

Funktionelle Untersuchung von genetischen Faktoren mit prognostischer Relevanz in der Onkologie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Anne Steinbach

aus Potsdam

2019

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Oktober 2014 bis April 2019 an der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln am Cologne Center for Genomics unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Dr. Michal-Ruth Schweiger angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Michal-Ruth Schweiger

Cologne Center for Genomics (CCG)
Universität zu Köln
Weyertal 115 b, 50931 Köln
Tel.: +49 221 478 96850
E-Mail: mschweig@uni-koeln.de

2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Institut für Biologie
Freie Universität Berlin
Königin-Luise-Straße 12-16, 14195 Berlin
Tel. +49 30 838 53116
E-Mail: rmutzel@zedat.fu-berlin.de

Disputation am 6.11.2019

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 KREBS UND EPIGENETIK	1
1.2 NICHT-KLEINZELIGES LUNGENKARZINOM	3
1.3 EGFR-SIGNALWEG	5
1.4 H3K4-METHYLTRANSFERASE <i>KMT2D</i>	8
1.5 CHROMATIN-BINDEPROTEIN <i>BRD4</i>	11
1.6 CRISPR CAS9 SYSTEM	14
1.7 ZIEL DER ARBEIT	17
2 MATERIAL UND METHODEN	19
2.1 MATERIALIEN	19
2.1.1 GERÄTE, MATERIALIEN UND CHEMIKALIEN	19
2.1.2 PRÄPARATIONSKITS.....	23
2.1.3 BAKTERIENSTÄMME UND –MEDIEN	24
2.1.4 OLIGONUKLEOTIDE	24
2.1.5 HUMANE ZELLINIEN, ZELLKULTURMEDIEN UND TRANSFEKTIONSMITTEL	27
2.1.6 CHEMOTHERAPEUTIKA	29
2.1.7 PUFFERLÖSUNGEN FÜR WESTERN BLOT ANALYSEN.....	29
2.1.8 ANTIKÖRPER	30
2.1.9 VEKTOREN	30
2.2 MIKROBIOLOGISCHE METHODEN	31
2.2.1 DESIGN SGRNÄS.....	31
2.2.2 PRÄPARATION UND KLONIERUNG DER SGRNÄS	34
2.2.3 (RE)-TRANSFORMATIONEN VON BAKTERIEN	38
2.2.4 ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA.....	38
2.2.5 DNA- UND RNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG MIT NANODROP.....	39
2.3 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	40
2.3.1 AUFTAUEN UND KULTIVIERUNG VON ZELLINIEN	40
2.3.2 TRANSFEKTION VON ZELLINIEN	41
2.3.2.1 TRANSFEKTION HUMANER ZELLINIEN MIT LIPOFECTAMINE 2000.....	41
2.3.2.2 TRANSFEKTION HUMANER ZELLINIEN MIT LIPOFECTAMINE LTX.....	41
2.3.2.3 TRANSFEKTION HUMANER ZELLINIEN MIT ATTRACTENE.....	42
2.3.2.4 TRANSFEKTION HUMANER ZELLINIEN MIT HiPERFECT	42
2.3.3 PUROMYCIN-SELEKTION	42
2.3.3.1 PUROMYCIN-SELEKTION VON CRISPR CAS9 TRANSFIZIERTEN ZELLEN	43
2.3.4 ZELLISOLIERUNG UND EXPANSION	43
2.3.5 KRYOKONSERVIERUNG VON ZELLEN	44
2.3.5.1 EINFRIEREN VON ZELLEN	44
2.3.5.2 EINFRIEREN VON MASTERPLATTEN.....	44
2.3.5.3 EINFRIEREN VON SCREENING-PLATTEN	45
2.3.6 PROLIFERATIONSEXPERIMENTE.....	45
2.3.6.1 ZELLZAHLBESTIMMUNG MIT HEMATOCYTOMETERN.....	45
2.3.6.2 AUTOMATISIERTE ZELLZAHLBESTIMMUNG.....	46
2.3.7 HITZESTRESSEXPERIMENTE.....	46

2.3.8 CHEMOTHERAPIE-BEHANDLUNGEN.....	47
2.3.8.1 CETUXIMAB	47
2.3.8.2 ERLOTINIB	48
2.3.9 ANALYSE DER ZELLVIABILITÄT.....	48
2.3.9.1 NEUTRALROT-TEST	48
2.4 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	49
2.4.1 PRIMERDESIGN	49
2.4.2 POLYMERASE-KETTENREAKTION	50
2.4.3 DNA-PRÄPARATION AUS HUMANEN ZELLINIEN	51
2.4.4 DNA-PRÄPARATION AUS 96 <i>WELL</i> -ZELLKULTURPLATTEN	52
2.4.4.1 DNA-EXTRAKTION MIT EINEM ZWEI-KOMPONENTEN-SYSTEM.....	52
2.4.4.2 EXTRAKTION MIT DEM <i>DIRECTPCR LYSIS</i> -ZELL-REAGENZ	53
2.4.4.3 DNA-EXTRAKTION OHNE VORHERGEHENDE LYSE DER ZELLEN	53
2.4.5 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	53
2.4.6 AUFREINIGUNG VON PCR-ANSÄTZEN UND GELEXTRAKTION.....	54
2.4.7 SANGER-SEQUENZIERUNG VON CRISPR CAS9-MUTANTEN.....	55
2.4.8 RNA-EXTRAKTION.....	56
2.4.9 cDNA-SYNTHESE	56
2.4.10 QUANTITATIVE ECHTZEIT-PCR-ANALYSE	57
2.5 PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	59
2.5.1 PROTEINEXTRAKTION.....	59
2.5.2 PROTEINBESTIMMUNG MIT BRADFORD	59
2.5.3 WESTERN BLOT ANALYSEN	60
2.5.3.1 SDS-POLYACRYLAMIDGELELEKTROPHORESE	60
2.5.3.2 WESTERN BLOT	61
2.5.3.3 WESTERN-BLOT ANALYSE BEI GROßEN PROTEINEN	62
2.5.4 IMMUNDETEKTION	63
2.6 BIOINFORMATISCHE ANALYSEN.....	64
2.6.1 CHROMATIN-IMMUNPRÄZIPITATION-DNA-SEQUENZIERUNGS-ANALYSEN.....	64
2.6.2 SIGNALWEG ANALYSEN	65
2.6.3 STATISTISCHE ANALYSEN	66
3 ERGEBNISSE.....	67
3.1 ETABLIERUNG DER CRISPR CAS9 VERMITTELTE GENOM-EDITIERUNG IN HUMANEN ZELLINIEN	67
3.1.1 ETABLIERUNG DER TRANSFEKTIONSEFFIZIENZEN IN HCC827- UND WI38-ZELLEN	67
3.1.2 DEFINITION DER EXPERIMENTELLEN KONDITIONEN ZUR PUROMYCIN-SELEKTION IN HCC827- UND WI38-ZELLEN.....	69
3.1.3 METHODENOPTIMIERUNG ZUR ISOLATION GENOMISCHER DNA BEI GERINGEN ZELLZAHLEN.....	71
3.1.4 SCREENING UND VALIDIERUNG VON CRISPR CAS9 INDUZIERTEN MUTATIONEN	73
3.1.5 VALIDIERUNG DER GENERIERTEN MUTATIONEN MITTELS SANGER-SEQUENZIERUNG	81
3.2 EXPRESSIONSANALYSE VON KMT2D UND BRD4 IN CRISPR CAS9 MODIFIZIERTE ZELLINIEN.....	82
3.2.1 EXPRESSIONSANALYSE IN <i>KMT2D</i> -MUTANTEN	83
3.2.2 EXPRESSIONSANALYSE IN <i>BRD4</i> -MUTANTEN	83
3.3 ZELLWACHSTUM UND MORPHOLOGIE	84
3.3.1 ERMITTLUNG VON UNTERSCHIEDEN IN DER MORPHOLOGIE BEI ZELLINIEN MIT MONOALLELISCHER DELETION	84
3.3.2 UNTERSUCHUNG DER ZELLPROLIFERATION BEI <i>KMT2D</i> -MUTATIONEN.....	86
3.4 SIGNALWEG-ANALYSEN.....	88

3.5 ANALYSE DER METHYLIERUNGSMODIFIKATION VON HISTON H3 LYSIN 4 (H3K4) UND HISTON H3 LYSIN 27 (H3K27)	94
3.6 UNTERSUCHUNG DER STRESSANTWORT IN <i>KMT2D</i>- UND <i>BRD4</i>-MUTIERTEN ZELLINIEN.....	97
3.6.1 VERÄNDERUNG DER H3K4ME3- UND H3K27ME3-METHYLIERUNG DURCH HITZESTRESS	98
3.6.2 UNTERSUCHUNG DES EINFLUSSES VON HITZESTRESS AUF DIE ZELLVIABILITÄT.....	102
3.7 ABERRANTE EXPRESSION VON U2 SNRNP ASSOZIIERTEN GENEN IN DEN <i>KMT2D</i>- UND <i>BRD4</i>-MUTANTEN	104
3.8 BESTIMMUNG VON ZELLVIABILITÄTSUNTERSCHIEDEN DER <i>KMT2D</i>-MUTANTEN NACH DER APPLIKATION VON CHEMOTHERAPEUTIKA.....	110
3.8.1 EINFLUSS VON CETUXIMAB AUF DIE ZELLVIABILITÄT BEI <i>KMT2D</i> -INDUZIERTEN MUTATIONEN.....	110
3.8.2 EINFLUSS VON ERLOTINIB AUF DIE ZELLVIABILITÄT BEI DELETIONEN IN <i>KMT2D</i>	118
4 DISKUSSION.....	125
4.1 ETABLIERUNG VON STABILEN NSCLC-ZELLINIEN MIT DELETION IN DEN GENEN <i>KMT2D</i> UND <i>BRD4</i>.....	125
4.2 UNTERSUCHUNG ZUM METHYLIERUNGSPROFIL BEI <i>KMT2D</i>- UND <i>BRD4</i>-INDUZIERTEN MUTATIONEN	130
4.3 EXPRESSION U2 SNRNP-ASSOZIIERTER GENE WIRD DURCH EINE ABERRANTE <i>KMT2D</i>- FUNKTION BEEINFLUSST	137
4.4 ABERRANTE <i>KMT2D</i>-EXPRESSIONEN FÜHREN TEILWEISE ZU EINER ERHÖHTEN SENSITIVITÄT GEGENÜBER CETUXIMAB UND ERLOTINIB..	140
ZUSAMMENFASSUNG	147
SUMMARY.....	149
LITERATURVERZEICHNIS	151
ANHANG.....	175
EIGENSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	187

Abkürzungsverzeichnis

A76	HCC827 <i>KMT2D</i> -Mutante	Glu	Glutamin
Akt	Proteinkinase B	GO	<i>Gene Ontology</i>
ALL	akute lymphatische Leukämie	h	Stunde
Amp	Ampicillin	HDR	<i>homology directed repair pathway</i>
ASH2	<i>Like, Histone Lysine Methyltransferase Complex Subunit</i>	HR	Homologe Rekombination
B6	HCC827 <i>KMT2D</i> -Mutante	IC₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
bp	Basenpaar	InDel	Insertion/Deletion
BRD4	<i>bromodomain-containing protein 4</i>	kb	Kilobasen
BSA	Bovine Serum Albumin	KMT2D	<i>Histone-lysine N-methyltransferase 2D</i>
CAS9	<i>CRISPR associated protein</i>	Konz.	Konzentration
ChIP-Seqs	Chromatin-Immunpräzipitation-DNA-Sequenzierungen	LB	Lysogensäurebrühe (<i>lysogeny broth</i>)
CRISPR	<i>Clustered Regularly Interspaced Short Palendromic Repeat</i>	LB-Agar	Lysogensäurebrühe-Agarose Gemisch
crRNA	endogene bakterielle RNA, die an die Zielsequenz bindet	MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
dCAS	<i>death CAS9</i>	max	maximal
ddH₂O	destilliertes Wasser	min	Minute
del	Deletion	mt	Mutante
DMSO	Dimethylsulfoxid	n.s.	nicht signifikant
DNA	Desoxyribonukleinsäure	NCOA6	<i>Nuclear Receptor Coactivator 6</i>
DPY30	<i>Histone Methyltransferase Complex Regulatory Subunit</i>	NEST	<i>Network neighborhood-based entity set</i>
DSB	Doppelstrangbruch	NGS	<i>next generation sequencing</i>
dsODN	doppelsträngiges Oligonukleotid-Fragment	NHEJ	<i>non-homologous end-joining repair pathway</i>
E114	Wi38 <i>BRD4</i> -Mutante	NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
E87	Wi38 <i>BRD4</i> -Mutante	nt	Nukleotid
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>	Oligos	Oligonukletide
ERK	extrazelluläre Signal-regulierende Kinase	ORF	<i>Open Reading Frame</i>
etvl.	eventuell	PA1	<i>PAXIP1 Associated Glutamate Rich Protein 1</i>
FCS	Fötales Kälberserum	PAM	<i>Protospacer Adjacent Motif</i>
FW	Vorwärts- (<i>Forward</i>) Primer	Pen/Step	Penicillin-Streptomycin
GDSC	<i>Genomics of Drug Sensitivity in Cancer</i>	PI3K	Phosphatidylinosit-3-Kinase

Abkürzungsverzeichnis

PKC	Proteinkinase C
PLCγ1	Phospholipase C gamma 1
PTIP	<i>PAX Interacting Protein 1</i>
Puro	Puromycin
qPCR	<i>real-time quantitative PCR</i>
RbBP5	<i>RB Binding Protein 5, Histone Lysine Methyltransferase Complex Subunit</i>
rpm	Umdrehung pro Minute
RV	Rück- (<i>Reverse</i>) Primer
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
sgRNA	<i>single guide RNA</i>
ssODN	einzelsträngiges Oligonukleotid-Fragment
STAT	Signaltransduzierer und Aktivator der Transkription
Std	Stunde
T7E1	T7-Endonuklease-Assay
tracrRNA	endogene bakterielle RNA, die die crRNA mit der CAS9-Nuklease verbindet
TSS	Transkriptionsstartseite
UTR	untranslatierte Region
UTX	<i>Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome</i>
WDR5	<i>WD Repeat Domain 5</i>
wt	Wildtyp
α	alpha
γ	gamma
H₂O₂	Wasserstoffperoxid

1 Einleitung

1.1 Krebs und Epigenetik

Epigenetik ist ein Schlüsselmechanismus, der die Regulation des Aktivitätszustands in der Expression von Genen definiert ohne dabei die DNA-Sequenz selbst zu modifizieren. Epigenetische Veränderungen umfassen Prozesse wie die DNA-Methylierung oder Histonmodifikationen, die polyvalent die Aktivität bzw. die Repression von Genen in diversen zellulären Prozessen regulieren, wobei Fehlfunktionen die Entwicklung verschiedener Krankheiten wie z.B. Krebs verursachen können (Kouzarides, 2007; Portella et al., 2010). Der Prozess der DNA-Methylierung erfolgt an CpG-Dinukleotiden. Genregionen, die eine hohe Dichte an CpGs aufweisen sogenannte CpG-Inseln, sind zu etwa 60 % mit Promotorfunktionen assoziiert. Die Funktionalität der CpG-Inseln äußert sich in der Regulation der Genexpression und in der Stummschaltung von Genen, bei der sie eine wichtige Rolle spielen (Portella et al, 2010). Die große Mehrheit der CpG-Inseln ist in allen Entwicklungsstadien und in gesundem Gewebe unmethyliert. Nur ungefähr 6 % der CpG-Inseln werden gewebespezifisch während der frühen Entwicklungsphasen oder in bereits ausdifferenzierten Gewebe methyliert (Straussman et al., 2009). Bei der Methylierung der CpG-Inseln wird eine Methylgruppe kovalent von einem S-Adenosylmethionin an die C-5-Position des Cytosins mit Hilfe einer DNA-Methyltransferase übertragen (Shamsi et al., 2017). Durch eine epigenetische Deregulierung kann es entweder zur Hypo- oder zur Hypermethylierung von Promotorregionen kommen. Eine Promotor-Hypermethylierung kann eine aberrante transkriptionale Inaktivierung hervorrufen und ein Stummschalten von Tumorsuppressorgenen und apoptotischen Genen nach sich ziehen, während bei einer Hypomethylierung eine chromosomale Instabilität und eine Onkogenaktivierung erfolgen kann (Feinberg et al., 2004). Die DNA-Methylierung ist dabei nicht exklusiv auf CpG-Inseln beschränkt, sondern konnte auch in Regionen den sogenannten CpG-Küsten (*shores*) festgestellt werden. Diese werden ebenfalls mit einer Inaktivierung der Transkription assoziiert (Irizarry et al., 2009).

DNA liegt in der Zelle während der Metaphase der Mitose in einer kondensierten Form als Chromatin vor, dessen Grundeinheit das Nukleosom bildet. Dieses besteht aus einem Oktamer aus jeweils zwei Molekülen der vier Histone -H3, -H4, -H2A und -H2B, um die die DNA 1.65 Mal gewickelt ist, was einer Länge von 146 bp entspricht. Das Oktamer unterteilt sich in zwei H2.A-

1 Einleitung

H2.B Dimere und zwei H3-H4 Dimere (Luger et al., 1997). Das weniger konservierte Histon H1 dient dabei zur Verknüpfung der einzelnen Nucleosomen. Histone besitzen einen aus bis zu 40 Aminosäuren bestehenden unstrukturierten N-terminalen Bereich, der vor allem an seinen Lysin- und Arginin-Resten verändert werden kann. Diese Veränderungen können in Form von posttranslationalen Modifikationen wie z.B. -Acetylierung, -Methylierung, -Phosphorylierung, -Ubiquitinierung oder -SUMOylierung erfolgen. Histonmodifikationen spielen eine wichtige Rolle in verschiedenen Prozessen wie der transkriptionalen Regulation, DNA-Reparatur und – Replikation sowie dem alternativen Spleißen (Huertas et al., 2009; Luco et al., 2010; Bannister et al., 2011). Am besten ist bisher die Histon-Methylierung von Lysin-Resten charakterisiert, wobei in erster Linie an H3K4, H3K9, H3K27, H3K36, H3K79 und H4K20 zahlreiche Untersuchungen erfolgten. Diese Modifikationen sind mit dem Chromatin assoziiert, das in zwei Bereiche unterteilt werden kann: 1. Transkriptionsaktives Euchromatin, das Acetylierungen an den Histonen und Tri-Methylierungen an H3K4, H3K36 oder H3K79 trägt und das die meisten aktiven Gene enthält und 2. Transkriptionsinaktives und hoch kondensiertes Heterochromatin, das vor allem Methylierungen an H3K9, H3K27 und H4K20 aufweist und hauptsächlich repressive Gene enthält (Li et al., 2007; Barski et al., 2007; Dawson et al., 2012). Dabei können in den jeweiligen Genen unterschiedliche Methylierungszustände auftreten. So konnte an den Transkriptionsstartseiten (TSS) von aktiven Promotoren eine H3K4me₂ oder H3K4me₃-Methylierung festgestellt werden. Im Gegensatz dazu sind aktive *Enhancer* durch eine H3K4me₁-Methylierung gekennzeichnet (Heintzman et al., 2007; Barski et al., 2007). Bei einigen Genen wurden auch sogenannte bivalente Domänen nachgewiesen, die sowohl aktivierende Markierungen wie H3K4me₃ als auch repressive Markierungen wie H3K27me₃ besitzen und die z.B. eine regulatorische Rolle bei der Differenzierung von embryonalen Stammzellen nahelegen (Bernstein et al., 2006). Eine Veränderung dieser epigenetischen Methylierungsmuster steht im Zusammenhang mit diversen Krankheiten wie z.B. Krebs. Krebszellen weisen im Vergleich zu normalen Zellen eine stark verzerrte globale epigenetische Veränderung der DNA-Methylierung, Histonmodifikation als auch der Expressionsprofile von Chromatin-modifizierenden Enzymen auf, die eine prägende Rolle bei der Entstehung und der Progression von Krebs spielen (Sharma et al., 2010). Diese Veränderungen der Methylierungsmuster können auf eine abweichende Expression oder Mutationen von Histon-Methyltransferasen und Histon-Demethylasen zurückgeführt werden. So wurde in aktuellen Studien gezeigt, dass die H3K4-Methyltransferase *KMT2D* häufig in Lungen-, Brust- oder Prostatakrebs mutiert ist (Ardeshir-Larijani, et al. 2018; Morcillo Garcia et al., 2018; Grasso et al., 2012). Morin et al., 2011 stellten in ihrer Studie in Sequenzierungsanalysen in 89 % der folliculären Lymphome (FL) und in 39 % der diffus großzelligen B-Zell-Lymphome (DLBCL) somatische Mutationen in *KMT2D* fest. In Studien über Nierenkarzinome erfolgten Nachweise über

inaktivierende Mutationen in den Methyltransferasen *SETD2* und den Histon-Demethylasen *UTX* und *KDM5C* (Dalglish et al., 2010). In anderen Studien wurde die Überexpression der H3K27-Methyltransferase *EZH2* bei unterschiedlichen Krebsarten nachgewiesen, u.a. beim nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom, bei Brust- und Prostatakrebs (Huqun et al., 2011; Yang et al., 2013; Crea et al., 2011; Hayden et al., 2011). Die funktionelle Relevanz von aberranten Histonmodifikationen, die eine Tumorentwicklung verursachen als auch die Bestimmung der zugrundeliegenden Mechanismen, die zu einer Deregulierung bei der Entstehung von Krebs führen, rücken zunehmend in den Fokus der Forschung. So demonstrierten Sharma et al. 2010 in ihren Studien einen durch die Struktur des Chromatins vermittelten medikamentenresistenten Zustand in Zell-Subpopulationen bei nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom-Zelllinien nach einer Behandlung mit Erlotinib und Cisplatin. Die Entwicklung einer Resistenz war in diesen Tumorzell-Subgruppen auf eine Überexpression der H3K4me3/2-Demethylase KDM5A zurückzuführen, die zu einer starken Reduktion der H3K4me3- und H3K4me2-Methylierung in diesen Zellen führte. Zudem zeigten diese Zell-Subpopulationen eine erhöhte Sensitivität gegenüber Histon-Deacetylase (HDAC) -Inhibitoren, was die tragende Rolle von epigenetischen Veränderungen im Verlauf einer Tumorentwicklung verdeutlicht.

1.2 Nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom

Die vom *Global Cancer Observatory* (GCO) 2018 publizierte Statistik über die Inzidenz und Mortalität von insgesamt 36 Krebsarten aus 185 Ländern zeigt, dass das Lungenkarzinom unabhängig von Geschlecht und Alter im Vergleich zu anderen Krebsarten die häufigste Todesursache weltweit ist (Bray et al., 2018; Abbildung 1.A). 2018 wurden 1,761,007 Todesfälle bei Lungenkarzinomen weltweit ermittelt, was einen Anteil von fast 18,6 % der krebsbedingten 9,6 Mio. Todesfälle ausmacht. Insgesamt wurden 18,1 Mio. Krebsfälle diagnostiziert, wobei in beiden Geschlechtern Lungenkarzinome zusammen mit Brustkrebs mit jeweils 11,6 % die häufigsten diagnostizierten Krebsarten sind (Abbildung 1.B). Bei Männern weisen Lungenkarzinome mit 27,1 % die höchste Mortalitätsrate auf, gefolgt von Leber- (12,7 %) und Magenkrebs (11,7 %). Auch bei der Inzidenzrate steht das Lungenkarzinom mit 31,5 % vor Prostatakrebs (29,3 %) und Darmkrebs mit 23,6 % an der ersten Stelle. Bei Frauen konnte die höchste Mortalitätsrate aller tumorbedingter Todesfälle bei Brustkrebs mit 16,6 % festgestellt werden. Lungenkarzinome folgen als zweit häufigste Todesursache mit 11,2 %. 2018 wurde Brustkrebs als häufigste diagnostizierte Krebsart mit 46,3 % angeführt. Lungenkarzinome stehen hinter Darmkrebs (16,3 %) an dritter Stelle mit ca. 14,6 %.

1 Einleitung

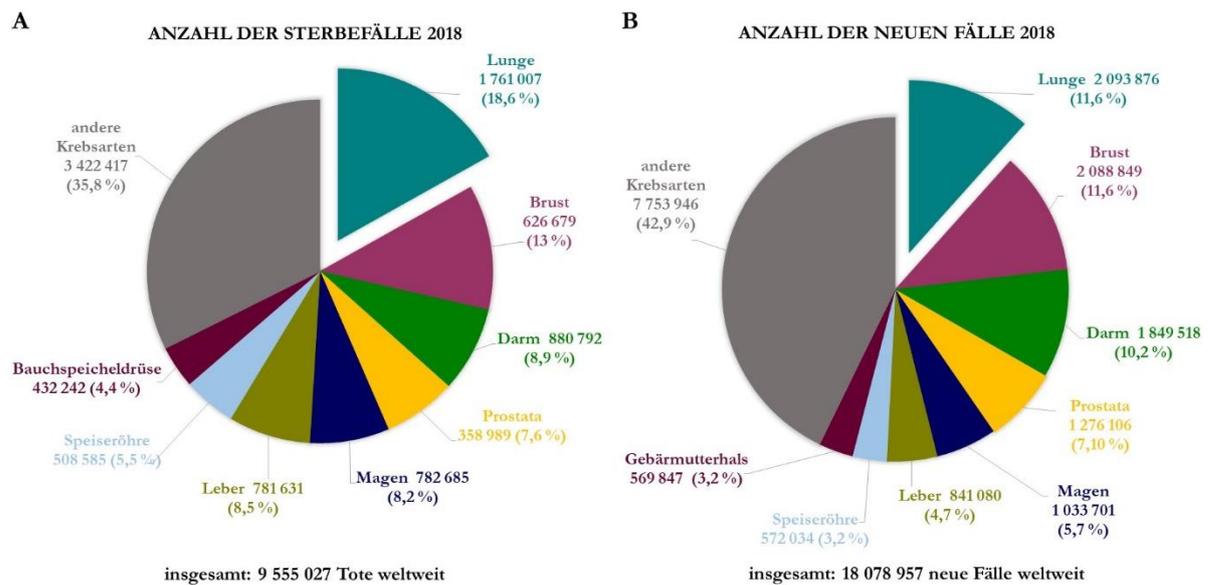


Abb. 1: Statistik der häufigsten Krebsarten weltweit, zusammengefasst für beide Geschlechter und aller Altersgruppen. A: Übersicht der Todesfälle 2018. B: Übersicht der Gesamtzahl neuer bekannter Krebsfälle. Die Daten stammen vom *Global Cancer Observatory* (GCO) der interaktiven Web-basierten Plattform der Internationalen Agentur für Krebsforschung (der Weltgesundheitsorganisation WHO), die 2018 publiziert wurden (www.iarc.fr; Datengrundlage GLOBOCAN2018).

Die Häufigkeit der Diagnose als auch die Todesursachen unterschieden sich in den jeweiligen Ländern. Diese hängen vom Entwicklungsstand des Landes und den damit verbundenen sozialen Bedingungen und in erster Linie den Lebensbedingungen ab, die eine Aufstellung der Daten über neue Krebsfälle und Todesfälle ermöglicht. Die Hauptursache für die Entstehung von Lungenkarzinomen ist auf Tabakkonsum zurückzuführen. In den letzten Jahren nahm der Anteil von Patienten mit einem Lungenkarzinom in Entwicklungsländern bei einem gleichzeitig steigenden Zigarettenkonsum stark zu (Sun et al., 2007). Raucher haben im Vergleich zu Nichtrauchern ein 10-20 Mal höheres Risiko an Lungenkarzinomen zu erkranken. Die Entwicklung eines Lungenkarzinoms ist allerdings auf multifaktorielle Ursachen zurückzuführen. 25 % der Betroffenen weltweit sind Nichtraucher. Zu dieser Kategorie zählen Patienten, die im Leben weniger als 100 Zigaretten geraucht haben (Sun et al., 2007). Die hohe Inzidenzrate von Lungenkarzinomen bei chinesischen Frauen beispielsweise ist auf die Inhalation von Holzkohle beim Heizen und Kochen zurückzuführen und weicht damit von der Hauptursache ab, da diese nur eine geringe Prävalenz beim Rauchen aufweisen (Bray et al., 2018). Weitere Ursachen können ökologische, berufliche und genetische Faktoren darstellen, aber auch Asbest, Radon, Schwermetalle, Infektion mit humanen Papillomaviren als auch Außenluftschadstoffe, frühere Dispositionen oder Ernährungsfaktoren können eine wesentliche Rolle spielen (Subramanian et

al., 2007; Bofetta, 2006). Nach Angaben der *American Cancer Society* werden Lungenkarzinome bei den meisten Betroffenen ab einem Alter von 65 Jahren diagnostiziert, das Durchschnittsalter bei der Diagnose beträgt in etwa 70 Jahre. Nur eine kleinere Anzahl von Patienten ist bei der Diagnose unter 45 Jahren alt. Im Vergleich zu anderen Krebsarten beträgt die 5-Jahres-Überlebensrate bei Lungenkarzinomen in Europa 13 %. In den USA ist diese mit 19 % nur unwesentlich höher, wobei diese sehr stark vom Zeitpunkt der Diagnose und vom Entwicklungsstadium des Tumors abhängt (Siegel et al., 2019; Aggarwal et al., 2016). Gründe liegen vornehmlich in der späten Diagnose bei einem fortgeschrittenen Stadium, einer schlechten Prognose, sozioökonomische Ungleichheit durch eine unzugängliche Gesundheitsversorgung und vor allem limitierte Therapiemöglichkeiten (Halpern et al., 2008; Berglund et al. 2010). Lungenkarzinome untergliedern sich in das kleinzellige Karzinom (SCLC, *small cell lung cancer*) mit einem Anteil von 15 % und das nicht-kleinzellige Karzinom (NSCLC; *non-small cell lung cancer*), das mit 85 % die Mehrheit der Fälle ausmacht. Entsprechend der pathologischen Phänotypen wird NSCLC weiterhin in Adenokarzinom (50 %), Plattenepithelkarzinom (30 %) und Großzelliges-Lungenkarzinom (20 %) kategorisiert (Ansari et al., 2016; Langevin et al., 2015; Herbst et al., 2008). Lungenkarzinome werden nach den international festgelegten Standards der internationalen Vereinigung gegen Krebs (UICC= *Union for International Cancer Control*) und nach der TMN-Klassifikation (Tumor-Nodus-Metastasen) eingeordnet (Detterbeck, 2018). Charakteristisch ist die häufige Ausprägung einer Chemotherapieresistenz, so dass die mittlere Überlebenszeit bei einem fortgeschrittenen Stadium unter Verwendung einer Standardtherapie in etwa 12 Monate beträgt (Aggarwal et al., 2016; Chen et al., 2018).

1.3 EGFR-Signalweg

Die Entwicklung eines Lungenkarzinoms umfasst polyvalente Wechselwirkungen von genetischen, epigenetischen als auch von Umweltfaktoren, die zu einer Deregulierung von beteiligten Onkogenen und Tumorsuppressorgenen führen, und damit krebsfördernde Signalwege progressiv aktivieren. Ein Kennzeichen von Lungenkarzinomen ist die durch DNA-Hypermethylierung bedingte Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen in einem frühen karzinogenen Stadium. Die Gesamtanzahl hypermethylierter Gene und explizit die Promotoren-Methylierung von Tumorsuppressorgenen summiert sich beim Fortschreiten in der neoplastischen Progression bis hin zu einem Lungenkarzinom. Die Inaktivierung der Tumorsuppressorgene kann durch Mutationen in den Promotoren verursacht werden, was Konsequenzen in dessen Methylierung nach sich zieht (Hulbert et al., 2017; Belinsky et al., 2006; Chung et al., 2011).

1 Einleitung

In der letzten Dekade wurden mehrere molekulare Aberrationen in einen Zusammenhang mit dem Wachstum, der Invasion oder der Metastasierung von Lungenkarzinomen wie dem Adenokarzinom gebracht. Dazu zählen u.a. Mutationen des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), die im Mittelpunkt zielgerichteter Therapieansätze stehen (Greulich, 2010). EGFR, auch als ERBB1 (*erythroblastic leukemia viral oncogene homolog*) oder HER1 (*human epidermal growth factor receptor 1*) bekannt, ist ein Transmembranrezeptor mit einer intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne und gehört zur ERBB-Rezeptorfamilie, zu der auch ERBB2 / HER2 / NEU, ERBB3 / HER3 und ERBB4 / HER4 zählen (Pines et al., 2010). Durch eine Bindung des Liganden EGF erfolgt die Dimerisierung von EGFR mit einer nachfolgenden Transautophosphorylierung des C-terminalen Endes, was die Aktivierung der Signaltransduktion von mehreren Signalwegen wie STAT, ERK1/2-MAPK, PI3K-AKT oder PLC γ 1-PKC bewirkt und somit Auswirkung auf das Zellwachstum als auch u.a. auf die Induktion der Apoptose, Migration oder Differenzierung hat (Collisson et al., 2014; Zhang et al., 2006; Brand et al., 2011). Eine Verbindung zwischen EGFR und Krebs wurde erstmals in den 80er Jahren als transformierendes v-ErbB-Onkogen des Erythroblastosevirus bei Vögeln entdeckt, dass ein Homolog des humanen EGFR ist (Downward et al., 1984; Ullrich et al., 1984). Das v-ErbB-Onkogen wies dabei Rekombinationen der Transmembranen und zytoplasmatischen EGFR-Domäne auf (Olofsson et al., 1986). Zudem ist bekannt, dass EGFR bei verschiedenen Tumoren hochreguliert ist und in einer mutierten Form vorliegt, was das Fortschreiten einer Krebsentwicklung vorantreibt und mit einer schlechten Prognose assoziiert ist (Nicholson et al., 2001; Brand et al., 2011). Bereits Ende 1987 stellten Veale et al. fest, dass eine Überexpression von EGFR in einem Zusammenhang mit NSCLC gebracht werden kann und ein geeignetes Ziel für eine Krebstherapie darstellt. Veränderungen der EGFR Tyrosinkinase-Aktivität äußern sich in einer erhöhten Zellproliferation, Migration, verminderter Apoptose, Angiogenese und einer verstärkten Metastasierung (Wee et al., 2017).

Im Mittelpunkt neu entwickelter gezielter Therapien steht die Inaktivierung und Herunterregulation von EGFR, um das Tumorwachstum zu hemmen. Man unterscheidet bei den gängigen Chemotherapien zwei Klassen: Die erste Klasse zielt auf die Hemmung der Tyrosinkinase-Aktivität ab. Bei den reversibel bindenden Tyrosinkinase-Inhibitoren (TKI) wie Erlotinib (Tarceva), Lapatinib (Tykerb) oder Gefintinib (Iressa) handelt es sich um niedermolekulare Wirkstoffe, die die ATP-Bindungsstelle in der EGFR-Tyrosinkinase-Domäne kompetitiv binden und so die Autophosphorylierung der Tyrosin-Reste verhindert. Die nachfolgende Signaltransduktion wird dadurch unterbunden (Chong et al., 2013). Bei Patienten mit

einer EGFR-positiven Mutation konnte eine erhöhte Sensitivität gegenüber Gefitinib und Erlotinib festgestellt werden, die derzeit vorrangig in der Anwendung bei Adenokarzinom-Behandlungen sind. 85 % dieser aktivierenden EGFR-Mutationen sind entweder eine auf Exon 21 lokalisierte L858R *Missense*-Mutation oder auf Exon 19 lokalisierte Mutationen in Form von kleinen Deletionsvarianten zurückzuführen (Zhou et al., 2011; El-Telbany et al., 2012). Diese Art von Mutationen wurden vornehmlich in einer Subgruppe von weiblichen Adenokarzinom-Patienten entdeckt, die in der Regel nie oder nur wenig geraucht haben (El-Telbany et al., 2012; Sonobe et al., 2005; Shigematsu et al., 2005). Die zweite Klasse umfassen monoklonale Antikörper wie Panitumumab (Vectibix) und Cetuximab (Erbix), wobei Cetuximab eine 10 Mal höhere Affinität zur extrazellulären EGFR-Bindedomäne aufweist als der EGF-Ligand und diesen effektiv verdrängt (Mazzarella et al., 2017; Martinelli et al., 2007). Durch die Bindung des chimären monoklonalen Antikörpers Cetuximab an die extrazelluläre Domäne III des EGF-Rezeptors wird die Aktivierung durch eine sterische Konformationsänderung bei der Dimerisierung verhindert, wodurch die Liganden-induzierte Tyrosinkinase-abhängige Phosphorylierung des Rezeptors inhibiert wird und die Signaltransduktion nicht mehr erfolgen kann (Li et al., 2005). Außerdem bewirkt die Bindung die Einleitung der Internalisierung des Rezeptors, wodurch eine Zytotoxizitätskaskade in den Krebszellen ausgelöst wird, die zur Apoptose führt (Camponelli et al., 2010). Da in mehreren Studien die Überlebensrate durch die Anwendung von Cetuximab nur unwesentlich um ca. einen Monat bei NCSLC-Patienten verlängert wurde und diese keinen signifikant positiven Unterschied im Vergleich zur Standard-Chemotherapie aufwies, zählt Cetuximab derzeit nicht zur Standardanwendung bei Patienten mit einem Lungenkarzinom (Lynch et al., 2010; Sgambato et al., 2014; Mazarella et al., 2018). In der Regel erfolgt die Anwendung von EGFR-Inhibitoren als Monotherapie oder auch als Kombinationsanwendung zusammen mit einer zytotoxischen Chemotherapie oder einer Hochdosisbestrahlung. Ein entscheidendes Problem bei der Behandlung mit TKI stellt die Entwicklung von Resistenzen bei EGFR-Mutationen tragenden Patienten im Laufe einer Therapie dar. Andere Gründe für ein Ausbleiben des Ansprechens auf eine Therapie sind auf die Präsenz von Resistenzmutationen bereits zum Zeitpunkt der Diagnose zurückzuführen (Chong et al., 2013). Resistenzmechanismen werden dabei in vier Kategorien untergliedert: 1. EGFR-Mutationen, die einen Arzneimittel-resistenten Zustand induzieren, 2. Die onkogene Verschiebung oder Aktivierung eines alternativen Signalwegs; 3. Beeinträchtigung der TKI-vermittelten Apoptose; 4. Histologische Transformationen hin zu einem kleinzelligen Lungenkarzinom oder zu einem epithelial-mesenchymalem Übergang (Yu et al., 2013; Lee et al., 2013). Die häufigste Mutation, die mit einer Resistenzentwicklung gegen EGFR-TKI in Verbindung gebracht wird, ist T790M. Diese Mutation führt zu einer gesteigerten ATP-Kinase-Affinität, die dadurch die Sensitivität der kompetitiven Inhibitoren drastisch herabsetzt (Yun et al.,

2008; Pao et al., 2005; Zhou et al., 2009). Eine potentielle Lösung stellt die Entwicklung einer zweiten Generation von TKIs dar, die irreversibel die ATP-Binde-Domäne binden als auch eine Mutanten-spezifische Selektivität aufweisen. Zu dieser zweiten Generation zählen u.a. AZD9291, Selumetinib oder ASP8273, die in der klinischen Anwendung als Erstlinientherapie ein signifikantes Ansprechen und ein progressionsfreies Überleben von Patienten mit einer T790M-Mutation ermöglichen (Cross et al., 2014; Dienstmann et al., 2012; Richer et al., 2015).

1.4 H3K4-Methyltransferase *KMT2D*

Die Histon-Lysin N-Methyltransferase 2D (*KMT2D*), auch bekannt als *Mixed lineage leukemia 2* (*MLL2*) oder 4 (*MLL4*), ist beim Menschen auf dem Chromosom 12q13.12 lokalisiert. Das Gen besitzt insgesamt 54 Exons und gehört zur Familie der Histon H3 Lysin 4 (H3K4) Methyltransferasen, die eine stark konservierte im C-terminalen Bereich befindliche SET-Domäne (*Suppressor of variegation, Enhancer of zeste, Trithorax*) aufweisen (Abbildung 2; Dillon et al., 2005). Zu dieser Familie gehören die H3K4-Methyltransferasen *KMT2A-G*, die sich in ihrer molekularen Größe und der Domänenstruktur unterscheiden. Das *KMT2D*-Protein ist mit einer Größe von 5537 Aminosäuren (564 kDa) das größte der Familie. Durch die SET-Domäne erfolgt die Bindung und die anschließende Methylierung von H3K4, was die Kernfunktion dieser Histon-Methyltransferasen beinhaltet. Eine Ausnahme bildet hierbei *KMT2E*, bei dem die Methyltransferase-Aktivität fehlt (Rao et al., 2015). *KMT2D* verfügt über Bindungsmotive wie die HMG-Box (*High Mobility Group*) und ein LXXLL-Motiv, die ebenfalls häufig in Transkriptionsfaktoren und Co-Faktoren vorkommen (Plevine et al., 2005; Bustin, 1999). In Säugetieren ist *KMT2D* für die H3K4-Mono-Methylierung verantwortlich und weist eine funktionelle partielle Redundanz mit *KMT2C* auf (Lee et al. 2013; Vallianatos et. al, 2015).

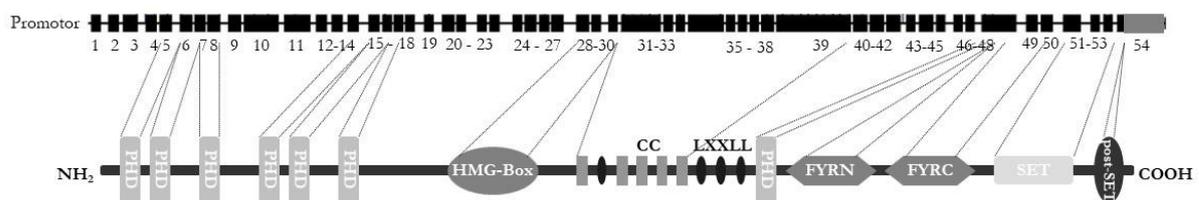


Abb.2: Struktur des Kandidatengens *KMT2D*. Oben: Die genomische Struktur des Gens besteht aus insgesamt 54 Exons (schwarze Quadrate). Die 3'UTR wird als graues Quadrat und die Introns als horizontale schwarze Striche dargestellt. Unten: Protein-Domänenstruktur. Die für die Funktionalität spezifische SET-Domäne befindet sich im C-terminalen Bereich des Proteins. PHD-Finger: *plant homeodomain finger*, HMG-Box: *high mobility group*, CC: *Coiled Coil*, LXXLL-Domäne: neun Kernrezeptor-Interaktionsmotive; FYRN: FY-reiche Domäne N-terminale Region, FYRC: FY-reiche Domäne C-terminale Region; SET-Domäne: *Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax*; PostSET: *Post-Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax* -Domäne. Abbildung modifiziert nach Micale et al., 2011.

KMT2D ist ein wichtiger epigenetischer Modifikator, der eine Rolle bei der epigenetischen transkriptionalen Regulation von *Enhancern* aktiv transkribierter Gene spielt (Hu et al., 2013). Dabei fungiert KMT2D ebenfalls als Indikator bei bivalent markierten Promotoren zusammen mit der repressiven H3K27me₃-Markierung (Malik et al., 2010; Denissov et al., 2014; Kaikokonen et al., 2013; Lee et al., 2013). KMT2D ist in polyvalente Prozesse involviert wie dem Zellwachstum, -Proliferation, -Adhäsion, Differenzierung, Metabolismus oder Migration und ist eng mit der DNA-Methylierung assoziiert (Issaeva et al., 2007; Froimchuk et al., 2017; Guo et al., 2013). KMT2D ist für die frühe Embryonalentwicklung elementar und wird in mehreren adulten Gewebe exprimiert. Bekannt wurde KMT2D im Zusammenhang mit dem Kabuki-Syndrom, einer monogenen Erkrankung. Charakteristisch für diese Krankheit sind Gesichtsanomalien, die an das Bühnen-Makeup des traditionellen Japanischen Theaters (Kabuki) erinnern. Prägend für das Kabuki-Syndrom sind in erster Linie Entwicklungsverzögerungen, Mikrocephalie, Skelettanomalien, viszerale und dermatoglyphische Anomalien, Herzanomalien und immunologische Defekte. Patienten mit einem Kabuki-Syndrom zeigen dabei ein großes Mutationsspektrum in *KMT2D*, zu denen vor allem verkürzte Varianten des Gens gehören (Micale et al., 2011). Des Weiteren wird beschrieben, dass KMT2D die Bindung von CBP und p300 an *Enhancer*-Regionen erleichtert, die diese aktivieren und mit H3K27ac markieren. Mit den assoziierten Transkriptionsfaktoren zieht dies die Rekrutierung von BRD4 nach sich, dass die Mediator- und RNA-PolymeraseII-Bindung als auch die Aktivierung der zelltypspezifischen Genexpression vermittelt (Froimchuk et al., 2017). KMT2D gehört zum COMPASS-ähnlichen Komplex, einem großen Proteinkomplex mit mehreren Untereinheiten, zu denen verschiedene Methyltransferasen und Demethylasen gehören wie z.B.: WDR5, RbBP5, ASH2 und DPY30. Zu diesem Komplex zählen weitere assoziierte Proteine wie NCOA6, PTIP, PA1 als auch die H3K27me₃ Demethylase UTX, die an der Regulation der Expression verschiedener Gene beteiligt sind (Michalak et al., 2016; Issaeva et al., 2007). In diesem Komplex dient KMT2D als Gerüstprotein und stabilisiert UTX, mit dem es im C-terminalen Bereich interagiert. Bei einigen Krebsarten wie beispielsweise Brustkrebs konnte bereits ein synergistischer Effekt der beiden Gene bei der Regulation der Genexpression hinsichtlich der Zellproliferation und Invasion nachgewiesen werden (Kim et al., 2014). Des Weiteren wurden Mutationen von *UTX* ebenfalls mit dem Kabuki-Syndrom assoziiert. Ein Verlust der Genfunktion von *UTX* und *KMT2D* verhindert eine normale Histon-Methylierung und unterbindet somit die korrekte Aktivierung bestimmter Gene, die letztlich zu den charakteristischen Anomalien in der Entwicklung dieser Krankheit führen (Cocciadiferro et al., 2018; Lederer et al., 2012; Börgerhausen et al., 2016; Laarhoven et al., 2015). *KMT2D* ist bei vielen

1 Einleitung

Krebsarten dereguliert oder nicht funktional wie z.B. bei DBLC (*diffuse large B cell lymphoma*), Brust-, Blasen-, Lungen- oder Prostatakrebs als auch Endometriumkarzinomen (Kandoth et al., 2013; Morcillo Garcia et al., 2018; Toska et al., 2017; Shidong et al., 2018; Ortega-Molina et al., 2015; Zhang et al., 2015). Bei den identifizierten Mutationen handelt es sich häufig um *Frameshift*- oder Nonsense-Mutationen (siehe Abbildung 3), die zu einem verkürzten Protein führen. Mutationen der SET-Domäne oder der PhD-Finger machen 37 % der gesamten *KMT2D*-Mutationen aus, während *Missense*-Mutationen in der SET-Domäne bei weniger als 1% der Patienten auftreten (Rao et al., 2015). In der Abbildung 3 wird das *KMT2D*-Mutationsspektrum aus insgesamt sieben NSCLC-Studien aus dem *cBioPortal for Cancer Genomics* dargestellt (Gao et al., 2013; Cerami et al., 2012).

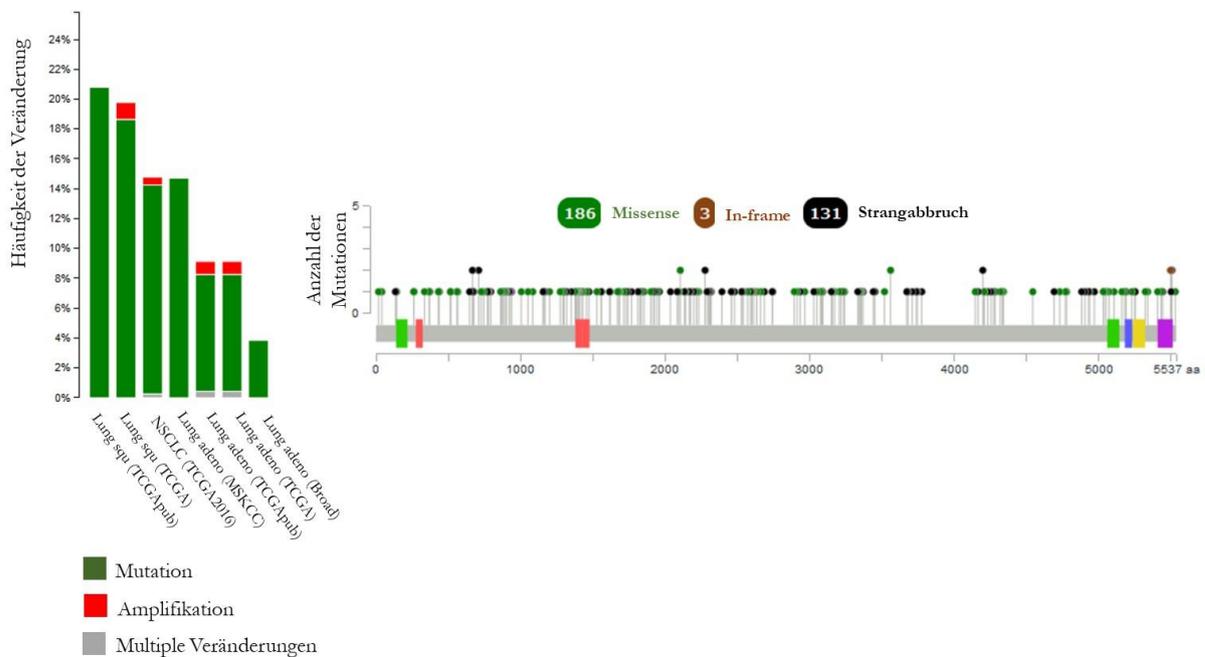


Abb.3: Visualisierung des *KMT2D*-Mutationsspektrums aus insgesamt sieben NSCLC-Studien. Links: In der Grafik wird die Frequenz der *KMT2D*-Veränderungen in der jeweiligen Studie dargestellt. Legende: grün: Mutationen; rot: Amplifikationen; grau: Multiple Veränderungen. Rechts: *KMT2D*-Lollipop Plot. In der Grafik werden die Lokalisationen der identifizierten Mutationen aus insgesamt sieben NSCLC-Studien auf dem linearisierten *KMT2D*-Protein kartiert. Der Hauptanteil der determinierten Mutationen sind *Missense*- und Strangabbruchmutationen. Legende: grün: *Missense*-Mutation; braun: Mutationen, die zu keiner Leserasterverschiebung führen; schwarz: Strangabbruch; Mutation führt zu einer Verkürzung des Proteins. Grafiken wurden nach dem *cBioPortal* des Memorial Sloan Kettering Cancer Center modifiziert (Quelle: MSK; <http://cbioportal.org>).

In soliden Tumoren wie dem Pankreas-Adenokarzinom ist *KMT2D* von elementarer Bedeutung für die Zellproliferation. Dabei konnte in einer Studie eine Korrelation zwischen einer verminderten *KMT2D*-Expression und einer erhöhten chemotherapeutischen Sensitivität festgestellt werden (Dawkins et al., 2016). Mutationen in *KMT2D* können zur Entwicklung von B-Zell-Lymphomen führen. *KMT2D* agiert hierbei als Tumorsuppressor zur Hemmung der

Tumorgenese und Metastasierung. Durch einen Verlust von *KMT2D* wird die Entwicklung der B-Zellen im Keimzentrum bereits in einem frühen Stadium gestört und die Lymphomogenese von Krebsvorläuferzellen gefördert (Ortega-Molina et al., 2015; Zhang et al., 2015). In WES-Analysen (*whole-exome sequencing*) wurde *KMT2D* als das am häufigsten mutierte Gen bei einer Kohorte chinesischer NSCLC-Patienten identifiziert, dabei wurde häufig ein Verlust der *KMT2D*-Expression beobachtet und insgesamt 11,4 % der Patienten wiesen Mutationen in *KMT2D* auf (Yin et al., 2014). Auch eine neuere Studie von 2018 verweist auf eine Verbindung zwischen *KMT2D*-Mutationen und einer schlechten Prognose bei NSCLC (Ardeshir-Larijani et al., 2018). Obwohl der genaue Mechanismus bisher noch unklar ist, scheinen *KMT2D*-Mutationen in einem engen Zusammenhang mit einer Progression von Tumoren zu stehen, da Mutationen in *KMT2D* häufig zu einer genomischen Instabilität und zu einem Transkriptionsstress führen, die als treibende Kraft bei der Tumorentstehung fungieren können (Kantidakis et al., 2016).

1.5 Chromatin-Bindeprotein *BRD4*

Ein weiteres Gen, das im Focus dieser Arbeit steht, ist *BRD4*, das zur Familie der BET-Proteine zählt (*bromodomains and extra terminal domain*) und auf dem Chromosom 19p13.12 lokalisiert ist. Charakteristisch für die Vertreter dieser Familie, denen auch BRD2, BRD3 und BRT angehören, sind zwei Tandem Bromo-Domänen und eine Extraterminale-Domäne (ET-Domäne; Abbildung 4; Chiang, 2009). Die Bromo-Domänen dienen zur Bindung an Acetyl-Resten an die Histone H3 und H4, wo BRD4 die acetylierten epigenetischen Markierungen von z.B. H3K14, H3K27, H4K5, H4K8 oder H4K12 abliest und transkriptionsregulatorische Komplexe an die Histone rekrutiert (Filippakopoulos et al., 2012; Dey et al., 2003; Floyd et al., 2013). Dadurch spielt *BRD4* eine elementare Rolle bei der Regulation des Transkriptionsprozesses und ist an der Modifikation und Umstrukturierung des Chromatins maßgeblich beteiligt (Junwei et al., 2014; Devaiah et al., 2016).

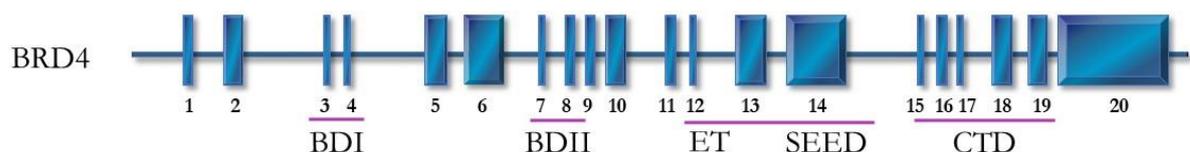


Abb.4: Struktur des Kandidatengens *BRD4*. Die genomische Struktur des Gens besteht aus insgesamt 20 Exons. Introns werden als horizontale blaue Linien dargestellt. Die Lokalisation der charakteristisch funktionellen Domänen wird durch die violette Markierung gekennzeichnet. Legende: BD: Bromo-Domäne; ET: Extraterminale-Domäne; SEED: Ser/Glu/Asp-reiche Region; CTD: Carboxyterminale Domäne.

1 Einleitung

Die Funktionalität von *BRD4* äußert sich in vielfältiger Weise wie z.B. in der Regulation des Zellzyklus, der Replikation, DNA-Reparatur oder dem Zellwachstum (Wu et al., 2007). Houzelstein et al. 2002 stellten im Rahmen ihrer Studien fest, dass heterozygote Defekte in *BRD4* bei Mäusen zu prä- als auch postnatalen Wachstumsdefekten führen, die mit einer reduzierten Proliferationsrate verbunden waren. Diesen Effekt wiesen Houzelstein et al. auch in Zellkulturexperimenten nach und ermittelten in weiterführenden Experimenten bei einem homozygoten Verlust eine unmittelbare Letalität in Mausembryonen, womit sie eine grundlegende Rolle von *BRD4* bei zellulären Prozessen belegten. Des Weiteren führt eine Herunterregulation von *BRD4* durch eine damit einhergehende Repression von Cyclin *D1*, *D2*, *E1*, *E2* und einer verminderten Phosphorylierung von *pRb* im Zellzyklus zu einem G1-Arrest (*Gap1*) und induziert den Apoptoseprozess (Zhang et al., 2008; Ottinger et al., 2006; Dey et al., 2009). Weitere Studien verweisen auf die Bindung von *BRD4* an Promotoren und Super-*Enhancern* und verdeutlichen dadurch eine Verbindung zur Regulation der Genexpression (Lovén et al., 2013). Zudem ist *BRD4* aktiv an der Regulation der Elongation beteiligt (Chiang, 2009). In einer Studie von Pongas et al. 2017 konnte gezeigt werden, dass das hochregulierte *CHK1* (*Checkpoint kinase 1*) in einem Eierstockkrebs-Subtyp durch eine Suppression von *BRD4* u.a. mit Hilfe des I-BET-Inhibitors JQ1, die Zytotoxizität der *CHK1*-Inhibierung verstärkte und zu einer Erhöhung der Anti-Tumoraktivität führte. Zudem war in diesem Subtyp die *BRD4*-Expression hochreguliert und korrelierte mit einer, wenn auch gering gesteigerten Gesamtüberlebenswahrscheinlichkeit der Patienten. Im Gegensatz dazu wurde in Darmkrebsstudien eine Hypermethylierung des *BRD4*-Promotors beobachtet, die zu einer Repression der RNA-Expression von *BRD4* in den untersuchten Darmkrebszelllinien und Primär-Tumoren führte. Die Wiederherstellung der *BRD4*-Expression reduzierte die Tumorgenese in den Zelllinien (Rodriquez et al., 2012). Inaktivierung oder Herabregulation der *BRD4*-Expression und der damit verbundenen Hemmung der Tumorentwicklung rücken *BRD4* zunehmend in den Focus bei der Behandlung von diversen Krebsarten. In den vergangenen Jahren wurden zahlreiche *BRD4*-Inhibitoren untersucht, von denen sich verschiedene in der klinischen Phase befinden (Duan et al., 2018; Klingbeil et al., 2016). Anhand der Wechselwirkung zu den Bromo-Domänen werden zwei Klassen der *BRD4*-Inhibitoren unterschieden. Bei den monovalenten *BRD4*-Inhibitoren erfolgt die Bindung an die jeweilige Bromo-Domäne separat, während bei bivalenten *BRD4*-Inhibitoren beide Bromo-Domänen gleichzeitig angegriffen werden. Die häufigsten untersuchten *BRD4*-Inhibitoren sind monovalent. Dazu gehören die auf Trizoloazepin-basierenden Inhibitoren JQ1, TEN-010 oder OTX-015, die sich in den klinischen Studien der Phase-I vorwiegend bei der Behandlung hämatologischer Malignome befinden (Duan et al., 2018). Zu den bivalenten Inhibitoren zählen Triazolopyridazin-enthaltende Verbindung, die im Stande sind die Tandem Bromo-Domänen simultan zu binden wie z.B. AZD3514 oder der

weiter modifizierte AZD5153, bei denen ein Methoxy-substituiertes Triazolopyridazin als verstärktes Acetyl-Lysin bindendes Rückgrat fungiert (Waring et al., 2016; Bradbury et al., 2016). In Studien über Bauchspeicheldrüsenkrebs unterdrückte JQ1 die Tumor-Entwicklung bei Mausmodellen, indem es sowohl die Hemmung von Inflammationssignalen als auch die Myc-Aktivität unterdrückte. Zusammen mit dem HDAC-Inhibitor SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) verstärkte *BRD4* die Induktion der Apoptose bei einem fortgeschrittenen Stadium (Mazur et al., 2015). Die Funktionsweise von BET-Inhibitoren wie JQ1 erfolgt durch die erhöhte Affinität in der kompetitiven Bindung der Bromo-Domänen, die eine Verdrängung vom Chromatin verursachen (Prinjha et al., 2012). Mehrere Studien legen die therapeutische Wirkung von BET-Inhibitoren in diversen Mausmodellen dar wie z.B. bei AML (akute myeloische Leukämie), Multiples Myelom oder Lymphom (Dawson et al., 2011; Zuber et al., 2011; Delmore et al., 2011; Zhao et al., 2016). Therapeutische Effekte konnten ebenfalls in der Anwendung von BET-Inhibitoren bei NSCLC durch anti-proliferative Effekte nachgewiesen werden. Lockwood et al., 2012 untersuchten in ihrer Studie die Sensitivität von 17 Adenokarzinom-Zelllinien gegenüber JQ1, von denen insgesamt acht empfindlich auf eine JQ1-Behandlung reagierten und schlossen daraus, dass der Wirkungsmechanismus einer BET-Inhibierung vom epigenetischen Status der getesteten Zelllinien abhing. Lockwood et al., 2012 führten die anti-proliferativen Effekte der BET-Inhibierung auf die Herunterregulation des onkogenen Transkriptionsfaktors *FOSL1* zurück, der in den sensitiven Zelllinien sehr niedrig exprimiert war, wohingegen die resistent reagierenden Zelllinien hohe Expressionslevel von *FOSL1* aufwiesen. In einer Studie über die Evaluierung der Aktivität des BET-Inhibitors JQ1 in 12 KRAS-mutierten Zelllinien identifizierten Klingbeil et al., 2016 einen potenzierten Effekt in der BET-Inhibierung bei der Kombinationsanwendung von JQ1 und dem Apoptose-fördernden Chemotherapeutikum Cisplatin oder mit TRAIL (Tumor-Nekrose-Faktor abhängiger Apoptose-induzierter Ligand) in JQ1-sensitiven Zellen. Im Fall von JQ1-resistenten Zellen führte die Kombinationsbehandlung zu einem verringerten Tumorwachstum und förderte ebenfalls die Apoptose. Außerdem konnte ein erhöhter Anti-Tumor-Effekt in einem A549-Xenograft Modell nachgewiesen werden, bei dem eine Einzelbehandlung mit Cisplatin oder JQ1 nur eine limitierte Aktivität zeigte. Liao et al., 2016 stellten in NSCLC-Zelllinien und –Geweben eine *BRD4*-Überexpression fest, die mit einer höheren Invasion und Metastasierung verbunden war und die eine Korrelation mit einer schlechten Prognose in den NSCLC-Patienten aufwies. Eine *BRD4*-Suppression verursachte eine deutliche Beeinträchtigung der Zellinvasion und hemmte die Zellproliferation, die in einer beschleunigten Apoptose mündete. Gao et al., 2018 stellten darüber hinaus fest, dass eine *BRD4*-Suppression durch eine siRNA oder durch die Verwendung der BET-Inhibitoren JQ1 und I-BET151 das Wachstum in NSCLC unterdrückte, dabei erfolgte gleichzeitig eine Herunterregulation der Expression des Elongationsfaktors eIF4E. Außerdem bewiesen Gao

et al., 2018, dass eine Überexpression von eIF4E die wachstumshemmende Wirkung von JQ1 aufhob und eine eIF4E-Herunterregulation die hemmenden Effekte von JQ1 verstärkte. Durch die entwicklungshemmende Wirkung, die durch eine Inaktivierung von *BRD4* hervorgerufen wird, wurde eine neue Generation von BRD4-Inhibitoren entwickelt, zu denen sogenannte PROTACS wie ARV-825 zählen. Diese kleinen, bi-funktionalen Moleküle führen eine selektive Degradierung der Zielproteine durch und weisen damit deutliche Vorteile in einer effizienteren Antikrebs-Aktivität gegenüber der herkömmlichen BRD4-Inhibierung auf. PROTACs bestehen aus einem zielgerichteten Protein-spezifischen Liganden und einer E3-Ubiquitin-Ligase-Bindungsstelle, die miteinander verbunden sind. Durch die Bildung eines ternären Komplexes erfolgt die Bindung an das Zielprotein und gleichzeitig an die E3-Ubiquitin-Ligase, wodurch das Zielprotein durch die E3-Ligase ubiquitiniert wird und der Proteasomen-Abbau erfolgt (Churcher, 2018; Gadd et al., 2017). Lu et al., 2015 bewiesen in Burkitt-Lymphom-Studien mit ARV-825 eine effektivere Suppression der c-Myc-Expression im Vergleich zu herkömmlichen BRD4-Inhibitoren, die zu einer verminderten Zellproliferation und höheren Apoptoserate führte. Im Vergleich zu anderen BRD4-Inhibitoren wie JQ1 oder OTX015, erfolgte durch ARV-825 eine längere und stärker ausgeprägte Suppression der c-Myc-Expression bei einer deutlich niedriger eingesetzten Konzentration.

1.6 CRISPR CAS9 System

Das CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) CAS9 (*CRISPR-associated protein*) System ist ein genomisches Editierverfahren bei dem gezielt Veränderungen in Genom induziert werden können (Jinek et al., 2012). Gegenüber anderen Verfahren wie den Zinkfinger-Nukleasen und Talens (*Transcription Activator-Like-Effektor-Nukleasen*), die auf dem Prinzip einer Protein-DNA-Erkennung beruhen, erfolgt die CRISPR-Editierung auf Grundlage einer wesentlich effektiveren und präziseren RNA-DNA-Wechselwirkung und einer kovalenten Modifikation der DNA-Sequenz (Christian et al., 2010; Porteus et al., 2005; Urnov et al., 2005; Ding et al., 2013). Die Nachteile bestehen bei Zinkfinger-Nukleasen und Talens in erster Linie in einem komplizierteren Design und in der Validierung der Spezifität für die jeweilige Zielsequenz, während beim CRISPR CAS9 System lediglich die sgRNA-Sequenz entsprechend der Zielsequenz modifiziert werden muss, um verschiedene Bereiche im Genom zu editieren (Gupta et al., 2014). Das CRISPR CAS9 System stammt aus Archaeen und Bakterien, wo es als adaptives Immunsystem zur Abwehr von invasiven Phagen und Plasmiden genutzt wird. Dabei werden Teile der invasiven DNA oder RNA als *Spacer*-Sequenz in die genomeigenen CRISPR-Arrays integriert, um bei einem

erneuten pathogenen Befall eine komplementär an die fremde Nukleotidsequenz bindende crRNA (*CRISPR RNA*) zu bilden, und so ein spezifisches Schneiden durch die CAS9-Nuklease zu ermöglichen (Doudna und Charpentier, 2014). Insgesamt existieren drei verschiedene Klassen des CRISPR CAS-Systems, die sich in ihrem Repertoire der CRISPR assoziierten *CAS*-Gene, der Organisation des *CAS*-Operons, und der Struktur der Wiederholungen in den *CRISPR*-Arrays unterscheiden (Makarova et al., 2011 a und b). Das bis dato am besten charakterisierte CRISPR-System ist das Typ II CRISPR, bei der ein Multidomänen Protein, die sogenannte CAS9-Nuklease, für die RNA-vermittelte DNA-Erkennung von einer co-prozessiven chimären *tracr:crRNA*-Duplex (*trans-activating crRNA:crRNA*) zur entsprechenden Stelle im Genom geführt wird (Ran et al., 2012; Doudna und Charpentier, 2014). Die crRNA bindet spezifisch an die DNA-Zielregion, während die *tracrRNA* die CAS9-Nuklease bindet (Jinek et al., 2012). Das im Labor am häufigsten verwendete CRISPR CAS9-System stammt ursprünglich aus *Streptococcus pyogenes*. Bei der Genom-Editierung im Labor wird anstelle der *tracrRNA:crRNA* eine modifizierte *single-guide RNA* (sgRNA) verwendet, die individuell für die jeweilige Zielsequenz designt werden kann. Die sgRNA weist durch ihren chimären Charakter sowohl die Fähigkeit auf, an die Zielsequenz als auch an die CAS9-Nuklease zu binden (Doudna und Charpentier, 2014; Ran et al., 2014). Die CAS9-Nuklease wird durch die 20 nt lange sgRNA komplementär an die Zielsequenz platziert, wobei zusätzlich zur Stabilisierung Wasserstoffbrückenbindungen und eine Doppelstrang-Struktur am 3'-Ende der sgRNA ausgebildet werden (Doudna und Charpentier, 2014). Zur Generierung von gezielten DNA-Doppelstrangbrüchen wird neben der spezifischen Bindung der sgRNA an die Zielsequenz, ein in unmittelbarer Nähe befindliches Sequenzmotiv benötigt, die sogenannte PAM-Domäne (*Protospacer Adjacent Motif*). Die Sequenz der PAM-Domäne variiert je nach Modelorganismus aus dem das CRISPR CAS9-System stammt. Bei *Streptococcus pyogenes* ist die Sequenz 5'-NGG (Sanchez-Rivera et al., 2015). Die CAS9-Nuklease führt 3 nt nach der Erkennungssequenz der PAM-Domäne einen Strangbruch in die DNA ein. Die CAS9-Nuklease weist zwei funktionale HNH- und die RuvC- Schneidedomänen auf, die jeweils einen Strang schneiden, wodurch in der Zielsequenz Doppelstrangbrüche induziert werden können (Jinek et al., 2012; Abbildung 5 A). Während beide Schneidedomänen bei der Wildtyp-CAS9 aktiv sind, weisen Nickasen durch inaktivierende Punktmutationen nur noch eine aktive Schneidedomäne in der CAS9-Nuklease auf, sodass nur noch Einzelstrangbrüche ausgeführt werden. Beispielweise weist die CAS9 D10A-Mutante aus *Streptococcus pyogenes* nur noch die Aktivität der HNH-Domäne auf, während bei der Mutante CAS9 H840A durch eine Mutation der HNH-Domäne nur noch die RuvC-Domäne aktiv ist (Hsu et al., 2014; Ran et al., 2013). Eine weitere Variante stellt die dCAS9 (*death*) dar, in der die beiden Schneidedomänen inaktiviert sind und somit keine Nuklease-Aktivität mehr vorliegt. Diese katalytisch inaktive Form behält nach wie vor die Fähigkeit DNA-Zielsequenzen aufgrund der

1 Einleitung

sgRNA-Spezifität zu binden und wird z.B. zur Untersuchung von Transkriptionsfaktoren verwendet (Sanchez-Rivera et al., 2015; Qi et al., 2013). Ein Problem beim CRISPR CAS9 System stellen *Off-Target*-Effekte dar, bei denen die sgRNA anstatt der Zielregion unspezifisch an andere Regionen des Genoms bindet, die von der CAS9-Nuklease geschnitten werden (Fu et al., 2013; Cho et al., 2014).

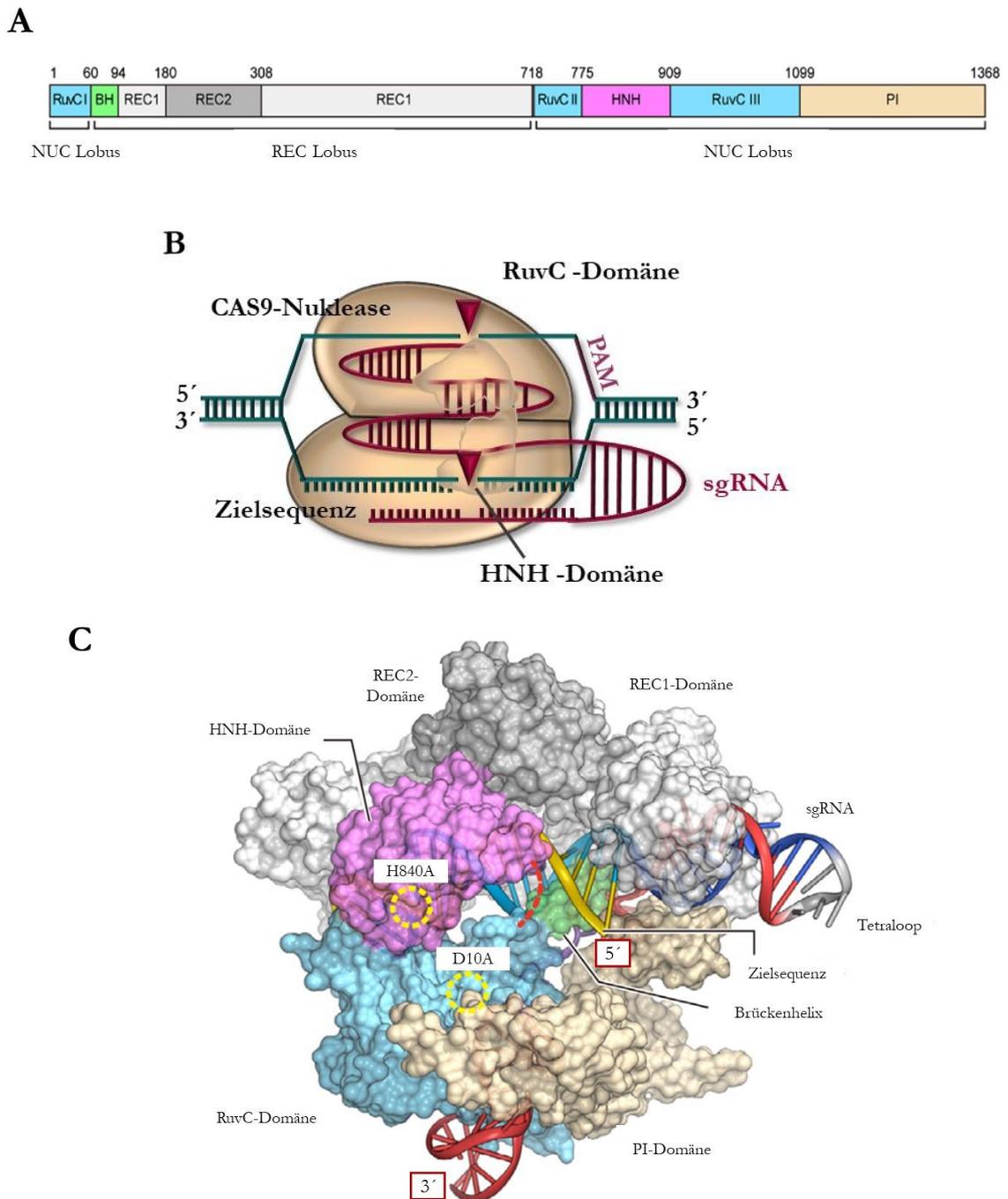


Abb.5: CRISPR-CAS9 Komplex. A: Domänenstruktur der CAS9-Nuklease aus *Streptococcus pyogenes*. Die CAS9-Nuklease verfügt über die zwei funktionsfähigen Schneidedomänen RuvC und HNH, mit denen Doppelstrangbrüche in der Zielregion erzeugt werden können. B: Interaktionsschema bei der Bindung des CAS9-sgRNA-Komplexes an die Zielsequenz. C: Darstellung der Oberflächenstruktur des CAS9-sgRNA-DNA-Komplexes. Die aktiven Seiten der

RuvC – (D10A) und HNH- (H840A) Domäne werden durch gestrichelte gelbe Kreise dargestellt. Abbildung A und C modifiziert nach Nishimasu et al., 2014.

Nach der Induktion eines Doppelstrangbruchs wird dieser durch einen der beiden in der Zelle vorherrschenden Reparaturwege repariert. Dabei unterscheidet man zwischen der nicht-homologen (NHEJ; *non-homologous end-joining*) oder der Homologie-gerichteten Reparatur (HDR; *homology directed repair*). Der NHEJ-Reparaturweg führt auf Grund des endogenen Reparaturmechanismus häufig zu kleineren Insertionen oder Deletionen (Indels) an den Bruchstellen der DNA, diese können Leserasterverschiebungen oder die Bildung eines vorzeitigen Stopp-Codons hervorrufen und somit den Leserahmen (ORF; *open reading frame*) des Zielgens zerstören. Der im Vergleich zum HDR-Reparaturweg fehleranfälliger NHEJ ist während des gesamten Zellzyklus aktiv (Mao et al., 2008; Brandsma et al., 2012). Bei HDR ist für die Reparatur des Doppelstrangbruchs eine Matrize erforderlich. Diese dient als Vorlage, die in die zerschnittene Zielsequenz hineinkopiert wird (Zhan et al., 2018). Durch die Verwendung von exogen eingeführten einzel- oder doppelsträngigen Oligonukleotiden (ssODN oder dsODN) können so definierte (Punkt)-Mutationen präzise in die Zielregion des Genoms integriert werden (Paquet et al., 2016). In der Zelle ist der HDR-Reparaturweg hauptsächlich in der S-Phase (Synthese-Phase) und der G2-Phase (*Gap 2-Phase*) aktiv (Ford et al., 2019; Brandsma et al., 2012). Die Effizienz von HDR kann je nach Zelltyp und Zielregion als auch des verwendeten ds-oder ssODN stark variieren. Durch die hohe Diversität in der Manipulation des Genoms kann CRISPR CAS9 in verschiedenen Anwendungsbereichen der Forschung, Medizin wie der Gentherapie oder Biotechnologie in einer Vielzahl von Organismen eingesetzt werden (Hsu et al., 2014). So können z.B. vielfältige Tier- und Zelllinien-Modelle generiert werden, um so die Entstehung von Chemotherapieresistenzen als auch diverse Krankheiten wie Herz-Kreislauf-, Neurodegenerative oder auch seltene monogenische Erkrankungen zu erforschen.

1.7 Ziel der Arbeit

Lungenkarzinome sind im Vergleich zu anderen Krebsarten die häufigste Todesursache weltweit und weisen gleichzeitig mit 13 % eine der niedrigsten 5-Jahres-Überlebensraten auf. Ein Hauptproblem bei der Behandlung von Lungenkarzinomen stellt die hohe Therapieresistenz bei einem fortgeschrittenen Entwicklungsstadium dar. Die Identifizierung von potentiellen Markergenen für die Validierung verbesserter Therapieansätze rückt dabei zunehmend in den Vordergrund. Epigenetische Veränderungen spielen bei der Progression von Krebs eine elementare Rolle, wobei diese mit der Karzinogenese und der Ausprägung einer Therapieresistenz

in Verbindung stehen. Epigenetische Modifikatoren wie die H3K4-Methyltransferase *KMT2D* und das Chromatin-Bindeprotein (*reader*) *BRD4* sind häufig in verschiedenen Krebsarten wie z.B. in NSCLC mutiert. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollen in verschiedenen Lungenkrebszelllinien unter Verwendung von CRISPR CAS9 definierte Mutationen in den Kandidatengen *KMT2D* und *BRD4* induziert werden, um funktionelle Mechanismen eingehender zu untersuchen, die mit einer Tumorprogression assoziiert werden. Dazu ist es zunächst erforderlich die CRISPR CAS9 Applikation für die Erstellung stabiler spezifisch modifizierter Zelllinien als auch effiziente Screeningverfahren zu etablieren. In dem Kandidatengen *KMT2D* sollen zwei verschiedene Deletionen in die Lungen-Adenokarzinom-Zelllinie HCC827 eingeführt werden. Durch die zwei unterschiedlichen Mutationen soll die Rolle von *KMT2D* bei einer epigenetisch bedingten Therapieresistenz gegen die EGFR-wirkenden Chemotherapeutika Cetuximab und Erlotinib untersucht werden. In *BRD4* wird eine Deletion induziert, die das gesamte Gen umfasst. Mit Hilfe von Chromatin-Immünpräzipitations-Analysen gefolgt von DNA-Sequenzierungen (ChIP-Seqs) werden die Parental-Zelllinien zur Identifizierung spezifisch angereicherter Signalwege untersucht. In funktionellen Analysen werden die Auswirkungen der induzierten Deletionen auf die Proliferation, die Genexpression, sowie methylierungsspezifische Unterschiede der H3K4- und H3K27-Methylierung funktionell charakterisiert. Zudem sollen Unterschiede in der Reaktion auf einen externen Stress zwischen den Parental-Zelllinien und den mutierten Zelllinien ermittelt werden.

Ziel der Arbeit ist es, Einblicke in die epigenetische Regulation von NSCLC zu erlangen und zu untersuchen welche Auswirkungen gezielte Veränderungen in *KMT2D* und *BRD4* auf die Tumorentstehung und –entwicklung haben.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Geräte, Materialien und Chemikalien

Folgende Geräte, Materialien und Chemikalien wurden für die mikrobiologischen, molekularbiologischen und zellbiologischen Methoden verwendet.

Tabelle 2.1. Geräte.

Gerät	Firma
Biofuge fresco	Heraeus
Biophotometer	Eppendorf
BioRad imager chemieDoc MP System	BioRad
CASY DT	Innovatis/Roche
Eppendorfständer	Eppendorf
FastGene Mini Centrifuge (pink)	Nippon Genetics Europe GmbH
Feinwaage EMB 200-2	Kern
Fluoreszenzmikroskop DM/3000B	Leica
große Zentrifuge Megafuge 1.0R	Heraeus
Heizplatte RH basic2	IKA
HERAEUS Multifuge X1R	Thermo Scientific
Inkubator BBD 62220	Thermo Scientific
Inkubator Fiction line	Heraeus
Inkubator Shaker	GFL
Innova 4430 Inkubator Shaker	New Brunswick Scientific
Lichtmikroskop DMIL LED	Leica
LightCycler 480	Roche
Mikrowelle	Severin
Mini-Protean	BioRad
Mr. Frosty Gefrierbehälter	Thermo Fisher
Multipette plus	Eppendorf
NanoDrop 3.1.0	Thermo Fisher
Neubauerzähl kammer	Superior Marienfeld
pH-Meter MP220	Mettler Toledo
Pinzetten	LHU
Pipetboy	Matrix Technologies
Pipetboy	Integra Biosciences
Pipette research pro 10 µl	Eppendorf
Pipette research pro 100 µl	Eppendorf
Pipette research pro 1000 µl	Eppendorf

2 Material und Methoden

Power Pac 200	BioRad
Power Pac basic	BioRad
Power Pac HC	BioRad
PTC-100 Thermocycler	MJ Research
Rainin Multikanal pipet lite XLS 20 µl	Mettler Toledo
Rainin Multikanal pipet lite XLS 200 µl	Mettler Toledo
Rainin pipet lite 1000 µl	Mettler Toledo
Rainin pipet lite 2 µl	Mettler Toledo
Rainin pipet lite 20 µl	Mettler Toledo
Rainin pipet lite 200 µl	Mettler Toledo
Rocky Schüttlerplattform	LTF Labortechnik
Sterilbank goldenline Biowizard (x-tra)	Kojair
Sub-Cell GT Elektrophoresekammer	BioRad
Tecan infinite 200 Pro series multimode reader	Life Science
Thermomixer comfact	Eppendorf
Tischzentrifuge Minispin plus	Eppendorf
Tuberoler RM5	ConCat
Vacuumpumpe BVC21 NT vacuu Hand control	Vacuubrand
Vortexer Mixer Uzusio VTX-3000L	LMS
Wasserbad	GFL
Wasserbad GLS400	Grant
X cell sure lock Novex Mini-cell	Invitrogen
Zellkuturbänke golden Line	Biowizard Kojair
Zentrifuge 5810R	Eppendorf
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus

Tabelle 2.2. Materialien.

Materialien	Firma	Artikelnummer
960 FinePoint Tips 200 µl mit Filter	Mettler Toledo	17005859
960 FinePoint Tips 1000 µl mit Filter	Mettler-Toledo	17007081
960 FinePoint Tips 20 µl mit Filter	Mettler-Toledo	17005860
Assay plate 96 Well, black with clear flat bottom	Corning	3651
Aufbewahrungsflasche 150 ml	LMS Consult GmbH & Co.KG	1018152
Autoklavierband mit Dampfindikador	Labomedic GmbH	1115096
Cryoröhrchen 2 ml	Greiner Bio-One GmbH	126280
Doppelseitiges Klebeband	Tesa	7047799K
Einmalskalpelle	VWR International GmbH	233-5324
Einmal-Wägeschälchen	VWR	611-9179
Eurofins Prepaid Barcodes	Eurofins Genomics	1094-000050
Falconröhrchen 50 ml	Sarstedt AG & Co	62.547.254
Falconröhrchen 15 ml	Sarstedt AG & Co	62.554.502
Immobilon-P Membran, PVDF	Merck	IPVH00010
Immun-Blot PVDF Membran	Bio-Rad	1620177
Impfhaken	VWR	SCUT3362162
Impfösen	VWR	734-2138

Kosmetiktücher, 100% Zellulosepapier	VWR International	115-0600
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	Thermo Fisher Scientific	4311971
Microplate, 96 Well, Polystyrene, Black	LMS Consult GmbH & Co.KG	3340
Novex Wedge Well 4-12 % Tris-Glycine Gel	Invitrogen by Thermo Scientific	XP04120PK2
Novex Wedge Well 4-20 % Tris-Glycine Gel	Invitrogen by Thermo Scientific	XP04200PK2
NuPAGE 3-8 % Tris-Acetate Gel	Invitrogen by Thermo Scientific	EA0375PK2
NuPAGE 4-12 % Bis-Tris Gel	Invitrogen by Thermo Scientific	NP0321Box
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer for Bis-Tris (20x)	Novex by life technologies	NP0001
NuPAGE Transfer Buffer (20X)	Novex by life technologies	NP00061
Parafilm	American Can Company	2911214
Pasteurpipetten 150 mm	Carl Roth	4518
Pasteurpipetten 230 mm	Th.Geyer GmbH & Co.KG	GY/09411020
PCR Plate, 384-Well, standard	Thermo Fisher Scientific	AB1384
PCR strips, 0.2 ml 8 Strip	Starlab	A14023700
Petrischalen	LABOMEDIC GmbH Gesellschaft für Laborund Medizin bedarf, Bonn	632180
Petrischalen	Greiner Bio-One GmbH	632102
Prepaid Barcode Labels	Eurofins Genomics	1094-000050
Reaktionsgefäß 1,5 ml	VWR International GmbH	2112130
Reaktionsgefäß 2,0 ml	VWR International GmbH	2112120
Reflexperlen	Carl Roth GmbH + Co.KG	A556.1
Serologische Pipette 10 ml	Sarstedt AG & Co	861.254.001
Serologische Pipette 25 ml	Sarstedt AG & Co	861.685.001
Serologische Pipette 5 ml	Sarstedt AG & Co	861.253.001
Serologische Pipette 50 ml	Greiner Bio-One GmbH	768-160
Ständer für Reaktionsgefäße 1,5/ 2,0 ml	Dr. Ilnoa Schubert Laborfachhandel	9555-001
StarTub reagent reservoir	Starlab GmbH	E2310-1010
T25 Zellkulturflasche	TPP	90.026
T75 Zellkulturflasche	Sarstedt AG & Co	833.911.002
TipOne 10/20 µL	Starlab GmbH	S11103810
TipOne 1200 µL	Starlab GmbH	S11111810
Tris-Acetate SDS Running Buffer (20x)	Novex by life technologies	LA0041
Vernichtungsbeutel	Sarstedt AG & Co	86.12
Wägebapier MN 226, Standardblock	Macherey Nagel GmbH	186002
Whatman Filter Paper grade 4	GE Healthcare Lite Science	3004-917
Wischtücher für Präzisionsanwendungen	Kimtech Science	115-2074
Zellkulturschale 60 mm	Faust Lab Science GmbH	TPP93060
Zellkultur-Testplatten 12 Wells	Faust Lab Science GmbH	TPP92012
Zellkultur-Testplatten 24 Wells	Faust Lab Science GmbH	TPP92024
Zellkultur-Testplatten 6 Wells	Faust Lab Science GmbH	TPP92006
Zellkultur-Testplatten 96 Wells	Faust Lab Science GmbH	TPP92096
Zellschaber 16 cm	Sarstedt AG & Co	831.832
Zellschaber 25 cm	Sarstedt AG & Co	831.830

2 Material und Methoden

Tabelle 2.3. Chemikalien.

Chemikalien	Firma	Artikelnummer
AccuGene molecular biology water	Lonza	17-724Q
Aceton $\geq 99.8\%$	VWR	20.066.310
Acrylamide/Bis Solution (30 %)	Bio-Rad Laboratories GmbH	161-0158
Adenosine 5'-triphosphate, 10 mM	New England BioLabs	P0756S
Agarose Broad Range Rotiagarose	Carl Roth	T846.3
Albumin Fraction V (pH 7.0) für Western Blot	AppliChem GmbH	A1391
Ampicillin sodium salt	Sigma-Aldrich	A9518-100G
Bacillol Plus	VWR International GmbH	BODE973375
BCIP/NBT purple liquid substrate system	SigmaAldrich	B3679100ML
Bradford - Lösung	AppliChem GmbH	A6932.0500
Bradford Reagent	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH	B6916-500ML
BSA, molecular biology grade	New England Biolabs	B9000 S
CloneJET PCR cloning Kit	Thermo Fisher Scientific	K1231
Comassie G-250	Carl Roth GmbH + Co.KG	9698.2
Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich	D8418-250ML
Dimethyl sulfoxide	Sigma-Aldrich	D2650-100ML
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck	1065860500
DirectPCR Lysis reagent	Peqlab	VIAG301
DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Fisher Scientific	R0611
DNAExitusPlus	AppliChem GmbH	A7089.0500
dNTP Mix, 10 mM each	Life Technologies GmbH	R0191
DTT	Fermentas/Thermo Scientific	R0862
Essigsäure 100 %, reinst.	Carl Roth GmbH + Co.KG	6755.1
Ethanol reinst, min. 99,5 %	Carl Roth GmbH + Co.KG	5054.1
FastDigest BbsI (BpiI)	Fermentas/Thermo Scientific	FD1014
Fermentas Tango buffer	Fermentas/Thermo Scientific	BY5
Glycine, Molecular Biology Grade	Merck Chemicals	357002-1KG
GoTaq qPCR Master Mix	Promega GmbH	A6001
Hoechst 33258 solution	Sigma-Aldrich	94403-1ML
Hydrogen peroxide solution 30 %	Sigma-Aldrich	H1009-500ML
Isopropanol	Carl Roth GmbH + Co.KG	T910.1
Kaliumchlorid (KCl)	Merck	1049360250
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck	1048730250
Laemmli SDS sample buffer, reducing (6X)	Alfa Aesar by Thermo Scientific	J61337
Methanol min. 99,9 %, Blotting-Grade	Carl Roth	82.3
MgCl ₂ , 25 mM	Thermo Scientific	R0971
Midori Green Advance	Biozym Scientific GmbH	617004
Milchpulver Blotting grade	Carl Roth	T145.2

MycoAlert PLUS detection kit	Lonza Verviers S.p.r.	LT07-705
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem	A1149.5000
Neutral red, cell culture tested	SIGMA-Aldrich	N4638-1G
Orange DNA Loading Dye (6x)	Life Technologies GmbH	R0631
Passive Lysis (5x) Buffer	Promega GmbH	E1941
pH-Indikatorstäbchen pH 5,0 - 10,0	Merck Chemicals	109533
Phusion HighFidelity DNA Polymerase	New England Biolabs GmbH	M0530S
PlasmidSafe ATP-dependent DNase	Epicentre	E3101K
Ponceau S stein proteomics grade	VWR	K793-500ML
Proteinase K, PCR grade 1 ml	Life Technologies GmbH	EO0491
Puromycin 10 mg/ml	Life Technologies GmbH	A1113803
Q5 High-Fidelity DNA Polymerase	New England Biolabs	M0491L
RNase H, recombinant	New England Biolabs GmbH	M0297 L
SOC medium	New England BioLabs	B9020S
SOC Medium	Invitrogen	15544034
SuperScript II Reverse Transcriptase	Life Technologies GmbH	18064071
T4 DNA ligase reaction buffer, 10×	New England BioLabs	B0202S
T4 polynucleotide kinase	New England BioLabs	M0201S
T7 DNA-Ligase mit 2× rapid Ligation buffer	Enzymatics	L602L
Topo TA cloning Kit	Invitrogen	K4500-J10
Tris Base, Molecular Biology Grade	Merck Chemicals	648310-500GM
Triton X-100	Sigma-Aldrich	9002-93-1
Trypanblau	Sigma-Aldrich	T8154
Trypsin/EDTA-Lösung (10x) 0,5 %/0,2 % in	Biochrom AG	L 2153
Tween 20, 250g	Carl Roth GmbH + Co.KG, Karlsruhe	9127.1
Ultra Pure Temed	Invitrogen	15524010
Western Lightning Plus-ECL 170 ml	Perkin Elmer LAS	NEL104001EA

2.1.2 Präparationskits

Tabelle 2.4. Präparationskits.

Artikel	Firma	Bestellnummer
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen	28604
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen	51304
Qiagen Endo free Plasmid Maxi Kit (25)	Qiagen	12362
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen	12125
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	28104
Ribo-Zero-rRNA removal Kit	Illumina	MRZH11124
ZR RNA MicroPrep	Zymo Research	R1051

2 Material und Methoden

2.1.3 Bakterienstämme und –Medien

In der Tabelle 2.5. werden die Bakterienstämme aufgeführt, die für die Klonierung der sgRNAs und für weitere Klonierungsexperimente verwendet wurden. Die nachfolgende Tabelle 2.6. enthält die zur Bakterienkultivierung verwendeten Medien.

Tabelle 2.5. Bakterienstämme.

kompetente Bakterienstämme	Firma	Artikelnummer
DH5 α –Zellen	AG Krobisch/ Thermo Fisher	18265017
One Shot TOP10 Chemically Competent <i>E.coli</i>	Life Technologies GmbH	C404006

Tabelle 2.6. Medien Bakterienkultur.

Artikel	Firma	Artikelnummer
LB-Agar	Becton Dickinson	244520
LB-Medium	Carl Roth GmbH + Co.KG	X968.2
Ampicillin	Sigma-Aldrich-Chemie GmbH	A9518-100G

Die für die Medien verwendete Antibiotika-Konzentration betrug 100 mg/ml Ampicillin (Amp).

2.1.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide in den Tabellen 2.7.-2.10. wurden von der Firma Metabion bezogen

Tabelle 2.7. sgRNA-Oligonukleotide für die Klonierung der CRISPR-Expressionsplasmide.

Gen	Name	Sequenz
KMT2D	sgRNA_FW_E31	CACCGGCCGGTTCGGTCAGTCTTAC
	sgRNA_RV_E31	AAACGTAAGACTGACCGACCGGCC
	sgRNA_FW_E41	CACCGGTGATAGCAGGCTCCGTTA
	sgRNA_RV_E41	AAACTAACGGAGCCTGCTATCACC
	sgRNA_FW_E48	CACCGCGAGGCCACGCGCATCTAT
	sgRNA_RV_E48	AAACATAGATGCGCGTGCCCTCGC
BRD4	sgRNA_FW_E1	CACCGAGTCATCCTACACGGGTCTT
	sgRNA_RV_E1	AAACAAGACCCGTGTAGGATGACTC
	sgRNA_FW_E20	CACCGCCGGCACTTGCTCGTAACA
	sgRNA_RV_E20	AAACTGTTACGAGCAAGTGCCGGC

Tabelle 2.8. Primer für CRISPR-Screeningverfahren und zur Ermittlung des Mutationsstatus.

<i>KMT2D</i>-Region	Bezeichnung des Primers	Sequenz 5' → 3'	Länge
Deletionsprimer Exon 31 + Exon 41	AS_31-48_E31_1	TCAACAAGCAGACCAAGGTG	431 bp
	AS_31-41_E41_1	GACGCCATTTCACCATCTTCT	
Primerpaar Exon 31	AS_31-48_E31_1	TCAACAAGCAGACCAAGGTG	521 bp
	AS_31-41_F31/2	CACAGCCAAGTTATCCAGCG	
Primerpaar Exon 41	AS_31-41_E41_1	GACGCCATTTCACCATCTTCT	660 bp
	AS_41_FE41_2	TTGACACCGAAGCCCAAG	
Deletionsprimer Exon 31 + Exon 48	AS_31-48_E31_1	TCAACAAGCAGACCAAGGTG	1495 bp
	AS_31-48_E48_2	TCGCCCTTCAGATACTCAGG	
Primerpaar Exon 48	AS_31-48_E48_2	TCGCCCTTCAGATACTCAGG	1527 bp
	AS_F48_1	ACCAGATGGCTGACTTTCATAGTG	
<i>BRD4</i>-Region	Bezeichnung des Primers	Sequenz 5' → 3'	Länge
Deletionsprimer Exon 1 + Exon 20	AS_1-20_E1_1	GGCTCTGATTTGTTTACGAGGAT	318 bp
	AS_14-20_E20_2	GGCAGGACATCACGAACGTC	
Primerpaar Exon 20	AS_14-20_E20_2	GGCAGGACATCACGAACGTC	553 bp
	AS_FE20_4	CTGGTAGCGGGTATGAGGG	
Primerpaar Exon 1	AS_1-20_E1_1	GGCTCTGATTTGTTTACGAGGAT	400 bp
	AS_FE1_1	ATCGAGCACTTCATCTGTATTGG	

Tabelle 2.9. Primer für Sangersequenzierung.

	Bezeichnung des Primers	Sequenz 5' → 3'
<u>Sequenzierungsprimer</u> <i>KMT2D</i>	AS_E41_Seq	GGAATAGTAGTCAGGGCCAGT
	AS_E48_Seq	GCCCTGCTCGATGACTTTG
<u>Sequenzierungsprimer</u> <i>BRD4</i>	AS_E1_Seq	TCTTTGGAATACTACTGCTAGA
	AS_E20_Seq	CGATGTCCTGTGTATACTGTGT
<u>Sequenzierungsprimer</u> <u>pJET1.2</u>	pJET1.2 <i>forward</i> Sequenzierprimer	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
	pJET1.2 <i>reverse</i> Sequenzierprimer	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

Tabelle 2.10. q-PCR-Primer zur Analyse der RNA-Expression.

Experiment	Bezeichnung des Primers	Sequenz 5' → 3'
KMT2D	N-MLL2_2_FW	GAA GGA TGA GGA GTT GGG CC
	N-MLL2_2_RV	AGC TGC TGG AAC CTT TCT CC
BRD4	BRD4_FW1	AAG AGG ACG TGG GAG GAA AG

2 Material und Methoden

HPRT	BRD4_RV1	TGC ACA GGA GGA GGA TTC G
	HPRT_FW	AGG AAA GCA AAG TCT GCA TTG
	HPRT_RV	GGT GGA GAT GAT CTC TCA ACT
Spleiß-Faktoren	BCLAF1_FW1	CGA GCG GTT CAC TTC GTA TC
	BCLAF1_RV1	AAC GGG TAT GCT TCC TCA GG
	CHD1_FW1	GCC ATT TCT GTT ACG CCG AG
	CHD1_RV1	GGT ACT GCC CTT GGA ACC TT
	DDX46_FW1	GAC TTT GGG ACT TAG AGT GGT C
	DDX46_RV1	AAT CAT TCG ACC AGG TGT GC
	DHX15_FW1	CTC TAG ATC CAC AGC TCG CA
	DHX15_RV1	TGG TAG ACG TTC AGC AGT GT
	DNAJC8_FW1	TTT CGG TGG TCT CAG GAA GG
	DNAJC8_RV1	CAA ACG GGA AAG AGA GTG GC
	PUF60_FW1	CCA CAA CTG GCA AGC ACA A
	PUF60_RV	CCA CCC AGG TCA AAG AGG TT
	SF3A1_FW1	CCT TAC TCG CAC AGG AAT AAG C
	SF3A1_RV1	CCA CAA CTG GCT TAG AAG GT
	SF3A2_FW1	GCC TTG TCG ATC TCT CTG CT
	SF3A2_RV1	CGT CAC CGC TTC ATG TCT G
	SF3A3_FW1	GAC AGG AGA AGA GCG AGA AGA
	SF3A3_RV1	CTC GGT AGG TGT AGT TTC CAC
	SF3B1_FW	GTG GAA GTG ACA GCA GAT TTG
	SF3B1_RV	TCT TCT GAC CAA GCA AAC TCG
	SF3B14_FW1	CGG GTC CTG GAT GTT GAT GT
	SF3B14_RV1	TTG GCG GGC TGA TGA AGT TA
	SF3B2_FW1	CCC ATC TTA GGC CGA ACT TTC
	SF3B2_RV1	GCC AGA CTT CAT CAA ACG CA
	SF3B3_FW1	GCT TGT AGC GAA CCC AGA TG
	SF3B3_RV1	GAG GGT GTT GAT TGG TGT GG
	SF3B4_FW1	TCA ACA CCC ACA TGC CAA AG
	SF3B4_RV1	CTG ATG CTT TGT TCA CCC GT
	SF3B5_FW1	AGA TGA CTG ACC GCT ACA CC
	SF3B5_RV1	GTT GAG AAG GTC GAA GTG GC
	SMNDC1_FW1	AGT GTA TGG CAG TCT GGA GT
	SMNDC1_RV1	ATG GGT TTG TTG CCA CTG TC
SNRPA1_FW1	TGA AGT GGA GAG GCT GAA GG	
SNRPA1_RV1	GAC CCG TTT GTG ACT GTG TC	
SNRPB2_FW1	TTC ATA GCA TGG GAC GGT GT	
SNRPB2_RV1	CCA GGG AGG CAT GAC ATT G	
SRSF2_FW1	CGC CTT CGT TCG CTT TCA C	
SRSF2_RV1	GAG TAA CCT CCG AGC AGC A	
TP 53_RV	GGG CTC TTG TTC TTC TCC TTC	
TP53_FW	TGG ACA CAA CTG GGA AGA CA	
U2AF35_FW1	GGT CTC CCA GGT TGT CAC A	
U2AF35_RV1	CGA TGT GGA GAT GCA GGA AC	
U2AF65_FW1	TCC ACG TAC TCA CAG AAG GC	
U2AF65_RV1	CTG CCC ACA AGC TGT TCA TC	

	U2SURP_FW1	ATT GCC CAA TCT TCC CAT GC
	U2SURP_RV1	TTC AGA CCT CAA TGC CAC CT
H3K4me3	ASH2_FW1	CAG TGA GAT GGC TGG GAA GT
Methyltransferasen/ Demethyhasen	ASH2_RV1	TGG ATA AAG CAG AGA AGA GCC T
	KMT2A_FW1	GAC ACC AAC TGC CTC CTT AGA
	KMT2A_RV1	TGG CTT CTA AAC ATC GTC AGC
	LSD1_FW1	GGC TGG GTA GTT ACG GAT CG
	LSD1_RV1	AAC TGT GGT GTC TCG TTG GC
	MLL3_FW1	TCC TGT CCA GTC TGC TAT CGA
	MLL3_RV1	TAG ACG CAG GCA TAT AGG GT
	SMYD3_FW1	GGA GCA CCT TCA GAA TCA GAG A
	SMYD3_RV1	GTC ATT ACG AGT TGC CTG AGG
H3K27me3	EZH2_FW2	AGT TGG TGA ATG CCC TTG GT
Methyltransferasen/ Demethyhasen	EZH2_RV2	CTG CTG TGC CCT TAT CTG GA
	UTX_FW1	GGC CAC CAA GAA CCC ATT AG
	UTX_RV1	CAT AAA TAT TGG CCC AGG TGA C

2.1.5 Humane Zelllinien, Zellkulturmedien und Transfektionsmittel

In den folgenden Tabellen erfolgt die Übersicht der im Rahmen der Zellkulturexperimente verwendeten Zelllinien und derer Kultivierungsmedien. Die verwendeten Transfektionsmittel werden zum Überblick in der Tabelle 2.13. aufgeführt.

Tabelle 2.11. Humane Zelllinien.

Name der Zelllinie	Organismus	Ursprung	Referenz	Artikelnummer	Medium
A549	Mensch	Adenokarzinom	ATCC	CRM-CCL-185	RPMI 1640
DU145	Mensch	Prostatakrebszelllinie	ATCC	HTB-81	DMEM
HCC827	Mensch	Adenokarzinom	ATCC	CRL-2868	RPMI 1640
HCC827-KMT2D-Mutante A76	Mensch	Adenokarzinom			RPMI 1640
HCC827-KMT2D-Mutante B6	Mensch	Adenokarzinom			RPMI 1640
Wi38	Mensch	Lungenfibroblasten	ATCC	CCL-75	MEM
Wi38-BRD4-Mutante 114	Mensch	Lungenfibroblasten			MEM
Wi38-BRD4-Mutante E87	Mensch	Lungenfibroblasten			MEM

2 Material und Methoden

Tabelle 2.12. Zellkulturmedien.

Medium	Inhalt	Firma	Artikelnummer
RPMI Medium 1640	+L-Glutamine	Gibco by Life Technologies	REF21875-034
MEM Earle´s	w 2.2 g/L NaHCO ₃ w/o L-Glutamine low endotoxin	Merck	F0325
Dulbecco´s MEM	w 3.7 g/L NaHCO ₃ w 1.0 g/L D-Glucose w/o L-Glutamine low endotoxin	Merck	F0415
Fetal bovine serum, low in endotoxin A.H		Sigma-Aldrich-Chemie GmbH	F7524-500ML
L-Glutamin (200 mM), 100 ml		Biochrom AG	K 0283
PBS Lösung ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , 500 ml		Biochrom AG	L 1825
Penicillin/Streptomycin 10.000 E/10.000 (10x) Trypsin (1:250) /EDTA-Lösung (0,5 %/0,2 %) in (10x) PBS, ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺		Biochrom AG	A 2213
		Biochrom AG	L 2153

Die Zellkulturmedien wurden mit 10 % fetales Kälberserum (FCS) (v/v) und 1% Penizillin/Streptomycin (Pen/Strep) sublimiert. Im Fall von MEM wurde zusätzlich 1 % L-Glutamin (v/v) hinzugefügt.

Tabelle 2.13. Transfektionsmittel.

Artikel	Lieferant	Artikelnummer
Attractene Transfection Reagent, 1 ml	Qiagen GmbH, Hilden	301005
HiPerFect Transfection Reagent, 1 ml	Qiagen GmbH, Hilden	301705
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent, 1,5 ml	Thermo Fisher Scientific	11668019
Lipofectamine LTX Reagent with Plus Reagent 1 ml	Thermo Fisher Scientific	15338100

2.1.6 Chemotherapeutika

Die in Tabelle 2.14. dargestellten Chemotherapeutika wurden zur Behandlung der humanen Zelllinien verwendet.

Tabelle 2.14. Chemotherapeutika.

Chemotherapeutikum	Firma	Artikelnummer	Funktion
Cetuximab (Erbix)	Apotheke der Uniklinik Köln, 50934 Köln	Med.Nr: 1191205	chimärer monoclonaler Antikörper vom Typ IgG1, inhibiert DNA-Reparatur, vermindert Invasion und Metastasierung von Tumorzellen
Erlotinib	LC laboratories	E-4007	Tyrosinkinase-Hemmer, Blockade des Tumor-Zellwachstums

2.1.7 Pufferlösungen für Western Blot Analysen

Tabelle 2.15. Übersicht Pufferlösungen für Western Blot Analysen.

Puffer	Chemikalien
10 x PBS pH 7,2	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ bis 1 l mit ddH ₂ O auffüllen
10 x SDS-Laufpuffer pH 8,3	250 mM Tris 1900 mM Glycin 1 % SDS
Transferpuffer pH 8,3	25 mM Tris 192 mM Glycine 20 % Methanol
1 x PBST pH 7,4	0,5 ml Tween 20 100 ml 10 x PBS 900 ml ddH ₂ O
Laemmli-Puffer SDS-Gele	
Trenngelpuffer pH 8,8	1,5 M Tris 0,4 % SDS
Sammelgelpuffer pH 6,8	0,5 M Tris-HCl 0,4 % SDS

2 Material und Methoden

2.1.8 Antikörper

In den folgenden beiden Tabellen erfolgt die Übersicht der in den Western Blot Analysen verwendeten Primär- und Sekundär-Antikörper.

Tabelle 2.16. Übersicht Primär- und Sekundärantikörper zur Analyse der Proteinexpression.

Primärantikörper	Verdünnung Western Blot	Firma	Bestellnummer
Actin (Ab-1); JCA26	1:1000	Calbiochem	CP01
Anti-MLL2 (C-Term)	1:500	Merck	ABE206
Anti-Sap155	1:1000	MBL	D221-3
Anti-SF3B4	1:1000	abcam	ab183483
Anti-IBP160	1:1000	abcam	ab205303
BRD4	1:1000	Bethyl laboratories	A301-985A50
CBP	1:1000	diagenode	C15410224
EZH2	1:1000	BD Transduction Laboratories	612666
GAPDH	1:1000	Ambion	AM4300
H3K27me3	1:500	diagenode	C15410069
H3K4me1	1:500	diagenode	C15310037
H3K4me3	1:500	abcam	ab8580
H3pan	1:500	diagenode	C15200011
KDM6A	1:500	novusbio	NBP1-80628
α -Tubulin	1:1000	Sigma-Aldrich	T9026
Sekundärantikörper	Verdünnung Western Blot	Firma	Bestellnummer
Goat IgG anti-Mouse	1:5000	Dianova	115-055-003
IgG (H+L) -Alk. Phos.			
Mouse IgG	1:10000	Millipore	12-349
Rabbit IgG	1:10000	Cell Signalling	7074P2

2.1.9 Vektoren

Die für die Klonierungsexperimente verwendeten CRISPR CAS9-Expressionsplasmide werden in der Tabelle 2.17. aufgeführt. Die Plasmide wurden von der AG Mundlos vom MPI für Molekulare Genetik in Berlin zur Verfügung gestellt.

Tabelle 2.17. CRISPR-Expressionsplasmide.

Name Vektor	Plasmid-Rückgrat	Addgene Plasmid-ID
pSpCAS9 (BB)-2A-Puro	PX459	48139
pSpCAS9 (BB)-2A-GFP	PX458	48138

Charakteristisch für diese Form von Dual-Plasmiden ist die CAS9-Nuklease mit einem unveränderten sgRNA-Gerüst, dem eine Klonierungsstelle für die Sequenz der sgRNA folgt (siehe Abbildung 2.1, Vektorkarte pSpCAS9 (BB)-2A-GFP siehe Anhang A). Zusätzlich verfügen diese Plasmide über einen Puromycin- oder GFP- Selektionsmarker. Für Klonierungen der sgRNAs wurde das pSpCAS9(BB)-2A-Puro-Expressionsplasmid verwendet, während das pSpCAS9(BB)-2A-GFP-Plasmid als Transfektionskontrolle diente.

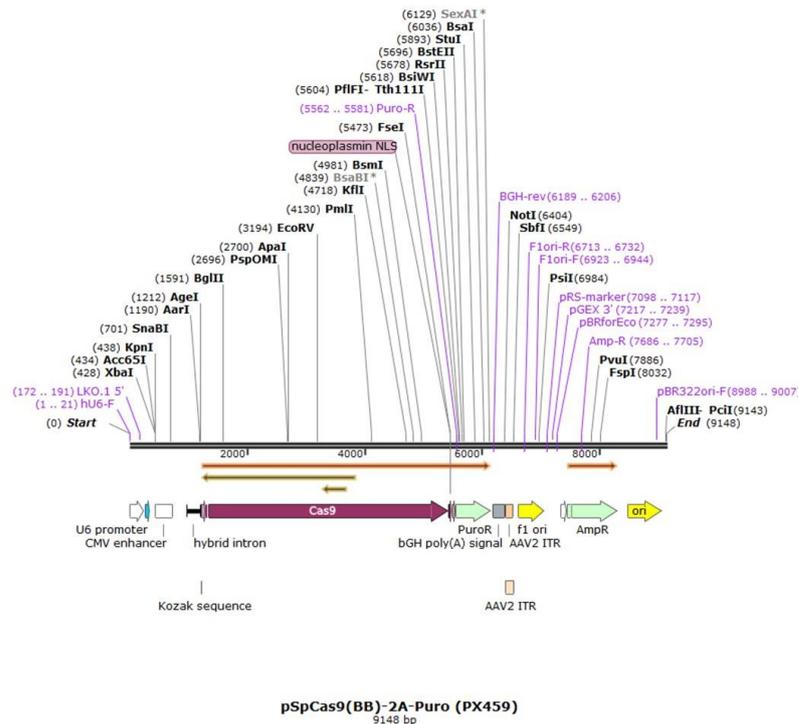


Abb.2.1: Vektorkarte pSpCAS9(BB)-2A-Puro CRISPR CAS9 Expressionsplasmid. Der Dual-Plasmid diente zur Klonierung der sgRNAs und wurde für Transfektionen von humanen Zelllinien in der Zellkultur verwendet. Der 9148 bp lange Plasmid weist neben dem Selektionsmarker Ampicillin, ein Puromycinresistenzgen auf, das zur Selektion transfizierter Zellen diente. Der Dual-Plasmid enthält die CAS9-Nuklease und ein sgRNA-Gerüst, in dem die spezifisch designten sgRNAs platziert werden, deren Expression durch einen U6-Promotor und einem CMV-Enhancer unterstützt wird. Der pSpCAS9(BB)-2A-Puro Expressionsplasmid wurde für Klonierung von spezifisch an *KMT2D* und *BRD4* bindenden sgRNAs verwendet.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Design sgRNAs

Die Spezifität der CAS9-Nuklease wird durch die 20 nt lange Sequenz der sgRNA des CRISPR CAS9-Komplexes definiert. Da nicht jede Zielregion für eine Anwendung von CRISPR CAS9 geeignet ist, wie z.B. bei einem Locus mit vielen repetitiven Sequenzen, wurde zunächst die Region des Zielgens definiert, bei der der CRISPR CAS9-Komplex die größtmögliche Effektivität aufwies.

2 Material und Methoden

Für das Design der sgRNA wurde das Online CRISPR CAS9 Design Tool (<http://tools.genome-engineering.org>) des Zhang Labs verwendet. Die Sequenz des Kandidatengens wurde mit einer maximalen Länge von 500 bp für den Modelorganismus *Homo sapiens* eingegeben. Als Referenzgenom diente dabei die Version *Homo sapiens* hg19 vom Genom-Referenzkonsortium (GRCh37). Die ermittelten sgRNAs wurden sowohl für Doppelnickasen als auch für einzelne sgRNAs mit allen wahrscheinlichen *Off-Targets* ermittelt. Für das Design der sgRNAs wurden ausschließlich Einzelanalysen verwendet. Die identifizierten sgRNAs wurden numerisch anhand eines sogenannten Qualitätswertes und der Wahrscheinlichkeit von auftretenden *Off-Target* Effekten aufgelistet. Unter einem *Off-Target*-Effekt versteht man die Wahrscheinlichkeit, dass eine sgRNA in anderen Regionen des Genoms als der Zielregion bindet und dort unerwünschte Strangbrüche von der CAS9-Nuklease initiiert werden. Um solche unerwünschten Nebeneffekte möglichst gering zu halten, wurden ausschließlich sgRNAs für die Experimente verwendet, die einen hohen Qualitätswert mit einer hohen Wahrscheinlichkeit von 80-97% aufwiesen, bei einem gleichzeitig sehr niedrigen *Off-Target*-Effekt von 0.0-0.2 (siehe Abbildung 2.2). In der Abbildung 2.2 wird exemplarisch für das Kandidatengen *KMT2D* das Design für die sgRNA der Zielregion von Exon 41 dargestellt. Die Designs der weiteren sgRNAs von *KMT2D* als auch dem Kandidatengen *BRD4* werden im Anhang B aufgeführt.

sgRNA Design für Kandidatengen *KMT2D* Exon 41

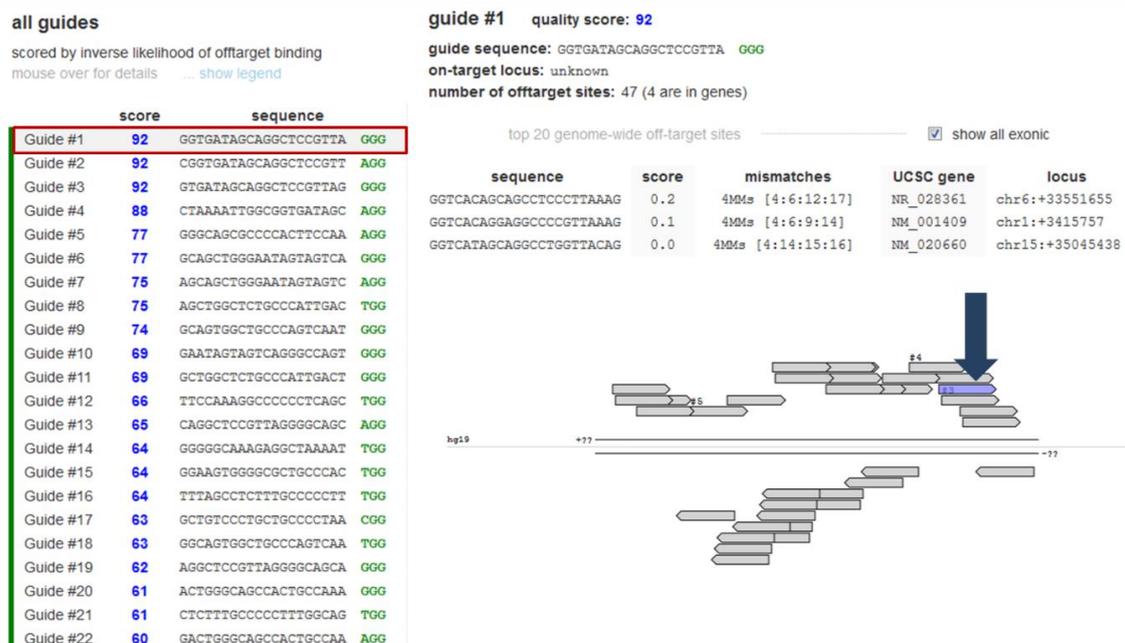


Abb.2.2: sgRNA-Design für die Zielregion von Exon 41 des Kandidatengens *KMT2D*. Das Design wurde mit dem Online CRISPR Design Tool vom Zhang Lab (<http://tools.genome-engineering.org>) durchgeführt. Nach der Eingabe der Zielsequenz wurden alle für die Region möglichen sgRNAs nach ihrer Qualität aufgelistet. Links: Neben dem Qualitätswert (blau) wurde die Sequenz der sgRNAs und die in der Zielsequenz befindliche PAM-Domäne aufgeführt

(grün). Rechts oben: Im Fall der ersten sgRNA wies diese einen Qualitätswert von 92 auf. Die Anzahl der ermittelten *Off-Targets* betrug insgesamt 47, von denen vier in Genen lokalisiert waren. Von diesen befanden sich drei direkt auf Exons, wobei die höchste Wahrscheinlichkeit eines potentiellen *Off-Target*-Effektes einen Wert von 0.2 in der Region von Chromosom 6 erreichten. Rechts unten: Grafik der gesamten ermittelten sgRNAs für die Zielregion von Exon 41. In der Grafik wird die Position und die Orientierung der sgRNAs visualisiert. Für die Klonierungen wurde die sgRNA #1 verwendet. Der blaue Pfeil markiert die Position als auch die Orientierung der sgRNA #1 in der Zielsequenz.

Für das Kandidatengen *KMT2D* wurden zwei unterschiedliche Deletionen eingeführt. Insgesamt wurden drei sgRNAs in diesen Experimenten verwendet, die zum einen in dem Bereich von Exon 31 und Exon 41 zu einer verkürzten Form des Gens führen, bei der die funktional notwendige SET-Domäne im C-terminal lokalisierten Bereich des Gens erhalten bleibt. Zum anderen erzeugt die Induktion der zweiten Deletion im Bereich von Exon 31 und Exon 48 eine Leserasterverschiebung, wobei der Verlust der C-terminalen SET-Domäne erfolgt. Im Falle des zweiten Kandidatengens *BRD4* sollte eine Deletion eingeführt werden, die das gesamte Gen umfasste. Aus diesem Grund wurden für die Induktion der Mutation sgRNAs für die Zielregionen der Exons 1 und 20 verwendet, die in der untranslatierten Region (UTR) des Gens banden. Zur Kontrolle der korrekten Lokalisation der sgRNAs in den Zielregionen wurden die Sequenzen im *UCSC Browser* (<http://genome.ucsc.edu/>) mit der Version GRCh37/hg19 des menschlichen Genoms überprüft und in BLAT visualisiert (Kent, 2002). In der Tabelle 2.18. werden zur Übersicht für das jeweilige Kandidatengen die Sequenzen der designten sgRNAs, die in der Zielsequenz befindlichen PAM-Domänen als auch die im *UCSC Browser* ermittelten Lokalisationen aufgeführt.

Tabelle 2.18. Übersicht sgRNAs für die Kandidatengene *KMT2D* und *BRD4*.

Gen	Name	Sequenz	PAM-Domäne	Chromosom	Übereinstimmung mit Genom	Start	Ende
<i>KMT2D</i>	sgRNA31	GTAAGAC TGACCGA CCGGCC TAACGGA	CCC	Chr12	100 %	49435250	49435269
	sgRNA41	GCCTGCT ATCACC GCGAGGC	CCC	Chr12	100 %	49424513	49424532
	sgRNA48	CACGCGC ATCTAT	TGG	Chr12	100 %	49420101	49420120
<i>BRD4</i>	sgRNA1	AAGACCC GTGTAGG ATGACTC GCCGGCA	CCA	Chr19	100 %	15391112	15391132
	sgRNA20	CTTGCTC GTAACA	AGG	Chr19	100 %	15348922	15348942

2 Material und Methoden

Für das finale Design wurde das 5' Ende der sgRNA durch ein zusätzliches Guanin-Nukleotid modifiziert. Durch das Hinzufügen eines Guanins wird die Expressionsrate der sgRNAs drastisch erhöht, ohne dabei die Effizienz negativ zu beeinträchtigen, da die für die Expression der sgRNA benötigte U6-RNA Polymerase III ein Guanin-Nukleotid als erste Base bevorzugt (Ran et al., 2013).

2.2.2 Präparation und Klonierung der sgRNAs

Die Konstruktion des Expressionsplasmids ermöglicht es, sgRNAs schnell und effizient in wenigen Klonierungsschritten durch partiell komplementäre Oligonukleotide zu klonieren. Bevor die Klonierung der sgRNAs in den CAS9-Expressionsplasmid durchgeführt werden konnte, mussten aus den designten sgRNA-Sequenzen sogenannte Guide-Oligonukleotide generiert werden. Die Guide-Oligonukleotide enthalten die 20 nt lange Sequenz der sgRNAs und benötigen Überhänge für die Ligation in die Expressionsplasmide, wobei die Orientierung der Sequenzen von 5' zu 3' für den nicht-codogenen Strang und von 3' zu 5' für den codogenen Strang mit der genomischen Zielsequenz übereinstimmen müssen (siehe Tabelle 2.7.). Durch den Verdau mit dem Restriktionsenzym *BbsI* wurden die TypII-Restriktionsstellen im Expressionsplasmid direkt durch die angelagerten Oligonukleotide ersetzt und im gleichen Schritt legiert. Um die sgRNA in das Puromycin-Expressionsplasmid zu klonieren, wurden die Guide-Oligonukleotide zunächst auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt. Für die Durchführung der weiteren Schritte der Klonierung wurde nach dem Protokoll von Ann Ran et al., 2013 verfahren. Dabei erfolgte in einem der ersten Schritte die Phosphorylierung (Tabelle 2.19.) und Hybridisierung der Guide-Oligonukleotide (Tabelle 2.20.).

Tabelle 2.19. Pipettierschema Mastermix -Phosphorylierung.

Reagenz	Menge (in µl)
sgRNA_FW (100 µM)	1
sgRNA_RV (100 µM)	1
T4 Ligationspuffer, 10 x	1
T4 PNK	1
ddH ₂ O	6
Insgesamt	10

Die Hybridisierung der Guide-Oligonukleotide erfolgte nach den folgenden Parametern:

Tabelle 2.20. Cyclerprogramm zur Hybridisierung der Guide-Oligonukleotide.

Temperatur	Zeit
37°C	30 min
95°C	5 min
Herunterkühlen von 95 °C bis 25°C in 5 °C Schritten	1 min

Anschließend wurden die phosphorylierten Guide-Oligonukleotide 1:200 mit ddH₂O verdünnt. Die Restriktion des Vektors und Ligation für die jeweilige sgRNA wurde in einem Schritt durchgeführt (Tabelle 2.21.).

Tabelle 2.21. Pipettierschema Klonierungsansatz.

Reagenz	Menge (in µl)
pSpCAS9(BB)-2A-Puro- Expressionsplasmid, 100 ng	X
1:200 verdünnte Guide - Oligonukleotide	2
Tangopuffer, 10 x	2
DTT, 10 mM	1
ATP, 10 mM	1
FastDigest <i>BbsI</i>	1
T7-Ligase	0,5
ddH ₂ O	Y
Insgesamt	20

Die Ligation wurde unter folgenden Bedingungen in einem Thermocycler durchgeführt:

Tabelle 2.22. Cyclerprogramm Ligation.

Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
1-6	37 °C	5 min
	21 °C	5 min

Insgesamt wurden drei Ligationsansätze hergestellt, wobei ein Ansatz nur mit dem pSpCAS9(BB)-2A-Puro-Plasmid ohne sgRNA-Oligonukleotide als Negativkontrolle für die Ligation verwendet wurde. Mit der PlasmidSafe Exonuklease (Epicentre, # E3101K) wurden Reste der linearisierten DNA aus dem Ligationsansatz entfernt (Tabelle 2.23.).

2 Material und Methoden

Tabelle 2.23. Pipettierschema Exonukleaseverdau.

Reagenz	Menge (in μl)
Ligationsansatz	11
PlasmidSafe-Puffer, 10x	1,5
ATP, 10 mm	1,5
PlasmidSafe Exonuklease	1
Insgesamt	20

Der Exonukleaseverdau wurde unter folgenden Konditionen durchgeführt:

Tabelle 2.24. Cyclerprogramm Exonukleaseverdau.

Temperatur	Zeit
37 °C	30 min
70 °C	30 min

Die erstellten Plasmidkonstrukte wurden anschließend in One Shot Top10-Zellen transformiert. Dieser chemisch kompetente *E.coli*-Stamm ermöglicht eine effiziente Transformation mit einer hohen Kopienzahl der Plasmide bei einer stabilen Replikation. Pro sgRNA-Plasmidkonstrukt wurde eine Transformation als auch ein Ansatz mit einem Leervektor als Ligationskontrolle durchgeführt (siehe Tabelle 2.25.). In 20 μ l kompetente One Shot Top 10 Zellen wurden 2 μ l Ligationsansatz pipettiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden für 30 s auf dem Thermoblock bei 42 °C hitzegeschockt und zum Abkühlen für 2 min zurück aufs Eis überführt. Die Zellen wurden in 100 μ l Raumtemperatur-warmen SOC-Medium aufgenommen und auf LB-Amp-Platten ausplattiert. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Tabelle 2.25. Transformationen CRISPR CAS9 Plasmide.

Gen	Name des Plasmid-Konstrukts
<i>KMT2D</i>	wt-Puro-Deletion-sg31
	wt-Puro-Deletion-sg41
	wt-Puro-Deletion-sg48
<i>BRD4</i>	wt-Puro-Deletion-sg1
	wt-Puro-Deletion-sg20
	wt-Puro-Leervektor
	wt-GFP-Leervektor

Nach der Transformation wurde das Koloniewachstum der Top10-Zellen auf den LB-Amp-Platten überprüft. Auf der Platte mit der Negativkontrolle war in der Regel kein Koloniewachstum festzustellen. Von jeder Platte wurden 5 Klone angepickt und in 7 ml LB-Amp-Medium angeimpft. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37 °C wurde aus jedem Ansatz die Plasmid-DNA mit dem Plasmid Mini Kit von Qiagen isoliert (siehe Abschnitt 2.2.4). Die Plasmid-DNA-Konzentration wurde anschließend mit dem NanoDrop ermittelt (siehe Abschnitt 2.2.5). Die Sequenzvalidierung potentiell positiver Klone (siehe Abbildung 2.3) erfolgte über eine Sangersequenzierung. Die Sequenzierung der Proben erfolgte mit der Firma Eurofins. Als Sequenzierungsprimer diente, wie in Ran et. al, 2013, zur Validierung der sgRNAs der U6-FW-Primer (Sequenz 5´-3´: GAGGGCCTATTTCATGATTC). Die Abbildung 2.3 zeigt exemplarisch die Sequenzierung der sgRNAs für das Kandidatengen *KMT2D* nach der erfolgten Klonierung in das pSpCAS9(BB)-2A-Puro-Expressionsplasmid.

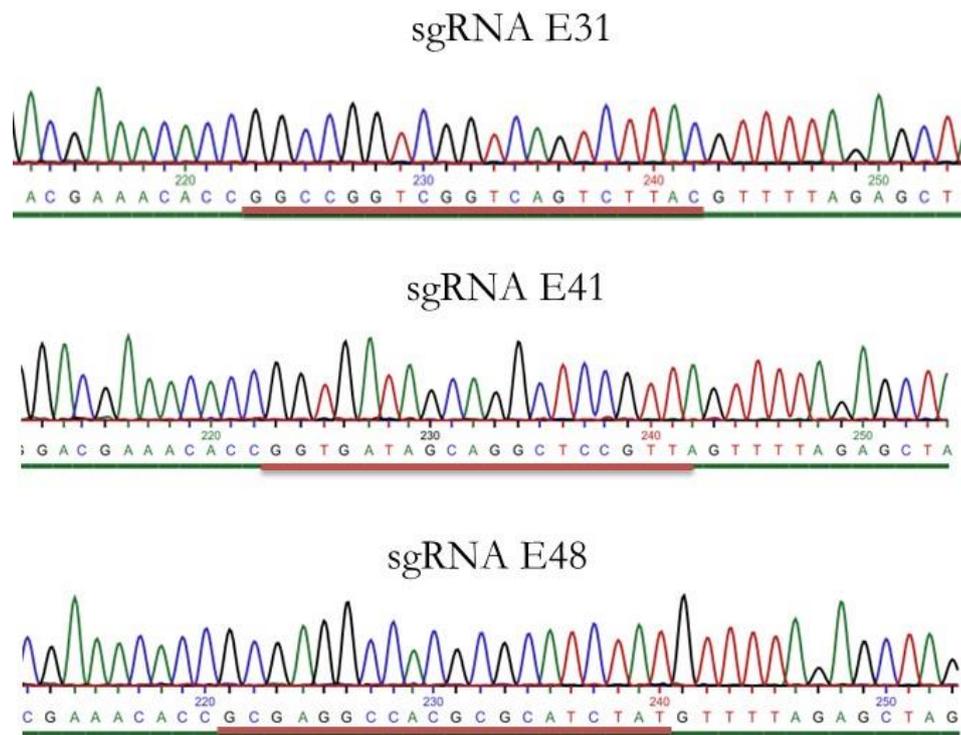


Abb. 2.3: Elektropherogramme der Sequenzierungen der sgRNAs E31, E41 und E48 für das Kandidatengen *KMT2D* nach der Klonierung in das pSpCAS9(BB)-2A-Puro-Expressionsplasmid. Die korrekt klonierte Sequenz der sgRNAs ist rot markiert. Legende: E: Exon.

2 Material und Methoden

Für die anschließende Anwendung in Transfektionsexperimenten, wurden positiv determinierte Klone in 100 ml LB-Amp-Medium angeimpft und die Plasmid-DNA mit dem Endofree Plasmid Maxi Kit von Qiagen isoliert (siehe Abschnitt 2.2.4).

2.2.3 (Re)-Transformationen von Bakterien

(Re)-Transformationen wurden in der Regel mit DH5 α -Zellen durchgeführt. Bei diesem Bakterienstamm handelt es sich um chemisch kompetente Zellen, die auf Grund ihrer hohen Transformationsfähigkeit polyvalent in vielen molekularbiologischen Standardverfahren, wie z.B. Klonierungen verwendet werden. Unter einer Transformation versteht man die Fähigkeit von Bakterienzellen freie DNA in Form von Plasmiden entweder durch zusätzliche elektrische Impulse oder durch einen Hitzeschock aufnehmen zu können. Für die Experimente wurden die DH5 α – Zellen von der AG Krobitch vom MPI für Molekulare Genetik in Berlin zur Verfügung gestellt. Eine Liste der für die Transformationen verwendeten Bakterienstämme ist aus der Tabelle 2.5. zu entnehmen. In 50 μ l auf Eis aufgetaute kompetente Zellen wurde 1 μ l Plasmid-DNA pipettiert und homogenisiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis, wurde das DNA-Bakterien-Gemisch 30 s bei 42 °C im Thermomixer hitzegeschockt und für 2 min zum Abkühlen auf Eis überführt. Anschließend wurden 800 μ l LB-Medium zu den Zellen pipettiert, die für eine weitere Stunde bei 37 °C auf einem Thermomixer bei 400 rpm inkubierten. Auf LB-Amp-Platten wurden 100 μ l des DNA-Bakterien-Gemisches ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

2.2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Einzelne Klone wurden in 10 ml angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 180 rpm inkubiert. Die Bakterienkultur wurde bei 6000 x g für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Aus dem Pellet wurde die Plasmid-DNA mit dem Plasmid Mini Kit nach dem Standardprotokoll des Herstellers Qiagen (Stand Protokoll 2011) isoliert, indem das Pellet zunächst in 300 μ l P1-Puffer resuspendiert wurde. Anschließend erfolgte die Lyse der Zellen mit 300 μ l P2-Puffer über eine Dauer von 5 min, bevor 300 μ l P3-Puffer hinzugegeben wurden und die Inkubation 5 min auf Eis erfolgte. Nach einer Zentrifugation von 16000 x g bei 4 °C für 10 min wurde der Überstand auf zuvor mit 1 ml QBT-Puffer vorbereitete *Qiagen-tip* Säulen gegeben. Die *Qiagen-tip* Säulen wurden anschließend zweimal mit je 2 ml QC-Puffer gewaschen. Mit 800 μ l QF-Puffer wurde die DNA eluiert und mit 560 μ l Raumtemperatur warmen Isopropanol präzipitiert. Nachdem die Proben mehrere Male invertiert wurden, erfolgte die Zentrifugation bei 16000 x g und einer Temperatur von 4 °C über 30 min. Der Überstand wurde verworfen und die

DNA mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 16000 x g wurde der Überstand ebenfalls verworfen und die Pellets für 5-10 min luftgetrocknet. Die DNA wurde in 30 µl TE-Puffer (pH 8.0) gelöst und die Konzentration mittels NanoDrop-Messung ermittelt (siehe Abschnitt 2.2.5.).

Im Fall einer anschließenden Verwendung der Plasmide für Transfektionsexperimente wurden die Klone in 100 ml LB-Amp-Medium angeimpft. Am nächsten Tag erfolgte nach dem Abzentrifugieren bei 6000 x g für 20 min die Präparation mit dem Endofree Plasmid Maxi Kit von Qiagen (Standardprotokoll Stand 2011). Nach der Resuspension in 10 ml P1-Puffer wurden die Zellen 5 min lang in 10 ml P2-Puffer bei Raumtemperatur lysiert. Die Lysate wurden für 10 min auf einer *QLAfilter*-Kartusche für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Entfernung der Kappe wurden die Lysate durch die Kartuschen gepresst und in ein 50 ml Reaktionsröhrchen überführt. Zu den Filtraten wurden 2,5 ml ER-Puffer pipettiert und die Proben mehrere Male invertiert. Anschließend erfolgte für 30 min eine Inkubation auf Eis. In der Zwischenzeit wurden *Qiagen-tip* Säulen mit 10 ml QBT-Puffer equilibriert und die Proben anschließend auf die Säulen geladen. Diese wurden danach 2 Mal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen. Die Proben wurden mit 15 ml QN-Puffer eluiert und die DNA durch die Zugabe von 10,5 ml Isopropanol präzipitiert. Nach einer Zentrifugation von 15000 x g bei einer Dauer von 30 min und einer Temperatur von 4 °C, wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet mit 5 ml Endotoxin-freiem 70 % Ethanol gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 15000 x g für 10 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet 10 min luftgetrocknet und abschließend in 100 µl Endotoxin-freiem TE-Puffer resuspendiert. Die Konzentration wurde mittels NanoDrop-Messung ermittelt (siehe Abschnitt 2.2.5.).

2.2.5 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung mit NanoDrop

Die Konzentration von DNA, RNA oder Plasmid-DNA wurde mit dem NanoDrop bestimmt, indem 1 µl der Probe auf den Messpunkt des Gerätes pipettiert und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen wurde. Durch die zusätzliche Angabe der relativen 260/280- und 260/230-Absorptionsverhältnisse erhielt man einen zusätzlichen Aufschluss auf mögliche Kontaminationen. Das 260/280-Absorptionsverhältnis gibt dabei Auskunft über die Reinheit der DNA und gilt bei Werten um die 1.8 nach Angaben des NanoDrop-Herstellers als rein. Im Fall der Vermessung von RNA-Proben würde der Wert hierbei rund um die 2.0 liegen. Liegt der Wert deutlich darunter, ist dies ein Indikator für potenzielle Verunreinigungen wie z.B. von Proteinen

oder Phenol, deren Absorption im Bereich von 280 nm liegt. Das 260/230-Absorptionsverhältnis dient als sekundäre Messung der Nukleinsäure-Reinheit und sollte in einem Bereich zwischen 2.0-2.2 liegen. Darunterliegende Werte weisen auf Verunreinigungen hin, deren Absorption bei 230 nm erfolgt.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Auftauen und Kultivierung von Zelllinien

Generell gilt beim Auftauen von Zellen, dass zu langsames Auftauen nach Möglichkeit vermieden werden sollte. Das basiert auf zweierlei Gründen: Zum einen weisen die meisten Kryoprotektiva wie DMSO bei Raumtemperatur eine zelltoxische Wirkung auf, zum anderen kann ein langsamer Auftauprozess zur Rekristallisation führen und damit den Zelltod induzieren (Schmitz, 2011). Zunächst wurden die entsprechenden Zelllinien aus dem Stickstofftank auf Trockeneis überführt (Übersicht der verwendeten Zelllinien siehe Tabelle 2.11.). Um das zytotoxische DMSO im Einfriermedium zu verdünnen, wurden die Zellen zügig mit 37 °C vorgewärmten und 20 % FCS (v/v) versetzten Medium aufgetaut und in 15 ml Falkonröhrchen für maximal 5 min bei 400 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 5 ml 20 % FCS (v/v) Medium aufgenommen. Die Zellen wurden bis zu ihrer ersten Konfluenz in T25-Zellkulturflaschen bei 5 % CO₂, 37 °C und einer 92 % Wasserdampf-Atmosphäre kultiviert. Erreichten die adhärennten Zellen eine Konfluenz von 70-80 %, wurde das Medium abgesaugt und die Zellen einmal mit 5 ml 37 °C warmem PBS (Biochrom AG) gewaschen. Um die Zellen vom Flaschenboden abzulösen, wurde über diese ein dünner Film Trypsin (1x Trypsin; Stocklösung 1:10 mit ddH₂O verdünnt) pipettiert und die Flaschen zur Inkubation für 10 min in den Brutschrank gestellt. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml Medium mit 20 % FCS (v/v) resuspendiert und durch vorsichtiges Pipettieren vereinzelt. Zum Verdünnen wurde die Zellsuspension in 5 ml frisches Medium (20 % FCS (v/v)) in eine T75-Zellkulturflasche überführt und sorgfältig über den Flaschenboden verteilt. Je nach Zelllinie wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:10 bzw. 1:20 zweimal pro Woche passagiert und in Medium mit 10 % FCS und Pen/Strep für die jeweiligen Zellkulturexperimente weiter gezüchtet. Eine Übersicht über die verwendeten Zellkulturmedien ist in der Tabelle 2.12. aufgeführt.

2.3.2 Transfektion von Zelllinien

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Effizienz unterschiedlicher Transfektionsmittel ausgetestet, die zum Überblick in der Tabelle 2.13. aufgeführt werden. In einer 12 *Well*-Zellkulturplatte wurden für die Zelllinie HCC827 200.000 Zellen pro *Well* ausgesät. Bei den Experimenten mit der Zelllinie Wi38 erfolgte die Aussaat mit 80.000 Zellen pro *Well*. Nach 24 h wurden die Transfektionen bei einer Konfluenz der Zellen von 70-85% unter Verwendung des CRISPR-CAS9-Expressionsplasmids pSpCAS9(BB)-2A-GFP durchgeführt. Die Transfektionseffizienzen wurden nach 48 h mit dem Fluoreszenzmikroskop DM/3000B (Firma Leica) ermittelt und mit einander verglichen.

2.3.2.1 Transfektion humaner Zelllinien mit Lipofectamine 2000

Für die Transfektionen mit Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher) wurden insgesamt 3 µg Plasmid-DNA eingesetzt und in 300 µl Medium ohne Zusatz von FCS und Pen/Strep pipettiert. In einem zweiten Ansatz wurde in 300 µl Medium ohne Zusätze 12 µl Lipofectamine 2000 pipettiert. Die Ansätze wurden homogenisiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden diese in einem Verhältnis von 1:1 vereinigt und nochmals für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den Zellen entfernt und pro *Well* 800 µl Medium mit 10 % FCS pipettiert. Anschließend wurden 200 µl des Transfektionsansatzes über die Zellen gegeben, die bei 37 °C und 6 % CO₂ kultiviert wurden.

2.3.2.2 Transfektion humaner Zelllinien mit Lipofectamine LTX

In 400 µl Zusatzfreiem-Medium (ohne FCS und Pen/Strep) wurden 4 µg Plasmid-DNA pipettiert. In einem weiteren Ansatz wurden in die jeweiligen zu testenden Lipofectamine LTX-Konzentrationen von 2 µl, 4 µl und 5 µl je 100 µl Zusatzfreies-Medium und ein 1 µl Plus-Reagenz pipettiert. Die Ansätze wurden homogenisiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze mit dem Transfektionsmittel und der Plasmid-DNA wurden in einem Verhältnis von 1:1 miteinander vereinigt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium der Zellen mit 800 µl 10 % FCS (v/v) enthaltenden Medium ersetzt. Abschließend wurden je 200 µl des Transfektionsansatzes auf die Zellen gegeben.

Für die Transfektion in 6 cm Schalen wurden für die Zelllinien HCC827 450.000 und für Wi38 400.000 Zellen ausgesät. Nach 24 h wurden für die Transfektion in 500 µl zusatzfreien Medium 5 µl Plus Reagenz und 25 µl Lipofectamine LTX pipettiert, während in einem Parallelansatz zu 500

2 Material und Methoden

μl zusatzfreien Medium insgesamt 5 μg Plasmid-DNA (2500 ng je CRISPR-Expressionsplasmid) gegeben wurde. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur wurden beide Ansätze miteinander homogenisiert und für weitere 20 min inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das alte Medium von den Zellen abgenommen und diese mit frischem Medium, das 10 % FCS enthielt, versorgt. Nach der Inkubationszeit wurde 1 ml des Transfektionsansatzes auf die Zellen pipettiert.

2.3.2.3 Transfektion humaner Zelllinien mit Attractene

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers Qiagen nach dem *Fast-Forward*-Protokoll (*Attractene Transfection Reagent Handbook* von 2008). Pro Ansatz wurden insgesamt 0,8 μg Plasmid-DNA und die jeweilige zu testende Attractene-Konzentration von 2, 3 und 6 μl in 120 μl Zusatzfreiem-Medium (ohne FCS und Pen/Strep) pipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den Zellen entfernt und mit 1 ml Medium mit 10 % FCS und Pen/Strep ersetzt. Abschließend wurde der Transfektionskomplex über die Zellen getropft, die für die nächsten 48 h im Brutschrank kultiviert wurden.

2.3.2.4 Transfektion humaner Zelllinien mit HiPerFect

Die Transfektionen mit HiPerFect erfolgten nach dem *Quick-Start*-Standardprotokoll des Herstellers Qiagen (Stand 2011). In 100 μl Zellkulturmedium ohne FCS-Zusatz wurden die zu testenden HiPerFect-Konzentrationen von jeweils 3, 6 und 9 μl Transfektionsmittel und 75 ng Plasmid-DNA pro Ansatz pipettiert und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze über die Zellen pipettiert und diese für 48 h in den Inkubator überführt.

2.3.3 Puromycin-Selektion

Neben der Determinierung der Transfektionseffizienzen bei der Anwendung unterschiedlicher Transfektionsreagenzien in den Zelllinien HCC827 und Wi38, wurden in nachfolgenden Experimenten die effektivsten Selektionsbedingungen bei einer Verwendung von Puromycin untersucht. 24 h nach der Aussaat der Zelllinien HCC827 (200.000 Zellen/*Well*) und Wi38 (80.000 Zellen/*Well*) in 12 *Well*-Zellkulturplatten wurden die zu untersuchenden Puromycin-Konzentrationen in Vollmedium angesetzt und mit dem alten Medium der Zellen substituiert. Insgesamt wurden sechs unterschiedliche Konzentrationen Puromycin ausgetestet, dabei rangierten die eingesetzten Konzentrationen zwischen 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin. Das Puromycin angereicherte Zellkulturmedium wurde jeden Tag frisch angesetzt und auf die Zellen

gegeben. Der Grad der absterbenden Zellen wurde täglich in einem Zeitraum von 72 h zwischen den eingesetzten Konzentrationen verglichen und unter dem Lichtmikroskop dokumentiert.

2.3.3.1 Puromycin-Selektion von CRISPR CAS9 transfizierten Zellen

Da es sich bei der Transfektion mit den CRISPR-Konstrukten um eine transiente Transfektion handelte, musste die Selektion innerhalb eines kurzen Zeitfensters durchgeführt werden. Unter einer transienten Transfektion versteht man, dass keine Integration der DNA ins Genom der Zelle erfolgt und diese nur vorübergehend für einige Stunden oder wenige Tage im Zellkern verbleibt. Zwar erfolgt eine sehr starke Expression in der Zielzelle, diese kann allerdings nur für kurze Zeit aufrechterhalten werden. Die Transfektion der pSpCAS9(BB)-2A-GFP transfizierten Zellen diente als Kontrolle, um so die Dauer der transienten Transfektionen abschätzen zu können. Diese wurde täglich unter dem Lichtmikroskop kontrolliert. Nach 48 h schloss sich bei den Zellen, die mit den pSpCAS9(BB)-2A-Puro-Konstrukten transfiziert wurden, eine Puromycin-Selektion an. Die Behandlung mit Puromycin (Life Technologies GmbH) erfolgte nachdem die Zellen zweimal mit PBS gewaschen wurden und anschließend das frisch angesetzte Puromycin-Medium mit einer Konzentration von 0,5 µg/ml Puromycin auf die HCC827-Zellen pipettiert wurde. Bei den Wi38-Zellen diente eine Konzentration von 0,25 µg/ml Puromycin zur Selektion. Als Negativkontrolle wurde der Transfektionsansatz mit dem Puromycin-Leervektor pSpCAS9(BB)-2A-Puro verwendet, um den Grad des Absterbens der Zellen effizienter einschätzen und gegebenenfalls die Selektion abstoppen zu können. Das Puromycin-Medium wurde jeden Tag frisch angesetzt und mit dem alten Medium vom Vortag substituiert. Die Dauer der Selektion betrug insgesamt drei Tage. Danach wurde das Puromycin-Medium durch ein Medium mit 20 % FCS ersetzt, so dass die Zellen bis zur Isolierung in 96 *Well*-Zellkulturplatten expandieren konnten.

2.3.4 Zellisolierung und Expansion

Neben der seriellen Verdünnung von selektierten Zellen oder der Zellisolation in Form von FACS Zellsortierungen wie man sie bei Transfektionen mit GFP-Expressionsplasmiden durchführt, wurden die Zellen nach einer Expansionsphase von 10-14 Tagen aus 6 cm Schalen semisteril gepickt und in 96 *Well*-Zellkulturplatten überführt. Für die Kultivierung der Zellen diente 20 % FCS (v/v) Medium. Erreichten die Zellen eine Konfluenz von 70-80 %, wurden diese in drei neue 96 *Well*-Zellkulturplatten gesplittet und in einem 20 %igen FCS (v/v) Medium kultiviert. Zwei der drei Zellkulturplatten wurden für anschließende Screeningverfahren und zur Erstellung von Masterplatten präpariert (siehe Abschnitt 2.3.5). Im Gegensatz zu den *BRD4*-CRISPR Zelllinien,

2 Material und Methoden

die bis zum Screening in 96 *Well*-Zellkulturplatten kultiviert wurden, expandierten die isolierten Klone der *KMT2D*-CRISPR Zelllinien bis auf 6 *Well*-Zellkulturplatten.

2.3.5 Kryokonservierung von Zellen

Durch das Verfahren der Kryokonservierung können Zellen über einen zeitlich sehr langen Zeitraum im flüssigen Stickstoff gelagert werden ohne dabei wesentliche Verluste der Vitalität herbeizuführen. Das Einfrieren von Zellen ist eine sehr verbreitete Methode, da sie ermöglicht, Stoffwechselfvorgänge fast vollständig zum Erliegen zu bringen und Zellen nach dem Auftauen die normalen physiologischen Prozesse nahtlos wiederaufnehmen können (Schmitz, 2011). Um qualitativ gute Zellen für spätere Experimente zu erhalten und den Kostenfaktor einer dauerhaften Kultivierung zu senken, wurden Protokolle zum Einfrieren von Zellen in unterschiedlichen Zellkulturformaten optimiert als auch neu etabliert.

2.3.5.1 Einfrieren von Zellen

Für in T75-, T25- Zellkulturflaschen oder in 6 *Well*-Zellkulturplatten kultivierte Zellen wurde zunächst 50 ml Einfriermedium mit 20 % FCS (v/v) Vollmedium hergestellt, zu dem als Kryoprotektivum 10 % (v/v) DMSO zugesetzt wurde. Von 75-85 % konfluent gewachsenen Zellen wurde das alte Medium abgesaugt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Auf die Zellen wurde Trypsin pipettiert, sodass ein dünner, gleichmäßiger Film auf den Zellen lag. Nach der Inkubation im Brutschrank bei 37 °C lösten sich die Zellen in der Regel nach 5-10 min vom Flaschenboden ab und wurden in 2 ml Einfriermedium aufgenommen. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen pipettiert und in einen Kryoeinfrierbehälter (Nalgene, #5100-0001) überführt. Die Kryoeinfrierbehälter wurden über Nacht in einem -85 °C Gefrierschrank gelagert, bis die Zellen in den entsprechenden Boxen einsortiert und in der Gasphase von flüssigem Stickstoff konserviert wurden.

2.3.5.2 Einfrieren von Masterplatten

Für jede mit CRISPR CAS9 erstellte Zelllinie wurden sogenannte Masterplatten erstellt. Für die Präparation wurde, wie im Abschnitt 2.3.5.1 zuvor beschrieben, frisches Einfriermedium hergestellt und auf Eis kaltgestellt. Vor der Präparation der 96 *Well*-Zellkulturplatten wurde 4 Std zuvor das Medium der Zellen gewechselt. Die Zellen mussten in einem guten physiologischen

Zustand und mindestens 80 % konfluent sein. Nach 4 Std wurde das Medium abgenommen und die Zellen vorsichtig zweimal mit 150 µl vorgewärmten PBS gewaschen. Dabei wurde darauf geachtet, dass sich die Zellen nicht ablösen. Nach dem Entfernen des PBS wurden 50 µl Trypsin gleichmäßig über die Zellen verteilt. Nach einer Inkubation von 5-10 min im Brutschrank bei 37 °C wurde unter dem Lichtmikroskop kontrolliert wie weit sich die Zellen abgelöst hatten. Die 96 *Well*-Zellkulturplatten wurden anschließend auf Eis gebettet und pro *Well* 150 µl Einfriermedium pipettiert. Die 96 *Well*-Zellkulturplatten wurden anschließend mit einer Schicht Parafilm umwickelt und in einem Plastikbeutel aus Polypropylen fest verschlossen. Die Masterplatten wurden in einer Styropor-Box bei -85 °C für zwei Tage zwischengelagert und für eine permanente Konservierung in die Gasphase des Flüssig-Stickstoffs überführt. Von jeder Masterplatte wurde ein Duplikat angefertigt.

2.3.5.3 Einfrieren von Screening-Platten

Für die Determinierung von positiven CRISPR CAS9-Klonen mussten Screening-Platten für RNA- oder DNA-Präparationen erstellt werden. Zu allererst wurde das Medium von den Zellen abgenommen. Die 96 *Well*-Zellkulturplatten wurden auf Eis platziert und dreimal mit PBS gewaschen, dabei musste man darauf achten, die 80-90 % konfluenten Zellverbände nicht zu zerstören. Das PBS wurde vollständig von den Zellen entfernt, die Screening-Platten abschließend mit Parafilm verpackt und bei -20 °C gelagert.

2.3.6 Proliferationsexperimente

Die Ermittlung der Zellzahl dient in der Zellkultur in erst Linie zur standardisierten und reproduzierbaren Kultivierung verschiedener Zelllinien, wird aber auch genutzt, um die Proliferation von Zellen in einem definierten Zeitraum ermitteln zu können. Für die Untersuchung der Zellproliferation wurden in einer 12 *Well*-Zellkulturplatte pro *Well* 100.000 Zellen der zu testenden Zelllinie ausgesät und die Zellzahl über einen Zeitraum von insgesamt 72 h mit einer Neubauerzählkammer als auch einem automatisierten Zell-Zählgerät ermittelt.

2.3.6.1 Zellzahlbestimmung mit Hematocytometern

Nach einem Zeitraum von 24 h nach der Aussaat der Zellen wurden 500 µl Trypsin auf die Zellen gegeben, die anschließend im Brutschrank bei 37 °C für maximal 5 min inkubiert wurden, bis sie

2 Material und Methoden

begannen sich langsam abzulösen und in 1 ml Vollmedium mit 10 % (v/v) FCS und Pen/Strep mit einer 1000 µl Pipette aufgenommen und vereinzelt werden konnten. Die Zellen wurden in einem Verhältnis von 1:2 mit einer Trypanblau-Färbung versetzt (Trypanblau in ClNa-Lösung; Sigma, #T8154). Die Trypanblau-Färbung diente dazu, die Vitalität der Zellen abzuschätzen, da nur tote Zellen den Farbstoff aufnehmen können und somit angefärbt werden. Von der Zellsuspension wurden 15 µl in eine Neubauer-Zählkammer (Neubauer Superior Marienfeld, Deutschland) überführt. Die Zellzahl wurde anschließend unter dem Lichtmikroskop (Leica DMIL LED, Wetzlar Deutschland) mit Hilfe eines Zählgerätes ermittelt. Zur Kalkulation der Zellanzahl wurde der Kammer- als auch der Verdünnungsfaktor mit einbezogen.

2.3.6.2 Automatisierte Zellzahlbestimmung

Parallel erfolgte eine Determinierung der Zellanzahl mit dem Cell Counter Casy (von Roche), der auf ein Kapillar-System basiert, bei dem durch die elektrisch erzeugten Impulse lebender Zellen die Zellanzahl ermittelt werden kann. Jeder generierte elektrische Impuls wird dabei als Zelle identifiziert, wobei die Höhe des Impulses dem Zellvolumen entspricht. Bei toten Zellen, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist, wird nur die Größe des Zellkerns erfasst (*Operator's Guide*, Version 2.5, August 2012). Für die Messung wurden die Parameter für Debris, tote Zellen und lebende Zellen in der Tabelle 2.26. wie folgt festgelegt:

Tabelle 2.26. Parameter für die automatisierte Zellzahlbestimmung.

Kategorisierung:		
	Debris	3.3-6.5 µm
	Tot	6.5-11.2 µm
	Lebend	11.2-100 µm

Pro Messung wurden in einem Casy-Cup 10 ml Casy-Ton vorgelegt und 100 µl der Zellsuspension hinzupipettiert. Das Casy-Cup wurde mehrere Male invertiert bevor es im Cell Counter platziert wurde. Die ermittelten Zellanzahlen wurden abschließend dokumentiert.

2.3.7 Hitzestressexperimente

Die Induktion von Stress diente dazu, die Fähigkeit von Zellen in Bezug auf ihre adaptive Reaktion und das Maß ihrer Widerstandsfähigkeit näher betrachten zu können. Stress wurde in Form von Hitzestress auf die Zellen ausgeübt (Tabelle 2.27.).

Tabelle 2.27. Übersicht Hitzestressexperimente.

Zelllinien	Stressor	Dauer	Regenerationszeit	Viabilitätstest
HCC827 KMT2D-Mutante A76 KMT2D-Mutante B6 Wi38	Hitzeschock	2 h	1 h / 48 h / 72 h	Neutralrot
BRD4-Mutante E87 BRD4-Mutante E114	Hitzeschock	2 h	72 h	Neutralrot

Die Zelllinien wurden einen Tag vor der Hitzebehandlung in einer 24 *Well*-Zellkulturplatte mit 80.000 Zellen pro *Well* ausgesät, sodass sie am nächsten Tag bei einer Konfluenz von 70-80 % in einen Brutschrank mit einer Temperatur von 42 °C überführt werden konnten. Zuvor wurden die Zellen mit frischem Vollmedium versorgt. Die Inkubationszeit erfolgte über eine Dauer von 2 h, wobei die Regenerationsphase je nach Versuch zwischen 1 h, 48 h oder 72 h variierte. Die Analyse der Zellviabilität erfolgte mit einem Neutralrot-Test. Für später erfolgte Western Blot Analysen wurden 500.000 Zellen pro *Well* in einer 6 *Well*-Zellkulturplatte ausgesät. Die Proteine wurden nach einer Regenerationszeit von 72 h geerntet.

2.3.8 Chemotherapie-Behandlungen

Bei den Experimenten mit einer Chemotherapie-Behandlung wurden in 24 *Well*-Zellkulturplatten 80.000 Zellen pro *Well* ausgesät. Nach 24 h erfolgte die Applikation der Chemotherapeutika durch die Substitution des Mediums. Für die Bestimmung der Zellviabilität wurde ein Neutralrot-Test durchgeführt. Für Western Blot Analysen erfolgte die Protein-Präparation aus 6 *Well*-Zellkulturplatten, auf denen ein Tag vor der Behandlung 500.000 Zellen ausgesät wurden. Parallel wurden Experimente mit einer Kombinationsbehandlung durchgeführt, die aus einem vorhergehenden Hitzestock bei einer Dauer von 2 h bei 42 °C und einer anschließenden Substitution des Mediums mit der entsprechenden Chemotherapeutika-Dosis bestanden.

2.3.8.1 Cetuximab

Da das Zytostatikum Cetuximab (Uniklinik Köln, Klinikinterne Apotheke, Charge 232337, Med. Nr. 11912050) bereits als 10 mg Stock-Lösung vorlag, konnte es direkt verwendet werden. Die Behandlung erfolgte mit Konzentrationen von 1 µM, 10 µM und 150 µM Cetuximab durch die Sublimierung des alten Mediums. Die Behandlungsdauer variierte zwischen 24-72 h. Die Zellviabilität wurde durch einen Neutralrot- Test ermittelt. Für spätere Zellviabilitäts- und Western

2 Material und Methoden

Blot Analysen wurde eine Konzentration von 1 μM Cetuximab verwendet, bei denen Parallel-Versuche mit einem zusätzlichen Hitzeschock durchgeführt wurden.

2.3.8.2 Erlotinib

Der Tyrosinkinase-Hemmer Erlotinib (LC laboratories, # E-4007) wurde in DMSO gelöst und eine 25 mM Stocklösung hergestellt. Die Applikation erfolgte über das Medium, in dem die jeweilige Konzentration von 0,5 μM , 1 μM oder 5 μM auf die Zellen gegeben wurde. Die Messung der Zellviabilität erfolgte nach einer Behandlungsdauer von 72 h mit einem Neutralrot- Test. Bei dieser Versuchsreihe erfolgten ebenfalls Western Blot Analysen und Kombinationsbehandlungen mit einem vorhergehenden Hitzeschock.

2.3.9 Analyse der Zellviabilität

Um den Einfluss der CRISPR CAS9 induzierten Mutationen in den Kandidatengen im Vergleich zur Ursprungsform des Gens divergieren zu können, wurde in funktionellen Analysen die Zellviabilität ermittelt.

2.3.9.1 Neutralrot-Test

Der Neutralrot-Test (Abbildung des Versuchsaufbaus siehe Anhang C) wird sehr häufig genutzt, um selbst bei sehr kleinen Zellmengen die Zytotoxizität zu ermitteln (Repetto et al., 2008). Es basiert auf der Fähigkeit von lebenden Zellen, den leicht kationischen Neutralrot-Farbstoff (pH 7,2) durch Endozytose aufzunehmen und in den Lysosomen zu speichern. In den Lysosomen wird dieser an die anionischen Reste der Zellmembran gebunden. Der Farbstoff kann durch eine Entfärbungslösung durch Herabsenkung des pH-Wertes aus den Zellen herausgelöst werden. Dabei ist die Menge des eingespeicherten Neutralrot-Farbstoffs proportional zur Gesamtmenge der lebenden Zellen.

Der Neutralrot-Test wurde für die Determinierung der Zellproliferationsunterschiede nach einer Behandlung mit Chemotherapeutika als auch bei einer Kombinationsbehandlung mit einer zusätzlichen Hitzeinduktion angewandt. Als Grundlage zur Etablierung der Analyse diente die Veröffentlichung von Repetto et al., 2008. 24 h vor Anwendung des Neutralrot-Tests wurde das Neutralrot Medium präpariert. Zunächst wurde eine 4 mg/ml Stocklösung hergestellt, indem 40 mg Neutralrot (Sigma, #N4638) in 10 ml PBS gelöst wurde. Die Neutralrot-Stocklösung wurde

1:100 mit Vollmedium verdünnt, sodass für die Analyse eine End-Konzentration von 40 µg/ml Neutralrot verwendet wurde. Vor dem Gebrauch wurde das Neutralrot-Medium für 10 min bei 1800 rpm zentrifugiert, um ausgefallte Farbstoffkristalle zu entfernen. 72 h nach der Anwendung von Chemotherapeutika oder nach einem zusätzlichen Hitzeschock wurde das Medium von den Zellen aus den 24 *Well*-Zellkulturplatten entfernt und 500 µl Neutralrot-Medium auf die Zellen gegeben. Die Zellen wurden 3 bis 4 h im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und zwischenzeitlich unter dem Lichtmikroskop kontrolliert, ob der Farbstoff von den Zellen aufgenommen wurde. Nach der Inkubation wurde das Medium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 500 µl Entfärbungslösung (50 % Ethanol 96%, 49 % ddH₂O und 1 % Eisessig) auf die Zellen gegeben und diese bei 200 rpm für 15-30 min bei 37 °C in einem Inkubator geschüttelt. Nachdem sich der Farbstoff homogen aus den Zellen gelöst hatte, wurden pro *Well* je zweimal 100 µl in eine 96 *Well*-Zellkulturplatte mit Glasboden überführt. Insgesamt wurden pro Testgruppe drei *Wells* im Duplikat gemessen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte im *Tecan Infinite 200 Pro series multicode reader* (Firma Life Science) unter dem Modus *Fluorescence Top Reading* bei *Corning 96 Flat Bottom White Polystyrol* bei einer Wellenlänge von 530-645 nm, da in diesem Bereich eine höhere Sensitivität mit einer geringeren Interferenz detektiert werden konnte. Nach der Messung wurde die Entfärbungslösung von den Zellen entfernt und diese dreimal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurde mit der RNA-Extraktion unter Abschnitt 2.4.8 weiterverfahren.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Primerdesign

Die für PCR- und qPCR-Analysen verwendeten Primer wurden mit *Primer3Web* Version 4.1.0 (1996-2017) entworfen und über den Anbieter Metabion bezogen. Beim Design der Screeningprimer zur Untersuchung der CRISPR CAS9 induzierten Mutationen musste auf eine möglichst geringe Selbstkomplementarität, Haarnadelstruktur und eine niedrige Rate des *Mispriming* geachtet werden, da insbesondere die Regionen rund um die induzierten Mutationen in *KMT2D* sehr schwierig zu amplifizieren und sehr GC-reich waren.

Beim Design von Primern, die für Sanger-Sequenzierungen bei der Firma Eurofins verwendet wurden, musste man zusätzlich darauf achten, dass das Maximum bei drei Poly-A lag, die maximale Länge des Primers nicht über 25 bp betrug und die durchschnittliche Schmelztemperatur zwischen 50-62 °C lag (siehe Tabelle 2.9.). Bei q-PCR-Primern sollte die Länge zwischen 18-20 bp liegen, wobei die Primer Exon übergreifend, auf den Exon-Exon-Bereichen liegen sollten (siehe Tabelle

2 Material und Methoden

2.10.). Alle Primer wurden nach dem Design in *Primer3Web* unter dem Punkt *Check_Primers* als auch im *UCSC Browser* unter *In-silico PCR* überprüft (Untergasser et al., 2012; Koressaar et al., 2007).

2.4.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Standardmethode in der Molekularbiologie, bei der eine bekannte DNA-Sequenz unter Verwendung einer Polymerase und spezifisch bindender Primer vervielfältigt wird. Beim Dreischritt umfassenden Reaktionsprozess werden die DNA-Stränge durch Hybridisierung über die Wasserstoffbrückenbindungen voneinander getrennt. Als nächstes erfolgt die Anlagerung spezifischer Oligonukleotid-Primer an die einzelsträngige DNA. Diese wird im abschließenden Elongationsschritt mit einer Polymerase komplementiert. PCRs wurden u.a. für Klonierungszwecke und CRISPR CAS9-Screeningverfahren verwendet.

Beim Screeningverfahren zur Ermittlung positiver Klonen beim Kandidatengen *KMT2D* wurde zunächst die Phusion-Polymerase genutzt, die jedoch im späteren Verlauf der Experimente durch die wesentlich effizientere Q5-Polymerase ersetzt wurde. In der Tabelle 2.28. werden die Komponenten der Mastermixe für die Phusion- und der Q5-Polymerase aufgeführt. In der nachfolgenden Tabelle 2.29. werden die Bedingungen der PCR-Programme aufgeführt.

Tabelle 2.28. Mastermixe Phusion- und Q5-Polymerase.

Komponenten Phusion-Mastermix	20 µl Reaktion	Komponenten Q5-Mastermix	25 µl Reaktion
5x Phusion GC-Puffer	4 µl	5x Q5 Reaktionspuffer	5 µl
10 mM dNTPs	0,4 µl	10 mM dNTPs	0,5 µl
10 µM Forward Primer	1 µl	10 µM Forward Primer	1,25 µl
10 µM Reverse Primer	1 µl	10 µM Reverse Primer	1,25 µl
DMSO	0,6 µl	5x Q5 High GC <i>Enhancer</i> Q5 High-Fidelity DNA	5 µl
Phusion DNA Polymerase	0,2 µl	Polymerase	0,25 µl
Nuklease freies Wasser	7,8 µl	Nuklease freies Wasser	10,75 µl
DNA (50 ng)	5 µl	DNA (<i>directPCR Lyse-Gemisch</i>)	1 µl

Tabelle 2.29. PCR-Programm Phusion- und Q5-Polymerase.

Phusion-Polymerase	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec	
Denaturierung	98 °C	10 sec	
Primerhybridisierung	68 °C	30 sec	35x
Elongation	72 °C	45 sec	
finale Elongation	72 °C	4 min	
	4 °C	∞	

Q5-Polymerase	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	98 °C	30 sec	
Denaturierung	98 °C	10 sec	
Primerhybridisierung	60 °C	30 sec	45x
Elongation	72 °C	60 sec	
finale Elongation	72 °C	4 min	
	4 °C	∞	

Eine Übersicht der für die Screenings verwendeten Primer ist in der Tabelle 2.8. dargestellt.

2.4.3 DNA-Präparation aus humanen Zelllinien

Im Fall der Zelllinie HCC827 und den generierten Zelllinien mit einer spezifischen Mutation im Kandidatengen *KMT2D* erfolgte die Expansion der Zellen auf 6 *Well*-Zellkulturplatten. Die Isolation der DNA erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, #51304) nach Angaben des Anbieters Qiagen (*QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook* von 2012). Nach dem Resuspendieren der Zellen in 200 µl PBS wurden 20 µl Proteinase K und um RNA-freie genomische DNA zu erhalten, zusätzlich 4 µl RNase A (100 mg/ml) zugegeben. Als nächstes wurde 200 µl AL-Puffer zu dem Zellgemisch pipettiert und die Proben für 15 s mit dem Vortexer homogenisiert. Nach einer Inkubation von 10 min bei 56 °C wurde 200 ml Ethanol (96-100 %) zu den Proben gegeben und alles noch einmal mit dem Vortexer gut durchmischt bevor das Probengemisch auf *QIAamp spin columns* gegeben bei 6000 x g für 1 min zentrifugiert wurden. Der Filter der *QIAamp spin columns* wurde in ein neues 2 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 500 µl AW1-Puffer gewaschen, indem die Proben für 1 min bei 6000 x g erneut zentrifugiert wurden. Danach erfolgte die Zugabe von 500 µl AW2-Puffer und ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 20000 x g für 3 min. Das Filtrat wurde verworfen und die Filter der *QIAamp spin columns* in ein neues 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt, über die 50 µl AE-Puffer pipettiert wurden. Nach einer Inkubation von 7 min bei Raumtemperatur erfolgte für 1 min eine Zentrifugation bei 6000 x g. Die

2 Material und Methoden

DNA-Konzentrationen wurden mit dem NanoDrop ermittelt (siehe Abschnitt 2.2.5). Die Proben wurden anschließend für die Screeningverfahren auf 10 ng/ μ l eingestellt.

2.4.4 DNA-Präparation aus 96 *Well*-Zellkulturplatten

Um nach der Puromycin-Selektion die CRISPR CAS9-Klone zu detektieren, die die erwünschten Mutationen trugen, musste zu allererst eine Methode etabliert werden, um aus unterschiedlich konfluent gewachsenen Zellen genügend DNA-Mengen zu extrahieren, um damit ein spezifisches Signal in einer PCR erzeugen zu können. Insgesamt wurde die Effizienz von drei unterschiedlichen Methoden ausgetestet: direkte Zugabe von Zellen ohne vorhergehende Lyse, Extraktion mit einem Zwei-Komponenten-System (Firma Quanta) und die Extraktion durch das *DirectPCR Lysis*-Zell-Reagenz. Die Amplifikation der PCR-Produkte erfolgte mit dem Standardprogramm der Q5-High-Fidelity-DNA-Polymerase von Neb (#M0491). Für die Austestung wurden Testplatten mit DU145- oder Wi38-Zellen verwendet (siehe Abschnitt 2.3.5.3). Bei der Aussaat der Testplatten wurden pro *Well* 30.000 Zellen eingesät. Bis zum weiteren Gebrauch erfolgte die Lagerung bei -85 °C.

2.4.4.1 DNA-Extraktion mit einem Zwei-Komponenten-System

Zunächst wurden pro *Well* zwischen 15-75 μ l Extraktionsreagenz (Quanta BioScience Inc., #95091-025) pipettiert und homogenisiert. Die Zellkulturplatten wurden mit einem *MicroAmp Optical adhesive* Film verschlossen und 1 Std bei 95 °C auf einem Thermoblock bei 1000 rpm geschüttelt. Nach 30 min wurde unter dem Lichtmikroskop überprüft, ob die Lyse bei den Zellen eingesetzt hatte. Das Zell-Extraktionsreagenz-Gemisch wurde mit einer 200 μ l Multikanalpipette in den *Wells* erneut homogenisiert und für weitere 30 min bei 95 °C auf dem Thermoblock bei 1000 rpm inkubiert. Dies wurde wiederholt bis nach 3 Std Gesamtinkubation nach dem Abkühlen der Zellen der Stabilisierungspuffer in einem Verhältnis von 1:1 zu den lysierten Zellen gegeben wurde. Nach der Zugabe des Stabilisierungspuffers erfolgte die Lagerung der extrahierten DNA bei -20 °C. Für die Determinierung der Effizienz wurde bei der Verwendung einer Q5-High-Fidelity-DNA-Polymerase pro PCR-Ansatz 1- 5 μ l DNA-Extrakt eingesetzt (siehe Abschnitt 2.4.2.).

2.4.4.2 Extraktion mit dem *DirectPCR Lysis-Zell-Reagenz*

Beim *DirectPCR Lysis-Zell-Reagenz* von Viagen Biotech Inc (#301-C) handelt es sich um eine lichtempfindliche Substanz, die speziell zur Lyse von Säugerzellen verwendet wird und direkt in den PCR-Ansatz pipettiert werden kann. Dem *DirectPCR Lysis-Zell-Reagenz* wurden 0,4 mg/ml Proteinase K hinzugefügt, die zum Abbau von Proteinen in Zelllysaten und zur Freisetzung von Nucleinsäuren dient. Das *DirectPCR Lysis-Gemisch* wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit ddH₂O verdünnt. Insgesamt wurden in einer 96 *Well-Zellkulturplatte* 50-140 µl des Gemisches pro *Well* auf die Zellen pipettiert. In späteren Anwendungen wurden ausschließlich 50 µl Lysegemisch verwendet. Die Zellen wurden mit dem Reagenz mit Hilfe einer Multikanalpipette homogenisiert und mit einem *Micro.Amp Optical adhesive* Film (Thermo Fisher, #4311971) versiegelt. Die Zellkulturplatten wurden bei 55 °C und 200 rpm in einem Inkubator über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inaktivierung der Proteinase K bei 85 °C in einem Wasserbad bei einer Zeitdauer von 1,5 Std. Nach dem Abkühlen der 96 *Well-Zellkulturplatten* wurden 1 µl bis maximal 5 µl des Reagenz-Gemisches pro PCR-Ansatz eingesetzt, um eine Inhibition der PCR zu vermeiden. Da bei zu häufigem Tau- und Einfrierzyklen die DNA degradiert wurde, musste das Reagenz-Gemisch nach dem Abkühlen aliquotiert werden.

2.4.4.3 DNA-Extraktion ohne vorhergehende Lyse der Zellen

Bei dieser Methode wurden die Zellen direkt nach dem Auftauen ohne einen zusätzlichen Lyse-Schritt mit einer Pipettenspitze abgekratzt und in 50 µl PCR-Mastermix homogenisiert. Im Unterschied zu den anderen angewendeten Methoden wurde vor dem Standard-PCR-Programm der Q5-High-Fidelity-DNA-Polymerase zusätzlich ein sogenannter „Hot-Start“ durchgeführt, bei dem nach drei Zyklen bei 95 °C und einer Dauer von 3 min, drei weitere Zyklen bei 55 °C für 2 min folgten. Bei dieser Methode wird keine zusätzliche Anwendung einer Proteinase benötigt, da die Zellen während der „Hot-Start“-Phase bersten und die DNA freigesetzt wird. Gleichzeitig werden die Proteine durch die hohe Initialtemperatur inaktiviert.

2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Nach der Amplifizierung einer PCR können mit Hilfe einer nachfolgenden Agarose-Gelelektrophorese DNA-Fragmente anhand ihrer Größe aufgetrennt und analysiert werden, dabei wandert die durch PO₄⁻-Reste negativ geladene DNA nach dem Anlegen einer Spannung zum positiven Pol, wobei kleinere Fragmente eine schnellere Laufgeschwindigkeit aufweisen als größere.

2 Material und Methoden

Weitere beeinflussende Parameter beim Auftrennen der DNA-Fragmente sind die Höhe der Spannung, der Laufpuffer, die Porengröße des Gels auf dem die Proben geladen werden, aber auch der prozentuale Anteil der Agarose, mit der die Gele hergestellt werden. Dabei gilt desto höher der Anteil der Agarose in einem Gel, desto fester ist die Laufmatrix und desto langsamer erfolgt die Auftrennung der DNA-Fragmente bei einer höheren Auflösung im Falle einer späteren Visualisierung. In der Regel wurden 1 oder 2 % Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten benutzt. Zum Gießen der Gele als auch als Laufpuffer wurde 1 x TAE verwendet, das aus einem 50 x TAE- Pufferstock (2 M Tris-Base, 1 M Essigsäure, 50 mM EDTA; pH-Wert 8.0-8.5) hergestellt wurde. Zur Visualisierung diente *Midori Green* (Biozym Scientific GmbH, # 617004), das in einem Verhältnis von 1: 20.000 in die erhitzte und vollständig aufgelöste Agarose (Carl Roth, # T846.3) pipettiert wurde. Da die Emission von *Midori Green* bei 530 nm lag, konnten die gleichen Filter des BioRad *Imager ChemieDoc MP* Systems genutzt werden wie bei einer Anwendung mit Ethidiumbromid oder UV-Licht. Die Beladung der Proben erfolgte mit 6X *Orange DNA Loading Dye* (Life Technologies GmbH, # R0631). Als DNA-Standard wurden 1 kb und 100 bp DNA-Ladder verwendet. Eine Übersicht der verwendeten Ladder wird unter der Tabelle 2.30. aufgeführt. Die Gele liefen in einer *Sub-Cell GT*-Elektrophoresekammer (BioRad Laboratories GmbH, München) bei 100 bis 120 V für 2 bis maximal 4 Std. Die Visualisierung und Aufnahme der detektierbaren Banden erfolgte mit dem *ChemiDoc MP Imaging* System (BioRad Laboratories GmbH), mit dem Programm *Image Lab 5.2.1* mit der Einstellung *Ethidium Bromide* unter dem Programmpunkt *Nucleic Acid Gels*.

Tabelle 2.30. DNA-Ladder.

Marker	Hersteller	Artikelnummer
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Life Technologies GmbH	SM0311
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Life Technologies GmbH	SM0241

2.4.6 Aufreinigung von PCR-Ansätzen und Gelextraktion

Nach den Screeningverfahren und der Untersuchung des Genotyps erfolgte die Präparation der positiv detektierten CRISPR CAS9-Klone für die Sequenzierung. Im Falle, dass die PCR-Amplifikate mehrere Unterbanden im Gel aufwiesen, wurden die in der erwarteten Höhe liegenden Banden mit einem Skalpell herausgeschnitten. Die DNA wurde nach Angaben des Herstellers Qiagen mit dem *Quick-Start* Protocol von 2011 isoliert, indem in einem Verhältnis von 3:1 das 3fache Volumen des QG-Puffers zu der Probe pipettiert wurden und diese bei 50 °C für 10 min

inkubierten bis die Gelschnitte vollständig geschmolzen waren. Anschließend wurde entsprechend des Volumenanteils des Gelschnittes 1 Volumenanteil Isopropanol zu den Proben gegeben und diese mehrmals invertiert. Das Proben-Gemisch wurde anschließend in eine *MinElute*-Säule überführt und 1 min bei 17900 x g zentrifugiert. Auf die *MinElute*-Säule wurde 500 µl QG-Puffer pipettiert und diese wie unter den zuvor beschriebenen Bedingungen zentrifugiert. Nach der Zugabe von 750 µl PE-Puffer und eines erneuten Zentrifugationsschrittes wurden die Proben in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt. Die DNA wurde abschließend in 20 µl EB-Puffer eluiert.

Im Falle von klar erkennbaren, prominenten Banden im Gelbild wurde der PCR-Ansatz mit dem *PCR Purification Spin Protocol* aus dem *QLAquick Spin Handbook* von 2015 isoliert. In 15 µl PCR-Ansatz wurden 75 µl PB-Puffer pipettiert und diese nach dem Homogenisieren auf eine *QLAquick*-Säule überführt. Die anschließende Zentrifugation erfolgte bei 17900 x g für 1 min. Das Filtrat wurde verworfen und die Proben mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation unter den zuvor beschriebenen Bedingungen, wurde das Filtrat erneut verworfen und die Proben nochmals für 1 min zentrifugiert. Die Proben wurden in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und mit 25 µl EB-Puffer nach einer Inkubation von 7 min bei Raumtemperatur bei 17900 x g für 2 min eluiert. Die Konzentration der aufgereinigten DNA-Proben wurde mit dem NanoDrop ermittelt (siehe Abschnitt 2.2.5).

2.4.7 Sanger-Sequenzierung von CRISPR CAS9-Mutanten

Die Sanger-Sequenzierungen wurden von der Firma Eurofins durchgeführt. Bei der sogenannten Kettenabbruch-Methode werden einzelne Strangabbrüche während der Replikation induziert, die es ermöglichen die Nukleotidabfolge einer Sequenz zu ermitteln (Sanger et al., 1975; Sanger et al., 1977). Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurden 150-200 ng/µl eingesetzt. Für aufgereinigte PCR-Produkte von einer Größe von 300-1000 bp wurden 30 ng/µl zur Sequenzierung verwendet. Die erforderliche Primer-Konzentration betrug 10 pmol/µl (10 µM). Die für die Sequenzierung der CRISPR CAS9-Mutanten verwendeten Sequenzierprimer werden in der Tabelle 2.9. aufgeführt. Die Auswertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte durch den Vergleich der FASTA-Dateien und der Elektropherogramme mit den zu erwartenden Sequenzveränderungen nach der Induzierung der Mutationen durch die Orientierung und Positionierung der sgRNAs als auch durch einen direkten Abgleich der FASTA-Sequenzen über BLAT des *UCSC Browsers* (Karolchik et al., 2002; Kent et al., 2002) in dem die Mutationen im direkten Vergleich zur Wildtyp-Sequenz visualisiert wurden.

2 Material und Methoden

2.4.8 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion erfolgte nach den Angaben des Herstellers Zymo Research mit dem ZR RNA MicroPrep Kit (#R1051). Die RNA-Proben wurden vor der Lyse der Zellen dreimal mit PBS-Puffer gewaschen, bevor 400 µl RNA-Lyse Puffer auf die Zellen pipettiert und diese in dem Puffer homogenisiert wurden. Zu dem Zellgemisch wurde im Verhältnis von 1:1 ein Volumenanteil Ethanol (95-100 %) gegeben und auf eine *Zymo-Spin IC*-Säule überführt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 30 s bei 12000 x g, wobei das Filtrat verworfen wurde. Um die DNA zu entfernen, erfolgte eine zusätzliche DNase-Behandlung direkt auf der Säule. Die Säule wurde zunächst mit 400 µl RNA-Wasch-Puffer gewaschen und anschließend bei 12000 x g für 30 s zentrifugiert. Pro Probe wurde 40 µl DNase I-Reaktion-Mix, der aus 5 µl DNase I und 35 µl DNA Verdauungspuffer bestand und frisch vor der Behandlung der Proben hergestellt wurde, auf die *Zymo-Spin IC*-Säulen pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Proben bei 12000 x g für 30 s zentrifugiert wurden. Danach wurden 400 µl RNA-Prep-Puffer auf die Säulen pipettiert und wie zuvor beschrieben zentrifugiert. Anschließend wurden die Proben mit 700 µl RNA-Wasch-Puffer gewaschen und nochmals zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Danach wurden die Proben erneut mit 400 µl RNA-Wasch-Puffer gewaschen und 2 min lang bei 12000 x g zentrifugiert. Die *Zymo-Spin IC*-Säule wurde in ein RNase-freies Eppendorfgefäß transferiert und in 15 µl DNase-/RNase-freies Wasser nach 7 min Inkubation bei Raumtemperatur eluiert. Die RNA-Konzentration der Proben wurden mit dem NanoDrop gemessen (siehe Abschnitt 2.2.5). Die Lagerung der RNA-Proben erfolgte bei -85 °C.

2.4.9 cDNA-Synthese

Für quantitative Echtzeit-PCR-Analyse wurden RNAs im ersten Schritt mit der *SuperScript II Reverse* Transkriptase (Life Technologies GmbH, #18064071) in cDNA umgeschrieben. Für die Synthese wurde zwischen 100-300 ng RNA eingesetzt. Der für die cDNA-Synthese verwendete Mastermix wird in der Tabelle 2.31. aufgeführt.

Tabelle 2.31. RNA-Mastermix cDNA-Synthese.

dNTPs (je 10 mM; von Life Technologies GmbH)	1 µl
Random Hexamere (aus 10 µM, von Metabion)	1,4 µl
ddH ₂ O (Nuklease-frei)	x µl
RNA (100-300 ng)	xx µl
	<u>insgesamt 13 µl</u>

Das Hinzufügen von sogenannten Random-Hexameren ermöglichte es, eine gleichmäßige und konstante Synthese von RNAs durchzuführen. Random-Hexamere sind 6 bp lange Oligonukleotide, die als Primer bei der Synthese des ersten Strangs bei der cDNA-Synthese fungieren. Die cDNA-Synthese erfolgte nach den folgenden PCR-Konditionen:

Tabelle 2.32. PCR-Konditionen cDNA-Synthese.

	Dauer in min	Temperatur in °C
1.Schritt	5	65
2.Schritt	5	25
3.Schritt	60	50
4.Schritt	15	70
5.Schritt	20	37
6.Schritt	20	65
7.finaler Schritt	∞	4

Nach dem initialen Schritt wurde ein Mastermix (Tabelle 2.33.) mit der *Super Script II Reverse* Transkriptase dazu pipettiert.

Tabelle 2.33. Super Script II Reverse Transkriptase-Mastermix.

5x FS Puffer (von Life Technologies GmbH)	4 µl
0,1 M DTT (von Life Technologies GmbH)	1 µl
ddH ₂ O	0,5 µl
Super Script II Reverse Transkriptase (von Life Technologies GmbH)	0,5 µl
	<u>insgesamt 6 µl</u>

Nach dem 4.Schritt (siehe Tabelle 2.32.) wurde die cDNA-Synthese pausiert und je Ansatz 1 µl Ribonuklease H (New England Biolabs GmbH) hinzupipettiert. Nach der Synthese wurden die cDNA-Proben mit ddH₂O auf 5 ng/ml eingesetzter RNA eingestellt.

2.4.10 quantitative Echtzeit-PCR-Analyse

Die quantitative Echtzeit-PCR-Analyse (qPCR; *real-time quantitative PCR*) basiert auf der Methode der Polymerasen-Kettenreaktion und wird dazu verwendet die Genexpression unterschiedlich behandelter Proben quantitativ miteinander zu vergleichen. Die qPCR ermöglicht dabei eine gleichzeitige Detektion, Amplifikation und Quantifikation der Proben. Neben Gensonden werden häufig Farbstoffe wie *SYBR Green* oder *BRYT Green* dazu verwendet, in die genomische oder

2 Material und Methoden

cDNA zu interkalieren, wobei die dabei entstehende Fluoreszenz detektiert wird. Für eine Analyse der Expression eines Gens ist eine Normalisierung mit einem Referenzgen erforderlich, um Inter-PCR-Variationen zu kompensieren (Pfaffl, 2001).

Die Berechnung der Expressionsdifferenzen erfolgte über die $\Delta\Delta C_T$ -Methode, bei der die Ct-Werte als erstes mit dem Referenzgen *HPRT* normalisiert wurden. Anschließend erfolgte die Berechnung des relativen Expressionslevels mit der entsprechenden Kontrollprobe (Applied Biosystems 2008, *Guide to performing Relative Quantitation of Gene Expression using Real-Time Quantitative PCR*, Applied Biosystems 2008, #4371095 Rev B).

Pro qPCR-Ansatz (siehe Tabelle 2.34.) wurden insgesamt 5 ng cDNA pro Probe eingesetzt. Für die Amplifikationen der Proben wurde ein GoTaq Mastermix (Promega GmbH, #A6001) mit einem *BRYT Green*-Farbstoff verwendet, der im Vergleich zum *SYBR Green* eine geringere Inhibition und eine höhere Effizienz bei der Interkalierung mit der cDNA während der Synthese aufweist. Die Proben wurden in Triplikaten gemessen. Pro qPCR wurde zusätzlich eine Negativkontrolle mit Wasser getestet.

Tabelle 2.34. Übersicht qPCR-Ansatz.

GO Taq Master Mix 2x	5 μ l
Wasser	3 μ l
cDNA	1 μ l
Primer (5 μ M)	1 μ l
	<u>10 μl</u>

Die Amplifikation der qPCR-Reaktionen erfolgte im *LightCycler 480* (Roche, Mannheim) mit dem Programm *LightCycler 480 SW 1.5.1* unter den folgenden Konditionen:

Tabelle 2.35. qPCR-Programm.

	Temperatur	Zeit	Abkühlungsrate	
Prä-Inkubation	50 °C	2 min.	4,8 °C / s	
	95 °C	10 min.	4,8 °C / s	
Amplifikation	95 °C	15 s	4,8 °C / s	40 x
	60 °C	1 min.	2,5 °C / s	
Schmelzkurve	95 °C	15 s	4,8 °C / s	
	65 °C	15 s	2,5 °C / s	
Kühlung	40 °C	30 s	2,5 °C / s	

Die für die qPCRs verwendeten Primer werden in der Tabelle 2.10. aufgeführt.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Proteinextraktion

Für Western Blot Analysen erfolgte die Isolierung von Proteinen aus 6 *Well*-Zellkulturplatten oder direkt nach der Ermittlung der Zellviabilität aus 24 *Well*-Zellkulturplatten. Von den Zellen wurde das Medium entfernt und diese dreimal mit kaltem PBS (0.14 M NaCl, 3.4 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) gewaschen. Anschließend wurden die Platten auf Eis überführt. In jedes *Well* wurde 1 ml kaltes PBS pipettiert und die Zellen mit einem Zellschaber (Sarstedt, #831.830; # 831.832) vom Plattenboden abgekratzt. Die Zellen wurden 3 min in einem 1,5 ml Eppendorfgefäß bei 600 rpm bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 50 µl 1x *Passive Lysis-Buffer* (Promega, # E1941) resuspendiert. Der Puffer wurde vor seinem Einsatz in einem Verhältnis von 1:5 mit ddH₂O verdünnt und konnte einen Monat bei 4 °C gelagert werden. Das Zell-Lyse-Puffergemisch wurde bei 600 rpm für 20 min bei Raumtemperatur auf einem Thermoblock (Thermomixer Compact, Eppendorf Vertrieb GmbH) inkubiert. Die lysierten Zellen wurden abschließend kurz abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

2.5.2 Proteinbestimmung mit Bradford

Bei der Proteinbestimmung mit Bradford handelt es sich um eine photometrische Methode, bei der die Proteinmenge in einer Probe mit Hilfe einer BSA-Standard Eichgeraden quantifiziert werden kann. Der Farbstoff Coomassie-Brillantblau, der Hauptbestandteil der Bradford-Lösung (von Sigma-Aldrich), bindet über Arginin-Reste an Proteine, so dass sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 470 nm durch die Komplexbildung nach 595 nm verschiebt. Dabei ist die Proteinkonzentration proportional zur Absorptionshöhe (Bradford,1976).

Für das Erstellen einer Standard-Eichgeraden, mit der die Proteinmenge bestimmt werden sollte, wurde eine gereinigte 10 mg/ml BSA-Lösung verwendet (New England Biolabs GmbH, #B9001S), die in einem Verhältnis von 1:10 mit ddH₂O verdünnt wurde. Die Probenbestimmung erfolgte, indem 2 µl des Proteinlysates in 18 µl ddH₂O pipettiert wurden. Die gut homogenisierten Proteinproben wurden in 980 µl Bradford-Lösung gegeben, mehrmals invertiert und in eine Küvette überführt. Die Proben wurden parallel zur Eichgeraden im BioPhotometer (Eppendorf) bei 595 nm vermessen. Die Proteinmenge wurde über die Funktion der Eichgeraden in Excel kalkuliert.

2.5.3 Western Blot Analysen

Die unter 2.5.3.1 beschriebenen Western Blot Analysen wurden für Proteine mit einer Größe von 15- 265 kDa durchgeführt. Die Detektion der Proteinexpression des Kandidatengens *KMT2D* erfolgte auf Grund der Größe des Proteins von 564 kDa unter anderen Bedingungen, die unter 2.5.3.2 beschrieben werden.

2.5.3.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) werden Proteine, wie beim Prinzip der PCR, anhand ihrer molekularen Größe durch eine Polyacrylamid-Matrix aufgetrennt (Laemmli, 1970). Durch die Zugabe von einem reduzierenden 6 x Laemmli SDS- Probenpuffer (bestehend aus: 375 mM Tris-HCl (pH 6.8), 9% SDS, 50% Glycerol, 9% β -Mercaptoethanol, 0.03% Bromphenolblau; von Alfa Aesar by Thermo Scientific, # J61337) wird die Sekundärstruktur der Proteine durch Reduzierung der Disulfidbrücken zerstört. Gleichzeitig werden die Proteine durch das enthaltene SDS negativ geladen, wodurch die Auftrennung beim Anlegen einer Spannung Richtung Anode ermöglicht wird. Durch eine 5 min Inkubation bei 95 °C auf dem Thermoblock erfolgte die Denaturierung und Linearisierung der Proteine.

Die Präparation der SDS-Gele erfolgte mit zwei abgedichteten Glasplatten (BioRad) mit einem Abstandhalter von 1,5 mm, in denen zuerst das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet wurde, um den Miniskus blasenfrei zu halten und vor oxidativen Prozessen zu schützen. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde das Isopropanol mit Whatmanpaper abgenommen und das Sammelgel darüber gegossen. Vor dem Auspolymerisieren wurden Probenkämme eingefügt. Eine Übersicht der für die Western Blot Analysen gefertigten SDS-Gele wird in der Tabelle 2.36. aufgeführt. Die verwendeten Pufferlösungen sind der Tabelle 2.15. zu entnehmen.

Tabelle 2.36. Übersicht SDS-Laufgele für Western Blot Analysen.

	BRD4, UTX, SF3B1	SF3B4, EZH2	H3K4me1, -3, H3K27me3
Trenngel	8%	10%	15%
30 % Acrylamid	1,375 ml	1,625 ml	2,5 ml
1,5 M Tris pH 8,8	1,25 ml	1,25 ml	1,25 ml
ddH ₂ O	2,375 ml	2,0875 ml	1,25 ml
10 % APS	24 µl	16,25 ml	16,25 µl
TEMED	4 µl	3,375 µl	3,375 µl
Sammelgel	4%	5%	7,5%
30 % Acrylamid	268 µl	335 µl	500 µl
0,5 M Tris pH 6,8	500 µl	500 µl	500 µl
ddH ₂ O	1,232 ml	1,165 ml	1 ml
10 % APS	20 µl	20 µl	20 µl
TEMED	4 µl	2 µl	2 µl

Nach der Präparation wurden die vorbereiteten Proteinproben auf die SDS-Gele geladen. Bei Proteinen mit einer Größe von 15 kDa wie H3K4me1, -3 oder -K27me3 wurden für die Analysen 20 µg Proteinlysate verwendet, während bei Proteinen ab einer Größe von 100 kDa zwischen 25-30 µg Proteinlysate auf die SDS-Gele geladen wurde. Die Gele wurden zunächst in eine Mini Protean II-Elektrophoresekammer von BioRad gespannt und diese mit 1x SDS-Laufpuffer gefüllt. Als Größenstandard diente der Protein Marker *Page Ruler Prestained Plus* (Life Technologies GmbH, #26619). Leere Taschen wurden mit 6 x SDS-Probenpuffer beladen, um eine ebene Lauffront zu erzeugen.

Für ein gleichmäßiges Herauslaufen der Proteine aus den Taschen des Sammelgels wurde eine Spannung von 80 V angelegt. Nach der Migration der Proteine ins Sammelgel wurde die Spannung beim Übergang ins Trenngel auf 120 V erhöht, sodass die im Sammelgel konzentrierten Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt werden konnten.

2.5.3.2 Western Blot

Nach der Auftrennung der Proteine erfolgte der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membran. Der Vorteil gegenüber dem Gebrauch von Nitrocellulose-Membranen besteht darin, dass PVDF-Membranen wesentlich stabiler sind und nach einer Reaktivierung mehrfach für die erneute Detektion von Proteinen genutzt werden können.

Vor dem Blotting der Proteine wurde eine 0,45 µm PVDF-Membran (Merck, # IPVH00010) in Methanol aktiviert und in einem aus 20 % Methanol bestehenden Transferpuffer

2 Material und Methoden

(Zusammensetzung siehe Tabelle 2.15.) equilibriert. In der Zwischenzeit wurden in einer Blotkassette auf der unteren Seite mit Transferpuffer angefeuchtetes 4-lagiges Whatmanpapier auf einen ebenfalls in Transferpuffer getränkten Schwamm gelegt. Zunächst wurde das SDS-Gel aus den Glasplatten gelöst und auf die Whatmanpapiere transferiert. Auf das SDS-Gel wurde die aktivierte PVDF-Membran platziert, auf dem 4-Lagen Whatmanpapier und ein in Transferpuffer getränkter Schwamm gelegt wurden, bevor die Blotkassette zusammengesetzt wurde. Diese wurde in eine Blotapparatur einer mit Transferpuffer gefüllten Mini Protean II-Elektrophoresekammer (BioRad) gestellt. Der Transfer erfolgte mit dem Tank-Blot-Verfahren in einem 4 °C Raum, wobei vor dem Transfer ein zusätzlicher Eisblock in den Tank gegeben wurde. Nach dem Anlegen einer Spannung von 400 mA senkrecht zur Laufrichtung des Gels wurden die Proteine nach 60 min auf die Membran übertragen.

Bei kleineren Proteinen mit einer Größe von 15 kDa erfolgte der Blottvorgang für 45 min bei Raumtemperatur mit einer Stromstärke von 200 mA. Nach dem Transfer wurde die Membran für 4 Std in PBS (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.15) mit 5 % Magermilchpulver (Carl Roth, # T145.2) geblockt, bevor die Immundetektion erfolgte (Abschnitt 2.5.3.4).

2.5.3.3 Western-Blot Analyse bei großen Proteinen

Für die Visualisierung der KMT2D-Expression wurden anstatt von selbsthergestellten 5 % SDS-Gelen aufgrund der Größe von 564 kDa kommerziell gefertigte 4-12 % Bis-Tris *Precast*-Gele (Invitrogen by Thermo Scientific, # XP04120) verwendet. Bei diesen speziellen Gradienten-Gelen wird durch die Präparation des Acrylamids ein Gradient von 4-12 % erzeugt, sodass im Vergleich zu selbst präparierten 5 % SDS-Gelen ein größerer Auftrennungsbereich der Molmassen erzielt werden kann. Der Auftrennungsbereich kann für diese spezielle Art von Gelen durch die Verwendung des entsprechenden Puffers zusätzlich angepasst werden. Im Falle von so großen Proteinen wie bei KMT2D wurde deshalb ein kommerzieller MOPS-Puffer (Invitrogen, #NP0001) verwendet. Die gebrauchsfertigen *Precast*-Gele wurden in eine *X-Cell Sure Lock* Elektrophoresekammer (Invitrogen) gespannt. Für die Analysen wurden 50 µg Proteinlysate verwendet. Als Größenstandard diente zum einen der *HiMark Pre-Stained* Standard (Life Technologies GmbH, # LC5699), wodurch die Proteine in einem Auftrennungsbereich von 30 bis 460 kDa detektiert werden konnten und zum anderen wurde zur besseren Orientierung beim Lauf des Gels zusätzlich der Protein Marker *Page Ruler Prestained Plus* Standard geladen. Das Gel lief über Nacht ca. 8-10 Std bei einer Spannung von 120 V in einem Kühlraum bei 4 °C unter permanenter Kühlung auf Eis, das zwischenzeitlich immer wieder erneuert wurde, um ein Schmelzen des Gels zu verhindern. Am nächsten Tag erfolgte der Transfer unter Verwendung von PVDF-Membranen

(Merck, # IPVH00010). Der Zusammenbau der Blottkassette erfolgte wie zuvor unter dem Abschnitt 3.5.3.2 beschrieben. Für den Fall eines evtl. Durchblottens der Proteine wurde eine zweite PVDF-Membran beim Transfer verwendet. Das Blotten erfolgte für 50 min bei einer Spannung von 100 V auf einer 0,45 µm PVDF-Membran mit einem kommerziellen Transferpuffer (Novex by life technologies, # NP00061) im Kühlraum bei 4 °C mit einer zusätzlichen Kühlung auf Eis. Nach 25 min wurde der in der Transferkammer befindliche Eisblock gewechselt. Nach dem Blottvorgang wurden die Membranen im Gegensatz zu den unter 3.5.3.2 beschriebenen Western Blot Analysen über Nacht in 1x PBS mit 5 % Magermilchpulver im Kühlraum bei 4 °C geblockt, bevor am nächsten Tag mit der Immundetektion weiterverfahren wurde.

2.5.4 Immundetektion

Die Immundetektion spezifischer Proteine erfolgte durch die Inkubation mit Antikörpern. Nach dem Blotten wurde die Membran in 1x PBS für 5 min gewaschen und in eine Primärantikörper-Lösung mit 3 % BSA (New England Biolabs) überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C im Kühlraum unter kontinuierlicher Rotation. Als Referenzgene dienten die Housekeeping-Gene alpha (α)-Tubulin, Aktin oder GAPDH, die parallel auf dem Blot entwickelt wurden. Bei methylierungsspezifischen Analysen wurde zusätzlich H3pan zur Abschätzung der gesamten Histon-Menge verwendet. Für den Nachweis der KMT2D-Expression erfolgte die Inkubation für 4 Std bei Raumtemperatur. Als Referenzgen diente in dem Fall der Spleiß-Faktor Aquarius (aa 1470-1485; Lührmann et al., 2004). Für eine spezifische Bindung des Antigens wurde nach einem dreimaligen Waschschrift mit 1x PBS und 0,05 % Tween (Carl Roth) für jeweils 10 min die Entwicklung mit dem Sekundärantikörper durchgeführt. In einer Verdünnung von 1:10.000 erfolgte die Inkubation in 1x PBS mit 0,5 g Magermilchpulver (Carl Roth, # T145.2) für 1 Std bei Raumtemperatur. In der Tabelle 2.16. werden die für die Western Blot Analysen verwendeten Antikörper aufgeführt. Nach einem erneuten dreimaligen Waschschrift mit 1x PBS und 0,05 % Tween wurden für eine Detektion mit Meerrettich-Peroxidase (HRP) die *Western Lightning Plus ECL* Agenzien (Perkin Elmer) im Verhältnis 1:1 zusammen pipettiert und über die Membran gegeben. Nach dem Entfernen der überschüssigen Agenzien wurde die Lumineszenz mit dem *ChemiDoc MP Imaging* System (BioRad) mit dem Programm *Image Lab 5.2.1* und unter *chemi* bei der Einstellung *Blots* für die Aufnahme der Chemilumineszenz durchgeführt. Für spätere Größenbestimmungen der Proteinexpressionen erfolgten Aufnahmen vom Größenmarker unter *colorimetric* bei der Einstellung *Blots*.

Neben der HRP-Entwicklung konnte für den Fall, dass die Proteine von Interesse auf der gleichen Höhe zu detektieren waren, wie beispielsweise in den methylierungsspezifischen Analysen der

2 Material und Methoden

Proteinexpression als auch unter dem Gesichtspunkt, dass die verwendeten Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies stammten, eine zusätzliche Entwicklung mit einer alkalischen Phosphatase (AP) durchgeführt werden. Dazu wurde der Blot nochmals über Nacht in 1x PBS mit 5 % Magermilchpulver inkubiert und nach einem Waschschrift mit 1 x PBS in ein Aliquot mit Primärantikörper überführt, das 4 Std bei Raumtemperatur oder wahlweise über Nacht bei 4 °C inkubiert wurde. Nach der Entwicklung mit einem speziellen *Goat IgG anti-mouse*-Sekundärantikörper (Verdünnung 1:5000, Dianova, #115-055-003) für 1 Std, wurde für die Visualisierung das auf Raumtemperatur erwärmte *BCIP/NBT purple liquid Substrat* (Sigma-Aldrich) auf den Blot pipettiert. Da bei der Entwicklung irreversible dunkelviolette Banden entstanden, wurde die Reaktion nach max. 5 min durch die Überführung des Blots in ddH₂O abgestoppt. Die nun erkennbaren Banden wurden mit dem BioRad *ChemiDoc MP Imaging System* unter der Einstellung *Blots* unter dem Punkt *colorimetric* aufgenommen.

2.6 Bioinformatische Analysen

2.6.1 Chromatin-Immunpräzipitation-DNA-Sequenzierungs-Analysen

Die Chromatin-Immunpräzipitation-DNA-Sequenzierungs (ChIP-Seq) -Analysen wurden mit Hilfe der *CLC Workbench* von Qiagen (GxS Version 11.0.0) durchgeführt. Die *CLC Workbench* ermöglicht es, Hochdurchsatz-DNA-Sequenzierungen (NGS) zu analysieren und diese anschließend in unterschiedlichen Online-Programmen zu visualisieren. Die Präparationen der H3K4me3 ChIP-Seqs der Zelllinien HCC827 und A549 wurden von Dr. rer. nat. Grimm am *Cologne Center for Genomics* in Köln durchgeführt. Die H3K4me3-ChIP-Seqs von Wi38- als auch die mit Wasserstoffperoxid-gestressten Wi38-Zellen wurden von Dr. rer. nat. Grasse am MPI Molekulare Genetik in Berlin durchgeführt. Die Analysen der ChIP-Seqs erfolgten nach dem *Tutorial ChIP Sequencing* (November 21, 2017) des Herstellers Qiagen, indem zunächst im ersten Schritt der Analyse die *Reads* der ChIP-Seqs dem Referenzgenom GRCh37/hg19 (Einstellungen: *Match score=1; Mismatch cost=2*) zugeordnet wurde. Der aus der Analyse hervorgehende Bericht hielt detaillierte Informationen über die Zuordnung der *Reads*. Diese wurden im nächsten Schritt im *Peak calling* im *Transcription Factor ChIP-Seq Tool* zur Ermittlung der signifikanten *Peaks* bei einem maximalen p-Wert von 0,1 analysiert. Die Analyse wurde mit einer Liste der determinierten *Peaks*, dem QC-Bericht, einer Übersicht der *Peak*-Form und der Diagrammspur für jede genomische Position komplettiert. Der QC-Bericht enthielt die gesamten metrischen Daten über die Qualität der einzelnen ChIP-Seqs. Der nächste Schritt nach der Verifizierung der Qualität beinhaltete die

Annotationsanalyse der nächsten stromabwärts- und stromaufwärts gelegenen Gene, die unter der Einstellung *annotate with nearby gene information* mit der Genreferenz der *CLC Workbench homo sapiens_ensembl_v74_genes* durchgeführt wurde. Abschließend erfolgte die Visualisierung der Ergebnisse durch *create genome browser view*, in dem die annotierten *Peaks*, die *Reads*, *Peak-Form* mit der *CLC Workbench* Referenzgenliste und dem Referenzgenom in einer *Track List* erstellt wurden. Die finalen Datenformate wurden für weiterführende Signalweg-Analysen genutzt.

2.6.2 Signalweg Analysen

Die aus der *CLC Workbench* generierten ChIP-Seq Daten wurden für unterschiedliche Anreicherungsanalysen verwendet. ConsensusPathDB wurde von der Bioinformatikgruppe um Ralf Herwig am MPI für Molekulare Genetik entwickelt und dient als Plattform zur Analyse und Interpretation von Genomdatensätzen, da es die Information von insgesamt 32 Datenbanken mit einem interaktiven Netzwerk verbindet und damit die Analyse biologisch relevanter Protein-Protein Interaktionen, Signalreaktionen, Genregulationen und die Interpretation biochemischer Signalwege ermöglicht. Mit ConsensusPathDB wurden funktionelle Annotationen mit angereicherten Signalweg-Analysen (p-Werte: 0,001; Überlappung mit der Eingabeliste Minimum 5 Gene) als auch Gen-Ontologie (GO) basierte Signalweg-Analysen durchgeführt (Kamburov et al., 2013). In den GO-Analysen erfolgte die Zuordnung der in der Eingabeliste befindlichen Gene anhand eines bekannten annotierten GO-Terminus aus dem Bereich der biologischen Prozesse, molekularen Funktion oder nach dem zellulären Kompartiment (p-Werte: 0,01; Zuordnung nach der GO-Level Kategorie 2-5). Des Weiteren wurde in Netzwerk-basierten Analysen (NESTs) die funktionelle Interaktion der Gene betrachtet (p-Werte: 0,001; Minimum-Überlappung mit der Eingabeliste Minimum 4 Gene).

Mit GREAT (*Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool*) konnten u.a. Funktionen von cis-regulatorischen nichtkodierenden genomischen Regionen vorhergesagt werden. Da viele kodierende Gene mit ihren Funktionen annotiert sind, nicht-codierende Regionen hingegen in der Regel keine solche Annotationen aufweisen, ordnet GREAT diesen genomischen Regionen eine biologische Bedeutung zu, indem die Annotation nahe gelegener Gene analysiert und mit diesen verknüpft wird (McLean et al., 2010). In den Annotationsanalysen wurde jedem Gen zunächst eine regulatorische Domäne zugewiesen, die sich in beide Richtungen (also stromauf- als auch -abwärts) bis zu 1000 kb zur Transkriptionsstartseite (TSS) des nächstgelegenen Gens erstreckte (Einstellung: *Two nearest genes*). Anschließend wurde jede genomische Region mit allen Genen assoziiert, deren regulatorische Domäne überlappte.

2 Material und Methoden

In der Tabelle im Anhang D wird eine Übersicht der verwendeten Software-Programme aufgeführt.

2.6.3 Statistische Analysen

Statistische Analysen wurden in der Regel mit Microsoft Excel 2016 durchgeführt. Für die Signifikanzberechnungen beim Vergleich von zwei Gruppen wie z.B. der Parental-Zelllinien vs. der CRISPR CAS9 Mutanten-Zelllinien wurde ein 2-seitiger t-Test verwendet. Im Fall der Proliferationsexperimente erfolgte zusätzlich eine Varianzanalyse mit einer zwei-faktoriellen ANOVA. Die ermittelten signifikanten p-Werte werden in den Grafiken wie folgt veranschaulicht: * = $p \leq 0,05$, ** = $p \leq 0,01$, *** = $p \leq 0,001$.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der CRISPR CAS9 vermittelten Genom-Editierung in humanen Zelllinien

3.1.1 Etablierung der Transfektionseffizienzen in HCC827- und Wi38-Zellen

Zur Erstellung von stabilen Zelllinien mit spezifischen CRISPR CAS9 induzierten Mutationen wurde zunächst für die Adenokarzinom-Zelllinie HCC827 und die fötale Lungenfibroblasten-Zelllinie Wi38 die Transfektionseffizienz von insgesamt drei Transfektionsreagenzien untersucht. Da sich die Anwendung mit Lipofectamine 2000 als zu toxisch für die beiden Zelllinien erwies, wurden die Transfektionsmittel Lipofectamine LTX, Attractene und HiPerFect in ihrer Effizienz verglichen. In einer 12 *Well*-Zellkulturplatte wurden für die Zelllinien HCC827 200.000 Zellen/*Well* und für Wi38 80.000 Zellen/*Well* ausgesät. 24 h nach der Aussaat wurden die Transfektionen durchgeführt. Zur Überprüfung der Transfektionseffizienzen wurde das CRISPR-Expressionsplasmid pSpCas9(BB)-2A-GFP verwendet. Die Transfektionen mit Lipofectamine LTX wurden jeweils mit 4 µg Plasmid-DNA mit 2 µl, 4 µl und 5 µl Transfektionsreagenz ausgetestet. Die Untersuchungen der Attractene –Effizienz erfolgte bei 0,8 µg Plasmid-DNA, wobei 2 µl, 3 µl und 6 µl Reagenz verwendet wurden. Die Versuchsreihe mit HiPerFect wurden mit 3 µl, 6 µl und 9 µl Transfektionsreagenz und insgesamt 75 ng Plasmid-DNA durchgeführt. Die Transfektionseffizienzen wurden nach 24 h unter dem Fluoreszenzmikroskop anhand des GFP-Signals bestimmt und miteinander verglichen. In beiden Zelllinien konnte bei Lipofectamine LTX bei einer Konzentration von 5 µl die höchste Effizienz ermittelt werden (Abbildung 3.1 und 3.2). Aus diesem Grund erfolgten die nachfolgenden Transfektionen, die in 6 cm Schalen durchgeführt wurden, mit Lipofectamine LTX. Die Transfektionsansätze wurden entsprechend hochskaliert und pro Transfektion 2,5 µg CRISPR CAS9-Plasmid eingesetzt. Pro 6 cm Schale wurden für die Zelllinien HCC827 450.000 und für Wi38 400.000 Zellen ausgesät.

3 Ergebnisse

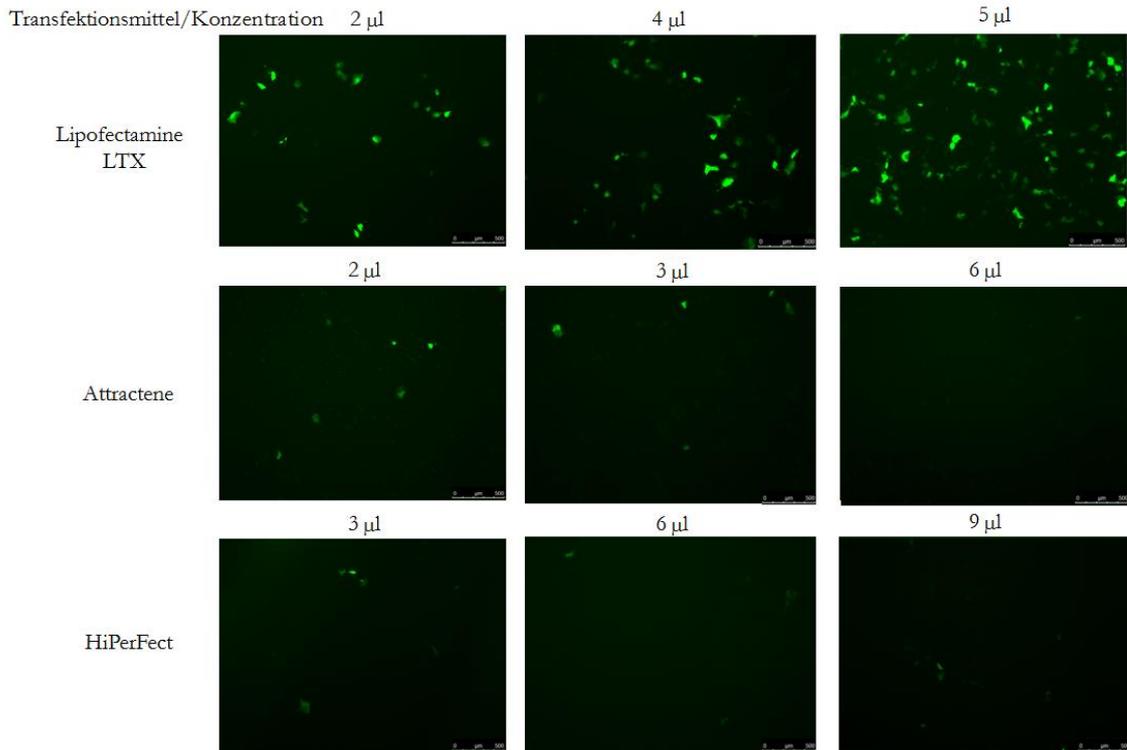


Abb. 3.1: Ermittlung der Transfektionseffizienz in der Adenokarzinom-Zelllinie HCC827 mit den Transfektionsmitteln Lipofectamine LTX, Attractene und HiPerFect. Die Aufnahmen erfolgten 24 h nach der Transfektion mit dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 10-fachen Vergrößerung.

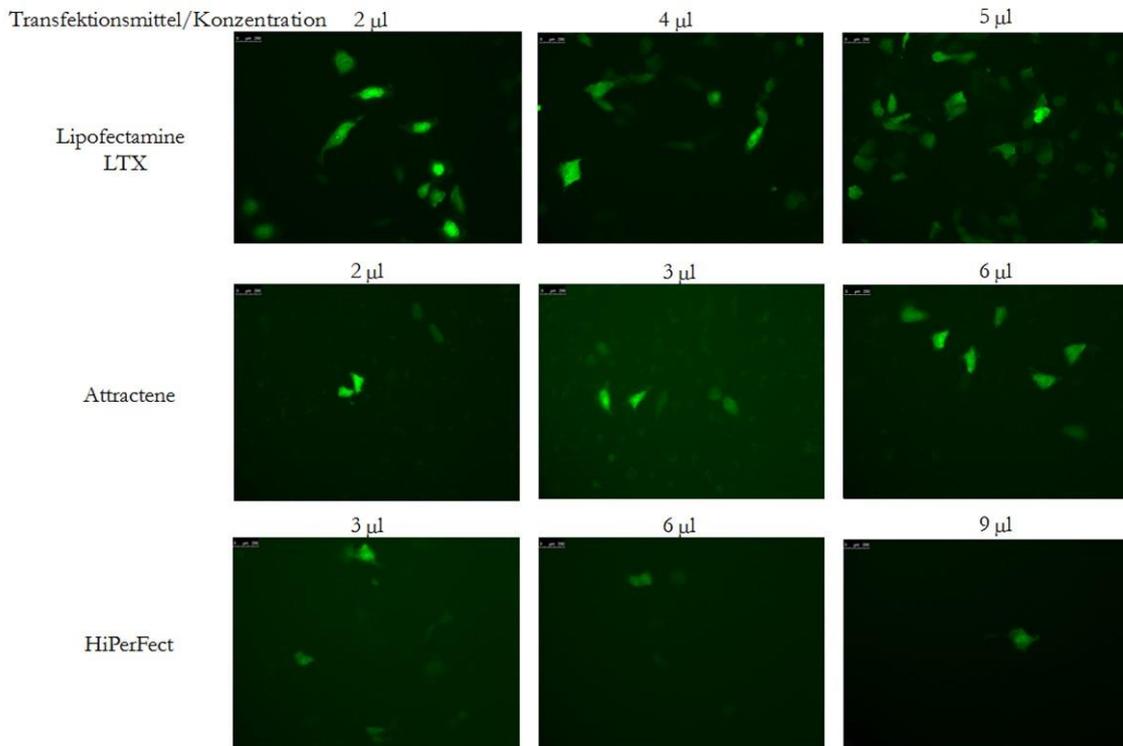


Abb. 3.2: Ermittlung der Transfektionseffizienz in der Zelllinie Wi38. Die Aufnahmen erfolgten mit dem Fluoreszenzmikroskop bei einer 20-fachen Vergrößerung 24 h nach der Transfektion.

Für das Kandidatengen *KMT2D* wurden Transfektionen in HCC827-Zellen durchgeführt, während für das Kandidatengen *BRD4* Wi38-Zellen transfiziert wurden. Die Transfektionen mit den sgRNA-Puromycin-Expressionsplasmiden wurden für die Selektionsexperimente in Duplikaten vorgenommen (Übersicht Transfektionen Tabelle 3.1.).

Tabelle 3.1. Übersicht Transfektionen.

Kandidatengen	Transfektion in Zelllinie	Name des CRISPR-Expressionsplasmiden	Menge der Plasmid-DNA pro Transfektion in ng	Kontrollen
<i>KMT2D</i>	HCC827	wt-Puro-sgExon31	2500	
		wt-Puro-sgExon41	2500	
		wt-Puro-sgExon48	2500	
<i>BRD4</i>	Wi38	wt-Puro-sgExon1	2500	
		wt-Puro-sgExon20	2500	
		wt-Puro-Leer	5000	Puromycin-Selektion
		wt-GFP-Leer	5000	Transfektions-effizienz

Neben den Transfektionen der klonierten CRISPR-Expressionsplasmide wurden Kontroll-Transfektionen mit dem Puromycin- als auch mit dem GFP-Leervektor durchgeführt. Die Transfektionseffizienz wurde nach 24 h mit dem Transfektionsansatz des GFP-Leervektors unter dem Fluoreszenzmikroskop überprüft. Für die Transfektionen mit HCC827 konnte eine Effizienz von 15 %-20 % ermittelt werden, während bei Transfektionen mit Wi38- Zellen eine ca. 55-65 % Effizienz festgestellt werden konnten. Die Transfektion mit dem Puromycin-Leervektor diente als Referenz bei der später folgenden Puromycin-Selektion.

3.1.2 Definition der experimentellen Konditionen zur Puromycin-Selektion in HCC827- und Wi38-Zellen

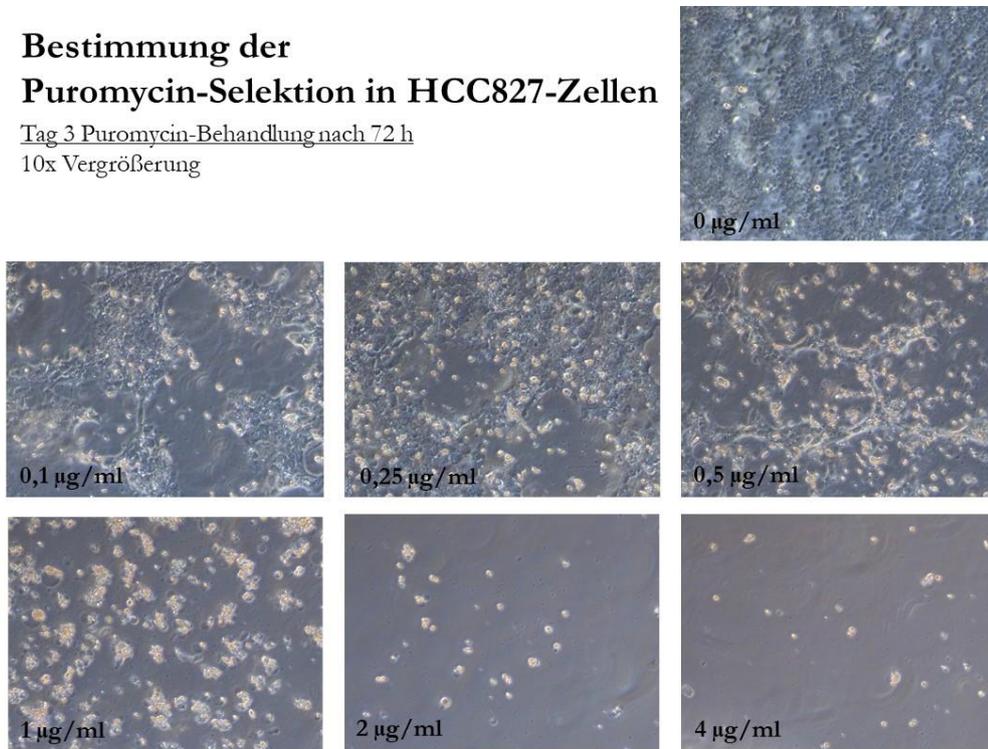
Nach der Transfektion der Zellen mit den CRISPR-Expressionsplasmiden schloss sich die Selektion mit Puromycin an. Nach den Angaben des Herstellers wurden zwar Konzentrationen zwischen 0,2 und 0,5 µg/ml Puromycin angegeben, aber da es nicht auszuschließen war, dass Konzentrationen unter 1 µg/ml toxisch bei eukaryotischen Zellen wirken konnten, musste vor einer Anwendung die entsprechende Konzentration für die Selektionen in der jeweiligen Zelllinie bestimmt werden. Für die Selektionen der HCC827-Zellen wurde eine Konzentration 0,5 µg/ml

3 Ergebnisse

Puromycin ermittelt, während für die Selektion von Wi38-Zellen eine Konzentration von 0,25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ eingesetzt wurde (Abbildung 3.3).

Bestimmung der Puromycin-Selektion in HCC827-Zellen

Tag 3 Puromycin-Behandlung nach 72 h
10x Vergrößerung



Bestimmung der Puromycin-Selektion in Wi38-Zellen

Tag 3 Puromycin-Behandlung nach 72 h
10x Vergrößerung



Abb. 3.3: Validierung der Puromycin-Konzentration zur Selektion in HCC827- Zellen (oben) und Wi38-Zellen (unten). Der Absterbegrad der Zellen wurde bei insgesamt sechs unterschiedlichen Puromycin-Konzentrationen zwischen 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ bis 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ über einen Zeitraum von 72 h untersucht und dokumentiert. Für HCC827-Zellen wurde eine

Konzentration von 0,5 µg/ml Puromycin zur Selektion ermittelt. Bei der Zelllinie Wi38 wurde eine 0,25 µg/ml Puromycin-Konzentration festgestellt.

3.1.3 Methodenoptimierung zur Isolation genomischer DNA bei geringen Zellzahlen

Bei Screeningverfahren zur Detektion von CRISPR CAS9 induzierten Mutationen aus unterschiedlich wachsenden Zellkolonien in 96 *Well*-Zellkulturplatten, war es elementar die Extraktion genomischer DNA bei geringen Zellzahlen zu maximieren, um robuste Signale in einer PCR zu erhalten. Als Erstes wurden drei unterschiedliche DNA-Präparationsmethoden ausgetestet: ein Zwei-Komponenten-System (Quanta BioScience), die Präparation mit dem *DirectPCR Lysis*-Zell-Reagenz (Viagen Biotech) oder das Erhitzen im initialen Schritt der PCR ohne vorherige Lyse der Zellen. Die Effizienz der Methoden wurde anschließend in einer PCR ausgetestet und miteinander verglichen.

Bei der Methode, in der Zellen ohne vorhergehenden Lyseschritt direkt in die PCR gegeben werden, wurden DU145-Zellen direkt im Mastermix homogenisiert. Ein initialer *Hotstart* vor der eigentlichen PCR bewirkt ein Bersten der Zellen, sodass die Proteine inaktiviert und die DNA im Mastermix freigesetzt wird, wodurch auf die Verwendung einer Proteinase K verzichtet werden kann. Der entscheidende Faktor bei dieser Methode ist die Menge der zugeführten Zellen, so dass bei den Experimenten unterschiedliche Zellmengen der Zelllinie DU145 ausgetestet wurden, um die unterste Nachweisgrenze in der PCR feststellen zu können. Bei einer Konfluenz von unter 70 % in einer 96 *Well*-Zellkulturplatte konnte in den PCRs kein Signal detektiert werden. In der Abbildung 3.4 wird ein PCR-Ergebnis von DU145-Zellen dargestellt, bei dem eine Konfluenz von mindestens 70-90 % getestet wurde. Als Kontaminationskontrolle diente eine Negativkontrolle mit Wasser. Die Positivkontrolle zur Überprüfung der PCR-Konditionen wurde mit 10 ng DNA (Affimetrix) durchgeführt.

Bei der Methode, bei der die Zellen direkt in den PCR-Ansatz gegeben werden, können nur dann stabile Signale in der PCR erhalten werden, wenn die zu untersuchenden Zellen nahezu vollständig konfluent sind, wodurch diese Methode für eine Anwendung bei den CRISPR CAS9-Screeningverfahren nicht weiterverfolgt wurde.

In den Experimenten mit dem Zwei-Komponenten-System konnten keine konsistenten Ergebnisse in den PCRs erzielt werden (Daten der PCRs nicht gezeigt), sodass diese Methode für die Screeningverfahren nicht weiter nicht Betracht gezogen wurde.

3 Ergebnisse

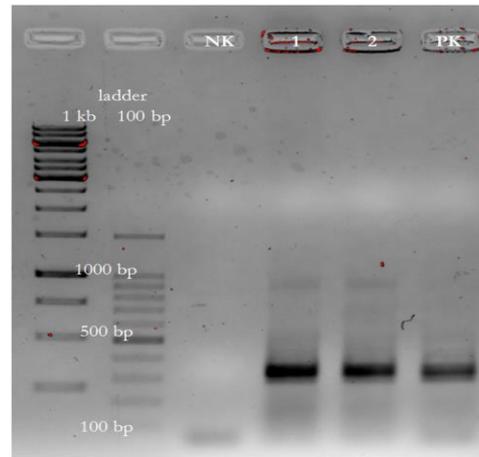
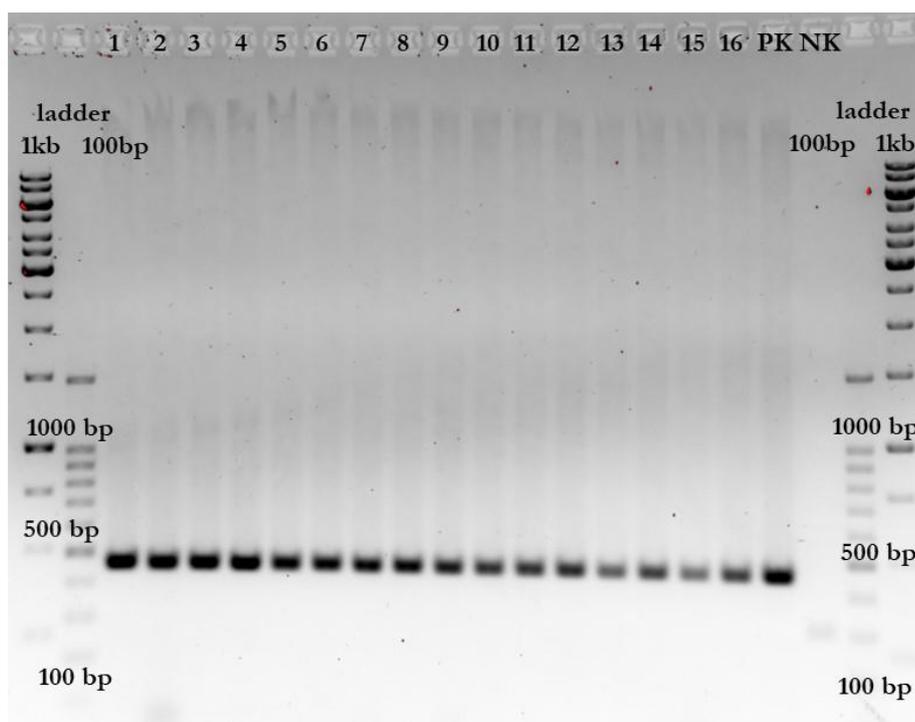


Abb.3.4: DNA-Präparation ohne Lyse der Zellen. Das PCR-Produkt liegt bei 330 bp. Legende: 1: DU145-Zellen mit einer Konfluenz von >85%, 2: 70-80 % konfluente Zellen, NK: Negativkontrolle; PCR-Ansatz ohne DNA, PK: Positivkontrolle 10 ng Kontroll-DNA (Affimetrix).

Bei der Anwendung mit dem *DirectPCR Lysis*-Zell-Reagenz wurden zunächst die einzusetzenden Volumina ausgetestet, um ein möglichst hoch konzentriertes DNA-Lysat zu erhalten. Des Weiteren wurden zwei verschiedene Proteinase K- Präparationen ausgetestet, eine mit und eine ohne zusätzliches Glycerol. Neben der Nachweisgrenze in der PCR wurde hierbei betrachtet, ob bei zu hohen eingesetzten Mengen des DNA-Lysats eine Inhibierung der PCR erfolgte. Für den Versuch wurde Wi38 DNA mit dem Lyse-Reagenz aus 96 *Well*-Zellkulturplatten extrahiert. Als Kontrolle bei der PCR diente eine Negativkontrolle, bei der an Stelle von DNA Wasser eingesetzt wurde, um Kontaminationen auszuschließen. Zur Überprüfung der PCR-Bedingungen wurden als Positivkontrolle 50 ng/ μ l DNA von Wi38-Zellen eingesetzt. In der Abbildung 3.5 wird das Ergebnis der PCR-Analyse nach der Anwendung von unterschiedlichen Volumina der *DirectPCR Lysis* -Zell-Reagenz aufgeführt. Da mit dieser Methode repetitiv stabile Ergebnisse erzeugt werden konnten, wurde diese für die DNA-Präparation bei den nachfolgenden CRISPR CAS9 Screeningverfahren eingesetzt. Bei den Screenings wurden in der Regel 1-5 μ l DNA-Lysat verwendet, wobei für die Extraktion eine Proteinase K ohne Glycerol verwendet wurde. Die Ergebnisse bei der Verwendung einer Proteinase K mit Glycerol lieferten im Vergleich weniger starke Signale in der PCR. Für die künftigen Präparationen wurden pro *Well* zur Lyse der Zellen 40 μ l Lyse-Reagenz in einem Mischungsverhältnis von 40 μ l nukleasefreiem Wasser eingesetzt.



Nr.	<i>DirectPCR</i> <i>Lysis-</i> Reagenz/ <i>Well</i> (in μ l)		Proteinase K (Stock) Konz. (in mg/ml)	Lysat pro PCR- Reaktion (in μ l)	Nr.	<i>DirectPCR</i> <i>Lysis-</i> Reagenz/ <i>Well</i> (in μ l)		Proteinase K (mit Glycerol) Konz. (in mg/ml)	Lysat pro PCR- Reaktion (in μ l)
	<i>Well</i> (in μ l)	H ₂ O/ <i>Well</i> (in μ l)				<i>Well</i> (in μ l)	H ₂ O/ <i>Well</i> (in μ l)		
1	25	25	0,4	1	10	25	25	0,4	5
2	25	25	0,4	5	11	40	40	0,4	1
3	40	40	0,4	1	12	40	40	0,4	5
4	40	40	0,4	5	13	50	50	0,4	1
5	50	50	0,4	1	14	50	50	0,4	5
6	50	50	0,4	5	15	70	70	0,4	1
7	70	70	0,4	1	16	70	70	0,4	5
8	70	70	0,4	5	PK			Wi38 DNA	
9	25	25	0,4	1	NK			H ₂ O	

Abb. 3.5: Nachweis der PCR-Effizienz nach der Anwendung der *DirectPCR Lysis-Zell-Reagenz* zur DNA-Extraktion aus 96 *Well*-Zellkulturplatten. Die detaillierte Legende zur Beschreibung des PCR-Bildes ist in der Tabelle unter der Abbildung aufgeführt.

3.1.4 Screening und Validierung von CRISPR CAS9 induzierten Mutationen

Da nicht in jeder Zelle trotz der hohen Effektivität von CRISPR CAS9 die Mutationen in den Zielregionen der Kandidatengene eingeführt werden, ist es notwendig, CRISPR CAS9 positive Zellen effizient zu identifizieren und zu verifizieren. Beim Kandidatengen *KMT2D* wurden zwei Deletionen in die Adenokarzinom-Zelllinie HCC827 induziert.

Die erste Deletion erstreckt sich von Exon 31 bis 41 über einen Bereich von 10737 bp, wobei das Leseraster intakt bleibt. Die für die Funktionalität essentielle SET-Domäne im C-terminalen

3 Ergebnisse

Bereich des Gens bleibt dadurch weiterhin erhalten. Die zweite Deletion umfasst einen Bereich von insgesamt 15163 bp, wobei die Region zwischen Exon 31 bis Exon 48 herausgeschnitten wird. Diese Mutation führt zu einem Stop-Codon auf Grund einer Leserasterverschiebung, sodass der Verlust der SET-Domäne erfolgt. In der Abbildung 3.6 wird zur Veranschaulichung eine Übersicht der CRISPR CAS9 induzierten Mutationen in *KMT2D* dargestellt.

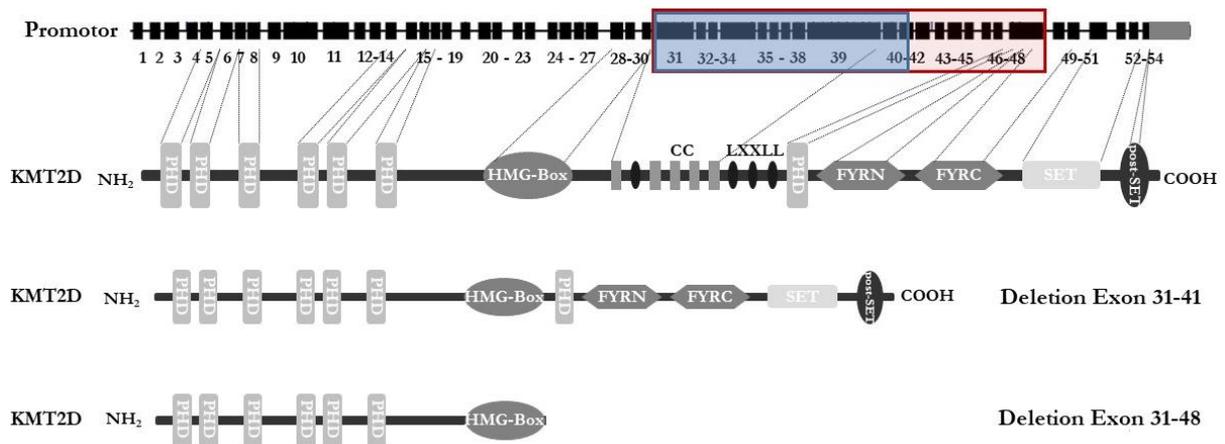


Abb.3.6: Übersicht der CRISPR CAS9 induzierten Mutationen. Oben: genomische Struktur von *KMT2D*. Schwarze Rechtecke stellen die insgesamt 54 codierenden Exons dar, die horizontalen Linien symbolisieren die Introns. Der 3' UTR wird in Form eines grauen Rechtecks abgebildet. Das blaue Rechteck markiert den Bereich von Exon 31-41, in dem die kleinere Deletion induziert wird. Das rote Rechteck markiert die Region der zweiten Deletion von Exon 31-48. Unten: Übersicht der unterschiedlichen Deletionen in der Domänenstruktur. Während bei der Deletion von Exon 31-41 die funktionswichtige SET-Domäne erhalten bleibt, führt die Deletion von Exon 31-48 zu einer verkürzten Form und einem Stop-Codon (Grafik modifiziert nach Micale et al., 2011).

Die Deletion im Kandidatengen *BRD4* umfasst mit 42 000 bp die gesamte Länge des Gens. Die Bindung der sgRNAs erfolgt dabei in der jeweiligen untranslatierten Region (UTR) von Exon 1 und Exon 20 (siehe Abbildung 3.7). Bei den *BRD4*-Klonen erfolgte die Isolierung der DNA mit Hilfe der *DirectPCR Lysis*-Zell-Reagenz unter den 3.1.3 ermittelten Konditionen. Die Screeningverfahren erfolgten unter der Verwendung der Q5-Polymerase, da diese eine höhere Sensitivität bei sehr geringen DNA-Mengen aufwies.

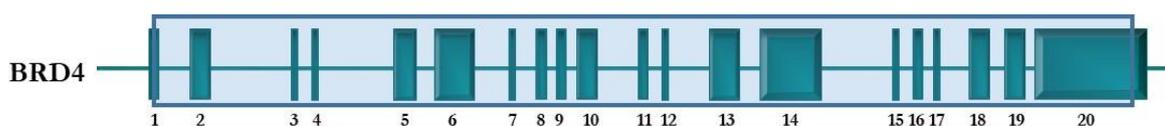
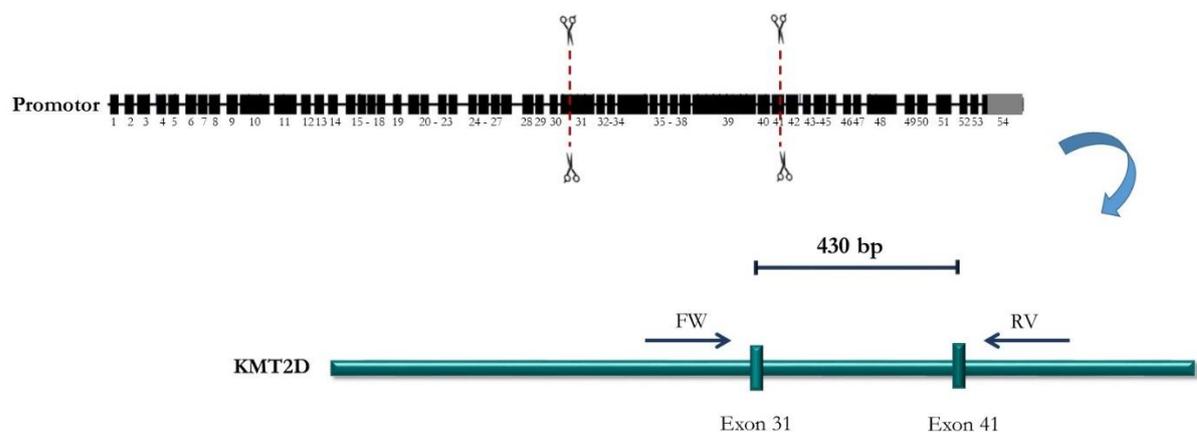


Abb.3.7: Übersicht der CRISPR CAS9 induzierten Mutation im Kandidatengen *BRD4*. Die Genomstruktur von *BRD4* wird veranschaulicht durch die 20 codierenden Exons (türkise Quadrate), einschließlich der Introns (horizontale blaue Linien). Die Mutation wird in den jeweiligen UTR-Bereichen der Exons 1 und 20 eingeführt (hellblaues Rechteck).

Die Testreihen der unterschiedlich induzierten Mutationen erhielten zur Übersichtlichkeit alphabetische Kürzel. Jeder untersuchte Klon aus der Versuchsreihe der *KMT2D*-Deletion zwischen Exon 31-41 wurde mit einem A und einer fortlaufenden Nummer gekennzeichnet. Die untersuchten Klone aus dem Screening der *KMT2D*-Deletion von Exon 31 bis 48 erhielten das alphabetische Kürzel B. Die untersuchten Klone der Versuchsreihe mit der induzierten Mutation in *BRD4* wurden mit dem Kürzel E gekennzeichnet. Da die Deletionen in den Kandidatengenomen größere genomische Regionen umfasste, erfolgten die PCR-basierten Screeningverfahren unter der Verwendung von insgesamt drei Primersets. Ein Primerset bindet dabei um die Region der Deletion, wobei nur im Fall einer induzierten Deletion ein PCR-Produkt amplifiziert wird. Bei den anderen beiden Primersets bindet jeweils ein Primer in der Deletionsregion während der andere Primer stromabwärts bzw. -aufwärts um den Bereich der Zielregion bindet, sodass nur ein PCR-Produkt bei einem unveränderten Wildtyp amplifiziert wird. In der Abbildung 3.8 wird zur Veranschaulichung ein Schema für das Screeningverfahren der *KMT2D*-Mutanten mit einer Mutation von Exon 31-41 dargestellt. Im Falle eines positiven Klons wurde eine Bande auf der Höhe von 430 bp erwartet (siehe Abbildung 3.9). Pro Screening wurde zusätzlich eine Positiv-, Negativ- und eine Deletionskontrolle durchgeführt. Als Positivkontrolle diente ein Primerpaar, das über einen der Bereiche band, in dem die Mutation induziert werden sollte. Bei *KMT2D* diente als Positivkontrolle HCC827-DNA. Um Kontaminationen in der PCR auszuschließen diente als Negativkontrolle ein Ansatz ohne DNA. Als eine weitere Negativkontrolle diente eine sogenannte Deletionskontrolle, bei der die Wildtyp-DNA mit den Deletionsprimern getestet wurde, um unerwünschte PCR-Produkte und Hintergrundreaktionen auszuschließen. Insgesamt wurden in der Versuchsreihe A 98 Klone getestet, von denen ein Klon mit der erstrebten Mutation ermittelt wurde. Prozentual entspricht dies einer Ausbeute von 1% der Gesamtanzahl der untersuchten Klone, die eine CRISPR CAS9 induzierte Mutation tragen.



3 Ergebnisse

Abb.3.8: Selektion von Klonen mit einer Mutation zwischen Exon 31 bis 41. Die Primer binden um den Bereich der induzierten Deletionsregion, sodass im Falle einer Deletion im PCR-basierten Screeningverfahren eine Bande bei 430 bp amplifiziert wird. Legende: FW: *Forward*-Primer, RV: *Reverse*-Primer.

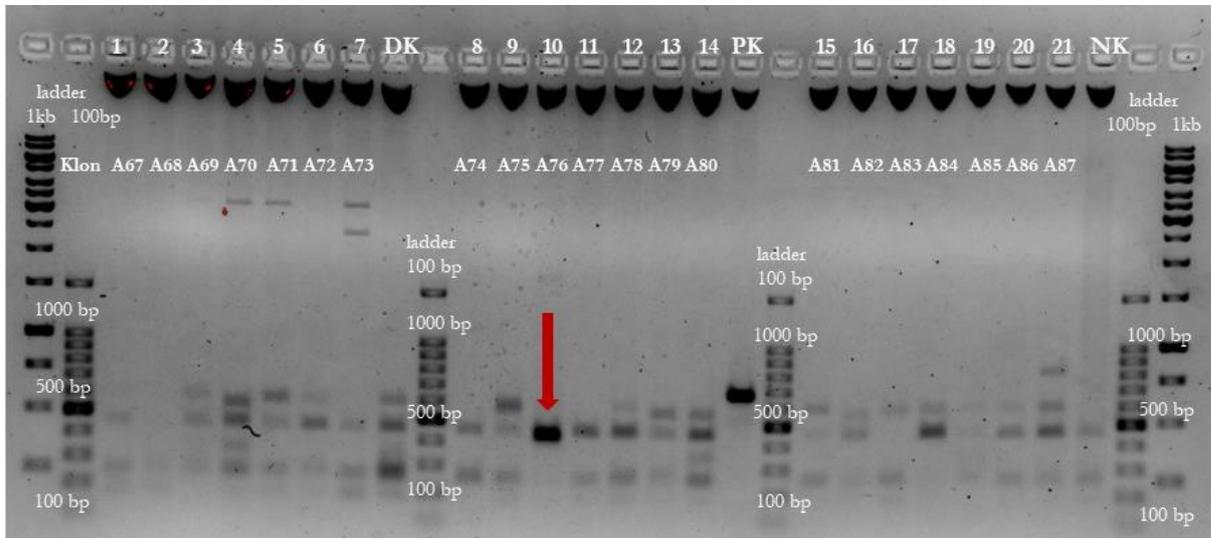


Abb.3.9: Gelbild des Screeningverfahrens der Versuchsreihe A-Deletion in *KMT2D* im Bereich von Exon 31-41. Der Klon A76 weist eine erkennbar starke Bande auf der erwarteten Höhe von 430 bp auf (roter Pfeil). Legende: In den Bahnen 1-21 werden die Klone A67-A87 analysiert. DK: Deletionskontrolle; Kontrolle der Deletionsprimer mit 10 ng genomischer HCC827-DNA; PK: Positivkontrolle mit 10 ng HCC827-DNA; NK: Negativkontrolle; Kontaminationskontrolle ohne genomische DNA.

Bei der Versuchsreihe B, in der nach der erfolgten Einführung der Mutation ein Verlust der SET-Domäne von *KMT2D* erfolgt, wurden insgesamt 49 Klone überprüft, von denen insgesamt drei Klone die induzierte Deletion zwischen Exon 31-48 aufwiesen, was einem prozentualen Anteil von insgesamt 6 % entspricht. In der Abbildung 3.10 zeigt das Schema der verwendeten Screeningprimer, dass zur Detektion der Deletion ein PCR-Produkt auf der Höhe von 1500 bp visualisiert werden kann. In der darunter befindlichen Abbildung 3.11 werden die positiv identifizierten Klone der Testreihe B dargestellt.

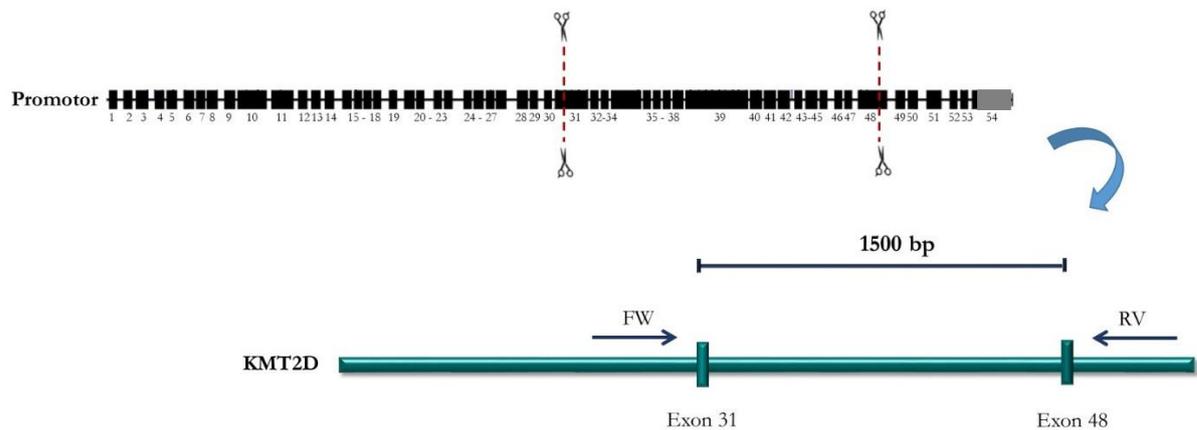


Abb.3.10: Selektion von Klonen der Versuchsreihe B- Deletion in *KMT2D* im Bereich von Exon 31-48. Im Fall eines positiven Klons wird eine Bande in der PCR bei 1500 bp erwartet. Legende: FW: *Forward-Primer*, RV: *Reverse-Primer*.

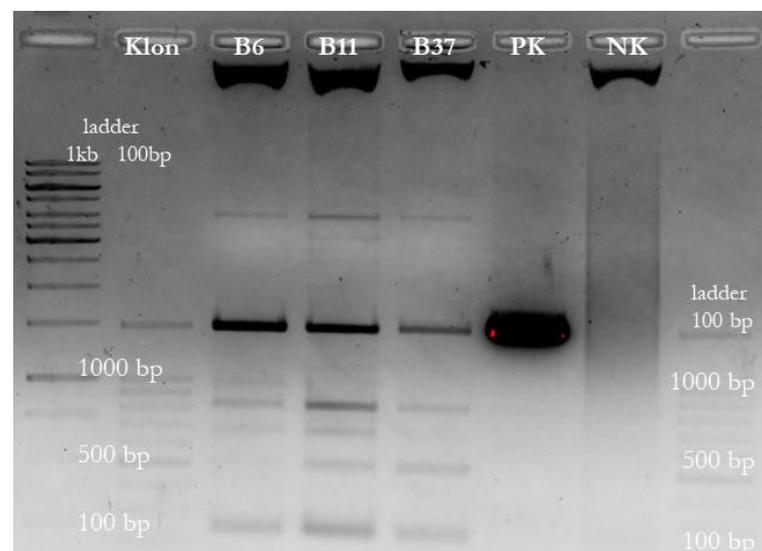


Abb.3.11: Gelbild des Screeningverfahrens der *KMT2D*-Klone der Testreihe B. Im Gelbild zeigen die Klone B6, B11 und B37 eine Bande von 1500 bp. Legende: PK: Positivkontrolle mit 10 ng genomischer HCC827-DNA; NK: Negativkontrolle; Kontaminationskontrolle ohne genomische DNA.

Bei der Analyse von positiven Klonen mit einer Mutation im Kandidatengen *BRD4*, konnte in den Screeningverfahren eine PCR-Bande bei 318 bp visualisiert werden. Das Schema der verwendeten Selektionsprimer ist in der Abbildung 3.12 vereinfacht dargestellt. Wie zuvor beschrieben, wurden die Screeningverfahren mit der Q5-Polymerase durchgeführt und jeweils eine Negativ-, eine Deletions- als auch eine Positivkontrolle verwendet. Bei der Positivkontrolle wurde Wi38-DNA eingesetzt. Das Screening umfasste insgesamt 167 Klone, von denen 50 Klone die erwünschte Mutation aufwiesen. Die Ausbeute von den positiv ermittelten Klonen entspricht damit 30 %. In der Abbildung 3.13 werden exemplarisch die untersuchten *BRD4*-Klone E106-126 dargestellt.

3 Ergebnisse

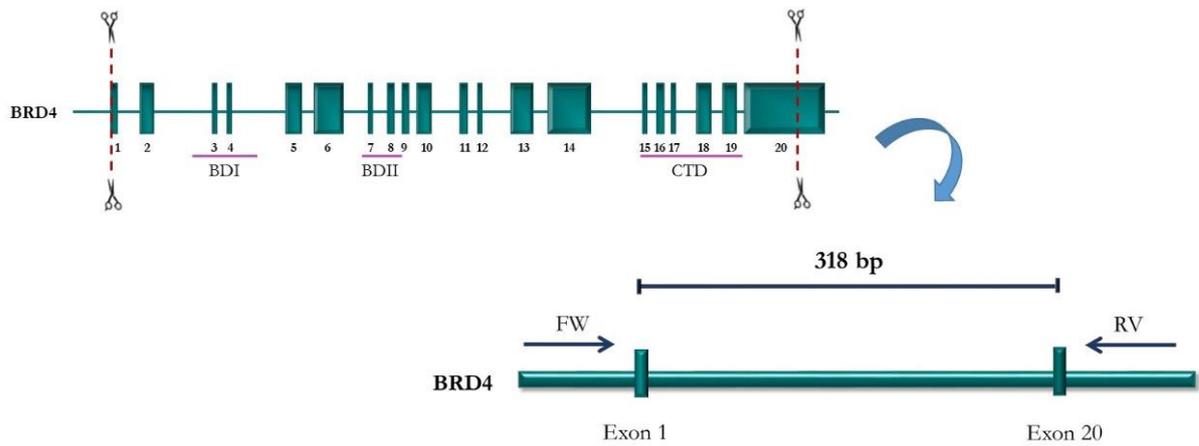


Abb.3.12: Analyse der Zielregion im Kandidatengen *BRD4*. Beim Screening von Klonen der Versuchsreihe E erfolgt bei einer erfolgreichen Deletion zwischen Exon 1- 20 ein PCR-Produkt auf der Höhe von 318 bp.

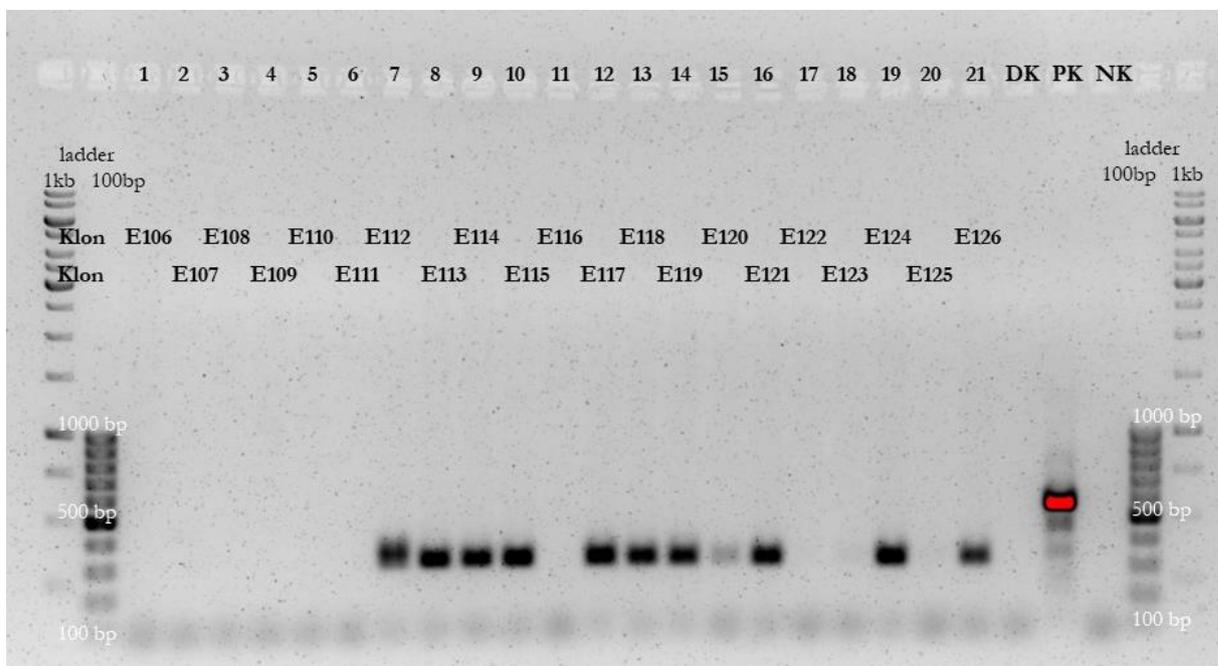


Abb.3.13: Gelbild des Screeningverfahrens zur CRISPR CAS9 eingeführten Deletion in *BRD4*. Legende: In den Bahnen 1-21 werden die Klone E106-E126 dargestellt. DK: Deletionskontrolle mit 10 ng genomischer Wi38- DNA; PK: Positivkontrolle mit 10 ng Wi38-DNA; NK: Negativkontrolle; Kontaminationskontrolle ohne genomische DNA.

Um den Mutationsstatus der positiv identifizierten Klone genotypisch als mono- oder biallelisch definieren zu können, wurden wie zuvor beschrieben für die Analysen insgesamt drei Primersets designt. Neben dem Primerset zur Identifizierung der Deletion, wurden die beiden zusätzlichen Primersets für die Bestimmung des Genotyps genutzt. Da bei diesen beiden Primersets jeweils ein Primer in der Deletionsregion bindet, der andere im Bereich um die Deletionsregion, können in einer PCR-Analyse heterozygote Klone durch zusätzliche PCR-Banden identifiziert werden. Für die Analyse wurden neben einer zuvor beschriebenen Deletionskontrolle und Negativkontrolle,

zwei Positivkontrollen mit den Primersets P2 und P3 unter Verwendung von HCC827- DNA durchgeführt. In der Abbildung 3.14 wird eine Übersicht der verwendeten Primer für die Versuchsreihe A dargestellt. Wie in der Abbildung 3.15 deutlich zu erkennen ist, kann im Fall einer heterozygoten Mutation für jedes Primerpaar eine Bande in der PCR nachgewiesen werden. Somit kann in der Mutationsanalyse für den Klon A76 ein heterozygoter Genotyp festgestellt werden.

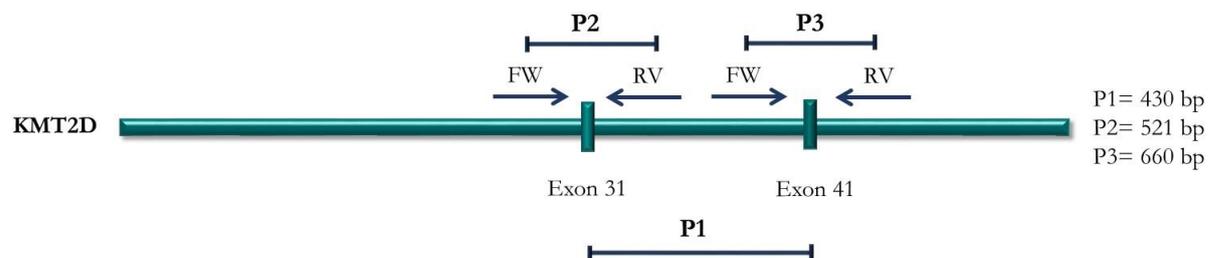


Abb.3.14: Übersicht der Primersets für die Mutationsanalyse in der Versuchsreihe A. Im Falle eines homozygoten Klons wäre nur eine Bande vom Primerset P1 in der PCR zu erwarten, das um den Bereich der Deletion bindet. Bei einem heterozygoten Mutationsstatus können zusätzliche Primer im Bereich der Deletionsregion binden, wodurch in der PCR zwei weitere Banden detektiert werden können.

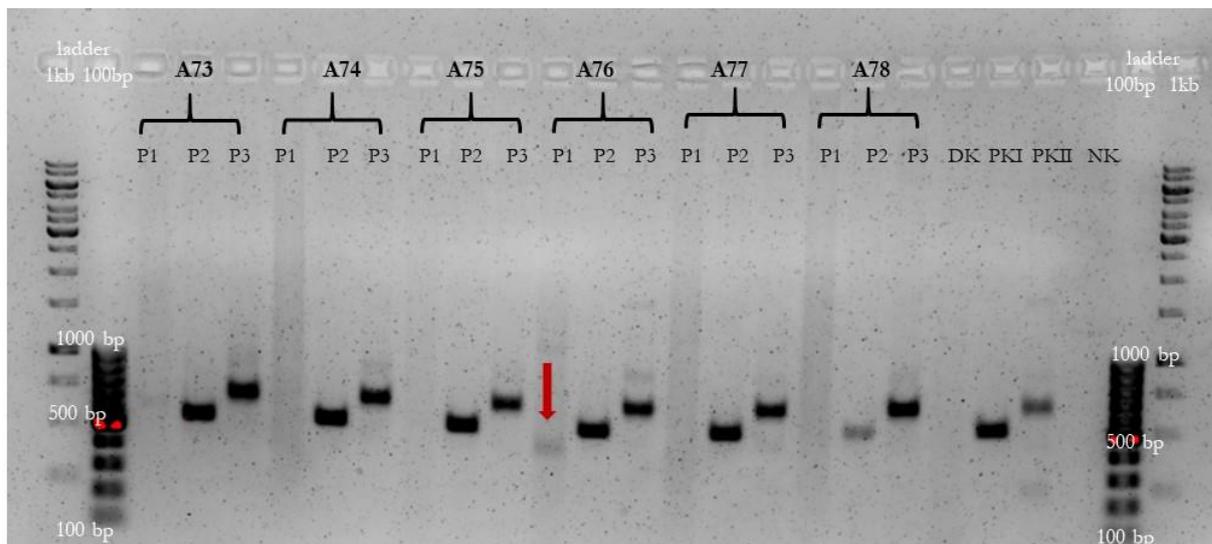


Abb.3.15: Analyse des Mutationsstatus bei *KMT2D*-Klonen der Versuchsreihe A. Im Gelbild kann beim Klon A76 neben dem PCR-Produkt der Deletionsprimer (P1=430 bp), zusätzliche Banden in der Region von Exon 31 bei 521 bp (Primerset P2) als auch Exon 41 bei 660 bp (Primerset P3) visualisiert werden. Der Klon A76 weist demnach eine heterozygote Mutation auf. Legende: DK: Deletionskontrolle mit 10 ng genomischer HCC827-DNA, PKI: Positivkontrolle mit Primerset P2, PKII: Positivkontrolle mit Primerset P3, NK: Negativkontrolle; Kontaminationskontrolle ohne genomische DNA.

Auf Grundlage des Schemas der verwendeten Primersets in Abbildung 3.16, weisen die Klone aus der Versuchsreihe B ebenfalls eine heterozygote Mutation auf (siehe Abbildung 3.17). Neben der

3 Ergebnisse

Deletionsbande, können in der PCR auch in der Region des Primerpaares um Exon 31 als auch beim Primerset, dass in der Region von Exon 48 lokalisiert ist, Banden visualisiert werden.

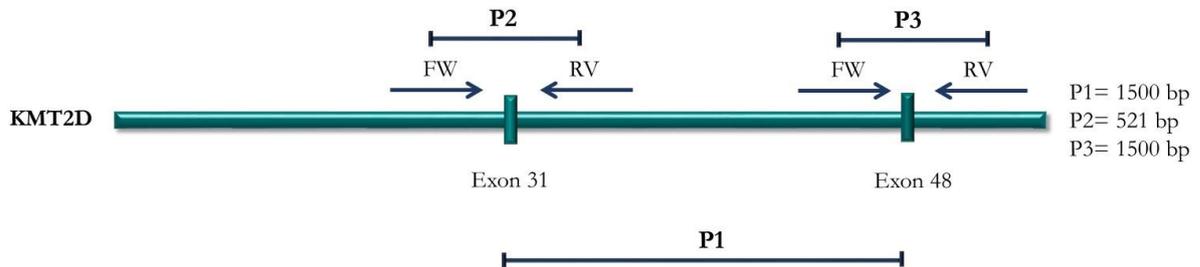


Abb.3.16: Schema Primersets zur Mutationsanalyse in der Versuchsreihe B. Neben dem Primerpaar zur Analyse der Zielregion, binden zusätzliche Primerpaare in der Region um Exon 31 (Primerpaar P2) als auch Exon 48 (Primerpaar P3).

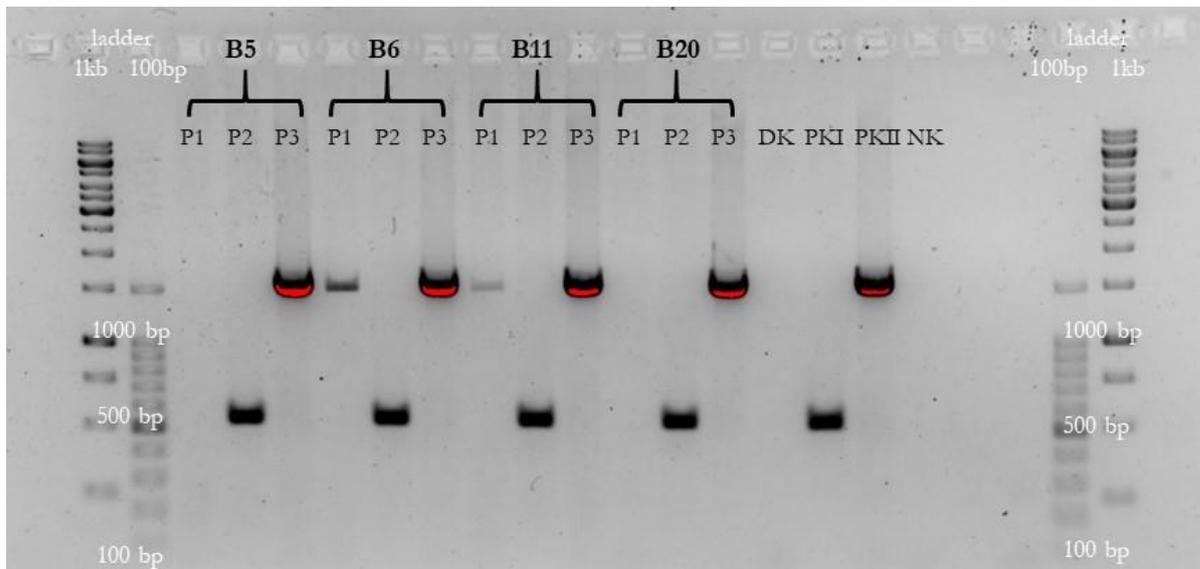


Abb.3.17: Analyse des Genotyps der *KMT2D*-Mutanten der Versuchsreihe B mit der Deletion von Exon 31 bis Exon 48. Für die Klone B6 und B11 konnte ein monoallelischer Mutationsstatus identifiziert werden. Legende: DK: Deletionskontrolle mit 10 ng genomischer HCC827-DNA, PKI: Positivkontrolle mit Primerset P2, PKII: Positivkontrolle mit Primerset P3, NK: Negativkontrolle; Kontaminationskontrolle ohne genomische DNA.

Im Fall der *BRD4*-positiven Klone, wurde der Mutationsstatus mit den im Schema der Abbildung 3.18 dargestellten Primer analysiert. Für 46 der insgesamt 50 getesteten *BRD4*-Mutanten konnte ein heterozygoter Genotyp festgestellt werden. Bei den anderen vier Klonen konnte die Deletion nicht bestätigt werden. In der Abbildung 3.19 werden exemplarisch für die gesamte Analyse die Klone E82-E92 dargestellt.

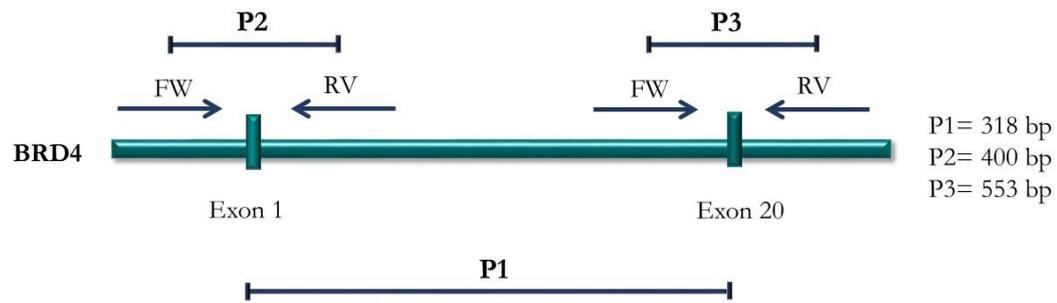


Abb.3.18: Übersicht Primersets zur Überprüfung einer mono-oder biallelischen Mutation bei Klonen der Versuchsreihe E. Im Falle einer monoallelischen Mutation können in der PCR zusätzlich Banden bei 400 bp (Primerpaar P2) und 553 bp (Primerpaar P3) visualisiert werden.

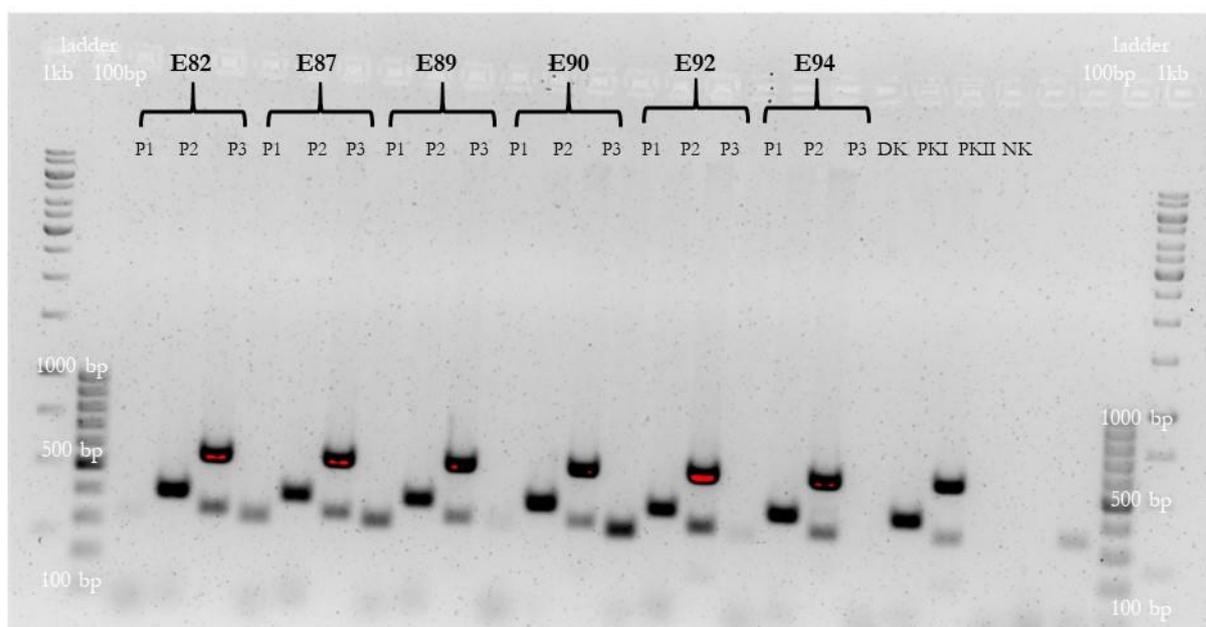


Abb.3.19: Ermittlung des Mutationstatus der CRISPR CAS9 Klone in der Versuchsreihe E mit einer Deletion des gesamten *BRD4*-Gens. Exemplarisch für die gesamte Analyse konnte für die hier aufgeführten Klone E87, E89 und E92 ein heterozygoter Genotyp ermittelt werden. Für die anderen analysierten Klone konnte die zuvor ermittelte Deletion nicht bestätigt werden. Legende: DK: Deletionskontrolle mit 10 ng genomischer Wi38- DNA, PKI: Positivkontrolle mit Primersset P2, PKII: Positivkontrolle mit Primersset P3, NK: Negativkontrolle; Kontaminationskontrolle ohne genomische DNA.

3.1.5 Validierung der generierten Mutationen mittels Sanger-Sequenzierung

Nach der Analyse des Mutationsstatus mittels PCR erfolgte die Sanger-Sequenzierung der positiv getesteten Klone. In der Abbildung 3.20 wird exemplarisch anhand der *BRD4*-CRISPR-Mutante E87 das Ergebnis der Sequenzierung mit der Wildtypform von *BRD4* im *UCSC Browser* dargestellt. Die Sanger-Sequenzierungen der analysierten *KMT2D*-Mutanten als auch der *BRD4*-Mutante E114 sind dem Anhang E zu entnehmen. Neben dieser Analyse wurde im Elektropherogramm des sequenzierten Klons der Deletionspunkt ermittelt, d.h. der Bereich an der die Bindung der sgRNAs

3 Ergebnisse

erfolgte und der CRISPR CAS9 Komplex die Doppelstrangbrüche eingeführt hat (siehe Abbildung 3.20). So konnte auf die Base genau festgestellt werden, ob die Mutation die für den NHEJ-Reparatursignalweg typischen Indels aufwies. Weder bei der Analyse der *BRD4*-Klone noch bei den *KMT2D*-Mutanten wurden an der Stelle der induzierten Mutationen Indels lokalisiert.

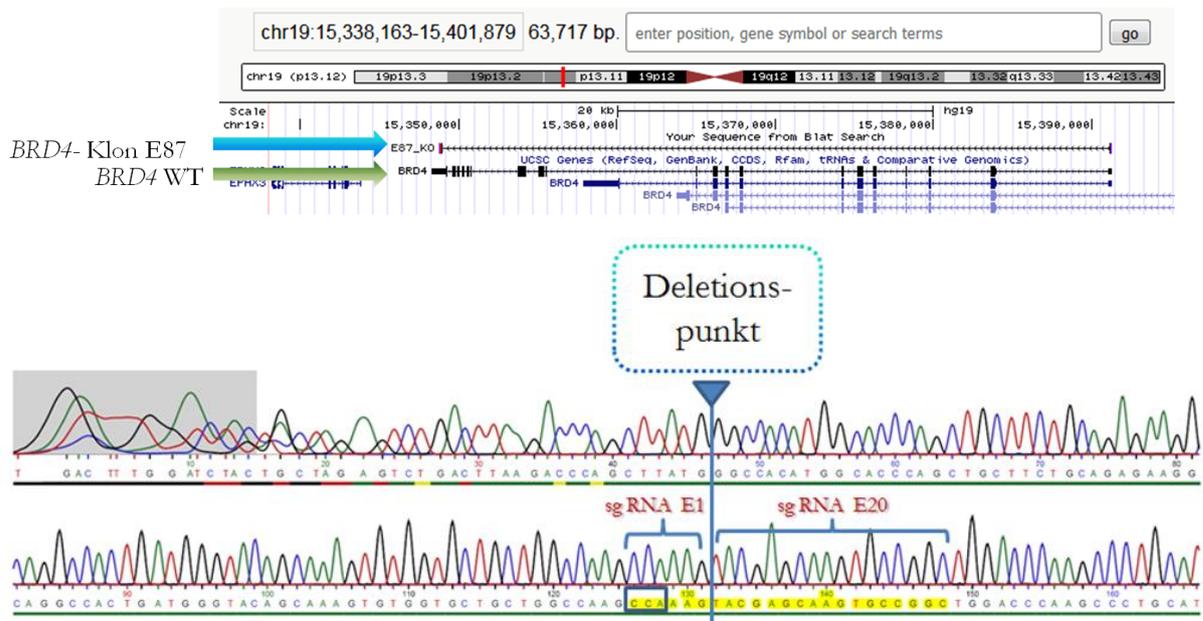


Abb. 3.20: Validierung der generierten Mutation im *BRD4*-Klon E87. Oben: Vergleich der Ursprungsform des Kandidatengens *BRD4* (grüner Pfeil) mit der *BRD4*-CRISPR-Mutante E87 (blauer Pfeil) in BLAT des *UCSC Browser*s. Bei der Mutante E87 ist die induzierte Deletion zwischen Exon 1 und Exon 20 deutlich zu erkennen. Unten: Elektropherogramm der Sequenzierung des *BRD4*-Klons E87. Im dargestellten Elektropherogramm wurde die Position markiert, an der die Deletion mit dem CRISPR CAS9-Komplex erfolgte (Deletionspunkt). Das blaue Quadrat markiert die PAM-Domäne der sgRNA von Exon 1. Nach drei Nukleotiden erfolgt der Schnitt von sgRNA E1. Die nachfolgende gelbmarkierte Sequenz zeigt den Bereich, in dem die sgRNA E20 in Exon 20 bindet.

3.2 Expressionsanalyse von *KMT2D* und *BRD4* in CRISPR CAS9 modifizierte Zelllinien

Nach der Etablierung der stabilen Zelllinien mit spezifisch eingeführten Mutationen in die Kandidatengene *KMT2D* und *BRD4* erfolgte zunächst die Untersuchung ob diese mit einer Veränderung in der Expression im Vergleich zu den jeweiligen Parental-Zelllinien einhergehen.

3.2.1 Expressionsanalyse in *KMT2D*-Mutanten

Die *KMT2D*-Expression in den *KMT2D*-Mutanten A76 und B6 wurde mittels q-PCR- und Western Blot Analysen mit der Expression der Parental-Zelllinie verglichen. Unterschiede zum Wildtyp sind bei beiden Mutanten durch eine signifikante Herunterregulation in der RNA-Expression festzustellen (Abbildung 3.21A; t-Test aus drei unabhängigen Experimenten im Triplikate, zweiseitig gepaart; $p < 0,001$). Die Proteinexpression ist im Vergleich zur Parental-Zelllinie HCC827 in den *KMT2D*-Mutanten deutlich verringert (Abbildung 3.21 B). Aufgrund der Größe des *KMT2D*-Proteins von 564 kDa wurde zur Normalisierung der Proteinexpression der Spleiß-Faktor Aquarius verwendet. Eine Quantifizierung von zwei unabhängigen Experimenten ergab eine um 37 % (Mutante A76) bzw. um 42 % (Mutante B6) verminderte *KMT2D*-Proteinexpression (Abbildung 3.21 C; t-Test aus zwei unabhängigen Versuchen, n.s.).

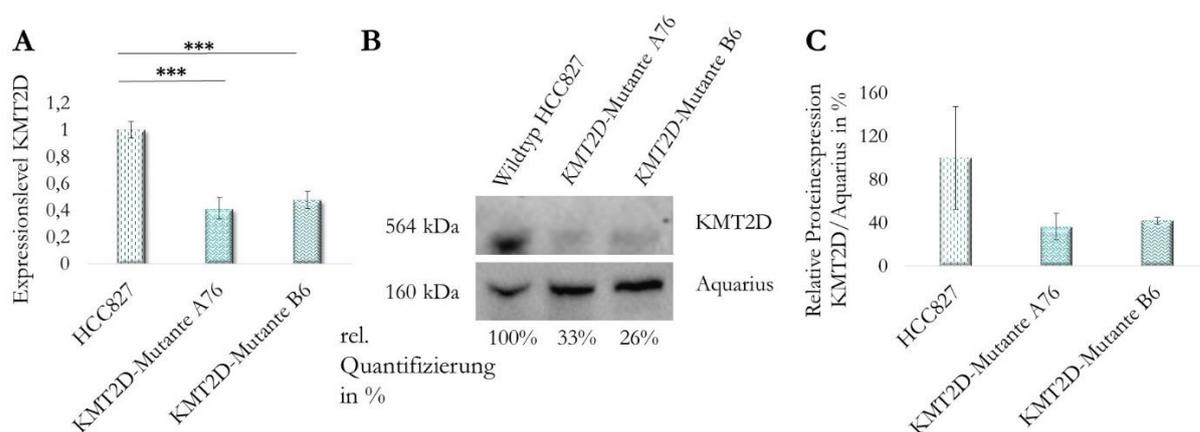


Abb. 3.21: Untersuchung der *KMT2D*-Expression in den *KMT2D*-Mutanten A76 und B6 in Relation zur HCC827-Parental-Zelllinie. A: RNA-Expression. In beiden *KMT2D*-Mutanten kann im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant verringerte Expression in *KMT2D* festgestellt werden (t-Test aus drei unabhängigen Experimenten im Triplikate; zweiseitig gepaart; $p < 0,001$). In der Grafik werden die Mittelwerte dargestellt. B: Proteinexpression. In beiden Mutanten ist eine reduzierte *KMT2D*-Expression festzustellen. Die Mutante A76 weist eine auf 33 % verminderte Expression im Vergleich zum Expressionslevel des *KMT2D*-Wildtyps auf. Bei der Mutante B6 ist das Expressionsniveau bis auf 26 % verringert. Repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Experimenten. C: Relative Quantifizierung der Proteinexpression in %. Die Mutante A76 zeigt eine auf 37 % reduzierte *KMT2D*-Expression, während das Expressionsniveau bei der Mutante B6 auf 42 % verringert ist (t-Test aus zwei unabhängigen Versuchen, zweiseitig gepaart, n.s.).

3.2.2 Expressionsanalyse in *BRD4*-Mutanten

Zur Ermittlung ob eine monoallelische Deletion von *BRD4* in den Mutanten E87 und E114, die die gleiche Deletion in *BRD4* aufweisen, zu Expressionsunterschieden im Vergleich zur Parental-Zelllinie Wi38 führt, wurde zunächst die RNA-Expression ermittelt. Diese ist in den *BRD4*-Mutanten signifikant verringert (Abbildung 3.22 A; t-Test aus drei unabhängigen Experimenten im

3 Ergebnisse

Triplikate, zweiseitig gepaart; $p < 0,001$). Dieses Ergebnis spiegelt sich in der Analyse der Proteinexpression wider, bei der eine Repression des Proteinlevels in den *BRD4*-Mutanten beobachtet wurde (Abbildung 3.22 B). In der relativen Quantifizierung der Proteinexpression kann für die *BRD4*-Mutante E87 ein auf 47 % herunterreguliertes Expressionsniveau bestimmt werden, während die *BRD4*-Mutante E114 eine auf 34 % dezimierte Expression aufweist (Abbildung 3.22 C; t-Test aus zwei unabhängigen Experimenten, zweiseitig gepaart, n.s.).

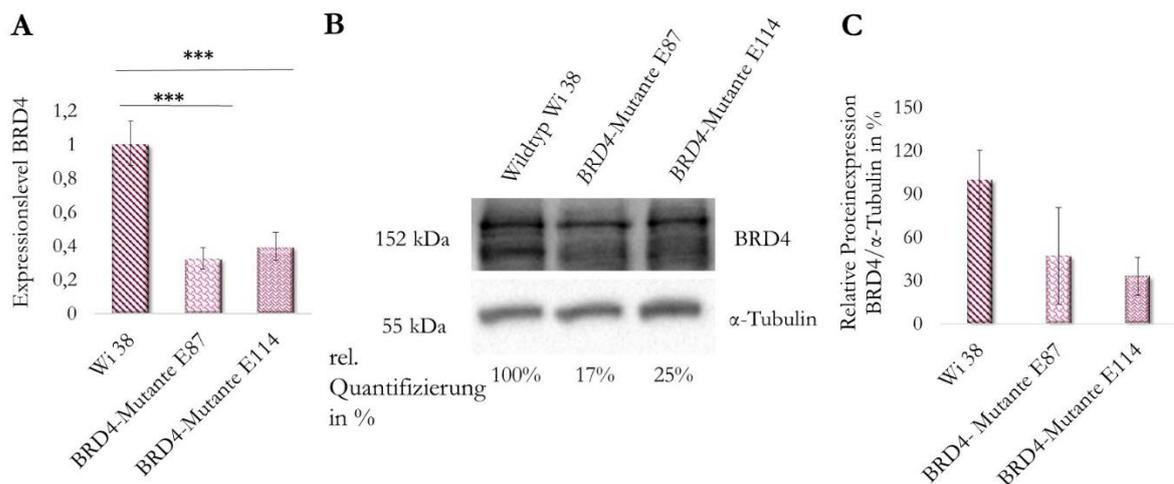


Abb. 3.22: Expressionsanalyse der *BRD4*-Mutanten E87 und E114. A: q-PCR-Analyse. Im Vergleich zur Parental-Zelllinie Wi38 kann bei den *BRD4*-Mutanten eine signifikant verminderte Expression ermittelt werden (t-Test aus drei unabhängigen Experimenten im Triplikate; zweiseitig gepaart, $p < 0,001$). In der Grafik werden Mittelwerte dargestellt. B: Western Blot Analyse. Für die *BRD4*-Mutanten kann eine reduzierte Proteinexpression gegenüber der Parental-Zelllinie ermittelt werden. Repräsentatives Ergebnis von insgesamt zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. C: Analyse der relativen Quantifizierung in %. Die relative Proteinexpression ist bei der Mutante E87 um 47 % gegenüber der Expression der Parental-Zelllinie vermindert. Bei der *BRD4*-Mutante E114 ist die Expression bis auf 34 % reduziert (t-Test aus zwei unabhängigen Versuchen, zweiseitig gepaart, n.s.).

3.3 Zellwachstum und Morphologie

3.3.1 Ermittlung von Unterschieden in der Morphologie bei Zelllinien mit monoallelischer

Deletion

Um die Ausprägung der induzierten Deletionen und deren Einfluss in unterschiedlichen zellphysiologischen Prozessen näher definieren zu können, wurde die Morphologie der CRISPR CAS9-Mutanten untersucht. In der Abbildung 3.23 werden morphologische Unterschiede der *KMT2D*-Mutanten mit der Parental-Zelllinie HCC827 dargestellt. Während die Induktion einer verkürzten Form in der *KMT2D*-Mutante A76 zu einer sehr starken morphologischen Veränderung führt, sind bei der *KMT2D*-Mutante B6 keine offensichtlichen Unterschiede feststellbar. Die

typische Formierung des Zellverbandes ist bei der Mutante A76 fast nahezu völlig aufgehoben (Abbildung 3.23 oberste Reihe). Anstatt eines planen, kompakten Zellverbandes, erfolgt das Wachstum der Zellen diffus in unterschiedlichen Ebenen, so dass die Zellen spindelförmig langezogen und zugespitzt in ihrer Zellform in lockeren Zellaggregaten mit einander vernetzt sind (Abbildung 3.23 20fache Vergrößerung von A76 im Vergleich zu HCC827). Die ursprüngliche abgerundete Zellform der Parental-Zelllinie ist bei der Mutante A76 nicht mehr erkennbar. Bei der *KMT2D*-Mutante B6, bei der durch die Deletion nur noch ein Allel funktionsfähig ist, sind die morphologischen Unterschiede nicht stark ausgeprägt. Zwar ist der Zellverband beim Vergleich der 5- und 10fachen Vergrößerung derart kompakt strukturiert wie bei der Parental-Zelllinie und die Zellform nach wie vor abgerundet, dennoch wurde im Vergleich der 20fachen Vergrößerungen in der Mutante B6 eine erhöhte Anzahl vergrößerter Zellen im Zellverband beobachtet.

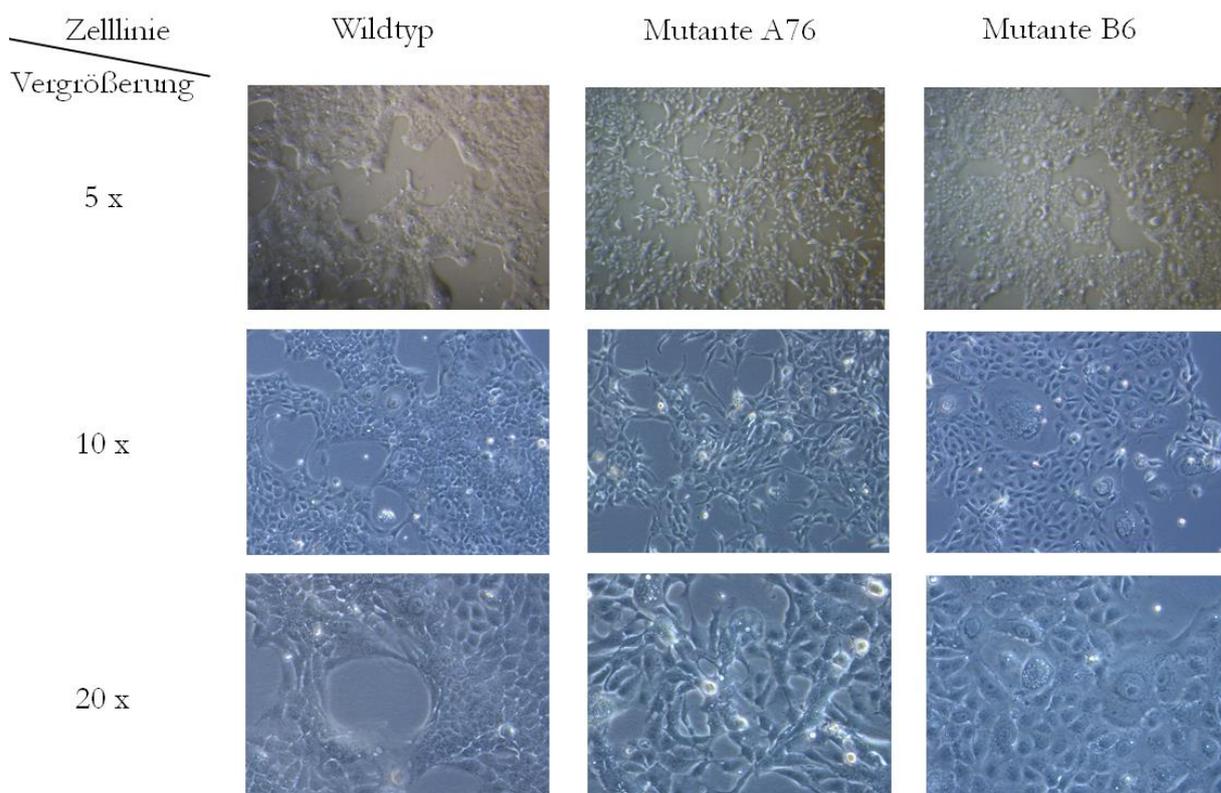


Abb. 3.23: Vergleich der Morphologie zwischen der Parental-Zelllinie HCC827 und den *KMT2D*-Mutanten A76 und B6. Während die Mutante B6 eine erhöhte Anreicherung von vergrößerten Zellen aufweist (20fache Vergrößerung) und sich morphologisch wenig von den parentalen Zellen unterscheidet (5fache Vergrößerung), zeigt die Mutante A76 eine grundlegende Veränderung in der Morphologie als auch in der Organisation des Zellverbandes. Die Aufnahmen wurden mit dem Lichtmikroskop 72 h nach der Aussaat der Zellen bei einer 5-, 10- und 20- fachen Vergrößerung aufgenommen.

3 Ergebnisse

Im Gegensatz dazu weisen die *BRD4*-Mutanten beim Vergleich der Zellmorphologie keinen Unterschied zur Parental-Zelllinie Wi38 auf (Abbildung 3.24). Weder in der Zellform noch in der Struktur des Zellverbandes können Veränderungen nach der Induktion der *BRD4*-Mutation festgestellt werden.

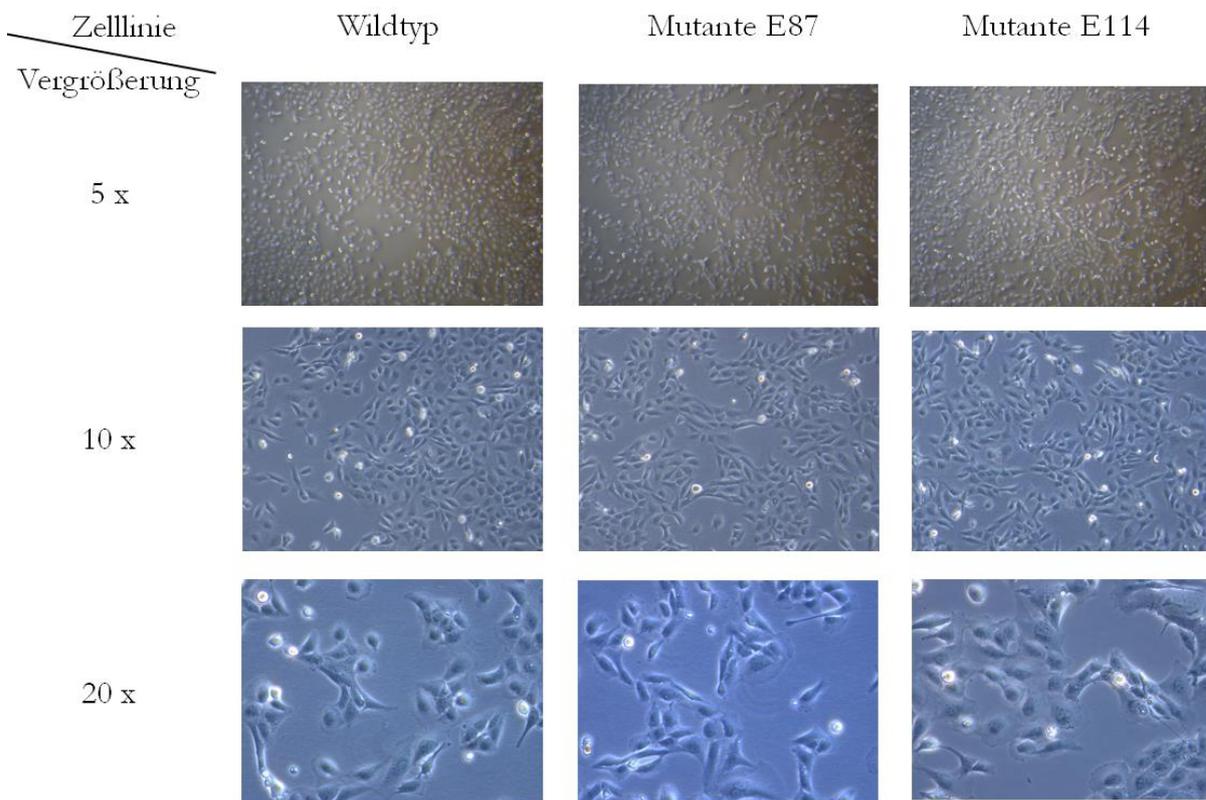


Abb. 3.24: Untersuchung der Morphologie der *BRD4*-Mutanten im Vergleich zur Parental-Zelllinie Wi38 72 h nach der Aussaat der Zellen. Weder in der Form der Zellen noch in der Strukturierung des Zellverbandes können Unterschiede in der Morphologie der *BRD4*-Mutanten gegenüber der Parental-Zelllinie Wi38 festgestellt werden.

3.3.2 Untersuchung der Zellproliferation bei *KMT2D*-Mutationen

In weiterfolgenden Experimenten erfolgte die Untersuchung von Unterschieden im Zellwachstum in den *KMT2D*-mutierten Zelllinien. Der Versuchsaufbau gestaltete sich in der Form, dass nach der Aussaat die Zellzahl durch eine Neubauer Zählkammer und zeitlich parallel mit einem automatisierten Zählgerät (Casy von Roche) ermittelt wurde. Die Messung erstreckte sich über einen Zeitraum von insgesamt 72 h, wobei nach jeweils 24 h die Zellzahl in Duplikaten bestimmt wurde. Die Experimente wurden insgesamt im Quadruplikat durchgeführt. In der Abbildung 3.25 werden die Unterschiede in der Zellproliferation nach der Ermittlung der Zellzahl mit einem automatisierten Zellcounter und einer Neubauer Zählkammer zwischen den *KMT2D*-Mutanten und der Parental-Zelllinie HCC827 dargestellt. Beide *KMT2D*-Mutanten weisen in einer

Zeitspanne von 72 h unabhängig von der angewandten Messmethode im Vergleich zur Parental-Zelllinie HCC827 ein signifikant dezimierteres Wachstum auf (2-weg ANOVA; $p < 0,001$).

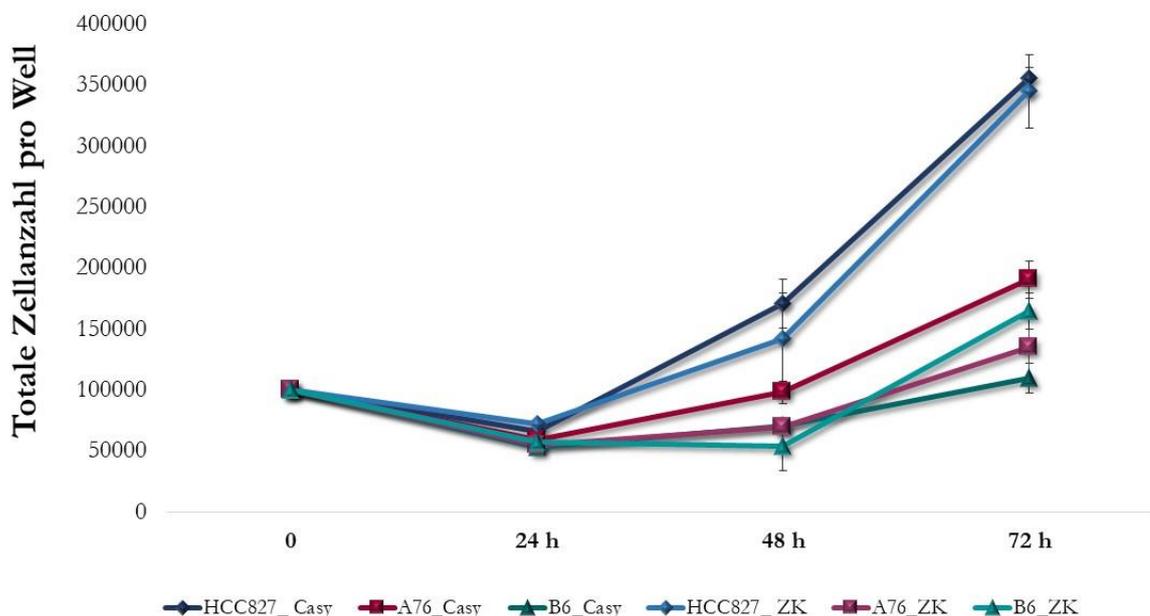


Abb. 3.25: Untersuchung der Zellproliferation in den *KMT2D*-Mutanten. Der Vergleich des Zellwachstums erfolgt über einen Zeitraum von insgesamt 72 h. Nach jeweils 24 h wurde die Zellzahl mit dem Casy-Zellcounter (Casy) oder der Neubauerzählkammer (ZK) ermittelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt vier durchgeführten Experimenten. Die *KMT2D*-Mutanten wachsen gegenüber der Ursprungszelllinie HCC827 signifikant langsamer (2-weg ANOVA; $p < 0,001$). Legende: blaue Rauten: Parental-Zelllinie HCC827, rote Quadrate: *KMT2D*-Mutante A76, blaugrüne Rechtecke: *KMT2D*-Mutante B6.

Betrachtet man das Zellwachstum der Versuchsgruppen nach 24 h, 48 h und 72 h prozentual, werden bereits nach 24 h Proliferationsunterschiede der Mutanten-Zelllinien gegenüber der Parental-Zelllinie deutlich (Abbildung 3.26; t-Test aus vier unabhängigen Experimenten; zweiseitig gepaart, $p < 0,05$). Die Unterschiede im Wachstumsverhalten führen nach 72 h zu einer um die Hälfte verminderten Proliferation der *KMT2D*-Mutanten (t-Test aus vier unabhängigen Experimenten; zweiseitig gepaart, 72 h: A76: $p < 0,001$; B6: $p < 0,01$). In der Abbildung 3.26 werden die Proliferationsunterschiede der Versuchsreihe mit der automatisierten Zählmethode dargestellt. Unter Anhang F werden die Daten der Neubauer Zählkammer aufgeführt.

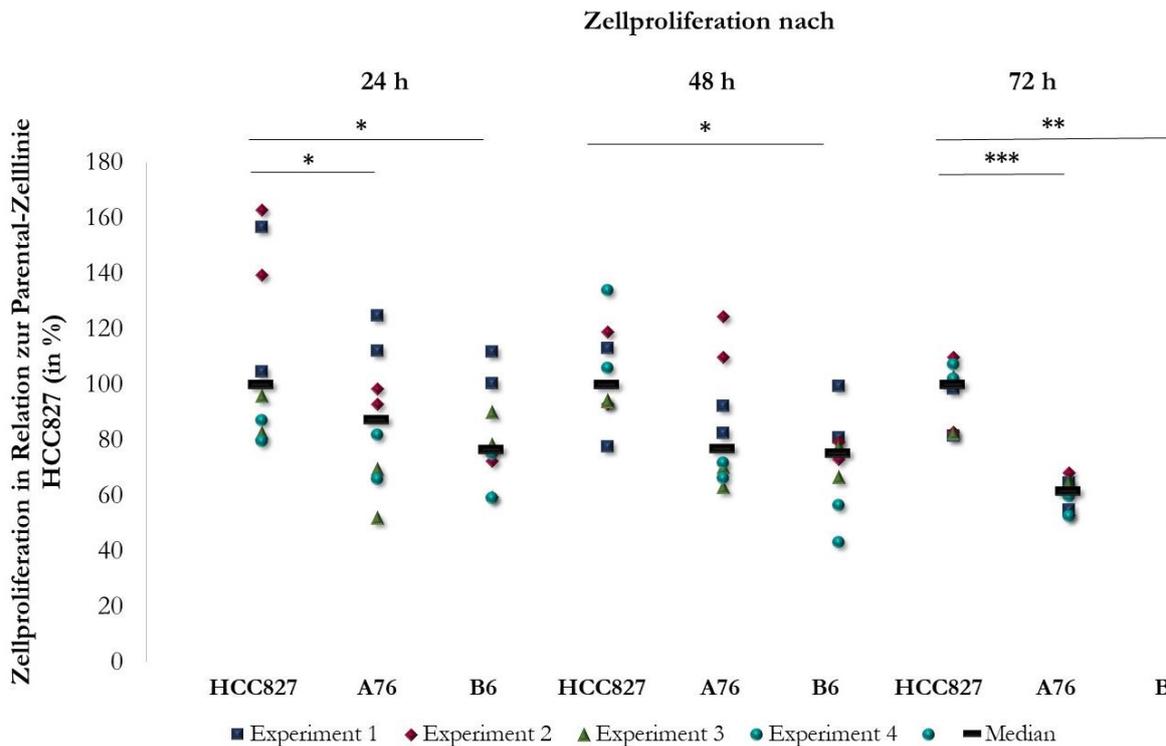


Abb. 3.26: Vergleich der Zellproliferation in %. Die Proliferation der Zellen wurde nach einem Zeitraum von 24 h, 48 h und 72 h mit einem Zellcounter ermittelt und zwischen den untersuchten Zelllinien verglichen. In der Grafik wird die Zellproliferation in Relation zur Parental-Zelllinie HCC827 nach 24 h, 48 h und 72 h in % dargestellt. Es wurden insgesamt vier unabhängige Experimente durchgeführt. Nach einer Dauer von 72 h ist die Proliferation der *KMT2D*-Mutanten bei A76 auf 62 % und bei B6 um 50 % signifikant vermindert (t-Test aus vier unabhängig durchgeführten Experimenten, zweiseitig gepaart, A76: $p < 0,001$, B6: $p < 0,01$).

3.4 Signalweg-Analysen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden H3K4me3-ChIP-Seq-Analysen von den Parental-Zelllinien HCC827 und Wi38 als auch mit der Adenokarzinom-Zelllinie A549 durchgeführt, um in nachfolgenden *in silico*-Analysen überrepräsentierte Signalwege zu identifizieren. In weiterführenden Experimenten sollten diese Signalwege in den CRISPR CAS9-Mutanten eingehender betrachtet werden. Insgesamt wurden die Datensätze von zwei unterschiedlichen ChIP-Seqs untersucht, wobei in einer ChIP-Seq-Analyse die differenzielle Methylierung von H3K4me3 zwischen den Adenokarzinom-Zelllinien HCC827 und A549 betrachtet wurde. In der zweiten ChIP-Seq erfolgten Untersuchungen in Bezug auf Veränderungen der H3K4me3-Methylierung von Wi38-Zellen gegenüber einem Wasserstoffperoxid-gestressten Zustand nach einer Regenerationszeit von 24 h. Unterschiedliche Signalweg-Analyse-Programme bieten die Möglichkeit bei großen Datensätzen wie die eben erwähnten ChIP- oder beispielsweise RNA-Seqs einen umfassenden Überblick über Verbindungen als auch der Anreicherung bestimmter Signalwege zu erlangen. In den Analysen wurden Gene mit unterschiedlichen H3K4me3-Level

identifiziert und in den Signalweg-Analysen eingesetzt. Mit Hilfe der ConsensusPathDB Online-Software wurden Nachbarschafts-basierte Analysen, GO-Analysen als auch Signalweg-Datenbanken basierte Analysen für die jeweilige ChIP-Seq durchgeführt. Durch die Verknüpfung der aus den ChIP-Seq-Analysen generierten differenziellen Genlisten ist es auf diese Weise möglich Signalwege zu identifizieren, die beispielsweise im Bereich der molekularen Funktion, zellulären Komponenten oder in biologischen Prozessen signifikant angereicht sind. Aus dem generierten Datenset der Wi38-ChIP-Seq konnten insgesamt 14696 Gene (61,4 %) in ConsensusPathDB eindeutig zugeordnet werden. Im Vergleich zur HCC827 vs. A549 ChIP-Seq wurden von insgesamt 59,7 % der Gene aus der Eingabeliste (22278 Gene) zugeordnet. Bei der Analyse von Signalweg-basierten Datensets erfolgte ein Abgleich auf Basis von Signalwegen aus insgesamt 13 Datenbanken bei einem Grenzwert des p-Wertes von 0,001 und unter der Betrachtung einer Überschneidung von mindestens 5 Genen aus der Eingabeliste, wodurch 277 angereicherte Signalwege in der Wi38-ChIP-Seq identifiziert wurden. Bei der Analyse betrug das Minimum der identifizierten Gene 7255 (49,4 %) in einem Signalweg, wobei das Maximum in einem Signalweg bei 112872 Genen lag. Bei jedem Datenset erfolgt die Berechnung des p-Wertes anhand eines hypergeometrischen Tests, der auf den Abgleich der Anzahl der gleichen physikalischen Objekte in den Datensets basiert (Eingangsliste im Vergleich der Gene aus den 13 Datenbanken). Es konnte eine Anreicherung in Signalwegen identifiziert werden, die beim Prozess des mRNA-Spleißens, der zellulären Stressreaktion und dem EGFR-Signalweg eine Rolle spielen (siehe Tabelle 3.2.; Visualisierung der Signalwege unter Anhang G).

Tabelle 3.2. Anreicherung der Signalwege der Wi38 vs. Wi38 H₂O₂-gestressten ChIP-Seq in ConsensusPathDB.

Signalweg	p-Wert	Quelle des Signalwegs
RNA-Metabolismus	2,330E-29	Reactome
Translation	1,890E-17	Reactome
Verarbeitung von verkappter Intron-enthaltender Prä-mRNA	2,010E-15	Reactome
mRNA-Spleißen	3,030E-15	Reactome
mRNA-Spleißen - Hauptsignalweg	4,780E-15	Reactome
EGFR1-Signalweg	1,160E-14	NetPath
mRNA-Prozessierung	7,820E-13	Wikipathways
Zelluläre Reaktionen auf äußere Reize	9,910E-09	Reactome
Regulation der Transkription durch TP53	1,710E-08	Reactome
mRNA-Überwachungssignalweg	3,110E-08	KEGG
EGF-EGFR-Signalweg	5,850E-08	Wikipathways
Spliceosom	7,120E-08	KEGG
Posttranslationale Proteinmodifikation	7,470E-08	Reactome
Zelluläre Antwort auf Hitzestress	7,660E-07	Reactome
Zelluläre Reaktionen auf Stress	9,270E-07	Reactome

3 Ergebnisse

Auf Grundlage dieser Ergebnisse wurden für die Wi38 vs. Wi38 H₂O₂-gestressten ChIP-Seq weitere Untersuchungen in GREAT durchgeführt. Von der Wi38 vs. Wi38 H₂O₂-gestressten ChIP-Seq können von 18041 Genen aus der Eingabeliste insgesamt 77 % (13924 Gene) in MSigDB eindeutig zugeordnet werden, von denen 45 % (8117 Gene) mit einem GO-Term assoziiert wurden (FDR, p-Wert<0,01). Das Ergebnis aus der ConsensusPathDB-Analyse mit einer signifikanten Anreicherung von am Spleißprozess (p-Wert= 1,7730E-27) involvierten Signalwegen, kann ebenfalls in den identifizierten Signalwegen der MSigDB-Analyse festgestellt werden (Abbildung 3.27).

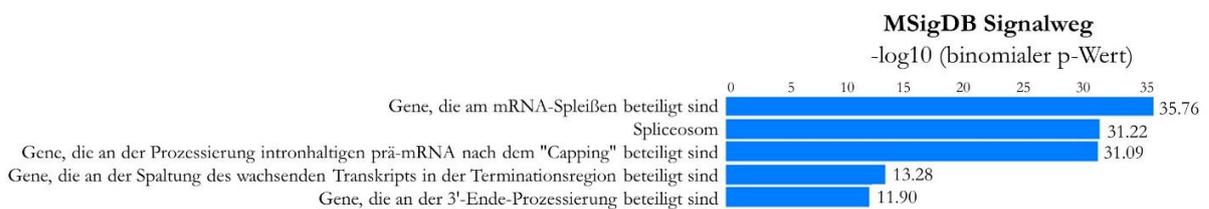


Abb.3.27: MSigDB Signalweg-Analyse. Die Analyse resultiert in einer signifikanten Anreicherung unterschiedlicher Spleiß-Signalwege.

Wie zuvor bei der Wi38-ChIP-Seq konnte mit CosenusPathDB bei der Analyse der überrepräsentierten Signalwege in der HCC827 vs. A549 ChIP-Seq insbesondere eine Anreicherung in den Signalwegen der Genexpression, des Spleißens, der zellulären Stressantwort und dem EGFR-Signalweg festgestellt werden (Abbildung 3.28, Übersicht der Signalwege in der Tabelle unter Anhang H). Des Weiteren wurden Anreicherungen in Signalwegen ermittelt, die in Prozessen der epigenetischen Modifikationen involviert sind. Als Parameter wurden, wie zuvor bei der Wi38 ChIP-Seq, eine Überlappung von mindestens 5 Genen aus der Eingabeliste und ein Grenzwert des p-Wertes bei 0,001 gewählt. Von 22277 eindeutig zugeordneten Genen erfolgte eine Anreicherung in 360 Signalweg-basierten Datensets. 46,6 % der Gene aus der Eingabeliste konnten in mindestens einem Signalweg determiniert werden. Die absolute Anzahl der identifizierten Gene betrug hierbei in mindestens einem Signalweg 12872.

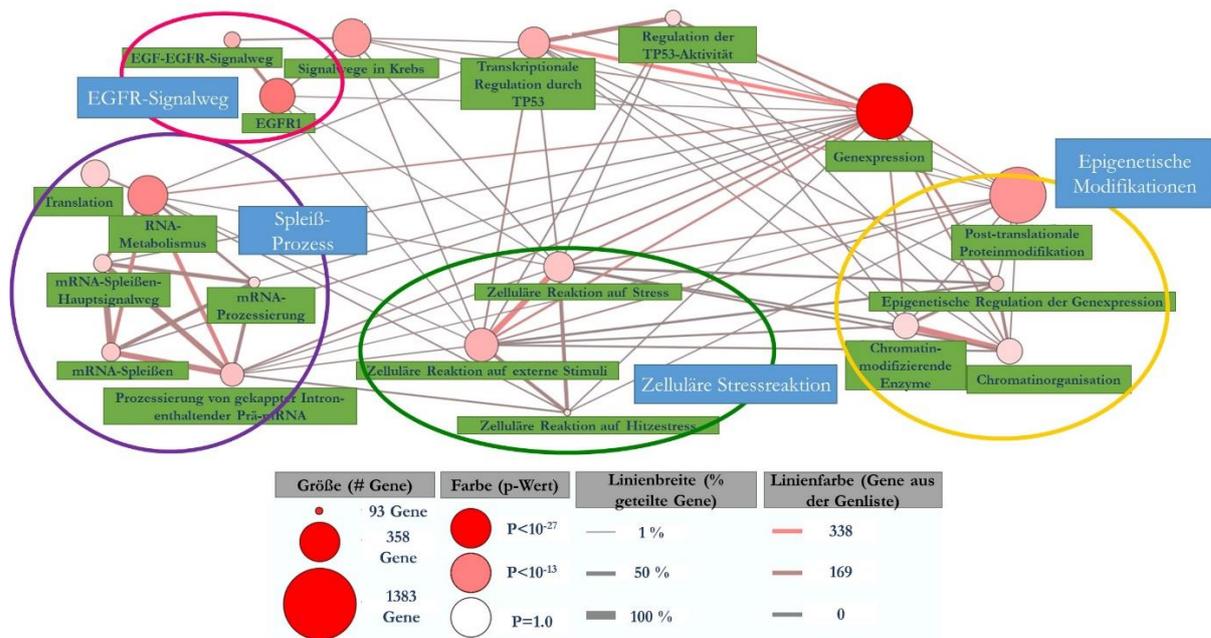


Abb.3.28: Analyse der angereicherten Signalwege. Betrachtet wird in der Analyse die generierte Genliste der ChIP-Seq-Analyse der differentiellen H3K4me3-Methylierung der Adenokarzinom-Zelllinien HCC827 im Vergleich zu der Zelllinie A549. Bei insgesamt 360 identifizierten Signalwegen sind insbesondere Signalwege zur epigenetischen Modifikationen (gelb markiert), Stressantwort (grün markiert) und dem Spleißen (violett markiert) involviert. Des Weiteren ist der EGFR-Signalweg (pink markiert) angereichtert. Legende: Die Größe der Knotenpunkte spiegelt die Anzahl der involvierten Gene wider, wobei der Farbcode die Signifikanz des p-Wertes darstellt. Die Linienstärke zwischen den verknüpften Knotenpunkten zeigt den prozentualen Anteil der Gene, die in den detektieren Signalwegen kongruent sind. Die Farbintensität der Linien verweist auf die Anzahl der Gene aus der Eingangsliste, die in den jeweiligen Signalwegen vertreten sind.

Die Analyse zur Determinierung von angereicherten Signalwegen, die einer spezifischen GO-Annotation zugeordnet werden können ist im Anhang H aufgeführt. Es konnten zusätzliche Signalwege mit einer sehr starken Anreicherung identifiziert werden, die bei epigenetischen Prozessen wie z.B. dem Proteinmodifikationsprozess (p-Wert: 3,230E-47), der Transferase-Aktivität (p-Wert: 8,790E-43) oder der Histonmodifikation (p-Wert: 3,530E-08) beteiligt sind (Tabelle 3.3.). Insgesamt konnten 1717 Anreicherungen in GO-basierten Gensets identifiziert werden (p-Wert <0,01).

3 Ergebnisse

Tabelle 3.3. Übersicht der Anreicherung in Signalwegen nach der GO-Analyse in ConsensusPathDB.

GO-Begriff	Kategorie und Level	p-Wert
GO: 0010467 Genexpression	BP 4	1,820E-66
GO: 0016070 RNA-Stoffwechselprozess	BP 5	2,250E-62
GO: 0010468 Regulation der Genexpression	BP 5	3,600E-51
GO: 0051252 Regulierung des RNA-Stoffwechselprozesses	BP 5	1,300E-49
GO: 0036211 Proteinmodifikationsprozess	BP 4	3,230E-47
GO: 0016740 Transferase-Aktivität	MF 2	8,790E-43
GO: 0019538 Proteinstoffwechselprozess	BP 3	1,880E-40
GO: 0033554 Zellreaktion auf Stress	BP 3	8,050E-39
GO: 0048585 negative Regulierung der Reizantwort	BP 4	4,600E-20
GO: 1990234 Transferasekomplex	CC 3	2,500E-19
GO: 0048583 Regulierung der Reaktion auf Stimulus	BP 3	1,340E-18
GO: 0051338 Regulierung der Transferase-Aktivität	BP 4	3,020E-18
GO: 0042127 Regulierung der Zellproliferation	BP 4	9,520E-17
GO: 0080135 Regulierung der zellulären Reaktion auf Stress	BP 4	1,390E-16

Legende: CC: Zelluläres Kompartiment, BP: Biologischer Prozess, MF: Molekulare Funktion.

In den sogenannten NESTs-Analysen (*Network neighborhood-based entity sets*) können Gene visualisiert werden, die über eine oder mehrere funktionelle Interaktionen mit einander vernetzt sind. Für die Untersuchung der angereicherten NESTs wird die Distanz zwischen den Genen, die in funktionalen Interaktionen übereinstimmen gleich 1 gesetzt. Somit definiert ein Radius die maximale Distanz von einer Anzahl von Genen mit der gleichen Interaktion und separiert diese von den anderen Genen des Datensets. Als Parameter für eine NEST-Analyse wurde als Minimum eine Größe von mindestens 4 Genen als Gruppe bei einem Grenzwert des p-Wertes von 0,001 definiert. Von 22277 funktionell annotierten Genen konnte eine Anreicherung in 8254 NESTs festgestellt werden. Von dem Datensatz der HCC827 vs. A549 ChIP-Seq sind 66,7 % der Gene (insgesamt 14859 Gene aus der Eingabeliste) in mindestens einem NEST vorhanden. Aus den Daten der HCC827 vs. A549 ChIP-Seq-Analyse, gehen aus den NESTs-Analysen insbesondere die Interaktionen solcher Gene hervor, die eine tragende Rolle bei der H3K4- und H3K27-Methylierung von Genen spielen als auch beim Spleiß-Prozess beteiligt sind (siehe Abbildung 3.29; Genliste unter Anhang H).

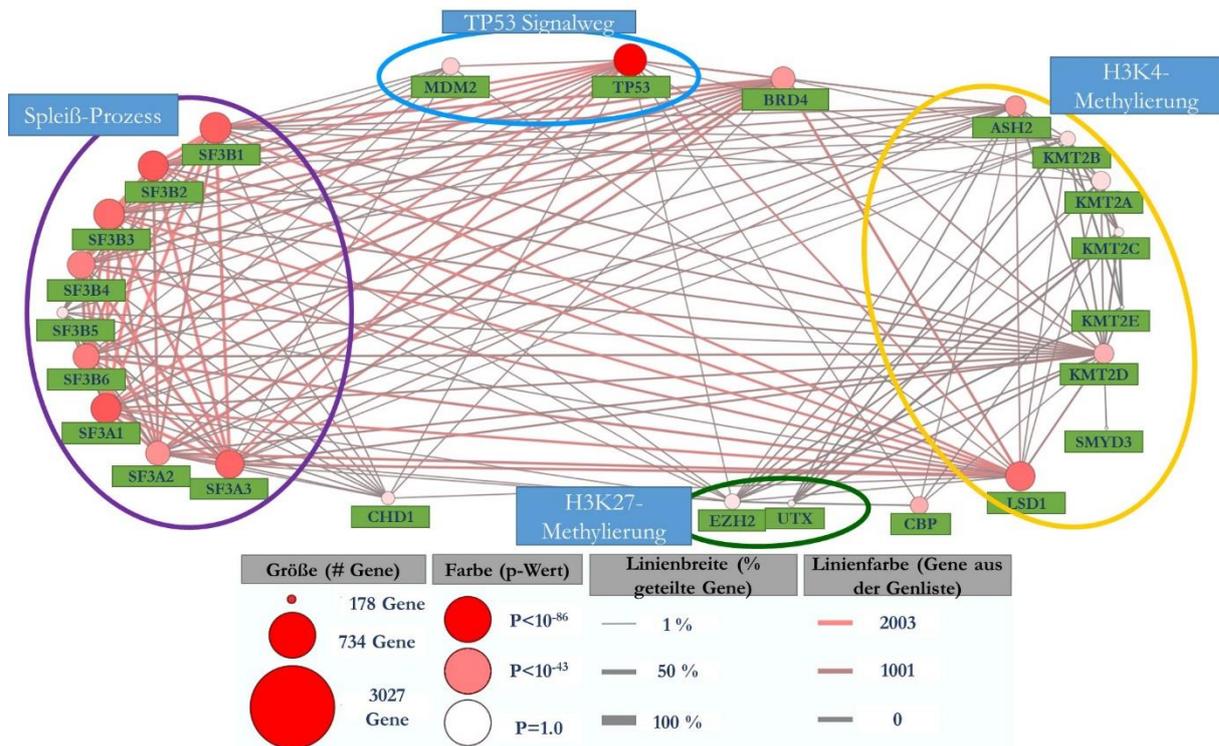


Abb.3.29: NESTs-Analyse der funktionellen Interaktion von Genen aus der ChIP-Seq der Adenokarzinom-Zelllinien. Für H3K4- (gelb markiert) und H3K27 (grün markiert) -methylierungsspezifische Gene wie z.B. *KMT2D* oder *LSD1* aber auch Genen wie *BRD4* kann eine funktionelle signifikante Interaktion mit Genen der spliceosomalen Untereinheit U2 (violett markiert) festgestellt werden. Legende: Die Größe der Knotenpunkte spiegelt die Anzahl der involvierten Gene wider, wobei die Farbintensität die Signifikanz des p-Wertes darstellt. Die Linienstärke zwischen den verknüpften Knotenpunkten zeigt den prozentualen Anteil der Gene, die in den detektierten Signalwegen kongruent sind. Die Farbintensität der Linien verweist auf die Anzahl der Gene aus der Eingangsliste, die in den jeweiligen Signalwegen vertreten sind.

In den GREAT-Analysen wurden der HCC827 vs. A549 ChIP-Seq 94 % der Gene aus der Eingangsliste (16,998 Gene) zugeordnet (FDR, p-Wert < 0,01), wobei 84 % der Gene (insgesamt 15,090) mit einer GO-molekularen Funktion assoziiert wurden. Die hoch signifikante Anreicherung der EGFR-aktivierte Rezeptoraktivität (p-Wert: 7,4481E-266; Abbildung 3.30) bestätigt das Ergebnis aus der ConsensusPathDB-Analyse, in der ebenfalls eine starke Anreicherung im EGFR-Signalweg festgestellt werden konnte.

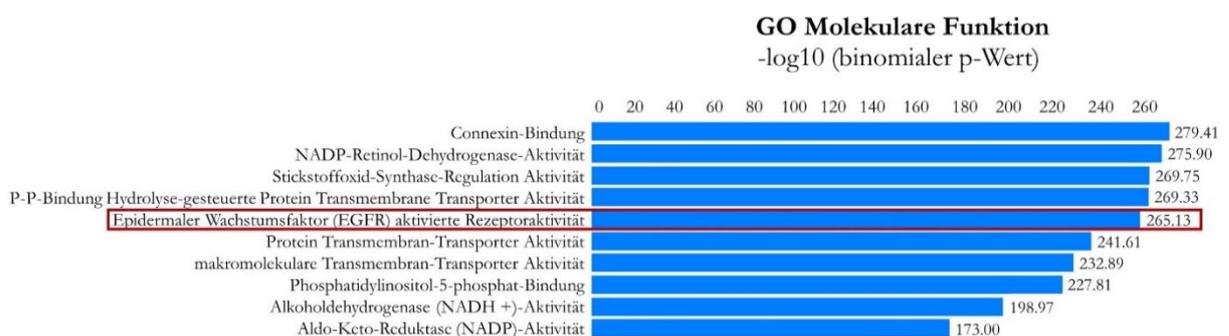


Abb.3.30: Analyse der GO-molekularen Funktion in GREAT. Bei der Analyse der HCC827 vs. A549 ChIP-Seq kann eine sehr starke signifikante Anreicherung der EGFR-aktivierten Rezeptoraktivität festgestellt werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Signalweg-Analysen der ChIP-Seqs zwischen HCC827 und A549 als auch der von Wi38 mit Wi38 Wasserstoffperoxid-gestressten Zellen hoch signifikante Anreicherungen in Signalwegen aufweisen, die in epigenetischen Prozessen wie der H3K4 –oder H3K27-Methylierung, der zellulären Stressantwort als auch dem Spleiß-Prozess eine elementare Bedeutung einnehmen. Aus diesem Grund werden in den nachfolgenden Experimenten diese Prozesse unter dem Gesichtspunkt betrachtet, ob in den CRISPR CAS9 modifizierten Zelllinien Veränderungen in der Methylierung, der Reaktion auf Stress oder beim Spleißen festgestellt werden können. Zudem wird untersucht wie sich die Anwendungen von Chemotherapeutika wie Cetuximab oder Erlotinib, die in der Krebstherapie gegen den EGFR-Rezeptor-Signalweg eingesetzt werden, auf die Zellviabilität der in HCC827 induzierten *KMT2D*-Mutationen auswirken.

3.5 Analyse der Methylierungsmodifikation von Histon H3 Lysin 4 (H3K4) und Histon H3 Lysin 27 (H3K27)

Um die molekularen Konsequenzen der induzierten CRISPR-Mutationen in *KMT2D* und *BRD4* in Bezug auf den H3K4-Methylierungsprozess eingehender betrachten zu können, wurde in Western Blot Analysen die H3K4me1- und H3K4me3-Proteinexpression der Mutanten mit den Wildtypen verglichen. Um die Proteinexpression der Probenmenge zu verifizieren, die auf das Gel geladen wurde, dienen als Ladekontrollen zum einen das Housekeeping-Protein alpha(α)-Tubulin und zum anderen H3pan, das zur Beurteilung der gesamten Histon-Menge genutzt wird. Trotz der gleichmäßigen Beladung der α -Tubulin-Ladekontrolle ist in den Western Blot Analysen ein asynchroner Effekt bei der Detektion des gesamten H3pan-Gehaltes festzustellen. Die Veränderung der differentiellen Histon-Menge der H3pan-Kontrolle spiegelt sich in einer aberranten delokalisierten H3K4-Methylierung der *KMT2D*- und *BRD4*-Mutanten wider (Abbildung 3.31 A und B). Aufgrund dieser massiven Schwankungen in der gesamten Histon-Menge kann keine Aussage bezüglich der Methylierungsunterschiede in den Mutanten-Zelllinien im Vergleich zu den Parental-Zelllinien getroffen werden.

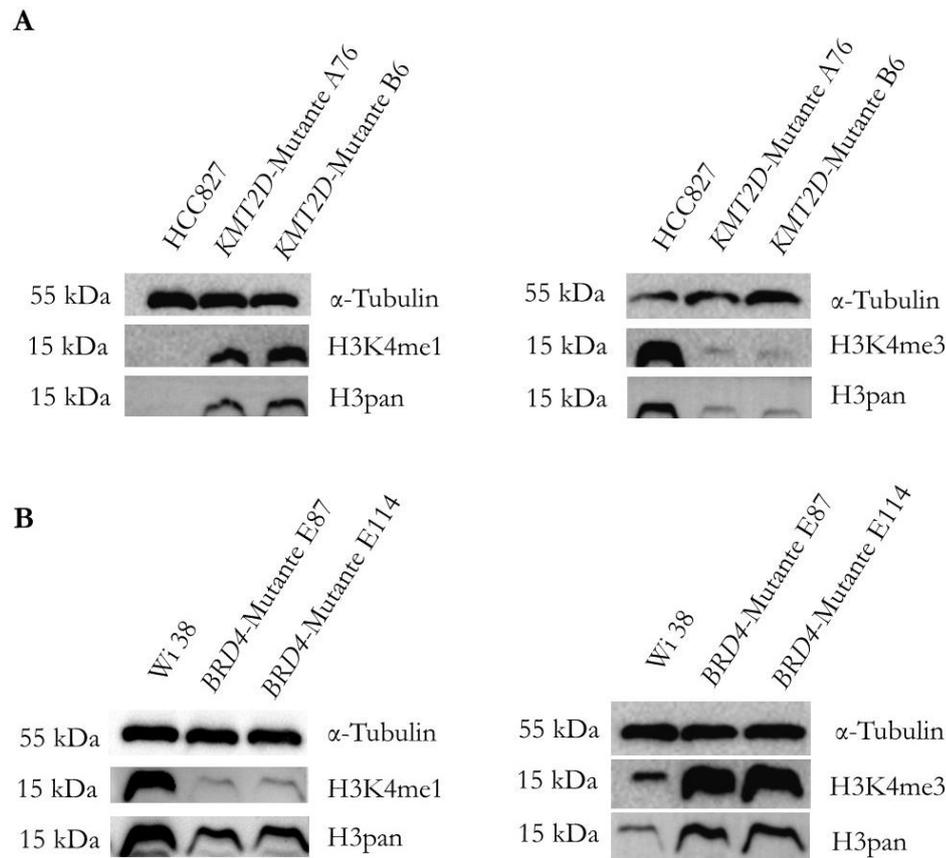


Abb.3.31: Untersuchung der H3K4-Methylierung in der Western Blot Analyse. A: Proteinexpression der *KMT2D*-Mutanten im Vergleich zur Parental-Zelllinie HCC827. B: Ausprägung der differentiellen H3K4-Methylierung in den *BRD4*- Mutanten in Bezug auf die Parental-Zelllinie Wi38. In den Western Blots wird neben dem Housekeeping-Protein α -Tubulin als Ladekontrolle zur Interpretation des gesamten Histon-Gehaltes H3pan verwendet. Die äquivalente Probenbeladung wird durch die gleiche α -Tubulin-Intensität über die Proben angezeigt. Repräsentative Ergebnisse von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Experimenten. kDa=Kilodalton.

In weiteren Experimenten wurde untersucht, inwiefern induzierte Mutationen in *KMT2D* Auswirkungen auf die Expression anderer H3K4- spezifischer Methyltransferasen als auch – Demethylasen hat. Um den Einfluss einer verminderten *KMT2D*-Expression auf andere H3K4-Methyltransferasen eingehender zu untersuchen, wurde die RNA-Expression der H3K4-Methyltransferasen *KMT2A*, *KMT2C*, *ASH2* und *SMYD3* untersucht (Abbildung 3.32 A). Es wird deutlich, dass die RNA-Expression von *KMT2C* und *SMYD3* durch die *KMT2D*-Modifikation signifikant in den Mutanten beeinträchtigt ist. Im Fall der *KMT2D*-Mutante A76 erfolgt zusätzlich eine signifikante Verminderung in der RNA-Expression von *KMT2A*. Zudem kann in den *KMT2D*-Mutanten eine verstärkte Expression der H3K4-Demethylase *LSD1* ermittelt werden (Abbildung 3.32 B).

3 Ergebnisse

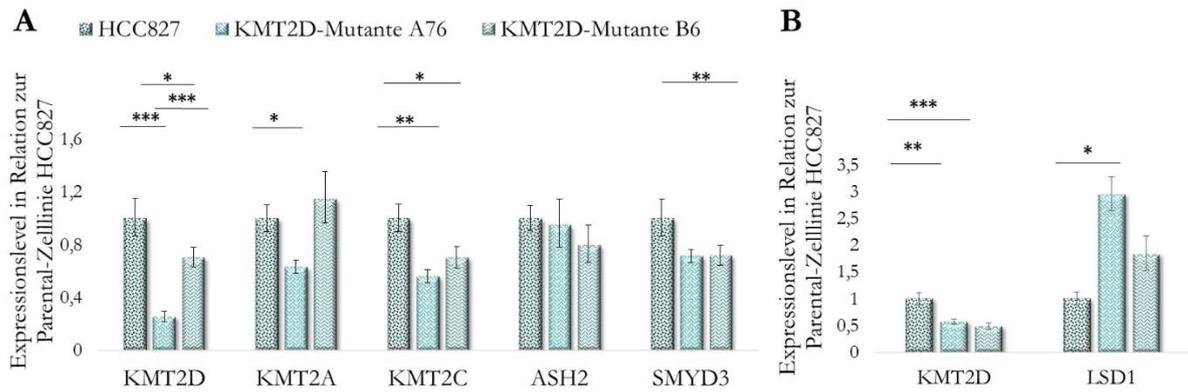


Abb.3.32: RNA-Expressionsanalyse von H3K4- relevanten Methyltransferasen und der Demethylase LSD1. T-Test aus drei unabhängigen Experimenten im Triplikate; zweiseitig gepaart. In den Grafiken werden jeweils die Mittelwerte dargestellt. A: Untersuchung der RNA-Expression der H3K4- Methyltransferasen KMT2C, KMT2A, ASH2 und SMYD3 im Vergleich zur KMT2D-Expression. B: Untersuchung der RNA-Expressionsunterschiede der H3K4- Demethylase LSD1 im Vergleich zur KMT2D-Expression.

Eine weitere Histonmodifikation, die mit repressiven Veränderungen von Genen in Verbindung steht und damit ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Expression von Genen spielt, ist die Methylierung von Lysin 27 des Histons H3 (H3K27me). In den folgenden Experimenten sollte die Auswirkung einer Mutation in *KMT2D* bzw. *BRD4* in Bezug auf H3K27-relevante Gene wie die H3K27me_{2/3} Methyltransferase *EZH2* und die H3K27me₃ Demethylase *UTX* betrachtet werden. Zunächst sollten Veränderungen einer differentiellen Proteinexpression in der H3K27-Methylierung zwischen den Mutanten und den Parental-Zelllinien in der Western Blot Analyse untersucht werden. Wie zuvor bei der Untersuchung der H3K4-Methylierung ist aufgrund der massiv ausgeprägten Schwankungen in der gesamten Histon-Menge trotz einer gleichmäßigen Beladung der α -Tubulin Ladekontrolle in den induzierten *KMT2D*- und *BRD4*- mutierten Zelllinien keine Interpretation der Daten hinsichtlich der H3K27-Methylierung im Vergleich zu den Parental-Zelllinien möglich (Western Blot Daten der H3K27me₃-Methylierung nicht gezeigt). In der anschließenden Analyse der RNA-Expression der H3K27me_{2/3}-Demethylase *UTX* und der H3K27me₃- Methyltransferase *EZH2*, konnte in den *KMT2D*-Mutanten in beiden Genen ein hoch signifikant reduzierter Effekt in der Expression festgestellt werden (Abbildung 3.33 A). Dieser synergistische Effekt kann im Fall der *BRD4*-Mutanten nicht beobachtet werden. Während bei der Methyltransferase *EZH2* eine schwach ausgeprägte Repression ermittelt werden kann, ist die RNA-Expression der H3K27me_{2/3}-Demethylase *UTX* in den *BRD4*-Mutanten erhöht. Für die in der Analyse untersuchten RNA-Expression von *KMT2D* kann eine signifikant ausgeprägte Steigerung festgestellt werden (Abbildung 3.33 A). Bei der Untersuchung der Proteinexpression konnte in den *KMT2D*-Mutanten gegenüber der Parental-Zelllinie HCC827 eine drastische Verringerung im *UTX*-Proteinniveau nachgewiesen werden (Abbildung 3.33 B). Die Analyse der Proteinniveaus in

den *BRD4*-Mutanten ergab eine gesteigerte UTX-Expression, während die Detektion von EZH2 in einer deutlichen Verringerung in der Proteinexpression resultierte.

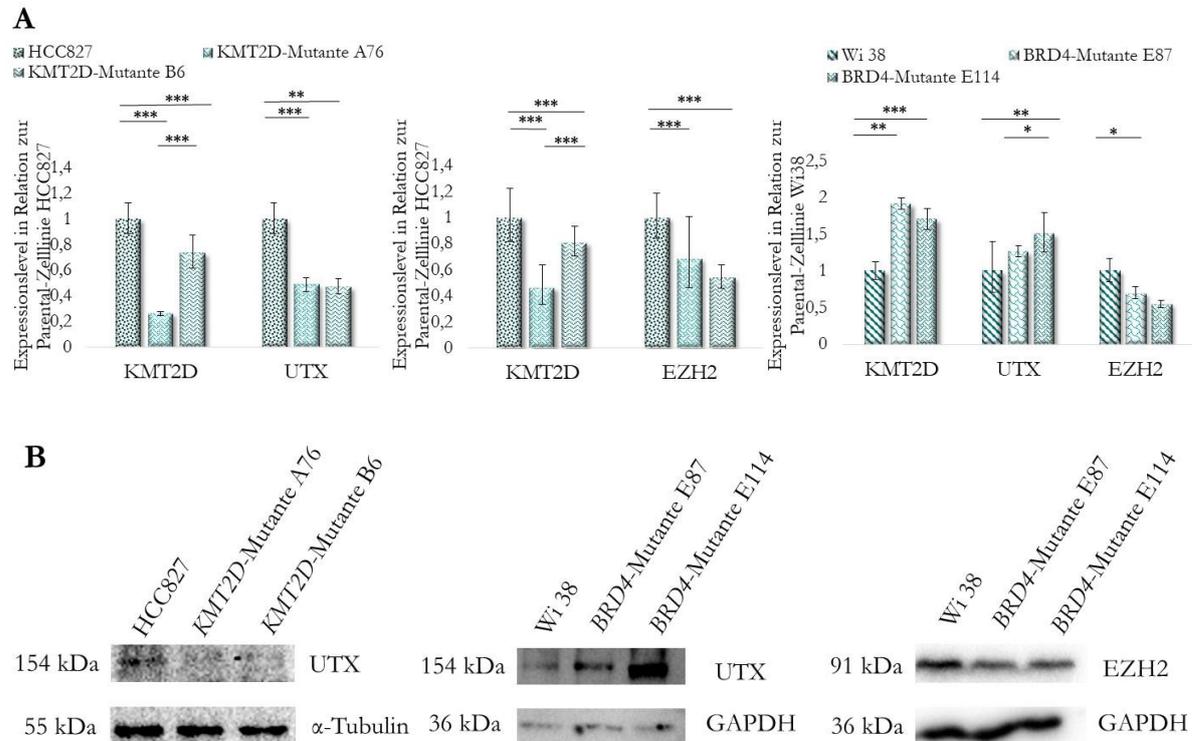


Abb.3.33: Expressionsanalyse der H3K27me2/3-Methyltransferase EZH2 und –Demethylase UTX. A: qPCR-Analyse. Durch die Repression von *KMT2D* kann in UTX als auch EZH2 eine verminderte RNA-Expression ermittelt werden. In den *BRD4*-Mutanten bewirkt die reduzierte Expression von BRD4 eine gesteigerte RNA-Expression in *KMT2D* und UTX, während bei der RNA-Expression von EZH2 eine deutliche Verminderung festgestellt werden kann. Dargestellt werden die Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im Triplikate (t-Test zweiseitig gepaart). B: Western Blot Analyse. Als Ladekontrolle wurden α -Tubulin und GAPDH als Housekeeping-Proteine in den Analysen verwendet. Repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Experimenten. kDa=Kilodalton.

3.6 Untersuchung der Stressantwort in *KMT2D*- und *BRD4*-mutierten Zelllinien

Im Rahmen dieser Versuchsreihe sollte untersucht werden, ob nach der Induktion von Stressoren Veränderungen in der Zellviabilität in *KMT2D*- und *BRD4*- modifizierten Zelllinien im Vergleich zu den Parental-Zelllinien festgestellt werden können.

3.6.1 Veränderung der H3K4me3- und H3K27me3-Methylierung durch Hitzestress

In Hinblick auf das Ergebnis der Signalanreicherungen der ChIP-Seq-Analysen von HCC827 und Wi38, bei denen Anreicherungen von Signalwegen der zellulären Stressantwort identifiziert wurden, wie z.B. die Stressantwort auf Hitze (siehe 3.3 Signalweg-Analysen), wurde in weiterführenden Experimenten die Auswirkung kurzzeitig induzierter Hitzeschocks in Bezug auf Veränderungen der Histon-Methylierung betrachtet als auch die Expression der beteiligten Methyltransferasen und die Zellviabilität untersucht. Die Auswirkung eines Hitzeschocks wurde in den *KMT2D*-Mutanten hinsichtlich einer Veränderung der Methylierungsniveaus von H3K4 und H3K27 analysiert. Durch die Induktion eines 2 h Hitzeschocks bei 42 °C und nach einer 72 h Regenerationszeit sind die zuvor ermittelten stark ausgeprägten Unterschiede in der H3K4- und H3K27- Methylierung als auch der differenziellen gesamten Histon-Menge der H3pan-Kontrolle nicht mehr zu beobachten. Die Methylierungsniveaus sind in den *KMT2D*-Mutanten und der Parental-Zelllinie angeglichen (Abbildung 3.34).

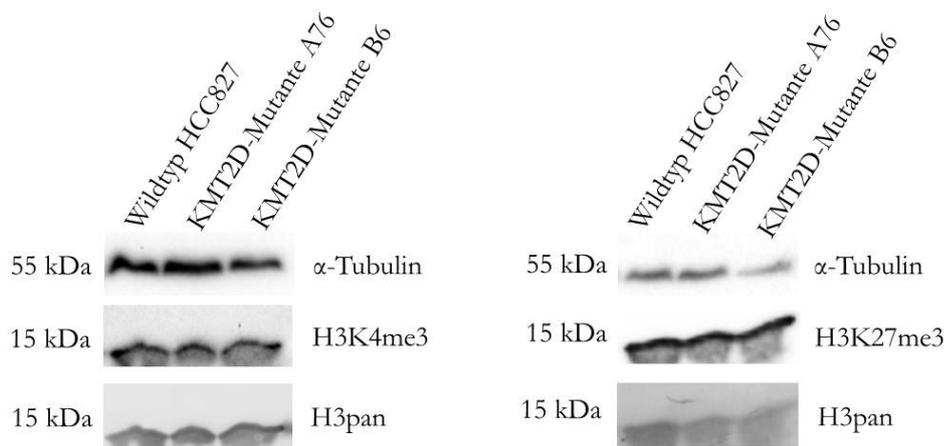
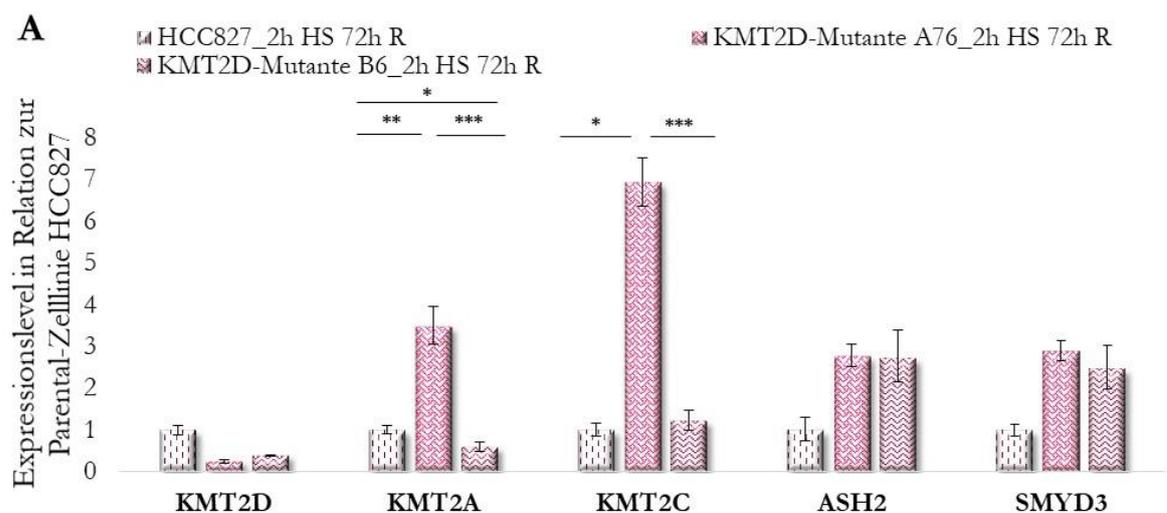


Abb.3.34: Western-Blot Analyse zur Ermittlung von Hitzestress-bedingten Veränderungen in der Methylierung von H3K4me3 und H3K27me3. Die Stressinduktion bewirkt eine Angleichung im Methylierungsniveau in den *KMT2D*-Mutanten im Vergleich zur Parental-Zelllinie HCC827. Als Ladekontrollen dienen das Housekeeping-Protein α -Tubulin und zur Interpretation der Gesamthiston-Menge H3pan. Die gleichmäßige Beladung der Proben ist an der Intensität von α -Tubulin erkennbar. Dargestellt werden repräsentative Western Blots von insgesamt zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Der Hitzeschock erfolgte 2 h bei 42 °C und einer anschließenden Regenerationszeit von 72 h. kDa=Kilodalton.

In nachfolgenden Experimenten wurde untersucht, in wie weit eine Induktion durch Hitzestress eine Expressionsveränderung bei Methyltransferasen nach sich zieht, die elementar an der H3K4- und H3K27-Methylierungen beteiligt sind. Im Falle der H3K4-Methylierung rücken dabei Methyltransferasen in den Fokus, die teilweise eine funktionelle Redundanz zu *KMT2D* aufweisen. Im Rahmen dieser Experimente sollte zudem ermittelt werden, ob bei *KMT2D* durch einen

Hitzestress ein „Rescue“-Effekt hervorgerufen und somit die verursachten Defizite der heterozygoten CRISPR CAS9 induzierten Mutationen ausgeglichen werden.

In der Abbildung 3.35 A wird die Auswirkung auf die RNA-Expression von H3K4-Methyltransferasen nach einem Hitzeschock dargestellt. Bei der *KMT2D*-Mutante A76 erfolgt nach einem Hitzeschock im Vergleich zur hitzegeschockten Parental-Zelllinie ein signifikanter Anstieg in der RNA-Expression der untersuchten H3K4-Methyltransferasen, während die *KMT2D*-Expression verglichen zum Wildtyp vermindert ist. Bei der *KMT2D*-Mutante B6 kann in den H3K4-Methyltransferasen SMYD3 und ASH2 in Relation zur hitzegeschockten Parental-Zelllinie eine erhöhte RNA-Expression festgestellt werden, wohingegen die RNA-Expression von *KMT2D* und *KMT2A* deutlich nach einem Hitzeschock reduziert wird. Die RNA-Expression der Methyltransferase *KMT2C* bleibt in dieser Mutante nach einem Hitzeschock nahezu unverändert. Vergleicht man die Expressionsänderung in der Mutante B6 nach einem Hitzeschock mit der unbehandelten Kontroll-Zelllinie bleibt das RNA-Expressionslevel deutlich unter dem Niveau der nicht gestressten Mutante (Abbildung 3.35 B). In der Parental-Zelllinie HCC827 führt ein Hitzeschock verglichen zur unbehandelten Kontrollgruppe zu einer deutlichen Verminderung der RNA-Expression der gesamten untersuchten H3K4-Methyltransferasen. Die *KMT2D*-Mutante A76 weist hingegen deutliche Unterschiede auf. Während für die Methyltransferasen *KMT2A* und *KMT2C* eine erhöhte RNA-Expression im Vergleich zur unbehandelten A76-Kontrollgruppe festgestellt werden kann, ist in den Methyltransferasen *ASH2* und *SMYD3* eine Reduktion in der RNA-Expression zu beobachten. Die *KMT2D*-Expression bleibt in Relation zur Hitze-unbehandelten A76-Kontrollgruppe unverändert auf dem gleichen Niveau.



3 Ergebnisse

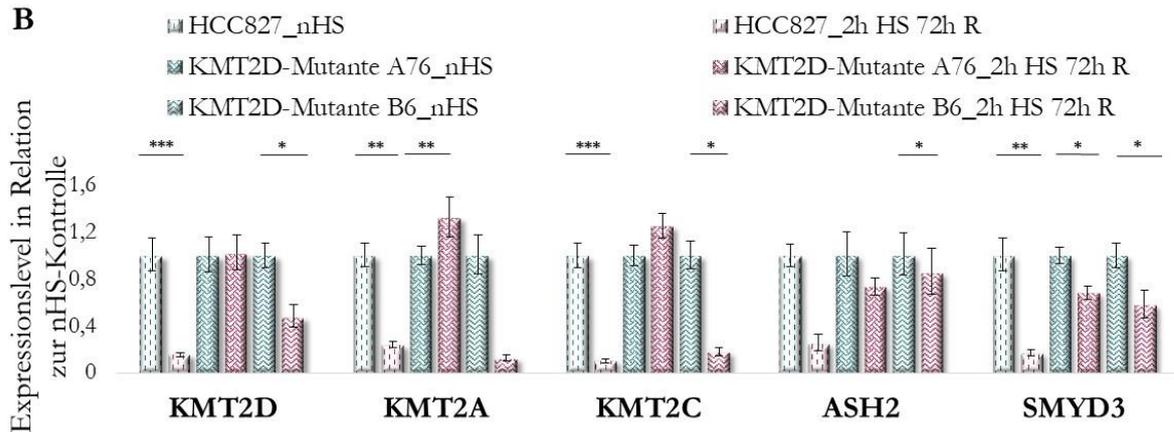
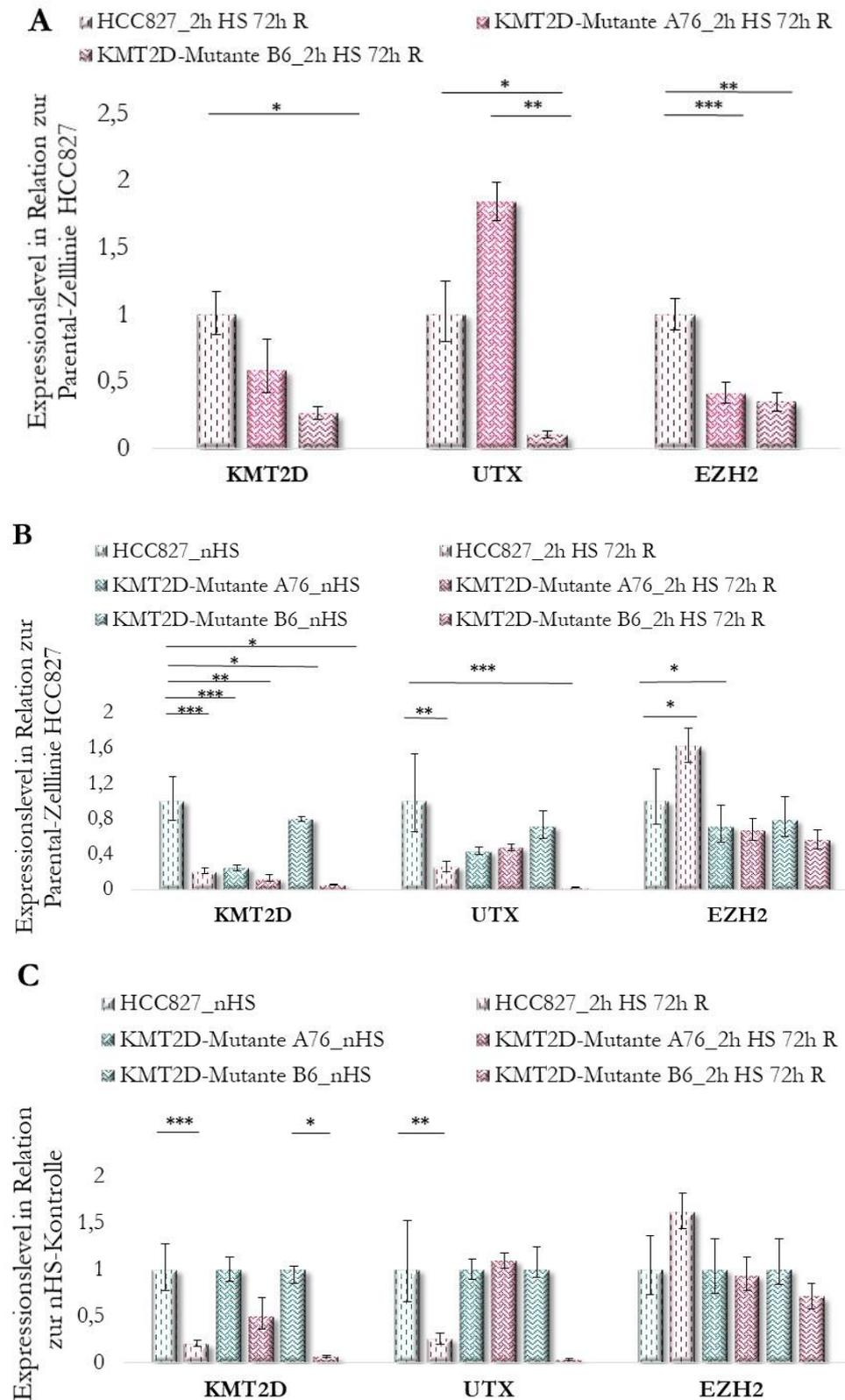


Abb.3.35: RNA-Expressionsanalyse nach einem Hitzeschock. Der Hitzeschock erfolgte für 2 h bei 42 °C mit einer anschließenden Regenerationszeit von 72 h. A: q-PCR-Analyse von H3K4- Methyltransferasen nach einem Hitzeschock. Die *KMT2D*-Mutante A76 zeigt eine massive Hochregulation in der RNA-Expression von *KMT2A* und *KMT2C*, aber auch in den Methyltransferasen *SMYD3* und *ASH2*. Im Gegensatz zur *KMT2D*-Mutante B6, die nur einen Anstieg in der Expression der H3K4me2/3- Methyltransferasen *SMYD3* und *ASH2* aufweist. B: Expressionsvergleich der H3K4- Methyltransferasen zwischen den nicht behandelten und den hitzegeschockten Zelllinien. Die Expressionslevel bleiben nach einer Hitzeinduktion in der Parental-Zelllinie und der *KMT2D*-Mutante B6 unter dem Hitze-unbehandelten Niveau der Kontrollgruppen. Bei der *KMT2D*-Mutante A76 ist ein Anstieg in der RNA-Expression der Methyltransferasen *KMT2C* und –A festzustellen. Die RNA-Expression von *KMT2D* bleibt in dieser Mutante nach einem Hitzeschock unverändert, während für die Methyltransferasen *ASH2* und *SMYD3* eine verminderte RNA-Expression ermittelt werden kann. T-Test aus zwei unabhängigen Versuchen im Triplikate; zweiseitig gepaart; $p < 0,001$. In der Grafik werden Mittelwerte dargestellt. Legende: nHS: ohne Hitzeschockbehandlung, HS: Hitzeschock, R: Regenerationszeit.

Bei der Untersuchung der Expressionsänderungen nach einem Hitzeschock bei dem H3K27-relevanten Histonmodifikatoren *EZH2* und *UTX*, kann in der *KMT2D*-Muntante A76 im Vergleich zur Hitzeschock-behandelten Parental-Zelllinie HCC827 eine starke Hochregulation der RNA-Expression in der H3K27me3 Demethylase *UTX* beobachtet werden (Abbildung 3.36 A). In beiden *KMT2D*-Mutanten ist nach einem Hitzeschock die RNA-Expression der H3K27-Methyltransferase *EZH2* im Vergleich zur hitzegestressten HCC827-Zelllinie signifikant herunterreguliert. Im Gegensatz zur anderen Mutante ist bei B6 die RNA-Expression von *UTX* verglichen zur Hitzeschock-behandelten Parental-Zelllinie signifikant vermindert. Vergleicht man die Expressionslevel der *KMT2D*-Mutanten vor und nach einem Hitzeschock in Relation zur Hitze-unbehandelten Parental-Zelllinie HCC827 wird offensichtlich, dass die RNA-Expression der H3K27-Methyltransferase *EZH2* beim Wildtyp nach einem Hitzeschock signifikant ansteigt, während diese in den *KMT2D*-Mutanten nahezu unverändert auf dem gleichen Niveau stagniert (Abbildung 3.36 B). Im Vergleich zur Hitze-unbehandelten Parental-Zelllinie kann interessanterweise unabhängig vom Behandlungszustand in beiden *KMT2D*-Mutanten eine verminderte *KMT2D*- und *UTX*-Expression festgestellt werden. In der Analyse der Expressionsänderungen innerhalb der Zelllinien kann in allen Versuchsgruppen nach einem Hitzeschock im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe eine verminderte *KMT2D*-

Expression ermittelt werden. In der Hitze-behandelten Mutante B6 wird eine reduzierte UTX- und EZH2-Expression im Vergleich zur Hitze-unbehandelten Mutante beobachtet. Bei der Mutante A76 ist nach einem Hitzestress die UTX- und EZH2- Expression gegenüber der unbehandelten A76-Kontrollgruppe unverändert (Abbildung 3.36 C).



3 Ergebnisse

Abb.3.36: RNA-Expressionsanalyse der H3K27me3- Methyltransferasen *EZH2* und –Demethylase *UTX* nach einem Hitzeschock. A: Vergleich der RNA-Expression in den *KMT2D*-Mutanten gegenüber der hitzegeschockten Parental-Zelllinie HCC827. Die Mutante A76 weist nach einem Hitzeschock eine drastisch erhöhte Expression in der H3K27me3-Demethylase *UTX* auf, während die Expression bei der Mutante B6 radikal reduziert ist. Die H3K27-Methyltransferase *EZH2* ist in den *KMT2D*-Mutanten nach einem Hitzeschock im Vergleich zur Hitze-behandelten Parental-Zelllinie signifikant in der Expression reduziert. B: Expressionsvergleich in Relation zur Hitze-unbehandelten Parental-Zelllinie HCC827. Unabhängig von einem Hitzeschock ist das Expressionsniveau der analysierten Gene in den *KMT2D*-Mutanten stets niedriger ausgeprägt als das HCC827-Niveau, wobei die Expressionsunterschiede in beiden Mutanten in *EZH2* nur schwach ausgeprägt sind. Die *EZH2*-Expression ist im Wildtyp signifikant erhöht. C: Vergleich der Expressionsunterschiede nach einem Hitzeschock innerhalb der Zelllinien. Der Hitzeschock erfolgte für 2 h bei 42 °C mit einer anschließenden Regenerationszeit von 72 h. Die statistische Analyse der Mittelwerte wurde mit einem zweiseitigen gepaarten t-Test aus insgesamt drei unabhängig Experimenten durchgeführt. Legende: nHS: ohne Hitzeschockbehandlung, HS: Hitzeschock, R: Regenerationszeit.

3.6.2 Untersuchung des Einflusses von Hitzestress auf die Zellviabilität

In den Hitzeschock-Experimenten wurde der Frage nachgegangen, ob eine CRISPR CAS9 induzierte Mutation in *KMT2D* bzw. *BRD4* zu Veränderungen in der Zellviabilität führt, die sich in einer gesteigerten Widerstandsfähigkeit oder einer erhöhten Sensitivität gegenüber der Parental-Zelllinie widerspiegelt. Da nicht nur die Höhe der Temperatur, sondern auch die Exposition der Dauer eine entscheidende Rolle für die Viabilität von Zellen spielt, erfolgte der Hitzeschock bei einer Temperatur von 42 °C für 2 h. Anschließend wurde die Zellviabilität nach unterschiedlich langen Regenerationszeiten überprüft. Die Regenerationszeiten variierten dabei in einer Spanne von 1 h bis zu 72 h nach der erfolgten Stressinduktion. Betrachtet man das Ansprechen auf einen Hitzestress innerhalb der Zelllinien HCC827 und den *KMT2D*-Mutanten A76 und B6, kann nach einer Regenerationszeit von bis zu 48 h kein signifikanter Unterschied innerhalb der Zelllinien beim Ansprechen auf einen Hitze-bedingten Stimulus festgestellt werden (Abbildung 3.37 A). Die Zellen sterben nahezu gleichmäßig ab und regenerieren sich im gleichen Maße, wobei die Mutante A76 eine leicht erhöhte Zellviabilität aufweist. Erst nach einer Regenerationszeit von 72 h sind deutliche Unterschiede zwischen der *KMT2D*-Mutante A76 im Verhältnis zur Parental-Zelllinie zu erkennen (t-Test, zweiseitig heteroskedatisch; $p < 0,001$). In Relation zur Zellviabilität der Parental-Zelllinie HCC827 zeigt die Mutante A76 in der Abbildung 3.37 B nach 72 h eine massive um 77 % erhöhte Zellviabilität und damit eine deutlich gesteigerte Regenerationsfähigkeit nach einem Hitzestress (Abbildung 3.37 C). Im Kontrast dazu stehen die Ergebnisse der *KMT2D*-Mutante B6. Die Zellviabilität zeigt nach einer Regenerationsdauer von 72 h eine um 22,4 % verminderte Viabilitätsrate gegenüber der Parental-Zelllinie (t-Test, zweiseitig heteroskedatisch; $p < 0,001$; Abbildung 3.37 B und C).

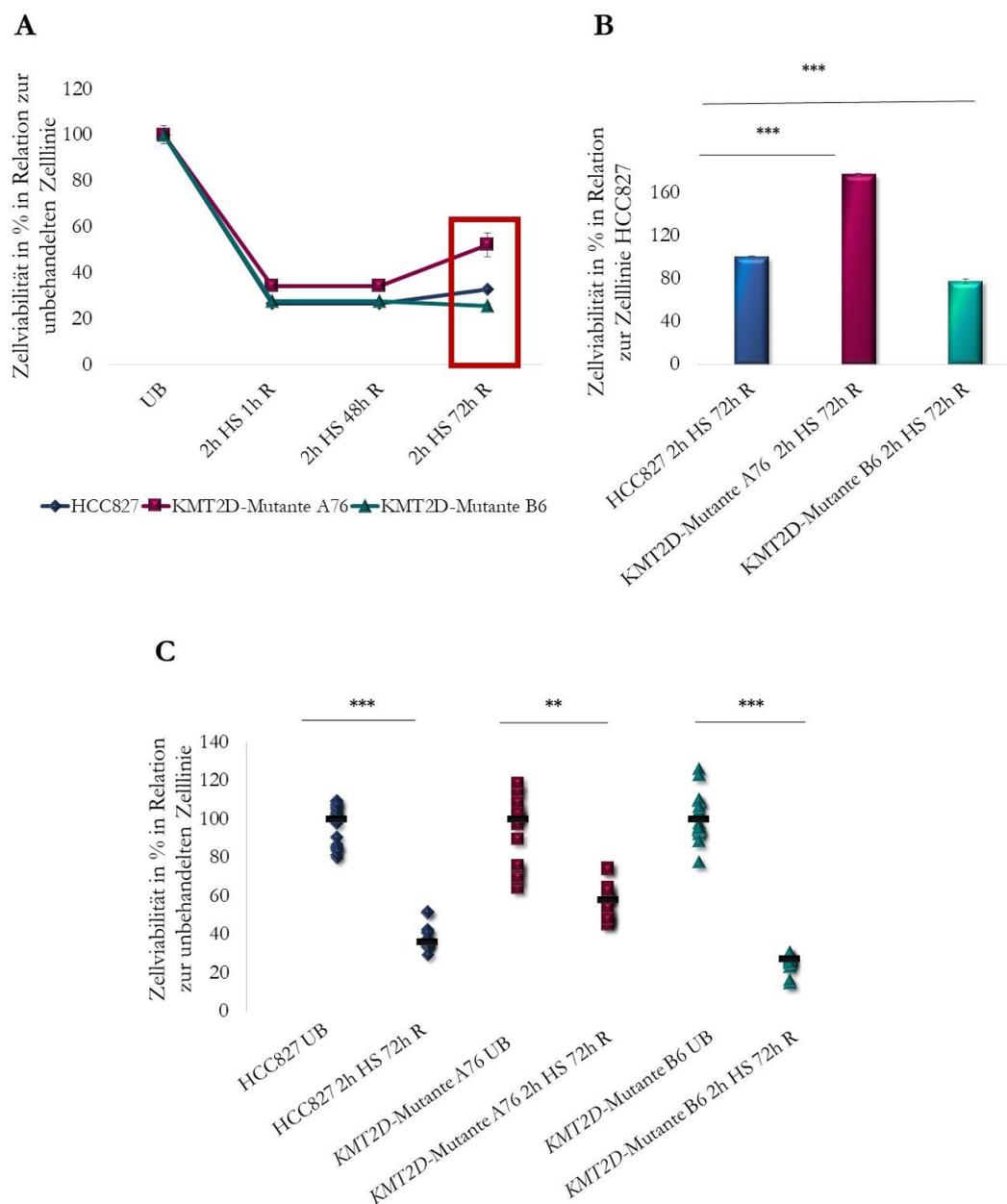


Abb.3.37: Untersuchung der Zellviabilität nach der Induktion von Hitzestress in den *KMT2D*-Mutanten im Vergleich zur Parental-Zelllinie HCC827. Der Hitzeschock wurde über eine Dauer von 2 h bei 42 °C zugeführt. A: Vergleich der Zellviabilität nach einer Regenerationszeit von 1-72 h. Die größten Unterschiede sind erst nach dem Verlauf einer Regenerationszeit von 72 h zwischen den untersuchten Zelllinien zu erkennen (Zeitpunkt markiert durch ein rotes Rechteck). Die *KMT2D*-Mutante A76 zeigt eine schnellere und gesteigerte Regenerationsfähigkeit bei einem kurzzeitig induzierten Stress gegenüber den anderen Versuchsgruppen (t-Test, zweiseitig heteroskedatisch, $p < 0,001$), während die Mutante B6 selbst nach 72 h unter dem Viabilitätsniveau der Parental-Zelllinie bleibt. B: Vergleich der Zellviabilität im Verhältnis zur Parental-Zelllinie HCC827 nach 72 h. Die Zellviabilität ist bei der Mutante A76 signifikant um 77% gegenüber HCC827 erhöht. Die Mutante B6 zeigt eine um 22,4 % signifikant reduzierte Zellviabilität im Vergleich zu HCC827 und somit eine deutlich verringerte Regenerationsfähigkeit nach einem kurzzeitig induzierten Hitzestress (t-Test, zweiseitig gepaart). Unterschiede in der Zellviabilität in Relation zur Parental-Zelllinie nach 1 h bzw. 48 h Regenerationszeit werden unter Anhang I aufgeführt. C: Vergleich der Zellviabilität nach einem Hitzestress innerhalb der Zelllinien HCC827 und den *KMT2D*-Mutanten A76 und B6. Nach der Induktion von Hitze kann im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied in der Zellviabilität nach einer Regenerationszeit von 72 h festgestellt werden (t-Test, zweiseitig gepaart). Die Parental-Zelllinie HCC827 weist nach dieser Zeitspanne eine Zellviabilität von 36 % auf, wohingegen die Zellviabilität der Mutante A76 mit 58 % deutlich erhöht ist. Die Mutante B6 weist im Gegensatz dazu eine auf 27 % reduzierte Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontroll-Zelllinie auf. Darstellung der Mediane im Triplikat. Die Zellviabilität wurde mit einem Neutralrot-Test ermittelt. Legende: blau:

3 Ergebnisse

Parental-Zelllinie HCC827, rot: *KMT2D*-Mutante A76; türkis: *KMT2D*-Mutante B6; UB: unbehandelt, HS: Hitzestress bei 42 °C, R: Regenerationszeit.

In der Analyse von Unterschieden in der Zellviabilität nach einem Hitzestress in den *BRD4*-Mutanten im Vergleich zur Parental-Zelllinie Wi38, kann bei einer Regenerationszeit von 72 h in allen Versuchsgruppen, einschließlich der Parental-Zelllinie, eine hoch signifikante Reduktion in der Zellviabilität in Bezug zu den nicht hitzegeschockten Kontrollgruppen ermittelt werden (Abbildung 3.38; t-Test, zweiseitig gepaart; $p < 0,001$). Aufgrund des starken Viabilitätsverlustes können keine Unterschiede in der Reaktion auf einen Hitzestress zwischen den untersuchten Versuchsgruppen beobachtet werden.

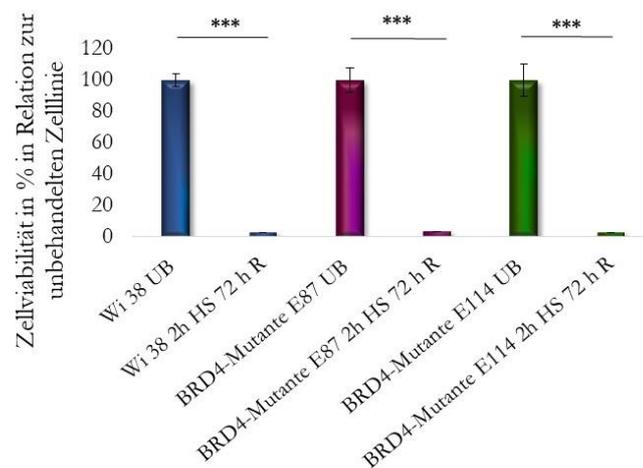


Abb.3.38: Untersuchung der Zellviabilität nach einer Hitze-Induktion von 2 h und einer anschließenden 72 h Regenerationszeit. Vergleich der Zellviabilität innerhalb der Zelllinien Wi38, E87 und E114. Nach 72 h zeigen die Hitzestress-behandelten Zellen aller Versuchsgruppen eine nahezu vollständige Reduktion der Zellviabilität gegenüber der unbehandelten Versuchsgruppe (t-Test, zweiseitig gepaart). Legende: blau: Parental-Zelllinie HCC827, violett: *BRD4*-Mutante E87, grün: *BRD4*-Mutante E114, UB: unbehandelt, HS: Hitzestress bei 42 °C, R: Regenerationszeit.

3.7 Aberrante Expression von U2 snRNP assoziierten Genen in den *KMT2D*- und *BRD4*-Mutanten

Aufgrund der Anreicherung von Signalwegen, die beim Spleißen eine wesentliche Rolle spielen, wurde in den weitergehenden Experimenten untersucht, ob Mutationen von *KMT2D* und *BRD4* (siehe Abschnitt 3.3) einen Einfluss auf die Expression der U2 snRNP (*small nuclear ribonucleic acid*) assoziierten Untereinheiten des Spliceosoms ausüben. Zusammen mit der U1 snRNP bildet das U2 snRNP den prä-spliceosomalen Komplex A, der den Spleißvorgang initiiert (Jurica et al., 2003).

An U2 snRNP sind die so genannten Multi-Untereinheit Komplexe SF3A, der aus den drei Untereinheiten SF3A1-3 besteht, und SF3B, mit den weiteren sechs Untereinheiten SF3B1, SF3B2, SF3B3, SF3B4, SF3B5 und SF3B14, assoziiert (Dziembowski et al., 2004). Obwohl bisher noch nicht im Detail bekannt ist, wie epigenetische Modifikationen in den Spleißprozess eingreifen, zeigen aktuelle Studien, dass CHD1 (*Chromodomain DNA Helicase DNA Binding Protein 1*), ein ATP-abhängiger Chromatin modifizierender Faktor, durch die Erkennung von H3K4me3 am koordinierten Ablauf des prä-mRNA-Spleißens eine tragende Rolle spielt (Sims et al., 2008). Dabei fungiert CHD1 als „Brückenprotein“, indem es über seine Tandem-Chromodomänen mit H3K4me3 interagiert und eine Verbindung zur Untereinheit des U2 snRNP-Komplexes knüpft, sodass durch diese spezifische Wechselwirkung die Effizienz des prä-mRNA-Spleißens moduliert wird (Shilatifard, 2008; Sims et al., 2008).

Aus der NESTs-Analyse in ConsensupathDB konnte (siehe Abbildung 3.29) eine funktionale Interaktion zwischen U2 snRNP assoziierten Genen und H3K4- Methyltransferasen festgestellt werden. Aus diesen Grund wurde in den folgenden Experimenten untersucht, ob Mutationen in *KMT2D* einen Einfluss auf die U2 snRNP- Untereinheiten kodierte Gene als auch U2 snRNP-assoziierter Gene haben. Zunächst wurde wie in der Abbildung 3.39 dargestellt, die RNA-Expressionen der untersuchten Spleiß-Faktoren in den *KMT2D*-Mutanten mit den der Parental-Zelllinie HCC827 verglichen. Des Weiteren wurde die Expression von den Genen *CHD1* und *BRD4* in die Betrachtung mit einbezogen. Es wird dabei sehr deutlich ersichtlich, dass die in den Mutanten reduzierte *KMT2D*-Expression zu repressiven Effekten in den untersuchten Genen führt (t-Test, zweiseitig gepaart). In der Analyse der Proteinexpression kann am Beispiel der Spleiß-Faktoren von SF3B1 und SF3B4 eine reduzierte Proteinexpression festgestellt werden (Abbildung 3.40).

3 Ergebnisse

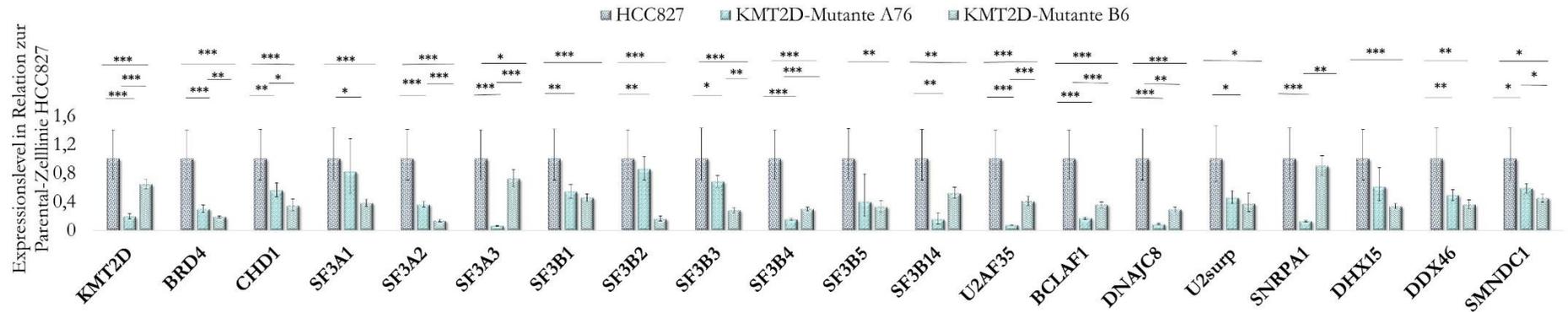


Abb.3.39: RNA-Expressionsanalyse der U2 snRNP-kodierenden Gene und weiterer an U2 snRNP-assoziiierter Gene. Untersuchung des Einflusses von *KMT2D*-bedingten Mutationen bei Genen, die im Spleißprozess involviert sind. Darstellung von Mittelwerten mit der Standardabweichung. T-Tests, zweiseitig gepaart aus drei unabhängigen Experimenten.

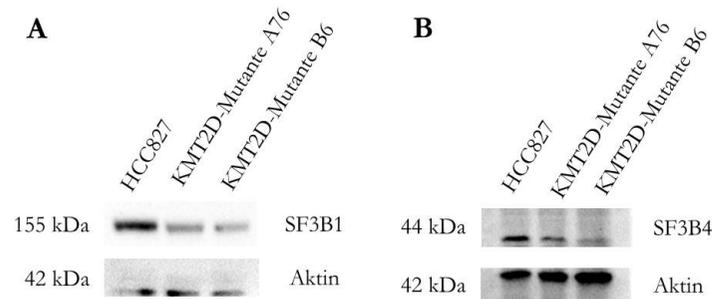


Abb.3.40: Analyse der Proteinexpression der Spleiß-Faktoren SF3B1 und SF3B4 in der Western Blot Analyse. A und B: Im Vergleich zur Parental-Zelllinie HCC827 kann in den *KMT2D*-Mutanten eine verringerte Proteinexpression der Spleiß-Faktoren SF3B1 und SF3B4 festgestellt werden. Die äquivalente Probenbeladung wird durch die gleiche Aktin-Intensität über die Proben angezeigt. Repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Experimenten. kDa=Kilodalton.

In der Visualisierung der H3K4me3 ChIP-Seqs im *UCSC Browser* konnten *Peaks* und eine H3K4me3-Anreicherung in den Promotorregionen der Spleiß-Faktoren *SF3B1* und *SF3B4* ermittelt werden (Abbildung 3.41; Visualisierung des Spleiß-Faktor *SF3B4* siehe Anhang J), sodass eine H3K4me3-methylierungsspezifische Abhängigkeit der Promotorregion dieser Gene festgestellt werden kann.

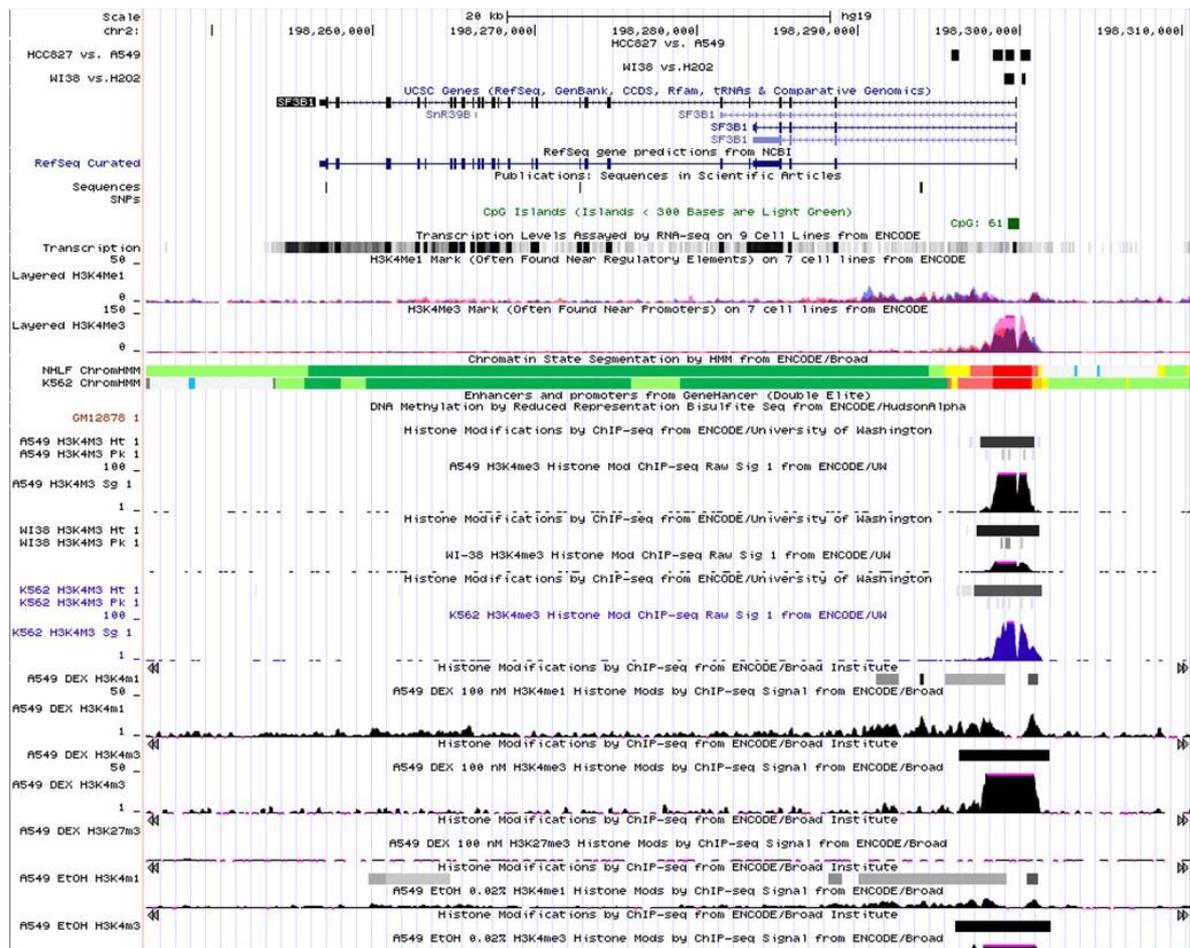


Abb.3.41: Visualisierung der Promotorspezifischen H3K4me3-Aktivität des Spleiß-Faktors *SF3B1* im *UCSC Browser*. Im oberen Bereich der Abbildung werden die in der HCC827- und Wi38- ChIP-Seq detektierten *Peaks* (schwarze Quadrate) in der *SF3B1*-Promotorregion dargestellt. Direkt unter dem Gen erfolgt die Darstellung der Überlagerung von H3K4me1 und H3K4me3 aus insgesamt drei Zelllinien (*layered* H3K4me1 und H3K4me3: GM12878, K562 und NHLF). Jede der drei Zelllinien wird zur besseren Identifizierung folgende Farbe zugeordnet: GM12878=rot, K562=violett und NHLF=rosa, die transparent überlagert dargestellt werden. In der Promotorregion von *SF3B1* ist eine starke Anreicherung von H3K4me3 gegenüber einer Abschwächung des H3K4me1-Niveaus festzustellen. Im unteren Bereich der Grafik werden zusätzlich die H3K4me3-, H3K4me1- und H3K27me3- ChIP-Seq-Analysen der Zelllinien A549, Wi38 und K562 dargestellt (Daten aus dem ENCODE –Projekt vom Broad Institute und der Universität Washington). Die methylierungsspezifische Anreicherung leitet sich dabei aus der Dichte der identifizierten *Peaks* ab (Regionen mit einer statistisch signifikanten Signalanreicherung). Die Signalanreicherungen zeigen dabei die Dichte der Überlappungen dieser sequenzierten Position an. Die aufgeführten Daten sind die Ergebnisse von jeweils gepoolten Replikaten. Für den Spleiß-Faktor *SF3B1* kann eine Anreicherung von H3K4me3 in der Promotorregion festgestellt werden, was auf eine H3K4-methylierungsabhängige -Aktivität des Promotors hinweist. Im Vergleich dazu können für die H3K4me1- und H3K27me3-ChIP-Seqs keine Anreicherungen in der Promotorregion (A549 DEX H3K27me3 bzw. H3K4me1) ermittelt werden. Die Visualisierung des Spleiß-Faktors *SF3B4* ist unter Anhang J zu entnehmen.

3 Ergebnisse

Ein weiterer Punkt ist die Betrachtung, welche Auswirkung ein zusätzlicher Hitzeschock auf das Spleißen hat. In Mahat et al, 2016 und 2017 wird von einer signifikanten Hochregulation von Genen nach einem Hitzeschock berichtet, die im Translationsprozess als auch bei der RNA-Prozessierung einen elementaren Stellenwert einnehmen, während die Mehrheit (55 %) aller aktiven Gene in ihrer Transkription massiv herunterreguliert werden. Bei einem Hitzeschock von 2 h mit einer anschließenden Regenerationszeit von 72 h wurde bei der *KMT2D*-Mutante A76 eine stark verminderte Expression aller untersuchten Gene beobachtet, wohingegen bei der Mutante B6 einige Gene das Expressionsniveau der Parental-Zelllinie erreichen (Abbildung 3.42).

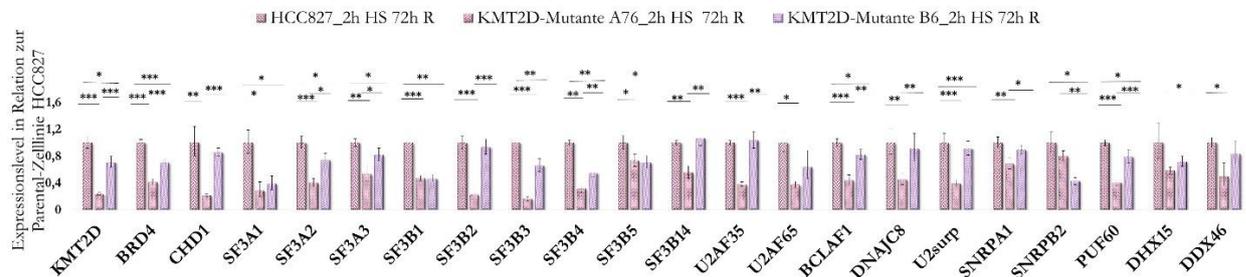


Abb.3.42: Analyse der RNA-Expression von Genen der U2 Spleiß-Untereinheit und U2-assoziierten Genen nach einem Hitzeschock. Untersuchung des Einflusses des *KMT2D*-bedingten Mutationen bei einem Hitzestress bei Spleißgenen. Durch einen Hitzeschock kann eine verminderte RNA-Expression der gesamten untersuchten Gene in der *KMT2D*-Mutante A76 in Relation zur RNA-Expression der Parental-Zelllinie beobachtet werden. Die Expression der Mutante B6 zeigt bei einigen Genen eine Angleichung in der Expression an das Niveau der Parental-Zelllinie HCC827. Der Hitzeschock wurde bei 42 °C für eine Dauer von 2 h mit einer anschließenden Regenerationszeit von 72 h durchgeführt. Darstellung von Mittelwerten mit der Standardabweichung. T-Test, zweiseitig gepaart aus zwei unabhängigen Versuchen. Legende HS: Hitzeschock, R: Regenerationszeit.

Interessanterweise ist bei den *BRD4*-Mutanten bei der Untersuchung der U2 Spleißgene und weiteren mit diesem Komplex assoziierten Genen eine Hochregulation in der RNA-Expression nahezu aller untersuchten Gene festzustellen. In der Analyse der Proteinexpression im Spleißfaktor SF3B1 kann im Vergleich zur Parental-Zelllinie Wi38 eine erhöhte Expression in den *BRD4*-Mutanten ermittelt werden (Abbildung 3.43 A). Bei einer Herunterregulation von *BRD4* ist in der Analyse der RNA-Expression ohne einen zusätzlichen Hitzeschock eine erhöhte Expression von *KMT2D* als auch der U2 assoziierten Gene festzustellen (Abbildung 3.43 B). Durch die Induktion eines Hitzestresses prägt sich die RNA-Expression von *KMT2D* trotz der gleichen induzierten CRISPR CAS9 Mutation bei den *BRD4*-Mutanten unterschiedlich aus. Während für die *BRD4*-Mutante E87 eine hoch signifikante Steigerung in der *KMT2D*-Expression ermittelt werden kann und dahingehend alle untersuchten U2-assoziierten Gene ebenfalls eine signifikant erhöhte Expressionsrate ausweisen, ist die *KMT2D*-Expression der Mutante E114 im starken Kontrast

dazu deutlich reduziert, ebenso wie das Expressionsniveau der untersuchten Spleiß-Gene. Gleichzeitig ist die Expression von *BRD4* nach einem Hitzeschock in beiden CRISPR-Mutanten signifikant reduziert (Abbildung 3.43 C; t-Test zweiseitig gepaart).

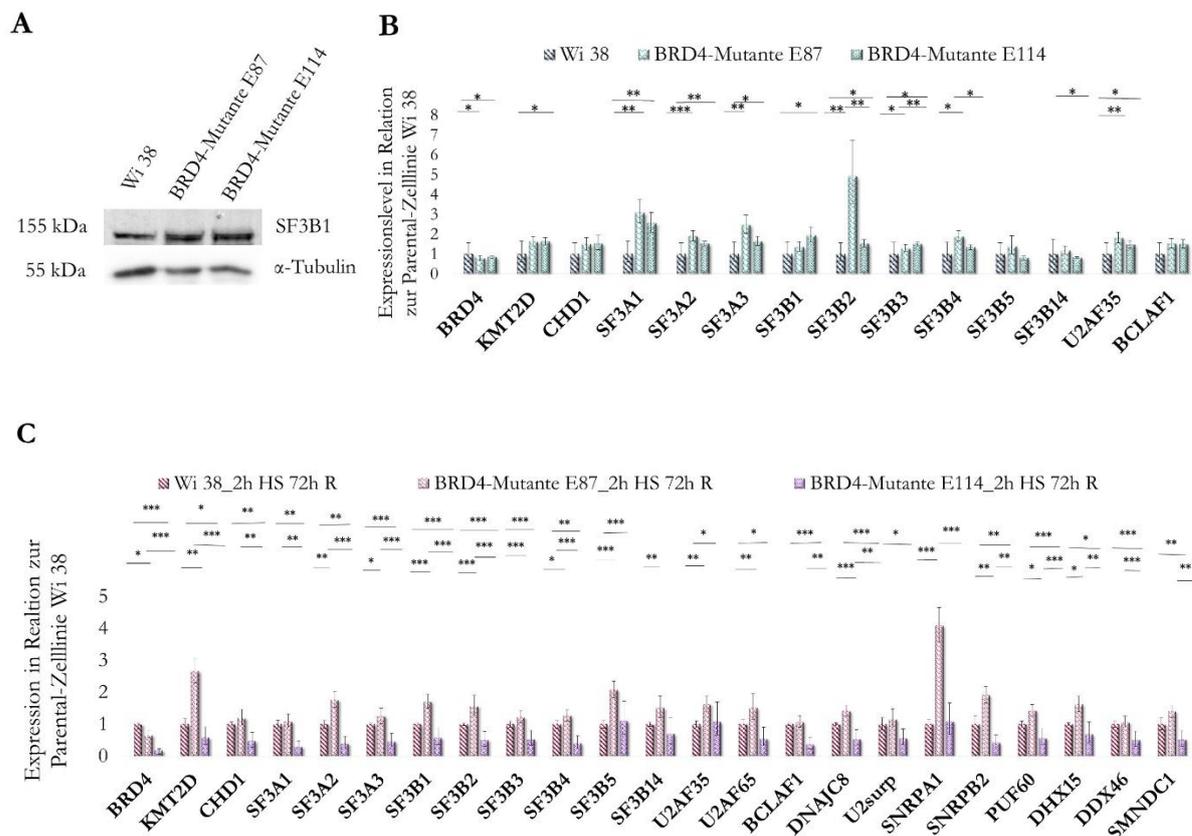


Abb.3.43: Expressionsanalyse der U2 snRNP-assoziierten Gene in den *BRD4*-Mutanten im Vergleich zur Parental-Zelllinie Wi38. Untersuchung des Einflusses von *BRD4*-bedingten Mutationen auf die Expression von Spleiß-Faktoren. A: Unterschiede der Proteinexpression des Spleiß-Faktors SF3B1 in der Western Blot Analyse. In den *BRD4*-Mutanten geht eine Repression von *BRD4* einer gesteigerten Proteinexpression des Spleiß-Faktors SF3B1 einher. Die äquivalente Probenbeladung wird durch die gleiche α -Tubulin-Intensität über die Proben angezeigt. Repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Experimenten. kDa=Kilodalton. B: q-PCR-Analyse der RNA-Expression. T-Test zweiseitig homoskedatisch aus insgesamt drei unabhängig durchgeführten Experimenten. C: Veränderung der RNA-Expression nach einem Hitzeschock. Bei der Mutante E87 ist nach einem Hitzeschock die RNA-Expression von *KMT2D* stark hochreguliert. Eine erhöhte Expression ist in dieser Mutante ebenfalls in den getesteten U2-assoziierten Genen festzustellen. Obwohl die Mutante E114 die exakt gleiche CRISPR CAS9 induzierte Mutation in *BRD4* aufweist, zeigt diese in der *KMT2D*- Expression nach der Induktion eines Hitzeschocks eine deutliche Reduktion. Die RNA-Expression von *CHD1* und vieler der untersuchten Spleißgene ist in dieser Mutante ebenfalls vermindert. Der Hitzeschock wurde bei 42 °C für 2 h mit einer anschließenden Regenerationszeit von 72 h durchgeführt. T-Test zweiseitig gepaart aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Legende HS: Hitzeschock, R: Regenerationszeit.

3.8 Bestimmung von Zellviabilitätsunterschieden der *KMT2D*-Mutanten nach der Applikation von Chemotherapeutika

Durch die signifikanten Anreicherungen im EGFR-Signalweg bei der Analyse der ChIP-Seq Daten erfolgte in den nächsten Schritten die Untersuchung hinsichtlich eines funktionellen Zusammenhangs von Mutationen in *KMT2D* und einer möglichen Resistenz bei der Behandlung von EGFR-gerichteten Chemotherapeutika wie Cetuximab und Erlotinib. EGFR ist häufig bei NSCLC überexprimiert und geht mit einer schlechten Prognose einher (Brabender et al., 2001). Dadurch steht EGFR als vielversprechendes Angriffsziel im Fokus vieler Therapieansätze. Dabei erfolgt die Inhibierung des Signalwegs entweder durch eine Ligandenbindung der extrazellulären Domäne wie z.B. mit Cetuximab oder durch die Blockierung der Tyrosinkinase-Aktivität wie durch Erlotinib (Kurai et al., 2007, Mukohara et al., 2005). Eine Übersicht, der in den Experimenten verwendeten Chemotherapeutika ist der Tabelle 3.4. zu entnehmen. Parallel erfolgten Kombinationsanwendungen mit einem vorhergehenden Hitzeschock bevor das Chemotherapeutikum über das Medium zu den Zellen gegeben wurde.

Tabelle 3.4. Übersicht Chemotherapie-Experimente.

Zelllinie	Chemotherapeutikum	Konzentration	Regenerationszeit	Viabilitätstest
HCC827	Cetuximab	1 µM, 10 µM, 150 µM	24 h, 48 h, 72 h	Neutralrot
<i>KMT2D</i> - Mutante A76	Erlotinib	0,5 µM, 1 µM, 5 µM	72 h	Neutralrot
<i>KMT2D</i> - Mutante B6				

3.8.1 Einfluss von Cetuximab auf die Zellviabilität bei *KMT2D*-induzierten Mutationen

Beim Chemotherapeutikum Cetuximab handelt es sich um einen monoklonalen Antikörper, der durch die Bindung an EGFR die Rezeptoraktivität und damit die nachfolgende Signalkaskade inhibiert (Kurai et al., 2007). Durch die GDSC- Datenbank (*Genomics of Drug Sensitivity in Cancer*) ist es möglich Information über die Sensitivität von Medikamenten bei diversen Krebszelllinien zu erhalten (Yang et al., 2013). Zur Identifikation von molekularen Markern bei der Reaktion von Medikamenten werden Daten über die Zellliniensensitivität mit genomischen Datensätzen integriert, die aus der Datenbank *Somatic Mutations in Cancer* stammen. Diese enthalten Informationen über somatische Mutationen in Tumorgenen, Genamplifikationen und Deletionen

als auch Transkriptionsdaten aus insgesamt 750000 Experimenten bei denen die Reaktionen von 138 Chemotherapeutika in insgesamt 900 Zelllinien beschrieben wurde. Für die Parental-Zelllinie HCC827 konnte im Vergleich zu den anderen 897 getesteten Zelllinien gegenüber Cetuximab eine relative Sensitivität bei einem IC_{50} -Wert von 720 und einem Z -Score von 0,56 ermittelt werden (Abbildung 3.44). Als IC_{50} -Wert wird die mittlere inhibitorische Konzentration eines Inhibitors bezeichnet, bei der die halbmaximale Hemmung beobachtet werden kann (Yang et al., 2013). Der Z -Score beschreibt den signifikanten Wert gegenüber der Empfindlichkeit einer Zelllinie nach der Applikation mit dem getesteten Medikament. Im Gegensatz zu anderen sensitiven Adenokarzinom-Zelllinien wie NCI-H1568 (IC_{50} =13.8) oder H3255 (IC_{50} =6.7) ist HCC827 unempfindlich gegenüber Cetuximab (Abbildung 3.44).

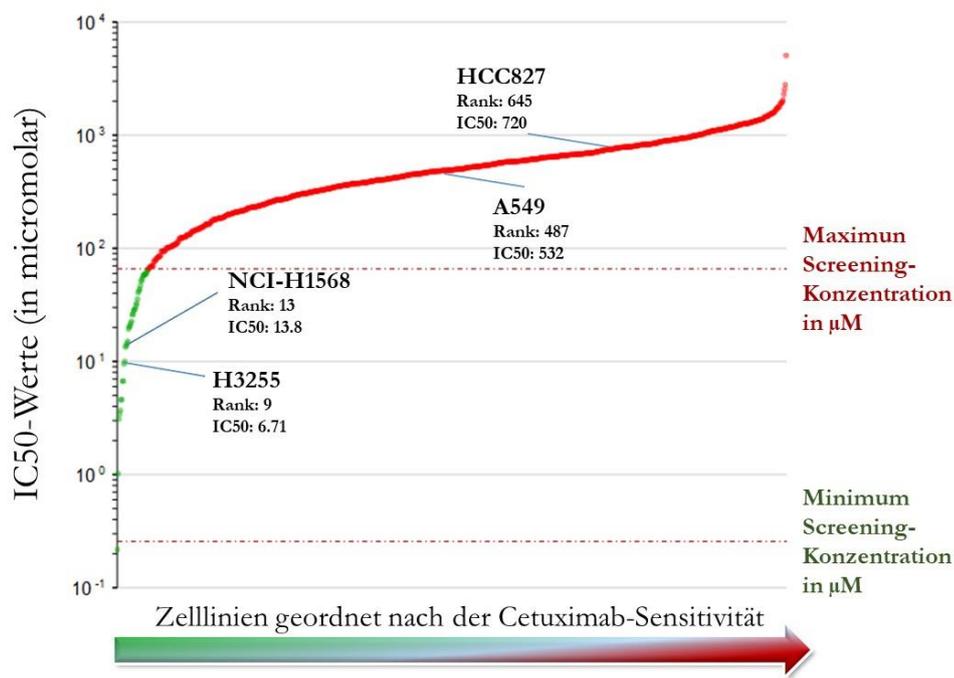
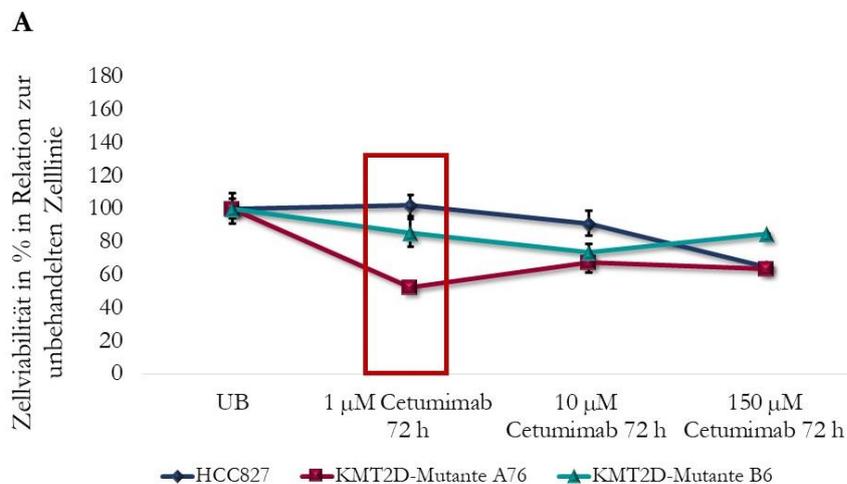


Abb.3.44: Ermittlung der relativen Sensitivität der HCC827 Parental-Zelllinien in GDSC (*Genomics of Drug Sensitivity in Cancer*). In der Grafik werden die getesteten Zelllinien nach dem Ansprechen einer Cetuximab-Behandlung von sensitiv bis resistent anhand des ermittelten IC_{50} -Wertes geordnet. Für HCC827 konnte dabei ein IC_{50} -Wert von 720 bei einem Z -Score von 0,56 ermittelt werden. Der IC_{50} -Wert stellt dabei die mittlere inhibitorische Konzentration dar, bei der die halbmaximale Inhibition erfolgt. Der Z -Score gibt Auskunft über die Empfindlichkeit der verwendeten Medikamente in der jeweiligen Zelllinie. Im Vergleich zu anderen Adenokarzinom-Zelllinien wie H3255 oder NCI-H1568, zeigen A549 und HCC827 nach der Behandlung mit Cetuximab keinen signifikanten Unterschied und sind damit unempfindlich gegenüber Cetuximab (Grafik modifiziert nach *Genomics of Drug Sensitivity in Cancer database*; www.cancerrxgene.org).

Die zu untersuchenden Zelllinien HCC827, A76 und B6 wurden mit drei verschiedenen Konzentrationen Cetuximab zwischen 1 μ M, 10 μ M und 150 μ M, für eine Dauer von 72 h

3 Ergebnisse

behandelt und anschließend die Viabilität in einem Neutralrot-Test analysiert (Abbildung 3.45 A). Der stärkste Unterschied in der Zellviabilität kann dabei bei einer Konzentration von 1 μM festgestellt werden (Abbildung 3.45 A). In der Abbildung 3.45 B wird das Ansprechen der Zellen bei einer Behandlung von 1 μM Cetuximab in einem Zeitraum von 24 h -72 h dargestellt. Das Zellwachstum der *KMT2D*-Mutante A76 wird bei einer Konzentration von 1 μM und einer Applikationsdauer von 72 h deutlich inhibiert. Bei einer Verwendung von 1 μM Cetuximab weist die Mutante A76 nach 72 h eine um 50 % signifikant reduzierte Zellviabilität gegenüber der Parental-Zelllinie HCC827 auf (Abbildung 3.45 A; t-Test zweiseitig gepaart). Dieser Effekt ist nach einer Dauer von 24 h bzw. 48 h nicht festzustellen (Abbildung 3.45 B). Des Weiteren ist die Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe um 39 % verringert. Damit spricht die Mutante A76 wesentlich sensibler auf eine Behandlung mit Cetuximab an als die Parental-Zelllinie HCC827, die mit 9 % nur unwesentlich von der Zellviabilität der unbehandelten Kontrollgruppe abweicht (Abbildung 5.45 C). Für die Mutante B6 hingegen kann nach einer Behandlungsdauer von 72 h kein signifikanter Unterschied in der Zellviabilität im Vergleich zur Parental-Zelllinie festgestellt werden.



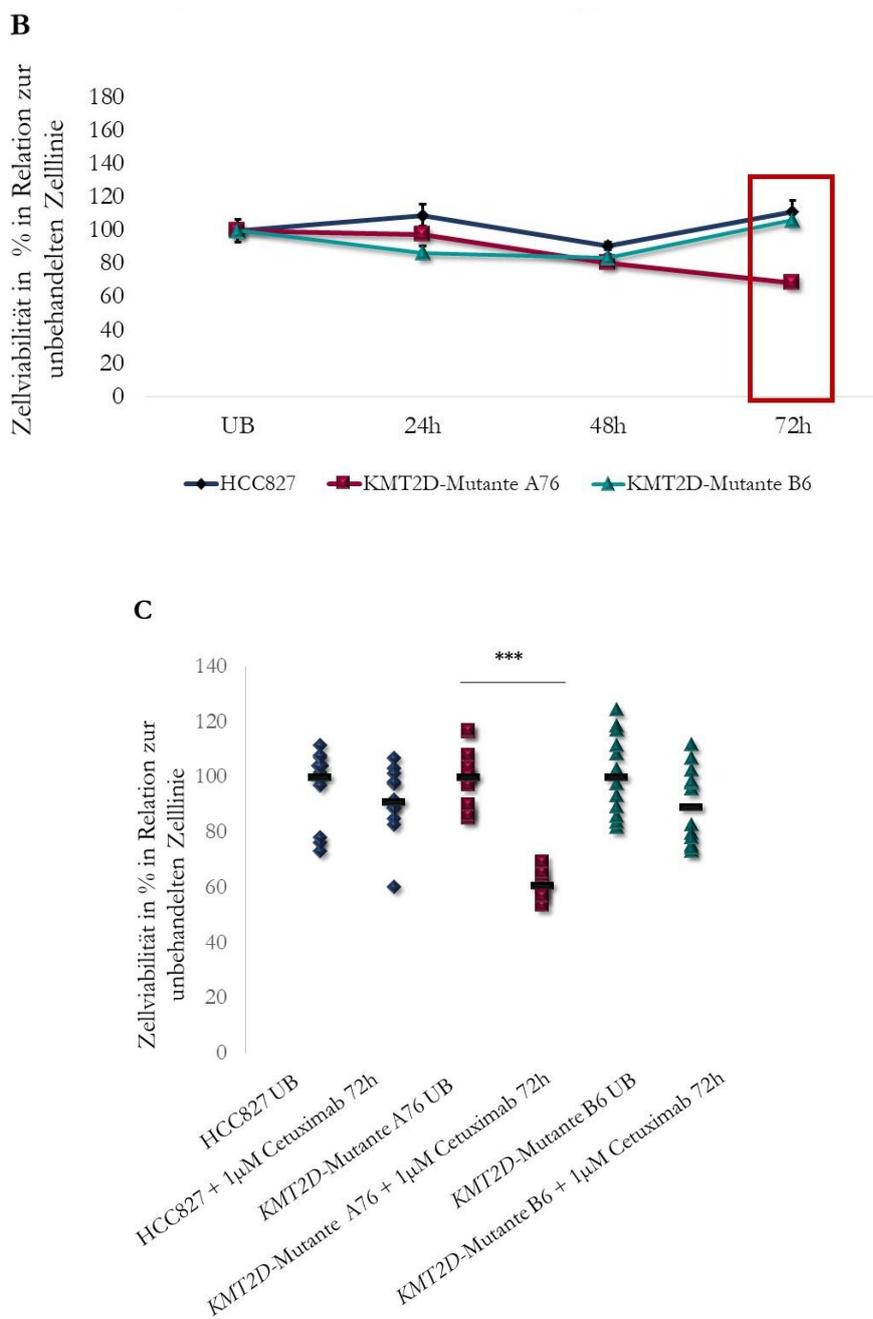


Abb.3.45: Untersuchung der Zellviabilität nach einer Behandlung mit Cetuximab. A: Vergleich der Sensitivität nach einer Behandlung mit 1 μ M, 10 μ M und 150 μ M Cetuximab nach einer Applikationsdauer von 72 h. Die Zellviabilität der *KMT2D*-Mutante A76 wird bei einer Cetuximab-Dosis von 1 μ M inhibiert (t-Test zweiseitig heteroskedatisch, A76: $p < 0,05$). Dieser Effekt ist bei der Mutante B6, mit einem heterozygoten Verlust der funktionellen Domäne, nicht festzustellen. B: Vergleich der Zellviabilität nach einer Applikation von 1 μ M Cetuximab nach einer Zeitdauer von 24 -72 h (t-Test zweiseitig heteroskedatisch, A76 nach 72 h: $p < 0,001$). A und B: Repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Experimenten. C: Untersuchung der Zellviabilität im Vergleich zur unbehandelten Kontroll-Zelllinie. Die Mutante A76 ist nach der Behandlung um 39 % in der Viabilität reduziert und spricht damit signifikant sensitiver auf Cetuximab an als die Versuchsgruppen mit der Parental-Zelllinie HCC827 oder die Mutante B6. Mediane werden als schwarze Balken dargestellt. Die Signifikanz wurde mit einem t-Test aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten ermittelt (zweiseitig heteroskedatisch).

Bei der Expressionsanalyse der H3K4-Methylierung wurde für die Western Blot Analysen zusätzlich die Wildtyp-EGFR Adenokarzinom-Zelllinie A549 untersucht, die im Gegensatz zur

3 Ergebnisse

Parental-Zelllinie HCC827 (*EGFR*-Mutation delE746-A750, Exon 19) keine Mutation in der *EGFR*-Tyrosinkinase Domäne trägt (Chen et al., 2012). Anhand der Daten aus der GDSC-Datenbank kann für A549 bei einem IC_{50} -Wert von 532 bei einem *Z-Score* von 0,27 eine Unempfindlichkeit gegenüber Cetuximab festgestellt werden (Abbildung 3.44). In den Western Blot Analysen der H3K4me1- als auch H3K4me3-Methylierung ist ein zusätzlicher asynchroner Effekt in den Cetuximab-behandelten Versuchsgruppen festzustellen (Abbildung 3.46). Die starke Delokalisierung der gesamten Histon-Menge (ersichtlich in der H3pan-Kontrolle) ist in allem Versuchsgruppen insbesondere beim H3K4me3-Western Blot zu beobachten. Die differenziellen Schwankungen sind deutlich stärker bei den *KMT2D*-mutierten Zelllinien A76 und B6 ausgeprägt als vergleichsweise bei der Adenokarzinom-Zelllinie A549 oder der Parental-Zelllinie HCC827. Durch diese drastischen Abweichungen in der H3pan-Kontrolle, die sich dementsprechend auf das H3K4me1- und H3K4me3-Niveau auswirken, kann hinsichtlich der Methylierungsunterschiede in der Expressionsanalyse zwischen den untersuchten Versuchsgruppen keine Aussage erfolgen.

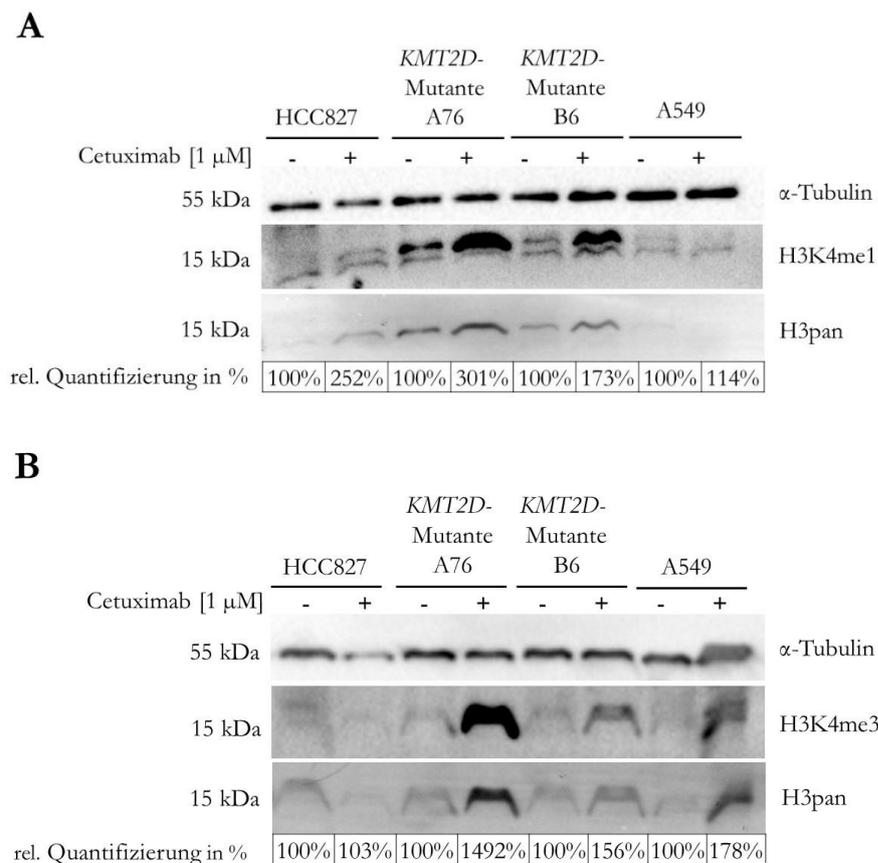


Abb.3.46: Verifizierung der H3K4-Expression in der Western Blot Analyse nach der Behandlung mit 1 μ M Cetuximab. Die Cetuximab-behandelten Zellen weisen eine stärkere Delokalisierung in der gesamten Histon-Menge auf, wobei diese bei den *KMT2D*-mutierten Zelllinien prägnanter ausgeprägt ist. A: Determinierung der Unterschiede in der H3K4me1-Proteinexpression nach einer 72 h Cetuximab-Behandlung. Unter dem Western Blot wird die relative Quantifizierung in Relation zur unbehandelten Zelllinie in % aufgeführt. B: Ermittlung der differenziellen H3K4me3-

Proteinexpression nach einer 24 h Cetuximab-Behandlung. Unter dem Western Blot werden die Werte der relativen Quantifizierung in Relation zur unbehandelten Zelllinie in % aufgeführt. In den Western Blots wird neben dem Housekeeping-Protein α -Tubulin als Ladekontrolle zur Interpretation des gesamten Histon-Gehaltes H3pan verwendet. Die äquivalente Probenbeladung wird durch die gleiche α -Tubulin-Intensität über die Proben angezeigt. Repräsentatives Ergebnis von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Experimenten. kDa=Kilodalton.

In einem weiterführenden Experiment wurde die Auswirkung eines hitzeinduzierten Stresses auf die H3K4-Methylierung betrachtet. Nach dem Hitzestress wurden die Versuchsgruppen mit einer Dosis von 1 μ M Cetuximab in einem Zeitraum von 72 h behandelt. Die zuvor deutlich ausgeprägten Unterschiede in der differentiellen Histon-Menge und der damit verbundenen Schwankungen in der H3K4-Methylierung sind nicht mehr zu beobachten. Die H3K4me1-Methylierung ist nach der Kombinationsbehandlung in allen Versuchsgruppen angeglichen (Abbildung 3.47 A). Dieses Ergebnis kann ebenfalls in der Analyse der Proteinexpression der H3K4me3-Methylierung der *KMT2D*-Mutanten festgestellt werden. Die Expression der H3K4me3-Methylierung ist in der Parental-Zelllinie HCC827 nach der Kombinationsbehandlung auf 22 % verringert. Dieser Effekt zeigt sich ebenfalls in der Analyse des H3K4me3-Niveaus der *KMT2D*-Mutanten. Der EGFR-Wildtyp A549 zeigt nach der Behandlung mit Cetuximab und einem zusätzlichen Hitzeschock eine doppelt so hohe Proteinexpression der H3K4me3-Methylierung (Vergleich unbehandelte A549 mit Cetuximab-behandelten A549-Zellen; Abbildung 3.47 B). Bei der H3K4me1-Methylierung ist die Proteinexpression der Cetuximab-behandelten A549-Zellen im Vergleich zur unbehandelten A549-Kontrollgruppe auf 32 % reduziert (Abbildung 3.47 A). Insgesamt bleibt die H3K4me3-Expression der untersuchten Zelllinien unter dem Niveau der Cetuximab-unbehandelten Parental-Zelllinie HCC827. Zusätzlich wurde die differentielle RNA-Expression von H3K4-relevanten Methyltransferasen als auch der Demethylase LSD1 in der q-PCR Analyse eingehender betrachtet (Abbildung 3.48 A). Außerdem erfolgten weitere Analysen, um die Auswirkung auf die RNA-Expression nach einer Kombinationsbehandlung durch einen zusätzlichen Hitzeschock in den Methyltransferasen zu untersuchen (Abbildung 3.48 B).

3 Ergebnisse

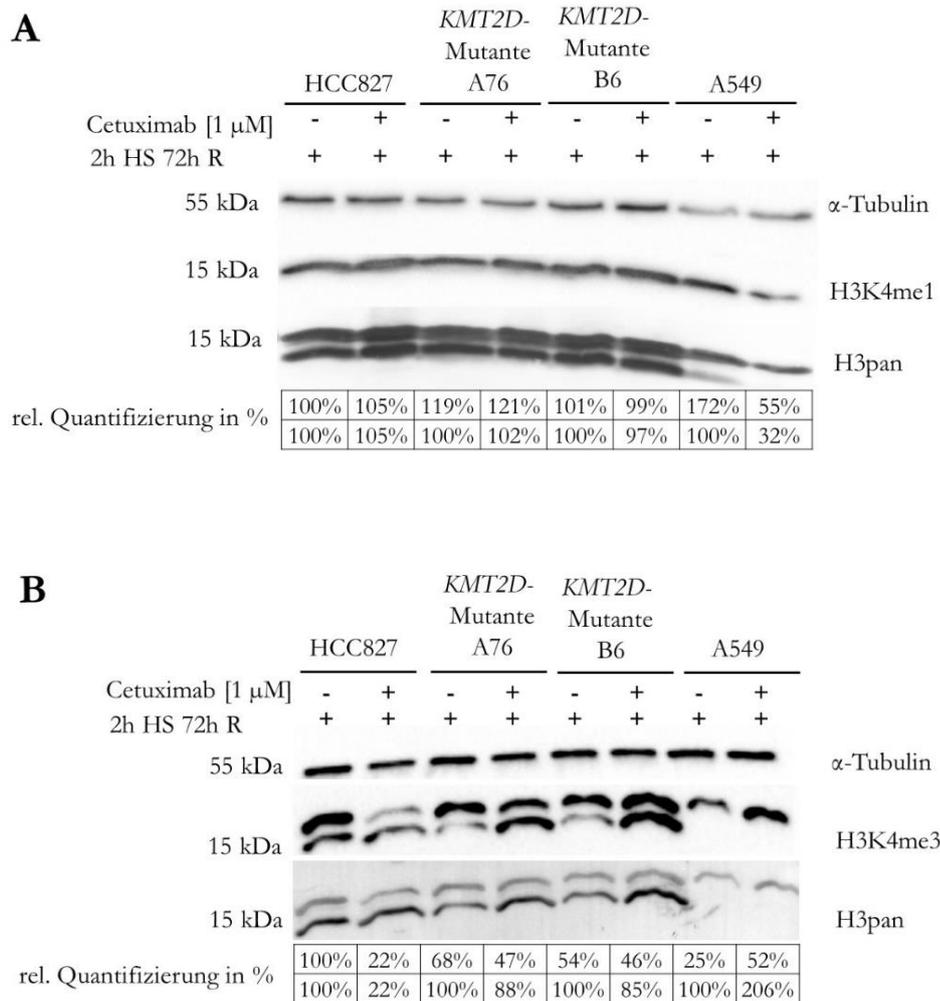
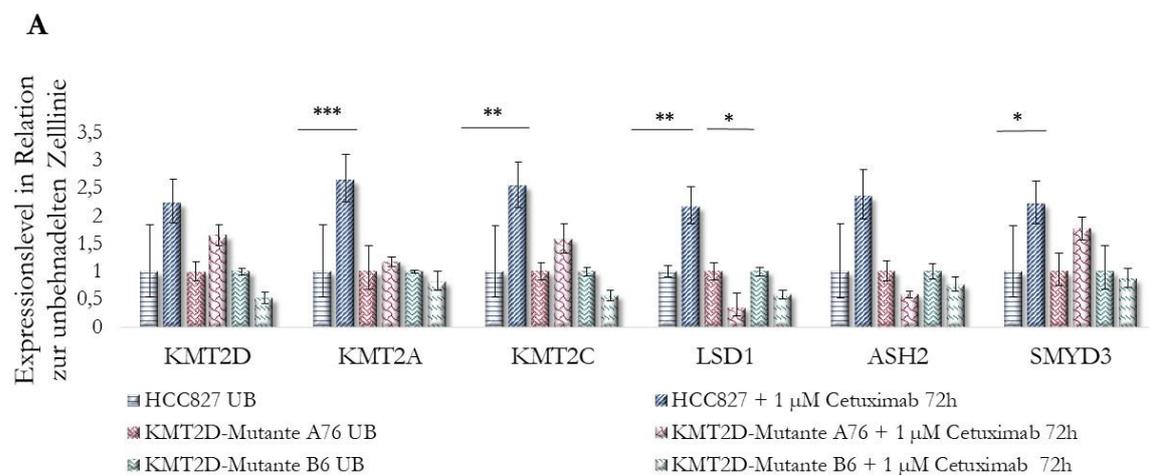


Abb.3.47: Analyse der H3K4-Methylierung nach einer Kombinationsbehandlung mit 1 μ M Cetuximab bei einem vorhergehenden Hitzeschock. Der Hitzeschock erfolgte für 2 h bei 42 °C und einer anschließenden Regenerationszeit von 72 h. A: Western Blot Analyse der H3K4me1-Expression. In den *KMT2D*-Mutanten und der Parental-Zelllinie HCC827 ist die Expression der H3K4me1-Methylierung auf dem gleichen Niveau. Die Versuchsgruppe des EGFR-Wildtyps A549 zeigt nach der Behandlung mit Cetuximab im Vergleich zur Cetuximab-unbehandelten Kontrollgruppe eine auf 32 % reduzierte H3K4me1-Expression. B: Western Blot Analyse der H3K4me3-Expression. Trotz des deutlich herunterregulierten H3K4me3-Niveaus der *KMT2D*-Mutanten nach der Applikation von Cetuximab, bleibt die H3K4me3-Expression unter dem Niveau der Cetuximab-unbehandelten Parental-Zelllinie HCC827 (A76: 47 %, B6: 46 %). Bei einer Kombinationsbehandlung mit Hitze weist die Parental-Zelllinie eine stärker verminderte H3K4me3-Expression auf (22 %). Demgegenüber ist beim EGFR-Wildtyp A549 eine doppelt so hohe Proteinexpression in der Cetuximab-behandelten Versuchsgruppe festzustellen (206 %). Unter den Western Blots erfolgt die Angabe der relativen Quantifizierung von H3Kme1 bzw. -me3. Obere Zeile: Werte in Relation zur unbehandelten HCC827-Kontrollgruppe. Untere Zeile: Werte in Relation zur unbehandelten Zelllinie. In den Western Blots wird neben dem Housekeeping-Protein α -Tubulin als Ladekontrolle zur Interpretation des gesamten Histon-Gehaltes H3pan verwendet. Die äquivalente Probenbeladung wird durch die gleiche α -Tubulin-Intensität über die Proben angezeigt. Zur Ermittlung der Expressionsunterschiede wurde jeweils die obere Bande in der Analyse betrachtet. Dargestellt werden repräsentative Ergebnisse von insgesamt drei unabhängig durchgeführten Experimenten. kDa=Kilodalton.

Die RNA-Expression in der Parental-Zelllinie HCC827 ist gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe in der H3K4-Demethylase LSD1 signifikant gesteigert (t-Test, zweiseitig gepaart, $p < 0,01$). Bei allen analysierten H3K4-Methyltransferasen ist eine starke Hochregulation in der RNA-Expression in der Cetuximab-behandelten Parental-Zelllinie festzustellen. Im Vergleich zur

Parental-Zelllinie kann bei der Mutante A76 nach einer Cetuximab-Behandlung in den H3K4-Methyltransferasen KMT2C, SMYD3 und KMT2D eine Erhöhung in der RNA-Expression beobachtet werden. Gleichzeitig ist die RNA-Expression der H3K4-Demethylase LSD1 signifikant herabgesenkt. Im Kontrast dazu kann bei der *KMT2D*-Mutante B6 eine verminderte RNA-Expression in KMT2C und eine zusätzliche Herunterregulation der vorab in der Zelllinie reduzierten KMT2D-Expression festgestellt werden. Nach einer Cetuximab-Behandlung ist ebenfalls eine Verminderung der LSD1-Expression zu beobachten. Die RNA-Expression der H3K4-Methyltransferasen KMT2A, SMYD3 und ASH2 wird durch eine Cetuximab-Behandlung bei der *KMT2D*-Mutante B6 nicht wesentlich verändert. Erfolgt vor der Cetuximab-Behandlung ein Hitzeschock kann mit Ausnahme der Demethylase LSD1 eine Verminderung und damit eine Angleichung in allen untersuchten H3K4-Methyltransferasen in der Parental-Zelllinie festgestellt werden (Abbildung 3.48 B). Die RNA-Expression von KMT2D wird nach der Kombinationsbehandlung in allen Versuchsgruppen gegenüber den Cetuximab-unbehandelten Kontrollgruppen signifikant reduziert. Bei der Mutante A76 erfolgt zudem eine signifikante Verminderung von KMT2C bei einer gleichzeitig signifikanten Hochregulation der LSD1-Expression. Bei der Expressionsanalyse der Methyltransferasen KMT2A, ASH2 und SMYD3 kann keine Veränderung im Vergleich zur Cetuximab-unbehandelten Mutante A76 festgestellt werden. Im Gegensatz dazu kann in der Mutante B6 nur in KMT2D eine signifikante Herunterregulation der Expression nach einer Kombinationsbehandlung ermittelt werden, während die anderen untersuchten Methyltransferasen und die Demethylase LSD1 eine nahezu unveränderte RNA-Expression aufweisen.



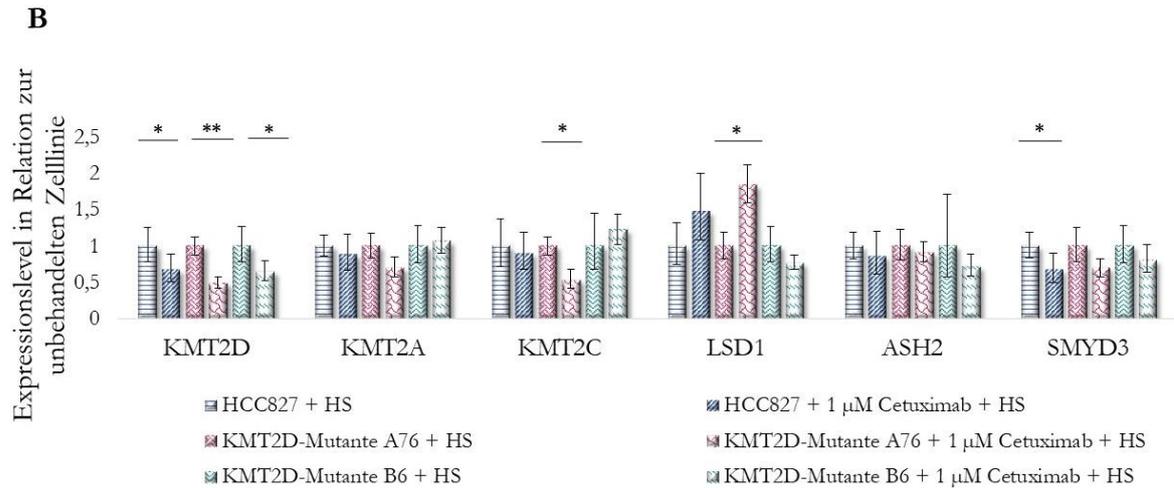
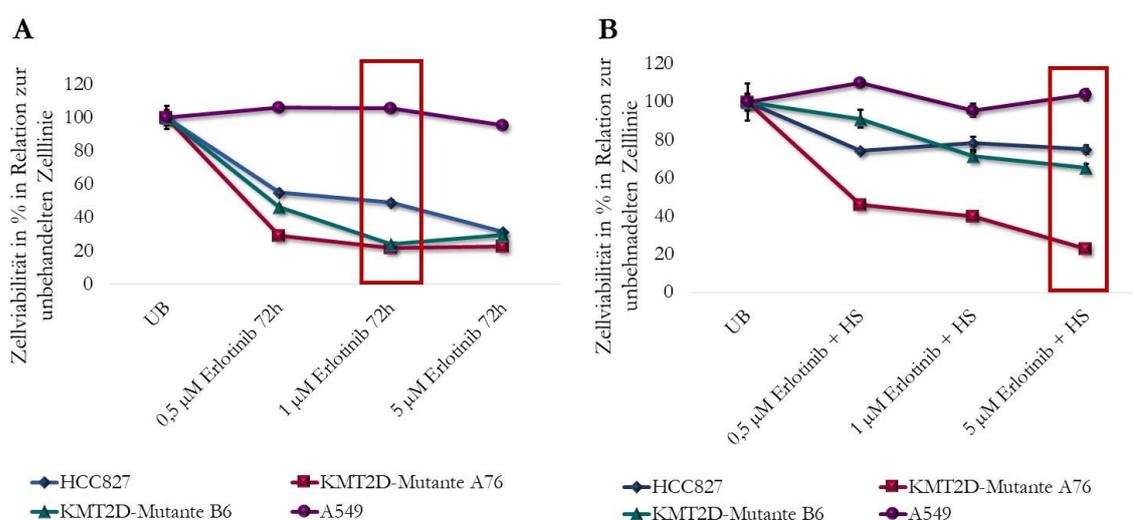


Abb.3.48: Untersuchung der differentiellen RNA-Expression von H3K4-Methyltransferasen und der H3K4-Demethylase LSD1 nach der Behandlung mit Cetuximab. Vergleich der Expression im Verhältnis zur unbehandelten Kontrollgruppe. A: Analyse der RNA-Expression nach der Applikation von 1 µM Cetuximab (t-Test zweiseitig gepaart aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten). B: Analyse der RNA-Expression nach einer Kombinationsbehandlung mit einem zuvor erfolgten Hitzeschock und einer nachfolgenden Applikation von 1 µM Cetuximab über einen Zeitraum von 72 h (t-Test zweiseitig homoskedatisch). Legende: UB: unbehandelt, HS: mit Hitzeschock behandelt.

3.8.2 Einfluss von Erlotinib auf die Zellviabilität bei Deletionen in *KMT2D*

In weiterführenden Experimenten wurde die Wirkungsweise des Chemotherapeutikums Erlotinib auf die Zellviabilität der *KMT2D*-Mutanten als auch der potentielle Einfluss bei der H3K4-Methylierung untersucht und mit der Wildtyp-Zelllinie HCC827 verglichen. Erlotinib ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der die intrazelluläre Tyrosinkinase-Domäne des EGFR-Rezeptor reversibel bindet und somit dessen Autophosphorylierung verhindert. Dadurch werden nachfolgende Signalwege vollständig unterdrückt (Tianhong et al., 2007). Es konnte bereits gezeigt werden, dass HCC827-Zellen mit einer *EGFR*-Mutation in Exon 19 (delE746-A750) mit einem IC_{50} -Wert von 0.02 sensitiv gegenüber Erlotinib sind (Li et al., 2013; Sos et al., 2009). Als Kontrollgruppe diente bei den Untersuchungen der Zellviabilität die Erlotinib-resistente Adenokarziom-Zelllinie A549 (IC_{50} -Wert > 20; Tianhong et al., 2007). Die *KMT2D*-Mutanten A76 und B6, deren *EGFR*-mutierte Parental-Zelllinie HCC827 als auch die *EGFR*-Wildtyp Zelllinie A549 wurden mit Erlotinib-Konzentrationen von 0,5-5 µM behandelt und das Zellwachstum nach einer Dauer von 72 h im Neutralrot-Test analysiert. Die Zellviabilität der *KMT2D*-Mutanten war im Vergleich zu den anderen beiden Versuchsgruppen deutlich verringert. Der größte Unterschied ist nach einer Applikationsdosis von 1 µM Erlotinib feststellbar. Beide *KMT2D*-Mutanten weisen eine um ca. 25 % verminderte Zellviabilität im Verhältnis zur Parental-Zelllinie HCC827 auf, deren Wachstum nach der Behandlung mit Erlotinib um 50 % reduziert ist. Im Vergleich zur Erlotinib-

resistenten Zelllinie A549 ist das Wachstum in den *KMT2D*-Mutanten um über 81,5 % minimiert (Abbildung 3.49 A). In Relation zur Erlotinib-behandelten Parental-Zelllinie HCC827 zeigt die *KMT2D*-Mutante A76 bei einer Dosis von 1 μM eine deutliche Hypersensitivität. Das Wachstum ist auf 47 % signifikant reduziert (Abbildung 3.49 C; t-Test, zweiseitig gepaart). Diese signifikanten Unterschiede im Zellwachstum sind auch bei einer Dosis von 0,5 μM (um 26,5 % reduziert) bzw. 5 μM Erlotinib (um 36,8 % vermindert) festzustellen (siehe unter Anhang K). Das Wachstum von B6 hingegen wird um 32 % stärker supprimiert als das der Parental-Zelllinie HCC827 (Abbildung 3.49 C). Damit kann für beide *KMT2D*-Mutanten im Falle einer Behandlung bei einer Dosis von 1 μM eine Hypersensitivität gegenüber Erlotinib festgestellt werden. Betrachtet man das Wachstumsverhalten nach einem zusätzlichen Hitzeschock kristallisieren sich ebenfalls Sensitivitätsunterschiede bei einer Dosis von 5 μM Erlotinib zwischen der *KMT2D*-Mutante A76 und dem Wildtyp HCC827 heraus. In Relation zur unbehandelten A76-Kontrollgruppe ist die Zellviabilität um 52 % reduziert (Abbildung 3.49 B). Betrachtet man die Viabilitätsunterschiede innerhalb der mit 5 μM Erlotinib-behandelten Versuchsgruppe, ist das Zellwachstum in der Mutante A76 um 33 % stärker gehemmt als das Wachstum der Parental-Zelllinie HCC827 (Abbildung 3.49 D). Für die *KMT2D*-Mutante B6, die eine nahezu unveränderte Zellviabilität aufweist, kann kein Unterschied im Verhältnis zur Parental-Zelllinie nach einer Kombinationsbehandlung mit einem zusätzlichen Hitzeschock festgestellt werden. Die Versuchsgruppe der A549-Zelllinie weist unabhängig von einem Hitzeschock ein uneingeschränkt resistentes Zellwachstum auf.



3 Ergebnisse

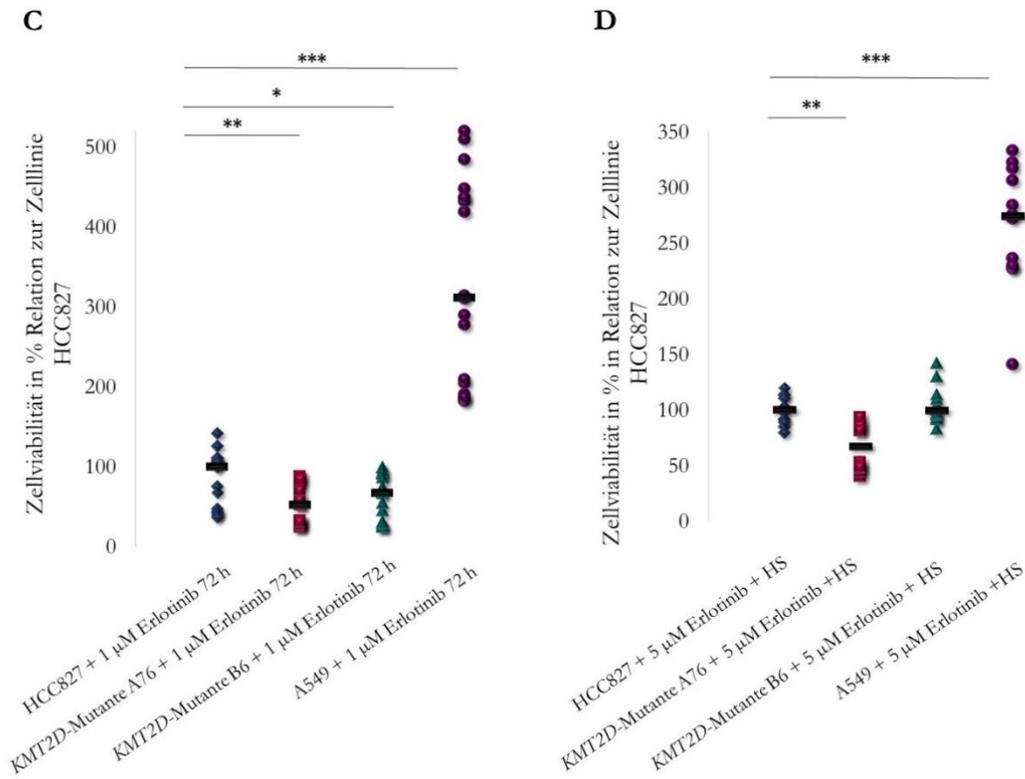
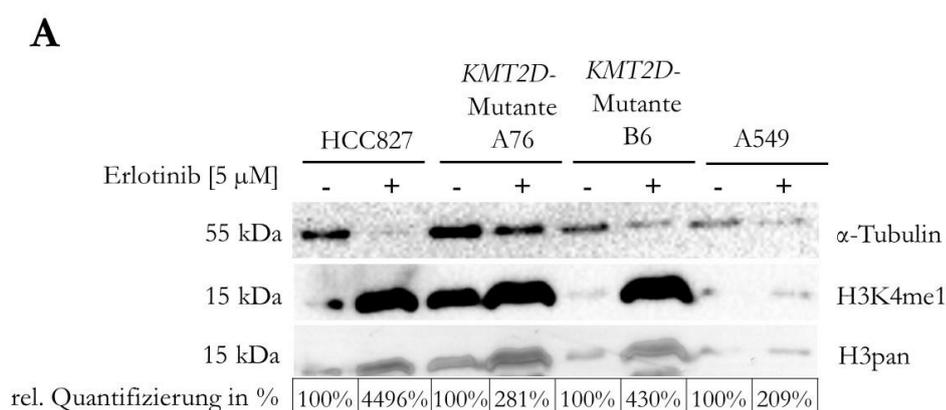


Abb.3.49: Untersuchung der Zellviabilität nach einer 72 h Erlotinib- Behandlung. A: Darstellung der Zellviabilität nach einer Behandlungsdosis von 0,5-5 µM Erlotinib. Beide *KMT2D*-Mutanten zeigen ein hypersensitives Ansprechen auf Erlotinib, wobei die größten Unterschiede zur Parental-Zelllinie HCC827 bei einer Dosis von 1 µM festzustellen sind (t-Test, zweiseitig gepaart, $p < 0,01$). B: Untersuchung der Zellviabilität nach einer Kombinationsbehandlung bestehend aus einem vorhergehenden Hitzeschock und einer anschließenden Behandlung mit 0,5 -5 µM Erlotinib über einen Zeitraum von 72 h. Der Hitzeschock wurde für 2 h bei 42 °C durchgeführt. A76 wird um 52,2 % stärker durch Erlotinib inhibiert als der Wildtyp HCC827. Dieser Effekt kann für die Mutante B6 nicht festgestellt werden (t-Test, zweiseitig heteroskedatisch; A76- 1-5 µM Erlotinib: $p < 0,001$; B6: n.s.; HCC827-5 µM Erlotinib: $p < 0,05$). C: Vergleich der Zellviabilität in Relation zur Parental-Zelllinie HCC827 bei einer Konzentration von 1 µM Erlotinib. Die Zellviabilität der *KMT2D*-Mutante A76 ist signifikant auf 53 % gegenüber der Parental-Zelllinie HCC827 reduziert. Ein hypersensitiveres Ansprechen auf Erlotinib ist in der *KMT2D*-Mutante B6 ebenfalls durch eine auf 68% reduzierte Zellviabilität festzustellen (t-Test, zweiseitig gepaart). D: Zellviabilität in Relation zur Parental-Zelllinie HCC827. Die Mutante A76 reagiert um 33 % sensitiver bei einer Dosis von 5 µM Erlotinib in Relation zur Parental-Zelllinie HCC827. Bei der Mutante B6 ist keine Veränderung in der Viabilität festzustellen (t-Test, zweiseitig gepaart). Die Kontroll-Zelllinie A549 zeigt ein davon deutlich abgrenzt resistentes Wachstumsverhalten. A; C: Ergebnis aus drei unabhängig durchgeführten Experimenten. B; D: Ergebnis aus zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Legende: UB: unbehandelt, HS: mit Hitzeschock behandelt.

Um eine mögliche Auswirkung einer Erlotinib-Behandlung auf die H3K4-Methylierung überprüfen zu können, wurden die Versuchsgruppen für 72 h mit 5 µM Erlotinib behandelt. Parallel erfolgte in einem weiteren Experiment eine Kombinationsbehandlung der Zelllinien mit einem vorhergehenden Hitzestress und einer unmittelbar darauffolgenden Applikation einer 5 µM Erlotinib-Dosis über einen Zeitraum von 72 h. Die differentielle Methylierung von H3K4- wurde durch die Proteinexpression in der Western Blot Analyse ermittelt. In der Abbildung 3.50 werden die beobachteten Unterschiede am Beispiel der H3K4me1-Methylierung dargestellt, die auf einer differentiellen Histon-Menge in allen Versuchsgruppen basiert. Diese Unterschiede sind

insbesondere bei den *KMT2D*-Mutanten zu beobachten, wobei in diesem Fall auch Schwankungen in der Ladekontrolle des Housekeeping-Proteins vorliegen. Allerdings kann festgestellt werden, dass der Effekt einer differentiellen Histon-Menge in den Versuchsgruppen, die mit Erlotinib behandelt wurden zusätzlich verstärkt wird. Dieser Effekt ist insbesondere in der Parental-Zelllinie HCC827 mit der EGFR-aktivierenden Mutationen (Exon 19; delE746-A750) und den *KMT2D*-Mutanten zu beobachten und ist wesentlich stärker ausgeprägt als vergleichsweise bei den Cetuximab-behandelten Zellen (Abbildung 3.47 A und B). Diese Veränderungen der Histongesamt-Menge spiegeln sich in der aberrant divergierenden H3K4me1-Methylierung wider (Abbildung 3.50 A). Selbst in der Erlotinib-resistenten A549- Zelllinie kann im Vergleich zu der Erlotinib-unbehandelten Versuchsgruppe ein verstärkter Effekt in der Delokalisierung der Histongesamt-Menge beobachtet werden. Erfolgt vor der Anwendung mit 5 μ M Erlotinib ein Hitzeschock (2 h bei 42 °C) kann nach einer Behandlungsdauer von 72 h in der Western Blot Analyse wie zuvor bei der Anwendung von Cetuximab eine Angleichung der H3K4me1-Expression beobachtet werden (Abbildung 3.50 B). Dieser Angleichungseffekt kann auch nach einem Hitzeschock für die Proteinexpression der H3K4me3-Methylierung festgestellt werden (Western Blot siehe unter Anhang K). Die H3K4me1-Methylierung ist dabei nur unwesentlich in den *KMT2D*-Mutanten erhöht (A76: 123 %; B6: 148% Vergleich zur unbehandelten Kontroll-Zelllinie). Die H3K4me1-Expression ist in HCC827 fast um die Hälfte in der Expression vermindert (57 %), während A549 nach der Erlotinib-Anwendung um mehr als das doppelte in der H3K4me1-Proteinexpression ansteigt (258 %).



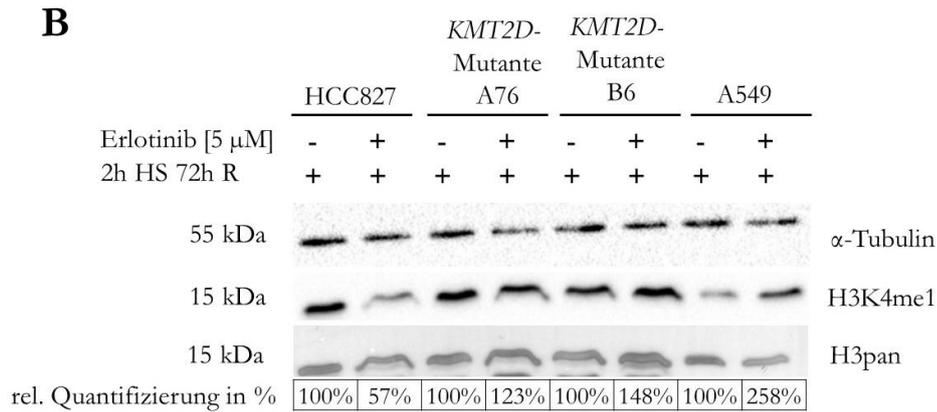


Abb.3.50: Untersuchung der Expressionsunterschiede in der H3K4me1-Methylierung nach der Behandlung mit 5 µM Erlotinib. A: Untersuchung der Proteinexpression in der Western Blot Analyse. B: Untersuchung der differentiellen H3K4me1-Expression nach einer Kombinationsbehandlung mit einem vorhergehenden Hitzeschock. Nach einer Kombinationsbehandlung kann eine Angleichung in der Proteinexpression aller untersuchten Versuchsgruppen festgestellt werden. Der Hitzeschock erfolgte für 2 h bei 42 °C mit einer anschließenden Erlotinib-Behandlung (5 µM Dosis) über 72 h. Unter den Western Blots erfolgt die Angabe der relativen Quantifizierung in Relation zur unbehandelten Zelllinie in %. In den Western Blots wird neben dem Housekeeping-Protein α-Tubulin als Ladekontrolle zur Interpretation des gesamten Histon-Gehaltes H3pan verwendet. Dargestellt wird ein repräsentatives Ergebnis von insgesamt zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. kDa=Kilodalton.

Bei der Analyse der RNA-Expression kann bei der Parental-Zelllinie HCC827 eine signifikante Hochregulation der Demethylase LSD1 festgestellt werden (Abbildung 3.51 A; t-Test, zweiseitig gepaart). Des Weiteren ist bei HCC827 eine signifikante Steigerung der KMT2A-, KMT2C- und ASH2-Expression zu beobachten. Die Expression von KMT2D und SMYD3 wird in HCC827 durch eine Erlotinib-Behandlung nicht im Wesentlichen beeinflusst. Interessanterweise kann in der RNA-Expression der Mutante A76 eine zusätzliche Reduktion der KMT2D-Expression ermittelt werden. Die Expressionslevel der H3K4-Methyltransferasen KMT2A, SMYD3 und KMT2C und der Demethylase LSD1 werden nach einer Erlotinib-Behandlung in der Mutante A76 verglichen zur unbehandelten Kontrollgruppe nicht verändert. Für die H3K4-Methyltransferase ASH2 kann eine erhöhte Expression in dieser Mutante ermittelt werden. Im Gegensatz dazu zeigt die Mutante B6 eine signifikante Hochregulation der LSD1- und ASH2 -Expression (LSD1: $p < 0,001$). Verglichen zu diesen Methyltransferasen, ist die SMYD3-Expression signifikant vermindert, während die KMT2D-Expression keine Veränderungen nach einer Erlotinib-Behandlung aufweist. Erstaunlicherweise kann bei der Erlotinib-resistenten Zelllinie A549 nur eine Hochregulation in der H3K4-Methyltransferase ASH2 beobachtet werden. Bei der Untersuchung der anderen Expressionslevel von KMT2D, KMT2A und LSD1 können keine Veränderungen im Vergleich zur unbehandelten Versuchsgruppe beobachtet werden. Betrachtet man die Veränderung der Expressionsunterschiede nach einem Hitzeschock kann insbesondere bei LSD1- als auch SMYD3 eine Angleichung der RNA-Expression in allen Versuchsgruppen festgestellt werden. In der

3 Ergebnisse

Abb.3.51: Untersuchung der RNA-Expression nach einer Behandlung mit Erlotinib. A: Untersuchung der differentiellen RNA-Expression von 5 μ M Erlotinib nach 72 h Inkubation. Beim Wildtyp HCC827 und der Mutante B6 sind die Methyltransferasen *ASH2*, *KMT2A* und *KMT2C* hochreguliert (t-Test zweiseitig gepaart aus zwei unabhängig durchgeführten Versuchen). Ebenso ist eine signifikante Hochregulation der *LSD1*-Expression in diesen Zelllinien zu beobachten. Die bei der Mutante A76 sehr hohe *LSD1*-Expression wird nach einer Behandlung mit Erlotinib nicht in der Expression beeinflusst, allerdings kann eine deutliche Repression in *KMT2D* festgestellt werden. B: Veränderung der RNA-Expression nach einem zusätzlichen Hitzeschock (t-Test, zweiseitig heteroskedatisch). Der Hitzeschock wurde 2 h bei 42 °C durchgeführt. Anschließend erfolgte die Applikation von 5 μ M Erlotinib über einen Zeitraum von 72 h. Legende: UB: unbehandelt; HS: mit Hitzeschock behandelt.

4 Diskussion

4.1 Etablierung von stabilen NSCLC-Zelllinien mit Deletion in den Genen *KMT2D* und *BRD4*

Durch die Entdeckung von CRISPR CAS9 und dessen großem Potential der gezielten Veränderung der genetischen Sequenz in Modellorganismen wie Mäusen, Fischen oder auch in diversen Zelllinien wurde eine neue Dimension der Gentechnologie erreicht (Jinek et al., 2012; Zhang et al., 2013; Platt et al., 2014). Mit dieser Technologie ist es möglich Ursachen in der Entstehung von diversen Tumoren durch die Generierung neuer definierter zellbasierter Modelle näher zu ergründen (Sanchez-Rivera et al., 2015; Zhan et al., 2018). Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde CRISPR CAS9 angewandt, um Deletionen in unterschiedlichen Größenordnungen in die Kandidatengene *KMT2D* und *BRD4* zu induzieren. Als Modell dienten dabei die Adenokarzinom-Zelllinie HCC827 als auch die Lungenfibroblasten-Zelllinie Wi38. Bei einer Deletionsgröße von 42 kb und damit das gesamte *BRD4*-Gen umfassend, konnten insgesamt 30 % der Klone mit der erwarteten Mutation identifiziert werden. Im Fall des Kandidatengens *KMT2D* betrug die Effizienz bei einer Deletionsgröße von 11 kb ca. 1 % der Klone, bei der Deletion von 15 kb wiesen insgesamt 6 % der Klone die erwartete Mutation auf. Die Wahrscheinlichkeit einen positiven Klon mit der angestrebten Mutation zu erzeugen, ist dabei stark von der Transfektionseffizienz abhängig. Aus der Tabelle 4.1 wird klar ersichtlich, dass eine höhere Transfektionseffizienz mit einer wesentlichen höheren Ausbeute an positiven Klonen korreliert.

Tabelle 4.1. Übersicht der CRISPR CAS9 induzierten Deletionen.

Zelllinie	Gen	Mutation	Transfektions effizienz	Anzahl der analysierten Klone	Anzahl der positiven Klone	Anzahl der positiven Klone in %
HCC827	<i>KMT2D</i>	delE31-E41	15%	98	1	1 %
		delE31-E48	15-20 %	49	3	6,13 %
Wi38	<i>BRD4</i>	delE1-E20	55-65 %	167	46	30 %

Die generierten Zelllinien wiesen in *BRD4* und *KMT2D* ausschließlich heterozygote Deletionen auf. Im Fall der untersuchten Kandidatengene zeigen mehrere Studien an Mausmodellen, dass homozygote Deletionen in *KMT2D* als auch *BRD4* bereits in der frühen Embryonalphase nach

kurzer Zeit letal sind (Lee et al., 2013; Muller et al., 2011). Des Weiteren legt Ford et al., 2015 in seinen Untersuchungen nahe, dass das Fehlen an homozygoten Inaktivierungen von *KMT2D* in Krebs darin begründet werden könnte, dass Krebszellen ein unverändertes Wildtyp-Allel benötigen, um die Lebensfähigkeit bei einer gleichzeitigen progressiven Zellproliferation gewährleisten zu können.

Durch die Aktivität des NHEJ-Reparatursystems, das für die Induktion von Deletionsmutationen initiiert wird, treten häufig Indels auf. Diese können in ihrer Länge in der Zielregion variieren und zu unerwünschten Leserasterverschiebungen und vorzeitigen Stop-Codons führen (Lieber, 2010; Sander et al., 2014; Rodger et al., 2017). Trotz der Häufigkeit des Auftretens konnten nach der Sequenzierung in keinem identifizierten *KMT2D*- oder *BRD4*-Klon Indels ermittelt werden. Das Design der sgRNAs wurde mit dem Online-Programm des Zhang Labs (<http://tools.genome-engineering.org>) durchgeführt, wodurch sgRNAs mit einem niedrigen *Off-Target*-Effekt ermittelt werden können. Die für die Induktion der Deletion in *KMT2D* verwendeten sgRNAs weisen einen sehr niedrigen *Off-Target-Score* bei einem maximalen Wert von 0.1-0.2 auf. Bei den *BRD4*-sgRNAs lag dieser Wert mit 0.1-0.3 nur unwesentlich darüber. Das Auftreten von *Off-Target*-Effekten rückt zunehmend in den Fokus der Forschung. So zeigt Kosicki et al., 2018 in seinen *FLEAR*-Experimenten, das durch CRISPR CAS9 zusätzliche Deletionen von mehreren kb Größe, Inversionen als auch Translokationen fern ab der Zielsequenz im Genom erfolgen, die weitreichende pathogene Konsequenzen nach sich ziehen können wie z.B. die Aktivierung von Onkogenen. Durch Programme wie beispielsweise dem *CAS-OFFinder*, können potentielle *Off-Targets* im Genom durch Algorithmen identifiziert werden (Bae et al., 2014). Die genomweite Spezifität der CAS9-Nuklease wurde insbesondere durch die Anwendung von *Guide-Seqs* als auch durch gezielte NGS (*next generation sequencing*) deutlich. Bei der sogenannten *Guide-Seq* handelt es sich um eine Methode, um genom-weite durch CRISPR-sgRNA gesteuerte Nukleasen induzierte, Doppelstrangbrüche spezifisch zu identifizieren und damit ein Profil der spezifischen Spaltungseffektivität zu erhalten (Tsai et al., 2015). Dadurch wird es möglich, vor einer therapeutischen Anwendung von CRISPR CAS9 die Genauigkeit der verwendeten sgRNAs durch das Auftreten von *Off-Target*-Effekten zu untersuchen. Der Erkennungsbereich von *Off-Target*-Frequenzen liegt bei dieser Methode unter 0,12 % und ist damit deutlich präziser als vergleichsweise die Anwendung von ChIP-Seqs (Tsai et al., 2015; Zhang et al., 2015). Ein neues Verfahren zum Nachweis genomweiter *Off-Target*-Effekte und zur spezifischen Validierung diverser CRISPR CAS9 Applikationen in humanen Zellen stellt als neuer „Golden-Standard“ die *Digenome-Seq* (*in vitro CAS9-digested whole genome sequencing*) dar, mit der *Off-Targets* bis zu einer unteren

Grenze von 0,1 % nahe dem Detektionslimit der gezielten Tiefensequenzierung ermittelt werden können (Kim et al., 2015). Bei der *Digenome-Seq* werden *Off-Target* induzierte Nuklease-Strangabbrüche in einer Zellpopulation durch die Sequenzierung des *in vitro*-verdauten Genoms identifiziert. Die aus dem Verdau resultierenden DNA-Fragmente weisen identische 5'Enden an den Spaltungsstellen auf, was zu Sequenzierungs-*Reads* führt, die mit dem *Digenome*-Programm identifiziert werden können. Eine präzisere DNA-Editierung mit einer höheren Ausbeute der spezifisch modifizierten Klone soll mit einer neuen Generation CRISPR-Nukleasen wie beispielsweise der Cpf1-Nuklease ermöglicht werden. Diese besitzt im Gegensatz zur CAS9-Nuklease nur eine 23-24 nt spezifische crRNA und orientiert sich im Zielgenom nach einer T-reichen PAM-Domäne. In der Zielsequenz erzeugt die Cpf1-Nuklease einen gestaffelten Doppelstrangbruch mit einem fünf Nukleotid-langen 5'-Überhang, wodurch die Orientierung bei der Verwendung von ss- oder dsODNs genau vorgegeben wird (Zetsche et al., 2015; Bin Moon et al., 2018). Das Problem der CAS9-Nuklease, bei der es beim Einbau der ss- bzw. der dsODNs sehr oft zu Inversionen kommt, soll damit vermieden und die Induktion von spezifischen Mutation über den NHEJ-Reparatursignalweg präzisiert werden. Ein Grund für diese Weiterentwicklung ist, dass der NHEJ-Reparatursignalweg im Gegensatz zum unterrepräsentierten HDR-Reparatursignalweg in humanen Zellen während des gesamten Zellzyklus aktiv ist und damit als Hauptreparatursignalweg deutlich überwiegt (G1<S<G2/M). HDR ist lediglich in der S-Phase und in der G2-Phase vermehrt aktiv (Ford et al., 2019; Lieber et al., 2010). Die durch die fehleranfällige NHEJ-Reparatur assoziierten kleineren Indel-Bildungen stellen gegenüber den gravierenden Reparaturfehlern in Form von massiv abweichenden Rekombinationsereignissen durch die Verwendung einer inkorrekten Matrize im HDR-Reparatursignalweg ein für den Organismus wesentlich weniger schädliches Ereignis dar. In Organismen könnte dies zu einem guten Schutz vor letalen genomischen Umlagerungen führen (Mao et al., 2008).

Weitere Limitierungen bei der Induktion von spezifischen Mutationen in Zelllinien sind vielfältig. Wesentlich ist dabei die Funktionalität der Reparatur-Signalwege, die im Falle eines defekten oder eingeschränkten NHEJ- oder HDR-Signalwegs die Integration von Mutationen unmöglich machen. Die DNA-Reparaturwege können in der jeweiligen zu editieren Zelllinie unterschiedlich effektiv funktionieren, sodass die Produktivität einer CRISPR CAS9 vermittelten Gen-Editierung stark divergieren kann. Für die als Zellkulturmodelle verwendeten Zelllinien HCC827 und Wi38 ist kein defektives Reparatursystem bekannt. Weitere Punkte stellen die Kopienzahl des Zielgens, die Klonierbarkeit, ineffiziente Primer beim PCR-Screening durch zu GC-reiche Sequenzen in der Zielregion als auch das Auftreten von homologen Zielsequenzen dar, die die Effektivität von

CRISPR CAS9 massiv beeinträchtigen können. Elementar ist dabei die effektive Zell-Selektion kurz nach der erfolgten Transfektion. Da es sich hierbei um transiente Transfektionen handelt, muss die Selektion innerhalb eines zeitlich gut abgestimmten Zeitfensters maximal 48 h nach der Transfektion erfolgen. Die Selektion der positiv transfizierten Zellen erfolgte dabei mit dem Antibiotikum Puromycin. Im Verlauf der Doktorarbeit wurde von Addgene bekannt gegeben, dass das bei den Experimenten verwendete pSpCas9(BB)-2A-Puro Plasmid (Plasmid # 48139; Addgene) eine Punktmutation im Resistenz-Gen aufwies und vom Markt genommen wurde. Mittlerweile ist eine neue Version des Plasmids verfügbar (pSpCas9(BB)-2A-Puro, Plasmid# 62988), bei dem die Punktmutation korrigiert wurde und damit eine verbesserte Selektion durchführbar ist. Andere verbreitete Formen der Zellseparation sind z.B. die Zellsortierung mit einem fluoreszenzaktivierten Zellsortierer (FACS). Bei der Verwendung von fluoreszierenden Plasmiden wie pSpCas9(BB)-2A-GFP werden positiv transfizierte Zellen im FACS erkannt, sortiert und in 96 *Well*-Zellkulturplatten separiert. In der Praxis zeigte sich allerdings in Pilot-Experimenten, dass die verwendeten HCC827- und Wi38-Zellen kurz nach der FACS-Sortierung abstarben, wodurch diese Methode bei der Etablierung von stabilen Zelllinien nicht weiterverfolgt wurde.

Ein weiteres potentielles Problem stellt die teilweise oder vollständig erfolgende Integration der Plasmid-DNA an mehreren Bereichen des Genoms dar. Bei der Verwendung von Plasmiden kann eine Limitierung durch die zufällige Integration im Zielgenom durch den Vorgang einer ungewollten stabilen Transfektion nicht ausgeschlossen werden. Diese Insertionen von Plasmid-Derivaten treten überwiegend in den Zielregionen auf, werden aber auch gehäuft in *Off-Target*-Regionen festgestellt (Kim et al., 2014). Erstere können durch die Sequenzierungen der Zielregionen effektiv und schnell nachgewiesen werden. Letztere sind komplizierter zu ermitteln und ziehen damit einhergehend mehrere Probleme mit sich wie z.B. durch eine Integration verursachte Immunreaktion oder auch die Inaktivierung von Genen mit weitreichenden negativen Folgen. Eine Möglichkeit, um einen endgültigen Aufschluss auf eine potentiell zufällige Integration der Plasmid-DNA in den etablierten *BRD4* und *KMT2D*-Zelllinien zu erhalten, wäre die kostenintensivere Variante der Sequenzierung des gesamten Genoms. Da die Effizienz als auch die Bandbreite der zu induzierenden Mutation sehr stark von der zu manipulierenden Zielsequenz abhängt, könnte mit Hilfe von TIDE (*Tracking of Indels by Decomposition*) nach der Zell-Selektion eine genaue Charakterisierung als auch die Quantifizierung der angestrebten Mutation in einer Zellpopulation durchgeführt werden (Brinkmann et al., 2014). In TIDE werden Sanger-Sequenzierungen der CRISPR CAS9 editierten Zellen mit der Wildtyp-Sequenz unter Angabe der

verwendeten Nuklease und der sgRNA-Sequenz abgeglichen und die Anteile der aberranten Nukleotid-Signale ermittelt. Dadurch ist es möglich in einer Zellpopulation vor dem eigentlichen Screeningverfahren potentiell positive Klone und deren Häufigkeit festzustellen, was im Falle eines negativen Befunds zeitintensive Arbeitsschritte vermeiden würde. Auch beim Screening ist die Effizienz stark von der gewählten Analysemethode abhängig. Die Selektion positiver Klone erfolgte für die CRISPR CAS9 editierten *KMT2D*- und *BRD4*- Klone in PCR-Analysen. Weitere sehr populäre Methoden, die zur Ermittlung von CRISPR-Mutanten genutzt werden sind z.B. das T7-Endonuklease-Assay (T7E1) oder der auf dem gleichen Prinzip basierende Surveyor-Assay. Hierbei erfolgt eine sogenannte Heteroduplex-Formation einer Chimären-DNA, die zur Hälfte aus dem Wildtyp und der veränderten CRISPR-Mutante besteht. Die eingesetzte T7- oder Surveyor-Nuklease ist im Stande bis auf das Nukleotid genaue Unterschiede in den erzeugten Heteroduplexen zu erkennen und zu schneiden. Im Vergleich zur T7E1 ist die Surveyor-Nuklease wesentlich störungsempfindlicher bei der Anwendung mit Deletionsheteroduplex-Substraten und benötigt nach der PCR-Amplifikation einen zusätzlichen zeitaufwendigen DNA-Aufreinigungsschritt (Vouillot et al., 2015, Sentmanat et al., 2018). Eine andere ebenso robuste und zeiteffektive Methode zur Selektion von potentiell positiven Klonen stellt z.B. die Verwendung von Restriktionsenzymen dar. Bei größer induzierten Mutationen ändern sich durch die eingefügten Deletionen oder Insertionen die Restriktionsschnittstellen (Vincze et al., 2003). Beim Vergleich der Wildtypsequenz mit der erwarteten modifizierten Sequenz der Zielregion können somit die von der ursprünglichen DNA-Sequenz differierenden Restriktionsschnittstellen identifiziert werden. Ähnlich dem T7E1 oder Surveyor-Assay wird der zu untersuchende DNA-Abschnitt in der PCR vervielfältigt und im Anschluss mit dem Restriktionsenzym behandelt. Im Fall eines positiven Klons, ist dieser in der Analyse bei einer definierten Bandenhöhe identifizierbar, während negative Klone kein Signal in der PCR-erzeugen. Erweitert kann man dieses Restriktions-Assay ebenfalls dazu verwenden, um den Mutationsstatus der identifizierten Klone zu untersuchen.

Weitere Anwendungsformen von CRISPR sind z.B. das *Golden Gate*-Assay oder das sogenannte induzierbare CRISPR. Beim *Golden Gate*-Assay handelt es sich um ein spezifisches zweistufiges Klonierungssystem mit dem eine Multiplex-Anwendung der CRISPR CAS9 Editierung von mehreren Genen erfolgen kann. Im ersten Schritt werden die Oligonukleotide der jeweiligen sgRNA der entsprechenden Zielsequenz in unterschiedliche Expressionsplasmide kloniert. Anschließend werden diese nach der spezifischen Restriktion mit dem Enzym *BpiI* in den flankierenden Überhängen der einzelnen sgRNA-Expressions-Kassetten mit einander verbunden. Die so geordnet aneinander gereihten sgRNA-Konstrukte werden in ein Zielplasmid kloniert, das

die CAS9-Nuklease exprimiert (Sakuma et al., 2014; Kabadi et al., 2014). Mit diesen Verfahren können bis zu zehn verschiedene genomische Loci zur gleichen Zeit in einem Organismus editiert werden. Allerdings kann die Editiereffizienz von Gen zu Gen stark variieren, sodass Klone mit mehreren unterschiedlichen homo-oder heterozygoten Mutationsstatus entstehen können (Vad-Nielsen et al., 2016). Im Bereich der Erkrankungen, in denen mehr als ein Gen beteiligt ist, kann eine Multiplex-Anwendung von CRISPR sehr effizient genutzt werden. Da viele dieser Erkrankungen erst nach dem Erreichen der Adoleszenz in einem höheren Alter auftreten, verfolgt die induzierbare CRISPR-Applikation die Strategie, dass der CRISPR-Komplex gezielt zu einem definierten Zeitpunkt aktiviert wird, um spezifische Loci in einem seneszenten Organismus gezielt zu modifizieren. Die CAS9-Nuklease wird dabei in C- und N-terminale Fragmente gesplittet, die während der Entwicklung des Organismus in unterschiedlichen getrennten Kompartimenten verweilen wie z.B. dem Zellkern und dem Cytosol. Erst durch die Induktion von spezifischen Indikatoren wie Licht, der Anwendung von bestimmten Substanzen wie Rapamycin oder Tamoxifen und Temperaturänderungen wie durch Hitze erfolgt die Dimerisierung der Domänen, wobei der im Cytosol befindliche Teil in den Zellkern transportiert wird und die korrekte Zusammensetzung des CRISPR-Komplexes erfolgt. Anschließend wird die Zielregion durch den vervollständigten CRISPR-Komplex modifiziert (Polstein et al., 2015; Zetsche et al., 2015; Chen et al., 2015).

Der Erfolg einer CRISPR CAS9 spezifisch modifizierten Mutante als auch die Ausbeute von positiven Klonen hängen von mehreren wesentlichen Faktoren ab. Neuere Anwendungstechnologie für eine gezielte und verbesserte Verwendung von CRISPR als auch die Analyse potentieller *Off-Target*-Effekte sowie die Bestimmung positiver Mutanten in Analyseverfahren sind teilweise noch in der Entwicklung, um die Bandbreite der Applikationsmöglichkeiten weiterhin zu verbessern und auszubauen. Dabei ist einer der wichtigsten Faktoren zu einer nachhaltigen Bewertung die Spezifität des CRISPR-Komplexes, die im unmittelbaren Fokus der Forschung steht und entscheidend für eine zukünftige patientenorientierte therapeutische Anwendung sein wird.

4.2 Untersuchung zum Methylierungsprofil bei *KMT2D*- und *BRD4*-induzierten Mutationen

Nach der Induktion der definierten Mutationen in *KMT2D* konnten sowohl in der CRISPR-Mutante A76, die eine Deletion zwischen dem Exon 31 und 41 als auch bei der CRISPR-Mutante

B6, bei der die Deletion zwischen Exon 31 bis Exon 48 zu einer Leserasterverschiebung und zu einem Stop-Codon führt, eine deutlich herunterregulierte Expression in *KMT2D* festgestellt werden. Zusammen mit KMT2C und ASH2 und weiteren Untereinheiten bildet KMT2D den sogenannten COMPASS-ähnlichen Komplex (*complex of proteins associated with Set1*), der sich vom COMPASS-Komplex aus *Saccharomyces cerevisiae* ableitet (Shilatifard, 2012). Die Funktion dieses Komplexes gestaltet sich in Form der gezielten Regulation der Transkription durch Veränderungen in der H3K4- und durch die Untereinheit UTX auch in der H3K27-Methylierung. Während der Komplex die H3K4me1-Methylierung an aktiven *Enhancern* fördert, kann er ebenso die Methylierung an Promotoren aktiv transkribierter Gene verändern (Hu et al., 2013). Dazu zählen niedrig-transkribierte bivalent markierte Promotoren, die eine gleichermaßen repressive H3K27-Markierung aufwiesen (Bernstein et al., 2006). Ford et al. 2015 beschreibt eine signifikante Rolle von *KMT2C* und *-D* Mutationen in soliden Tumoren als auch anderen diversen Krebsarten wie z.B. NSCLC und SCLC (Yin et al., 2014; Ross et al., 2014; Rao et al., 2015). Des Weiteren stellt Rabello et al., 2018 eine starke positive Korrelation in der verminderten Expression von *KMT2D* und *KMT2C* in CML (chronische myeloische Leukämie) fest und legt dies einen gemeinsamen Regulationsmechanismus zu Grunde. Zudem stellt Rabello et al. Unterschiede in den H3K4me1-Methylierungsprofilen von *Enhancern* im Krebs-Transkriptom im Vergleich zu Normalgewebe fest. Studien in Prostata-Krebs legen die Rolle von *KMT2D* im Zusammenhang mit der Zellproliferation, Zellmigration und – Inversion nahe, da in PC-3 und DU145-Zellen nach einem Knock-down von *KMT2D* eine Suppression dieser Prozesse festgestellt werden konnte, wobei ein Verlust von *KMT2D* das Tumorstadium um 90 % reduzierte (Shidong et al., 2018). In mehreren Studien konnte in unterschiedlichen Zelllinien eine Herunterregulation von *KMT2D* mit einem reduzierten Zellwachstum und einer verminderten Zellmigration assoziiert werden (Issaeva et al., 2007; Guo et al., 2013). Ardeshir-Larijani et al., 2018 zeigen in ihrer Studie, dass *KMT2D* mit einer schlechten Prognose von NCSCL assoziiert ist. Dies wird auch in diversen anderen Krebsarten wie z.B. Brust- oder Prostata-Krebs beschrieben, wo der Mutationsstatus von Genen betrachtet wurde, die eine epigenetische Relevanz in der Kontrolle der Genregulation aufwiesen. So kann in dreifach negativen Brustkrebs-Tumoren, die durch einen Mangel des Östrogenrezeptors, Progesteronrezeptors und der HER2-Expression gekennzeichnet sind, ebenfalls eine niedrige Expression von *KMT2D* identifiziert werden, die mit einer schlechten Prognose einhergeht (Morcillo Garcia et al., 2018; Dent et al., 2007). Zudem zeigen chinesische Studien, dass 11% der NSCLC-Patienten eine Mutation in *KMT2D* aufweisen (Yin et al., 2014). Guo et al., 2013 verweisen auf die Komplexität von Funktionsverlusten in Form von Nonsense- oder Leseraster-Mutationen in *KMT2D* und auf eine mögliche onkogene Abhängigkeit der *KMT2D*-Aktivität aufgrund nicht existenter homozygoter Mutationen in Medulloblastomen. Des Weiteren schliessen Guo et al. aus

ihren Ergebnissen auf eine divers komplexe Auswirkung von *KMT2D* in normalen Zellen im Verhältnis zu den Beobachtungen in Krebszellen hinsichtlich ihrer Prädisposition und ihrer potentiellen Transformationsfähigkeit. *KMT2D* ist in der Nähe von *Enhancer*-Elementen lokalisiert und reguliert diese durch die H3K4-Mono-Methylierung, sodass deren Regulationsmechanismen in verschiedenen Krebsarten eine Rolle bei der zellspezifischen Genexpression spielen (Heyn et al., 2016; Lee et al., 2013). In diesem Zusammenhang zeigen Lovén et al., 2013 hinsichtlich einer *BRD4*-Hemmung und die damit einhergehende selektive Inhibierung von *MYC* im multiplen Myelom, dass dabei ebenfalls Super-*Enhancer* blockiert werden. Eine Inhibierung von *BRD4* durch die Behandlung mit dem BET-Inhibitor JQ1 führt dabei zu einer defekten Elongation der betrachteten *Enhancer*. Ein hohes Expressionsniveau von *BRD4* ist ebenfalls mit einer schlechten Prognose von NSCLC-Patienten verbunden (Liao et al., 2016). Dabei besteht eine Verbindung zwischen einer hohen *BRD4*-Expression in NSCLC-Geweben und –Zelllinien, die eine höhere Invasion und ein verstärktes Potential der Metastasierung aufweisen. Bei einer Suppression von *BRD4* erfolgt eine verminderte Zellinvasion und eine inhibierte Zellproliferation (Liao et al., 2016). Zudem wird in Lee et al., 2017 beschrieben, dass *BRD4* verstärkt an aktiven *Enhancern* und Promotoren vorzufinden ist, die wiederum ein durch *KMT2D* und *KMT2C* angereichertes H3K4me1-Level aufweisen. Dabei ist die Aktivität dieser H3K4-Methyltransferasen ebenfalls wichtig für die Bindung von *BRD4* an *Enhancern*. Eine Deletion von *BRD4* verhindert eine Anreicherung der Mediator- und RNA PolymeraseII-abhängigen Transkriptions-Maschinerie als auch die Zelldifferenzierung. Lee et al., 2017 knüpfen außerdem eine direkte Verbindung zur *KMT2C*- bzw. *KMT2D*-Aktivität und *BRD4*, die im Wesentlichen die Bindung an *Enhancern* beeinflussen kann.

Während der Untersuchungen zu Veränderungen der H3K4- als auch der H3K27- Methylierung wurde bei den *KMT2D*- und *BRD4*-Mutanten in den Western Blot Analysen eine differenzielle Histon-Gesamtmenge in der H3pan-Kontrolle identifiziert. Diese Divergenz spiegelt sich in den untersuchten CRISPR-Mutanten in der Proteinexpression der H3K4- und H3K27-Methylierung wider. Eine Begründung für diese auftretenden Unterschiede könnte die Studie von Karnavas et al., 2014 liefern, in dem die *KMT2D*- und *BRD4*-Mutanten-Zelllinien ähnlich wie embryonale Stammzellen (ESCs) ein unterschiedlich stark kondensiertes Chromatin aufweisen, wodurch der gesamte Histon-Gehalt sehr stark variieren kann. Des Weiteren zeigen die Untersuchungen von Karnavas et al., dass die H3-Histon-Transkripte während der Differenzierung der embryonalen Stammzellen stärker schwanken als die H3-Histon-Proteinmenge, womit die mRNA-Abundanz nicht die synthetisierte Proteinmenge widerspiegelt. Bis dato ist allerdings noch völlig unklar ob

der gesamte Histon-Gehalt in Abhängigkeit von unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Differenzierungskapazitäten gleichbleibt oder Veränderungen unterworfen ist. Ein anderer Punkt stellt die Möglichkeit dar, dass die beobachteten Unterschiede der gesamten Histon-Menge auf die durch CRISPR CAS9 verursachten DNA-Veränderungen basieren. Es konnte bereits in seneszenten Zellen gezeigt werden, dass eine anhaltende DNA-Schädigung auf eine verminderte Histon-Biosynthese zurückzuführen ist (O'Sullivan et al., 2010). Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die durch CRISPR CAS9 verursachten Mutationen zu einer unterschiedlichen Ausprägung der differentiellen Gesamthiston-Menge in den Klonen führt, die wiederum Veränderungen der H3K4- bzw. H3K27-Methylierungsebenen nach sich ziehen. Diese Feststellung unterstreichen Untersuchungen an *Drosophila melanogaster*, in denen die Einführung von einer definierten Anzahl transgener Histon-Gene in einer Histon-Null-Mutante das Defizit zum korrekten Zusammenbau des Chromatins und somit zur Koordinierung des Zellzyklusverlaufs nicht ausgleichen konnte (Günesdogan et al., 2014). Hödl et al., 2012 schlussfolgern aus ihren Ergebnissen, dass die funktionelle Diversifizierung des Chromatins hauptsächlich durch posttranslationale Modifikationen und den daran bindenden Proteinen (*Readern*) bestimmt wird. Hinsichtlich ihrer Beobachtungen zu H3K4me3 stellen Hödl et al. fest, dass neu eingebaute Histon-Proteine unabhängig von ihrer Identität anhand des lokalen genomischen Kontextes modifiziert werden. In wie fern ebenfalls eine funktionale Redundanz in humanen Zellen besteht, muss noch in weiterführenden Analysen geprüft werden.

Viele molekulare Ereignisse unterliegen der Reaktion auf äußere Veränderungen der unmittelbaren Umwelt wie z.B. in Stresssituationen. Es stellte sich heraus, dass viele dieser Faktoren die transkriptionale Genregulation beeinflussen wie z.B. nach der Reaktion auf einen Hitzeschock, der zu Fehlern bei der Faltung von Proteinen und somit zu krankheitsauslösenden Proteinexpressionen führen kann (Qu et al., 2018). Nadal et al., 2011 beschreiben, dass ein Hitzeschock zu einem Stillstand des Zellzyklus führen kann, der von der Stärke der zugeführten Hitze als auch deren Dauer abhängt und Anhäufungen der dabei entstehenden Defekte zu einer Reduktion der Zellviabilität führen können und damit das Zellwachstum beeinträchtigen. Diese Feststellung konnte in dieser Arbeit auch durch die Untersuchung in Zellviabilitäts-Assays nach einem 2 h Hitzeschock beobachtet werden. Selbst nach einer Regerationszeit von 72 h ist die Zellviabilität der Hitzeschock-behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollgruppen signifikant reduziert. Dabei ist die Regenerationsfähigkeit der *KMT2D*-Mutante A76 deutlich schneller, was sich im Vergleich zur HCC827-Kontrollgruppe durch eine signifikant höhere Zellviabilität äußert. Diese steht in Kontrast zur anderen *KMT2D*-Mutante B6 deren Regeneration

signifikant gegenüber der Parental-Zelllinie reduziert ist und damit eine wesentlich längere Regenerationszeit benötigt, um die beigegeführten Defekte durch einen Hitzeschock wieder auszugleichen. In genetischen Analysen im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae*, in dem die Reste von Histon-Kern-Domänen hoch konserviert sind, wurde bei der Veränderung von multiplen H3- und H4-Histone-Resten gezeigt, dass Modifikationen gestört und somit die Zellen sensitiver gegenüber unterschiedlichen zellulären Stress reagieren (Huang et al., 2009). Dies weist daraufhin, dass mehrere Chromatin-modifizierende Komplexe bzw. Histonmodifikationen elementar bei der Stressinduktion sein können. Nadal et al., 2011 führt diese mit dem Hitzestress einhergehenden Wachstumsdefizite auf die Aktivierung Zellzyklus spezifischer Kontrollpunkte zurück, bei der zur Protektion Energie von anderen zellulären Prozessen in die Stressantwort umgeleitet wird. Zusammen mit der Feststellung, dass der Zellzyklus durch einen Hitzeschock stagniert, könnte dies eine Erklärung für die Beobachtung einer Angleichung der Methylierungsniveaus in den *KMT2D*-Mutanten an das H3K4- als auch H3K27- Niveau der Parental-Zelllinie nach einer Hitzestressinduktion in den Western Blot Analysen liefern. Dabei erfolgt nach einem Hitzeschock eine Angleichung in den Methylierungsniveaus, die sich vor allem auch in einer völlig equilibrierten Gesamthiston-Menge in der H3pan-Kontrolle zeigt. Um demzufolge einen Zellzyklus-Effekt in den nicht mit Hitze-behandelten Zellen auszuschließen, sollten weiterführende Experimente unter zusätzlicher Betrachtung der Zellzyklus-Aktivität einen näheren Aufschluss liefern. Allerdings zeigen Studien in denen die H3K4-Methyltransferase *KMT2A* herunterreguliert wurde, eine supprimierte Proliferation von Hela-Zellen in Verbindung mit einer reduzierten Cyclin b-Expression. Diese wiederum führt zu einem induzierten Zellzyklus-Arrest in der G2/M Phase (Ansari et al., 2013). Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen Chen et al., 2015 in ihren Untersuchungen an der H3K4-Methyltransferase *WDR5*, die die Proliferation in Blasenkrebszellen durch die Regulierung des Zellzyklus beeinflusst. Durch eine Herunterregulation von *WDR5* wird dabei ein Zellzyklus-Arrest in der G0/G1 Phase verursacht. Diese Daten legen nahe, dass ein ähnlicher Effekt im Zellzyklus durch die Deletion von *KMT2D* bzw. *BRD4* hervorgerufen werden könnte. Dahingehend konnte basierend auf Micro-Array und Gen-Set Anreicherungsanalysen eine Herunterregulation von Zell-Zyklus involvierten Genen bei einer Reduktion von *KMT2D* und *KMT2C* nachgewiesen werden (Dawkins et al., 2016).

Es ist bekannt, dass Veränderungen der Histonmodifikation in einem engen Zusammenhang mit der Entwicklung von Tumoren steht wie beispielsweise die Deregulierung von Histon-Methyltransferasen, die beim Auftreten und der Entwicklung von Tumoren eine wesentliche Rolle spielen (Morera et al., 2016). So zeigen Natarajan et al., 2010, dass eine Überexpression von

KMT2D in Verbindung mit einer Tumorgenese in Brust- und Darmkrebs gebracht werden kann. Betrachtet man andere H3K4-aktive Methyltransferasen wie KMT2A, -C, ASH2 und SMYD3 als auch die Demethylase LSD1 eingehender in Zusammenhang einer KMT2D-Repression, so wird deutlich, dass insbesondere bei der funktionell redundanten H3K4-Methyltransferase KMT2C eine synergistisch signifikante Verminderung in der Expression in den *KMT2D*-Mutanten erfolgt. Diese ist ebenso in der H3K4me₂/me₃-Methyltransferase SMYD3 festzustellen, die in diversen Krebsarten wie Darmkrebs, Brustkrebs, Prostata- oder Bauchspeicheldrüsenkrebs in einer stark exprimierten Form vorliegt (Hamamoto et al., 2004 und 2006). Des Weiteren wird berichtet, dass eine *SMYD3*-bedingte Methylierung die Zellproliferation sowie die Metastasierung vorantreibt und den Zellzyklus negativ beeinflusst (Kunizaki et al., 2007; Tsai et al., 2016). Chen et al., 2017 stellt bei einer Herunterregulation von SMYD3 eine Beeinträchtigung der Expression von HDR-assoziierten Genen und insgesamt eine beeinträchtigte HDR-vermittelte DBS-Reparatur fest. Außerdem verursacht ein Mangel an SMYD3 eine genomische Instabilität. Im Gegensatz zu den H3K4-methylierenden Genen führt die KMT2D-Repression bei LSD1 zu einer entgegenregulierten erhöhten Expression in den *KMT2D*-Mutanten. LSD1 reichert damit durch die gesteigerte Demethylierung von H3K4me₂ das H3K4me₁-Niveau an. Ein höheres LSD1-Expressionslevel ist in mehreren soliden Tumoren wie NSCLC, Darm- und Brustkrebs identifiziert worden und ist in Nierenkrebs und Mantelzell-Lymphomen mit einer schlechten Prognose der Patienten assoziiert (Zhu et al., 2018; Zou et al., 2017; Lim et al., 2010; Hayami et al., 2010). Des Weiteren zeigen mehrere Studien, dass die Inhibierung von *LSD1* eine vielversprechende Strategie in verschiedenen Krebstherapien darstellt (Jin et al., 2015). So dokumentieren Kong et al., 2016, dass eine Herunterregulation von *LSD1* die Zellproliferation und die Migration in NSCLC unterdrückt.

Betrachtet man die Auswirkung einer *KMT2D*-Repression in Bezug auf H3K27me₃, zeigt sich eine stark verminderte Expression der H3K27me₃ Demethylase UTX. Beobachtet man dahingegen die Folgen einer *BRD4*-Deletion erfolgt eine verminderte Expression der Methyltransferase EZH2. In den Fokus der Forschung gelangte *UTX* im Rahmen von Untersuchungen am Kabuki-Syndrom, einer monogenetischen Erkrankung, in der neben *KMT2D* in *UTX* eine Ansammlung von Mutationen und damit einhergehende synergistische Funktionsdefekte beobachtet werden konnten (van der Meulen et al., 2014; Miyake et al., 2013). Zudem weisen Zellen mit einer verminderten *UTX*-Expression als auch Zellen mit einem *KMT2D*-Defizit ähnliche Effekte im Proliferations- und Inversionsverhalten auf. So kann in Brustkrebs für beide Gene eine kooperativ regulierende Genexpression in der Zellinvasion und Proliferation festgestellt werden, wobei hohe

Expressionslevel beider Gene mit einer schlechten Prognose in Brustkrebs einhergehen (Kim et al., 2014). Trotz der konträren Funktionsweise der H3K27me2/3 Methyltransferase *EZH2* und der Demethylase *UTX* ist in den *KMT2D*-Mutanten in beiden Genen eine signifikante Expressionsverminderung festzustellen. Ähnliche Beobachtungen macht Jankowska et al., 2011 in einer Studie über chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML), in der in beiden Genen ein Funktionsverlust ermittelt werden konnte. Diese Ergebnisse unterstreichen den Stellenwert einer funktionierenden Chromatinregulation, die ein häufig wiederkehrendes Mutationsziel in verschiedenen Krebsarten darstellt. Des Weiteren beschreibt Makishima et al., 2010, dass Mutationen in diesen Genen eine neue Klasse molekularer Läsionen darstellen, die einen epigenetisch instabilen Phänotyp vermitteln. Beide Gene sind an der Regulation des Methylierungsstatus des Histons H3, insbesondere von H3K27me3, beteiligt. Auch Hock (2012) erläutert, dass es zu klären bleibt, warum Funktionsverluste in beiden Genen trotz ihrer gegensätzlichen Funktion zu einer malignen Pathogenese führen, zumal die Zielgene in diesem Zusammenhang von beiden völlig unterschiedlich sind. Interessanterweise beschreibt Ezponda et al., 2017 in seinem Paper eine Studie über Multiple Myelom-Zellen, in denen *UTX* mit CRISPR CAS9 zerstört wurde und in diesen Zellen daraufhin eine höhere Sensitivität gegenüber einer *EZH2*-Inhibierung bei einer Dosis-abhängigen GSK126 Applikation im Vergleich zu Kontroll-Zellen festzustellen war.

Wu et al. 2018 zeigt ein vermindertes Wachstumsverhalten durch die Anwendung des *EZH2*-Inhibitors JQEZ5 in *UTX*-defizienten-Lungentumormodellen. JQEZ5 wird in der Regel bei Lungentumoren im Mausmodell mit einer erhöhten *EZH2*-Expression verwendet und fördert dessen Rückbildung (Zhang et al., 2016). Neben den beschriebenen Defekten des Zellproliferationsverhaltens, die durch Verminderung in der Expression in *KMT2D* und *UTX* hervorgerufen werden, wird ebenso eine Inhibition von *EZH2* in Zusammenhang mit einer Beeinträchtigung der Zellproliferation und –Invasion gebracht (Zingg et al., 2015). In Tumoren wurde die Funktion von *EZH2* bereits mit dem Proliferationsverhalten und dem Tumorwachstum assoziiert, sodass die Inhibition von *EZH2* eine vielversprechende Anwendung in der Therapie von Tumoren darstellt. So konnte Kikuchi et al., 2012 mit einer Anwendung des *EZH2*-Inhibitors DZNep (3-Deazaneplanocin A) eine zelluläre Verminderung des *EZH2*-Levels und eine damit verbundene inhibierte H3K27me3-Methylierung nachweisen, die zu einer Verlangsamung des Zellwachstums in NSCLC-Zelllinien führte. *EZH2* ist häufig in NSCLC überexprimiert und ebenfalls mit einer schlechten Prognose verbunden (Huqun et al., 2011; Kikuchi et al., 2010). Die Wirkung von DZNep konnte zuvor auch in Studien bei anderen Tumorarten wie Prostata-,

Brustkrebs oder akuter myeloische Leukämie (AML) festgestellt werden (Yang et al., 2013; Crea et al., 2011; Hayden et al., 2011; Fiscus et al., 2009). Außerdem verdeutlichen Serresi et al. 2018, dass durch die Inhibierung von *EZH2* mit dem Histon-Methyltransferase-Blocker GSK126 NSCLC-Tumore sensitiver auf eine Behandlung mit Nimesulid und Bortezomib ansprechen und was die definierte Rolle einer *EZH2*-Inhibierung bei der Zellproliferation unterstreicht.

Zusammenfassend führen die Ergebnisse aus verschiedenen Studien zu dem Schluss, dass eine Herunterregulation von *KMT2D*, *UTX* als auch *EZH2* zu einer Verminderung des Zellwachstums führt. Dies könnte die Ursache des deutlich reduzierten Proliferationsverhaltens in den *KMT2D*-Mutanten begründen, insbesondere da in den Zelllinien mit Deletionen in *KMT2D* eine Korrelation zwischen der Repression von *KMT2D*, *EZH2* und *UTX* und einer Wachstumsminde rung festgestellt werden konnte.

4.3 Expression U2 snRNP-assoziierter Gene wird durch eine aberrante *KMT2D*- Funktion beeinflusst

Die ChIP-Seq basierten Analysen der H3K4me3-Methylierung der Parental-Zelllinien HCC827 und Wi38 dienten zur Identifikation spezifisch angereicherter Signalwege. Diese wurden wiederum als Grundlage für weiterführende Experimente genutzt, um potentielle Veränderung in den generierten Mutanten-Zelllinien im Vergleich zu den Parental-Zelllinien zu determinieren. Vor allem in den GO-und Signalweg-Analysen konnte eine starke Anreicherung in Spleiß-und RNA-metabolisch relevanter Prozesse festgestellt werden. Außerdem erfolgte in NESTs-basierten Analysen die Identifizierung funktionaler Interaktionen zwischen methylierungsspezifisch epigenetischen H3K4-Regulatorgenen und Genen der U2 snRNP assoziierten SF3-Subklassen. Bernstein et al., 2005 stellen in ihren Untersuchungen fest, dass Gene mit einer Tri-Methylierung an ihren 5'Ende signifikant aktiver sind. Eine andere Studie identifiziert ChIP-Seq *Peaks* am Ende des ersten Exons an der Stelle der 5'Spleißseite (Bieberstein et al., 2012). Die H3K4me3-Methylierung wird als „aktivierende Markierung“ von bestimmten Promotoren wie z.B. CHD1, BPTF oder JMJD2A wahrgenommen, die wiederum als Brückenproteine zur Rekrutierung von spliceosomalen Genen dienen. Sims et al., 2005 indiziert, dass das ATP-abhängige CHD1 direkt und selektiv Methylierungen an H3 erkennt und über seine Tandem-Chromodomänen an H3K4 bindet. In einer weiterführenden Studie charakterisiert Sims, dass CHD1 an Prozessen wie der mRNA-Reifung oder der Prä-mRNA-Prozessierung maßgeblich beteiligt ist, in dem es mit Genen des Multi-Untereinheit Komplexes SF3A interagiert und es mit H3K4me3 verknüpft (Sim et al.,

2007). Des Weiteren zeigt Sims, dass ein Verlust von CHD1 zu einer massiven Reduktion der Spleißeffizienz führt und diese ebenfalls in Zusammenhang mit einer Reduktion des H3K4me3-Levels gebracht werden können. Seine Ergebnisse demonstrieren zudem eine reduziertere Assoziation von U2 snRNP-Genen an Chromatin und münden in Veränderungen beim effektiven prä-mRNA-Spleißen, womit die Rolle von H3K4me3 im Zusammenhang mit einer Regulation im Spleißprozess verdeutlicht wird. Die Ergebnisse der RNA-Expressionsanalysen der U2 snRNP assoziierten Genen in den *KMT2D*-Mutanten legen nahe, dass Deletionen in *KMT2D* zu einer Veränderung der Genexpression am Spleißprozess beteiligter Gene führen. Die U2 snRNP-Untereinheit bildet zusammen mit U1 snurp das Prä-Spliceosom (Komplex A), das für die Einleitung des gesamten Spleißprozesses verantwortlich ist (Will et al., 2011). Die Daten indizieren zudem, dass *KMT2D*-Mutationen die Genexpression des Brückenproteins CHD1 beeinflussen. Luco et al., 2010 zeigt beim Alternativen Spleißen, dass epigenetische Histonmodifikationen die Spleißeffektivität bei der Rekrutierung von Spleißregulatoren durch Chromatin-bindende Proteine modulieren. Zu diesem Schluss kommen auch Davie et al., 2015 in ihrer Studie, bei der sich die Abschwächung des H3K4me3-Niveaus auf das prä-mRNA-Spleißen auswirkt und vice versa eine Minderung des prä-mRNA-Spleißen die H3K4me3-Methylierung dämpft. Weiterführende Experimente mit *KMT2D*-insuffizienten Zellen werden dahingehend einen klaren Aufschluss liefern.

Mahat et al., 2016 und 2017 belegen in ihren Studien, dass die zellulären Mechanismen nach einem Hitzeschock einer genomweiten Regulation in der Transkription unterworfen sind. Die Studien legen dabei keine einheitliche Reaktion in der Genexpression dar, sondern zeigen Induktionen von Genen, die an der Translation sowie der RNA-Prozessierung beteiligt sind. Gleichzeitig erfolgt eine Repression der Transkription von 55 % der aktiven Gene. In GO-Analysen konnten herunterregulierte Gene identifiziert werden, die bei Metabolismusprozessen, der Mitose oder dem Zellzyklus beteiligt sind. Mahat et al. 2017 indizieren daraus, dass diese Gene unmittelbar nach einem Hitzeschock ausgeschaltet werden, um so Ressourcen in Prozessen wie dem mRNA-Spleißen, der mRNA-Prozessierung oder Transportprozessen aus dem Zellkern zu ermöglichen. Diese wurden in den Analysen im Vergleich zu anderen Signalwegen erst wesentlich später reprimiert. Durch diese gestaffelte Anpassung der Genexpression wird es ermöglicht einer Hitzebedingten Schädigung entgegen zu wirken (de Nadal et al., 2011). Des Weiteren impliziert Mahat et al. die Repression der Transkription nach einem Hitzeschock als einen hoch komplexen regulativen pervasiven Prozess, bei dem 10 % und damit eine Minderheit der aktiven Gene hochreguliert werden. Interessanterweise werden die Expressionsunterschiede von U2 snRNP-

assoziierten Genen nach der Induktion eines Hitzestresses in der *KMT2D*-Mutante A76 zusätzlich reprimiert. Trotz der starken Hochregulation der H3K4-Methyltransferasen *KMT2C* und *KMT2A* werden die Expressionsdefizite in Relation zum Expressionsniveau der Parental-Zelllinie in den untersuchten Spleiß-Faktoren nicht ausgeglichen. Bei der *KMT2D*-Mutante B6 erfolgt bei einigen Genen ein tendenzieller Angleichungseffekt an das Expressionsniveau der Parental-Zelllinie, der durch die Hochregulation der H3K4-Methyltransferasen *ASH2* und *SMYD3* begründet werden kann. Ein divergenter Effekt kann in der Expression der *BRD4*-Mutanten erkannt werden, die sich nach einem Hitzeschock ausprägen. Trotz der gleichen Deletion von *BRD4* in beiden Mutanten kann in der *BRD4*-Mutante E87 ein Anstieg der *KMT2D*-Expression und der gesamten untersuchten Spleiß-Faktoren nach der Hitzeinduktion beobachtet werden. Bei der *BRD4*-Mutante E114 ist in der RNA-Expressionsanalyse eine Reduktion der *KMT2D*-Expression und der U2 snRNP -assoziierten Gene zu beobachten. Die Divergenz der beiden *BRD4*-Mutanten nach einem Hitzeschock könnte auf einen möglichen *Off-Target*-Effekt in einem der beiden Mutanten hinweisen. Der Einfluss auf die Genexpression der untersuchten U2 snRNP -assoziierten Gene scheint dabei von Unterschieden in der *KMT2D*-Expression in den *BRD4*-Mutanten abhängig zu sein. In Genanalysen wurde ermittelt, dass durch Mutationen in den Histon-Resten und den damit verbundenen Modifikationsdefekten in Zellen eine höhere Anfälligkeit gegenüber unterschiedlichen zellulären Stress erfolgt (Huang et al., 2009). Dies legt den Einfluss von Chromatin-modifizierenden Komplexen als auch den Stellenwert von histonmodifizierenden Genen bei einer Stressbelastung nahe. Dies spiegelt sich auch in der Stress-bedingten Modulation der mRNA-Stabilität wider, indem durch separierte Regulationsmechanismen selektiv mRNAs stabilisiert oder abgebaut werden, abhängig von der Phase der Stressreaktion (de Nadal et al, 2011). Allerdings fehlt derzeit ein detailliertes Verständnis, das den tiefgreifenden funktionalen Mechanismus der methylierungsbedingten Chromatinmodifikation durch *KMT2D* und einer spliceosomalen Verbindung bei einem Hitzestress in Beziehung setzt. Ein Grund könnte dabei in der Anzahl der variablen Faktoren liegen, die mit der Aktivität von Genen bei einer Stressantwort in Zusammenhang stehen wie z.B. die koordinierte Regulation der Expression und die damit verbundene Feinabstimmung der Expressionsniveaus einzelner Gene, denen in Regulationsprozessen in mehreren Schritten des mRNA-Spleißens und darüber hinaus dem gesamten RNA-Metabolismus eine gewichtige Bedeutung zukommt.

4.4 Aberrante KMT2D-Expressionen führen teilweise zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Cetuximab und Erlotinib

In den Analysen der ChIP-Seq Daten zur Bestimmung der differentiellen Methylierung von H3K4me3 zwischen den Adenokarzinom-Zelllinien HCC827 und A549 wurde eine Anreicherung in EGFR relevanten Reaktionsprozessen wie z.B. EGFR1 (p-Wert: 4,190E-15) und der EGF-EGFR-Signalweg (p-Wert: 9,990E-09) identifiziert. Dieses Ergebnis ergibt sich ebenfalls aus der GREAT-Analyse der GO molekularen Funktion, bei der die EGFR-aktivierte Rezeptoraktivität (p-Wert: 7,4481E-266) stark angereichert ist. In zahlreichen Studien wird über die letzten Jahre hinweg gehäuft über die Überexpression von diversen Mutationen und eine damit verbundene erhöhte Aktivität von EGFR berichtet (Selvaggi et al., 2004; Hirsch et al., 2003). In NSCLC ist *EGFR* eines der am häufigsten mutierten Gene, das oft im Fokus vieler Therapieanwendungen steht, da es die Zellproliferation reguliert und damit wesentlich zum Überleben von Krebszellen beiträgt (Dearden et al., 2013; Smits et al., 2012; Imielinski et al. 2012; Troiani et al., 2016; Wee et al., 2017). In verschiedenen Krebsarten kann die deregulierende Aktivität des EGFR-Signalwegs mit der Tumorentwicklung, Progression, Metastasierung oder einer Resistenzentwicklung in Verbindung gebracht werden (Dienstmann et al., 2012; Hopper-Borge et al., 2009; Hrustanovis et al., 2013; Campoli et al., 2010). Die Überlebensrate der Patienten hängt dabei häufig vom *EGFR*-Mutationsstatus ab und ist insgesamt mit einer geringen Überlebensrate assoziiert (Lynch et al., 2004; Nicholson et al., 2001). Deregulierende Auswirkungen zeichnen sich durch eine erhöhte EGFR-Stimulierung bedingt durch Ligandenbindung, detektierte Punktmutationen im Rezeptor und Deletionsmutationen in *EGFR* aus (Gazdar et al., 2009; Tezel et al., 2017; Purba et al., 2017). Eine der soweit am besten charakterisierten Mutationen in *EGFR* ist eine Deletion in Exon 19, die das konservierte LREA-Motiv entfernt. Eine weitere gut bekannte Mutation ist eine in Exon 21 befindliche Substitution. Beide Mutationen machen insgesamt 80-90 % aller *EGFR*-Mutationen in NSCLC aus und sind maßgeblich an der Onkogenese beteiligt (Russo et al., 2015). Zur Blockierung von EGFR werden zwei unterschiedliche Hauptklassen verwendet: Tyrosinkinase-Inhibitoren, die die intrazelluläre Tyrosinkinsae-Domäne des EGFR-Rezeptors binden wie z.B. Gefitinib, Erlotinib oder Afatinib, oder es kommt zur Anwendung von Antikörpern gegen EGFR wie z.B. mit Cetuximab, Panitumumab und Necitumumab (Takeda et al., 2015; Russo et al., 2015). Bei der Anwendung von Cetuximab erfolgt die Inhibierung durch die Bindung an die extrazelluläre Domäne, wodurch die EGFR-Dimerisierung verhindert und die EGFR-Degradation einleitet wird (Li et al., 2005). Die Affinität von Cetuximab ist dabei 10fach höher als die des EGFR-Liganden (Mazzarella et al., 2017). Des Weiteren erfolgt die Inhibierung von Signalwegen wie dem Zellzyklus,

dem Zellwachstum als auch die Angiogenese, was zur Apoptose der Zellen führt und das Tumorwachstum stoppt (Kurai et al., 2007; Liang et al. 2018). Ein weiterer Punkt, der bei der Progression von Krebs zunehmend eine Rolle spielt, sind epigenetische Dysfunktionen der Histon-Methylierung. Hierbei kann für die Inhibierung von Methylytransferasen wie *DOT1L* und Demethylasen wie *EZH2* und *LSD1* eine Antitumoraktivität in Lungenkrebs nachgewiesen werden (Kim et al., 2012; Xu et al., 2014; Zhang et al., 2013; Xia et al., 2014; Hayami et al., 2011). Durch WES (*whole-exome sequencing*) konnten Yin et al., 2014 *KMT2D* als das häufigste mutierte Gen in einer chinesischen NSCLC-Kohorte identifizieren. Yin et al. beobachteten bei der Validierung der somatischen Mutationen, eine hohe Anzahl von Nonsense-Mutationen, die zu einem vorzeitigen Strangabbruch und einem Verlust der SET-Domäne führen und zeigen eine signifikant reduzierte Expression sowie einen Gesamtverlust der *KMT2D*-Expression. Dabei weisen Patienten mit einer *KMT2D*-Mutation eine schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patienten mit einem normalen *KMT2D*-Status auf. Ein Zusammenhang von *KMT2D*-Mutationen und einer geringen Überlebenswahrscheinlichkeit in NSCLC wird ebenfalls von Ardeshir-Larijani et al., 2018 erbracht. Dabei zeigt die Studie einen Unterschied zu SCLC auf, in dem *KMT2D*-Mutationen keinen Effekt auf das Überleben haben, obwohl in SCLC mehr Mutationen in *KMT2D* (32,8 %) detektiert werden als in NSCLC (17,5 %). Die in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse der Zellviabilität deuten darauf hin, dass eine Verkürzung des *KMT2D*-Proteins in Zellen mit einer EGFR-positiven Mutation eine Sensitivierung gegenüber Cetuximab bewirkt. Die Auswirkungen einer Cetuximab-Behandlung führen in der *KMT2D*-Mutante A76 zu einer um 50 % gesteigerten Sensitivität gegenüber der Parental-Zelllinie HCC827 bei einer geringen Cetuximab-Dosis von 1 μ M. Die andere *KMT2D*-Mutante B6 zeigt eine unveränderte Zellviabilität nach einer Behandlung mit Cetuximab und reagiert im gleichen Maße resistent wie die Parental-Zelllinie. Mukohara et al., 2005 beschreiben in ihrer Studie zum Apoptoseverhalten von *EGFR*-mutierten und *EGFR*-Wildtyp Zelllinien nach der Applikation von Cetuximab und Gefitinib eine Inhibierung des Zellwachstums bei HCC827-Zellen, wobei der Effekt bei der Anwendung von Gefitinib signifikant stärker ausgeprägt ist als bei Cetuximab. Daraus schlussfolgern Mukohara et al., dass *EGFR*-Mutationen mit einer Gefitinib-Sensitivität in NSCLC verbunden sind, dies aber nicht mit Cetuximab assoziiert werden kann. Bei den Untersuchungen zur Zellviabilität in dieser Arbeit, konnte in der Parental-Zelllinie HCC827 keine ausgeprägte Inhibierung gegenüber Cetuximab festgestellt werden. Über die GDSC-Datenbank verfügbare Daten über die Parental-Zelllinie HCC827 indizieren keinen signifikanten Unterschied nach einer Behandlung mit Cetuximab (*Z-Score*=0.56), wodurch HCC827-Zellen insgesamt als resistent kategorisiert werden. Bei der Herunterregulation der EGFR-Proteinexpression durch eine EGFR-spezifische siRNA wurde in fünf getesteten NSCLC-Zelllinien das Wachstum inhibiert (Chen et al., 2012). Im Vergleich zu den

anderen Zelllinien zeigte die Zelllinie HCC827 gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren eine 10fach höhere Sensitivität, während bei der Anwendung von Cetuximab keine relevante *in vitro* Aktivität festgestellt werden konnte. Aus diesem Grund werden HCC827 wie die anderen Zelllinien in der Studie von Chen et al., 2012 als relativ resistent betrachtet. Keine der untersuchten Zelllinien zeigt eine Empfindlichkeit gegenüber Cetuximab unter 10 %. Bei einer zusätzlichen EGFR-siRNA-Herunterregulation kann unabhängig vom EGFR-Mutationsstatus der untersuchten Zelllinien ein verstärkter Effekt in der Induktion der Apoptose oder einer Wachstumshemmung ermittelt werden. Chen et al. führen dies auf eine Abwesenheit der onkogenen Signifikanz des Rezeptors bzw. einer Unempfindlichkeit des mutierten Rezeptors gegenüber einer Inhibierung durch einen monoklonalen Antikörper zurück. Aktivierende Mutationen bewirken zwar eine Überempfindlichkeit gegenüber Tyrosinkinase-Inhibitoren, führen aber nicht zwangsläufig zu einer erhöhten Sensitivität bei der Anwendung von monoklonalen Antikörpern wie Cetuximab. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch Rice et al., 2011, die in vier NSCLC-Zelllinien, darunter HCC827, die Sensitivität gegenüber Cetuximab untersuchen. Die Cetuximab-Sensitivität war dabei ebenfalls unabhängig vom EGFR-Mutationsstatus der Zelllinien, wobei HCC827 in der Studie intermediär auf Cetuximab reagierte.

In den in dieser Arbeit gezeigten Western Blot Analysen kann auf Grund der differenziellen Histon-Mengen, die sich in der H3K4me1 – und H3K4me3 – Methylierung widerspiegeln, keine eindeutige Interpretation der Daten erfolgen. Tendenziell sieht man eine Veränderung der gesamten Histon-Mengen in den *KMT2D*-Mutanten nach einer Cetuximab-Behandlung. Jhaver et al., 2014 zeigen in ihrer Studie an Darmkrebszelllinien, dass eine Behandlung mit Cetuximab in Cetuximab-sensitive Zelllinien wie LIM1215, GEO und SW403 den Zellzyklus in der G1/G0-Phase stoppt, aber nicht zwangsläufig zu einer Induktion der Apoptose führt. Die Ergebnisse der RNA-Expressionsanalysen legen nahe, dass eine Cetuximab-Behandlung in der Mutante A76 eine gesteigerte Expression in den Methyltransferasen KMT2C, SMYD3 und KMT2D selbst hervorruft. Zusätzlich scheint die H3K4me3-Methylierung durch die Herunterregulation der H3K4me2/me1 Demethylase LSD1 zusätzlich verstärkt zu werden. In der Parental-Zelllinie HCC827 scheint eine Cetuximab-Behandlung eine gesteigerte Expression der gesamten untersuchten H3K4-Methyltransferasen nach sich zu ziehen, wobei der Effekt einer vermehrten H3K4me3-Methylierung durch die ebenfalls signifikant hochregulierte Expression von LSD1 relativiert wird. Eine mögliche Anreicherung der H3K4me1-Methylierung begründet sich wiederum in der *KMT2D*-Mutante B6 durch die Cetuximab-bedingte Repression der H3K4-Methyltransferasen KMT2D und KMT2C, wobei die Verminderung von LSD1 diesem ebenfalls

entgegenwirkt. Erfolgt eine Kombinationsbehandlung mit einem zusätzlichen Hitzeschock kann in der Western Blot Analyse eine Angleichung der H3K4-Methylierung in allen Versuchsgruppen beobachtet werden, der ebenfalls in der RNA-Expression der untersuchten H3K4-Methyltransferasen und –Demethylase festgestellt werden kann. KMT2D scheint zudem nach der Kombinationsbehandlung zusätzlich in der RNA-Expression sowohl in der Parental-Zelllinie als auch den *KMT2D*-Mutanten reduziert zu werden. Bei der Mutante A76 erfolgt eine additive signifikante Repression von KMT2C bei einer gleichzeitig signifikanten Hochregulation der LSD1-Expression, was auf ein Einpendeln der H3K4me1-Expression auf das Niveau der unbehandelten Kontroll-Zelllinien hinweisen könnte und eine Reduktion der H3K4me3-Expression nach sich zieht. Bis dato fehlen Vergleichsstudien, in denen die Auswirkung einer Cetuximab-Behandlung in Bezug auf die H3K4-Methylierung und die in dem Prozess involvierten H3K4-Methyltransferasen näher untersuchen, sodass zukünftige Experimente einen näheren Ausschluss liefern werden.

Der EGFR-Signalweg spielt eine tragende Rolle in der Entwicklung von NSCLC und wird effektiv in der zielgerichteten Therapie bei der Behandlung von Patienten mit einer Mutation in EGFR angewandt. Das Anwendungsspektrum bei NSCLC wurde durch Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Erlotinib oder Gefitinib im Fall eines überexprimierten oder amplifizierten EGFR markant erweitert. Mutationen in EGFR, die mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber Erlotinib oder Gefitinib in Verbindung gebracht werden, sind vornehmlich in Exon 18-24 lokalisiert (Gridelli et al., 2007). Diese Region kodiert die EGFR-Tyrosinkinase-Domäne. Die häufigsten Mutationen machen dabei Deletion in Exon 19 und die Substitutions-Mutation L858R in Exon 21 aus (Gazdar, 2009). Erlotinib als Erstbehandlung bewirkte bei Patienten mit diesen aktivierenden Mutationen in EGFR eine starke Anti-Tumoraktivität in NSCLC (Giaccone, 2006; Zhou et al., 2011). Die Ergebnisse der Effizienz-Analyse von Zhou et al., 2011 zeigen bei der Erstbehandlung mit Erlotinib im Vergleich zu anderen Chemotherapeutika ein längeres progressionsfreies Überleben bei EGFR-positiv mutierten Patienten mit einem fortgeschrittenen NSCLC. Ein elementares Problem stellt jedoch die Entwicklung einer Resistenz nach einer längeren Behandlungsdauer mit Tyrosinkinase-Inhibitoren dar (Yano et al., 2005). Abourbeh et al. 2015 dokumentieren in ihren Untersuchungen, dass Zelllinien mit einer aktivierenden EGFR-Mutation wie z.B. HCC827 oder NCI-H3255 100-1000fach signifikant sensitiver mit einem anti-proliferativen Effekt nach einer Erlotinib-Behandlung in vitro reagierten als vergleichsweise andere Zelllinien. In einer Studie über die Auswirkung einer Kombinationsanwendung des pan-HDAC-Inhibitors Panobinostat und Erlotinib in NSCLC-Zelllinien, wird nach der Einzelapplikation des Tyrosinkinase-Inhibitors Erlotinib eine induziert erhöhte H3K4-Methylierung in HCC827- und A549-Zellen festgestellt

(Greve et al., 2015). Dieser Effekt wird durch eine zusätzliche Behandlung mit Panobinostat zusätzlich verstärkt. Greve et al., 2015 schließen daraus, dass Panobinostat in NSCLC-Zellen die antiproliferative Erlotinib-Wirkung verstärkt, wobei eine Kombinationsanwendung beider Wirkstoffe einen synergistischen Effekt auf die H3K4-Methylierung als auch der Histon-H3-Acetylierung bewirken. Dabei stellte sich heraus, dass Veränderungen in der Kopienzahl von Genen mit einer Relevanz in der H3K4-Methylierung, keine Rolle bei der H3K4-Regulation spielen. Greve et al. vermuten, dass die Induktion der H3K4-Methyltransferase-Expression oder eine Hemmung der Demethylase-Expression verantwortlich für die Veränderung der aktivierenden H3K4-Markierung sein könnten. In den in dieser Arbeit dargestellten Ergebnissen konnte diese Beobachtung hinsichtlich einer gesteigerten H3K4me1-Methylierung in den Western Blot Analysen nach einer Erlotinib-Behandlung in den untersuchten NSCLC- und *KMT2D*-mutierten Zelllinien durch die stark differenzielle Gesamthiston-Menge nicht geklärt werden. Dieser Effekt ist insbesondere bei den Erlotinib-behandelten Versuchsgruppen festzustellen, wo die divergente Histon-Menge in den *KMT2D*-Mutanten aber auch der Erlotinib-sensitiven Parental-Zelllinie HCC827 zu beobachten ist. Bei einer Kombinationsbehandlung mit einem vorhergehenden Hitzeschock veränderte sich der beobachtete Effekt, sodass eine Angleichung in der H3K4me1-Methylierung und der gesamten Histon-Menge erfolgte. Lee et al., 2007 dokumentieren in ihrer Studie an mehreren NSCLC-Zelllinien, dass eine Behandlung mit Erlotinib zu einem Wachstumsstillstand in der G1-Phase (*Gap1-Phase*) führt und somit die Apoptose in den Zellen induziert. Zu einem ähnlichen Schluss kommen ebenfalls Huether et al., 2005 bei ihren Untersuchungen an den hepatozellulären Tumorzelllinien Huh-7 und HepG2, bei denen eine zeit- und dosisabhängige Behandlung mit Erlotinib das Zellwachstum hemmt und zu einem Stillstand der G1/S-Phase des Zellzyklus führt. In weiterführenden Experimenten sollte dieser Effekt im Zusammenhang mit einer siRNA oder Überexpression von *KMT2D* eingehender betrachtet werden. Bei der Analyse der Zellviabilität zeigen die *KMT2D*-Mutanten eine starke verminderte Zellproliferation nach einer Erlotinib-Behandlung bei einer Dosis von 1 μM und einer Behandlungsdauer von 72 h. Die Zellviabilität der *KMT2D*-Mutante A76 ist dabei auf 47 % gegenüber der Parental-Zelllinie HCC827 reduziert, wohingegen bei der *KMT2D*-Mutante B6 ebenfalls eine Veränderung durch eine um 32 % reduzierte Zellviabilität festgestellt werden konnte. Nach einer Kombinationsbehandlung mit einem vorhergehenden Hitzeschock kann nur in der Mutante A76 bei einer Behandlung mit 5 μM Erlotinib eine höhere Sensitivität festgestellt werden. Bei der Mutante A76 wird die Zellviabilität um 33 % stärker supprimiert als gegenüber der Parental-Zelllinie. Das Wachstum von der Mutante B6 wird durch eine Kombinationsbehandlung nicht wesentlich im Vergleich zur Parental-Zelllinie verändert. Betrachtet man die Auswirkungen einer Erlotinib-Behandlung hinsichtlich der am Prozess beteiligten H3K4-Methyltransferasen bzw.

Demethylase in den *KMT2D*-mutierten Zelllinien könnte sich die erhöhte LSD1-Expression in der Mutante B6 als auch in der Parental-Zelllinie HCC827 (*EGFR*-Mutation delE746-A750) in einer deutlich erhöhten H3K4me1-Methylierung widerspiegeln. Dieser Effekt könnte durch die schwach signifikant verminderte Expression von SMYD3 unterstützt werden. Die in der Mutante B6 ermittelte erhöhte RNA-Expression von ASH2, KMT2A und KMT2C würde den gesteigerten Effekt der H3K4me1-Anreicherung dabei relativieren. Die ebenfalls erhöhte Expression der H3K4-Methyltransferasen KMT2A, KMT2C und ASH2 in der Parental-Zelllinie HCC827, könnte zudem dazu führen, dass vermehrt H3K4me1 in –me3 umgewandelt wird und zu einer starken Anreicherung der H3K4me3-Expression führen. Das in der Mutante A76 erhöht vorliegende Expressionsniveau von LSD1 wird nach einer Erlotinib-Behandlung nicht beeinflusst, sodass vermehrt H3K4me2 in H3K4me1 umgewandelt werden könnte. Eine Erlotinib-Behandlung führt hingegen in der resistenten Zelllinie A549 nur zu einer Hochregulation in der H3K4me2/3-Methyltransferase ASH2.

Veränderungen im H3K4-Methylierungsstatus wurden bereits in früheren Studien mit einer veränderten Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika in Verbindung gebracht. So zeigt Hou et al., 2012 beispielsweise, dass eine Überexpression von KDM5A mit einer Chemotherapie-Resistenz in Brustkrebs verbunden ist und eine Verminderung der KDM5A-Expression die Proliferation der Brustkrebszellen inhibiert. *KDM5A* wird ebenso mit einer Resistenzentwicklung in NSCLC in Verbindung gebracht (Sharma et al., 2010). Durch die Anwendung des JmjC-Demethylase Inhibitors YUKA1 (4-([2-(Allyloxy)-3-methoxybenzyl] amino)-4H-1,2,4-triazole-3-thiol) wird die H3K4me3-Methylierung erhöht und die Zellproliferation durch *KDM5A* in EGFR-mutierten NSCLC-Zelllinien selektiv inhibiert (Gale et al., 2016). Ji et al., 2018 zeigen in *KMT2D*-mutierten Jurkat-Zellen (mit einer *Missense*-Mutation in V5486M) nach der Applikation der HDAC-Inhibitoren Romidepsin und Chidamid eine Wiederherstellung der zuvor reduzierten H3K4me3-Methylierung. In weiterführenden *in vivo* Xenograft-Experimenten zeigen Ji et al., 2018 anschließend, dass die Tumore in Mäusen von *KMT2D* V5486M -mutierten Jurkat-Zellen, die mit Romidepsin und Chidamid behandelt wurden, signifikant kleiner ausfallen als die von unbehandelten Tieren. Ji et al. schließen daraus eine klinische Relevanz von Histonmodifikatoren als verwertbare Biomarker in der Therapieanwendung. Darüber hinaus liefern Chen et al. 2015 den Beweis, dass die Überexpression der H3K4-Methyltransferase WDR5 die Zellproliferation und Chemotherapie-Resistenz von Cisplatin und damit das Tumorwachstum in Blasenkrebszellen fördert. Frühere Studien weisen zudem auf ein reduziertes Zellwachstum in Brust- und

Prostatakrebs nach der Repression von WDR5 hin (Kim et al., 2014; Mungamuri et al., 2013). Der genaue Mechanismus ist bis dato allerdings noch unbekannt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass *KMT2D* mit einer Reihe von Prozessen, die in der Tumorentwicklung in NSCLC beteiligt sind, in Verbindung gebracht werden kann. Damit stellt *KMT2D* als potentieller Biomarker ein vielversprechendes Ziel für Therapieanwendungen dar. So konnte für die *KMT2D*-Mutante A76 eine Inhibierung der Zellproliferation bei einer Behandlung mit den Chemotherapeutika Cetuximab und Erlotinib ermittelt werden, wobei der zugrundeliegende Mechanismus in weiterführenden Studien funktionell eingehender untersucht werden sollte. Eine personalisierte Anwendung mit einer gezielten Therapie stellt dabei gegenüber der konventionellen Therapie eine wesentliche Verbesserung dar, wie es bereits im Fall von Patienten mit einer *EGFR*-positiven Mutation bei der Behandlung mit Erlotinib von NSCLC bewiesen wurde (Zhou et al., 2011; Rosell et al., 2012).

Zusammenfassung

Lungenkarzinome sind im Vergleich zu anderen Krebsarten die häufigste Todesursache weltweit. Aufgrund der späten Diagnose und einer hohen Rate an Therapieresistenzen liegt die 5-Jahres-Überlebensraten bei nur 13% und ist damit eine der niedrigsten überhaupt. Die Identifikation von potentiellen Biomarkern für eine Verbesserung der Therapieansätze rückt dabei zunehmend in den Vordergrund. Epigenetische Veränderungen spielen bei der Progression von Tumoren eine elementare Rolle, wobei diese mit der Karzinogenese und der Ausprägung einer Therapieresistenz in Verbindung stehen. Epigenetische Modifikatoren wie die H3K4-Methyltransferase KMT2D und das Chromatin-Bindeprotein (*Reader*) BRD4 sind häufig in verschiedenen Krebsarten wie z.B. in NSCLC mutiert. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollten in verschiedenen Lungenkrebszelllinien unter Verwendung von CRISPR CAS9 definierte Mutationen in den Kandidatengen *KMT2D* und *BRD4* induziert werden, um funktionelle Mechanismen eingehender zu untersuchen, die mit einer Tumorprogression assoziiert werden. Die Deletionen im Kandidatengen *KMT2D* unterscheiden sich dadurch, dass bei einer der Deletionen ein Verlust der SET-Domäne erfolgt (Zelllinie B6), wohingegen bei der anderen Deletion das Leseraster C-terminal und damit auch die SET-Domäne erhalten bleibt (Zelllinie A76). In *BRD4* wird eine Deletion des gesamten Gens eingefügt. In ChIP-Seq –Analysen der Parental-Zelllinien erfolgte zunächst die Identifikation spezifisch angereicherter Signalwege, die in Prozessen der zellulären Stressantwort, dem Spleißprozess und der epigenetischen Regulation eine Rolle spielten. Zudem konnte eine starke Anreicherung im EGFR-Signalweg festgestellt werden. Um die mögliche Auswirkung der induzierten Mutationen in diesen identifizierten Signalwegen eingehender zu betrachten, wurden diese in Expressions-, Proliferations- und methylierungsspezifischen Experimenten analysiert. Des Weiteren wurde der Einfluss von KMT2D auf eine epigenetisch bedingte Therapieresistenz gegen die EGFR-wirkenden Chemotherapeutika Cetuximab und Erlotinib untersucht. Die induzierten Mutationen führten zu einer verminderten RNA- und Proteinexpression der Kandidatengene. Bei der *KMT2D*-Zelllinie A76 konnten deutliche morphologische Veränderungen beobachtet werden. Die Zellproliferation war in der Analyse verglichen zur Parental-Zelllinie HCC827 deutlich in den *KMT2D*-mutierten Zelllinien vermindert. In den Western Blot Analysen führten die induzierten *KMT2D*- und *BRD4*-Mutationen zu Veränderung der gesamten Histon-Mengen, die sich in einer differenziellen H3K4- und H3K27-Methylierung in den mutierten Zelllinien widerspiegeln. Durch einen Hitzestress konnte eine Stabilisierung der methylierten Histon-Mengen beobachtet werden. Zudem wurden Unterschiede in der Zellviabilität nach der Induktion durch einen

Hitzestress ermittelt. In den *BRD4*-mutierten Zelllinien konnten hingegen keine Unterschiede in der Zellviabilität nach einem Hitzeschock im Vergleich zur parentalen Zelllinie Wi38 festgestellt werden. Die *KMT2D*-Mutationen resultierten in einer veränderten RNA-Expression von H3K4- und H3K27-relevanter Methyltransferasen und Demethylasen. Zudem konnten Veränderungen in der Expressionsanalyse von U2 snRNP Spleiß-Faktoren in den *KMT2D*- und *BRD4*-mutierten Zelllinien festgestellt werden. Bei der *KMT2D*-Mutante A76 konnte zudem in Zellviabilitätsassays eine erhöhte Sensitivität gegenüber Cetuximab und Erlotinib beobachtet werden.

Summary

Lung cancer is the most common cause of cancer-related death worldwide. Due to late diagnosis and a high rate of therapy resistance, the 5-year survival rate is with only 13% very low. The identification of potential biomarkers for the improvement of therapeutic approaches is thus at the focus of different research activities. Epigenetic changes play an elementary role in the progression of tumors and are associated with carcinogenesis and the development of therapy resistance. Epigenetic modifiers such as the H3K4 methyltransferase *KMT2D* and the chromatin reader *BRD4* are often mutated in various cancers including NSCLC. The aim of this Ph.D. thesis was to induce defined deletions in the candidate genes *KMT2D* and *BRD4* in various lung cancer cell lines using CRISPR CAS9. In further experiments, it was the aim of the work to investigate functional epigenetic mechanisms associated with tumor progression and therapy resistance. The introduced deletions in the candidate gene *KMT2D* differ in that one of the deletions leads to a pre-terminal stop codon and thus a loss of the SET domain (cell line B6), whereas in the other deletion the reading frame is C-terminally retained (cell line A76). Subsequently, the influence of *KMT2D* on the therapy response against the EGFR chemotherapeutic agents cetuximab and erlotinib was investigated. For *BRD4* the complete gene is deleted. ChIP-Seq analyzes of the parental cell lines revealed enrichment of specific signaling pathways involved in the cellular stress response, splicing and epigenetic regulation. In addition, a strong enrichment in the EGFR signaling pathway was found. Based on this enrichment analysis differences between parental and modified cell lines were determined in expression, proliferation, and methylation-specific experiments. *KMT2D* and *BRD4* mutations decreased RNA and protein expression levels of the candidate genes. The *KMT2D* mutant A76 showed strong morphological changes compared to the appearance of the parental cell line. Furthermore, cell proliferation was significantly reduced in the *KMT2D* mutated cell lines. Western blot analysis showed that the entire global histone pattern was variable and was mirrored in the differential levels of H3K4 and H3K27 methylation. After heat shock, the observed differences in the H3K4 and H3K27 methylation levels seemed to be stabilized. In contrast to the *KMT2D* cell lines, no differences in cell viability after heat shock could be determined in the *BRD4* mutant cell lines. The *KMT2D* mutations resulted in altered RNA expression of H3K4 and H3K27-relevant methyltransferases and demethylases. In addition, changes in the expression of splice factors of the U2 snRNP subunit in the *KMT2D* and *BRD4* mutant cell lines could be detected. Furthermore, increased sensitivity to the EGFR-directed chemotherapeutic agents' cetuximab and erlotinib was observed in cell viability assays in the *KMT2D* mutant A76.

Literaturverzeichnis

Abourbeh, Galith; Itamar, Batel; Salnikov, Olga; Beltsov, Sergey; Mishani, Eyal (2015): Identifying erlotinib-sensitive non-small cell lung carcinoma tumors in mice using (11) C-erlotinib PET. In: *EJNMMI research* 5, S. 4. DOI: 10.1186/s13550-014-0080-0.

Aggarwal, Ajay; Lewison, Grant; Idir, Saliha; Peters, Matthew; Aldige, Carolyn; Boerckel, Win et al. (2016): The State of Lung Cancer Research: A Global Analysis. In: *Journal of thoracic oncology: official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 11 (7), S. 1040–1050. DOI: 10.1016/j.jtho.2016.03.010.

Ansari, Junaid; Shackelford, Rodney E.; El-Osta, Hazem (2016): Epigenetics in non-small cell lung cancer: from basics to therapeutics. In: *Translational lung cancer research* 5 (2), S. 155–171. DOI: 10.21037/tlcr.2016.02.02.

Ansari, K. I.; Kasiri, S.; Mandal, S. S. (2013): Histone methylase MLL1 has critical roles in tumor growth and angiogenesis and its knockdown suppresses tumor growth in vivo. In: *Oncogene* 32 (28), S. 3359–3370. DOI: 10.1038/onc.2012.352.

Ardeshir-Larijani, Fatemeh; Bhateja, Priyanka; Lipka, Mary Beth; Sharma, Neelesh; Fu, Pingfu; Dowlati, Afshin (2018): KMT2D Mutation Is Associated With Poor Prognosis in Non-Small-Cell Lung Cancer. In: *Clinical lung cancer* 19 (4), e489–e501. DOI: 10.1016/j.clcc.2018.03.005.

Bae, Sangsu; Park, Jeongbin; Kim, Jin-Soo (2014): Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 30 (10), S. 1473–1475. DOI: 10.1093/bioinformatics/btu048.

Bannister, Andrew J.; Kouzarides, Tony (2011): Regulation of chromatin by histone modifications. In: *Cell research* 21 (3), S. 381–395. DOI: 10.1038/cr.2011.22.

Barski, Artem; Cuddapah, Suresh; Cui, Kairong; Roh, Tae-Young; Schones, Dustin E.; Wang, Zhibin et al. (2007): High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. In: *Cell* 129 (4), S. 823–837. DOI: 10.1016/j.cell.2007.05.009.

Belinsky, Steven A.; Liechty, Kieu C.; Gentry, Frederick D.; Wolf, Holly J.; Rogers, Justin; Vu, Kieu et al. (2006): Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort. In: *Cancer research* 66 (6), S. 3338–3344. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3408.

Berglund, Anders; Holmberg, Lars; Tishelman, Carol; Wagenius, Gunnar; Eaker, Sonja; Lambe, Mats (2010): Social inequalities in non-small cell lung cancer management and survival: a population-based study in central Sweden. In: *Thorax* 65 (4), S. 327–333. DOI: 10.1136/thx.2009.125914.

Bernstein, Bradley E.; Kamal, Michael; Lindblad-Toh, Kerstin; Bekiranov, Stefan; Bailey, Dione K.; Huebert, Dana J. et al. (2005): Genomic maps and comparative analysis of histone modifications in human and mouse. In: *Cell* 120 (2), S. 169–181. DOI: 10.1016/j.cell.2005.01.001.

Bernstein, Bradley E.; Mikkelsen, Tarjei S.; Xie, Xiaohui; Kamal, Michael; Huebert, Dana J.; Cuff, James et al. (2006): A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. In: *Cell* 125 (2), S. 315–326. DOI: 10.1016/j.cell.2006.02.041.

Bieberstein, Nicole I.; Carrillo Oesterreich, Fernando; Straube, Korinna; Neugebauer, Karla M. (2012): First exon length controls active chromatin signatures and transcription. In: *Cell reports* 2 (1), S. 62–68. DOI: 10.1016/j.celrep.2012.05.019.

- Bin Moon, Su; Lee, Jeong Mi; Kang, Jeong Gu; Lee, Nan-Ee; Ha, Dae-In; Kim, Do Yon et al. (2018): Highly efficient genome editing by CRISPR-Cpf1 using CRISPR RNA with a uridinylate-rich 3'-overhang. In: *Nature communications* 9 (1), S. 3651. DOI: 10.1038/s41467-018-06129-w.
- Blandin Knight, Sean; Crosbie, Phil A.; Balata, Haval; Chudziak, Jakub; Hussell, Tracy; Dive, Caroline (2017): Progress and prospects of early detection in lung cancer. In: *Open biology* 7 (9). DOI: 10.1098/rsob.170070.
- Boffetta, Paolo (2006): Human cancer from environmental pollutants: the epidemiological evidence. In: *Mutation research* 608 (2), S. 157–162. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2006.02.015.
- Bögershausen, Nina; Gatinois, Vincent; Riehmer, Vera; Kayserili, Hülya; Becker, Jutta; Thoenes, Michaela et al. (2016): Mutation Update for Kabuki Syndrome Genes KMT2D and KDM6A and Further Delineation of X-Linked Kabuki Syndrome Subtype 2. In: *Human mutation* 37 (9), S. 847–864. DOI: 10.1002/humu.23026.
- Brabender, J.; Danenberg, K. D.; Metzger, R.; Schneider, P. M.; Park, J.; Salonga, D. et al. (2001): Epidermal growth factor receptor and HER2-neu mRNA expression in non-small cell lung cancer Is correlated with survival. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 7 (7), S. 1850–1855.
- Bradbury, Robert H.; Callis, Rowena; Carr, Gregory R.; Chen, Huawei; Clark, Edwin; Feron, Lyman et al. (2016): Optimization of a Series of Bivalent Triazolopyridazine Based Bromodomain and Extraterminal Inhibitors: The Discovery of (3R)-4-(2-(4-(1-(3-Methoxy-1,2,4-triazolo[4,3-b]pyridazin-6-yl)-4-piperidylphenoxyethyl)-1,3-dimethyl-piperazin-2-one (AZD5153)). In: *Journal of medicinal chemistry* 59 (17), S. 7801–7817. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.6b00070.
- Bradford, M. M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Analytical biochemistry* 72, S. 248–254.
- Brand, Toni M.; Iida, Mari; Wheeler, Deric L. (2011): Molecular mechanisms of resistance to the EGFR monoclonal antibody cetuximab. In: *Cancer biology & therapy* 11 (9), S. 777–792. DOI: 10.4161/cbt.11.9.15050.
- Brandsma, Inger; Gent, Dik C. (2012): Pathway choice in DNA double strand break repair: observations of a balancing act. In: *Genome integrity* 3 (1), S. 9. DOI: 10.1186/2041-9414-3-9.
- Bray, Freddie; Ferlay, Jacques; Soerjomataram, Isabelle; Siegel, Rebecca L.; Torre, Lindsey A.; Jemal, Ahmedin (2018): Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 68 (6), S. 394–424. DOI: 10.3322/caac.21492.
- Brinkman, Eva K.; Chen, Tao; Amendola, Mario; van Steensel, Bas (2014): Easy quantitative assessment of genome editing by sequence trace decomposition. In: *Nucleic acids research* 42 (22), e168. DOI: 10.1093/nar/gku936.
- Bustin, Michael (1999): Regulation of DNA-Dependent Activities by the Functional Motifs of the High-Mobility-Group Chromosomal Proteins. In: *Molecular and cellular biology* 19 (8), S. 5237–5246.
- Campoli, Michael; Ferris, Robert; Ferrone, Soldano; Wang, Xinhui (2010): Immunotherapy of malignant disease with tumor antigen-specific monoclonal antibodies. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 16 (1), S. 11–20. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2345.
- Cerami, Ethan; Gao, Jianjiong; Dogrusoz, Ugur; Gross, Benjamin E.; Sumer, Selcuk Onur; Aksoy, Bülent Arman et al. (2012): The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. In: *Cancer discovery* 2 (5), S. 401–404. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-12-0095.

- Chen, Gang; Kronenberger, Peter; Teugels, Erik; Umelo, Ijeoma Adaku; Grève, Jacques de (2012): Targeting the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells: the effect of combining RNA interference with tyrosine kinase inhibitors or cetuximab. In: *BMC medicine* 10, S. 28. DOI: 10.1186/1741-7015-10-28.
- Chen, Guo; Deng, Xingming (2018): Cell Synchronization by Double Thymidine Block. In: *Bio-protocol* 8 (17). DOI: 10.21769/BioProtoc.2994.
- Chen, Xu; Xie, Weibin; Gu, Peng; Cai, Qingqing; Wang, Bo; Xie, Yun et al. (2015): Upregulated WDR5 promotes proliferation, self-renewal and chemoresistance in bladder cancer via mediating H3K4 trimethylation. In: *Scientific reports* 5, S. 8293. DOI: 10.1038/srep08293.
- Chen, Yuchen; Liu, Xinran; Li, Yangkai; Quan, Chuntao; Zheng, Ling; Huang, Kun (2018): Lung Cancer Therapy Targeting Histone Methylation: Opportunities and Challenges. In: *Computational and structural biotechnology journal* 16, S. 211–223. DOI: 10.1016/j.csbj.2018.06.001.
- Chen, Yuejun; Cao, Jingyuan; Xiong, Man; Petersen, Andrew J.; Dong, Yi; Tao, Yunlong et al. (2015): Engineering Human Stem Cell Lines with Inducible Gene Knockout using CRISPR/Cas9. In: *Cell stem cell* 17 (2), S. 233–244. DOI: 10.1016/j.stem.2015.06.001.
- Chen, Yun-Ju; Tsai, Cheng-Hui; Wang, Pin-Yu; Teng, Shu-Chun (2017): SMYD3 Promotes Homologous Recombination via Regulation of H3K4-mediated Gene Expression. In: *Scientific reports* 7 (1), S. 3842. DOI: 10.1038/s41598-017-03385-6.
- Chiang, Cheng-Ming (2009): Brd4 engagement from chromatin targeting to transcriptional regulation: selective contact with acetylated histone H3 and H4. In: *F1000 biology reports* 1, S. 98. DOI: 10.3410/B1-98.
- Cho, Seung Woo; Kim, Sojung; Kim, Yongsub; Kweon, Jiyeon; Kim, Heon Seok; Bae, Sangsu; Kim, Jin-Soo (2014): Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. In: *Genome research* 24 (1), S. 132–141. DOI: 10.1101/gr.162339.113.
- Chong, Curtis R.; Jänne, Pasi A. (2013): The quest to overcome resistance to EGFR-targeted therapies in cancer. In: *Nature medicine* 19 (11), S. 1389–1400. DOI: 10.1038/nm.3388.
- Christian, Michelle; Cermak, Tomas; Doyle, Erin L.; Schmidt, Clarice; Zhang, Feng; Hummel, Aaron et al. (2010): Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. In: *Genetics* 186 (2), S. 757–761. DOI: 10.1534/genetics.110.120717.
- Chung, Jin-Haeng; Lee, Hyun Ju; Kim, Baek-Hui; Cho, Nam-Yun; Kang, Gyeong Hoon (2011): DNA methylation profile during multistage progression of pulmonary adenocarcinomas. In: *Virchows Archiv: an international journal of pathology* 459 (2), S. 201–211. DOI: 10.1007/s00428-011-1079-9.
- Churcher, Ian (2018): Protac-Induced Protein Degradation in Drug Discovery: Breaking the Rules or Just Making New Ones? In: *Journal of medicinal chemistry* 61 (2), S. 444–452. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b01272.
- Cocciadiferro, Dario; Augello, Bartolomeo; Nittis, Pasquela de; Zhang, Jiyuan; Mandriani, Barbara; Malerba, Natascia et al. (2018): Dissecting KMT2D missense mutations in Kabuki syndrome patients. In: *Human molecular genetics* 27 (21), S. 3651–3668. DOI: 10.1093/hmg/ddy241.
- Collisson EA, Campbell JD, Brooks AN, Berger AH, Lee W, Chmielecki J, Beer DG, Cope L, Creighton CJ, Danilova L, Ding L, Getz G, Hammerman PS, Hayes DN, Hernandez B, Herman JG, Heymach JV, Jurisica I, Kucherlapati R, Kwiatkowski D, Ladanyi M, Robertson G, Schultz N, Shen R, Sinha R, Sougnez C, Tsao MS, Travis WD, Weinstein JN, Wigle DA, Wilkerson MD, Chu A, Cherniack AD, Hadjipanayis A, Rosenberg M, Weisenberger DJ, Laird PW, Radenbaugh A, Ma S, Stuart JM, Averett Byers L, Baylin SB, Govindan R, Meyerson M, Rosenberg M, Gabriel SB, Cibulskis K, Sougnez C, Kim J, Stewart C, Lichtenstein L, Lander ES, Lawrence MS, Getz,

Kandath C, Fulton R, Fulton LL, McLellan MD, Wilson RK, Ye K, Fronick CC, Maher CA, Miller CA, Wendl MC, Cabanski C, Ding L, Mardis E, Govindan R, Creighton CJ, Wheeler D, Balasundaram M, Butterfield YS, Carlsen R, Chu A, Chuah E, Dhalla N, Guin R, Hirst C, Lee D, Li HI, Mayo M, Moore RA, Mungall AJ, Schein JE, Sipahimalani P, Tam A, Varhol R, Robertson A, Wye N, Thiessen N, Holt RA, Jones SJ, Marra MA, Campbell JD, Brooks AN, Chmielecki J, Imielinski M, Onofrio RC, Hodis E, Zack T, Sougnez C, Helman E, Sekhar Pedamallu C, Mesirov J, Cherniack AD, Saksena G, Schumacher SE, Carter SL, Hernandez B, Garraway L, Beroukhi R, Gabriel SB, Getz G, Meyerson M, Hadjipanayis A, Lee S, Mahadeshwar HS, Pantazi A, Protopopov A, Ren X, Seth S, Song X, Tang J, Yang L, Zhang J, Chen PC, Parfenov M, Wei Xu A, Santoso N, Chin L, Park PJ, Kucherlapati R, Hoadley KA, Auman JT, Meng S, Shi Y, Buda E, Waring S, Veluvolu U, Tan D, Mieczkowski PA, Jones CD, Simons JV, Soloway MG, Bodenheimer T, Jefferys SR, Roach J, Hoyle AP, Wu J, Balu S, Singh D, Prins JF, Marron JS, Parker JS, Hayes DN, Perou CM, Liu J, Cope L, Danilova L, Weisenberger DJ, Maglinte DT, Lai PH, Bootwalla MS, Van Den Berg DJ, Triche T Jr, Baylin SB, Laird PW, Rosenberg M, Chin L, Zhang J, Cho J, DiCara D, Heiman D, Lin P, Mallard W, Voet D, Zhang H, Zou L, Noble MS, Lawrence MS, Saksena G, Gehlenborg N, Thorvaldsdottir H, Mesirov J, Nazaire MD, Robinson J, Getz G, Lee W, Aksoy BA, Ciriello G, Taylor BS, Dresdner G, Gao J, Gross B, Seshan VE, Ladanyi M, Reva B, Sinha R, Sumer SO, Weinhold N, Schultz N, Shen R, Sander C, Ng S, Ma S, Zhu J, Radenbaugh A, Stuart JM, Benz CC, Yau C, Haussler D, Spellman PT, Wilkerson MD, Parker JS, Hoadley KA, Kimes PK, Hayes DN, Perou CM, Broom BM, Wang J, Lu Y, Kwok Shing Ng P, Diao L, Averett Byers L, Liu W, Heymach JV, Amos CI, Weinstein JN, Akbani R, Mills GB, Curley E, Paulauskis J, Lau K, Morris S, Shelton T, Mallery D, Gardner J, Penny R, Saller C, Tarvin K, Richards WG, Cerfolio R, Bryant A, Raymond DP, Pennell NA, Farver C, Czerwinski C, Huelsenbeck-Dill L, Iacocca M, Petrelli N, Rabeno B, Brown J, Bauer T, Dolzhanskiy O, Potapova O, Rotin D, Voronina O, Nemirovich-Danchenko E, Fedosenko KV, Gal A, Behera M, Ramalingam SS, Sica G, Flieder D, Boyd J, Weaver J, Kohl B, Huy Quoc Thinh D, Sandusky G, Juhl H, Duhig E, Illei P, Gabrielson E, Shin J, Lee B, Rodgers K, Trusty D, Brock MV, Williamson C, Burks E, Rieger-Christ K, Holway A, Sullivan T, Wigle DA, Asiedu MK, Kosari F, Travis WD, Rekhman N, Zakowski M, Rusch VW, Zippile P, Suh J, Pass H, Goparaju C, Owusu-Sarpong Y, Bartlett JM, Kodeeswaran S, Parfitt J, Sekhon H, Albert M, Eckman J, Myers JB, Cheney R, Morrison C, Gaudio C, Borgia JA, Bonomi P, Pool M, Liptay MJ, Moiseenko F, Zaytseva I, Dienemann H, Meister M, Schnabel PA, Muley TR, Peifer M, Gomez-Fernandez C, Herbert L, Egea S, Huang M, Thorne LB, Boice L, Hill Salazar A, Funkhouser WK, Rathmell WK, Dhir R, Yousem SA, Dacic S, Schneider F, Siegfried JM, Hajek R, Watson MA, McDonald S, Meyers B, Clarke B, Yang IA, Fong KM, Hunter L, Windsor M, Bowman RV, Peters S, Letovanec I, Khan KZ, Jensen MA, Snyder EE, Srinivasan D, Kahn AB, Baboud J, Pot DA, Mills Shaw KR, Sheth M, Davidsen T, Demchok JA, Yang L, Wang Z, Tarnuzzer R, Zenklusen JC, Ozenberger BA, Sofia HJ, Travis WD, Cheney R, Clarke B, Dacic S, Duhig E, Funkhouser WK, Illei P, Farver C, Rekhman N, Sica G, Suh J, Tsao MS, Travis WD, Cheney R, Clarke B, Dacic S, Duhig E, Funkhouser WK, Illei P, Farver C, Rekhman N, Sica G, Suh J, Tsao MS. (2014): Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. In: *Nature* 511 (7511), S. 543–550. DOI: 10.1038/nature13385.

Crea, Francesco; Hurt, Elaine M.; Mathews, Lesley A.; Cabarcas, Stephanie M.; Sun, Lei; Marquez, Victor E. et al. (2011): Pharmacologic disruption of Polycomb Repressive Complex 2 inhibits tumorigenicity and tumor progression in prostate cancer. In: *Molecular cancer* 10, S. 40. DOI: 10.1186/1476-4598-10-40.

Cross, Darren A. E.; Ashton, Susan E.; Ghiorghiu, Serban; Eberlein, Cath; Nebhan, Caroline A.; Spitzler, Paula J. et al. (2014): AZD9291, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer. In: *Cancer discovery* 4 (9), S. 1046–1061. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0337.

- Dalgliesh, Gillian L.; Furge, Kyle; Greenman, Chris; Chen, Lina; Bignell, Graham; Butler, Adam et al. (2010): Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. In: *Nature* 463 (7279), S. 360–363. DOI: 10.1038/nature08672.
- Davie, James R.; Xu, Wayne; Delcuve, Genevieve P. (2016): Histone H3K4 trimethylation: dynamic interplay with pre-mRNA splicing. In: *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 94 (1), S. 1–11. DOI: 10.1139/bcb-2015-0065.
- Dawkins, Joshua B. N.; Wang, Jun; Maniati, Eleni; Heward, James A.; Koniali, Lola; Kocher, Hemant M. et al. (2016): Reduced Expression of Histone Methyltransferases KMT2C and KMT2D Correlates with Improved Outcome in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. In: *Cancer research* 76 (16), S. 4861–4871. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0481.
- Dawson, Mark A.; Kouzarides, Tony (2012): Cancer epigenetics: from mechanism to therapy. In: *Cell* 150 (1), S. 12–27. DOI: 10.1016/j.cell.2012.06.013.
- Dawson, Mark A.; Prinjha, Rab K.; Dittman, Antje; Giotopoulos, George; Bantscheff, Marcus; Chan, Wai-In et al. (2011): Inhibition of BET recruitment to chromatin as an effective treatment for MLL-fusion leukaemia. In: *Nature* 478 (7370), S. 529–533. DOI: 10.1038/nature10509.
- Dearden, S.; Stevens, J.; Wu, Y-L; Blowers, D. (2013): Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap). In: *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 24 (9), S. 2371–2376. DOI: 10.1093/annonc/mdt205.
- Delmore, Jake E.; Issa, Ghayas C.; Lemieux, Madeleine E.; Rahl, Peter B.; Shi, Junwei; Jacobs, Hannah M. et al. (2011): BET bromodomain inhibition as a therapeutic strategy to target c-Myc. In: *Cell* 146 (6), S. 904–917. DOI: 10.1016/j.cell.2011.08.017.
- Denissov, Sergei; Hofemeister, Helmut; Marks, Hendrik; Kranz, Andrea; Ciotta, Giovanni; Singh, Sukhdeep et al. (2014): Mll2 is required for H3K4 trimethylation on bivalent promoters in embryonic stem cells, whereas Mll1 is redundant. In: *Development (Cambridge, England)* 141 (3), S. 526–537. DOI: 10.1242/dev.102681.
- Dent, Rebecca; Trudeau, Maureen; Pritchard, Kathleen I.; Hanna, Wedad M.; Kahn, Harriet K.; Sawka, Carol A. et al. (2007): Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 13 (15 Pt 1), S. 4429–4434. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-3045.
- Detterbeck, Frank C. (2018): The eighth edition TNM stage classification for lung cancer: What does it mean on main street? In: *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 155 (1), S. 356–359. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2017.08.138.
- Devaiah, Ballachanda N.; Case-Borden, Chanelle; Gegonne, Anne; Hsu, Chih Hao; Chen, Qingrong; Meerzaman, Daoud et al. (2016): BRD4 is a histone acetyltransferase that evicts nucleosomes from chromatin. In: *Nature structural & molecular biology* 23 (6), S. 540–548. DOI: 10.1038/nsmb.3228.
- Dey, Anup; Chitsaz, Farideh; Abbasi, Asim; Misteli, Tom; Ozato, Keiko (2003): The double bromodomain protein Brd4 binds to acetylated chromatin during interphase and mitosis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (15), S. 8758–8763. DOI: 10.1073/pnas.1433065100.
- Dey, Anup; Nishiyama, Akira; Karpova, Tatiana; McNally, James; Ozato, Keiko (2009): Brd4 Marks Select Genes on Mitotic Chromatin and Directs Postmitotic Transcription. In: *Molecular Biology of the Cell* 20 (23), S. 4899–4909. DOI: 10.1091/mbc.E09-05-0380.

- Dienstmann, Rodrigo; Dosso, Sara de; Felip, Enriqueta; Tabernero, Josep (2012): Drug development to overcome resistance to EGFR inhibitors in lung and colorectal cancer. In: *Molecular oncology* 6 (1), S. 15–26. DOI: 10.1016/j.molonc.2011.11.009.
- Dillon, Shane C.; Zhang, Xing; Trievel, Raymond C.; Cheng, Xiaodong (2005): The SET-domain protein superfamily: protein lysine methyltransferases. In: *Genome biology* 6 (8), S. 227. DOI: 10.1186/gb-2005-6-8-227.
- Ding, Qirong; Lee, Youn-Kyoung; Schaefer, Esperance A. K.; Peters, Derek T.; Veres, Adrian; Kim, Kevin et al. (2013): A TALEN genome-editing system for generating human stem cell-based disease models. In: *Cell stem cell* 12 (2), S. 238–251. DOI: 10.1016/j.stem.2012.11.011.
- Doudna, Jennifer A.; Charpentier, Emmanuelle (2014): Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. In: *Science (New York, N.Y.)* 346 (6213), S. 1258096. DOI: 10.1126/science.1258096.
- Downward, J.; Yarden, Y.; Mayes, E.; Scrace, G.; Totty, N.; Stockwell, P. et al. (1984): Close similarity of epidermal growth factor receptor and v-erb-B oncogene protein sequences. In: *Nature* 307 (5951), S. 521–527.
- Duan, Yingchao; Guan, Yuanyuan; Qin, Wenping; Zhai, Xiaoyu; Yu, Bin; Liu, Hongmin (2018): Targeting Brd4 for cancer therapy: inhibitors and degraders. In: *MedChemComm* 9 (11), S. 1779–1802. DOI: 10.1039/c8md00198g.
- Dziembowski, Andrzej; Ventura, Ana-Paula; Rutz, Berthold; Caspary, Friederike; Faux, Céline; Halgand, Frédéric et al. (2004): Proteomic analysis identifies a new complex required for nuclear pre-mRNA retention and splicing. In: *The EMBO journal* 23 (24), S. 4847–4856. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600482.
- Eden, Eran; Lipson, Doron; Yogev, Sivan; Yakhini, Zohar (2007): Discovering motifs in ranked lists of DNA sequences. In: *PLoS computational biology* 3 (3), e39. DOI: 10.1371/journal.pcbi.0030039.
- Eden, Eran; Navon, Roy; Steinfeld, Israel; Lipson, Doron; Yakhini, Zohar (2009): GORilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. In: *BMC bioinformatics* 10, S. 48. DOI: 10.1186/1471-2105-10-48.
- El-Telbany, Ahmed; Ma, Patrick C. (2012): Cancer genes in lung cancer: racial disparities: are there any? In: *Genes & cancer* 3 (7-8), S. 467–480. DOI: 10.1177/1947601912465177.
- Ezponda, Teresa; Dupéré-Richer, Daphné; Will, Christine M.; Small, Eliza C.; Varghese, Nobish; Patel, Tej et al. (2017): UTX/KDM6A Loss Enhances the Malignant Phenotype of Multiple Myeloma and Sensitizes Cells to EZH2 inhibition. In: *Cell reports* 21 (3), S. 628–640. DOI: 10.1016/j.celrep.2017.09.078.
- Feinberg, Andrew P. (2004): The epigenetics of cancer etiology. In: *Seminars in cancer biology* 14 (6), S. 427–432. DOI: 10.1016/j.semcancer.2004.06.005.
- Filippakopoulos, Panagis; Knapp, Stefan (2012): The bromodomain interaction module. In: *FEBS letters* 586 (17), S. 2692–2704. DOI: 10.1016/j.febslet.2012.04.045.
- Fiskus, Warren; Wang, Yongchao; Sreekumar, Arun; Buckley, Kathleen M.; Shi, Huidong; Jillella, Anand et al. (2009): Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. In: *Blood* 114 (13), S. 2733–2743. DOI: 10.1182/blood-2009-03-213496.
- Floyd, Scott R.; Pacold, Michael E.; Huang, Qiuying; Clarke, Scott M.; Lam, Fred C.; Cannell, Ian G. et al. (2013): The Bromodomain Protein Brd4 Insulates Chromatin from DNA Damage Signaling. In: *Nature* 498 (7453), S. 246–250. DOI: 10.1038/nature12147.

- Ford, David J.; Dingwall, Andrew K. (2015): The cancer COMPASS: navigating the functions of MLL complexes in cancer. In: *Cancer genetics* 208 (5), S. 178–191. DOI: 10.1016/j.cancergen.2015.01.005.
- Ford, Kyle; McDonald, Daniella; Mali, Prashant (2019): Functional Genomics via CRISPR-Cas. In: *Journal of Molecular Biology* 431 (1), S. 48–65. DOI: 10.1016/j.jmb.2018.06.034.
- Froimchuk, Eugene; Jang, Younghoon; Ge, Kai (2017): Histone H3 lysine 4 methyltransferase KMT2D. In: *Gene* 627, S. 337–342. DOI: 10.1016/j.gene.2017.06.056.
- Fu, Yanfang; Foden, Jennifer A.; Khayter, Cyd; Maeder, Morgan L.; Reyon, Deepak; Joung, J. Keith; Sander, Jeffrey D. (2013): High frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells. In: *Nature biotechnology* 31 (9), S. 822–826. DOI: 10.1038/nbt.2623.
- Gadd, Morgan S.; Testa, Andrea; Lucas, Xavier; Chan, Kwok-Ho; Chen, Wenzhang; Lamont, Douglas J. et al. (2017): Structural basis of PROTAC cooperative recognition for selective protein degradation. In: *Nature chemical biology* 13 (5), S. 514–521. DOI: 10.1038/nchembio.2329.
- Gale, Molly; Sayegh, Joyce; Cao, Jian; Norcia, Michael; Gareiss, Peter; Hoyer, Denton et al. (2016): Screen-identified selective inhibitor of lysine demethylase 5A blocks cancer cell growth and drug resistance. In: *Oncotarget* 7 (26), S. 39931–39944. DOI: 10.18632/oncotarget.9539.
- Gao, Chun-qi; Zhao, Yin-ling; Li, Hai-chang; Sui, Wei-guo; Yan, Hui-chao; Wang, Xiu-qi (2015): Heat stress inhibits proliferation, promotes growth, and induces apoptosis in cultured Lantang swine skeletal muscle satellite cells. In: *Journal of Zhejiang University. Science. B* 16 (6), S. 549–559. DOI: 10.1631/jzus. B1400339.
- Gao, Jianjiong; Aksoy, Bülent Arman; Dogrusoz, Ugur; Dresdner, Gideon; Gross, Benjamin; Sumer, S. Onur et al. (2013): Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. In: *Science signaling* 6 (269), p11. DOI: 10.1126/scisignal.2004088.
- Gao, Zhongyuan; Yuan, Ting; Zhou, Xiao; Ni, Ping; Sun, Geng; Li, Ping et al. (2018): Targeting BRD4 proteins suppresses the growth of NSCLC through downregulation of eIF4E expression. In: *Cancer biology & therapy* 19 (5), S. 407–415. DOI: 10.1080/15384047.2018.1423923.
- Gazdar, A. F. (2009): Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. In: *Oncogene* 28 Suppl 1, S24–31. DOI: 10.1038/onc.2009.198.
- Giaccone, Giuseppe; Gallegos Ruiz, Marielle; Le Chevalier, Thierry; Thatcher, Nick; Smit, Egbert; Rodriguez, Jose Antonio et al. (2006): Erlotinib for frontline treatment of advanced non-small cell lung cancer: a phase II study. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 12 (20 Pt 1), S. 6049–6055. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0260.
- Grasso, Catherine S.; Wu, Yi-Mi; Robinson, Dan R.; Cao, Xuhong; Dhanasekaran, Saravana M.; Khan, Amjad P. et al. (2012): The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. In: *Nature* 487 (7406), S. 239–243. DOI: 10.1038/nature11125.
- Greulich, Heidi (2010): The genomics of lung adenocarcinoma: opportunities for targeted therapies. In: *Genes & cancer* 1 (12), S. 1200–1210. DOI: 10.1177/1947601911407324.
- Greve, Gabriele; Schiffmann, Insa; Pfeifer, Dietmar; Pantic, Milena; Schüler, Julia; Lübbert, Michael (2015): The pan-HDAC inhibitor panobinostat acts as a sensitizer for erlotinib activity in EGFR-mutated and -wildtype non-small cell lung cancer cells. In: *BMC cancer* 15, S. 947. DOI: 10.1186/s12885-015-1967-5.
- Gridelli, Cesare; Bareschino, Maria Anna; Schettino, Clorinda; Rossi, Antonio; Maione, Paolo; Ciardiello, Fortunato (2007): Erlotinib in non-small cell lung cancer treatment: current status and future development. In: *The oncologist* 12 (7), S. 840–849. DOI: 10.1634/theoncologist.12-7-840.

Güler Tezel, Gaye; Şener, Ebru; Aydın, Çisel; Önder, Sevgen (2017): Prevalence of Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer in Turkish Population. In: *Balkan Medical Journal* 34 (6), S. 567–571. DOI: 10.4274/balkanmedj.2017.0297.

Günesdogan, Ufuk; Jäckle, Herbert; Herzig, Alf (2014): Histone supply regulates S phase timing and cell cycle progression. In: *eLife* 3, e02443. DOI: 10.7554/eLife.02443.

Guo, Changcun; Chen, Lee H.; Huang, Yafen; Chang, Chun-Chi; Wang, Ping; Pirozzi, Christopher J. et al. (2013): KMT2D maintains neoplastic cell proliferation and global histone H3 lysine 4 monomethylation. In: *Oncotarget* 4 (11), S. 2144–2153. DOI: 10.18632/oncotarget.1555.

Gupta, Rajat M.; Musunuru, Kiran (2014): Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9. In: *The Journal of clinical investigation* 124 (10), S. 4154–4161. DOI: 10.1172/JCI72992.

Halpern, Michael T.; Ward, Elizabeth M.; Pavluck, Alexandre L.; Schrag, Nicole M.; Bian, John; Chen, Amy Y. (2008): Association of insurance status and ethnicity with cancer stage at diagnosis for 12 cancer sites: a retrospective analysis. In: *The Lancet Oncology* 9 (3), S. 222–231. DOI: 10.1016/S1470-2045(08)70032-9.

Hamamoto, Ryuji; Furukawa, Yoichi; Morita, Masashi; Iimura, Yuko; Silva, Fabio Pittella; Li, Meihua et al. (2004): SMYD3 encodes a histone methyltransferase involved in the proliferation of cancer cells. In: *Nature cell biology* 6 (8), S. 731–740. DOI: 10.1038/ncb1151.

Hamamoto, Ryuji; Silva, Fabio Pittella; Tsuge, Masataka; Nishidate, Toshihiko; Katagiri, Toyomasa; Nakamura, Yusuke; Furukawa, Yoichi (2006): Enhanced SMYD3 expression is essential for the growth of breast cancer cells. In: *Cancer science* 97 (2), S. 113–118. DOI: 10.1111/j.1349-7006.2006.00146.x.

Harper, Jane V. (2005): Synchronization of cell populations in G1/S and G2/M phases of the cell cycle. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 296, S. 157–166.

Hayami, Shinya; Kelly, John D.; Cho, Hyun-Soo; Yoshimatsu, Masanori; Unoki, Motoko; Tsunoda, Tatsuhiko et al. (2011): Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers. In: *International journal of cancer* 128 (3), S. 574–586. DOI: 10.1002/ijc.25349.

Hayden, Annette; Johnson, Peter W. M.; Packham, Graham; Crabb, Simon J. (2011): S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibition by 3-deazaneplanocin A analogues induces anti-cancer effects in breast cancer cell lines and synergy with both histone deacetylase and HER2 inhibition. In: *Breast cancer research and treatment* 127 (1), S. 109–119. DOI: 10.1007/s10549-010-0982-0.

Heintzman, Nathaniel D.; Stuart, Rhona K.; Hon, Gary; Fu, Yutao; Ching, Christina W.; Hawkins, R. David et al. (2007): Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. In: *Nature genetics* 39 (3), S. 311–318. DOI: 10.1038/ng1966.

Herbst, Roy S.; Heymach, John V.; Lippman, Scott M. (2008): Lung cancer. In: *The New England journal of medicine* 359 (13), S. 1367–1380. DOI: 10.1056/NEJMra0802714.

Heyn, Holger; Vidal, Enrique; Ferreira, Humberto J.; Vizoso, Miguel; Sayols, Sergi; Gomez, Antonio et al. (2016): Epigenomic analysis detects aberrant super-enhancer DNA methylation in human cancer. In: *Genome biology* 17, S. 11. DOI: 10.1186/s13059-016-0879-2.

Hirsch, Fred R.; Varella-Garcia, Marileila; Bunn, Paul A.; Di Maria, Michael V.; Veve, Robert; Bremmes, Roy M. et al. (2003): Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 21 (20), S. 3798–3807. DOI: 10.1200/JCO.2003.11.069.

- Hock, Hanno (2012): A complex Polycomb issue: the two faces of EZH2 in cancer. In: *Genes & development* 26 (8), S. 751–755. DOI: 10.1101/gad.191163.112.
- Hödl, Martina; Basler, Konrad (2012): Transcription in the absence of histone H3.2 and H3K4 methylation. In: *Current biology: CB* 22 (23), S. 2253–2257. DOI: 10.1016/j.cub.2012.10.008.
- Hopper-Borge, Elizabeth A.; Nasto, Rochelle E.; Ratushny, Vladimir; Weiner, Louis M.; Golemis, Erica A.; Astsaturov, Igor (2009): Mechanisms of tumor resistance to EGFR-targeted therapies. In: *Expert opinion on therapeutic targets* 13 (3), S. 339–362. DOI: 10.1517/14712590902735795.
- Hou, Jinling; Wu, Jack; Dombkowski, Alan; Zhang, Kezhong; Holowatyj, Andreana; Boerner, Julie L.; Yang, Zeng-Quan (2012): Genomic amplification and a role in drug-resistance for the KDM5A histone demethylase in breast cancer. In: *American Journal of Translational Research* 4 (3), S. 247–256.
- Houzelstein, Denis; Bullock, Simon L.; Lynch, Denise E.; Grigorieva, Elena F.; Wilson, Valerie A.; Beddington, Rosa S. P. (2002): Growth and Early Postimplantation Defects in Mice Deficient for the Bromodomain-Containing Protein Brd4⁺. In: *Molecular and cellular biology* 22 (11), S. 3794–3802. DOI: 10.1128/MCB.22.11.3794-3802.2002.
- Hrustanovic, Gorjan; Lee, Bianca J.; Bivona, Trevor G. (2013): Mechanisms of resistance to EGFR targeted therapies. In: *Cancer biology & therapy* 14 (4), S. 304–314. DOI: 10.4161/cbt.23627.
- Hsu, Patrick D.; Lander, Eric S.; Zhang, Feng (2014): Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. In: *Cell* 157 (6), S. 1262–1278. DOI: 10.1016/j.cell.2014.05.010.
- Hu, Deqing; Gao, Xin; Morgan, Marc A.; Herz, Hans-Martin; Smith, Edwin R.; Shilatifard, Ali (2013): The MLL3/MLL4 branches of the COMPASS family function as major histone H3K4 monomethylases at enhancers. In: *Molecular and cellular biology* 33 (23), S. 4745–4754. DOI: 10.1128/MCB.01181-13.
- Huang, Hailiang; Maertens, Alexandra M.; Hyland, Edel M.; Dai, Junbiao; Norris, Anne; Boeke, Jef D.; Bader, Joel S. (2009): HistoneHits: a database for histone mutations and their phenotypes. In: *Genome research* 19 (4), S. 674–681. DOI: 10.1101/gr.083402.108.
- Huertas, Dori; Sendra, Ramon; Muñoz, Purificación (2009): Chromatin dynamics coupled to DNA repair. In: *Epigenetics* 4 (1), S. 31–42.
- Huether, Alexander; Höpfner, Michael; Sutter, Andreas P.; Schuppan, Detlef; Scherübl, Hans (2005): Erlotinib induces cell cycle arrest and apoptosis in hepatocellular cancer cells and enhances chemosensitivity towards cytostatics. In: *Journal of hepatology* 43 (4), S. 661–669. DOI: 10.1016/j.jhep.2005.02.040.
- Hulbert, Alicia; Jusue-Torres, Ignacio; Stark, Alejandro; Chen, Chen; Rodgers, Kristen; Lee, Beverly et al. (2017): Early Detection of Lung Cancer Using DNA Promoter Hypermethylation in Plasma and Sputum. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 23 (8), S. 1998–2005. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-1371.
- Huqun; Ishikawa, Rinako; Zhang, Jialing; Miyazawa, Hitoshi; Goto, Yoshiya; Shimizu, Yoshihiko et al. (2012): Enhancer of zeste homolog 2 is a novel prognostic biomarker in nonsmall cell lung cancer. In: *Cancer* 118 (6), S. 1599–1606. DOI: 10.1002/cncr.26441.
- Imielinski, Marcin; Berger, Alice H.; Hammerman, Peter S.; Hernandez, Bryan; Pugh, Trevor J.; Hodis, Eran et al. (2012): Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. In: *Cell* 150 (6), S. 1107–1120. DOI: 10.1016/j.cell.2012.08.029.
- Irizarry, Rafael A.; Ladd-Acosta, Christine; Wen, Bo; Wu, Zhijin; Montano, Carolina; Onyango, Patrick et al. (2009): Genome-wide methylation analysis of human colon cancer reveals similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. In: *Nature genetics* 41 (2), S. 178–186. DOI: 10.1038/ng.298.

- Issaeva, Irina; Zonis, Yulia; Rozovskaia, Tanya; Orlovsky, Kira; Croce, Carlo M.; Nakamura, Tatsuya et al. (2007): Knockdown of ALR (MLL2) reveals ALR target genes and leads to alterations in cell adhesion and growth. In: *Molecular and cellular biology* 27 (5), S. 1889–1903. DOI: 10.1128/MCB.01506-06.
- Jang, Younghoon; Wang, Chaochen; Zhuang, Lenan; Liu, Chengyu; Ge, Kai (2017): H3K4 Methyltransferase Activity Is Required for MLL4 Protein Stability. In: *Journal of Molecular Biology* 429 (13), S. 2046–2054. DOI: 10.1016/j.jmb.2016.12.016.
- Jankowska, Anna M.; Makishima, Hideki; Tiu, Ramon V.; Szpurka, Hadrian; Huang, Yun; Traina, Fabiola et al. (2011): Mutational spectrum analysis of chronic myelomonocytic leukemia includes genes associated with epigenetic regulation: UTX, EZH2, and DNMT3A. In: *Blood* 118 (14), S. 3932–3941. DOI: 10.1182/blood-2010-10-311019.
- Jhawer, Minaxi; Goel, Sanjay; Wilson, Andrew J.; Montagna, Cristina; Ling, Yi-He; Byun, Do-Sun et al. (2008): PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. In: *Cancer research* 68 (6), S. 1953–1961. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5659.
- Ji, Meng-Meng; Huang, Yao-Hui; Huang, Jin-Yan; Wang, Zhao-Fu; Di Fu; Liu, Han et al. (2018): Histone modifier gene mutations in peripheral T-cell lymphoma not otherwise specified. In: *Haematologica* 103 (4), S. 679–687. DOI: 10.3324/haematol.2017.182444.
- Jin, Lihua; Hanigan, Christin L.; Wu, Yu; Wang, Wei; Park, Ben Ho; Woster, Patrick M.; Casero, Robert A. (2013): Loss of LSD1 (lysine-specific demethylase 1) suppresses growth and alters gene expression of human colon cancer cells in a p53- and DNMT1(DNA methyltransferase 1) - independent manner. In: *The Biochemical journal* 449 (2), S. 459–468. DOI: 10.1042/BJ20121360.
- Jinek, Martin; Chylinski, Krzysztof; Fonfara, Ines; Hauer, Michael; Doudna, Jennifer A.; Charpentier, Emmanuelle (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. In: *Science (New York, N.Y.)* 337 (6096), S. 816–821. DOI: 10.1126/science.1225829.
- Jostes, Sina; Nettersheim, Daniel; Fellermeier, Martin; Schneider, Simon; Hafezi, François; Honecker, Friedemann et al. (2017): The bromodomain inhibitor JQ1 triggers growth arrest and apoptosis in testicular germ cell tumours in vitro and in vivo. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 21 (7), S. 1300–1314. DOI: 10.1111/jcmm.13059.
- Jurica, Melissa S.; Moore, Melissa J. (2003): Pre-mRNA Splicing. In: *Molecular cell* 12 (1), S. 5–14. DOI: 10.1016/S1097-2765(03)00270-3.
- Kabadi, Ami M.; Ousterout, David G.; Hilton, Isaac B.; Gersbach, Charles A. (2014): Multiplex CRISPR/Cas9-based genome engineering from a single lentiviral vector. In: *Nucleic acids research* 42 (19), e147. DOI: 10.1093/nar/gku749.
- Kaikkonen, Minna U.; Spann, Nathanael J.; Heinz, Sven; Romanoski, Casey E.; Allison, Karmel A.; Stender, Joshua D. et al. (2013): Remodeling of the enhancer landscape during macrophage activation is coupled to enhancer transcription. In: *Molecular cell* 51 (3), S. 310–325. DOI: 10.1016/j.molcel.2013.07.010.
- Kamburov, Atanas; Stelzl, Ulrich; Lehrach, Hans; Herwig, Ralf (2013): The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. In: *Nucleic acids research* 41 (Database issue), D793-800. DOI: 10.1093/nar/gks1055.
- Kandoth, Cyriac; McLellan, Michael D.; Vandin, Fabio; Ye, Kai; Niu, Beifang; Lu, Charles et al. (2013): Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. In: *Nature* 502 (7471), S. 333–339. DOI: 10.1038/nature12634.

- Kantidakis, Theodoros; Saponaro, Marco; Mitter, Richard; Horswell, Stuart; Kranz, Andrea; Boeing, Stefan et al. (2016): Mutation of cancer driver MLL2 results in transcription stress and genome instability. In: *Genes & development* 30 (4), S. 408–420. DOI: 10.1101/gad.275453.115.
- Karnavas, Theodoros; Pintonello, Luisa; Agresti, Alessandra; Bianchi, Marco E. (2014): Histone content increases in differentiating embryonic stem cells. In: *Frontiers in physiology* 5, S. 330. DOI: 10.3389/fphys.2014.00330.
- Karolchik, Donna; Hinrichs, Angela S.; Furey, Terrence S.; Roskin, Krishna M.; Sugnet, Charles W.; Haussler, David; Kent, W. James (2004): The UCSC Table Browser data retrieval tool. In: *Nucleic acids research* 32 (Database issue), D493-6. DOI: 10.1093/nar/gkh103.
- Kent, W. James (2002): BLAT--the BLAST-like alignment tool. In: *Genome research* 12 (4), S. 656–664. DOI: 10.1101/gr.229202.
- Kent, W. James; Sugnet, Charles W.; Furey, Terrence S.; Roskin, Krishna M.; Pringle, Tom H.; Zahler, Alan M.; Haussler, David (2002): The human genome browser at UCSC. In: *Genome research* 12 (6), S. 996–1006. DOI: 10.1101/gr.229102.
- Kikuchi, Junko; Kinoshita, Ichiro; Shimizu, Yasushi; Kikuchi, Eiki; Konishi, Jun; Oizumi, Satoshi et al. (2010): Distinctive expression of the polycomb group proteins Bmi1 polycomb ring finger oncogene and enhancer of zeste homolog 2 in nonsmall cell lung cancers and their clinical and clinicopathologic significance. In: *Cancer* 116 (12), S. 3015–3024. DOI: 10.1002/cncr.25128.
- Kikuchi, Junko; Takashina, Taichi; Kinoshita, Ichiro; Kikuchi, Eiki; Shimizu, Yasushi; Sakakibara-Konishi, Jun et al. (2012): Epigenetic therapy with 3-deazaneplanocin A, an inhibitor of the histone methyltransferase EZH2, inhibits growth of non-small cell lung cancer cells. In: *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 78 (2), S. 138–143. DOI: 10.1016/j.lungcan.2012.08.003.
- Kim, Daesik; Bae, Sangsu; Park, Jeongbin; Kim, Eunji; Kim, Seokjoong; Yu, Hye Ryeong et al. (2015): Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells. In: *Nature methods* 12 (3), 237-43, 1 p following 243. DOI: 10.1038/nmeth.3284.
- Kim, Jae-Hwan; Sharma, Amrish; Dhar, Shilpa S.; Lee, Sung-Hun; Gu, Bingnan; Chan, Chia-Hsin et al. (2014): UTX and MLL4 coordinately regulate transcriptional programs for cell proliferation and invasiveness in breast cancer cells. In: *Cancer research* 74 (6), S. 1705–1717. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1896.
- Kim, Ji-Young; Banerjee, Taraswi; Vinckevicius, Aurimas; Luo, Qianyi; Parker, J. Brandon; Baker, Mairead R. et al. (2014): A role for WDR5 in integrating threonine 11 phosphorylation to lysine 4 methylation on histone H3 during androgen signaling and in prostate cancer. In: *Molecular cell* 54 (4), S. 613–625. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.03.043.
- Kim, Sojung; Kim, Daesik; Cho, Seung Woo; Kim, Jungeun; Kim, Jin-Soo (2014): Highly efficient RNA-guided genome editing in human cells via delivery of purified Cas9 ribonucleoproteins. In: *Genome research* 24 (6), S. 1012–1019. DOI: 10.1101/gr.171322.113.
- Kim, Wootae; Kim, Ranah; Park, Geunyeong; Park, Jong-Wan; Kim, Ja-Eun (2012): Deficiency of H3K79 histone methyltransferase Dot1-like protein (DOT1L) inhibits cell proliferation. In: *The Journal of biological chemistry* 287 (8), S. 5588–5599. DOI: 10.1074/jbc.M111.328138.
- Klingbeil, Olaf; Lesche, Ralf; Gelato, Kathy A.; Haendler, Bernard; Lejeune, Pascale (2016): Inhibition of BET bromodomain-dependent XIAP and FLIP expression sensitizes KRAS-mutated NSCLC to pro-apoptotic agents. In: *Cell Death & Disease* 7 (9), e2365-. DOI: 10.1038/cddis.2016.271.
- Kong, Lingzhi; Zhang, Peng; Li, Wang; Yang, Yan; Tian, Ye; Wang, Xujun et al. (2016): KDM1A promotes tumor cell invasion by silencing TIMP3 in non-small cell lung cancer cells. In: *Oncotarget* 7 (19), S. 27959–27974. DOI: 10.18632/oncotarget.8563.

- Koessaar, Triinu; Remm, Mairo (2007): Enhancements and modifications of primer design program Primer3. In: *Bioinformatics (Oxford, England)* 23 (10), S. 1289–1291. DOI: 10.1093/bioinformatics/btm091.
- Kosicki, Michael; Tomberg, Kärt; Bradley, Allan (2018): Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements. In: *Nature biotechnology* 36 (8), S. 765–771. DOI: 10.1038/nbt.4192.
- Kouzarides, Tony (2007): Chromatin modifications and their function. In: *Cell* 128 (4), S. 693–705. DOI: 10.1016/j.cell.2007.02.005.
- Kunizaki, Masaki; Hamamoto, Ryuji; Silva, Fabio Pittella; Yamaguchi, Kiyoshi; Nagayasu, Takeshi; Shibuya, Masabumi et al. (2007): The lysine 831 of vascular endothelial growth factor receptor 1 is a novel target of methylation by SMYD3. In: *Cancer research* 67 (22), S. 10759–10765. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1132.
- Kurai, Jun; Chikumi, Hiroki; Hashimoto, Kiyoshi; Yamaguchi, Kosuke; Yamasaki, Akira; Sako, Takanori et al. (2007): Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 13 (5), S. 1552–1561. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-1726.
- Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (5259), S. 680–685.
- Le Cong; Ran, F. Ann; Cox, David; Lin, Shuailiang; Barretto, Robert; Habib, Naomi et al. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. In: *Science (New York, N.Y.)* 339 (6121), S. 819–823. DOI: 10.1126/science.1231143.
- Lederer, Damien; Grisart, Bernard; Digilio, Maria Cristina; Benoit, Valérie; Crespín, Marianne; Ghariani, Sophie Claire et al. (2012): Deletion of KDM6A, a histone demethylase interacting with MLL2, in three patients with Kabuki syndrome. In: *American journal of human genetics* 90 (1), S. 119–124. DOI: 10.1016/j.ajhg.2011.11.021.
- Lee, J. K.; Shin, J-Y; Kim, S.; Lee, S.; Park, C.; Kim, J-Y et al. (2013): Primary resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors (TKIs) in patients with non-small-cell lung cancer harboring TKI-sensitive EGFR mutations: an exploratory study. In: *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* 24 (8), S. 2080–2087. DOI: 10.1093/annonc/mdt127.
- Lee, Ji-Eun; Park, Young-Kwon; Park, Sarah; Jang, Younghoon; Waring, Nicholas; Dey, Anup et al. (2017): Brd4 binds to active enhancers to control cell identity gene induction in adipogenesis and myogenesis. In: *Nature communications* 8 (1), S. 2217. DOI: 10.1038/s41467-017-02403-5.
- Lee, Ji-Eun; Wang, Chaochen; Xu, Shiliyang; Cho, Young-Wook; Wang, Lifeng; Feng, Xuesong et al. (2013): H3K4 mono- and di-methyltransferase MLL4 is required for enhancer activation during cell differentiation. In: *eLife* 2, e01503. DOI: 10.7554/eLife.01503.
- Li, Bing; Carey, Michael; Workman, Jerry L. (2007): The role of chromatin during transcription. In: *Cell* 128 (4), S. 707–719. DOI: 10.1016/j.cell.2007.01.015.
- Li, Shiqing; Schmitz, Karl R.; Jeffrey, Philip D.; Wiltzius, Jed J. W.; Kussie, Paul; Ferguson, Kathryn M. (2005): Structural basis for inhibition of the epidermal growth factor receptor by cetuximab. In: *Cancer cell* 7 (4), S. 301–311. DOI: 10.1016/j.ccr.2005.03.003.
- Li, Tianhong; Ling, Yi-He; Goldman, I. David; Perez-Soler, Roman (2007): Schedule-dependent cytotoxic synergism of pemetrexed and erlotinib in human non-small cell lung cancer cells. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 13 (11), S. 3413–3422. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2923.

- Li, Yuan-yuan; Lam, Sze-kwan; Mak, Judith Choi-wo; Zheng, Chun-yan; Ho, James Chung-man (2013): Erlotinib-induced autophagy in epidermal growth factor receptor mutated non-small cell lung cancer. In: *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 81 (3), S. 354–361. DOI: 10.1016/j.lungcan.2013.05.012.
- Liang, Shuzhen; Lin, Mao; Niu, Lizhi; Xu, Kecheng; Wang, Xiaohua; Liang, Yingqing et al. (2018): Cetuximab combined with natural killer cells therapy: an alternative to chemoradiotherapy for patients with advanced non-small cell lung cancer (NSCLC). In: *American Journal of Cancer Research* 8 (5), S. 879–891.
- Liao, Yun-Fei; Wu, Yong-Bing; Long, Xiang; Zhu, Shu-Qiang; Jin, Chun; Xu, Jian-Jun; Ding, Jian-Yong (2016): High level of BRD4 promotes non-small cell lung cancer progression. In: *Oncotarget* 7 (8), S. 9491–9500. DOI: 10.18632/oncotarget.7068.
- Lieber, Michael R. (2010): The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. In: *Annual review of biochemistry* 79, S. 181–211. DOI: 10.1146/annurev.biochem.052308.093131.
- Lim, Soyoun; Janzer, Andreas; Becker, Astrid; Zimmer, Andreas; Schüle, Roland; Buettner, Reinhard; Kirfel, Jutta (2010): Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. In: *Carcinogenesis* 31 (3), S. 512–520. DOI: 10.1093/carcin/bgp324.
- Lockwood, William W.; Zejnullahu, Kreshnik; Bradner, James E.; Varmus, Harold (2012): Sensitivity of human lung adenocarcinoma cell lines to targeted inhibition of BET epigenetic signaling proteins. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 (47), S. 19408–19413. DOI: 10.1073/pnas.1216363109.
- Lovén, Jakob; Hoke, Heather A.; Lin, Charles Y.; Lau, Ashley; Orlando, David A.; Vakoc, Christopher R. et al. (2013): Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. In: *Cell* 153 (2), S. 320–334. DOI: 10.1016/j.cell.2013.03.036.
- Lu, Jing; Qian, Yimin; Altieri, Martha; Dong, Hanqing; Wang, Jing; Raina, Kanak et al. (2015): Hijacking the E3 Ubiquitin Ligase Cereblon to Efficiently Target BRD4. In: *Chemistry & biology* 22 (6), S. 755–763. DOI: 10.1016/j.chembiol.2015.05.009.
- Luco, Reini F.; Pan, Qun; Tominaga, Kaoru; Blencowe, Benjamin J.; Pereira-Smith, Olivia M.; Misteli, Tom (2010): Regulation of alternative splicing by histone modifications. In: *Science (New York, N.Y.)* 327 (5968), S. 996–1000. DOI: 10.1126/science.1184208.
- Luger, K.; Mäder, A. W.; Richmond, R. K.; Sargent, D. F.; Richmond, T. J. (1997): Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. In: *Nature* 389 (6648), S. 251–260. DOI: 10.1038/38444.
- Lv, Shidong; Ji, Liyan; Chen, Bin; Liu, Shuqiang; Lei, Chengyong; Liu, Xi et al. (2018): Histone methyltransferase KMT2D sustains prostate carcinogenesis and metastasis via epigenetically activating LIFR and KLF4. In: *Oncogene* 37 (10), S. 1354–1368. DOI: 10.1038/s41388-017-0026-x.
- Lynch, Thomas J.; Patel, Taral; Dreisbach, Luke; McCleod, Michael; Heim, William J.; Hermann, Robert C. et al. (2010): Cetuximab and first-line taxane/carboplatin chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: results of the randomized multicenter phase III trial BMS099. In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28 (6), S. 911–917. DOI: 10.1200/JCO.2009.21.9618.
- Mahat, Dig B.; Lis, John T. (2017): Use of conditioned media is critical for studies of regulation in response to rapid heat shock. In: *Cell stress & chaperones* 22 (1), S. 155–162. DOI: 10.1007/s12192-016-0737-x.

- Mahat, Dig B.; Salamanca, H. Hans; Duarte, Fabiana M.; Danko, Charles G.; Lis, John T. (2016): Mammalian Heat Shock Response and Mechanisms Underlying Its Genome-wide Transcriptional Regulation. In: *Molecular cell* 62 (1), S. 63–78. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.02.025.
- Makarova, Kira S.; Aravind, L.; Wolf, Yuri I.; Koonin, Eugene V. (2011 a): Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems. In: *Biology direct* 6, S. 38. DOI: 10.1186/1745-6150-6-38.
- Makarova, Kira S.; Haft, Daniel H.; Barrangou, Rodolphe; Brouns, Stan J. J.; Charpentier, Emmanuelle; Horvath, Philippe et al. (2011 b): Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. In: *Nature reviews. Microbiology* 9 (6), S. 467–477. DOI: 10.1038/nrmicro2577.
- Makarova, Olga V.; Makarov, Evgeny M.; Urlaub, Henning; Will, Cindy L.; Gentzel, Marc; Wilm, Matthias; Lührmann, Reinhard (2004): A subset of human 35S U5 proteins, including Prp19, function prior to catalytic step 1 of splicing. In: *The EMBO journal* 23 (12), S. 2381–2391. DOI: 10.1038/sj.emboj.7600241.
- Makishima, H.; Jankowska, A. M.; Tiu, R. V.; Szpurka, H.; Sugimoto, Y.; Hu, Z. et al. (2010): Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies. In: *Leukemia* 24 (10), S. 1799–1804. DOI: 10.1038/leu.2010.167.
- Malik, Shivani; Bhaumik, Sukesh R. (2010): Mixed lineage leukemia: histone H3 lysine 4 methyltransferases from yeast to human. In: *The FEBS journal* 277 (8), S. 1805–1821. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07607.x.
- Mao, Zhiyong; Bozzella, Michael; Seluanov, Andrei; Gorbunova, Vera (2008): DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 7 (18), S. 2902–2906. DOI: 10.4161/cc.7.18.6679.
- Martinelli, E.; Palma, R. de; Orbitura, M.; Vita, F. de; Ciardiello, F. (2009): Anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies in cancer therapy. In: *Clinical and Experimental Immunology* 158 (1), S. 1–9. DOI: 10.1111/j.1365-2249.2009.03992.x.
- Mazur, Pawel K.; Herner, Alexander; Mello, Stephano S.; Wirth, Matthias; Hausmann, Simone; Sánchez-Rivera, Francisco J. et al. (2015): Combined inhibition of BET family proteins and histone deacetylases as a potential epigenetics-based therapy for pancreatic ductal adenocarcinoma. In: *Nature medicine* 21 (10), S. 1163–1171. DOI: 10.1038/nm.3952.
- Mazzarella, Luca; Guida, Alessandro; Curigliano, Giuseppe (2018): Cetuximab for treating non-small cell lung cancer. In: *Expert opinion on biological therapy* 18 (4), S. 483–493. DOI: 10.1080/14712598.2018.1452906.
- McLean, Cory Y.; Bristor, Dave; Hiller, Michael; Clarke, Shoa L.; Schaar, Bruce T.; Lowe, Craig B. et al. (2010): GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. In: *Nature biotechnology* 28 (5), S. 495–501. DOI: 10.1038/nbt.1630.
- Mi, Huaiyu; Huang, Xiaosong; Muruganujan, Anushya; Tang, Haiming; Mills, Caitlin; Kang, Diane; Thomas, Paul D. (2017): PANTHER version 11: expanded annotation data from Gene Ontology and Reactome pathways, and data analysis tool enhancements. In: *Nucleic acids research* 45 (D1), D183–D189. DOI: 10.1093/nar/gkw1138.
- Mi, Huaiyu; Muruganujan, Anushya; Casagrande, John T.; Thomas, Paul D. (2013): Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. In: *Nature protocols* 8 (8), S. 1551–1566. DOI: 10.1038/nprot.2013.092.
- Mi, Huaiyu; Thomas, Paul (2009): PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 563, S. 123–140. DOI: 10.1007/978-1-60761-175-2_7.

- Micale, Lucia; Augello, Bartolomeo; Fusco, Carmela; Selicorni, Angelo; Loviglio, Maria N.; Silengo, Margherita Cirillo et al. (2011): Mutation spectrum of MLL2 in a cohort of Kabuki syndrome patients. In: *Orphanet journal of rare diseases* 6, S. 38. DOI: 10.1186/1750-1172-6-38.
- Michalak, Ewa M.; Visvader, Jane E. (2016): Dysregulation of histone methyltransferases in breast cancer - Opportunities for new targeted therapies? In: *Molecular oncology* 10 (10), S. 1497–1515. DOI: 10.1016/j.molonc.2016.09.003.
- Miyake, Noriko; Koshimizu, Eriko; Okamoto, Nobuhiko; Mizuno, Seiji; Ogata, Tsutomu; Nagai, Toshiro et al. (2013): MLL2 and KDM6A mutations in patients with Kabuki syndrome. In: *American journal of medical genetics. Part A* 161A (9), S. 2234–2243. DOI: 10.1002/ajmg.a.36072.
- Morcillo García, Sara; Noblejas López, María del Mar; Nieto Jiménez, Cristina; Pérez Peña, Javier; Nuncia Cantarero, Miriam; Györffy, Balázs et al. (2018): Epigenetic mutational landscape in breast cancer: role of the histone methyltransferase gene KMT2D in triple negative tumors.
- Morera, Ludovica; Lübbert, Michael; Jung, Manfred (2016): Targeting histone methyltransferases and demethylases in clinical trials for cancer therapy. In: *Clinical epigenetics* 8, S. 57. DOI: 10.1186/s13148-016-0223-4.
- Morin, Ryan D.; Mendez-Lago, Maria; Mungall, Andrew J.; Goya, Rodrigo; Mungall, Karen L.; Corbett, Richard et al. (2011): Frequent mutation of histone modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. In: *Nature* 476 (7360), S. 298–303. DOI: 10.1038/nature10351.
- Mukohara, Toru; Engelman, Jeffrey A.; Hanna, Nasser H.; Yeap, Beow Y.; Kobayashi, Susumu; Lindeman, Neal et al. (2005): Differential effects of gefitinib and cetuximab on non-small-cell lung cancers bearing epidermal growth factor receptor mutations. In: *Journal of the National Cancer Institute* 97 (16), S. 1185–1194. DOI: 10.1093/jnci/dji238.
- Muller, Susanne; Filippakopoulos, Panagis; Knapp, Stefan (2011): Bromodomains as therapeutic targets. In: *Expert reviews in molecular medicine* 13, e29. DOI: 10.1017/S1462399411001992.
- Mungamuri, Sathish Kumar; Murk, William; Grumolato, Luca; Bernstein, Emily; Aaronson, Stuart A. (2013): Chromatin modifications sequentially enhance ErbB2 expression in ErbB2-positive breast cancers. In: *Cell reports* 5 (2), S. 302–313. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.09.009.
- Nadal, Eulàlia de; Ammerer, Gustav; Posas, Francesc (2011): Controlling gene expression in response to stress. In: *Nature reviews. Genetics* 12 (12), S. 833–845. DOI: 10.1038/nrg3055.
- Natarajan, Thanemozhi G.; Kallakury, Bhaskar V.; Sheehan, Christine E.; Bartlett, Margaret B.; Ganesan, Natarajan; Preet, Anju et al. (2010): Epigenetic regulator MLL2 shows altered expression in cancer cell lines and tumors from human breast and colon. In: *Cancer cell international* 10, S. 13. DOI: 10.1186/1475-2867-10-13.
- Nicholson, R. I.; Gee, J. M.; Harper, M. E. (2001): EGFR and cancer prognosis. In: *European journal of cancer (Oxford, England: 1990)* 37 Suppl 4, S9-15.
- Nishimasu, Hiroshi; Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Konermann, Silvana; Shehata, Soraya I.; Dohmae, Naoshi et al. (2014): Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. In: *Cell* 156 (5), S. 935–949. DOI: 10.1016/j.cell.2014.02.001.
- Olofsson, B.; Pizon, V.; Zahraoui, A.; Tavitian, A.; Therwath, A. (1986): Structure and expression of the chicken epidermal growth factor receptor gene locus. In: *European journal of biochemistry* 160 (2), S. 261–266.
- Ortega-Molina, Ana; Boss, Isaac W.; Canela, Andres; Pan, Heng; Jiang, Yanwen; Zhao, Chunying et al. (2015): The histone lysine methyltransferase KMT2D sustains a gene expression program that represses B cell lymphoma development. In: *Nature medicine* 21 (10), S. 1199–1208. DOI: 10.1038/nm.3943.

- O'Sullivan, Roderick J.; Kubicek, Stefan; Schreiber, Stuart L.; Karlseder, Jan (2010): Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres. In: *Nature structural & molecular biology* 17 (10), S. 1218–1225. DOI: 10.1038/nsmb.1897.
- Ottinger, Matthias; Christalla, Thomas; Nathan, Kavita; Brinkmann, Melanie M.; Viejo-Borbolla, Abel; Schulz, Thomas F. (2006): Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA-1 interacts with the short variant of BRD4 and releases cells from a BRD4- and BRD2/RING3-induced G1 cell cycle arrest. In: *Journal of virology* 80 (21), S. 10772–10786. DOI: 10.1128/JVI.00804-06.
- Pao, William; Miller, Vincent A.; Politi, Katerina A.; Riely, Gregory J.; Somwar, Romel; Zakowski, Maureen F. et al. (2005): Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. In: *PLoS medicine* 2 (3), e73. DOI: 10.1371/journal.pmed.0020073.
- Paquet, Dominik; Kwart, Dylan; Chen, Antonia; Sproul, Andrew; Jacob, Samson; Teo, Shaun et al. (2016): Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. In: *Nature* 533 (7601), S. 125–129. DOI: 10.1038/nature17664.
- Pérez-Salvia, Montserrat; Esteller, Manel (2017): Bromodomain inhibitors and cancer therapy: From structures to applications. In: *Epigenetics* 12 (5), S. 323–339. DOI: 10.1080/15592294.2016.1265710.
- Pfaffl, M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. In: *Nucleic acids research* 29 (9), e45.
- Pines, Gur; Köstler, Wolfgang J.; Yarden, Yosef (2010): Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. In: *FEBS letters* 584 (12), S. 2699–2706. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.04.019.
- Platt, Randall J.; Chen, Sidi; Zhou, Yang; Yim, Michael J.; Swiech, Lukasz; Kempton, Hannah R. et al. (2014): CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. In: *Cell* 159 (2), S. 440–455. DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.014.
- Plevin, Michael J.; Mills, Morgon M.; Ikura, Mitsuhiko (2005): The LxxLL motif: a multifunctional binding sequence in transcriptional regulation. In: *Trends in biochemical sciences* 30 (2), S. 66–69. DOI: 10.1016/j.tibs.2004.12.001.
- Polstein, Lauren R.; Gersbach, Charles A. (2015): A light-inducible CRISPR-Cas9 system for control of endogenous gene activation. In: *Nature chemical biology* 11 (3), S. 198–200. DOI: 10.1038/nchembio.1753.
- Pongas, Georgios; Kim, Marianne K.; Min, Dong J.; House, Carrie D.; Jordan, Elizabeth; Caplen, Natasha et al. (2017): BRD4 facilitates DNA damage response and represses CBX5/Heterochromatin protein 1 (HP1). In: *Oncotarget* 8 (31), S. 51402–51415. DOI: 10.18632/oncotarget.17572.
- Portela, Anna; Esteller, Manel (2010): Epigenetic modifications and human disease. In: *Nature biotechnology* 28 (10), S. 1057–1068. DOI: 10.1038/nbt.1685.
- Porteus, Matthew H.; Carroll, Dana (2005): Gene targeting using zinc finger nucleases. In: *Nature biotechnology* 23 (8), S. 967–973. DOI: 10.1038/nbt1125.
- Prinjha, R. K.; Witherington, J.; Lee, K. (2012): Place your BETs: the therapeutic potential of bromodomains. In: *Trends in pharmacological sciences* 33 (3), S. 146–153. DOI: 10.1016/j.tips.2011.12.002.
- Purba, Endang R.; Saita, Ei-Ichiro; Maruyama, Ichiro N. (2017): Activation of the EGF Receptor by Ligand Binding and Oncogenic Mutations: The "Rotation Model". In: *Cells* 6 (2). DOI: 10.3390/cells6020013.

- Qi, Lei S.; Larson, Matthew H.; Gilbert, Luke A.; Doudna, Jennifer A.; Weissman, Jonathan S.; Arkin, Adam P.; Lim, Wendell A. (2013): Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. In: *Cell* 152 (5), S. 1173–1183. DOI: 10.1016/j.cell.2013.02.022.
- Qiu, Haifeng; Jackson, Amanda L.; Kilgore, Joshua E.; Zhong, Yan; Chan, Leo Li-Ying; Gehrig, Paola A. et al. (2015): JQ1 suppresses tumor growth through downregulating LDHA in ovarian cancer. In: *Oncotarget* 6 (9), S. 6915–6930. DOI: 10.18632/oncotarget.3126.
- Qu, Zhe; Titus, Anto Sam Crosslee Louis Sam; Xuan, Zhenyu; D'Mello, Santosh R. (2018): Neuroprotection by Heat Shock Factor-1 (HSF1) and Trimerization-Deficient Mutant Identifies Novel Alterations in Gene Expression. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 17255. DOI: 10.1038/s41598-018-35610-1.
- Rabello, Doralina do Amaral; Ferreira, Vivian D'Afonseca da Silva; Berzoti-Coelho, Maria Gabriela; Burin, Sandra Mara; Magro, Cíntia Leticia; Cacemiro, Maira da Costa et al. (2018): MLL2/KMT2D and MLL3/KMT2C expression correlates with disease progression and response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukemia. In: *Cancer cell international* 18, S. 26. DOI: 10.1186/s12935-018-0523-1.
- Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Lin, Chie-Yu; Gootenberg, Jonathan S.; Konermann, Silvana; Trevino, Alexandro E. et al. (2013): Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. In: *Cell* 154 (6), S. 1380–1389. DOI: 10.1016/j.cell.2013.08.021.
- Ran, F. Ann; Hsu, Patrick D.; Wright, Jason; Agarwala, Vineeta; Scott, David A.; Zhang, Feng (2013): Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. In: *Nature protocols* 8 (11), S. 2281–2308. DOI: 10.1038/nprot.2013.143.
- Rao, Rajesh C.; Dou, Yali (2015): Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases. In: *Nature reviews. Cancer* 15 (6), S. 334–346. DOI: 10.1038/nrc3929.
- Repetto, Guillermo; del Peso, Ana; Zurita, Jorge L. (2008): Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. In: *Nature protocols* 3 (7), S. 1125–1131. DOI: 10.1038/nprot.2008.75.
- Rice, Shara D.; Cassino, Theresa R.; Sakhamuri, Lahari; Song, Nan; Williams, Karl E.; Brower, Stacey L. (2011): An in vitro chemoresponse assay defines a subset of colorectal and lung carcinomas responsive to cetuximab. In: *Cancer biology & therapy* 11 (2), S. 196–203.
- Richer, Amanda L.; Friel, Jacqueline M.; Carson, Vashti M.; Inge, Landon J.; Whitsett, Timothy G. (2015): Genomic profiling toward precision medicine in non-small cell lung cancer: getting beyond EGFR. In: *Pharmacogenomics and personalized medicine* 8, S. 63–79. DOI: 10.2147/PGPM.S52845.
- Rodgers, Kasey; McVey, Mitch (2016): Error-Prone Repair of DNA Double-Strand Breaks. In: *Journal of cellular physiology* 231 (1), S. 15–24. DOI: 10.1002/jcp.25053.
- Rodriguez, R. M.; Huidobro, C.; Urdinguio, R. G.; Mangas, C.; Soldevilla, B.; Domínguez, G. et al. (2012): Aberrant epigenetic regulation of bromodomain BRD4 in human colon cancer. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 90 (5), S. 587–595. DOI: 10.1007/s00109-011-0837-0.
- Rosell, Rafael; Carcereny, Enric; Gervais, Radj; Vergnenegre, Alain; Massuti, Bartomeu; Felip, Enriqueta et al. (2012): Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): a multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. In: *The Lancet Oncology* 13 (3), S. 239–246. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70393-X.
- Ross, J. S.; Wang, K.; Elkadi, O. R.; Tarasen, A.; Foulke, L.; Sheehan, C. E. et al. (2014): Next-generation sequencing reveals frequent consistent genomic alterations in small cell undifferentiated lung cancer. In: *Journal of clinical pathology* 67 (9), S. 772–776. DOI: 10.1136/jclinpath-2014-202447.

- Russo, Alessandro; Franchina, Tindara; Ricciardi, Giuseppina Rosaria Rita; Picone, Antonio; Ferraro, Giuseppa; Zanghì, Mariangela et al. (2015): A decade of EGFR inhibition in EGFR-mutated non small cell lung cancer (NSCLC): Old successes and future perspectives. In: *Oncotarget* 6 (29), S. 26814–26825. DOI: 10.18632/oncotarget.4254.
- Sakuma, Tetsushi; Nishikawa, Ayami; Kume, Satoshi; Chayama, Kazuaki; Yamamoto, Takashi (2014): Multiplex genome engineering in human cells using all-in-one CRISPR/Cas9 vector system. In: *Scientific reports* 4, S. 5400. DOI: 10.1038/srep05400.
- Sánchez-Rivera, Francisco J.; Jacks, Tyler (2015): Applications of the CRISPR-Cas9 system in cancer biology. In: *Nature reviews. Cancer* 15 (7), S. 387–395. DOI: 10.1038/nrc3950.
- Sander, Jeffrey D.; Joung, J. Keith (2014): CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. In: *Nature biotechnology* 32 (4), S. 347–355. DOI: 10.1038/nbt.2842.
- Sanger, F.; Coulson, A. R. (1975): A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. In: *Journal of Molecular Biology* 94 (3), S. 441–448. DOI: 10.1016/0022-2836(75)90213-2.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74 (12), S. 5463–5467.
- Schmitz, Sabine (2011): *Der Experimentator: Zellkultur*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Selvaggi, G. (2004): Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. In: *Annals of Oncology* 15 (1), S. 28–32. DOI: 10.1093/annonc/mdh011.
- Sentmanat, Monica F.; Peters, Samuel T.; Florian, Colin P.; Connelly, Jon P.; Pruett-Miller, Shondra M. (2018): A Survey of Validation Strategies for CRISPR-Cas9 Editing. In: *Scientific reports* 8 (1), S. 888. DOI: 10.1038/s41598-018-19441-8.
- Serresi, Michela; Siteur, Bjorn; Hulsman, Danielle; Company, Carlos; Schmitt, Matthias J.; Liefink, Cor et al. (2018): Ezh2 inhibition in Kras-driven lung cancer amplifies inflammation and associated vulnerabilities. In: *The Journal of experimental medicine* 215 (12), S. 3115–3135. DOI: 10.1084/jem.20180801.
- Sgambato, Assunta; Casaluze, Francesca; Maione, Paolo; Rossi, Antonio; Ciardiello, Fortunato; Gridelli, Cesare (2014): Cetuximab in advanced non-small cell lung cancer (NSCLC): the showdown? In: *Journal of thoracic disease* 6 (6), S. 578–580. DOI: 10.3978/j.issn.2072-1439.2014.06.14.
- Shamsi, Monis B.; Firoz, Abdul S.; Imam, Syed N.; Alzaman, Naweed; Samman, Muhammad A. (2017): Epigenetics of human diseases and scope in future therapeutics. In: *Journal of Taibah University Medical Sciences* 12 (3), S. 205–211. DOI: 10.1016/j.jtummed.2017.04.003.
- Sharma, Shikhar; Kelly, Theresa K.; Jones, Peter A. (2010): Epigenetics in cancer. In: *Carcinogenesis* 31 (1), S. 27–36. DOI: 10.1093/carcin/bgp220.
- Sharma, Sreenath V.; Lee, Diana Y.; Li, Bihua; Quinlan, Margaret P.; Takahashi, Fumiyuki; Maheswaran, Shyamala et al. (2010): A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. In: *Cell* 141 (1), S. 69–80. DOI: 10.1016/j.cell.2010.02.027.
- Shi, Junwei; Vakoc, Christopher R. (2014): The mechanisms behind the therapeutic activity of BET bromodomain inhibition. In: *Molecular cell* 54 (5), S. 728–736. DOI: 10.1016/j.molcel.2014.05.016.
- Shi, Junwei; Wang, Eric; Milazzo, Joseph P.; Wang, Zihua; Kinney, Justin B.; Vakoc, Christopher R. (2015): Discovery of cancer drug targets by CRISPR-Cas9 screening of protein domains. In: *Nature biotechnology* 33 (6), S. 661–667. DOI: 10.1038/nbt.3235.

- Shigematsu, Hisayuki; Lin, Li; Takahashi, Takao; Nomura, Masaharu; Suzuki, Makoto; Wistuba, Ignacio I. et al. (2005): Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. In: *Journal of the National Cancer Institute* 97 (5), S. 339–346. DOI: 10.1093/jnci/dji055.
- Shilatifard, Ali (2012): The COMPASS family of histone H3K4 methylases: mechanisms of regulation in development and disease pathogenesis. In: *Annual review of biochemistry* 81, S. 65–95. DOI: 10.1146/annurev-biochem-051710-134100.
- Siegel, Rebecca L.; Miller, Kimberly D.; Jemal, Ahmedin (2019): Cancer statistics, 2019. In: *CA: a cancer journal for clinicians* 69 (1), S. 7–34. DOI: 10.3322/caac.21551.
- Sims, Robert J.; Chen, Chi-Fu; Santos-Rosa, Helena; Kouzarides, Tony; Patel, Smita S.; Reinberg, Danny (2005): Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (51), S. 41789–41792. DOI: 10.1074/jbc.C500395200.
- Sims, Robert J.; Millhouse, Scott; Chen, Chi-Fu; Lewis, Brian A.; Erdjument-Bromage, Hediye; Tempst, Paul et al. (2007): Recognition of trimethylated histone H3 lysine 4 facilitates the recruitment of transcription postinitiation factors and pre-mRNA splicing. In: *Molecular cell* 28 (4), S. 665–676. DOI: 10.1016/j.molcel.2007.11.010.
- Smits, Alexander J. J.; Kummer, J. Alain; Hinrichs, John W. J.; Herder, Gerarda J. M.; Scheidel-Jacobse, Karen C.; Jiwa, N. Mehdi et al. (2012): EGFR and KRAS mutations in lung carcinomas in the Dutch population: increased EGFR mutation frequency in malignant pleural effusion of lung adenocarcinoma. In: *Cellular oncology (Dordrecht)* 35 (3), S. 189–196. DOI: 10.1007/s13402-012-0078-4.
- Sonobe, M.; Manabe, T.; Wada, H.; Tanaka, F. (2005): Mutations in the epidermal growth factor receptor gene are linked to smoking-independent, lung adenocarcinoma. In: *British Journal of Cancer* 93 (3), S. 355–363. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602707.
- Sos, Martin L.; Koker, Mirjam; Weir, Barbara A.; Heynck, Stefanie; Rabinovsky, Rosalia; Zander, Thomas et al. (2009): PTEN loss contributes to erlotinib resistance in EGFR-mutant lung cancer by activation of Akt and EGFR. In: *Cancer research* 69 (8), S. 3256–3261. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4055.
- Stewart, Helen Jayne Susan; Horne, Gillian Abigail; Bastow, Sarah; Chevassut, Timothy James Telfer (2013): BRD4 associates with p53 in DNMT3A-mutated leukemia cells and is implicated in apoptosis by the bromodomain inhibitor JQ1. In: *Cancer medicine* 2 (6), S. 826–835. DOI: 10.1002/cam4.146.
- Straussman, Ravid; Nejman, Deborah; Roberts, Douglas; Steinfeld, Israel; Blum, Barak; Benvenisty, Nissim et al. (2009): Developmental programming of CpG island methylation profiles in the human genome. In: *Nature structural & molecular biology* 16 (5), S. 564–571. DOI: 10.1038/nsmb.1594.
- Subramanian, Janakiraman; Govindan, Ramaswamy (2007): Lung cancer in never smokers: a review. In: *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25 (5), S. 561–570. DOI: 10.1200/JCO.2006.06.8015.
- Sun, Sophie; Schiller, Joan H.; Gazdar, Adi F. (2007): Lung cancer in never smokers--a different disease. In: *Nature reviews. Cancer* 7 (10), S. 778–790. DOI: 10.1038/nrc2190.
- Takeda, Masayuki; Nakagawa, Kazuhiko (2015): Role of EGFR Monoclonal Antibodies in the Management of Non-small Cell Lung Cancer. In: *CCDT* 15 (9), S. 792–802. DOI: 10.2174/156800961509151110143001.

- Tan, Jing; Yang, Xiaojing; Zhuang, Li; Jiang, Xia; Chen, Wei; Lee, Puay Leng et al. (2007): Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. In: *Genes & development* 21 (9), S. 1050–1063. DOI: 10.1101/gad.1524107.
- Tavares e Castro, Ana; Clemente, Joana; Carvalho, L.; Freitas, Sara; Cemlyn-Jones, Jessica (2016): Small-cell lung cancer in never-smokers: A case series. In: *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 93, S. 82–87. DOI: 10.1016/j.lungcan.2016.01.006.
- Toska, Eneida; Osmanbeyoglu, Hatice U.; Castel, Pau; Chan, Carmen; Hendrickson, Ronald C.; Elkabets, Moshe et al. (2017): PI3K pathway regulates ER-dependent transcription in breast cancer through the epigenetic regulator KMT2D. In: *Science (New York, N.Y.)* 355 (6331), S. 1324–1330. DOI: 10.1126/science.aah6893.
- Troiani, Teresa; Napolitano, Stefania; Della Corte, Carminia Maria; Martini, Giulia; Martinelli, Erika; Morgillo, Floriana; Ciardiello, Fortunato (2016): Therapeutic value of EGFR inhibition in CRC and NSCLC: 15 years of clinical evidence. In: *ESMO open* 1 (5), e000088. DOI: 10.1136/esmoopen-2016-000088.
- Tsai, Cheng-Hui; Chen, Yun-Ju; Yu, Chia-Jung; Tzeng, Shiou-Ru; Wu, I-Chen; Kuo, Wen-Hung et al. (2016): SMYD3-Mediated H2A.Z.1 Methylation Promotes Cell Cycle and Cancer Proliferation. In: *Cancer research* 76 (20), S. 6043–6053. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0500.
- Tsai, Shengdar Q.; Zheng, Zongli; Nguyen, Nhu T.; Liebers, Matthew; Topkar, Ved V.; Thapar, Vishal et al. (2015): GUIDE-seq enables genome-wide profiling of off-target cleavage by CRISPR-Cas nucleases. In: *Nature biotechnology* 33 (2), S. 187–197. DOI: 10.1038/nbt.3117.
- Ullrich, A.; Coussens, L.; Hayflick, J. S.; Dull, T. J.; Gray, A.; Tam, A. W. et al. (1984): Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells. In: *Nature* 309 (5967), S. 418–425.
- Untergasser, Andreas; Cutcutache, Ioana; Koressaar, Triinu; Ye, Jian; Faircloth, Brant C.; Remm, Mairo; Rozen, Steven G. (2012): Primer3--new capabilities and interfaces. In: *Nucleic acids research* 40 (15), e115. DOI: 10.1093/nar/gks596.
- Urnov, Fyodor D.; Miller, Jeffrey C.; Lee, Ya-Li; Beausejour, Christian M.; Rock, Jeremy M.; Augustus, Sheldon et al. (2005): Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. In: *Nature* 435 (7042), S. 646–651. DOI: 10.1038/nature03556.
- Vad-Nielsen, Johan; Lin, Lin; Bolund, Lars; Nielsen, Anders Lade; Luo, Yonglun (2016): Golden Gate Assembly of CRISPR gRNA expression array for simultaneously targeting multiple genes. In: *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 73 (22), S. 4315–4325. DOI: 10.1007/s00018-016-2271-5.
- Vallianatos, Christina N.; Iwase, Shigeki (2015): Disrupted intricacy of histone H3K4 methylation in neurodevelopmental disorders. In: *Epigenomics* 7 (3), S. 503–519. DOI: 10.2217/epi.15.1.
- van der Meulen, Joni; Speleman, Frank; van Vlierberghe, Pieter (2014): The H3K27me3 demethylase UTX in normal development and disease. In: *Epigenetics* 9 (5), S. 658–668. DOI: 10.4161/epi.28298.
- van Haften, Gijs; Dalglish, Gillian L.; Davies, Helen; Chen, Lina; Bignell, Graham; Greenman, Chris et al. (2009): Somatic mutations of the histone H3K27 demethylase gene UTX in human cancer. In: *Nature genetics* 41 (5), S. 521–523. DOI: 10.1038/ng.349.
- van Laarhoven, Peter M.; Neitzel, Leif R.; Quintana, Anita M.; Geiger, Elizabeth A.; Zackai, Elaine H.; Clouthier, David E. et al. (2015): Kabuki syndrome genes KMT2D and KDM6A: functional analyses demonstrate critical roles in craniofacial, heart and brain development. In: *Human molecular genetics* 24 (15), S. 4443–4453. DOI: 10.1093/hmg/ddv180.

- Veale, D.; Ashcroft, T.; Marsh, C.; Gibson, G. J.; Harris, A. L. (1987): Epidermal growth factor receptors in non-small cell lung cancer. In: *British Journal of Cancer* 55 (5), S. 513–516.
- Vincze, Tamas; Posfai, Janos; Roberts, Richard J. (2003): NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. In: *Nucleic acids research* 31 (13), S. 3688–3691.
- Vouillot, Léna; Thélie, Aurore; Pollet, Nicolas (2015): Comparison of T7E1 and surveyor mismatch cleavage assays to detect mutations triggered by engineered nucleases. In: *G3 (Bethesda, Md.)* 5 (3), S. 407–415. DOI: 10.1534/g3.114.015834.
- Wang, Shu-Ping; Tang, Zhanyun; Chen, Chun-Wei; Shimada, Miho; Koche, Richard P.; Wang, Lan-Hsin et al. (2017): A UTX-MLL4-p300 Transcriptional Regulatory Network Coordinately Shapes Active Enhancer Landscapes for Eliciting Transcription. In: *Molecular cell* 67 (2), 308-321.e6. DOI: 10.1016/j.molcel.2017.06.028.
- Waring, Michael J.; Chen, Huawei; Rabow, Alfred A.; Walker, Graeme; Bobby, Romel; Boiko, Scott et al. (2016): Potent and selective bivalent inhibitors of BET bromodomains. In: *Nature chemical biology* 12 (12), S. 1097–1104. DOI: 10.1038/nchembio.2210.
- Wee, Ping; Wang, Zhixiang (2017): Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation Signaling Pathways. In: *Cancers* 9 (5). DOI: 10.3390/cancers9050052.
- Will, Cindy L.; Lührmann, Reinhard (2011): Spliceosome structure and function. In: *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3 (7). DOI: 10.1101/cshperspect.a003707.
- Wu, Qibiao; Tian, Yahui; Zhang, Jian; Tong, Xinyuan; Huang, Hsinyi; Li, Shuai et al. (2018): In vivo CRISPR screening unveils histone demethylase UTX as an important epigenetic regulator in lung tumorigenesis. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (17), E3978-E3986. DOI: 10.1073/pnas.1716589115.
- Wu, Shwu-Yuan; Chiang, Cheng-Ming (2007): The double bromodomain-containing chromatin adaptor Brd4 and transcriptional regulation. In: *The Journal of biological chemistry* 282 (18), S. 13141–13145. DOI: 10.1074/jbc.R700001200.
- Xia, Hui; Zhang, Wen; Li, Yingjie; Guo, Nannan; Yu, Changhai (2014): EZH2 silencing with RNA interference induces G2/M arrest in human lung cancer cells in vitro. In: *BioMed research international* 2014, S. 348728. DOI: 10.1155/2014/348728.
- Xu, Chunhua; Hao, Keke; Hu, Huidi; Sheng, Zhihong; Yan, Jun; Wang, Qingbo; Yu, Like (2014): Expression of the enhancer of zeste homolog 2 in biopsy specimen predicts chemoresistance and survival in advanced non-small cell lung cancer receiving first-line platinum-based chemotherapy. In: *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)* 86 (2), S. 268–273. DOI: 10.1016/j.lungcan.2014.09.010.
- Yang, Wanjuan; Soares, Jorge; Greninger, Patricia; Edelman, Elena J.; Lightfoot, Howard; Forbes, Simon et al. (2013): Genomics of Drug Sensitivity in Cancer (GDSC): a resource for therapeutic biomarker discovery in cancer cells. In: *Nucleic acids research* 41 (Database issue), D955-61. DOI: 10.1093/nar/gks1111.
- Yang, Yeqing Angela; Yu, Jindan (2013): EZH2, an epigenetic driver of prostate cancer. In: *Protein & cell* 4 (5), S. 331–341. DOI: 10.1007/s13238-013-2093-2.
- Yang, Zhiyuan; He, Nanhai; Zhou, Qiang (2007): Brd4 Recruits P-TEFb to Chromosomes at Late Mitosis To Promote G1 Gene Expression and Cell Cycle Progression. In: *Molecular and cellular biology* 28 (3), S. 967–976. DOI: 10.1128/MCB.01020-07.
- Yano, Seiji; Nakataki, Emiko; Ohtsuka, Shinsaku; Inayama, Mami; Tomimoto, Hideki; Edakuni, Nobutaka et al. (2005): Retreatment of lung adenocarcinoma patients with gefitinib who had experienced favorable results from their initial treatment with this selective epidermal growth factor receptor inhibitor: a report of three cases. In: *Oncology research* 15 (2), S. 107–111.

- Yin, Shanye; Yang, Jing; Lin, Bin; Deng, Wenjun; Zhang, Yuchao; Yi, Xianfu et al. (2014): Exome sequencing identifies frequent mutation of MLL2 in non-small cell lung carcinoma from Chinese patients. In: *Scientific reports* 4, S. 6036. DOI: 10.1038/srep06036.
- Yu, Helena A.; Arcila, Maria E.; Rekhtman, Natasha; Sima, Camelia S.; Zakowski, Maureen F.; Pao, William et al. (2013): Analysis of Tumor Specimens at the Time of Acquired Resistance to EGFR TKI therapy in 155 patients with EGFR mutant Lung Cancers. In: *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 19 (8), S. 2240–2247. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2246.
- Yun, Cai-Hong; Mengwasser, Kristen E.; Toms, Angela V.; Woo, Michele S.; Greulich, Heidi; Wong, Kwok-Kin et al. (2008): The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (6), S. 2070–2075. DOI: 10.1073/pnas.0709662105.
- Zetsche, Bernd; Gootenberg, Jonathan S.; Abudayyeh, Omar O.; Slaymaker, Ian M.; Makarova, Kira S.; Essletzbichler, Patrick et al. (2015): Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. In: *Cell* 163 (3), S. 759–771. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038.
- Zetsche, Bernd; Volz, Sara E.; Zhang, Feng (2015): A split-Cas9 architecture for inducible genome editing and transcription modulation. In: *Nature biotechnology* 33 (2), S. 139–142. DOI: 10.1038/nbt.3149.
- Zhan, Tianzuo; Rindtorff, Niklas; Betge, Johannes; Ebert, Matthias P.; Boutros, Michael (2018): CRISPR/Cas9 for cancer research and therapy. In: *Seminars in cancer biology*. DOI: 10.1016/j.semcancer.2018.04.001.
- Zhang, Haikuo; Qi, Jun; Reyes, Jaime M.; Li, Lewyn; Rao, Prakash K.; Li, Fugen et al. (2016): Oncogenic Deregulation of EZH2 as an Opportunity for Targeted Therapy in Lung Cancer. In: *Cancer discovery* 6 (9), S. 1006–1021. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-16-0164.
- Zhang, Huijun; Zhang, Hui; Zhao, Mingchuan; Lv, Zhongwei; Zhang, Xiaoping; Qin, Xiong et al. (2013): MiR-138 inhibits tumor growth through repression of EZH2 in non-small cell lung cancer. In: *Cellular physiology and biochemistry: international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 31 (1), S. 56–65. DOI: 10.1159/000343349.
- Zhang, Jiyuan; Dominguez-Sola, David; Hussein, Shafinaz; Lee, Ji-Eun; Holmes, Antony B.; Bansal, Mukesh et al. (2015): Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. In: *Nature medicine* 21 (10), S. 1190–1198. DOI: 10.1038/nm.3940.
- Zhang, Xiao-Hui; Tee, Louis Y.; Wang, Xiao-Gang; Huang, Qun-Shan; Yang, Shi-Hua (2015): Off-target Effects in CRISPR/Cas9-mediated Genome Engineering. In: *Molecular therapy. Nucleic acids* 4, e264. DOI: 10.1038/mtna.2015.37.
- Zhang, Xuewu; Gureasko, Jodi; Shen, Kui; Cole, Philip A.; Kuriyan, John (2006): An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. In: *Cell* 125 (6), S. 1137–1149. DOI: 10.1016/j.cell.2006.05.013.
- Zhao, Yue; Liu, Qi; Acharya, Pankaj; Stengel, Kristy R.; Sheng, Quanhu; Zhou, Xiaofan et al. (2016): High Resolution Mapping of RNA Polymerases Identifies Mechanisms of Sensitivity and Resistance to BET Inhibitors in t (8;21) AML. In: *Cell reports* 16 (7), S. 2003–2016. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.07.032.
- Zhou, Caicun; Wu, Yi-Long; Chen, Gongyan; Feng, Jifeng; Liu, Xiao-Qing; Wang, Changli et al. (2011): Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study. In: *The Lancet Oncology* 12 (8), S. 735–742. DOI: 10.1016/S1470-2045(11)70184-X.

Zhou, Wenjun; Ercan, Dalia; Chen, Liang; Yun, Cai-Hong; Li, Danan; Capelletti, Marzia et al. (2009): Novel mutant-selective EGFR kinase inhibitors against EGFR T790M. In: *Nature* 462 (7276), S. 1070–1074. DOI: 10.1038/nature08622.

Zhu, Liangsong; Wang, Jianfeng; Kong, Wen; Huang, Jiwei; Dong, Baijun; Huang, Yiran et al. (2018): LSD1 inhibition suppresses the growth of clear cell renal cell carcinoma via upregulating P21 signaling. In: *Acta Pharmaceutica Sinica B*. DOI: 10.1016/j.apsb.2018.10.006.

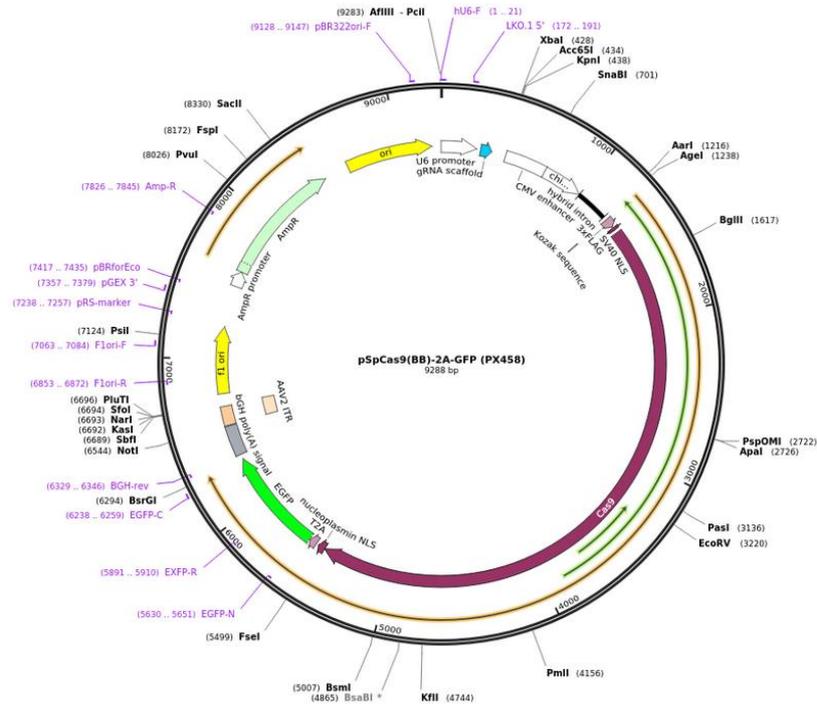
Zingg, Daniel; Debbache, Julien; Schaefer, Simon M.; Tuncer, Eylul; Frommel, Sandra C.; Cheng, Phil et al. (2015): The epigenetic modifier EZH2 controls melanoma growth and metastasis through silencing of distinct tumour suppressors. In: *Nature communications* 6, S. 6051. DOI: 10.1038/ncomms7051.

Zou, Zhong-Kai; Huang, Yi-Qun; Zou, Yong; Zheng, Xu-Ke; Ma, Xu-Dong (2017): Silencing of LSD1 gene modulates histone methylation and acetylation and induces the apoptosis of JeKo-1 and MOLT-4 cells. In: *International journal of molecular medicine* 40 (2), S. 319–328. DOI: 10.3892/ijmm.2017.3032.

Zuber, Johannes; Shi, Junwei; Wang, Eric; Rappaport, Amy R.; Herrmann, Harald; Sison, Edward A. et al. (2011): RNAi screen identifies Brd4 as a therapeutic target in acute myeloid leukaemia. In: *Nature* 478 (7370), S. 524–528. DOI: 10.1038/nature10334.

Anhang

A. Vektorkarte pSpCas9 (BB)-2A-GFP



B. sgRNA-Designs der Kandidatengene *BRD4* und *KMT2D*

sgRNA Design für Kandidatengene *BRD4* Exon 1

all guides

scored by inverse likelihood of offtarget binding
 mouse over for details ... [show legend](#)

	score	sequence
Guide #1	91	AGTCATCCTACACGGGCTCTT TGG
Guide #2	88	GCCARGCCAAAGACCCGTGT AGG
Guide #3	87	AAGACCCGTGTAGGATGACT GGG
Guide #4	85	AAAGACCCGTGTAGGATGAC TGG
Guide #5	84	GTGCCATGTGGCCATAAGC TGG
Guide #6	82	GAGGCCAGTCATCCTACAC GGG
Guide #7	82	TCCTACACGGGCTTTGGCT TGG
Guide #8	80	TGACTTAAGACCCAGCTTAT GGG
Guide #9	76	TGCCATGTGGCCATAAGCT GGG
Guide #10	74	AGAGGCCAGTCATCCTACA CCG
Guide #11	71	CTGACTTAAGACCCAGCTTA TGG
Guide #12	70	CACTTTGTGTATCCCATCAG TGG
Guide #13	65	ACAGTGGCAACCCACCAAG GGG
Guide #14	64	GACCCAGCTTATGGGCCACA TGG
Guide #15	63	CTGATGGTACAGCAAGTG TGG
Guide #16	62	CACAGTGGCAACCCACCAA GGG
Guide #17	61	ACAGCAAAGTGTGGTGCTGC TGG

guide #1 quality score: 91

guide sequence: AGTCATCCTACACGGGCTCTT TGG

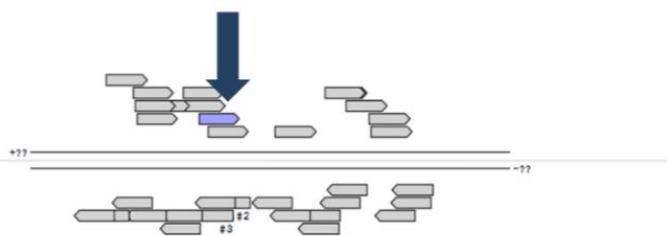
on-target locus: unknown

number of offtarget sites: 47 (4 are in genes)

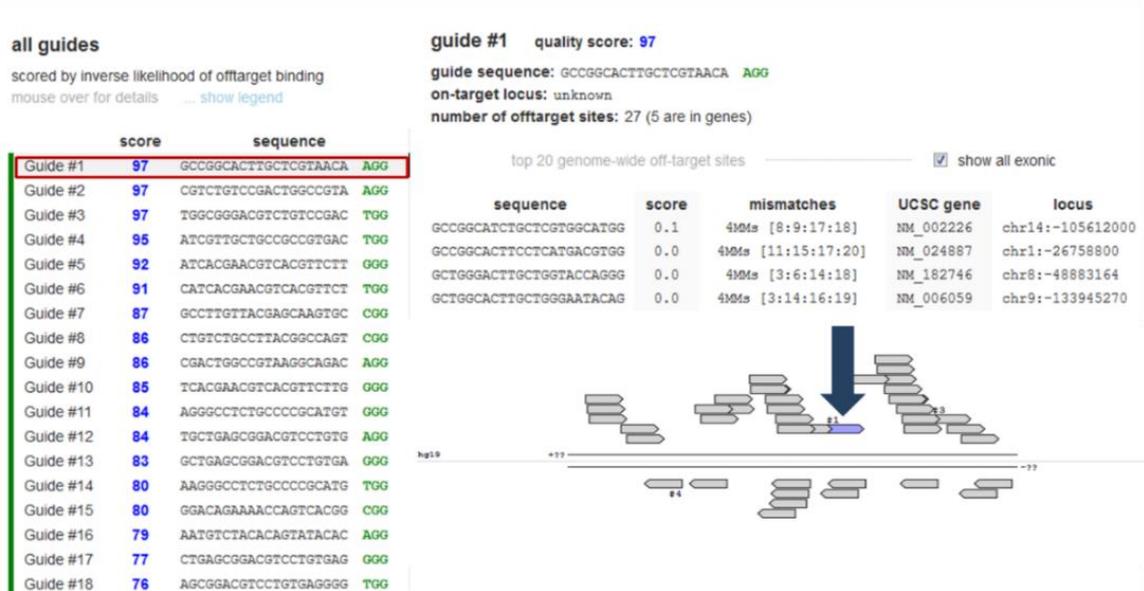
top 20 genome-wide off-target sites

show all exonic

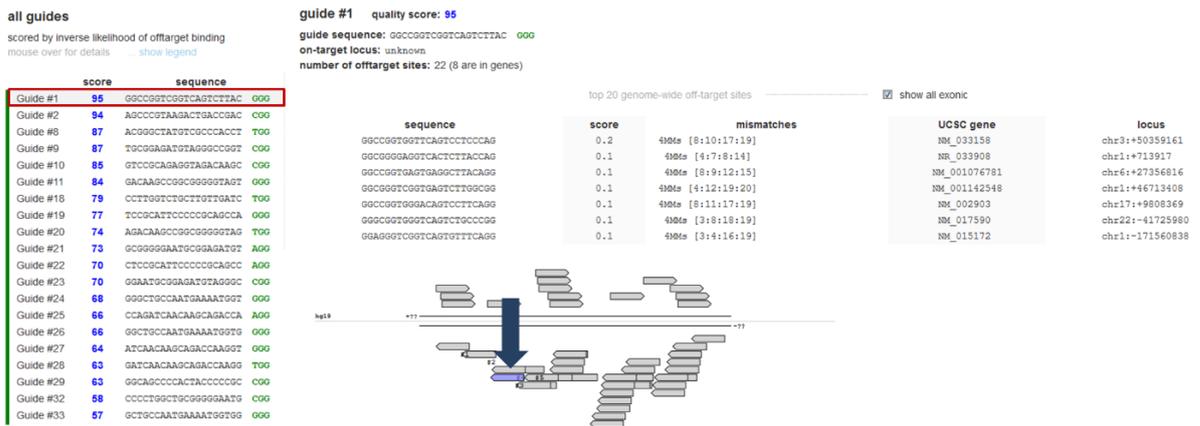
sequence	score	mismatches	UCSC gene	locus
AGTCACGTGACACGGGCTTAAG	0.3	4Mts [6:7:8:9]	NM_014883	chr4:+89978374
AGTTACCCCTACAAGGGCTTTGG	0.1	4Mts [4:6:13:17]	NR_039975	chr4:+185815329
AGTCATCCACCACGGGTTTGAGG	0.1	4Mts [9:10:18:20]	NM_001204425	chr13:-103524672



sgRNA Design für Kandidatengen *BRD4* Exon 20



sgRNA Design für Kandidatengen *KMT2D* Exon 31



sgRNA Design für Kandidatengen *KMT2D* Exon 48

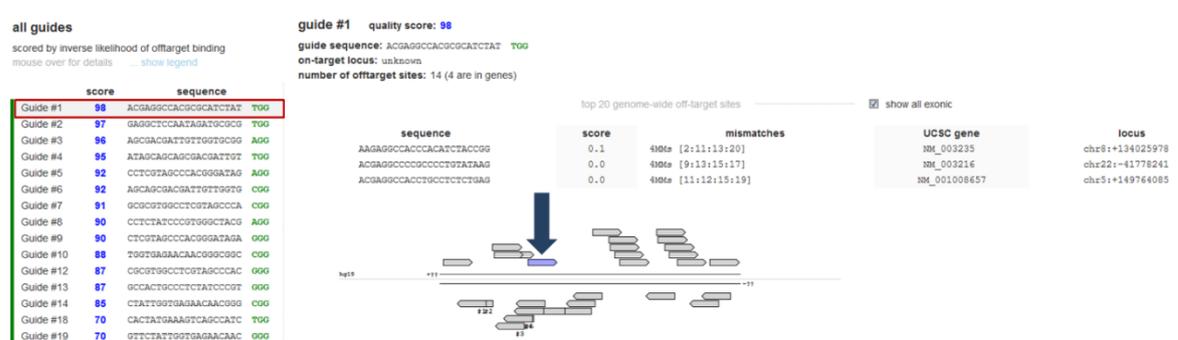


Abb. B.: Übersicht sgRNA-Design für die Kandidatengene *KMT2D* und *BRD4*.

C. Zellviabilitäts-Analysen

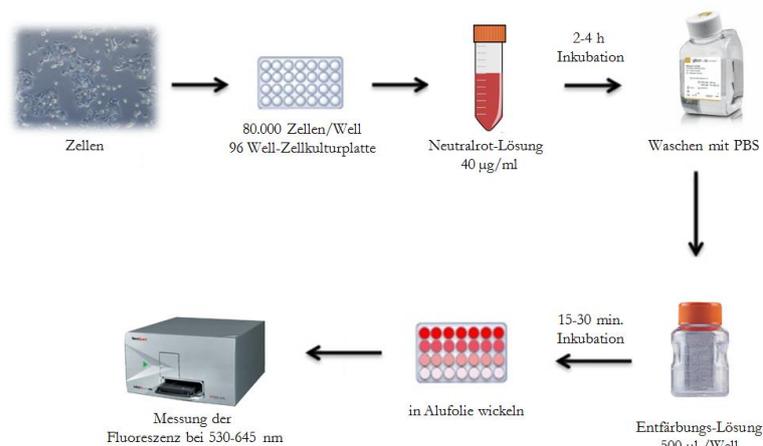


Abb. C.: Versuchsaufbau Neutralrot-Test. Grafik modifiziert nach: Ripetto et al., 2008.

D. Software Programme

Tabelle D. Software-Programme.

Programm	Version	Anbieter
cbiportal	Version 1.11.4-SNAPSHOT	Center for Molecular Oncology at MSK
CLC workbench	10.0.0 BxS	Qiagen
ConsensusPathDB	Release 32 (11.01.2017)	MPI for Molecular Genetics
Excel	2016	Microsoft
GREAT	Version 3.0.0	University of California, Santa Cruz (UCSC)
IGV Viewer	Version 2.3.72	Broad Institute
Image lab	Version 5.2 build14 (11.9.2014)	BioRad
Leica application suite AF	Version 2.2.1 build 4842 (2005-2009 Leica Microsystems)	Leica
Nano Drop	Version 3.1.0	Thermofisher
Primer3Web	Version 4.1.0 (1996-2017)	Whitehead Institute for Biomedical Research
Reverse complement UCSC	Onlineversion human GRCh37/hg19	Bioinformatics.org University of California, Santa Cruz (UCSC)

E. Sequenzierung CRISPR CAS9-Mutanten

BLAT Search Results **Größe der Deletion von Exon 31-Exon 41 = 11000bp**

Go back to chr12:49041364-49041745 on the Genome Browser.

ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN	
browser	details	Klon	114	1	115	116	100.0%	12	+	49030668	49041519	10852
browser	details	Klon	20	14	33	116	100.0%	4	-	48994176	48994195	20

```
>Seq A76
AGCTGGCTCTGCCATTGACTGGGCAGCCACTGCCAAAGGGGGCAAAGAGGCTAAAATTG
GCGGTGATAGCAGGCTCCGTACGGGCTATGTCGCCACCTTGGTCTGCTTGTGAA
```

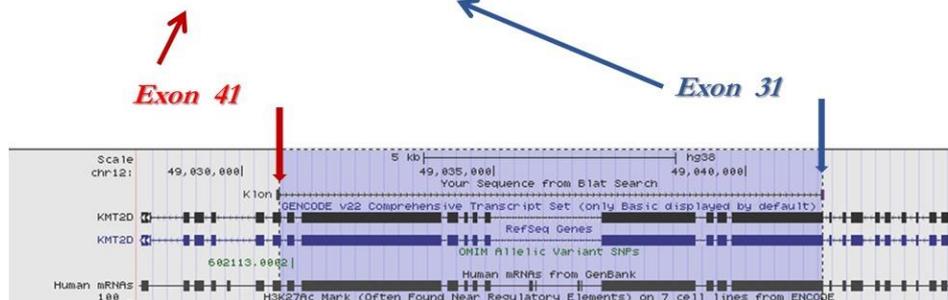


Abb.E.1: Sanger-Sequenzierung des *KMT2D*-Klons A76. Oben: Die Analyse der Sequenzierung erfolgte mit BLAT im *UCSC Browser*. Mitte: In der Sequenz der FASTA-Datei sind die Region von Exon 31 (blau markiert) und Exon 41 (rot markiert), in der die Deletion induziert wurde farblich hervorgehoben. Unten: Beim Vergleich der Sequenz mit der Wildtypform des *KMT2D*-Gens kann der Bereich der eingeführten Mutation deutlich unterschieden werden.

Human BLAT Results

BLAT Search Results **Größe der Deletion von Exon 31-Exon 48 = 15262bp**

ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN	
browser	details	Seq	103	10	232	607	97.3%	12	+	49026255	49041567	15313
browser	details	Seq	26	226	257	607	79.4%	10	-	113690108	113690136	29

```
> Seq B6
CATCATTCACCCGTTTGTTCACCCATAGAACAGCGATAGCAGCAGCGACGATTGTTGGTG
CGGAGGCTCCAATATACGGGCTATGTCGCCACCTTGGTCTGCTTGTGAAACAATATTCT
TTGTAACITGACGACATCTTCAGCCCTTTCTAAAAAATAATCCAGACATAGTTATCTAT
CAATACATGGGTGATTGCTGTATCTCTAACTTATTTTAGGGCAGTCAGACAAAAAT
AAAGGAAGTGAATAACATCTGTTGAGGTGGGGATTAACCTCACACATAAAAAACATCA
CATAGAACCTCCTTCTTTGGATGGGTAATGAATCCATCCTGATCAATGGACTGACAA
CCTATACCGCTGCCGAAAAAAGACAGCTGGACTGTGACTGACATTCAGAAGTAAATGGGA
ATATTGAATTGGGCATGTCAGATTTAACTATGGATTAAGAAAAGCAGTTATGTAATCTC
CTTAGGGGAACAAAACACTAACAAAAGTAGTACCACATAACAAAAGAGGCAGAGCTAAAA
CTGGCAGAAACAGGGAATATCTAATAGACACAGTACATGGATTAATAAATACCCAATAA
ATAAAAC
```

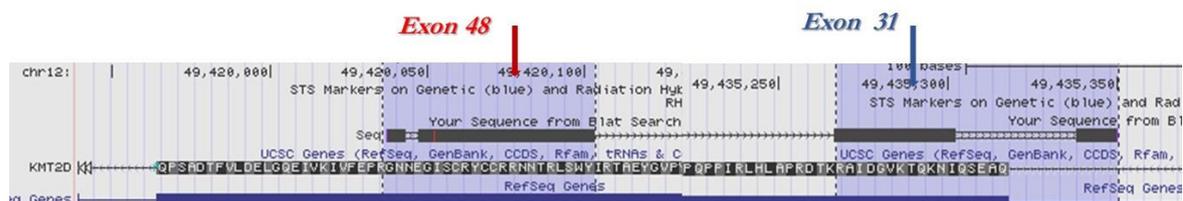


Abb.E.2: Sanger-Sequenzierung des *KMT2D*-Klons B6 in BLAT des *UCSC Browser*s. Oben: Analyse der Sanger-Sequenz in BLAT. Mitte: In der Sequenz der FASTA-Datei ist der Deletionsbereich von Exon 31 (blau) und Exon 48 (rot) farblich markiert. Unten: Beim Vergleich der Sequenzen zwischen dem CRISPR CAS9 Klon und dem *KMT2D*-Wildtyp in *UCSC* ist die deletierte Region in der Mutante deutlich zu erkennen.

BLAT Search Results **Größe der Deletion von Exon 1-Exon 20 = 42000bp**

Go back to chr19:15338167-15401853 on the Genome Browser.

ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN	
browser	details	E87	244	16	278	278	98.5%	19	-	15348781	15391238	42458
browser	details	E87	20	71	90	278	100.0%	12	+	86520900	86520919	20

```
>Seq E87_premix -- unclipped
CAGGCAACATTTTCTAGTCTGACTTAGACCCTCTTATGGCCACATG
GCACCCGCTGCTTCTGAATCAAGCAGGCCACTGATGGGTACAGCAA
ATGTGGTGCTGCTGGCCAACCCAAAGTACGAGCAAGTGCCGGCTG
GACCAAGCCCTGCATCCCCAATGCGGGGCAAAGCCCTTCTCTCC
GCCAAATGTCTACACAGTATACACAGGACATCGTTGCTGCCCCGCTG
ACTGTTTTTCTGTCCCAAGAACGTGACGTTCTGTATGTCTGCC
```

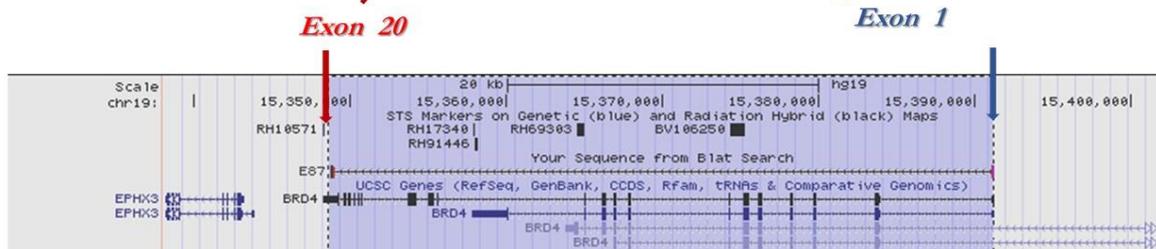


Abb.E.3: Sanger-Sequenzierung des *BRD4*-Klons E87. In der FASTA-Sequenz ist der Übergang zwischen Exon 1 (blau) und 20 (rot) farblich hervorgehoben. Bei der Visualisierung im *UCSC Browser* kann die Deletion im Klon eindeutig ermittelt werden.

BLAT Search Results **Größe der Deletion von Exon 1-Exon 20 = 42000bp**

Go back to chr19:15338166-15401860 on the Genome Browser.

ACTIONS	QUERY	SCORE	START	END	QSIZE	IDENTITY	CHRO	STRAND	START	END	SPAN	
browser	details	E114	273	17	290	291	100.0%	19	-	15348783	15391245	42463
browser	details	E114	22	77	98	291	100.0%	6	-	39026928	39026949	22
browser	details	E114	22	23	45	291	100.0%	5	+	61789886	61789909	24
browser	details	E114	20	84	103	291	100.0%	12	+	86520900	86520919	20

```
>Seq E114_premix -- unclipped
GAAATTTTGTCTCTCGTCTAGAGAAGTCTGACTTAAGACCCAGCTTATGGGCCACATGGCA
CCCAGCTGCTTCTGCAGAGAAGGCAGGCCACTGATGGGTACAGCAAAGTGTGGTGCTGCT
GGCCAAGCCAAAGTACGAGCAAGTGCCGGCTGGACCAAGCCCTGCATCCCCACATGCGG
GGCAGAGGCCTTCTCTCCGCAAAGTCTACACAGTATACACAGGACATCGTTGCTGCC
GCCGTGACTGGTTTTTCTGTCCCAAGAACCTGACGTTCTGTATGTCTCTGCA
```

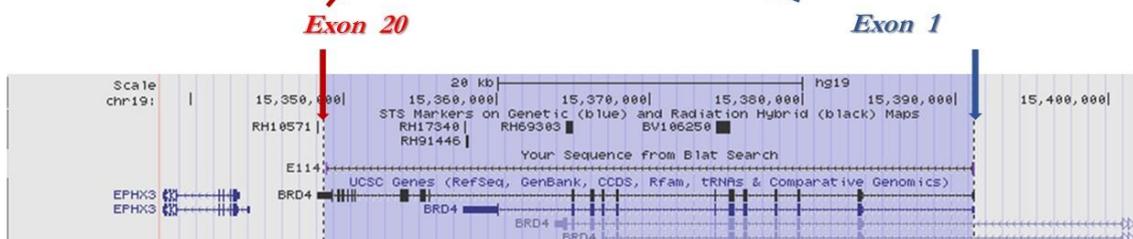


Abb.E.4: Sanger-Sequenzierung des *BRD4*-Klons E114. In der FASTA-Sequenz ist der Übergang zwischen Exon 1 (blau) und 20 (rot) farblich markiert. Im *UCSC Browser* ist die Deletion im Klon gegenüber der Wildtypform des *BRD4*-Gens deutlich zu erkennen.

F. Proliferationsunterschiede der KMT2D-Mutanten in %

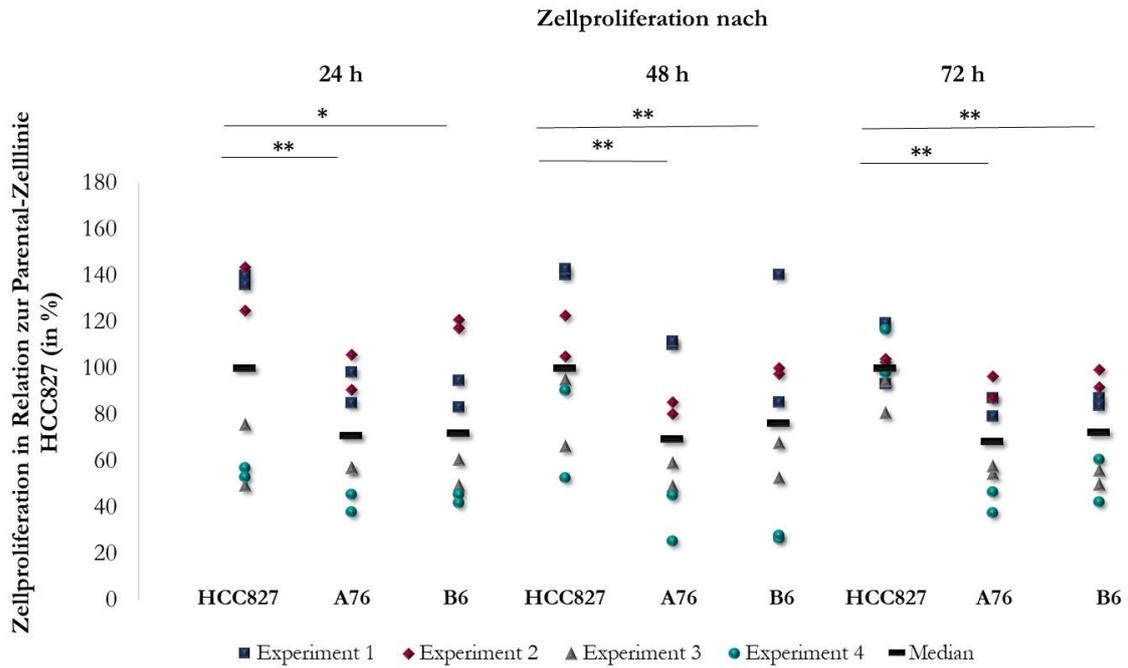


Abb. F.: Vergleich der Zellproliferation zwischen den *KMT2D*-Mutanten und der Parental-Zelllinie HCC827 in %. Die Proliferation der Zellen wurde über einen Zeitraum von 72 h untersucht. Die Ermittlung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer. Die Versuchsreihe wurde im Quadruplikat durchgeführt. Die Wachstumsunterschiede sind in beiden Mutanten im Verhältnis zur Parental-Zelllinie HCC827 in einer verlangsamt Proliferation festzustellen (t-Test aus vier unabhängigen Versuchen, zweiseitig gepaart).

G. Wi38 vs. Wi38 H₂O₂-gestresste ChIP-Seq Annotations- und Signalweganalysen

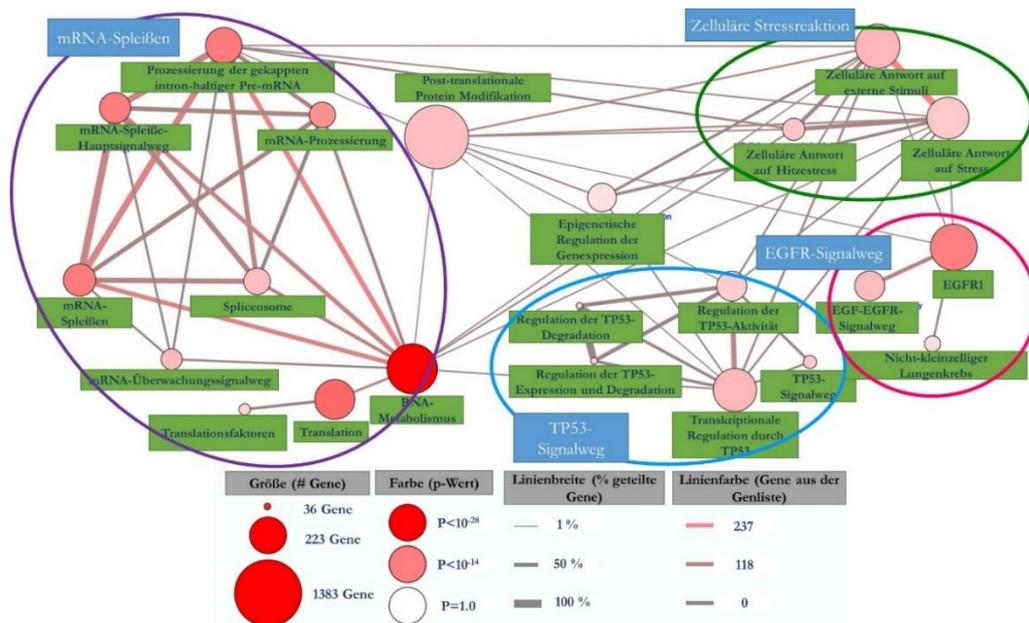


Abb. G.: ConsensusPathDB-Analyse der ChIP-Seq generierten Genliste von H3K4me3 Wi38 vs. H3K4me3 Wi38 mit einer H₂O₂-Behandlung nach einer Regenerationszeit von 24 h. Dargestellt wird die Analyse von überrepräsentierten Signalwegen. Es wurden Signalwege detektiert, die beim Spleißprozess (violett markiert), den EGFR-Signalweg (pink markiert) als auch bei der zellulären Stressantwort (grün markiert) und dem TP53-Signalweg (hellblau markiert) eine

Rolle spielen. Legende: Die Größe der Knotenpunkte spiegelt die Anzahl der involvierten Gene wider, wobei der Farbcode die Signifikanz des p-Wertes darstellt. Die Linienstärke zwischen den verknüpften Knotenpunkten zeigt den prozentualen Anteil der Gene, die in den detektierten Signalwegen kongruent sind. Die Farbintensität der Linien verweist auf die Anzahl der Gene aus der Eingangsliste, die in den jeweiligen Signalwegen vertreten sind.

H. HCC827 vs. A549 ChIP-Seq Annotations- und Signalweganalysen

Tabelle H.1. Anreicherung der Signalwege der HCC827 vs. A549 ChIP-Seq in ConsensusPathDB.

Signalweg	p-Wert	Quelle des Signalwegs
Genexpression	5,940E-28	Reactome
EGFR1	4,190E-15	NetPath
RNA-Metabolismus	1,900E-13	Reactome
Posttranslationale Proteinmodifikation	7,420E-12	Reactome
Signalwege bei Krebs	2,390E-11	KEGG
Regulation der Transkription durch TP53	2,350E-09	Reactome
Zelluläre Reaktionen auf äußere Reize	5,750E-09	Reactome
EGF-EGFR-Signalweg	9,990E-09	Wikipathways
Verarbeitung von gecappter Intron-enthaltender Prä-mRNA	2,690E-07	Reactome
Zelluläre Reaktionen auf Stress	9,270E-07	Reactome
mRNA-Spleißen	2,770E-06	Reactome
Translation	6,570E-06	Reactome
mRNA-Spleißen - Hauptsignalweg	8,830E-06	Reactome
Epigenetische Regulation der Genexpression	1,890E-05	Reactome
Regulierung der TP53-Aktivität	9,360E-05	Reactome
Chromatin modifizierende Enzyme	9,380E-05	Reactome
Chromatin-Organisation	9,380E-05	Reactome
mRNA-Prozessierung	1,800E-04	Wikipathways
Zelluläre Antwort auf Hitzestress	3,890E-04	Reactome

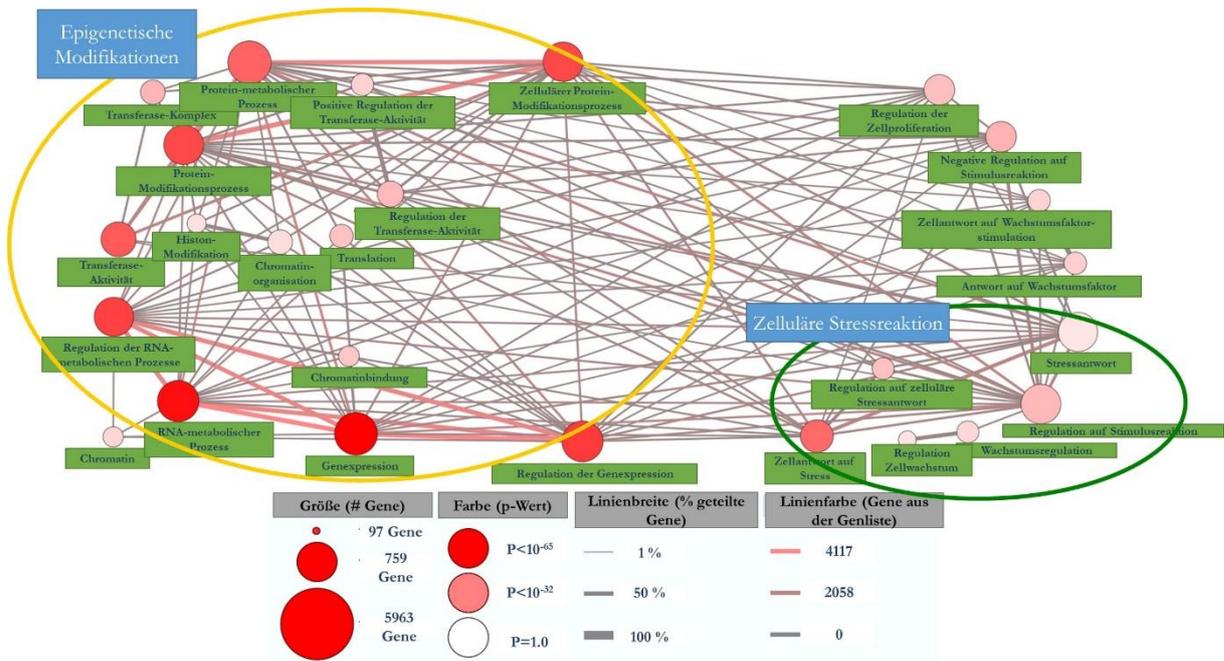


Abb.H: GO-Analyse der HCC827 ChIP-Seq in ConsensusPathDB. Eine sehr starke Anreicherung ist in epigenetisch relevanten Signalwegen (gelb markiert) festzustellen. Legende: Die Größe der Knotenpunkte spiegelt die Anzahl der involvierten Gene wider, wobei die Farbintensität die Signifikanz des p-Wertes darstellt. Die Linienstärke zwischen den verknüpften Knotenpunkten zeigt den prozentualen Anteil der Gene, die in den detektierten Signalwegen kongruent sind. Die Farbintensität der Linien verweist auf die Anzahl der Gene aus der Eingangsliste, die in den jeweiligen Signalwegen vertreten sind. Identifizierte Signalwege der zellulären Zellantwort sind grün markiert.

Tabelle H.2. Genliste der NESTs-Analyse aus dem Datenset der HCC827 vs. A549 ChIP-Seq.

Name des Gens	p-Wert
TP53	2,750E-89
SF3A1	1,870E-59
SF3A3	2,420E-56
SF3B1	6,600E-55
LSD1	1,690E-52
SF3B2	1,900E-52
SF3B6	3,040E-52
SF3B3	5,480E-51
ASH2	4,140E-48
SF3B4	5,910E-44
KMT2D	1,570E-37
SF3A2	6,440E-34
CBP	6,840E-27
CHD1	1,990E-23
MDM2	5,470E-19
SF3B5	1,010E-18
KMT2A	1,490E-12
KMT2B	5,200E-12
EZH2	2,700E-10

KMT2C	3,380E-07
UTX	4,830E-07
SMYD3	6,930E-05
BRD4	8,070E-04
KMT2E	1,040E-03

I. Untersuchung der Zellviabilität nach der Induktion von Hitzestress

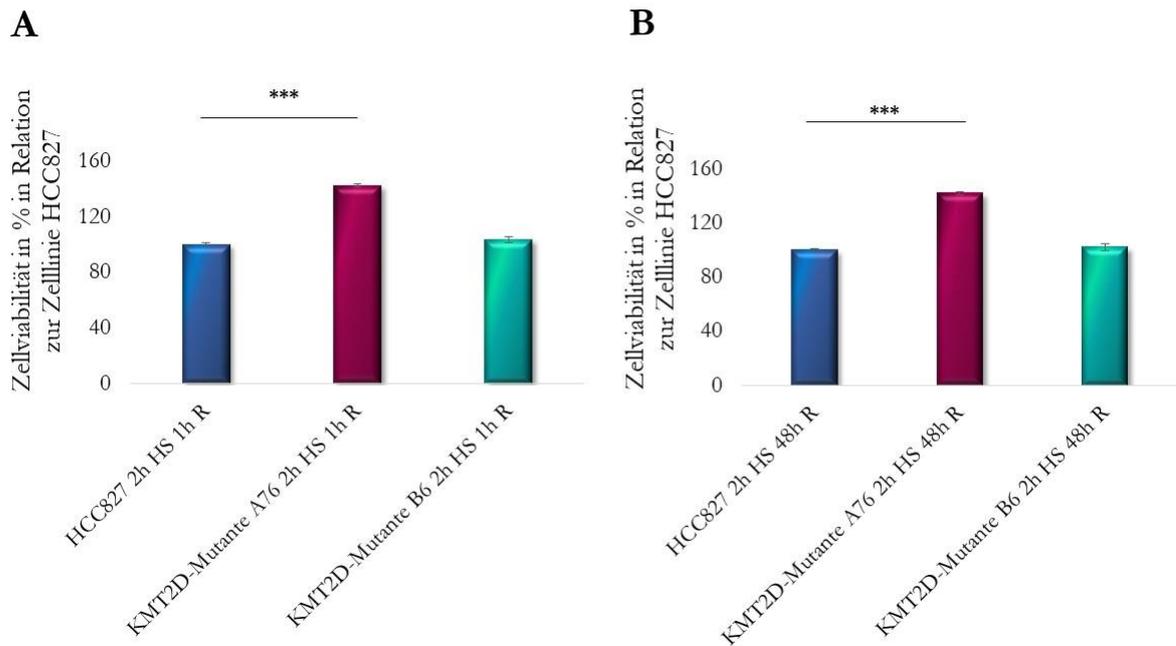


Abb.I: Zellviabilität nach einer Hitzeschock-Dauer von 2 h. Dargestellt wird der Vergleich der Zellviabilität zwischen den *KMT2D*-Mutanten im Verhältnis zur Zelllinie HCC827. Die *KMT2D*-Mutante A76 zeigt eine um 42 % signifikant erhöhte Viabilität. Die *KMT2D*-Mutante B6 weist keine signifikanten Veränderungen in der Viabilität in Relation zur Parental-Zelllinie auf. A: Vergleich der Zellviabilität nach einer Regenerationszeit von 1 h. B: Vergleich der Zellviabilität nach einer Regenerationszeit von 48 h (t-Test zweiseitig gepaart; Duplikat). Legende: HS: Hitzestress bei 42 °C, R: Regenerationszeit.

J. Visualisierung SF3B4 im UCSC-Browser

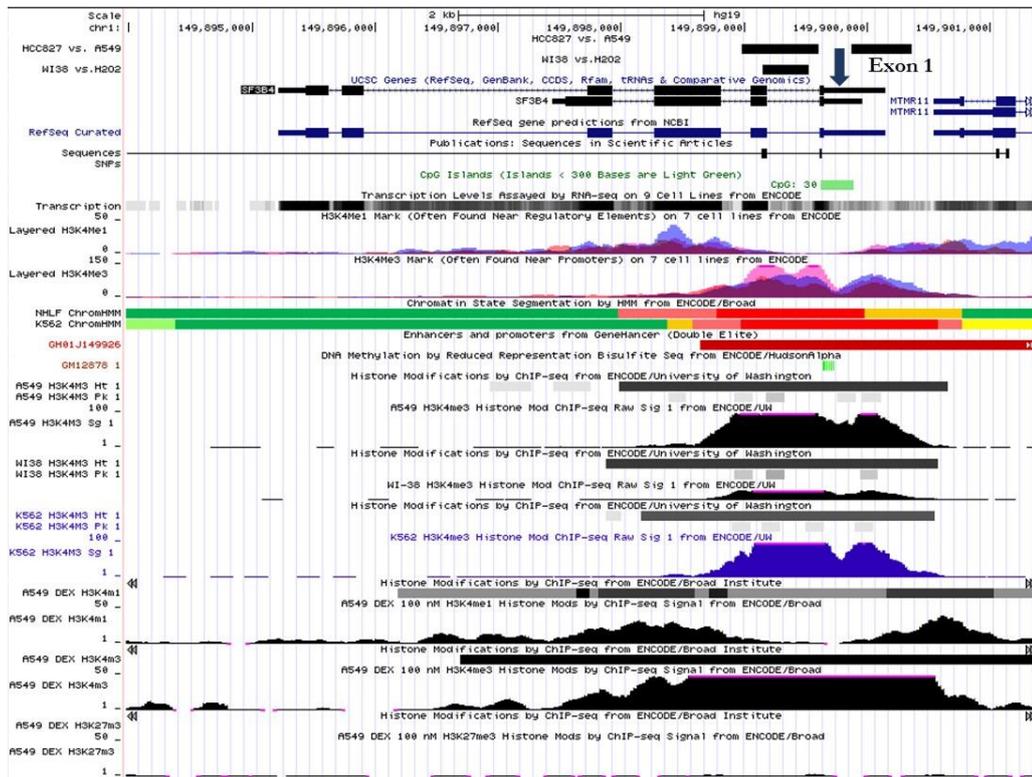


Abb.J: Visualisierung der H3K4me3 ChIP-Seq Analysen am Beispiel des Spleiß-Faktors SF3B4 im UCSC Browser. Für SF3B4 kann eine H3K4me3-abhängige Promotorspezifität festgestellt werden.

K. Chemotherapie-Experimente

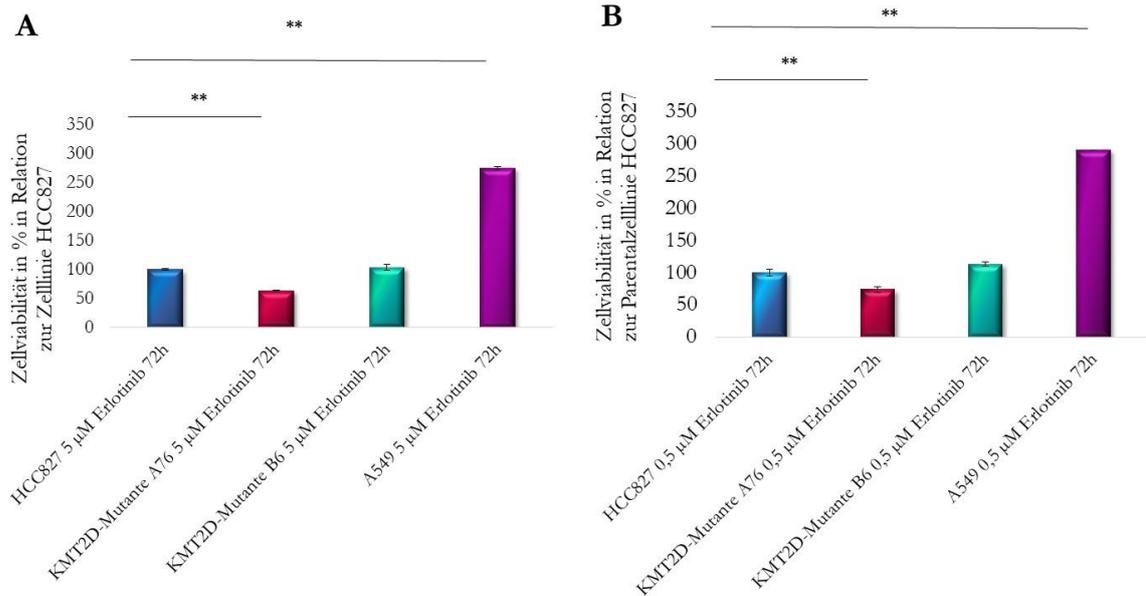


Abb.K.1: Vergleich der Zellviabilität nach einer Applikation des Chemotherapeutikums Erlotinib. Die KMT2D-Mutante A76 zeigt ein signifikant erhöhtes Absterben im Zellwachstum und weist damit eine wesentlich höhere Sensitivität gegenüber einer Erlotinib-Behandlung auf. A: Vergleich der Zellviabilität in Relation der Parental-Zelllinie

HCC827 bei einer Konzentration von 0,5 μM Erlotinib (t-Test, zweiseitig gepaart). Darstellung eines Duplikats. B: Vergleich der Zellviabilität in Relation der Parental-Zelllinie HCC827 bei einer Konzentration von 5 μM Erlotinib (t-Test zweiseitig gepaart). Darstellung eines Duplikats.

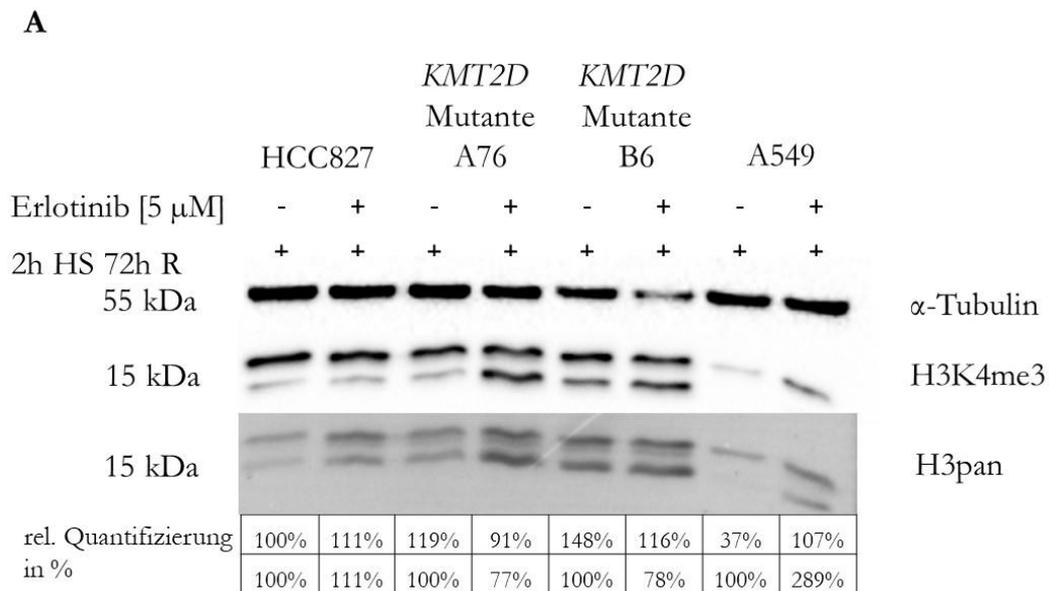


Abb.K.2: Untersuchung der H3K4me3-Expression in der Western Blot Analyse. A: Untersuchung der Proteinexpression des H3K4me3-Methylierung nach einer Kombinationsbehandlung mit einem Hitzestress und 5 μM Erlotinib. Durch einen zusätzlichen Hitzeschock kann ein Angleichungseffekt in der H3K4me3-Expression festgestellt werden.

Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel “ Funktionelle Untersuchung von genetischen Faktoren mit prognostischer Relevanz in der Onkologie” selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. In der Arbeit verwendete Aussagen anderer Autoren habe ich durch Quellenangaben kenntlich gemacht. Alle Ausführungen, die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Schriften entnommen sind, habe ich als solche durch Quellenangabe kenntlich gemacht. Die vorliegende Arbeit wurde in keinem früheren Promotionsverfahren eingereicht oder als ungenügend beurteilt.

Berlin, den

(Anne Steinbach)