

Identifizierung von epigenetischen Masterregulatoren der Alterung im humanen hämatopoietischen System

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Nina Graffmann

aus Düsseldorf

Düsseldorf, März 2013

aus dem Institut für Transplantationsdiagnostik und Zelltherapeutika
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. Markus Uhrberg
Korreferent: Prof. Dr. Thomas Klein

Tag der mündlichen Prüfung: 06.05.2013

„Die Welt ist immer nur in dem Maße
kompliziert, wie man in der Lage ist,
sie zu begreifen.“

Rebecca Gablé, Das zweite Königreich

INHALT

Inhalt	4
Abkürzungsverzeichnis.....	9
1. Zusammenfassung.....	12
2. Summary	14
3. Einleitung.....	15
3.1 Alterung	15
3.1.1 Alterung als Defekt in der Homöostase	15
3.1.2 Alterung im Immunsystem.....	17
3.1.3 Alterung in der Hämatopoese	19
3.1.3.1 Hämatopoese.....	19
3.1.3.2 Hämatopoietische Stammzellen.....	20
3.1.3.3 Alterung von HSC.....	21
3.2 Epigenetik	23
3.2.1 DNA-Methylierung.....	23
3.2.1.1 Die Rolle von DNA-Methylierung in der Alterung und der Tumorentstehung.....	24
3.2.2 Histonmodifikationen.....	25
3.2.3 Polycomb Gruppen Komplexe.....	27
3.2.3.1 Aufbau von PRC2	27
3.2.3.2 Aufbau von PRC1	31
3.2.3.3 Polycomb Antagonisten	32
3.2.3.4 Funktionen des PRC2	32
3.3 Ziel der Arbeit.....	37
4. Material und Methoden	38
4.1 Material	38
4.1.1 Geräte	38
4.1.2 Materialien für die Molekularbiologie.....	39
4.1.2.1 Chemikalien und Enzyme	39
4.1.2.2 Kits für die Molekularbiologie.....	40
4.1.2.3 Antikörper für ChIP-Assay und Western Blot.....	41
4.1.2.4 Primer.....	41
4.1.2.5 TaqMan Assays.....	45

Inhalt

4.1.2.6	Programme und Datenbanken.....	45
4.1.2.7	Referenzsequenzen.....	46
4.1.2.8	Materialien für die Bakterienkultur.....	47
4.1.2.9	Verwendete Bakterien.....	47
4.1.2.10	Vektoren.....	48
4.1.3	Materialien für die Zellkultur.....	50
4.1.3.1	Mediumgrundlagen und Puffer.....	50
4.1.3.2	Zelllinien.....	51
4.1.3.3	Primäre Zellen.....	51
4.1.3.4	Zellkulturmedien.....	52
4.1.3.5	Kits für die Zellkultur.....	53
4.1.3.6	Antikörper und Farbstoffe für Durchflusszytometrie-Färbungen.....	53
4.1.4	Puffer und Lösungen.....	55
4.1.4.1	DEPC-Wasser.....	56
4.2	Methoden.....	57
4.2.1	molekularbiologische Methoden.....	57
4.2.1.1	RNA Isolation.....	57
4.2.1.2	Reverse Transkription.....	58
4.2.1.3	PCR.....	60
4.2.1.4	Agarosegelelektrophorese.....	65
4.2.1.5	5'-RACE (<i>rapid amplification of cDNA ends</i>).....	66
4.2.1.6	Klonierung und Transformation von Bakterien.....	69
4.2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	75
4.2.2.1	Kernextraktion.....	75
4.2.2.2	Proteinbestimmung.....	75
4.2.2.3	Histonaufreinigung.....	76
4.2.2.4	FPLC.....	76
4.2.2.5	ELISA.....	77
4.2.2.6	Western Blot.....	78
4.2.2.7	ChIP-Assay.....	82
4.2.2.8	ChIP-on-chip Analyse mit NimbleGen Arrays.....	84
4.2.3	Zellbiologische Methoden.....	89
4.2.3.1	Durchflusszytometrie.....	89
4.2.3.2	Isolierung von CD34 ⁺ hämatopoietischen Progenitorzellen.....	90

Inhalt

4.2.3.3	Zellkultur.....	93
4.2.3.4	Überexpression und Herabregulation von Genen.....	96
4.2.3.5	Virusproduktion.....	101
4.2.3.6	NK-Zell-Generierung.....	103
4.2.3.7	Kolonie-Assay.....	104
5.	Ergebnisse.....	107
5.1	Screening zur Identifikation von epigenetischen Masterregulatoren der Alterung in hämatopoietischen Zellen.....	107
5.2	Detaillierte Expressionsanalysen der PRC2 Kernkomponenten und ihrer Antagonisten.....	110
5.2.1	Ausschluss des Einflusses eines <i>EED</i> -Pseudogens auf die Expressionsanalysen.....	110
5.2.2	Expressionsanalyse der PRC2 Kernkomponenten und ihrer Antagonisten.....	112
5.2.3	Einfluss von G-CSF auf die Expression von <i>EED</i>	114
5.2.4	Analyse der <i>EED</i> -Expression in höherem Alter.....	115
5.3	Rolle von <i>EED</i> in der Seneszenz von Fibroblasten.....	116
5.4	Alterungsassoziierter Anstieg der repressiven Histonmodifikation H3K27me3.....	117
5.4.1	Globale Analyse der Verteilung von H3K27me3 und H3K4me3 in HPC von Neugeborenen und Erwachsenen.....	119
5.4.2	Assoziation der modifizierten Promotoren mit zellulären Prozessen.....	123
5.4.3	Eine Gruppe alters- und krebsassoziierter Polycomb Zielgene weist in Erwachsenen verstärkt H3K27me3 auf.....	126
5.4.4	Detailanalyse ausgewählter Gene.....	127
5.5	Etablierung von Systemen zur Überexpression und Herabregulation von <i>EED</i>	130
5.5.1	Analyse der humanen <i>EED</i> mRNA Sequenz.....	130
5.5.2	Analyse der <i>EED</i> 5' Region mittels 5' RACE.....	132
5.5.3	Herstellung verschiedener Überexpressionskonstrukte.....	134
5.5.3.1	Test der <i>EED</i> -Überexpression in Zelllinien.....	134
5.5.3.2	Einfluss der Überexpression von <i>EED</i> auf die Menge an H3K27me3.....	137
5.5.3.3	Einfluss der Überexpression von <i>EED3</i> in der Langzeitkultur.....	141

5.5.4	Einfluss der <i>EED</i> -Überexpression auf die Alterung von Zellen der Linie NK3.3.....	143
5.5.5	Herabregulation von <i>EED</i>	146
5.6	Einfluss der <i>EED</i> Menge auf das Differenzierungspotenzial primärer CD34 ⁺ HPC.....	150
5.6.1	Einfluss der <i>EED</i> -Überexpression auf die NK-Zell-Generierung	150
5.6.1.1	Veränderung der Oberflächenmarker während der NK-Zell-Generierung.....	155
5.6.1.2	Einfluss der <i>EED1</i> -Überexpression auf die NK-Zell-Generierung	157
5.6.2	Einfluss der Reduktion von <i>EED</i> auf die NK-Zell-Generierung	159
5.6.3	Einfluss der <i>EED</i> -Überexpression auf die Myelopoese.....	163
6.	Diskussion	167
6.1	Identifikation von <i>EED</i> als epigenetischen Masterregulator der Alterung in der Hämatopoiese.....	167
6.1.1	Der Einfluss der PRC2-Antagonisten auf die altersassoziierte Zunahme von H3K27me3 ist vernachlässigbar	169
6.1.2	G-CSF übt keinen Einfluss auf die Expression von <i>EED</i> aus.....	169
6.1.3	Die <i>EED</i> Expression steigt mit zunehmendem Alter weiter an	170
6.1.4	Die Polycomb vermittelte repressive Histonmodifikation H3K27me3 nimmt im Alter zu	171
6.2	Altersassoziiertes Anstieg der antagonistischen Histonmodifikationen H3K27me3 und H3K4me3	172
6.2.1	Globale Histonmodifikationsanalysen deuten auf eine fortschreitende Determinierung des Differenzierungspotentials in HPC aus älteren Individuen hin	174
6.2.2	Altersassoziierte Zellfunktionen weisen in Apheresat verstärkt die aktivierende Histonmodifikation H3K4me3 auf.....	175
6.2.3	Qualitative Veränderungen der bivalenten Domänen.....	176
6.2.4	H3K27me3 nimmt an altersassoziierten Polycomb Zielgenen zu und korreliert mit dem DNA-Hypermethylierungsstatus dieser Gene.....	176
6.2.5	Altersassoziierte Veränderungen der Histonmodifikationen führen zu Expressionsänderungen von hämatopoiese-relevanten Transkriptionsfaktoren	177
6.3	<i>EED</i> -Überexpression führt zu einem Anstieg von H3K27me3	178

Inhalt

6.3.1	Der putative <i>EED</i> -Promotorbereich liegt stromabwärts des bislang angenommenen Translationsstarts von <i>EED1</i>	178
6.3.2	<i>EED1</i> beginnt deutlich weiter stromabwärts als bislang angenommen	179
6.3.3	Durch Überexpression von <i>EED3</i> kann der altersassoziierte Anstieg von <i>H3K27me3</i> nachgestellt werden	181
6.4	Die Herabregulation von <i>EED</i> weist starke zelltypspezifische Unterschiede auf	181
6.5	Einfluss der <i>EED</i> -Menge auf das Entwicklungspotential von primären humanen <i>CD34⁺</i> HPC	183
6.5.1	Überexpression von <i>EED</i> verlangsamt die NK-Zellentwicklung	183
6.5.1.1	Nachweis eines myeloiden „Umwegs“ bei der NK-Zell-Generierung	185
6.5.1.2	Überexpression von <i>EED1</i> verschärft den entwicklungsverzögernden Polycomb-Effekt in der NK-Zell-Generierung	186
6.5.2	Herabregulation von <i>EED</i> hat keinen Einfluss auf die Lymphopoiese	187
6.5.3	<i>EED</i> -Überexpression hat keinen Einfluss auf die Myelopoiese	187
6.6	Einfluss von <i>EED</i> und <i>PRC2</i> auf die Alterung im humanen hämatopoietischen System	188
7.	Ausblick	191
7.1	Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der Rolle von <i>EED</i> und <i>PRC2</i> in der gesunden und malignen Hämatopoiese	191
7.2	Weiterführung der Charakterisierung der verschiedenen <i>EED</i> -Isoformen	193
8.	Anhang	195
8.1	Bei der MicroFluidic Card verwendete TaqMan Assays	195
8.2	Alignment der humanen <i>EED</i> mRNA Sequenzen mit dem X-chromosomalen <i>EED</i> Pseudogen	196
8.3	Analyse von myeloischen Markern in einer wildtypischen NK-Zell-Generierungskultur	200
9.	Literatur	201
10.	Danksagung	216
11.	Eidesstattliche Versicherung	219

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AEBP2	AE Binding Protein 2
ALL	akute lymphoblastische Leukämie
AML	akute myeloische Leukämie
APC	Allophycocyanin
BFU-E	Burstforming units-erythrocyte
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CD	Cluster of Differentiation
cDNA	complementary (= komplementäre) DNA
CFU-GEMM	Colony forming units-granulocyte, erythrocyte, monocyte, megakaryocyte
CFU-GM	Colony forming units- granulocyte, monocyte
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
cMYC	cellular Myelocytomatose
CpG	Cytosin-Guanin Dinukleotid
CT	threshold Cycle
Cy	Cyanin
DAVID	Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-triphosphat
DNMT	DNA Methyltransferase
EED	Embryonic Ectoderm Development
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
esc	extra sex combs
ESR1	estrogen receptor 1
ez	enhancer of zeste
EZH1	Enhancer of Zeste 1
EZH2	Enhancer of Zeste 2
Fc	fragment, crystallizable
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Flk2	fetale Leber Kinase 2 (= flt3)
Flt3	FMS-like Tyrosin Kinase (= flk2)
FPLC	fast protein liquid chromatography
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-CSF	Granulocyte-colony stimulating factor
ggf.	gegebenenfalls
GO	Gene Ontology
Gy	Gray
HLA	humanes Leukozyten-Antigen-System

Abkürzungsverzeichnis

HOX	homeobox
HPC	hematopoietic Progenitor Cell (hämatopoietische Progenitorzelle)
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JARID2	Jumonji, AT Rich Interactive Domain 2
JMJD3	Jumonji D3
kb	Kilobase(n)
kDa	Kilodalton
KIR	Killer-cell Immunoglobulin like receptor
LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1
LINE	long interspersed element
M	molar
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MDS	myelodysplastisches Syndrom
min	Minute(n)
miR-	microRNA
MYT	myelin transcription factor
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	messenger RNA
ncRNA	non-coding RNA
NK-Zelle	natürliche Killer-Zelle
OD	optische Dichte
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
PCR	polymerase chain reaction
PML	Promyelocytic leukemia
PRC	Polycomb Repressive Complex
PE	Phytoerythrin
RACE	rapid amplification of cDNA ends
RBAP46/48	Retinoblastoma Protein Associated Protein 46/48
RISC	RNA induced silencing complex
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
RUNX1	runt-related transkription factor 1
s	Sekunde(n)
Sca1	stem cell antigen 1
SCF	Stem Cell Factor
SET	<u>S</u> u-(var)3-9; <u>E</u> (z); <u>T</u> rithorax
shRNA	small hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
slamfl	Signaling lymphocytic activation molecule
sog.	So genannt
SUZ12	Suppressor of Zeste 12
t	Zeit

Abkürzungsverzeichnis

Tab.	Tabelle
T _m	Schmelztemperatur
U	unit(s); Aktivitätseinheit für Enzyme
u. a.	unter anderem
UTX	ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene on X-chromosome
vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
WD-40	Tryptophan-Asparaginsäure 40
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid
YY1	Ying Yang 1
z.B.	zum Beispiel

1. ZUSAMMENFASSUNG

In einer immer älter werdenden Bevölkerung ist es essentiell die der Alterung zu Grunde liegenden Faktoren zu verstehen, um eine adäquate medizinische Versorgung zu gewährleisten und um die Zeitspanne des gesunden Lebens zu verlängern. Da das menschliche Immunsystem einen entscheidenden Beitrag zur Gesundheit und Lebensqualität im Alter leistet, und seine korrekte Funktion untrennbar mit der Funktion der hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen zusammenhängt, stellen diese ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung von molekularen Mechanismen der Alterung dar.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass der Polycomb Faktor EED eine Rolle in der Alterung von humanen hämatopoietischen Progenitorzellen (HPC) spielt. Es konnte in dieser Studie erstmalig gezeigt werden, dass die *EED*-Expression im Zuge der Alterung sowohl in CD34⁺ HPC, als auch in Leukozyten ansteigt und, dass dies mit einer Zunahme der Polycomb-vermittelten repressiven Histonmodifikation H3K27me3 korreliert. Dies ist Teil einer tiefen altersassoziierten Veränderung des Epigenoms, die nicht nur, wie schon lange bekannt, die DNA-Hypomethylierung, sondern neben H3K27me3 auch die Zunahme der aktivierenden Histonmodifikation H3K4me3 beinhaltet.

Es konnte in dieser Arbeit ebenfalls erstmals gezeigt werden, dass sich das Gleichgewicht der beiden antagonistischen Histonmodifikationen H3K27me3 und H3K4me3 in humanen HPC im Alter verändert. Dies wird bei entwicklungsrelevanten Genen deutlich, die, sofern sie in der Hämatopoese keine Rolle spielen, verstärkt durch H3K27me3 reprimiert werden. Sind sie hingegen relevant für die Hämatopoese, so werden sie durch H3K4me3 der Transkriptionsmaschinerie zugänglich gemacht. Daneben ist das verstärkte Vorliegen von H3K27me3 an ehemals bivalenten Promotoren in HPC älterer Individuen vermutlich ursächlich für die im Zuge der Alterung von differenzierten Leukozyten sowie der Entartung von Tumorzellen beobachtete verstärkte DNA-Methylierung an diesen Loci.

Weiterhin geben die beobachteten altersassoziierten Veränderungen in der Verteilung der beiden antagonistischen Histonmodifikationen auch Hinweise auf die Ursachen des myeloiden Bias älterer HPC, da eine Korrelation zwischen Veränderungen im Histonmodifikationsmuster und der Genexpression von Transkriptionsfaktoren der unterschiedlichen hämatopoietischen Linien nachgewiesen werden konnte. Die Auswirkungen des veränderten Histonmodifikationsgleichgewichts in HPC älterer Individuen zeigen sich aber auch in einer epigenetisch erhöhten Transkriptionsbereitschaft von Genen, die im Zusammenhang mit Apoptose und Abbau von degenerierten Proteinen stehen, beides

Zusammenfassung

Funktionen, die im Alter aufgrund der Akkumulation von beschädigten Makromolekülen und DNA-Mutationen besonders benötigt werden.

Erstmalig wurden in dieser Arbeit auch die Auswirkungen der EED-Überexpression auf die Differenzierung von primären humanen HPC untersucht. Während die Erhöhung der EED-Expression die Myelopoese nicht beeinflusst, verzögert sie die Lymphopoese, indem sie den Übergang von transienten myeloiden Zwischenstufen zu reifen natürlichen Killerzellen verlangsamt. Dies deutet darauf hin, dass es hier einen Zusammenhang zwischen erhöhter Polycombaktivität und reduzierter Flexibilität im Entwicklungspotential gibt.

2. SUMMARY

One of today's major challenges for medical research is to improve health status and quality of life in the light of a population that is continuously growing older. To this end, understanding the molecular mechanisms of aging is essential. The immune system is an important mediator of health and quality of life until higher ages and its function is inseparably tied to the function of hematopoietic stem and progenitor cells. Thus, investigating aging of these cells promises to give insights into essential molecular mechanism of aging.

The present study suggests that the Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) member EED is involved in human hematopoietic progenitor cell (HPC) aging. It is shown for the first time, that expression of *EED* increases in CD34⁺ HPC as well as in leukocytes of elderly donors, which leads to an increase in the PRC2 mediated repressive histone mark H3K27me3. This is part of a series of profound age-associated epigenetic changes. It is shown here that the increase of H3K27me3 during aging is accompanied by an increase of the activating histone mark H3K4me3. Both histone modifications occupy different classes of promoters in young and old HPCs. In HPCs from old donors genes important for hematopoiesis are marked by H3K4me3, while those important for other lineages are repressed by H3K27me3. H3K27me3 also increases during aging at loci that are bivalent in ES cells and probably interacts here with DNA methyltransferases, as these loci often acquire *de novo* methylation and become repressed in differentiated leukocytes of old donors as well as in tumors. Genes that are increasingly needed during aging, like those important for apoptosis and degradation of proteins, however, are preferentially modified by the activating histone mark in older HPCs.

Furthermore, expression changes of transcription factors important for the different hematopoietic lineages correlate well with the altered distribution of the opposing histone marks during aging. This explains, at least in part, the observed myeloid bias of hematopoietic stem and progenitor cells from older individuals.

In order to further investigate the functional relevance of increased EED expression during hematopoiesis, several *in vitro* differentiation assays were performed. Thus it could be demonstrated for the first time, that increased EED expression does not interfere with myelopoiesis, while it retards natural killer (NK) cell development by slowing down the transition of myeloid progenitors towards the NK-lineage. This indicates a correlation between increased Polycomb activity and reduced epigenetic plasticity.

3. EINLEITUNG

3.1 Alterung

Weltweit steigt die menschliche Lebenserwartung kontinuierlich an. Schon heute liegt in Europa der Anteil der über 65-jährigen bei ca. 17% und wird bis 2060 voraussichtlich auf etwa 30% steigen [1]. Dies ist zu einem Großteil der Verbesserung der medizinischen Versorgung zu verdanken, verlangt allerdings auch, dass diese immer weiter den Bedürfnissen der alternden Bevölkerung angepasst werden muss [2]. Im Gegensatz zu früheren Jahrzehnten, wo eine immense Steigerung der Lebenserwartung durch Reduktion der Sterblichkeit im Kindes- oder jungem Erwachsenenalter erreicht wurde, ist es heutzutage essentiell, die Behandlung der Erkrankungen älterer Menschen wie Krebs oder Alzheimer zu verbessern, um die Lebenserwartung weiterhin zu erhöhen [2]. Um zusätzlich auch die Lebensqualität im Alter zu gewährleisten, müssen daneben Wege gefunden werden die Gesundheit möglichst lange zu erhalten und das Einsetzen altersbedingter Krankheiten zu verzögern oder sogar zu verhindern. Hierzu ist es notwendig die zellulären und molekularen Vorgänge, die der Alterung zu Grunde liegen, zu verstehen.

3.1.1 Alterung als Defekt in der Homöostase

Alterung kann allgemein definiert werden, als „ein progressiver Funktionsverlust in Verbindung mit einem Rückgang an Fruchtbarkeit und einer Zunahme an Sterblichkeit“ [3]. Der Funktionsverlust betrifft nach und nach alle Organe. So geht im Alter z.B. die Immunantwort zurück, Verletzungen an Muskelzellen können schlechter repariert werden, das Erscheinungsbild und die Integrität der Haut verändern sich und die regenerative Kapazität von Leberzellen nimmt ab [4-9]. In einem jungen Organismus wird die Integrität der Gewebe aufrechterhalten indem defekte oder abgestorbene Zellen durch gewebespezifische adulte Stammzellen ersetzt werden [10,11].

Stammzellen sind dadurch charakterisiert, dass sie sich zum einen selbst reproduzieren können, und zum anderen in der Lage sind differenzierte Tochterzellen zu produzieren [12]. Je nach Entwicklungsstadium verlieren sie hierbei an Differenzierungspotential. Während pluripotente embryonale Stammzellen (ES-Zellen) noch jeden beliebigen Zelltyp generieren können, beschränkt sich das Repertoire von adulten Stammzellen auf wenige Zelltypen eines Gewebes [10,13-15]. Die Anforderungen an die regenerative Kapazität gewebespezifischer Stammzellen hängen stark vom jeweiligen Gewebe ab (Abb. 1). So müssen z.B. in Nerven

oder Muskeln relativ selten Zellen erneuert werden, während hämatopoietische Stammzellen ständig die kurzlebigen und vielfältigen Zellen des Blutes neu bilden müssen [10].

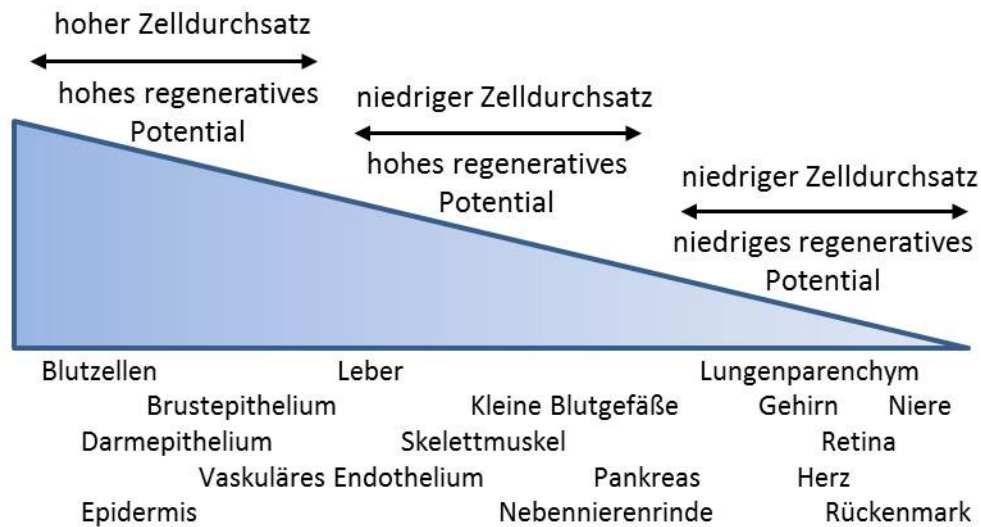


Abb. 1: Abhängigkeit der Homöostase unterschiedlicher Gewebe von der Regenerierung durch Stammzellen [10]

Einige Gewebe, wie Blut oder Epithelien haben ein hohes regeneratives Potential und einen hohen Zelldurchsatz, während Gewebe wie Muskeln selten erneuert werden, dies nach Verletzungen aber aufgrund ihres hohen regenerativen Potentials problemlos möglich ist. Organe mit einem geringen regenerativen Potential wie das Herz oder Nerven, können bei Verletzung schlecht repariert werden und die Zellen erneuern sich normalerweise nicht.

Die gewebespezifischen Stammzellen unterliegen, wie auch die ausdifferenzierten Zellen, dem Prozess der Alterung. Die genauen molekularen Grundlagen hierfür sind allerdings nicht bekannt. Man weiß jedoch, dass es im Alter zu einer Ansammlung von Schäden an Makromolekülen wie z.B. Mutationen der genomischen und mitochondrialen DNA [16-18], Verkürzung der Telomere [19-21], oxidativen Schäden und Proteinaggregaten [22,23] in differenzierten und undifferenzierten Zellen kommt. Diese Schäden entstehen zum Teil durch extrinsische Einflüsse, wie z.B. UV-Licht oder mutagene Stoffe [8,24-26]. Zusätzlich tragen aber auch reaktive Sauerstoffspezies (*reactive oxygene spezies*; ROS), die als Nebenprodukte des Stoffwechsels anfallen [22,27-29], sowie replikationsbedingte DNA-Mutationen zu einem Verlust der Integrität der zellulären Makromoleküle bei [16,17,30]. Dies ist eng mit einem veränderten Genexpressionsprofil der Zellen verknüpft. So zählen zu den altersassoziierten Veränderungen in der Genexpression eine Hochregulation von Genen, die mit der Stressantwort oder Entzündungsreaktionen verbunden sind, während Gene, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind, herabreguliert werden [31,32]. Interessanterweise lassen sich

allerdings Veränderungen im Genexpressionsmuster bis auf wenige Ausnahmen weder von Zelltyp zu Zelltyp, noch von Spezies zu Spezies übertragen [32].

Bis zu einem gewissen Grad ist jede Zelle in der Lage, die erworbenen Schäden zu reparieren [16,17,22,23,33-36]. Wenn dies nicht mehr adäquat geschieht, werden die betroffenen Zellen entweder seneszent und verlassen irreversibel den Zellzyklus, oder sie sterben durch Apoptose [37-39]. Beide Mechanismen dienen dem Schutz des gesamten Organismus, da die korrekte Funktion der betroffenen Zellen nicht mehr gewährleistet ist und die Möglichkeit besteht, vor allem bei einer Ansammlung an DNA-Schäden, dass die Zelle entartet.

All dies führt dazu, dass adulte Stammzellen mit zunehmendem Alter immer schlechter in der Lage sind, die Homöostase des betreffenden Gewebes/Organsystems zu gewährleisten. Somit beeinflusst die Alterung der Stammzellen schlussendlich die Alterung des gesamten Organismus [10,40].

3.1.2 Alterung im Immunsystem

Das Immunsystem lässt sich in zwei große Bereiche unterteilen, das angeborene und das adaptive Immunsystem. Zum angeborenen Immunsystem gehören die Leukozyten aus der myeloiden Linie (Monozyten/Macrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen) und die der lymphoiden Linie angehörenden natürlichen Killer (NK)-Zellen [41]. Zellen des angeborenen Immunsystems erkennen meist allgemeine Strukturen von Pathogenen und bekämpfen diese durch Phagozytose oder durch Zellyse. Außerdem produzieren sie Zytokine, die die Zellen des adaptiven Immunsystems zum Ort der Infektion leiten und z.T. auch für Entzündungen sorgen.

Zu den Zellen des adaptiven Immunsystems zählen die T- und B-Lymphozyten. Sie zeichnen sich dadurch aus, dass sie, nach erstmaligem Kontakt mit einem Pathogen, gezielt Rezeptoren ausbilden, die hochspezifisch Antigene erkennen, die für dieses Pathogen charakteristisch sind. In der akuten Phase einer Erkrankung expandieren die Zellen, die das auslösende Pathogen erkennen stark, danach geht die Anzahl zurück, es bleiben jedoch sog. *Memory*-Zellen zurück, die bei erneuter Erkrankung eine rasche Immunreaktion gewährleisten.

Im Zuge der Alterung unterliegt das Immunsystem einigen Veränderungen. Zunächst einmal bildet sich mit dem Thymus der Ort zurück, an dem T-Zellen reifen, sodass sich mit zunehmendem Alter immer weniger naive T-Zellen auf ein Antigen spezialisieren können, was die Effizienz der adaptiven Immunantwort deutlich schwächt [42]. Gleichzeitig nimmt die Zahl der *Memory*-T-Zellen, die auf die Erkennung von chronisch vorliegenden Antigenen,

wie z.B. dem Zytomegalievirus (CMV), spezialisiert sind zu, was das T-Zellrepertoire weiter einschränkt [43].

Auch die Entwicklung von B-Zellen verändert sich mit dem Alter. Trotz eines Rückgangs an B-Zell-Vorläufern, bleibt die Menge an reifen B-Zellen im Alter konstant. Allerdings verschiebt sich hier, genau wie bei den T-Zellen auch, das Gleichgewicht zugunsten von *Memory*-Zellen. Die Bildung von hochspezifischen Antikörpern ist im Alter ebenfalls reduziert. Dies liegt zum einen daran, dass das B-Zell-*Homing* in den sekundären Lymphorganen sowie die Interaktion mit T-Zellen im Alter zurückgehen. Zum anderen nimmt auch die Fähigkeit zur somatischen Hypermutation ab, was insgesamt zu einer Bildung von weniger spezifischen Antikörpern führt [7,44]. Hinzu kommt noch eine Zunahme von B-Zellen, die autoreaktive Antikörper produzieren und somit den eigenen Körper angreifen [45]. Auch für Zellen des angeborenen Immunsystems konnten altersassoziierte Veränderungen beobachtet werden. So nimmt z.B. die Phagozytose-Aktivität von Makrophagen im Alter ab, und sie produzieren weniger Zytokine [46]. Der Anteil von NK-Zellen an den Zellen des peripheren Blutes nimmt mit der Alterung zu. Dies geht mit einer Verschiebung des Verhältnisses der unterschiedlichen NK-Zell-Subsets zu Gunsten der reifen CD56^{dim} NK-Zellen einher [46-49]. Im Gegensatz zu unreifen, zytokinproduzierenden CD56^{bright} NK-Zellen, sind die CD56^{dim} NK-Zellen vor allem für die Lyse virusinfizierter und entarteter Zellen verantwortlich. Ihre Expansion sorgt dafür, dass insgesamt die zytotoxische Aktivität von NK-Zellen in der Alterung erhalten bleibt. Allerdings sinken sowohl die Zytotoxizität der einzelnen Zelle als auch ihre Reaktionsfähigkeit auf Zytokine [47,49,50].

Neben den Veränderungen auf zellulärer Ebene steigt im Alter auch die Entzündungsrate im Blut an („*Inflamm-aging*“). Erhöhte Entzündungswerte sind charakteristisch für viele altersassoziierte Erkrankungen wie Alzheimer oder Arteriosklerose und es scheint, als würde die Fähigkeit eines Individuums die Entzündungsreaktion zu kontrollieren, entscheidend zur Lebensspanne beitragen [51].

Allgemein kann im Immunsystem beobachtet werden, dass bei gesunden älteren Menschen die Zellzahlen und Funktionalitäten eher mit denen junger Menschen zu vergleichen sind. Alterstypische Abweichungen treten fast immer dann auf, wenn auch der allgemeine Gesundheitszustand des Menschen eher schlecht ist. Dies legt nahe, dass das Immunsystem einen Schlüssel zur gesunden Alterung darstellt [43,49,51].

3.1.3 Alterung in der Hämatopoese

Das hämatopoietische System eignet sich sehr gut für Untersuchungen zur Alterung. Zum einen ist die Hämatopoese sehr gut untersucht und es sind eine Vielzahl altersassoziierter Veränderungen des Immunsystems bekannt (vgl. 3.1.2), zum anderen sind die hämatopoietischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*; HSC) relativ leicht zu isolieren und im Vergleich zu anderen Stammzellen in einigermaßen großer Anzahl im Körper vorhanden. Ein weiterer Vorteil ist die relativ hohe Teilungsrate von hämatopoietischen Stammzellen [10], sodass für diesen Zelltyp eine raschere Ansammlung an Schäden, die z.B. während der Replikation entstehen, zu erwarten ist.

3.1.3.1 Hämatopoese

Hämatopoietische Stammzellen können sich, wie alle Stammzellen, selbsterhaltend teilen, oder differenzierte Tochterzellen hervorbringen [15] (Abb. 2). Hierbei nimmt das Entwicklungspotential graduell ab. Aus den Langzeit-HSC, die während der gesamten Lebensphase eines Organismus und, im Falle von Transplantationen, sogar darüber hinaus, die Hämatopoese aufrechterhalten [52], entstehen über Zwischenstufen, die z.T. dieselben Aufgaben, nur zeitlich begrenzt, erfüllen, die in ihrem Entwicklungspotential stärker eingeschränkten Progenitoren für die myeloide (*common myeloid progenitor*; CMP) und die lymphoide Linie (*common lymphoid progenitor*; CLP) [53,54]. CLPs differenzieren weiter zu T-Zellen und B-Zellen, die das adaptive Immunsystem bilden, sowie zu NK-Zellen, die Bestandteil des angeborenen Immunsystems sind, aus [53,55,56]. CMPs bringen über weitere Zwischenstufen myeloide Zellen wie Monozyten, die sich im Falle einer Immunreaktion zu Macrophagen entwickeln, Granulozyten, Erythrozyten und Thrombozyten hervor [54]. Dendritische Zellen können sowohl aus CMPs als auch aus CLPs entstehen [57]. Lymphozyten, Monozyten/Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen können unter dem Begriff Leukozyten (weiße Blutkörperchen) zusammengefasst werden.

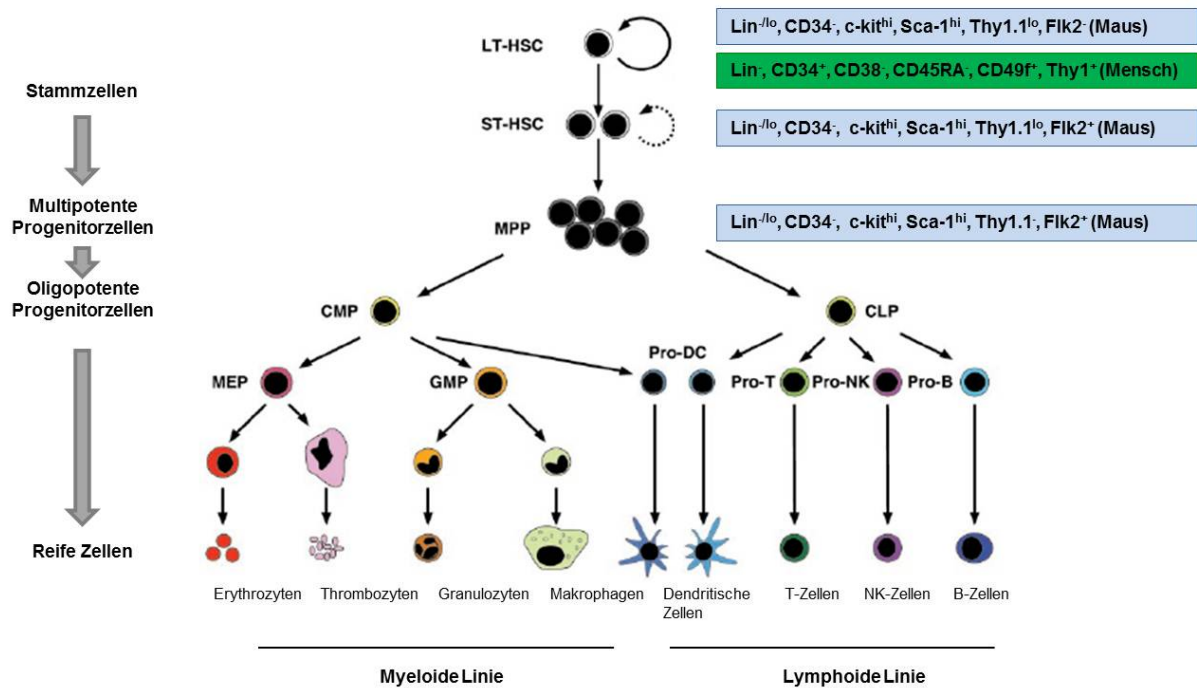


Abb. 2: Schematische Darstellung der humanen und murinen Hämatopoese [15].

Die Grundlage der Hämatopoese bilden Langzeit (LT) HSC, die sich sowohl selbsterhaltend teilen, als auch Kurzzeit (ST) HSC hervorbringen können. Diese entwickeln sich zu multipotenten Progenitoren (MPPs), aus denen wiederum die Progenitoren für die myeloide (CMP) und lymphoide (CLP) Linie hervorgehen. Aus ihnen entwickeln sich über Zwischenstufen die verschiedenen reifen Blutzellen.

3.1.3.2 Hämatopoietische Stammzellen

Hämatopoietische Stammzellen befinden sich im erwachsenen Menschen im Knochenmark. Dort liegen sie in perivaskulären und/oder endostealen Nischen, die sich aus Osteoblasten, Endothelzellen und mesenchymalen Zellen zusammensetzen, vor. Die Zellen der Nische produzieren verschiedene Zytokine, die für die Erhaltung der Stammzellen wichtig sind, wie z.B. Stammzellfaktor (SCF), Angiopoietin und Thrombopoietin [58,59].

HSC sind durch die Expression bestimmter Kombinationen an Oberflächenmarkern charakterisiert. Hierbei tragen neue Forschungsergebnisse stetig dazu bei, einzelne Subpopulationen der HSC immer genauer einzugrenzen. Während bis vor wenigen Jahren murine HSC durch die Expression von c-Kit und Sca1, sowie die Abwesenheit von *Lineage* Markern charakterisiert wurden [60,61], werden heute Langzeit HSC aufgrund der zusätzlichen Abwesenheit von CD34 und flk2 definiert [62,63]. Weiterhin werden sie anhand ihrer Expression von CD150 (Slamf1) dahingehend unterschieden, ob sie in die lymphoide

oder myeloide Linie („Ly-biased“ bzw. „My-biased“) tendieren, oder ausgewogen in beide Linien differenzieren können („Balanced“) [64].

Beim Menschen ist solch eine detaillierte Unterscheidung der Subpopulationen erschwert, da diese nur selten in ausreichenden Mengen aus dem Knochenmark isoliert werden können, und da ihr Stammzellpotential nur *in vitro* oder im Mausmodell, nicht aber im humanen System, getestet werden kann. Aktuell geht man davon aus, dass humane HSC mit Langzeitrepopulationspotential durch die Abwesenheit von Lineage Markern, CD38 und CD45RA, sowie die Expression von Thy1 und CD49f und einen geringen Rhodamin Efflux charakterisiert sind [65]. Da diese Zellen nicht in größeren Mengen isolierbar sind, werden humane HSC in der Praxis meist als CD34⁺/CD38⁻/Lin⁻ charakterisiert [66,67]. Doch auch diese Population ist nur in geringen Mengen vorhanden, sodass in dieser Arbeit die CD34⁺/CD38^{+/-}/Lin⁻ hämatopoietischen Progenitorzellen (HPC) verwendet wurden.

3.1.3.3 Alterung von HSC

Die Alterung von HSC wurde vor allem im murinen System ausführlich untersucht. Während in älteren Mäusen die Anzahl an HSC erhöht ist, nimmt die kompetitive Fähigkeit der einzelnen Stammzelle zur Repopulation des Knochenmarks ab [31,64,68]. Außerdem ist eine Verschiebung der Hämatopoese in Richtung Myelopoese zu beobachten. Dies liegt daran, dass sich das Verhältnis der einzelnen Stammzellsubpopulationen zueinander im Zuge der Alterung ändert [69,70].

Hämatopoietische Stammzellen können in drei Subpopulationen eingeteilt werden. Bei der Ausdifferenzierung von bala-HSC entstehen Lymphozyten und myeloide Zellen in demselben Verhältnis zueinander, wie sie auch im peripheren Blut junger Mäuse zu finden sind, sodass Lymphozyten mengenmäßig überwiegen. Ly-biased HSC produzieren die normale Anzahl an Lymphozyten aber nur in einem geringen Maße myeloide Zellen, bei my-biased HSC ist es umgekehrt. Während die Stammzellen bei jungen Mäusen überwiegend ly-biased sind, findet man in alten Mäusen überwiegend my-biased HSCs [68,69], was zu einem Überschuss an myeloischen Zellen im Blut älterer Mäuse führt. Dies ist mit ein Grund, warum HSC von älteren Mäusen schlechter zur Repopulation des Knochenmarks geeignete sind, als solche von jungen Mäusen. Der erhöhte Anteil an sich langsamer teilenden my-biased HSC führt insgesamt zu einer Verlangsamung der Repopulation [68]. Außerdem entstehen entsprechend dem intrinsischen Differenzierungspotential der my-biased HSC überwiegend myeloide Zellen, sodass keine ausgewogene Repopulation stattfindet [68,69,71,72].

In ausführlichen Transplantationsexperimenten konnte gezeigt werden, dass individuelle Stammzellklone eine intrinsisch festgelegte Lebensspanne haben. So zeigten Rossi *et al.* zunächst, dass ältere Mäuse mehr Langzeit HSC besitzen als jüngere, und dass dieses Verhältnis erhalten bleibt, wenn man HSC von jungen Mäusen ins Knochenmark älterer Tiere transplantiert [62]. Weitere Experimente zeigten, dass nicht nur das Differenzierungspotential der einzelnen HSC von Beginn an festgelegt ist, sondern auch ihre Lebensspanne [72,73]. Tochterzellen einer einzigen hämatopoietischen Stammzelle, die in verschiedene Mäuse transplantiert wurden, lebten in allen Tieren exakt gleich lang [73]. Zusammengenommen deuten diese Daten daraufhin, dass die Stammzellalterung aufgrund intrinsischer Faktoren festgelegt ist.

Es ist jedoch nicht ausgeschlossen, dass extrinsische Faktoren, wie die Alterung der Stammzellnische, auch zur Alterung in der Hämatopoese beitragen [74]. Hierfür spricht die offensichtliche Veränderung der Stammzellnische mit der Alterung. So bildet sich im Zuge der Alterung in Knochen vermehrt Fettgewebe aus, während weniger Osteoblasten entstehen [42,75]. Gleichzeitig benötigen die HSC die richtige Dosis an Zytokinen, die so vermutlich nicht gewährleistet werden kann.

Versuche von Mochizuki-Kashio *et al.* zeigen deutlich, dass Veränderungen der Umgebung einen starken Einfluss auf HSC haben. So starben Mäuse mit EZH2-defizienten HSC während der Embryonalentwicklung aufgrund von hämatopoietischen Defekten. Dennoch waren dieselben HSC in der Lage in bestrahlten erwachsenen Mäusen die Hämatopoese, bis auf Defekte in der Lymphopoese, wiederherzustellen, da in der Umgebung des adulten Knochenmarks die EZH2-Defizienz durch vermehrte Expression des homologen EZH1 kompensiert werden konnte [76].

Für Muskelstammzellen, sog. Satellitenzellen konnte mit heterochronischen parabiotischen Mäusen ein Einfluss der Umgebung auf das Stammzellpotential gezeigt werden [5]. Zu diesem Zweck wurden die Blutkreisläufe zweier Mäuse unterschiedlichen oder gleichen Alters miteinander verbunden. Fügte man der älteren Maus eine Muskelverletzung zu, so heilte diese deutlich besser ab, wenn die Maus mit einer jüngeren parabiotisch verbunden war. Hierbei konnte auch nachgewiesen werden, dass ausschließlich Zellen aus dem älteren Tier zur Heilung beitrugen. Folglich müssen extrinsische Faktoren aus dem Kreislauf des jüngeren Tieres zur Funktionsverbesserung der Zellen des alten Tieres beigetragen haben.

Auch im humanen System wurden die altersassoziierten Veränderungen in der Hämatopoese untersucht. Hierzu zählen vor allem eine Abnahme der blutbildenden Bereiche des Knochenmarks und eine reduzierte Lymphopoese bei gleichzeitiger Zunahme von

Krebserkrankungen des Blutsystems [75,77]. Die Proliferationskapazität humaner HSC nimmt von fetaler Leber über Nabelschnurblut zu Knochenmark von Erwachsenen hin ab [78]. Eine detaillierte Studie konnte zeigen, dass, ähnlich wie im murinen System, die Frequenz von humanen Langzeit HSC im Knochenmark mit dem Alter ansteigt, und dass auch hier die Differenzierung bevorzugt in die myeloide Richtung verläuft [79]. Diese Veränderungen der humanen HSC im Alter können zum Teil erklären, warum Transplantationen von Knochenmark älterer Spender häufiger weniger erfolgversprechend und mit mehr Komplikationen belastet sind, als Knochenmarktransplantationen von jungen Spendern [80].

3.2 Epigenetik

Epigenetik bezeichnet vererbare Veränderungen und Muster in der Genexpression, die nicht in der DNA-Sequenz selber codiert sind. Geprägt wurde der Ausdruck erstmals schon 1942 von Conrad Waddington um zu erklären, wie Zellen, die mit demselben Genmaterial ausgestattet sind, sich dennoch in die verschiedensten Zelltypen entwickeln können [81]. Epigenetische Modifikationen sind jedoch nicht nur stabil vererbbar, sie können sich auch im Laufe eines Lebens verändern [82]. Dies wird bei der Differenzierung deutlich, geschieht jedoch auch als Antwort auf externe Einflüsse, Stress, im Zuge der Alterung oder während der Tumorgenese [82-85].

Die am besten untersuchten epigenetischen Modifikationen sind die DNA-Methylierung (3.2.1) und Histonmodifikationen (3.2.2). Daneben spielt es aber auch eine Rolle, an welcher exakten Position die Nukleosomen sitzen, welche Histonvarianten in einem Nukleosom vorliegen und in welchem Bereich des Zellkerns sich der jeweilige DNA-Abschnitt befindet [86-89].

3.2.1 DNA-Methylierung

DNA-Methylierung ist ein wichtiges Instrument zur Repression von Transkription. In Säugern betrifft sie die C5 Position des Cytosins (5mC) bei etwa 70-80% aller CpG-Dinukleotiden [90]. Während die Frequenz von CpG-Dinukleotiden im Genom aufgrund der hohen Mutationsrate der methylierten Variante relativ gering ist, kommt das Dinukleotid im Promotorbereich einer Vielzahl von Genen gehäuft vor. Man spricht von sog. CpG-Inseln [91,92]. Hier erfüllen die CpG-Dinukleotide regulatorische Funktionen. Sind sie nicht

methyliert kann das zugehörige Gen transkribiert werden. Dies ist meist bei *Housekeeping*-Genen der Fall, die in allen Zelltypen exprimiert werden. Methylierte CpGs in Promotorbereichen bedeuten hingegen, dass das entsprechende Gen in der jeweiligen Zelle nicht transkribiert wird [92,93].

Neben dieser Transkriptionskontrolle dient die DNA-Methylierung aber auch der Stilllegung von repetitiven Elementen, bei denen durch die Methylierung die Transkription und die Transposition verhindert werden [92,94-100]. Auch bei der Inaktivierung des X-Chromosoms spielt DNA-Methylierung eine wichtige Rolle, ebenso beim genomischen *imprinting* [92,101,102]. Letzteres bezeichnet den Vorgang bei dem entweder das maternale oder das paternale Allel eines Gens dauerhaft stillgelegt wird.

Für die Etablierung der DNA-Methylierung sind drei DNA-Methyltransferasen (DNMTs) zuständig [103]. DNMT1 wirkt als Erhaltungsmethyltransferase. Das heißt, sie kopiert bei der Zellteilung das Methylierungsmuster auf den neu-synthetisierten Tochterstrang. DNMT3a und 3b sind *de novo* Methyltransferasen. Sie können ohne Vorlage neue genomische Bereiche methylieren und spielen deswegen in der Entwicklung eine wichtige Rolle [103].

3.2.1.1 Die Rolle von DNA-Methylierung in der Alterung und der Tumorentstehung

Es gibt eine deutliche Parallele bei der Rolle der DNA-Methylierung in der Alterung und der Tumorentstehung [104]. In beiden Fällen kommt es zu einer globalen Hypomethylierung, während lokal einzelne Promotoren hypermethyliert sind. Hiervon sind häufig in gealterten und entarteten Zellen dieselben Regionen betroffen, und diese Veränderungen sind meist auch mit entsprechenden Veränderungen in der Genexpression assoziiert [104-108].

Um die altersassoziierten Veränderungen bei der DNA-Methylierung möglichst genau untersuchen zu können, wurden unter anderem Lymphozyten monozygotischer Zwillingspaare unterschiedlichen Alters untersucht [109]. Während bei jungen Zwillingspaaren die epigenetischen Signaturen nahezu identisch waren, traten bei älteren Paaren deutliche Unterschiede auf. Dies betraf zu einem Großteil repetitive Elemente, aber auch einzelne Gene. Bei letzteren wirkten sich die Unterschiede in der DNA-Methylierung auch auf ihre Expression aus, sodass bei denjenigen alten Zwillingspaaren, die die stärksten Unterschiede in der DNA-Methylierung aufwiesen, auch die größten Expressionsunterschiede vorlagen [109]. Eine weitere ausführliche Studie beschreibt DNA-Methylierungsunterschiede zwischen Neugeborenen und 90-Jährigen [110]. Hier konnte nicht nur gezeigt werden, dass im Alter eine globale Hypomethylierung vorliegt, die Studie macht auch deutlich, dass die

Homogenität der Methylierung an einzelnen Loci mit dem Alter abnimmt. Während also an bestimmten CpG-Inseln bei Neugeborenen benachbarte CpGs einen vergleichbaren Methylierungsstatus haben, verändert sich dieser innerhalb von CpGs bei älteren Menschen. Auch hier wurde deutlich, dass vor allem repetitive Elemente bei älteren Menschen von der Hypomethylierung betroffen sind und dass diese Hypomethylierung auch mit einer Aktivierung der Transkription der repetitiven Elemente in Zusammenhang steht [110].

Für humane HPC konnte gezeigt werden, dass die altersassoziierte DNA-Hypomethylierung bevorzugt Gene betrifft, die bei der Differenzierung in die myeloide Richtung ebenfalls demethyliert werden, was den myeloiden Bias älterer HPC unterstreicht [107]. Gene, die in HPCs älterer Donoren hypermethyliert sind, sind häufig auch Polycomb-Zielgene, und es konnte gezeigt werden, dass vergleichbare Muster der Hypermethylierung auch in Tumoren vorliegen [105,107,108].

Allgemein findet man in Tumoren ähnliche Veränderungen des Epigenoms, wie im Alter, was auch erklärt, warum Alter einer der stärksten Risikofaktoren für die Entwicklung von Tumoren darstellt [104,105]. An der Entartung von Zellen ist die DNA-Methylierung meist zusätzlich zu Mutationen beteiligt. So werden z.B. die Promotoren von Tumorsuppressorgenen methyliert, und somit ihre Expression verhindert oder umgekehrt die von Onkogenen demethyliert, was zu einer verstärkten Expression führt .

3.2.2 Histonmodifikationen

Die zweite wichtige Gruppe der epigenetischen Regulatoren sind die Histonmodifikationen. DNA liegt im Zellkern hoch kondensiert vor. Jeweils 146 Basenpaare der Doppelhelix sind um ein Histonoktamer gewickelt und bilden so ein Nukleosom aus (Abb. 3) [87,111]. Einzelne Nukleosomen werden durch kurze DNA-Abschnitte miteinander verbunden. An diese wiederum kann das Histon H1 binden, was die Chromatinkondensation noch erhöht.

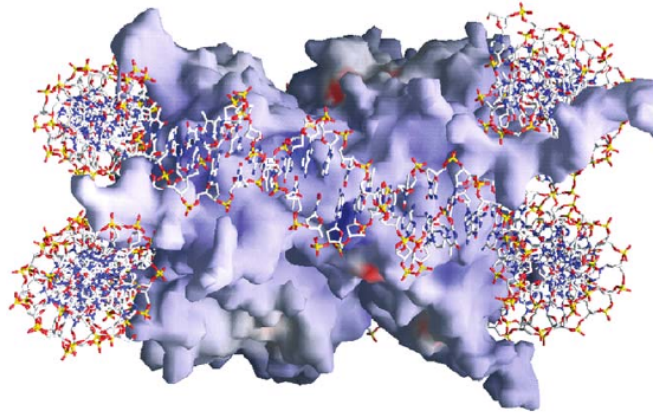


Abb. 3: Darstellung eines Nukleosoms nach Röntgenstrukturdaten [112].

Das Histonoktamer ist als Oberflächenmodell dargestellt. Dabei weisen blaue Flächen auf basische Bereiche und rote auf saure Bereiche hin. Die um das Histonoktamer gewundene DNA ist als „*Ball-and-stick*“ Modell gezeigt. Die hochdynamischen N-terminalen Enden der Histone können in der Röntgenstrukturanalyse nicht dargestellt werden.

Histonoktamere sind aus je zwei Heterodimeren der Histone H3 und H4 bzw. H2A und H2B zusammengesetzt. Histone sind basische Proteine und besitzen ein relativ langes N-terminales Ende, das aus dem Histonoktamer hinausragt und Angriffspunkt für verschiedene modifizierende Enzyme ist [113,114]. Hierbei werden vor allem Lysinreste methyliert oder acetyliert [115]. Es gibt jedoch auch weitere Modifikationen, wie die Phosphorylierung von Serinresten und Citrullinierung oder Methylierung von Argininresten, die allerdings alle weniger gut untersucht sind, als die Modifikationen, die Lysinreste betreffen [116-119]. Histonmodifikationen beeinflussen die Bindung der DNA an das Histon und damit die Kondensationsstärke und Zugänglichkeit des Chromatins, sowie die Bindung weiterer Enzyme, wie z.B. Transkriptionsfaktoren an die DNA [113].

Acetylierung von Histonen ist immer mit einer Genaktivierung verbunden [120-122]. Dies hängt damit zusammen, dass durch die Acetylierung der positiv geladenen Lysinreste die Gesamtladung des Nukleosoms neutralisiert wird, was dazu führt, dass die DNA nicht mehr so stark kondensiert werden kann. Das Chromatin liegt in einer lockeren Konformation, dem Euchromatin, vor und die Gene in dieser Region können transkribiert werden. Es ist eine Reihe von Enzymen bekannt, die für die Acetylierung zuständig sind [113,123]. Daneben existiert ebenfalls eine Vielzahl von Histondeacetylasen, die durch das Entfernen der Acetylgruppe für eine stärkere Kondensation der DNA sorgen (Heterochromatinbildung) und somit die Transkription der Gene in dieser Region verhindern [120,124]. Die Auswirkungen von Lysinmethylierung hingegen hängen stark vom betroffenen Histonrest, dem

Methylierungsgrad und den epigenetischen Modifikationen in der Umgebung ab [119,125,126].

Sehr intensiv wurde vor allem die Rolle der Trimethylierung von H3K4 (H3K4me3), die charakteristisch für aktive Gene ist, sowie die der Trimethylierung von H3K27 (H3K27me3), die charakteristisch für reprimierte Gene ist, untersucht. Die aktivierende Trimethylierung von H3K4 wird durch Enzyme des Trithorax Komplex etabliert, während Polycomb-Faktoren für H3K27me3 notwendig sind [127]. Enzyme beider Komplexe wurden zunächst in *Drosophila* beschrieben, als Faktoren, welche die korrekte Expression der Hox-Gene, die für die Musterbildung notwendig sind, aufrechterhalten [127]. Beide Histonmodifikationen gelten als stabil vererbbar, obwohl sie sich in bestimmten Situationen, vor allem während der Differenzierung oder Tumorgenese, auch verändern können [84,126,128-131].

3.2.3 Polycomb Gruppen Komplexe

Polycomb Gruppen Komplexe wurden ursprünglich in *Drosophila* als Repressoren der Hox-Gen-Expression beschrieben [132,133]. Aufgrund ihrer essentiellen Funktion bezüglich der Genregulation sind funktional ähnliche Komplexe in unterschiedlichen Spezies konserviert. Polycomb Gene sind während der Evolution jedoch teilweise durch Duplikationen expandiert und haben sich aufgrund von Mutationen verändert. So gibt es im Menschen und in der Maus eine Vielzahl von Genen, die im Polycomb Repressiven Komplex 1 (*Polycomb Repressive Complex 1* = PRC1) agieren, während die Zusammensetzung des Polycomb Repressiven Komplex 2 (*Polycomb Repressive Complex 2* = PRC2) evolutionär stärker konserviert ist [127,134].

3.2.3.1 Aufbau von PRC2

Im Menschen und in der Maus besteht der PRC2 aus drei Kernkomponenten: Enhancer of Zeste (EZH2), Embryonic Ectoderm Development (EED) und Suppressor of Zeste (SUZ12) [135-139]. Diese entsprechen den Faktoren Enhancer of zeste (Ez), Extra sex combs (esc) und Suppressor of zeste 12 (Su(z)12) in *Drosophila* [137]. Zwei weitere Faktoren, Retinoblastoma Protein Associated Protein 46/48 (RBAP46/48), der zur Histonbindung beiträgt und AE Binding Protein 2 (AEBP2), gehören zum murinen und humanen PRC2, sind aber für die eigentliche Funktion des Komplexes nicht notwendig [138,139].

EZH2 ist die katalytische Untereinheit des PRC2. Es methyliert Lysin 27 in Histon H3 (H3K27) über seine SET Domäne (SET = Su-(var)3-9; E(z); Tritheorax) [135,139-141].

Sowohl H3K27me2 als auch H3K27me3 sind charakteristisch für fakultatives Heterochromatin [142], wobei H3K27me3 die klassische, Polycomb-vermittelte Modifikation darstellt und mit nicht-transkribierten Genen assoziiert ist. Neben EZH2 kann auch das homologe EZH1 die katalytische Funktion des Komplexes übernehmen. Die beiden Enzyme unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer katalytischen Effizienz, ihres Expressionsmusters und teilweise auch in ihren Zielgenen, sodass ein Verlust von EZH2 nicht vollständig durch EZH1 kompensiert wird [143,144].

Das Zink-Finger-Protein SUZ12 rekrutiert den DNA bindenden Faktor RbAp46/48 zum Komplex, während EED sowohl als Matrix fungiert, die den Komplex zusammenhält, als auch über seinen N-Terminus Kontakt zu Histon H3 herstellt [138,139,145,146]. Alle drei Kernkomponenten sind für die Stabilität und Funktion des PRC2 notwendig, und die Expression aller drei Faktoren folgt normalerweise demselben Muster. Daher führt der *Knock-down* von nur einem Faktor meist auch zu einer reduzierten Expression der beiden anderen [138,147].

3.2.3.1.1 EED

Dem Protein EED kommt im PRC2 eine duale Funktion zu. Zum einen dient es als Matrix, die den Komplex zusammenhält, zum anderen stellt es auch den Kontakt zu Histon H3 und insbesondere H3K27me3 her [145,146,148].

EED besitzt sieben WD40-Repeat Domänen, die sich kreisförmig zusammenschließen und somit die für diese Proteingruppe typische propellerartige Struktur bilden (Abb. 4 A). Auf der einen Seite des sog. β -Propellers bindet EZH2 [148], auf der anderen Seite bildet sich ein aromatischer Käfig aus, in den trimethylierte Histonreste hineinragen. Hierbei wurde gerade für H3K27me3 die stärkste Bindungsintensität gemessen [145]. Dies ermöglicht es dem PRC2 bereits vorhandene H3K27me3-Modifikationen zu erkennen, und aufgrund dessen diese Modifikation weiter zu propagieren [145]. Für den Kontakt zum Histon H3 ist neben dem aromatischen Käfig das N-terminale Ende von EED, das keine WD40-Repeat-Motive enthält, notwendig [145,146].

Es gibt von EED zwei Splicevarianten, von denen jedoch nur die kürzere funktional ist [149,150]. Die längere enthält ein vorzeitiges Stoppcodon, das zum Verlust einer der WD-Domänen führt, sodass sich der Propeller vermutlich nicht korrekt ausbilden kann, und die Bindungsstellen für EZH2 und/oder Histon H3 zerstört sind (Abb. 4 B).

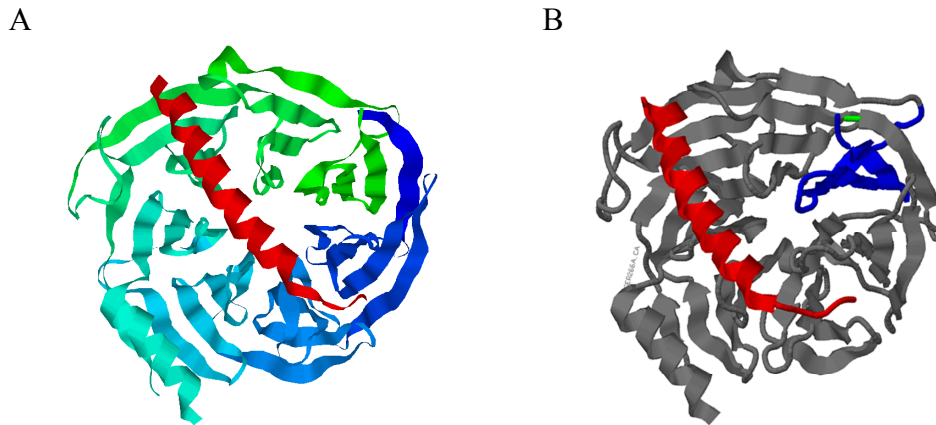


Abb. 4: Bändermodell der Kristallstruktur von EED mit einem gebundenen EZH2 Fragment

A: Die sieben WD40-*Repeats* von EED sind in blau- und grün-Tönen dargestellt, ein gebundenes EZH2-Fragment in rot. Jede WD40-*Repeat* Domäne besteht aus vier antiparallelen β -Faltblättern, die zusammen einen β -Propeller ausbilden. B: EED ist in grau dargestellt, bis auf die in blau eingefärbte C-terminale Region, die in der unfunktionalen Splice-Variante fehlt. Das Methionin am Beginn von EED ist in grün gezeigt, das gebundene EZH2-Fragment wieder in rot. Die Modelle wurden mit Hilfe von RasMol auf der Basis der kristallographischen Daten angefertigt [145,148].

Für das murine Eed wurden vier verschiedenen Translationsstarts beschrieben [151,152], die alle für die Initiation funktionaler Eed-Varianten (Eed1-4) verantwortlich sind (Abb. 5). Nur die beiden kürzesten Varianten (Eed3 und 4) beginnen mit einem klassischen ATG als Startcodon, Die beiden längeren (Eed1 und 2) beginnen mit einem GTG, das als alternatives Startcodon fungiert, wobei es hier Kontroversen gibt, nach denen die längste Eed Variante eigentlich an der Stelle beginnt, die als Initiationspunkt für Eed2 beschrieben wurde [149].

Zwischen humanem und murinem EED besteht eine hohe Sequenzhomologie. Gerade für den Bereich ab EED3 sind die Nukleotidsequenzen beinahe und die Proteinsequenzen vollständig identisch [149,150,153]. Im 5'-Bereich gibt es allerdings aufgrund einer Leserasterverschiebung erhebliche Unterschiede auf mRNA und Proteinebene, die unter anderem auch dazu führen, dass das für Eed1 beschriebene Startcodon aus dem murinen System nicht auf den Menschen übertragbar ist, sodass hier dieser Translationsstart noch nicht näher definiert ist [149,153].

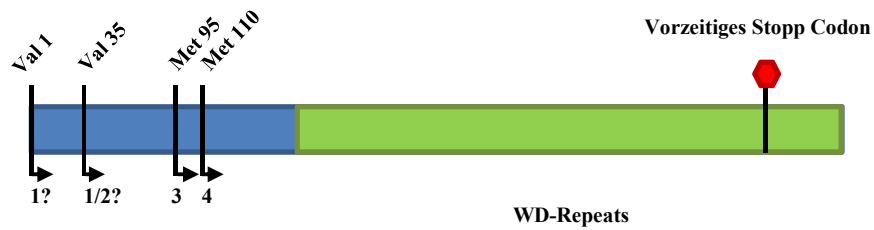


Abb. 5: Schematische Zeichnung der vier murinen Eed-Proteinvarianten nach Kuzmichev *et al.* [152]

Die vier murinen Proteinvarianten Eed1-4 (durch Pfeile angedeutet) entstehen durch Verwendung unterschiedlicher, z.T. nicht-klassischer, Startcodons. Fragezeichen deuten an, dass die exakte Startposition der jeweiligen Variante nicht geklärt ist. Das jeweilige putative Startcodon ist über dem Pfeil, der den Beginn der Proteinvariante andeutet, angegeben. In grün ist der Bereich von Eed dargestellt, der aus WD40-Repeat-Domänen besteht, in blau das N-terminale Ende, das zumindest in Teilbereichen notwendig für die Bindung an H3 ist. Das vorzeitige Stoppcodon der alternativen Splicevariante ist als rotes Sechseck gezeigt.

Alle vier oben beschriebenen Protein-Isoformen konnten aus funktionalen Polycomb Komplexen isoliert werden, wobei sich Unterschiede in der Aktivität der Komplexe, abhängig von der eingebauten Eed-Variante, ergaben [152,154]. Insbesondere Eed3, die Variante, die mit dem ersten klassischen ATG-Startcodon beginnt, ist mit der Trimethylierung von H3K27 assoziiert [152].

3.2.3.1.2 Polycomb vermittelte Genstilllegung

Wie genau der PRC2 zu seinen Zielgenen rekrutiert wird, wird im Moment intensiv untersucht. In *Drosophila* bindet PRC2 an *Polycomb Responsive Elements* (PREs) die zwar z.T. auch in Säugern gefunden wurden, aber bei weitem nicht alle Zielgene des PRC2 abdecken [155-157]. Viele Polycomb Zielsequenzen in Säugern sind CpG-reich oder sogar CpG-Inseln. In ES-Zellen bindet PRC2 z.B. an CpG-reiche, jedoch nicht methylierte Sequenzen. Hierbei scheint ein ausschlaggebender Faktor die Abwesenheit von Bindestellen für aktivierende Transkriptionsfaktoren zu sein [158,159]. Auf der anderen Seite wurde für den Transkriptionsfaktor REST in der Neurogenese gezeigt, dass er in der Lage ist PRC2 und damit auch H3K27me3 an Promotorregionen zu holen, die das REST-Bindemotiv beinhalten [160].

In einigen Fällen ist der PRC2 an der Rekrutierung von DNMTs und der Stilllegung seiner Zielgene durch DNA-Methylierung beteiligt [161]. Dies scheint auch bei der Tumorgenese eine Rolle zu spielen, da verschiedene Studien gezeigt haben, dass Gene, die in ES-Zellen Polycomb Ziele darstellen, in Tumoren später häufig hypermethyliert werden [105,108,162-164]. Auf der anderen Seite gibt es jedoch auch Hinweise dafür, dass sich H3K27me3 und DNA-Methylierung an Regionen mit hoher CpG-Dichte gegenseitig ausschließen [165-167]. Ein weiterer Faktor, der an der Rekrutierung des PRC2 beteiligt sein könnte, ist der Transkriptionsfaktor Ying Yang 1 (YY1) [168,169]. Allerdings gibt es bislang keinen Nachweis dafür, dass PRC2 und YY1 in Vertebraten tatsächlich an denselben Promotoren binden [170]. Ebenso spielt Jumonji, AT Rich Interactive Domain 2 (JARID2) eine Rolle bei der Rekrutierung des PRC2, wobei nicht geklärt ist, ob JARID2 eine aktivierende [171,172] oder eine inhibitorische [173,174] Rolle auf die Methyltransferaseaktivität des Komplexes ausübt.

Eine weitere wichtige Rolle bei der Rekrutierung des PRC2 zu seinen Zielgenen spielen lange (< 200 bp), nichtcodierende (*long noncoding* (nc)) bzw. intronische RNAs [175]. Dies konnte beispielsweise für die ncRNA XIST gezeigt werden, die PRC2 im Zuge der X-Chromosominaktivierung rekrutiert, wie auch für HOTAIR, eine ncRNA die an der Stilllegung des HOXD-Locus beteiligt ist [176,177].

Interessanterweise wurde für die Vererbung von H3K27me3 gezeigt, dass der verantwortliche Polycomb-Komplex während der gesamten Replikation an den entsprechend Loci gebunden ist, um sofort die Modifikation auf den neusynthetisierten Tochterstrang anbringen zu können [178,179].

3.2.3.2 Aufbau von PRC1

Der PRC1 ist in Vertebraten in seinem Aufbau flexibler als der PRC2. Die vier Kernuntereinheiten gehören zu den Familien der CBX, PHC, PCGF und RING1 Genen und können in unterschiedlichen Kombinationen auftreten. Hierbei hängt die Aktivität des PRC1 stark von der genauen Zusammensetzung ab [134].

In einem klassischen Modell geht man davon aus, dass zunächst der PRC2 H3K27 trimethyliert und diese Modifikation durch die Chromodomäne der CBX Komponente des PRC1 ausgelesen wird [135,137]. PRC1 sorgt dann über die RING1-E3-Ligaseaktivität für eine Monoubiquitinierung von H2AK119, was zur endgültigen Stilllegung der Transkription führt [180,181].

Dieses klassische Modell stellt jedoch vermutlich nicht den einzigen Weg der Genstilllegung durch Polycomb dar. Hierfür spricht, dass die Zielgene von PRC1 und 2 nicht komplett überlappen, und dass bei defektem PRC2 immer noch Bindung von PRC1 sowie Monoubiquitinierung von H2AK119 nachgewiesen werden konnte [182-185].

Daneben gibt es auch Hinweise darauf, dass durch PRC1-Aktivität die Bildung des Präinitiationskomplex der RNA-Polymerase II verhindert wird und somit keine Transkription stattfinden kann. [186,187].

3.2.3.3 Polycomb Antagonisten

Lange Zeit ging man davon aus, dass Methylierungen an Lysinresten der Histone irreversible Modifikationen darstellen, bis 2004 mit der Lysin-spezifischen Demethylase 1 (LSD1) die erste Histon-Lysin-Demethylase gefunden wurde [188]. Im Zusammenhang mit der Demethylierung von H3K27me3 sind besonders die Demethylasen Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat X und Y (UTX und UTY) sowie Jumonji Domain Containing 3 (JMJD3), von Bedeutung [189-194]. UTX und UTY werden konstitutiv exprimiert [195], während JMJD3 vor allem in Stammzellen exprimiert wird, und in differenzierten Zellen erst durch spezifische Trigger, wie z.B. Stimulation durch Onkogene, induziert wird [196-198]. Alle drei Enzyme entfernen Methylgruppen sowohl von tri- als auch von dimethyliertem H3K27, während UTX und UTY auch H3K27me1 demethylieren können [189,190,194].

3.2.3.4 Funktionen des PRC2

3.2.3.4.1 PRC2 in der Entwicklung

Um die genaue Rolle des PRC2 *in vivo* zu untersuchen, wurden die einzelnen Komponenten in Mäusen ausgeknockt. Hierbei zeigte sich, dass Embryonen, denen eine der drei Kernkomponenten fehlt, Defekte in der Gastrulation aufweisen und spätestens neun Tage *post coitus* sterben, was die essentielle Rolle des PRC2 für die murine Embryonalentwicklung verdeutlicht [138,199,200]. Der *Knock-out* einer der drei Kernkomponenten des PRC2 führt zu starkem globalem Verlust von H3K27me3 und H3K27me2, und, jedoch nur im Falle des EED *Knock-outs*, zusätzlich auch von H3K27me1 [138,144,147]. Dies geht allerdings nicht zwangsläufig mit einem Verlust der Pluripotenz embryonaler Stammzellen einher [201], auch wenn man eine Derepression verschiedener entwicklungsrelevanter Gene, die Polycomb Ziele darstellen, beobachten kann [201,202].

ESCs denen eine Komponente des PRC2 fehlt, können sich weiterhin selbst erneuern [144,201,202] und für EED defiziente ES-Zellen konnte sogar gezeigt werden, dass sie ansatzweise in Richtung aller drei Keimblätter differenzieren [201]. Allerdings tendieren PRC2 defiziente Zellen schon bei sehr geringen externen Einflüssen zur Differenzierung und diese verläuft meist nicht vollständig, was zeigt, dass der PRC2 für die Differenzierung notwendig ist [201,203]. Erst wenn beide Polycomb Komplexe ausgeschaltet werden, verlieren die ES-Zellen ihre Fähigkeit zu differenzieren vollständig [204].

3.2.3.4.2 PRC2 und bivalente Domänen

Insbesondere bei embryonalen Stammzellen, aber in geringerem Ausmaße auch bei differenzierteren Zellen treten die beiden gegenläufigen Histonmodifikationen H3K27me3 und H3K4me3 gemeinsam an einem Promotor auf [126,128-130,205]. Sie bilden dann eine bivalente Domäne, die zunächst nicht oder nur schwach transkribiert wird, aus. Als Antwort auf externe Signale, vor allem im Zuge der Entwicklung, lösen sich die bivalenten Domänen entweder in Richtung aktiver, transkribierter Gene, die nur noch H3K4me3 im Promotor aufweisen, oder aber zu inaktiven Genen mit der reprimierenden Histonmodifikation H3K27me3 auf [126,128-131].

In ES-Zellen sind etwa 8% aller Gene bivalent modifiziert [203,206]. Etwa die Hälfte der so modifizierten Genen stellen Transkriptionsfaktoren dar, die für die weitere Entwicklung wichtig sind, und bei fast allen dieser Gene wird die Transkription im Zuge der Differenzierung eingeleitet [203,206]. Bei der Ausbildung von bivalenten Domänen gibt es eine starke Übereinstimmung zwischen murinen und humanen embryonalen Stammzellen [158]. Bindet zusätzlich zum PRC2 noch PRC1 an die bivalente Domäne, so erhöht sich die Wahrscheinlichkeit, dass diese Domäne in der differenzierten Zelle nicht transkribiert wird [158]

3.2.3.4.3 PRC2 in der Hämatopoese

Polycomb Proteine spielen eine wichtige Rolle in der Hämatopoese, wobei das genaue Zusammenspiel der einzelnen Faktoren noch nicht ganz geklärt ist. Entgegen dem Modell des klassischen Zusammenwirkens von PRC1 und 2 haben beide Komplexe in der Hämatopoese entgegengesetzte Funktionen [207,208]. Für Bmi1, ein Mitglied des PRC1, ist eine positive Wirkung auf die Hämatopoese beschrieben [207,209,210], während sowohl Eed als auch Suz12 als Repressoren fungieren [207,211]. Für Ezh2 allerdings konnte gezeigt werden, dass

seine Überexpression die Kapazität zur seriellen Transplantation von murinen HSC erhöht [212].

Einige Polycomb Faktoren wie EED werden in der Hämatopoese kontinuierlich exprimiert, während andere je nach Differenzierungsstatus der Zellen in der Expression schwanken. So ist eine hohe Expression von BMI1 charakteristisch für HSC. Diese nimmt mit der Differenzierung ab, während andere Komponenten des PRC1 ansteigen [207,213]. Aber auch während der Entwicklung des Organismus ändert sich die Expression einiger PRC Komponenten. In HSC der fetalen Leber spielt Ezh2 eine essentielle Rolle, während seine Funktion in adulten HSC zu einem Großteil von Ezh1 kompensiert werden kann [76].

3.2.3.4.4 PRC2 in der Alterung

Ein gut beschriebenes Polycomb Zielgen ist der INK4A/ARF Locus, welcher durch die stabilisierende Wirkung der codierten Proteine auf die Tumorsuppressoren pRB und p53 eine wichtige Rolle in der Tumorgenese und der Seneszenz spielt [214-216].

In humanen embryonischen Fibroblasten wird die Expression von INK4A während der Seneszenz hochreguliert, während sich die von ARF nicht verändert. Dies steht in direktem Zusammenhang mit reduzierter Expression einzelner PRC1 und 2 Mitglieder sowie einer Reduktion von Polycomb Bindung und H3K27me3 am INK4A Promotor [214,215]. Außerdem steigt die Menge des Polycomb Antagonisten JMJD3 sowie seine Bindung am INK4A-Locus nach Induktion von Seneszenz an, was den Rückgang von H3K27me3 noch einmal verstärkt [196,215]. Die Expression von INK4A führt dann über den pRB-*Pathway* zur Induktion von Seneszenz. In vielen Tumoren führt Überexpression von Polycomb Faktoren zur dauerhaften Stilllegung des INK4A/ARF-Locus, sodass die entarteten Zellen nicht durch Seneszenz in ihrem Wachstum gebremst werden können.

Dieser Seneszenzmechanismus kann jedoch nicht zwangsläufig mit Alterung gleichgesetzt werden. In Mäusen konnte allerdings in Hautfibroblasten älterer Tiere erhöhte Jmjd3 und Ink4a Expression nachgewiesen werden, was auch in einem Zusammenhang mit erhöhter Seneszenz stand [196].

3.2.3.4.5 PRC2 in der Tumorentstehung und in hämatopoietischen Erkrankungen

Für verschiedene solide Tumoren, wie z.B. Brust-, Darm-, Prostata-, oder Blasen Tumore gilt EZH2 als Onkogen, dessen vermehrte Expression mit einer schlechten Prognose verbunden ist [217-222]. Ein wichtiger Grund hierfür ist die Polycomb vermittelte Stilllegung des INK4A-Locus, die das unkontrollierte Proliferationsverhalten der entarteten Zellen ermöglicht [214].

In hämatopoietischen Krebserkrankungen kann EZH2 allerdings sowohl die Rolle eines Onkogens als auch die eines Tumorsuppressors übernehmen. Klassische Beispiele für eine Funktion als Onkogen sind die akute myeloische Leukämie (AML) und Lymphome [223,224]. Bei letzteren wurden zwei aktivierende EZH2 Mutationen (Y641 und A677G) gefunden, die zu einer vermehrten H3K27-Methylierungsaktivität führen [225-229]. Für diese Fälle werden zur Zeit einige Wirkstoffe getestet, die gezielt die Methylierungsaktivität von EZH2 reduzieren und somit als Therapieformen für Krebserkrankungen mit erhöhter EZH2-Aktivität in Frage kommen könnten [205,230-234]. Im Gegensatz dazu wirken PRC2-Faktoren in akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) und im myelodysplastischen Syndrom (MDS) als Tumorsuppressoren. Bei ALL handelt es sich um die am weitesten verbreitete Leukämieform bei Kindern, sie tritt jedoch auch, wie alle Leukämien, bei Erwachsenen auf. Für kindliche T-Zell-ALL konnte gezeigt werden, dass in ca. 42% der Fälle eine Deletion oder inaktivierende Mutation in einer der Komponenten des PRC2 vorliegt [235]. Auch in Erwachsenen sind T-Zell-ALLs mit einem Rückgang der EZH2 und/oder SUZ12-Expression assoziiert, wobei teilweise auch eine Zunahme an JMJD3-Expression beobachtet werden konnte [236,237].

Für fast alle Blutkrebserkrankungen ist Alter einer der größten Risikofaktoren und bei den meisten erfolgt die Erstdiagnose im Alter über 60 [77]. Dies trifft in noch stärkerem Maße auf MDS zu [238]. Bei MDS differenzieren die Blutzellen, wie auch bei Leukämien, nicht aus. Im Unterschied zu Leukämien, die einen Zelltyp betreffen, der in der Entwicklung entartet und mit unreifen Progenitoren das Blut überschwemmt, sind bei MDS sehr frühe Stadien betroffen. Die Zellen differenzieren nicht aus und im Knochenmark sammeln sich entartete Blasten, während kaum Zellen ins Blut gelangen [238].

Für MDS gilt eine Deletion von Chromosom 7 oder 7q als sehr schlechte Prognose [239]. Im Jahr 2000 konnte von Cardoso *et al.* gezeigt werden, dass in diesem Bereich das EZH2-Gen liegt [240]. Seitdem wurde die Rolle von PRC2-Faktoren bei MDS untersucht. Nicht nur Deletionen von EZH2, sondern auch inaktivierende Mutationen dieses Gens sind mit einer schlechten Prognose assoziiert [241,242]. Daneben spielen auch Mutationen von EED oder

SUZ12 bei der Entstehung der Krankheit eine Rolle [243,244]. EZH2 Deletionen konnten schon in frühen Stadien der Erkrankung nachgewiesen werden, was dafür spricht, dass sie bei der Entartung eine wichtige Rolle spielen [242].

3.2.3.4.6 Sensibles Polycomb Gleichgewicht

Die Daten bezüglich der Funktion der verschiedenen Polycomb Komponenten in unterschiedlichen Systemen zeigen, dass die korrekte Entwicklung und Funktion von hämatopoietischen und embryonalen Stammzellen auf einem sensiblen Gleichgewicht der Polycomb-Faktoren basiert [245].

So kann man insgesamt sagen, dass eine Reduktion von Mitgliedern des PRC2 zu einer erhöhten HSC Aktivität führt [207,211], während eine Erhöhung die Erschöpfung von HSC verzögert [212]. Bei embryonalen Stammzellen wiederum wird Polycomb benötigt, um eine korrekte Differenzierung zu gewährleisten. Der Verlust eines dieser Faktoren führt zwar zu einer spontanen Differenzierung der Zellen, diese ist jedoch nicht vollständig [201,203].

Offensichtlich ist eine gewisse Polycomb-Dosis notwendig, um die Stammzellen in ihrem undifferenzierten Stadium zu halten [245]. Ist die PRC2 Menge zu niedrig, differenzieren die Zellen rasch aus und tragen z.B. verstärkt zur Hämatopoiese bei. Diese schnelle Differenzierung läuft jedoch häufig unvollständig ab, und führt zur Entstehung von Krebs. Auf der anderen Seite verzögert zu viel PRC2 die Differenzierung und erhält damit länger die Stammzellkapazität. Doch auch dies kann zu Krebs führen, wenn die sich teilenden undifferenzierten Stammzellen viel zu langsam ausdifferenzieren [245].

3.3 Ziel der Arbeit

Der Polycomb Repressive Komplex 2 spielt eine Schlüsselrolle in allen Aspekten der humanen Hämatopoese. Da in dieser Arbeit in einem ersten Screening zur Identifikation von epigenetischen Masterregulatoren der Alterung in humanen hämatopoietischen Progenitorzellen das PRC2 Mitglied *EED* als stark differentiell exprimiert ermittelt wurde, sollte im weiteren Verlauf die Rolle des PRC2 bei der Alterung von humanen HPC im Detail untersucht werden. Zu diesem Zweck sollten neben detaillierten Expressionsanalysen der einzelnen Polycomb Mitglieder und ihrer Antagonisten, auch Veränderungen der Polycomb vermittelten repressiven Histonmodifikation H3K27me3 im Zuge der Alterung analysiert werden. Diese Untersuchungen sollten genomweit mittels ChIP-on-chip durchgeführt werden, und Aufschluss über die Verteilung von H3K27me3 und der entgegen gerichteten Histonmodifikation H3K4me3 geben. Aus diesen Veränderungen sollten dann Hinweise auf die Ursache verschiedener altersassoziierter Phänomene abgeleitet werden.

Des Weiteren sollte durch Überexpression und Herabregulation von EED analysiert werden, ob die veränderten Polycomb Level *in vitro* Effekte der Alterung widerspiegeln können, und ob sie einen Einfluss auf das *in vitro* Differenzierungspotential von HPC haben.

4. MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Tab. 1: Geräte

Gerät	Name	Firma
CO ₂ Brutschrank	ATP Linie, Serie CB210	Binder
CO ₂ Brutschrank	IG150	Jouan
Durchflusszytometer	Cytomics FC 500	Beckman Coulter
Elektroporator	Pulse Controller Plus Capacitance Extender Plus Gene Pulser II	Bio RAD
ELISA-Reader		Bio-Tek Instruments
Fluoreszenzmikroskop Kamera	Axioplan 2 imaging Axio Cam HRC	Zeiss
Geldokumentationsgerät	Herolab E.A.S.Y. 429K	Herolab
Inkubationsschüttler	Schüttelapparate 3005-3020 Modell G25	GFL Gesellschaft für Labortechnik
Inkubator	Certomat H	B. Braun
Küvetten (Elektroporation)	2-mm-Elektroporationsküvetten	PeqLab
Mikroskop	Wilovert S	Hund
Mixer (NimbleGen)	Mixer	Roche NimbleGen
Nanodrop	NanoDrop N-2000 Spectrophotometer	PeqLab
NimbleGen Array	RefSeq 385K Promoter Arrays	Roche NimbleGen
Photometer	DU 640 Spectrophotometer	Beckman Coulter
Scanner für NimbleGen Arrays	Axon 4000B Microarray Scanner	Roche NimbleGen
Sorter	MoFlo XDP	Beckman Coulter
Thermo Cycler für Real-Time PCR	ABI Prism Sequence Detector 7700	Applied Biosystems
Thermo Cycler für Real-Time PCR	ABI Prism 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems
Thermocycler	GeneAmpPCR System 9700 und 2700	Applied Biosystems
Ultraschall Desintegrator (130 W)	Vibra-Cell 75022	Bioblock Scientific
Western-Blot Dokumentationsgerät	Odyssey infrared imager	LI-COR Biosciences
Western-Blot Dokumentationsgerät	LAS 3000	Fuji Film
Zentrifuge	Rotixa/P, Rotor #4210	Hettich
Zentrifuge	RL 5B plus, Rotoren HB-6 und SLA1500	Sorvall
Zentrifuge	Biofuge Stratos, Rotor #3335	Heraeus
Zentrifuge	Rotina 46R, Rotor #4624	Hettich

4.1.2 Materialien für die Molekularbiologie

4.1.2.1 Chemikalien und Enzyme

Tab. 2: Chemikalien und Enzyme

Chemikalie oder Enzym	Firma
β-Mercaptoethanol (99%)	Sigma
Aqua ad iniectabilia	DeltaSelect GmbH
Advantage2 Polymerase und 10x Puffer	Clontech
Agarose	PeqLab
APS	Roth
Biocoll (Ficoll)	Biochrom
Bis/Acrylamid (40%)	BioRad
CIAP (1 U/μl)	Life technologies
Complete, Mini, EDTA-free	Roche
DNA-Leiter, 100 bp (0,5 mg/μl)	Invitrogen
DNA-Leiter, 1 kb (0,1 μg/μl)	Invitrogen
DNase I, RNase-free (1 U/μl)	Fermentas
dNTPs (10 mM)	PeqLab
EDTA	Merck
Ethidiumbromid (1 mg/ml)	Sigma
Formaldehyd (37 %)	Merck
HotStar Taq (5 U/μl) und 10 x Puffer	Qiagen
Lane Marker Reducing Sample Buffer (5x)	Thermo
LiChrosolv Wasser	VWR Merck
Leupeptin	Sigma
Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2x)	Fermentas
M-MLV reverse Transkriptase (200 U/μl) und 5x Puffer	Promega
Oligo (dT) 15 Primer (300 μg/ml)	Promega
PBS	Lonza
Pepstatin (1mg/ml)	Roche
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth
PMSF	Roth
Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer	Thermo
RNase A (100mg/ml)	Qiagen
rRNasin® (Plus), RNase Inhibitor (40 U/μl)	Promega
RNase free DNase Set (30 U/μl)	Qiagen
RNase freies Wasser	Qiagen
Sequencing RR-100 BigDye® Terminator und 5x Puffer	Applied Biosystems
T4-DNA Ligase und 5x Puffer	Qiagen
TaqMan Universal PCR Mastermix, No AmpErase UNG	Applied Biosystems

Material und Methoden

Chemikalie oder Enzym	Firma
Taq Polymerase (5 U/μl) und 10x Puffer	Invitrogen
TEMED	Roth

Weitere allgemeine Chemikalien, die in dieser Arbeit verwendet wurden, stammten von Merck, Roth oder Sigma.

Tab. 3: Restriktionsenzyme (mit zugehörigem 10x Puffer) für die Klonierungen

Enzym (10 U/μl)	Firma
ClaI	Invitrogen
KpnI	Invitrogen
NheI	Invitrogen
SstI (SacI)	Invitrogen
XhoI	Invitrogen

4.1.2.2 Kits für die Molekularbiologie

Tab. 4: Kits für die Molekularbiologie

Kit	Firma
5'/3' RACE Kit, 2 nd Generation	Roche
Chromatin Immunopräzipitations (ChIP) Assay Kit	Millipore
DC Proteinassay	BioRad
iScript cDNA Synthesis Kit	BioRad
MirVana miRNA Isolation Kit	Ambion
NimbleGen Dual-Color DNA Labeling Kit	Roche NimbleGen
NimbleGen Hybridization Kit	Roche NimbleGen
NimbleGen Wash Buffer Kit	Roche NimbleGen
Novex ECL Chemiluminescence Kit	Invitrogen
NucleoBond Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel
Nucleo Spin Plasmid Mini Kit	Macherey-Nagel
RNeasy Mini Kit	Qiagen
PathScan Sandwich ELISA Tri-Methyl-Histon H3 (Lys27)	Cell Signaling Technology (CST)
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
QIAshredder Säulen	Qiagen
Whole Genome Amplification Kit	Sigma

4.1.2.3 Antikörper für ChIP-Assay und Western Blot

Tab. 5: Primärantikörper für ChIP-Assay und Western Blot

Antikörper	Spezies	Konzentration	Anwendung	Firma
IgG-Kontrolle	Kaninchen	1 µg/µl	ChIP	CST
IgG-Kontrolle	Maus	?	ChIP	Millipore
anti-Histon H3	Kaninchen	1 µg/µl	ChIP, WB	Millipore
anti-Histon H3	Maus	?	WB	CST
anti-Histon H3K27me3	Maus (IgG3)	1 µg/µl	ChIP	Abcam
anti-Histon H3K27me3	Kaninchen	?	WB	CST
anti-Histon H3K4me3	Kaninchen	1 µg/µl	ChIP	Abcam
anti-EED	Kaninchen	?	WB	Dr. Raphael Margueron
ChIPAb+ EZH2, clone AC22	Maus (IgG2a)	1 µg/µl	ChIP	Millipore
anti-SUZ12	Kaninchen	?	WB	CST
anti-Flag Tag	Maus (IgG1)	1 µg/µl	WB	Sigma
anti-β-Aktin	Maus (IgG2a)	1,5 µg/µl	WB	Sigma

Tab. 6: Sekundärantikörper für Western Blot

Name	Detektionsverfahren	Konzentration	Verdünnung	Firma
Ziege anti-Kaninchen IRDye ® 800CW	Infrarotfluoreszenz	1 µg/µl	1:10.000	LI-COR
Ziege anti-Maus IRDye ® 680CW	Infrarotfluoreszenz	1 µg/µl	1:10.000	LI-COR
Ziege anti-Kaninchen HRP	Chemilumineszenz	400 µg/ml	1:2.500	SantaCruz
Rind anti-Maus HRP	Chemilumineszenz	400 µg/ml	1:2.500	SantaCruz

4.1.2.4 Primer

Primer, die nicht zuvor schon im Labor etabliert waren, wurden mit Hilfe von Oligo 6 designt. Im Falle der *MYT1* Promotorprimern wurden Sequenzen aus der Literatur verwendet [246]. Alle Primer wurden bei Thermo Scientific bestellt, und auf Arbeitskonzentrationen von 10 pmol/µl mit Wasser verdünnt. Für jedes Primerpaar wurden die optimalen PCR Bedingungen empirisch bestimmt.

Tab. 7: Primer zur Klonierung der unterschiedlichen EED Varianten.

Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind unterstrichen. Alle zusätzlich eingefügten Nukleotide sind in fett dargestellt. Die Sequenz des Flag Tag ist in grün markiert, das zugehörige Startcodon in blau und die Kosak-Sequenz in rot.

Name	Sequenz von 5' nach 3'	Bemerkung	Produktgröße [bp]	Tm [°C]
sEED kurz 454U24_Xho	<u>GATTGACTCGAGA</u> AATATGTCCGAGA GGGAAGTGTC	EED3	1340	54,5
sEED Kurz 139U22_Xho	<u>GATTGACTCGAGT</u> GCCCTCTTAATCC AACGGACC	EED1	1657	57,3
sEED Kurz 454U20Flag_Xho	<u>GATTGACTCGA</u> g ccg ccat ggattacaaggatg acgatgacaag ATGTCCGAGAGGGAAGTGTC	EED3_Flag	1382	54,5
sEED Exon1 212U18Flag_Xho	<u>GATTGACTCGA</u> g ccg ccat ggattacaaggatg acgatgacaag TTGGGGAAGGGAAGGAGC	EED1_Flag 1	1612	56,3
sEED kurz 170U19Flag_Xho	<u>GATTGACTCGA</u> g ccg ccat ggattacaaggatg acgatgacaag GTAGACTGCCGGGAGGGCG	EED1_Flag 2	1654	56,3
asEED kurz 1763L21_Nhe	<u>CGGCTAGCCG</u> TTATCGAAGTCGATCC CAGCG	antisense Primer		

Tab. 8: Primer für 5' RACE Analysen

Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme sind unterstrichen. Alle zusätzlich eingefügten Nukleotide sind in fett dargestellt.

Name	Sequenz von 5' nach 3'	Tm [°C]
asEed kurz 1704L21	TGCTATCCCTGCTAAACTGG	55
RA2 EED 520L23	TGTTCTCGTCACTGCTCAGCTTC	51
RA3 EED 512L23	<u>GATTGAGGTACCT</u> CACTGCTCAGCTTCTGCTTCTT	51

Material und Methoden

Tab. 9: Primer für Expressionsanalysen

Name	Sequenz von 5' nach 3'	Bemerkung	Produktgröße [bp]	Tm [°C]
sEed kurz 1557U21	GGTTTTCTATGGATTTCTGGC	cDNA (EED kurz)	145	50
asEed kurz 1704L21	TGCTATCCCTGCTAAAAGTGG			
sEed kurz 1557U21	GGTTTTCTATGGATTTCTGGC	cDNA (EED lang)	191	50
asEed lang 1727L21	GGCACTGCAAAATATAAATGAT			
sEED kurz 934U19	CCATCCTCTGCTGGCTGTA	cDNA ohne Pseudogen (EED gesamt)	184	63
asEED kurz 1118L19	CCACCAGAGTGTCCTGCTG			
sEED kurz 1514U18	CTTGGGCGATTTGATTAC	cDNA ohne Pseudogen (EED kurz)	156	54
asEED kurz 1647L23	CAGTGTTGTACATTTGGCTTTAT			
sXEED 1052U22	TATGATAGCAATAGAAGCATAA	EED Pseudogen	182	54
asXEED 1214L20	CCACCAGTGTGTCCATTATT			
s3Ezh2	TGTTTTAAATATGACTGCTTCC	cDNA	133	50
as2Ezh2	AATGCTGGTAACACTGTGGTCC			
sSuz12 1989U21	TGAATGGCTAAGAGAAAAAAC	cDNA	136	50
asSuz12 2125L21	TTCTACAAACAGCATAACAGGC			
sLEF1_1543U20	AGAAAGTGCAGCTATCAACC	cDNA	174	53
asLEF1 1695L22	TTCTCTCTCTCCTCTTCTTTT			
sPML 1264U20	GCTTCGACGAGTTCAAGGTG	cDNA	134	57
asPML 1378L20	GGGCAGGTCAACGTCAATAG			
sRUNX1 295U17	CACGAGCCGCGCTTCA	cDNA	146	64
asRUNX1 422L19	CGGCCAGCACCTCCACCAT			
s1HoxA9	CTGAGAATGAGAGCGGCGGAG	cDNA	245	59
as1HoxA9	CATTTTCATCCTGCGGTTCTGG			
HoxB4-sense	CCTGGATGCGCAAAGTTCA	cDNA	114	58
HoxB4-antisense	AATTCCTTCTCCAGCTCCAAGA			
sCD14 364U20	AGCTCAGAGGTTTCGGAAGAC	cDNA	154	59
asCD14 499L19	TGAGGTTTCGGAGAAGTTGC			
sCD16 859U18	CACTCAAGGTTTGGCAGT	cDNA	158	51,5
sCD16 998L19	GGTCCTTCCAGTCTCTTGT			
sGAPDH cDNA	ACCACAGTCCATGCCATCAC	cDNA	450	63
asGAPDH cDNA	TCCACCACCCTGTTGCTGTA			

Tab. 10: Primer für Sequenzierungen

Name	Sequenz von 5' nach 3'
s pCL6 seq	CGCCAGTCCTCCGACAGAC
as pCL6 seq	TTCGGCCAGTAACGTTAGG
s pCL2 seq	TGGCAGGAAGATGGCTGTGA
s Eed kurz 833U21	TGTCATTCAACAAGGAGAAATC
as Eed kurz 529L22	TGGATTGCTGTTCTCGTCACTG
T3	ATTAACCCTCACTAAAGGGA
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

Tab. 11: Primer für ChIP-Assay

Name	Sequenz von 5' nach 3'	Produktgröße [bp]	Tm [°C]
s2DL4PrChIP	GTTGCGCATGATGTGAAGTGA	142	53
as2DL4PrChIP	TGACACATTGACCACAACATGT		
sGAPDHPPrChIP	CAGCACAGCCCACAGGTTTCC	299	63
asGAPDHPPrChIP	CCTGGCTCCTGGCATCTCTGG		
sLINEPrunk	CCGGTCTACAGCTCCAGCG	344	60
asLINEPrunk	GCGAGATTCCGTGGGCGTAG		
sMYT1Pr_distal	AGGCACCTTCTGTTGGCCGA	330	62
asMYT1Pr_distal	AGGCAGCTGCCTCCCGTACA		
sESR1 126U22	CATTCTATCTGCCCTATCTCGG	180	56
asESR1 306L22	TTAAAATAAACGCGAAAGACGG		

Tab. 12: Primer für Mycoplasmentest

Name	Sequenz 5' nach 3'	Produktgröße [bp]	Tm [°C]
Myco F	GGGAGCAAACAGGATTAGATACCCT	190	63
Myco R	TGCACCATCTGTCACTCTGTAAACCTC		

4.1.2.5 TaqMan Assays

Zur Analyse der Genexpression wurden z. T. TaqMan Assays von Applied Biosystems verwendet.

Tab. 13: TaqMan Assays

Name	Gen	Referenz-Sequenz	Protein	Exon Grenzen	Lage	Produktgröße [bp]
Hs00243609_m1	EED	NM_003797.3	NP_003788.2	10-11	1592	133
Hs00172783_m1	EZH2	NM_001203247.1	NP_001190176.1	4-5	558	137
Hs99999905_m1	GAPDH	NM_002046.4	NP_002037.2	3-3	229	122
Hs00389738_m1	JMJD3	NM_001080424.1	NP_001073893.1	1-2	102	66
Hs00958902_m1	UTX	NM_021140.2	NP_066963.2	28-29	4552	71
Hs00248742_m1	SUZ12	NM_015355.2	NP_056170.2	8-9	1140	84

Weitere TaqMan Assays, die im Rahmen der MicroFluidic Card (4.2.1.3.2.3) verwendet wurden, sind im Anhang aufgeführt (Tab. 25).

4.1.2.6 Programme und Datenbanken

Tab. 14: Programme und Datenbanken

Programm/Datenbanken	Firma/Homepage	Referenz
Chromas Lite	Technelysium	
Clone Manager Suite	Scientific&Educational software	
ClustalW	www.ebi.ac.uk/clustalw/	
Cytomics RXP	Beckman Coulter	
DAVID functional annotation	http://david.abcc.ncifcrf.gov/	[247,248]
DNA Duster	www.soe.ucsc.edu/~kent/dnaDust/dnadust.html	
ExPASy	http://www.expasy.org/	
EZ Plasmid Map v1.9	www.infosake.com/plasmid/plasmidFrame.php	
Kaluza v1.2	Beckmann Coulter	
KC Junior	Bio-Tek instruments	
Lalign	www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html	
Mission shRNA search and order	www.sigmaaldrich.com/life-science/functional-genomics-and-rnai/shrna/shrna-search-and-order.html	
NCBI-Server	www.ncbi.nlm.nih.gov	
NimbleScan 2.6	Roche NimbleGen	
NNPP v2.2	http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html	
Odyssey 2.1 software	LI-COR	

Material und Methoden

Programm/Datenbanken	Firma/Homepage	Referenz
Oligo 6	www.oligo.net	
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/	
Promoter 2.0 Prediction Server	www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/	
RasMol	http://rasmol.org/	
RepeatMasker	www.repeatmasker.org	
SDS 2.3	Applied Biosystems	
SignalMap 1.9	Roche NimbleGen	
TFsearch	www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html	
The RNAi Consortium shRNA library	http://www.broadinstitute.org/rnai/trc/lib	

4.1.2.7 Referenzsequenzen

Als Referenzsequenzen dienen die Sequenzen mit folgenden Gene Bank Accession Nummern:

Tab. 15: Referenzsequenzen

Name		Spezies	Gene Bank Accession Nummer	Chromosomen Abschnitt
GAPDH	mRNA	human	NM_002046	
EED	mRNA	human	NM_003797	
EED	mRNA	human	NM_152991.1	
Eed	mRNA	murin	NM_021876.3	
EED	DNA			GRCh37:11:85955215:85990378:1
EED	Protein	human	NP_003788.2	
EED	Protein	human	NP_694536.1	
Eed	Protein	murin	NP_068676.1	
EED	Pseudogen	human	NW_001842405.1	
EZH2	mRNA	human	NM_004456	
SUZ12	mRNA	human	NM_015355	
LEF1	mRNA	human	NM_001130714.1	
PML	mRNA	human	NM_033238	
HOXA9	mRNA	human	NM_152739.3	
HOXB4	mRNA	human	NM_024015	
RUNX1	mRNA	human	NM_001754	
CD14	mRNA	human	NM_001174104.1	
CD16	mRNA	human	NM_001127592.1	

4.1.2.8 Materialien für die Bakterienkultur

Tab. 16: Materialien für die Bakterienkultur

Material	Firma/Bezugsquelle
Ampicillin	Sigma
IPTG	Invitrogen
Kanamycin	Sigma
LB Broth Base	Invitrogen
Select Agar	Invitrogen
SOC-Medium	Invitrogen
Tetracyclin	Sigma
Vektor pBluescript II KS+	Fermentas
Vektor pCD/NL-BH.mcpp	Prof. Dr. Helmut Hanenberg
Vektor pCL2	Prof. Dr. Helmut Hanenberg
Vektor pCL6	Prof. Dr. Helmut Hanenberg
Vektor pczHFVenv EMI 140	Prof. Dr. Helmut Hanenberg
X-Gal	Sigma

4.1.2.9 Verwendete Bakterien

E.coli SURE: e14⁻(McrA) Δ (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC [F' proAB lacI^dZAM15 Tn10 (Tet^r)]

Die Bakterien stammen von Gibco

4.1.2.10 Vektoren

Für die Klonierung der 5' RACE-Fragmente (4.2.1.5) wurde der Vektor pBluescript II KS+ (kurz pKS+) verwendet (Abb. 4). Er ist geeignet um die sog. Blau-Weiß-Screening (4.2.1.6.9) durchzuführen, da er das α -Fragment des β -Galactosidase Gens enthält.

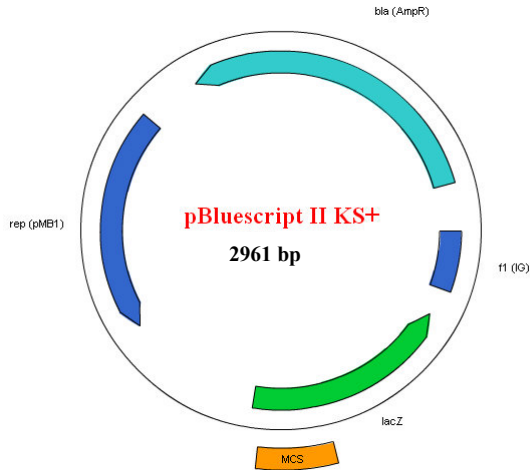


Abb. 6: Vektorkarte des Vektors pBluescript II KS+

Bei der Produktion von Lentiviren (4.2.3.5) wurden, wenn Gene überexprimiert werden sollten, der Vektor pCL6-IEG-wo (kurz pCL6) und zur Herabregulation mittels shRNA der Vektor pCL2 verwendet. Die Schnittstellen der verwendeten Enzyme sind jeweils in den Vektorkarten angegeben. Des Weiteren sind zur Produktion von Viren noch die Vektoren pczHFVenv EM140 und pCD/NL-BH notwendig. Ersterer codiert für die Hüllproteine des Foamy-Virus, letzterer für die Enzyme, die zum Verpacken der DNA in die Viruspartikel notwendig sind. Alle vier für die Produktion von Lentiviren benötigten Vektoren wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Helmut Hanenberg (HNO-Klinik, Uniklinik Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Im prinzipiellen Aufbau ähneln sich pCL6 und pCL2. Beide codieren für einige virusrelevante Gene (orange dargestellt), die über den CMV-Promotor exprimiert werden. Über den SFFV U3 Promotor wird in beiden Fällen GFP exprimiert. Hierbei unterscheiden sich die Vektoren jedoch voneinander. Bei pCL6 ist dem GFP eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) vorgelagert, die es ermöglicht, dass das Gen, das überexprimiert werden soll und GFP aus einer einzigen mRNA translatiert werden. Da shRNAs von der RNA-Polymerase III abgelesen werden, wird in diesem Fall ein gesonderter Promotor (hier der H1 Promotor) für die Expression benötigt. Weitere Bestandteile beider Vektoren werden für die Replikation in den Bakterien benötigt.

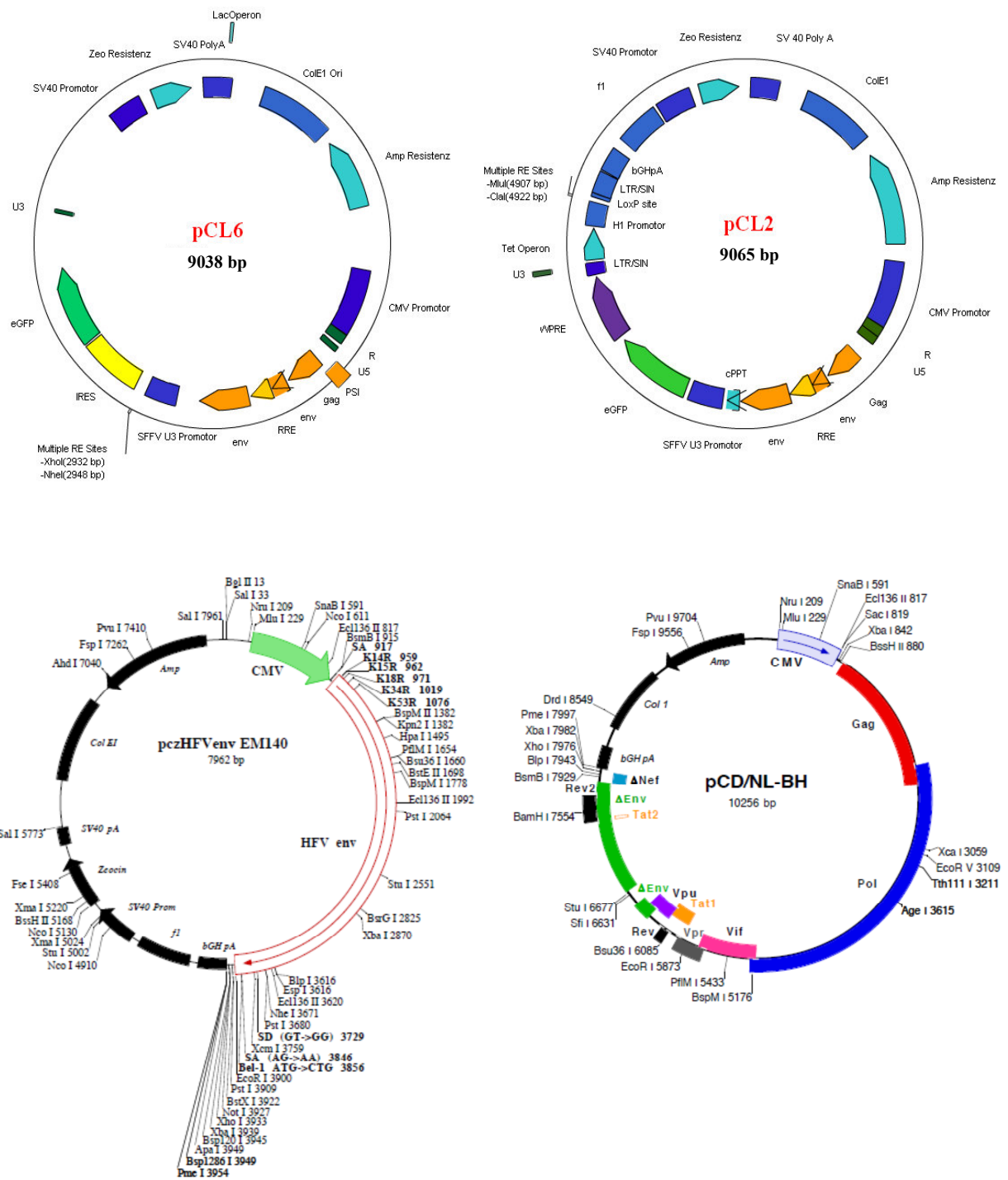


Abb. 7: Vektorkarten der für die Virusproduktion benötigten Vektoren.

PCL6-IEG-wo (kurz: pCL6) und pCL2 wurden für die Klonierung von cDNA bzw. shRNA verwendet. PczHFVenv EMI140 codiert für die Hüllproteine der Viren und pCD/NL-BH für die Enzyme, die zum Verpacken der Viren benötigt werden.

4.1.3 Materialien für die Zellkultur

4.1.3.1 Mediumgrundlagen und Puffer

Tab. 17: Materialien für die Zellkultur

Material	Firma
β-Mercaptoethanol (50 mM)	Gibco
Ammoniumchlorid, isotonisch	Uniklinik Düsseldorf, Eigenproduktion
Chloroquine-Diphosphat (25 mM)	Sigma
DMSO	Sigma
DMEM high Glucose (4,5 g/l)	Gibco
DMEM low Glucose (1 g/l)	Gibco
EDTA	Roth
Ethanolamin	Sigma
FBS	Biochrom
Ficoll (Biocoll)	Biochrom
Flt3-Ligand	Immunotools
Gelatine (2%)	Sigma
Humanalbumin (5%) Octalbin	Octapharma
Humanes AB Serum*	Lonza
IMDM	Gibco
Interleukin 2 (IL-2) (Proleukin)	Chiron
Interleukin 3 (IL-3)	Immunotools
Interleukin 7 (IL-7)	Immunotools
Interleukin 15 (IL-15)	Immunotools
Lipofektamin 2000	Invitrogen
L-Glutamin	Gibco
MethoCult GF H84434	Stem Cell Technologies
Natriumselenit	Sigma
OptiMEM	Gibco
PBS	Lonza
Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml)	Gibco
Pferdeserum*	Stem Cell
Poly D-Lysin homobromid	Sigma
Retronektin	Takara
RPMI 1640	Lonza
SCF	Immunotools
Trypanblau (0,4 %)	Sigma
Trypsin	Gibco
X-Gal	Sigma

* Hitzeinaktiviert für 30 min bei 56°C

4.1.3.2 Zelllinien

Tab. 18: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Spezies	Besonderheit	Literatur
EL08-1D2	embryonale Leberzelle (Stadium E11)	Mus musculus	transfiziert mit dem large T Antigen	[249,250]
HEK293T	embryonale Nierenzelle	Homo sapiens	transfiziert mit Adenovirus Typ 5 sowie dem large T Antigen	[251-254]
HeLa	Cervix Karzinom	Homo sapiens		[255,256]
Jurkat	CD4 ⁺ T-Zelle	Homo sapiens		[257]
NK3.3	NK-Zelle	Homo sapiens		[258]

4.1.3.3 Primäre Zellen

Neben Zelllinien wurden auch primäre Zellen kultiviert. Zum einen handelte es sich hierbei um verschiedene Lymphozytenpopulationen, zum anderen um Fibroblasten. Die Lymphozyten wurden wie unter 4.2.3.2 beschrieben aus Nabelschnurblut oder peripherem Blut gewonnen. Die Fibroblasten wurden freundlicherweise von Dr. Peter Schröder aus dem Institut für umweltmedizinische Forschung (IUF), Düsseldorf, zur Verfügung gestellt. Die Zellen stammten aus der Vorhaut eines 2-jährigen Jungen.

4.1.3.4 Zellkulturmedien

NK3.3

RPMI 1640
10 % FBS
1 % Penicillin/Streptomycin
15 % IL-2 haltiger Kulturüberstand
nach Kahle *et al.* [259].
200 U/ml IL-2

Jurkat

RPMI 1640
10 % FBS
1 % Penicillin/Streptomycin

Fibroblasten

DMEM low Glucose
10 % FBS
1 % L-Glutamin
1 % Penicillin/Streptomycin

Hela

DMEM (4,5 g/l Glucose)
10 % FBS
1 % Penicillin/Streptomycin

HEK293T

DMEM (4,5 g/l Glucose)
10 % FBS
1 % Penicillin/Streptomycin

EL08

80 % IMDM
15 % FBS
5 % Pferdeserum (Hitzeinaktiviert)
1 % Penicillin/Streptomycin
1 % L-Glutamin

MEF-Medium

RPMI 1640
10 % FBS
1 % Penicillin/Streptomycin
1 % Nicht-Essentielle Aminosäuren
1 % Natrium-Pyruvat

2 % Advanced MEF-Medium

Advanced DMEM
2 % FBS (Virus)
1 % Penicillin/Streptomycin
1 % L-Glutamin

5 % Advanced MEF-Medium

Advanced DMEM
5 % FBS (Virus)
1 % Penicillin/Streptomycin
1 % L-Glutamin

Material und Methoden

NK1 Medium

27,5 ml DMEM (4,5 g/l Glucose)
 12,5 ml Ham's F12
 10 ml humanes AB Serum*
 20 µg Vitamin C
 50 µmol/ml Ethanolamin
 50 µg/ml Natriumselenit
 24 µM β Mercaptoethanol
 500µl Penicillin/Streptomycin
 1000 U/ml IL2
 5 ng/ml IL3
 20 ng/ml IL7
 10 ng/ml Flt3 Ligand
 20 ng/ml SCF

NK2 Medium

30 ml DMEM (4,5 g/l Glucose)
 15 ml Ham's F12
 5 ml humanes AB Serum*
 20 µg Vitamin C
 50 µmol/ml Ethanolamin
 50 µg/ml Natriumselenit Natriumselenit
 24 µM β Mercaptoethanol
 500 µl Penicillin/Streptomycin
 1000 U/ml IL2
 20 ng/ml IL7
 10 ng/ml IL15
 10 ng/ml Flt3 Ligand
 20 ng/ml SCF

*Hitzeinaktiviert; 56°C 30 min

4.1.3.5 Kits für die Zellkultur

Tab. 19: Kits für die Zellkultur

Kit	Firma
CD34 MicroBead Kit	Miltenyi
Lineage Cell Depletion Kit (enthält Antikörper gegen: CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123, and CD235a)	Miltenyi
VenorGem Mycoplasma Test	Minerva Biolabs

4.1.3.6 Antikörper und Farbstoffe für Durchflusszytometrie-Färbungen

Tab. 20: Antikörper und Farbstoffe für Durchflusszytometrie-Färbungen

Antigen	Exprimierende hämatopoietische Zellen	Klon	Fluorophor	Firma
CD13	Granulozyten, Monozyten, myeloide Vorläufer, dendritische Zellen	L138	PE	Beckman Coulter
CD13	Granulozyten, Monozyten, myeloide Vorläufer, dendritische Zellen	Immu103.44	PE/Cy5	Beckman Coulter
CD14	Monozyten, Macrophagen, Granulozyten (schwach)	M5E2	PE	BD Biosciences
CD14	Monozyten, Macrophagen, Granulozyten (schwach)	HCD14	APC/Cy7	Biolegend
CD16	NK-Zellen, aktivierte Monozyten und Macrophagen	3G8	PE/Cy5 PE ECD	Biolegend Beckman Coulter

Material und Methoden

Antigen	Exprimierende hämatopoietische Zellen	Klon	Fluorophor	Firma
CD33	Monozyten	D3HL60.251	PE/Cy5	Beckman Coulter
CD34	Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen	581	PE ECD	Beckman Coulter /Biolegend
CD38	Diverse hämatopoietische Zellen, vor allem Plasmazellen und aktivierte T- und B-Zellen	HIT2	PE/Cy5	Biolegend
CD56	NK-Zellen, NKT-Zellen, T-Zell Subpopulationen	N901 (NKH-1)	PE PECy5	Beckman Coulter
CD56	NK-Zellen, NKT-Zellen, T-Zell Subpopulationen	AF12-7H3	PE/VIO770	Miltenyi
CD159a (NKG2A)	NK-Zellen, T-Zellsubsets	Z199.1.10	APC/Cy7	Beckman Coulter
DRAQ5	Kernfarbstoff (lebende Zellen)			
Lineage Cocktail CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56	Differenzierte hämatopoietische Zellen	NCAM16.2, MφP9, L27, SJ25C1, 3G8, SK7	FITC	BD Biosciences
CD303 (BDCA2)	Plasmacytoide dendritische Zellen	AC144	PE	Miltenyi
HLA-DR	Monozyten, Macrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen, aktivierte T-Zellen, NK-Zellen, HPCs	G46-6	PE	BD Biosciences
HLA-DR	Monozyten, Macrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen, aktivierte T-Zellen, NK-Zellen, HPCs	Immu-357	PE/Cy5	Beckman Coulter
NKAT2 (KIR2DL3)	NK-Zellen, T-Zellsubsets	GL183	APC	Beckman Coulter

4.1.4 Puffer und Lösungen

<u>Blaumarker:</u>	dH ₂ O	35 ml
	Glycerin	15 ml
	Xylene Cyanol	1 Spatelspitze
	Bromphenolblau	1 Spatelspitze
<u>Elutionspuffer:</u>	SDS	1%
	NaHCO ₃	0,1 M
<u>Färbelösung pH4:</u>	0,5 M K ₄ [Fe(CN) ₆]	10 µl
	0,5 M K ₃ [Fe(CN) ₆]	10 µl
	Zitronensäure-Phosphat Puffer pH4	40 µl
	5 M NaCl	30 µl
	XGal (40 mg/ml in DMSO)	25 µl
	ad 1 ml dH ₂ O	
<u>Färbelösung pH6:</u>	0,5 M K ₄ [Fe(CN) ₆]	10 µl
	0,5 M K ₃ [Fe(CN) ₆]	10 µl
	Zitronensäure-Phosphat Puffer pH6	40 µl
	5 M NaCl	30 µl
	XGal (40 mg/ml in DMSO)	20 µl
	ad 1 ml dH ₂ O	
<u>MACS-Puffer:</u>	PBS	500 ml
	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	5 ml
	Humanes Serum Albumin (5%)	2 ml
<u>Lysispuffer 1:</u>	HEPES, pH 8	10 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	KCl	10 mM
	DTT	1 mM
<u>Lysispuffer 2:</u>	HEPES, pH 8	20 mM
	MgCl ₂	1,5 mM
	Glycerol	25%
	NaCl	420 mM
	EDTA pH 8	0,2 mM
<u>H2 Puffer:</u>	HEPES, pH 7,6	5 mM
	EDTA	0,5 mM
	Saccharose	0,1 mM
	DTT	0,1 mM
<u>HBS Puffer (2x):</u>	Hepes	100 mM
	NaCl	280 mM
	Na ₂ HPO ₄	1,5 mM
	pH einstellen auf 6,95/7,00/7,05	

Material und Methoden

<u>PBS/EDTA:</u>	PBS	500 ml
	EDTA (0,5 M, pH 8,0)	5 ml
<u>Protease-Inhibitor-Lsg.:</u>	PBS	15 ml
	Leupetin (23,8 µg/µl)	1 µl
	Pepstatin (1 mg/ml)	10 µl
	PMSF (100 mM)	75 µl
	½ Tablette Complete Mini EDTA Free Protease-Inhibitor Mix	
<u>TBE-Puffer (10x):</u>	Tris Base	89 mM
	Borsäure	89 mM
	EDTA	2 mM
<u>TE-Puffer (1x):</u>	Tris HCl (pH 7,4)	10 mM
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
<u>WB Laufpuffer (1x):</u>	Tris-Base	25 mM
	Glycin	192 mM
	SDS	0,1 %
<u>WB-Lösung (1x):</u>	Tris-Base	25 mM
	Glycin	192 mM
<u>WB Transferpuffer (1x):</u>	Westernblotlösung	10 %
	Methanol	20 %
	dH ₂ O	70 %
<u>Zitronensäure-Phosphatpuffer nach McIlvaine [260]:</u>		
Für 10 ml:		
pH 6,0:	0,2 M Na ₂ HPO ₄	6,32 ml
	0,1 M Zitronensäure	3,68 ml
pH 4,0:	0,2 M Na ₂ HPO ₄	3,86 ml
	0,1 M Zitronensäure	6,14 ml

4.1.4.1 DEPC-Wasser

Mit Hilfe von DEPC (Diethylpolycarbonat) können RNasen inhibiert werden. Dabei bindet DEPC in wässriger Lösung kovalent an Histidinreste der RNasen, was zum Verlust der enzymatischen Aktivität führt. Zur Herstellung von DEPC-Wasser wurde Wasser mit 0,1% (v/v) DEPC für mindestens 1 Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend mit dem Standardprogramm für Flüssigkeiten (20 min, 121°C) autoklaviert. Meist wurde das DEPC

behandelte Wasser freundlicherweise von Dr. Hans-Ingo Trompeter (ITZ, Uniklinik Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

Da RNA sehr sensitiv gegenüber enzymatischer Degradation ist, wurde bei der Arbeit mit RNA immer DEPC-Wasser verwendet. Lösungen, die für die Isolation der RNA benötigt wurden, wurden auch immer mit DEPC-Wasser angesetzt.

4.2 Methoden

4.2.1 molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 RNA Isolation

4.2.1.1.1 RNA Isolation mit dem Qiagen Kit

RNA wurde mit dem RNeasy Kit von Qiagen isoliert. Zur Homogenisierung der Lysate wurden QIASHredder-Säulen verwendet. Es wurde nach den Anweisungen des Herstellers vorgegangen, und immer auch der optionale DNase-Verdau mit der DNase von Qiagen durchgeführt, wobei dieser z.T. bis auf 30 min verlängert wurde. Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die RNA bei -80°C eingefroren. Wurde die RNA nicht direkt aus den Zellen isoliert, so wurden diese in RLT-Puffer mit 10% β -Mercaptoethanol bei -20°C eingefroren.

4.2.1.1.2 RNA-Isolation mit dem mirVana Kit

RNA wurde mit dem mirVana Kit von Ambion isoliert. Die Zellen wurden, je nach Zellzahl, in 300-600 μ l mirVana Lysisbuffer aufgenommen und entweder sofort weiterverwendet oder bei -20°C bis zur Isolation gelagert. Die Isolation erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zum Teil wurde hier nicht nur die Gesamt-RNA isoliert, sondern es wurden RNAs kleiner als 200 bp getrennt von den größeren RNAs präpariert. Bei der Isolation der größeren RNAs und auch bei Gesamt-RNA wurde meist ein zusätzlicher DNase Verdau auf der Säule durchgeführt. Dazu wurde zunächst nur einmal mit Wash-Puffer 2/3 gewaschen. Anschließend wurde eine Lösung aus 10 μ l DNase (Qiagen) und 70 μ l RDD Puffer (Qiagen) auf die Säule gegeben und ca. 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde erneut mit 500 μ l Wash-Puffer 2/3 gewaschen und dann das Protokoll wie vom Hersteller empfohlen beendet. Die RNA wurde in 100 μ l heißem RNase-freiem Wasser eluiert, die Konzentration gemessen und die Probe bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

4.2.1.1.3 DNase Verdau in Lösung

Um zu überprüfen, ob die RNA nach der Aufreinigung noch DNA-Spuren enthielt, wurde eine PCR gegen den *GAPDH*-Promotor durchgeführt (siehe 4.2.1.3.1). War diese positiv, wurde die RNA entweder in Lösung noch einmal für 30 min mit der DNase von Qiagen nach den Angaben des Herstellers verdaut und anschließend erneut über eine Säule aufgereinigt oder wie folgt mit der DNase von Fermentas behandelt:

RNA (1µg)	x µl
Puffer mit MgCl ₂ (10x)	1 µl
DNase (1 U/µl)	1 µl

Die Proben wurden 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die DNase durch eine zehnminütige Inkubation bei 65°C hitzeinaktiviert. Um zu verhindern, dass die RNA bei der erhöhten Temperatur ebenfalls denaturiert, wurde die Lösung zum Schutz der RNA vorher mit 5 mM EDTA versetzt

4.2.1.2 Reverse Transkription

4.2.1.2.1 Standard Reverse Transkription (RT)

Um zu analysieren, ob ein bestimmtes Transkript auf RNA-Ebene nachweisbar ist, wurde die RNA zunächst mit Hilfe der Reversen Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV) wie folgt in cDNA umgeschrieben:

RNA (500 ng)	x µl
Oligo dT Primer (0,5 µg/µl)	1 µl
dH ₂ O (RNase frei)	ad 15 µl

Es wurde 5 min bei 70°C inkubiert um Sekundärstrukturen im Template zu schmelzen. Anschließend wurden die übrigen Reagenzien hinzu gegeben:

M-MLV-Puffer (5x)	5 µl
dNTPs (10mM)	1,25 µl
RNasin (40 U/µl)	0,63 µl
M-MLV reverse Transkriptase (200 U/µl)	1 µl
dH ₂ O (RNase frei)	ad 25µl

Die Reaktion erfolgte für 1 Stunde bei 42°C.

Anschließend wurde die cDNA bis zu ihrer Verwendung bei -80 °C weggefroren.

Bei dieser Methode wurden ausschließlich Oligo (dT) Primer verwendet, da diese spezifisch an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden. So ist zum einen gewährleistet, dass nur mRNA und keine andere RNA-Sorte umgeschrieben wird. Zum anderen erhält man so auch ein durchgängiges cDNA Produkt, das sich zum Klonieren eignet. Als Alternative können auch sog. *Random* Primer verwendet werden. Diese bestehen aus sechs zufällig aneinandergereihten Nukleotiden, die statistisch in der RNA Sequenz binden. Sie sind notwendig, wenn eine andere RNA Sorte als mRNA analysiert werden soll, oder wenn das nachzuweisende Fragment im 5' Bereich einer langen RNA liegt. Bei Oligo (dT) Primern besteht hierbei immer die Gefahr, dass die reverse Transkriptase nicht bis zum Ende der RNA hin synthetisiert und vorher abbricht.

4.2.1.2.2 Reverse Transkription für die MicroFluidic Card

Für das Screening mit der MicroFluidic Card (siehe 4.2.1.3.2.3) wurde eine andere Methode der cDNA Synthese gewählt. Da hier viele verschiedene Produkte gleichzeitig amplifiziert werden sollten, unter anderem auch solche, deren Ursprung in rRNA und nicht mRNA liegt, wurde der iScript cDNA Synthesis Kit von BioRad verwendet, bei dem sowohl Oligo (dT) als auch Random Primer gleichzeitig eingesetzt werden.

Es wurden zunächst 500 ng RNA in einem Volumen von 10 µl für 5 min auf 70°C erhitzt um Sekundärstrukturen zu schmelzen. Anschließend wurde die RNA auf Eis abgekühlt. Dann wurden die zum Umschreiben nötigen Reagenzien hinzugegeben:

RNA (500 ng)	10 µl
Reaktionsmix (5 x)	4 µl
iScript Reverse Transkriptase	1 µl
dH ₂ O (RNase frei)	ad 15 µl

Es wurde wie folgt inkubiert:

25°C	5 min
42°C	60 min
85°C	5 min
4°C	∞

Anschließend wurde die cDNA bis zu ihrer Verwendung bei -80°C weggefroren.

4.2.1.3 PCR

4.2.1.3.1 Endpunkt PCR

Um bestimmte Transkripte in einer Probe nachzuweisen, oder um sie ggf. zu klonieren, wurden DNA und cDNA-Fragmente mittels PCR amplifiziert [261-264]. cDNA wurde, wie unter 4.2.1.2. beschrieben, gewonnen. Sollten die PCR-Produkte kloniert werden, wurde die Advantage2 Polymerase verwendet und Schnittstellen für Restriktionsenzyme über die verwendeten Primer eingefügt. Außerdem wurden für diese Zwecke bis zu 10 der jeweiligen 25 µl Ansätze vereinigt. Um lediglich nachzuweisen, dass ein bestimmtes Transkript in einer Probe vorliegt, wurden, je nach Primerpaar und Fragestellung, Taq oder Hot Star Taq Polymerase verwendet.

Mastermix PCR

Pro Probe:

Puffer (10x)	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,12 µl
DNA (ca. 40 ng)	
dH ₂ O	ad 25 µl

Mastermix Hot-Star PCR

Pro Probe:

Puffer (10x)	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Hot Star Taq Polymerase (5 U/µl)	0,2µl
DNA (ca. 40 ng)	
dH ₂ O	ad 25 µl

Mastermix für die PCR mit der Advantage2 Polymerase

Pro Probe:

Puffer (10x)	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Advantage2 Polymerase	0,5 µl
DNA (ca. 80 ng)	
dH ₂ O	ad 25 µl

PCR-Programme:

für die Taq Polymerase

95°C	3 min	} 38 x
95°C	30-55 s	
Tm°C	15-60 s	
72°C	1 min/kb	
72°C	7 min	
4°C	∞	

für die Hot Star Taq Polymerase

95°C	15 min	} 38 x
95°C	30-55 s	
Tm°C	15-60s	
72°C	1 min/kb	
72°C	7 min	
4°C	∞	

für die Advantage2 Polymerase

95°C	5 min	} 35 x
95°C	5 s	
Tm°C	15 s	
72°C	1 min/kb	
72°C	7 min	
4°C	∞	

4.2.1.3.2 Real-Time PCR

Zur Quantifizierung von Transkripten und DNA-Fragmenten wurden Real-Time PCRs durchgeführt [265]. Hierbei wird die Menge der synthetisierten DNA direkt während der Reaktion über ein Fluoreszenzsignal bestimmt. Dabei existieren zwei unterschiedliche Techniken; zum einen der Nachweis von doppelsträngiger DNA über SYBR Green und zum anderen der Nachweis spezifischer Amplifikate mittels fluoreszenzgekoppelter Sonden.

4.2.1.3.2.1 Expressionsanalyse mittels SYBR Green

Bei der DNA-Quantifizierung mit Hilfe von SYBR Green wird für die PCR ein Mix verwendet, der dNTPs, Polymerase und SYBR Green enthält. Daneben werden noch die zu analysierende DNA bzw. cDNA sowie die spezifischen Primer hinzugegeben.

SYBR Green bindet sequenzunabhängig in der kleinen Furche der DNA [265]. Das Emissionsmaximum von SYBR Green liegt bei 520 nm, die Anregungswellenlänge beträgt 480 nm. Da die gebundenen Moleküle etwa 1000-mal so stark fluoreszieren wie der freie Farbstoff, eignet sich dieser Stoff sehr gut zum Nachweis von doppelsträngiger DNA. Während der Real-Time PCR wird in jedem Zyklus die vorhandene doppelsträngige DNA-Menge über die SYBR Green Fluoreszenz gemessen. Ein Nachteil dieser Methode ist, dass

hiermit nicht zwischen spezifischem Produkt und unspezifischen Nebenprodukten, wie z.B. Primerdimeren unterschieden werden kann [265]. Um sicherzustellen, dass es nur ein Amplifikat gibt, wurde im Anschluss an die PCR immer noch eine Schmelzkurve erstellt. Hierbei wird die amplifizierte DNA noch einmal aufgeschmolzen. Dazu wird die Temperatur kontinuierlich erhöht, sodass der neusynthetisierte Doppelstrang bei seiner spezifischen Schmelztemperatur denaturiert. Im Idealfall sollte es bei dieser Analyse nur einen Peak für das spezifische Produkt geben.

SYBR Green basierte PCRs wurden am TaqMan 7700 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der SDS2.3 Software von Applied Biosystems.

Mastermix für die SYBR Green basierte Real-Time PCR:

Pro Probe:

Primer (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l
Primer (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l
SYBR Green Mastermix	7,0 μ l
cDNA (ca. 10 ng)	2 μ l
dH ₂ O	5,0 μ l

Programme:

für die Real-Time PCR

95°C	10 min	} 40x
95°C	30 s	
T _m °C	30 s	
72°C	30-35 s	

für die Erstellung einer Schmelzkurve

95°C	15 sec
60°C	20 sec
Langsames Aufheizen über 20 min	
95°C	15 sec

4.2.1.3.2.2 Expressionsanalyse mittels fluoreszenzmarkierter Sonden

Zur Quantifizierung mittels fluoreszenzmarkierter Sonden wurden TaqMan Assays von Applied Biosystems verwendet. Bei dieser Methode wird zur cDNA ein Puffermix, der unter anderem die Polymerase enthält, sowie der Assay selbst, der aus den Primern und einer fluoreszenzmarkierte Sonde, die für den zu amplifizierenden Bereich spezifisch ist, hinzugegeben. Die Sonde trägt neben der am 5' Ende befindlichen Fluoreszenzmarkierung (6-FAM-phosphoramidit, kurz FAM) am 3' Ende einen Quencher (TAMRA). Wenn die Sonde frei vorliegt oder an ein DNA-Fragment bindet, befinden sich Quencher und Fluorophor in räumlicher Nähe, sodass die emittierte Fluoreszenz komplett gequenched, also gelöscht, wird.

Wird allerdings der DNA Strang, an den die Sonde gebunden ist, amplifiziert, so wird die Sonde durch die Polymerase abgebaut. Hierbei werden Fluorophor und Quencher voneinander getrennt, sodass nun messbare Fluoreszenz emittiert wird [265].

Dadurch, dass neben den Primern noch die produktspezifische Sonde verwendet wird, erhöht sich mit dieser Methode die Genauigkeit gegenüber der SYBR Green basierten Methode und es kommt seltener zu unspezifischen Amplifikationen.

Auch TaqMan Assay basierte PCRs wurden am TaqMan 7700 durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der SDS2.3 Software von Applied Biosystems.

Mastermix für TaqMan Assays:

Pro Probe:

2 x TaqMan Gene Expression Master Mix	10,0 µl
20 x TaqMan Gene Expression Assay	1,0 µl
dH ₂ O	7,0 µl
cDNA (ca. 20 ng)	2,0 µl

Programm für TaqMan Assays:

95°C	10 min	} 40 x
95°C	15 s	
60°C	60 s	

4.2.1.3.2.3 Expressionsanalyse mittels MicroFluidic Card

Auf einer MicroFluidic Card von Applied Biosystems können verschiedene TaqMan Assays parallel zueinander durchgeführt werden. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Format wurde die Expression von 48 Genen in 8 Proben gleichzeitig bestimmt. Die Messung beruht auf dem unter 4.2.1.3.2.2 beschriebenen Prinzip der TaqMan Assays. Bei der Microfluidic Card sind die entsprechenden Assays (Primer und Sonde) auf der 384 Wells umfassenden Karte vorgelegt. Anschließend werden dann nur noch die individuellen Proben sowie der PCR Mix hinzugegeben. Über Zentrifugation werden die Proben auf die Taschen der MicroFluidic Card verteilt. Anschließend erfolgt die Amplifikation mit dem gleichen Programm wie für die TaqMan Assays (siehe 4.2.1.3.2.2).

Ansatz für jede Probe der MicroFluidic Card:

2 x TaqMan Universal PCR Master Mix	50 μ l
dH ₂ O	30 μ l
cDNA (ca. 500 ng)	20 μ l

Messungen mit der MicroFluidic Card wurden am TaqMan 7900HT durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der SDS2.3 Software von Applied Biosystems.

4.2.1.3.2.4 Quantifizierung für die Real-Time PCR

Bei allen oben beschriebenen Techniken steigt die gemessene Fluoreszenz mit der Menge der synthetisierten DNA an und lässt somit Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge zu. Trägt man die Fluoreszenzintensität gegen den PCR Zyklus auf, so erhält man charakteristische Kurven (Abb. 8).

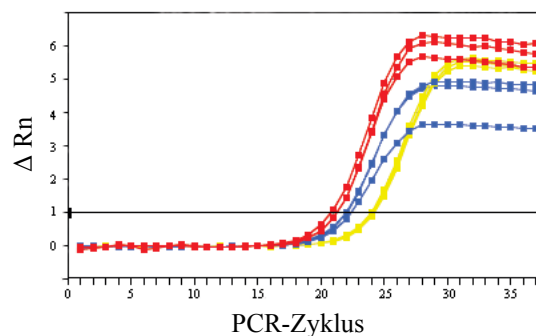


Abb. 8: Exemplarische Darstellung des charakteristischen Kurvenverlaufs bei der Real-Time PCR

Nach einer gewissen Anzahl von PCR-Zyklen, steigt die gemessene Fluoreszenz über einen festgelegten Schwellenwert (*threshold*). Der entsprechende Zyklus wird *threshold cycle* (CT) genannt.

Zur Auswertung der Real-Time PCR wurde die ddCT Methode verwendet [265]. Hierbei subtrahiert man zunächst vom CT Wert des Zielgens den eines *Housekeepers* (dCT). Anschließend wird von diesem Wert der dCT Wert einer Referenzsituation (z.B. Tag 0 oder Leervektor) abgezogen (ddCT). Berechnet man dann 2^{-ddCT} so erhält man die n-fache Expression (*Fold change*) [265]. Gibt es keine sinnvolle Referenzsituation, so gibt der Wert 2^{-dCT} Auskunft über die relative Expressionsstärke.

4.2.1.3.2.5 Statistische Analysen der Real-Time PCR Proben

Um zu ermitteln, ob die Ergebnisse statistisch relevant sind, wurden zunächst die Mittelwerte der einzelnen dCT Werte gebildet. Aus diesen wurde dann der gemittelte ddCT berechnet und in die Formel 2^{-ddCT} eingesetzt. Anschließend wurde das 95% Konfidenzintervall für den entsprechenden Mittelwert berechnet. Dazu wurde zunächst die Standardabweichung σ der dCT-Werte bestimmt. Aus dieser ergibt sich die Standardabweichung für den *Fold change*:

$$\sigma_{FC} = FC * \ln(2) * \sqrt{(\sigma_x^2 / n_x + \sigma_y^2 / n_y)}$$

mit

σ_x : Standardabweichung dCT Testgruppe

σ_y : Standardabweichung dCT Referenzgruppe

n_x : Probenanzahl Testgruppe

n_y : Probenanzahl Referenzgruppe

FC: *Fold change*

Das 95 % Konfidenzintervall (CI) ergibt sich dann wie folgt:

$$95\% \text{ CI} = (FC - 1.96 * \sigma_{FC}, FC + 1.96 * \sigma_{FC})$$

Die Differenz der verschiedenen Werte zum *Fold change* wird als Fehlerbalken im Diagramm dargestellt.

Um die Signifikanz zu berechnen wurden 2-seitige t-Tests mit den dCT-Werten als Grundlage durchgeführt.

4.2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA Fragmenten nach ihrer Größe wurden Agarosegele in 1x TBE verwendet. Die Gele wurden mit 30 $\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid gefärbt. Vor dem Auftragen wurde jede Probe mit 5-fach Blaumarker vermischt.

Als Marker dienten die 100 bp Leiter (Größe der Fragmente in bp von oben nach unten: 2072, 1500, 1000, 900, 800, 700, **600**, 500, 400, 300, 200, 100) oder die 1 kb Leiter von Invitrogen (Größe der Fragmente in bp von oben nach unten: 12216, 11198, 10180, 9162, 8144, 7126, 6108, 5090, 4072, 3054, 2036, **1636**, 1018, 506/517, 399).

4.2.1.5 5'-RACE (rapid amplification of cDNA ends)

Mit der 5'-RACE-Technik (Abb. 9) ist es möglich cDNA Fragmente zu klonieren und zu sequenzieren, deren 5'-Ende man nicht genau kennt [266].

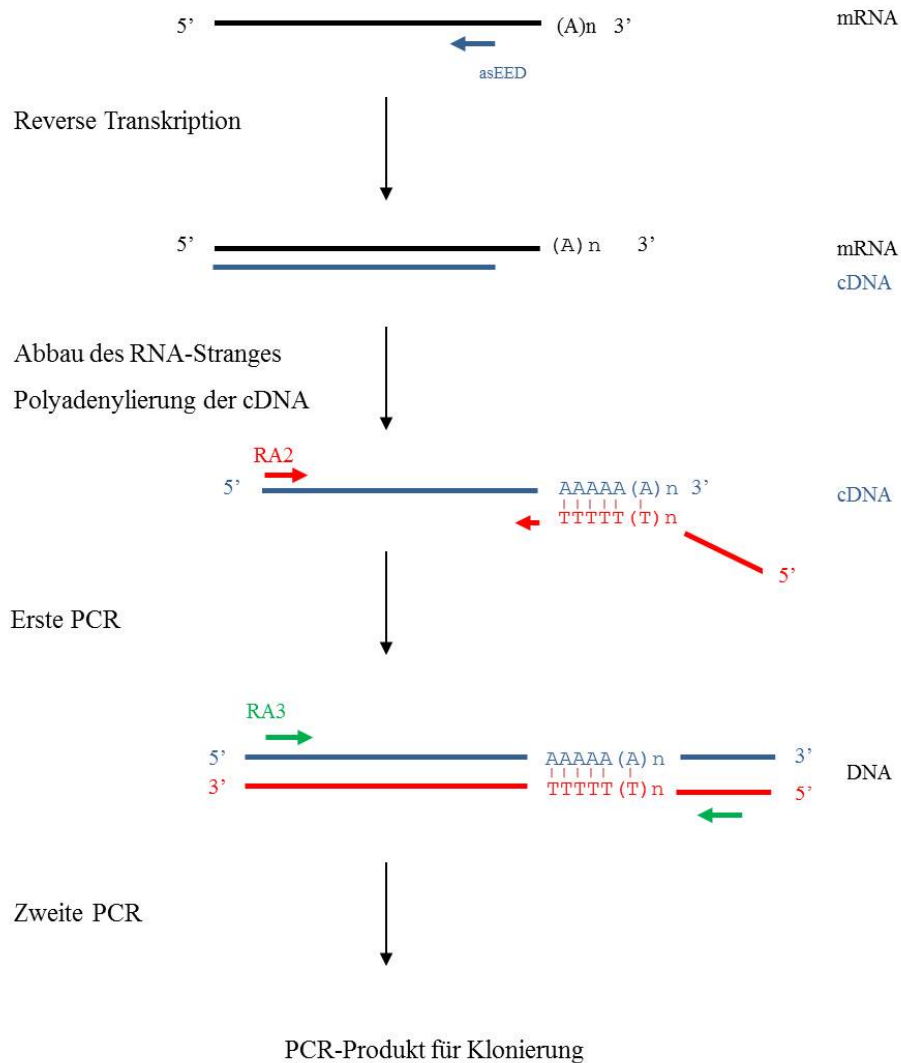


Abb. 9: Schematische Darstellung der 5'-RACE-Technik
 Modifiziert nach Roche 5'/3' RACE Kit, 2nd Generation, Nutzerinformation

Material und Methoden

Zunächst wird eine reverse Transkription mit einem für die interessierende mRNA spezifischen *antisense* Primer durchgeführt. Dabei enden die entstandenen Sequenzen dort wo das 5'-Ende des vorliegenden Transkripts liegt. Anschließend wird die RNA abgebaut und die cDNA am 3'-Ende adenyliert. Dann wird das Fragment mittels PCR amplifiziert. Dazu werden ein spezifischer 5'-Primer und ein Oligo-dT-Anker-Primer für das 3'-Ende verwendet. Letzterer bindet an den Poly-A-Schwanz der cDNA. Sein 5'-Ende, das eine Schnittstelle für ein Restriktionsenzym enthält, bindet nicht. In einer anschließenden „*nested*-PCR“ wird die DNA weiter amplifiziert. Es werden ein „Anker“-Primer, der komplementär zur eingeführten Schnittstelle ist und ein spezifischer Primer verwendet. Der spezifische Primer führt ebenfalls eine Schnittstelle ein.

Durchführung:

Zunächst werden mit einem spezifischen Primer (hier asEED_L1704) anhand von RNA-Matrizen cDNAs synthetisiert:

cDNA Synthese Puffer	4 µl
dNTPs	2 µl
Primer (asEED_L1704)	1 µl
0,5-1 µg RNA	x µl
Transcriptor reverse Transcriptase	1 µl
dH2O	ad 20 µl

Es wurde 60 min bei 55°C inkubiert, anschließend noch einmal 5 min bei 85°C. Die Mischung wurde abzentrifugiert und, abweichend vom empfohlenen Protokoll, mit dem PCR-Purification Kit von Qiagen aufgereinigt.

Anschließend wurde das 3'-Ende der cDNA polyadenyliert.

cDNA	19 µl
Puffer	2,5 µl
2 mM dATP	2,4 µl

Die Reagenzien wurden gemischt und alles 3 min bei 94°C inkubiert. Danach wurde sofort auf Eis gekühlt. 80 U Terminale Transferase wurden hinzugefügt und es wurde bei 37°C für 30 min inkubiert. Durch eine zehnmütige Inkubation bei 70°C wurde das Enzym inaktiviert. Im Anschluss daran wurde eine erste PCR durchgeführt:

Material und Methoden

Polyadenylierte cDNA	5 µl
Oligo dT-Anker Primer	1 µl
Primer (RA2 EED)	1 µl
dNTPs	1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
10x Puffer	5 µl
dH2O	36,5 µl

PCR-Programm:

94°C	2 min	
94°C	15 s	} 10 x
Tm°C	30 s	
72°C	40 s	
94°C	15 s	} 25 x
Tm°C	30 s	
72°C	40* s	
72°C	7 min	
4°C	∞	

*Die Elongationszeit wurde in jedem Zyklus um 20 Sekunden verlängert

Das PCR-Produkt wurde 1:20 verdünnt und in eine „nested“ PCR eingesetzt

PCR-Produkt	1 µl
PCR Anker Primer	1 µl
Primer (RA3 EED)	1 µl
dNTPs	1 µl
Taq-Polymerase	0,5 µl
10x Puffer	5 µl
dH2O	40,5 µl

Das PCR Programm entsprach dem für die erste PCR.

Die 5'-RACE Produkte wurden anschließend in den Vektor pBluescript II KS+ (Abb. 6) kloniert (4.2.1.6.4-4.2.1.6.6).

4.2.1.6 Klonierung und Transformation von Bakterien

Um (c)DNA Fragmente zu amplifizieren und ihre Funktion näher zu analysieren, wurden sie in Vektoren kloniert (4.2.1.6.4-4.2.1.6.6) und anschließend in Bakterien transfiziert. Hierbei wurden zwei verschiedene Methoden, die chemische Transformation (4.2.1.6.8) oder die Elektroporation (4.2.1.6.7), angewendet. Für die chemische Transformation wurden TOP10F' Zellen von Invitrogen verwendet. Hierbei handelt es sich um *E. coli* Bakterien, die durch eine CaCl₂-Behandlung hitzekompetent gemacht wurden. Für die Elektroporation wurden kompetente *E.coli* SURE hergestellt.

4.2.1.6.1 Herstellung von elektrokompetenten *E.coli* SURE

Bakterien aus der original *E.coli* SURE Stocklösung wurden auf einer Agarplatte mit 30 µg/ml Kanamycin und 12,5 µg/ml Tetracyclin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Kolonie gepickt und eine 25 ml Vorkultur angeimpft. Diese wurde ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Morgen wurde 1 Liter LB-Medium mit Kan/Tet mit 1/100 Volumen der Übernachtskultur angeimpft. Die Zellen wurden bis zu einer optischen Dichte von 0,5 wachsen gelassen. Anschließend wurden sie in einem Eisbad abgekühlt und 15 min lang bei 4.000 x g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen auf Eis in einem Liter kalten 10%igem Glycerin resuspendiert und anschließend wie oben abzentrifugiert. Dieser Schritt wurde noch einmal mit 500 ml kalten, 10%igem Glycerin wiederholt. Danach wurden die Zellen in 20 ml kalten, 10%igem Glycerin resuspendiert und noch einmal bei 4.000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml 10%igem Glycerin aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension auf 40 µl Aliquots verteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die kompetenten Zellen wurden bei -80°C gelagert.

4.2.1.6.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Aufreinigung von z.B. PCR-Produkten wurde eine Lösung aus Phenol, Chloroform und Isoamylalkohol im Verhältnis 25:24:1 verwendet. Davon wurde 1 Volumen auf die DNA-Lösung gegeben und gemischt. Es wurde 10 min bei 15.900 x g zentrifugiert. Die obere Phase wurde vorsichtig abgenommen, ohne die untere Phase zu berühren, und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dann wurden nacheinander 1/20 Volumen 5 M NaCl und 3 Volumina eiskalter absoluter Ethanol hinzu gegeben und jeweils gut gemischt. Es wurde

10 min bei 15.900 x g zentrifugiert und der Überstand abgekippt. Anschließend wurden 300 µl eiskalter 70%iger Ethanol hinzu gegeben und gemischt. Es wurde 1 min bei 15.900 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Ggf. wurde ebenso noch einmal mit 100%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde ca. 10 min trocknen gelassen und dann in 20-60 µl TE-Puffer aufgenommen. Es wurde 10 min bei 60°C inkubiert und die Probe vor der Weiterverwendung abkühlen gelassen.

Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt.

4.2.1.6.3 Weitere Techniken zur Aufreinigung von DNA

Neben der Phenol-Chloroform-Extraktion wurde auch das PCR-Purification Kit von Qiagen zur Aufreinigung von PCR-Produkten etc. verwendet. In diesem Fall wurde nach Angaben des Herstellers vorgegangen. Ein Ansatz wurde immer auf mehrere Säulen verteilt, da diese nur eine limitierte DNA-Bindekapazität haben. Zur Elution wurde das kleinstmögliche Volumen des empfohlenen Puffers verwendet. Das Eluat der ersten Säule wurde für die Elution der übrigen Säulen verwendet um die Konzentration zu erhöhen. Mit dieser Methode können DNA Fragmente zwischen 100 bp und 1 kb aufgereinigt werden. Da kleinere Fragmente nicht an die Säule gebunden werden, eignet sich dieses Kit gut zur Entfernung von Primern nach der PCR.

Waren nach der PCR auf dem Gel mehrere Banden zu sehen, so wurde die gewünschte Bande nach dem Restriktionsverdau (4.2.1.6.4) aus dem Gel ausgeschnitten und mittels QIAquick Gel Extraction Kit von Qiagen gereinigt.

4.2.1.6.4 Restriktionsverdau

Die PCR-Produkte und der Vektor wurden mit den entsprechenden Enzymen über Nacht im Brutschrank bei 37°C geschnitten. Abhängig von der DNA-Konzentration wurde der Restriktionsverdau in einem Volumen von 50-60 µl durchgeführt. Dabei wurden 20-30 U jedes Enzyms verwendet.

4.2.1.6.5 Dephosphorylierung

Um eine Religation des geschnittenen Vektors zu verhindern wurden die 5'-Phosphatgruppen enzymatisch entfernt. Dazu wurde der Vektor direkt nach dem Restriktionsverdau mit 1 µl CIAP (*Calf intestinal alkaline phosphatase*) bei 37°C für 30 min inkubiert. Bei Enzymen, die

3'-Überhänge erzeugen, ist hier die Entfernung des 5'-Phosphats schwieriger, sodass der Vektor anschließend mit weiteren 1 µl CIAP für 30 min bei 50°C inkubiert wurde.

4.2.1.6.6 Ligation

Die Ligation erfolgte in einem möglichst kleinen Volumen (idealerweise weniger als 20 µl) über Nacht bei 4°C im Kühlschrank. Es wurden jeweils 100 ng Vektor mit einem 10fachen molaren Überschuss Insert zusammengegeben und 5 min bei 65°C inkubiert. Nachdem diese Mischung abgekühlt war, wurden 2 µl Ligase sowie die entsprechenden Mengen Wasser und Puffer hinzu gegeben und die Reaktion auf 4°C gestellt. Nach ca. 15 Stunden wurde der Ligationsansatz mit dem PCR-Purification Kit aufgereinigt (4.2.1.6.3). Es wurde in 30 µl Wasser eluiert.

4.2.1.6.7 Elektroporation

Pro Elektroporation wurde ein 40 µl Aliquot *E.coli SURE* ca. 15 min lang auf Eis aufgetaut. Von den aufgereinigten Ligationsansätzen wurden jeweils 2 µl hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Nach 20 min auf Eis wurde die Mischung in eine gekühlte 2 mm Elektroporationsküvette überführt. Die Elektroporation erfolgte bei 2500 V, 200 Ohm und 25 µF. Die Zellen wurden in 1 ml LB-Medium ohne Antibiotika überführt und 30 min bei 37°C und 210 rpm inkubiert. In Abhängigkeit vom Vektor wurden bis zu 500 µl auf Agarplatten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.1.6.8 Transformation chemisch kompetenter Bakterien

Bei der Transformation chemisch kompetenter Bakterien mittels Hitzeschock wurden 2 µl des jeweiligen Ligationsansatzes zu einem Aliquot Top10 F' Zellen gegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Für den Hitzeschock wurden die Bakterien anschließend für 30 Sekunden bei 42°C gehalten. Sofort danach wurden 250 µl SOC Medium hinzugegeben und die Bakterien eine Stunde bei 37°C und 210 rpm geschüttelt. 150 µl dieses Ansatzes wurden auf Agarplatten mit dem benötigten Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

4.2.1.6.9 Blau-Weiß-Screening

Mit Hilfe des Blau-Weiß-Screenings lässt sich direkt auf der Agarplatte erkennen, ob die Transformation erfolgreich gewesen ist.

Dafür macht man sich die Funktion des Enzyms β -Galaktosidase zu Nutze. β -Galaktosidase hydrolysiert nicht nur das natürliche Substrat Laktose, sondern auch das Substratanalogon X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactosid). Letzteres bildet nach der Hydrolyse einen unlöslichen blauen Farbstoff.

Für die analytische Blau-Weiß-Selektion wurden Bakterienstämme entwickelt, denen das 5'-Ende des *lacZ* Gens, das für die β -Galaktosidase codiert, fehlt. Sie können nur das carboxyterminale sog. ω - Fragment der β -Galaktosidase synthetisieren. Bringt man in diese Bakterienstämme ein Plasmid ein, das für das aminoternale α -Fragment codiert, lagern sich beide Fragmente zum funktionalen Protein zusammen. Die entsprechenden Bakterienkolonien sind blau (α -Komplementation). Die *multiple cloning site* des Vektors liegt genau in der codierenden Sequenz für das aminoternale α -Fragment. Fügt man ein Insert ein, wird diese Sequenz gestört. Bakterien die einen Vektor mit Insert enthalten bilden folglich weiße Kolonien, bzw. solche, die nur einen blauen Punkt in der Mitte aufweisen. Bakterienkolonien mit Plasmid ohne Insert sind blau [267].

Für das Blau-Weiß-Screening wurden Agarplatten mit 100 μ g/ml Ampicillin mit einer Mischung aus 80 μ g/ml X-Gal und 20 mM IPTG (zur Induktion des *lac*-Operons) bestrichen. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C auf diesen Platten wachsen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Platten für einige Stunden bei 4°C inkubiert und anschließend die weißen Kolonien gepickt bei denen in der Mitte ein blauer Punkt zu erkennen war.

4.2.1.6.10 Kolonie-PCR

Wenn aufgrund der verwendeten Bakterien oder Plasmide kein Blau-Weiß-Screening möglich war, wurden Kolonie-PCRs durchgeführt, um zu sehen, ob sich das klonierte Fragment aus der jeweiligen Kolonie amplifizieren lies. Dazu wurden einzelne Kolonien gepickt und in 10 μ l Wasser überführt. Der Rest der jeweiligen Kolonie wurde in 300 μ l Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin aufgenommen und bei 37°C und ca. 200 rpm 3-4 Stunden inkubiert.

Die Kolonien im Wasser wurden 10 Minuten bei 95°C lysiert. Anschließend wurde die entsprechende Menge PCR-Mastermix hinzu gegeben (es wurden pro Reaktion jedoch nur 0,15 μ l Taq Polymerase verwendet) und eine PCR wie unter 4.2.1.3.1 beschrieben

durchgeführt. Die PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Kolonien aus denen das Fragment amplifiziert werden konnte, wurden für Minipräparationen eingesetzt.

4.2.1.6.11 Minipräparation und Kontrollverdau

Für die Minipräparationen wurden je ca. 2 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C und ca. 110 rpm. Die Bakteriensuspension wurde in ein Eppendorfggefäß überführt und die Zellen wurden durch 1 minütige Zentrifugation bei 15.900 x g pelletiert. Anschließend wurde die Präparation mit dem Nucleo Spin Plasmid Mini Kit nach Herstellerangaben durchgeführt.

Zur Kontrolle, ob der Vektor das richtige Insert enthält, wurden je 1 µl Plasmid erneut mit Restriktionsenzymen verdaut. Hierbei wurden entweder die Enzyme verwendet, die auch für die Klonierung eingesetzt wurden, oder solche, die ein für das Insert charakteristisches Schnittmuster ergaben.

Ansatz für den Kontrollverdau:

je Enzym	0,5 µl
Puffer	1 µl
Plasmid-DNA	1 µl
dH ₂ O	ad 10 µl

Der Verdau erfolgte ca. 1 Stunde lang bei 37°C. Anschließend wurden die Proben auf einem Agarosegel analysiert.

4.2.1.6.12 Sequenzierung

Proben, die im Kontrollverdau nach der Minipräparation das erwartete Schnittmuster aufwiesen, wurden zur Sequenzierung an das HLA-Labor des ITZs gegeben. Hier erfolgte die Sequenzierung nach der Sanger-Methode [268].

Reaktionsansatz:

Big Dye Puffer	1 μ l
Sequenziermix	1 μ l
Primer	1 μ l
Plasmid-DNA	1 μ l
Wasser	6 μ l

Die zum Sequenzieren verwendeten Primer sind in Tab. 10 aufgeführt.

PCR-Programm

96°C	1 min	} 27x
96°C	10 s	
Tm	5 s	
60°C	3 min	
4°C	∞	

4.2.1.6.13 Maxipräparation

Für die Maxipräparationen wurden je ca. 200 ml LB-Medium mit 100 μ g/ml Ampicillin mit einer Bakterienkolonie, die das gewünschte Insert enthielt, angeimpft. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 37°C und ca. 210 rpm. Am nächsten Tag wurden die Bakterien durch 5 minütige Zentrifugation bei 8000 rpm geerntet und die Maxipräparation mit dem NucleoBond Xtra Maxi Kit von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Das Pellet wurde in 300-400 μ l TE-Puffer aufgenommen.

Mit einer 1:10-Verdünnung der DNA wurde ein Kontrollverdau wie unter 4.2.1.6.11 beschrieben durchgeführt.

4.2.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.2.1 Kernextraktion

Um kernständige Proteine zu isolieren, wurde eine zweistufige Extraktion durchgeführt. Zunächst wurden zwischen 5 und 20 Millionen Zellen pelletiert und einmal mit 3 ml eiskaltem PBS gewaschen (400 x g, 7 min, 4 °C). Anschließend wurden die Zellen in 1 ml kaltem Lysispuffer 1 (versetzt mit einer Tablette Complete Mini Proteinaseinhibitor pro 10 ml) resuspendiert und in Eppendorfgefäße überführt. Sie wurden 15 min auf Eis inkubiert, 10 Sekunden gevortext und 2 min bei 15.900 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der die zytoplasmatischen Proteine enthielt, wurde abgenommen und bei -80°C eingefroren. Das Pellet wurde in kaltem Lysispuffer 2 (versetzt mit einer Tablette Complete Mini Proteinaseinhibitor pro 10 ml) resuspendiert, 30 Sekunden gevortext und unter Schütteln 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 15.900 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand, der die kernständigen Proteine enthielt, wurde abgenommen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

4.2.2.2 Proteinbestimmung

Die colorimetrische Proteinbestimmung aus den Proteinlysaten wurde mit Hilfe des DC Protein-Assays von BioRad durchgeführt. Der Assay basiert auf dem klassischen Proteinnachweis nach Lowry [269]. Hier reagieren aromatische Aminosäurereste zunächst mit Kupfer-Tartrat in alkalischem Medium und können anschließend das sog. Folin-Reagenz reduzieren, was zu einer Blaufärbung der Lösung führt.

Zunächst wurde der Puffer A' vorbereitet. Dazu wurden pro Ansatz 25 µl Reagenz A und 0,5 µl Reagenz S gemischt. Anschließend wurden 5 µl Lysat, 25 µl Puffer A' und 200 µl Puffer B zusammengegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die Absorption bei 750 nm im Photometer gemessen. Als Leerwert wurde statt des Lysats 1 µl Lysispuffer verwendet.

4.2.2.3 Histonaufreinigung

Um präparativ reine Histone zu isolieren, reicht ein einfacher Kernextrakt nicht aus, da die Histone zu stark an die DNA gebunden sind. Daher wurden Histone nach dem Protokoll von Young *et al.* [270] aufgereinigt. Eingefrorene Zellproben mit bis zu 1×10^7 Zellen wurden, wie unter 4.2.3.3.4 beschreiben, aufgetaut und einmal mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Proben für 15 min bei $3086 \times g$ und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 3 ml H₂ Puffer sowie 500 μl Proteaseinhibitor-Mix ohne zu resuspendieren in einen Dounce-Homogenisator überführt und dort mechanisch aufgeschlossen. Nach dem Aufschluss wurde die Suspension in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt und wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit 30 ml eiskaltem destilliertem Wasser gewaschen. Es wurde wie oben zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurde das Wasser sehr vorsichtig abgenommen, da sich kein festes, sondern ein „wolkenartiges“ Pellet gebildet hatte, welches die Kerne enthielt. Dieses wurde in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Es wurden 2 ml 0,8 M H₂SO₄ hinzugegeben und für 5 Stunden bei 4°C unter Schütteln inkubiert um die Kerne zu lysieren. Anschließend wurde erneut wie oben zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Falcon-Röhrchen überführt und die Histone wurden mit 20 ml eiskaltem Aceton über Nacht bei 4°C präzipitiert. Am nächsten Tag wurde wie oben abzentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 1 ml abgenommen und das Pellet in diesem Milliliter in ein 2 ml Eppendorf Röhrchen überführt. Die Probe wurde für 3 min bei $11.400 \times g$ und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet an der Luft getrocknet.

4.2.2.4 FPLC

Bei der FPLC (*fast protein liquid chromatography* = schnelle Protein Flüssigchromatographie) handelt es sich um eine Flüssigchromatographie-Technik, die häufig zur Auftrennung von Proteinen angewendet wird. Hierbei können Proteingemische aufgrund der unterschiedlichen Bindungsaffinität der einzelnen Bestandteile zum Trägermaterial einer geeigneten Säule und eines geeigneten Lösungsmittels voneinander getrennt werden. Die Aufreinigung von Histon H3 aus dem isolierten Histongemisch wurde freundlicherweise von den Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin unter der Leitung von Frau Prof. Dr. Ritz-Timme an einem FPLC 900 Series Instrument von Amersham Biosciences durchgeführt. Hierzu wurden die Histone in 0,3% (w/v) Trifluoressigsäure resuspendiert und über eine *reverse-phase* HPLC Säule (Jupiter C18, 5μ , 300 \AA , $250 \times 10 \text{ mm}$, Phenomenex) aufgetrennt.

Der Proteingehalt wurde über die Absorption bei 214 nm bestimmt. Die H3 Fraktion wurde gesammelt, luftgetrocknet und für spätere Versuche bei -80°C weggefroren.

4.2.2.5 ELISA

Um global die Menge an H3K27me3 zu analysieren, wurde der PathScan Sandwich ELISA Tri-Methyl-Histon H3 (Lys27) von Cell Signaling Technologies (CST) verwendet. Da nicht ausgeschlossen werden kann, dass sich die Zusammensetzung der Nukleosomen bzw. die Menge an Histonen, die an die DNA binden, im Alter verändert [271,272], wurde zum Vergleich von alten und jungen Proben ausschließlich aufgereinigtes Histon H3 verwendet (vgl. 4.2.2.3). Für Überexpressions-, bzw. Herabregulationsexperimente wurden hingegen Zelllysate wie im Kit vorgegeben präpariert.

Zur Erstellung der Zelllysate wurden 0,5-1 Million Zellen zunächst 1 Mal mit PBS gewaschen (400 x g, 4°C, 7 min). Anschließend wurden die Pellets in je 0,5 ml 1x ELISA-Lysispuffer mit 1 mM PMSF resuspendiert, in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt und 5 min auf Eis inkubiert. Jede Probe wurde 3 Mal 20 Sekunden bei 50% Amplitude mittels eines 130 W Ultraschall Desintegrators im Eisbad aufgeschlossen. Zwischen jedem Sonifikationsschritt wurden die Proben mindestens 1 min auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Proben bei 15.900 x g und 4°C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und in 100 µl Aliquots bei -80°C eingefroren.

Die Proteinkonzentration der Proben wurde wie unter 4.2.2.2 beschrieben bestimmt. Für jeden ELISA wurden 3 verschiedene Konzentrationen eingesetzt, um ermitteln zu können, ob die Linearität des Assays gewährleistet ist.

Der ELISA wurde wie vom Hersteller empfohlen durchgeführt. Die Proben wurden zunächst über Nacht bei 4°C inkubiert. Alle weiteren Inkubationsschritte erfolgten bei 37°C. Die Absorption wurde bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm mit dem ELISA-Reader bestimmt.

4.2.2.6 Western Blot

4.2.2.6.1 SDS Gel

Die Stärke der Expression verschiedener Proteine wurde mittels Western Blot untersucht.

Um die Proteine entsprechend ihrer Größe aufzutrennen wurde eine denaturierende SDS-Gelelektrophorese durchgeführt [273]. Hierbei werden Proteine zunächst durch das Detergenz SDS denaturiert und von ihm umschlossen. Dies führt dazu, dass sie, unabhängig von ihren Seitenketten, eine starke negative Ladung erhalten, und durch Anlegen einer Spannung in einem Polyacrylamidgel allein nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Die Porengröße des Polyacrylamidgels wurde entsprechend der Proteingröße gewählt. Für Histone mit einem Molekulargewicht von nur ca. 17 kDa wurden 15%ige Gele verwendet, für alle anderen Proteine 8%ige. Zu Beginn der Elektrophorese wurden die Proteine in einem Sammelgel fokussiert, sodass sie zeitgleich in das Trenngel übertraten.

Zunächst wurde das Trenngel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem es auspolymerisiert war, wurde das Isopropanol abgenommen und das Sammelgel darüber gegossen.

Sammelgel

Bis/Acrylamid 40 %	0,63 ml
1,5 M Tris pH 6,8	0,42 ml
H ₂ O	3,85 ml
10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl
TEMED	5 µl

Trenngele

	8 %	15 %
Bis/Acrylamid 40 %	2 ml	3,75 ml
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	2,5 ml
H ₂ O	5,3 ml	3,55 ml
10 % SDS	100 µl	100 µl
10 % APS	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Es wurden jeweils 40 µg Kernextrakt oder 28 µg Ganzzelllysate eingesetzt. Diese wurden mit 5-fach Ladepuffer versetzt, 5 min bei 95°C gekocht und auf das Gel aufgetragen. Um ein optimales Laufverhalten zu gewährleisten, wurden alle Taschen gleichmäßig befüllt. Leere Taschen wurden mit Puffer aufgefüllt. Die Gele wurden zunächst bei 15 mA laufen gelassen, bis die Proteinfront das Sammelgel verlassen hatte. Anschließend wurde die Stromstärke auf 20-25 mA erhöht und das Gel so lange weiter laufen gelassen, bis die erwünschte Auftrennung erfolgt war.

4.2.2.6.2 Blotting

Im nächsten Schritt wurden die Proteine mittels eines sog. „Semi-Dry-Blot“ vom Gel auf die Nitrocellulosemembran übertragen [274,275]. Dazu wurde das SDS-Gel zunächst aus der Kammer gelöst und in 1x Transferpuffer überführt. Dann wurde das Sammelgel entfernt. Eine Nitrocellulosemembran mit 0,2 µm Porengröße (Invitrogen), sowie 6 Whatmanpapiere wurden auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten und in Transferpuffer inkubiert. Dann erfolgte der Blotaufbau wie folgt:

- 3 Whatmanpapiere
- Membran
- Gel
- 3 Whatmanpapiere

Nach jedem Whatmanpapier sowie nach dem Gel wurden Luftblasen entfernt, indem mit einer Pipette vorsichtig über den Aufbau gerollt wurde. Die Proteine wurden dann bei 2,5 mA pro cm² für 1 Stunde auf die Membran überführt. Anschließend wurde die Membran, abhängig vom verwendeten Primärantikörper (vgl. Tab. 21), für 1 Stunde bei Raumtemperatur, oder über Nacht bei 4°C in 1x TBST mit 5% Milchpulver oder BSA blockiert.

4.2.2.6.3 Antikörperinkubation

Nach dem Blockieren wurde die Membran mit dem ersten Antikörper über Nacht bei 4°C oder 1-2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert (Tab. 21). Anschließend wurde die Membran 3 Mal für 10 min bei Raumtemperatur in 1x TBST gewaschen. Dann folgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (Tab. 22) zur Detektion der spezifischen Proteinbande.

Tab. 21: Inkubationsbedingungen der Primärantikörper für Western Blot

Antikörper	Blockierungs- lösung	Blockierungs- dauer	Inkubations- puffer	Verdünnung	Inkubations- dauer
EED	1 x TBST, 4% Milchpulver	Über Nacht, 4°C	1 x TBST, 2,5% Milchpulver	1 : 1.000	2 h, RT
H3 (Millipore)	1 x TBST, 4% Milchpulver	Über Nacht, 4°C	1 x TBST, 2,5% Milchpulver	1 : 1.000	2 h, RT
H3 (CST)	1 x TBST, 5% BSA	1 h, RT	1 x TBST, 5% BSA	1 : 1.000	Über Nacht, 4°C
H3K27me3	1 x TBST, 5% BSA	1 h, RT	1 x TBST, 5% BSA	1 : 1.000	Über Nacht, 4°C
Aktin	1 x TBST, 4% Milchpulver	Über Nacht, 4°C, oder 1 h, RT	1 x TBST, 2,5% Milchpulver	1 : 2.500	Über Nacht, 4°C, oder 2 h RT
Suz12	1 x TBST, 4% Milchpulver	Über Nacht, 4°C	1 x TBST, 2,5% Milchpulver	1 : 1.000	2 h, RT
Flag	1 x TBST, 4% Milchpulver	Über Nacht, 4°C	1 x TBST, 2,5% Milchpulver	1 : 1.000	2 h, RT

Tab. 22: Inkubationsbedingungen der Sekundärantikörper für Western-Blot,

Antikörper	Spezies	Detektion	Inkubations- puffer	Verdünnung	Inkubations- dauer
anti- Kaninchen	Ziege	Chemilumineszenz	1 x TBST, 2,5% Milchpulver	1 : 2.500	1,5 h, RT
anti-Mause	Rind	Chemilumineszenz	1 x TBST, 2,5% Milchpulver	1 : 2.500	1,5 h, RT
anti- Kaninchen IRDye [®] 800CW	Ziege	Infrarotfluoreszenz (grün)	1 x TBST, 2,5% BSA oder Milch- pulver	1 : 10.000	1,5 h, RT
anti-Maus IRDye [®] 680CW	Ziege	Infrarotfluoreszenz (rot)	1 x TBST, 2,5% BSA oder Milch- pulver	1 : 10.000	1,5 h, RT

4.2.2.6.4 Detektion

4.2.2.6.4.1 Detektion mittels Chemilumineszenz

Zur Detektion der Proteine wurden, abhängig vom Sekundärantikörper, zwei verschiedene Techniken angewendet. Zum einen wurden Antikörper verwendet, die an die Meerrettich (*Horseradish*) Peroxidase (HRP) gekoppelt sind. Die Meerrettich-Peroxidase katalysiert die Oxidation von Luminol zu 3-Aminophthalat, unter der Emission von Licht bei 428 nm. Zugabe eines Enhancers (meist ein modifiziertes Phenol) verstärkt diese Chemilumineszenzreaktion um das bis zu 1000-fache. Zur Detektion mittels Chemilumineszenz wurden die zwei Komponenten des Novex ECL Chemiluminescence Kits von Invitrogen zu gleichen Teilen miteinander vermischt, und auf die Membran gegeben. Nach kurzer Inkubationszeit konnte die Lichtemission am LAS 3000 detektiert werden. Je nach Intensität des Signals wurde hierbei die Expositionsdauer zwischen 30 Sekunden und 1 Stunde variiert.

4.2.2.6.4.2 Detektion mittels Infrarotfluoreszenz

Als Alternative zur Detektion über Chemilumineszenz wurden Antikörper der Firma LI-COR verwendet, die direkt an einen Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Werden zwei Sekundärantikörper aus unterschiedlichen Spezies mit unterschiedlichem Fluorophor gleichzeitig verwendet, so können die Signale in unterschiedlichen Kanälen detektiert werden, sodass gleichzeitig zwei Banden, die sich auch überlappen können, analysiert werden können. Je nach Intensität der Bande wird hierbei die Intensität der Exposition variiert. Die Messungen erfolgten am Odyssey infrared imager. Die Blots wurden mit der Odyssey 2.0 Software analysiert und die Banden ggf. quantifiziert.

4.2.2.6.5 Strippen der Membran

Um verschiedene Proteine auf ähnlicher Höhe oder unter Verwendung von Antikörpern aus derselben Spezies auf ein und derselben Membran nachzuweisen, wurde diese gestrippt. Beim Strippen werden alle an die Membran gebundenen Antikörper von dieser wieder entfernt. Hierzu wurde die Membran für 7 min bei Raumtemperatur in Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer (Thermo) inkubiert. Anschließend wurde 2 mal 10 min bei Raumtemperatur mit 1x TBST gewaschen. Um zu überprüfen, ob tatsächlich alle Antikörper von der Membran entfernt wurden, wurde die Membran wie unter 4.2.2.6.4.1 beschrieben fotografiert. Hierbei

wurde meist mindestens so lange exponiert, wie auch für die Aufnahme des eigentlichen Bildes exponiert wurde. Bevor die Membran erneut mit Antikörpern inkubiert wurde, wurde sie 2 weitere Male mit 1x TBST bei Raumtemperatur für 10 min gewaschen. Membranen wurden maximal 2 Mal gestrippt.

4.2.2.7 ChIP-Assay

Um Histonmodifikationen an ausgewählten Gen-Loci zu untersuchen, wurden Chromatinimmunopräzipitations (ChIP) Assays durchgeführt. Dabei wurde ein in unserem Labor etabliertes Protokoll verwendet [276]. Für jede Immunopräzipitation wurden 1 Million Zellen eingesetzt. Diese wurden entweder direkt aus der Kultur verwendet, oder nach Lagerung bei -80°C bzw. in flüssigem Stickstoff, wie unter 4.2.3.3.4 beschrieben aufgetaut. Die Zellen wurden in dem entsprechenden Kulturmedium aufgenommen. Zu je 5 ml Zellsuspension wurden $135\ \mu\text{l}$ 37%iges Formaldehyd gegeben. Die Proben wurden 10 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden sie à 1 Million Zellen auf 1,5 ml Eppendorfgefäße verteilt und bei $400\ \text{x g}$ und 4°C für 7 min abzentrifugiert. Die Proben wurden zwei Mal mit kalter Proteaseinhibitorlösung wie oben gewaschen. Danach wurden die Pellets in $200\ \mu\text{l}$ Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren (vgl. 4.1.4, Proteaseinhibitorlösung) resuspendiert und 30 min auf Eis liegend inkubiert.

Um die DNA zu fragmentieren wurden die Lysate mit einem 130 W Ultraschall Desintegrator sonifiziert. Abhängig vom Zelltyp wurde 60-80 Sekunden lang in 10 sekundigen Pulsen bei 30% der maximalen Amplitude sonifiziert. Die Proben wurden hierbei in Eiswasser gekühlt. Danach wurden die Proben 10 min bei $15.900\ \text{x g}$ und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde in neue 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Um die Sonifikationseffizienz zu überprüfen wurden pro Probe $5\ \mu\text{l}$ abgenommen und vereinigt. Diese wurden wie unten beschrieben aufgereinigt und auf einem 0,8%igen Agarosegel analysiert, um sicherzustellen, dass die Fragmentgröße zwischen 200 und 1000 bp lag.

Der Rest der Probe wurde mit je 1,8 ml Dilution Puffer inklusive Proteaseinhibitoren (vgl. 4.1.4, Proteaseinhibitorlösung) verdünnt. Hiervon wurden je $120\ \mu\text{l}$ für die spätere Input-Kontrolle abgenommen und bei -20°C eingefroren.

Die eigentliche Probe wurde nun mit je $70\ \mu\text{l}$ Protein A oder G (abhängig vom später verwendeten Antikörper) Agarose Kügelchen für 30 min bei 4°C rotierend inkubiert um unspezifische Bindungen abzusättigen. Anschließend wurde bei $1.000\ \text{x g}$ für 2 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in neue 2 ml Eppendorfgefäße überführt. Die jeweiligen

Antikörper wurden hinzugegeben. Dabei richtete sich die zu verwendende Menge nach vorher durchgeführten Titrationskurven und schwankte zwischen 1 und 5 µg. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C unter Rotation. Am nächsten Tag wurden erneut 60 µl Protein A oder G Agarose Kügelchen hinzugegeben und für 70 min rotierend bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben 2 min bei 1.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Pellets nacheinander mit den Puffern steigender Salzkonzentration wie im Kit empfohlen, gewaschen.

Für die Elution wurde jedes Mal frischer Puffer angesetzt. Pro Probe wurden zunächst 250 µl des Elutionspuffers hinzugegeben. Anschließend wurde 15 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Proben wurden wie oben zentrifugiert und der Überstand in einem neuen Eppendorfgefäß gesammelt. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt, wobei nun die Proben nicht geschüttelt wurden, sondern bei Raumtemperatur rotierten. Das Eluat, sowie auch die Sonifikations- und Inputkontrollen wurden mit 20 µl 5 M NaCl pro 500 µl Probe versetzt und 4 Stunden bei 65°C inkubiert. Danach wurden pro 500 µl Probe 20 µl Tris, 10 µl EDTA und 2 µl Proteinase K hinzugegeben und 1 Stunde bei 45°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit dem PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt und nacheinander in 2 Mal 28 µl Elutionspuffer eluiert. Je 2 µl des Eluats wurden in Real-Time PCRs eingesetzt.

4.2.2.7.1 Analyse und Auswertung der ChIP-Assays

Die Auswertung der Real-Time PCR für die ChIP-Assays erfolgte nach der 2^{-ddCT} Methode (4.2.1.3.2.4). Jede Real-Time PCR wurde in Dreifachbestimmung durchgeführt. Von diesen Dreifachbestimmungen wurden die Mittelwerte der CTs unter Ausschluss von Ausreißern bestimmt. Anschließend wurde die Differenz der gemittelten CT-Werte zwischen der präzipitierten Probe und der Input-Probe bestimmt (dCT). Dann wurde dieser Wert auf den dCT-Wert für Histon H3 normiert. Histon H3 wurde als Faktor für die Normierung ausgewählt, da so am besten Schwankungen in der Gesamthistonmenge in die Berechnung mit einbezogen werden können. Da die Berechnung einer Standardabweichung für diese Experimente nicht so leicht möglich ist, wurden stattdessen, ebenfalls mit der 2^{-ddCT} Methode, die Ranges der Schwankungen des Mittelwerts nach oben und unten ermittelt. Dazu wurden zunächst die Standardabweichungen des dCT- Werts wie folgt ermittelt:

$$\sigma_{CT} = \sqrt{(\sigma_P^2 + \sigma_I^2)}$$

mit σ_P : Standardabweichung dCT präzipitierte Probe

σ_I : Standardabweichung dCT Input

Anschließend wurden dann die Abweichungen nach der Formel $2^{(-\Delta\Delta CT \pm \sigma_{CT})}$ berechnet.

Der Range ergibt sich dann aus der Differenz der Abweichungen des Mittelwerts nach oben und nach unten und dem Mittelwert selbst. Diese Ranges sind in den entsprechenden Abbildungen als Fehlerbalken dargestellt.

4.2.2.7.2 Empirische Bestimmung der zu verwendenden Antikörpermenge

Um bei neuen Antikörpern zu testen, ob sie überhaupt für die Chromatinimmunopräzipitation geeignet sind, und in welcher Konzentration sie einzusetzen sind, wurden alle Antikörper zunächst an der Zelllinien HEK293T getestet. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen des jeweiligen Antikörpers in den Assay eingesetzt. Daneben wurden auch Präzipitationen mit bekannten Antikörpern durchgeführt. Anschließend wurden Real-Time PCRs für den *GAPDH*-Promotor als Beispiel eines aktiven Gens und für den *KIR2DL4*- oder *MYT1*-Promotor als Beispiel eines in HEK293T reprimierten Gens durchgeführt. Die Assays wurden wie unter 4.2.2.7.1 beschrieben ausgewertet und die Antikörpermenge ausgewählt, die ein deutliches Signal bei aktiven und kaum Signal bei inaktiven Genen bzw., bei gegenteiliger Antikörperspezifität, kaum Signal bei aktiven und ein deutliches Signal bei inaktiven Genen gab.

4.2.2.8 ChIP-on-chip Analyse mit NimbleGen Arrays

Beim klassischen ChIP-Assay mit anschließender Real-Time PCR erhält man nur Auskunft über die Histonmodifikationen an einigen wenigen vorher ausgewählten Loci. Um jedoch einen Überblick zu erhalten, welche Promotoren genomweit bestimmte Histonmodifikationen aufweisen, können die Präzipitate aus dem ChIP-Assay auch auf Arrays hybridisiert werden (Abb. 10).

Zu diesem Zweck wurden hier NimbleGen 385k RefSeq Promotor-Arrays verwendet. Diese Arrays ermöglichen die Analyse von 24.659 humanen Promotoren, die durch 20.516 sog. „*Tiled regions*“ abgedeckt werden. Die *Tiled regions* umfassen jeweils 2.200 bp stromaufwärts und 500 bp stromabwärts eines jeden Transkriptionsstarts. Aufgrund dieses speziellen Designs lassen sich mit den Arrays leicht auch bivalente Promotoren, die mit den antagonistischen Modifikationen H3K27me3 und H3K4me3 gleichzeitig assoziiert sind, nachweisen, da Promotoren als bivalent gelten, wenn beide Modifikationen in einem Fenster +/-2,5 kb um den Transkriptionsstart herum auftreten [277].

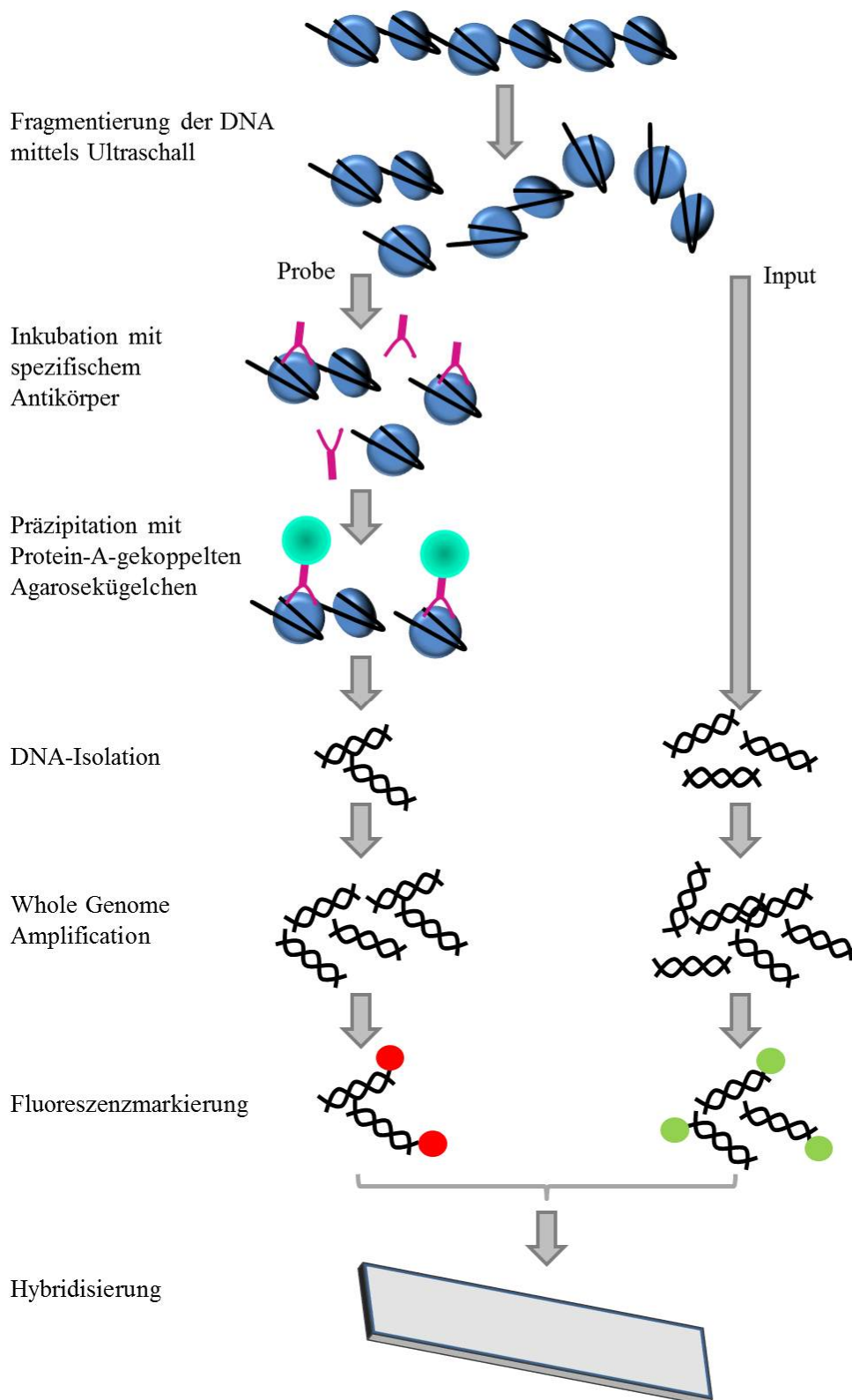


Abb. 10: Schematische Darstellung des Ablaufs eines ChIP-on-chip Experiments.

Zunächst wird die DNA mittels Ultraschall in Fragmente von 200-1000 bp Größe zerkleinert. Dann wird mit einem für die zu untersuchende Modifikation spezifischen Antikörper inkubiert und anschließend präzipitiert. Die DNA-Fragmente werden amplifiziert, mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf den NimbleGen Array hybridisiert. Modifiziert nach: Roche NimbleGen, Nutzerinformation.

4.2.2.8.1 DNA Amplification mittels Whole Genome Amplification

Zur ChIP-on-chip Analyse wurden HPC aus CB und Apheresat verwendet (vgl. 4.2.3.2.1). Um möglichst reine Populationen zu erhalten, wurden die Zellen nach der magnetischen Anreicherung (vgl. 4.2.3.2.4) noch durchflusszytometrisch auf das Vorhandensein des Stammzellmarkers CD34 sowie auf die Abwesenheit von Lineagemarkern hin sortiert (vgl. 4.2.3.1.1). Da hier sehr viele Zellen benötigt wurden, mussten je neun CBs und fünf Apheresate (34-54 Jahre, durchschnittliches Alter: 43,6 Jahre) vereinigt werden.

Anschließend wurde ein ChIP-Assay wie unter 4.2.2.7 beschrieben, durchgeführt. Die Präzipitate wurden mit dem Whole Genome Amplification (WGA) Kit von Sigma amplifiziert. Dabei wurde vom Herstellerprotokoll abgewichen und ein für ChIP-on-chip Analysen optimiertes Protokoll [278] verwendet. Aufgrund der geringen Konzentration der präzipitierten Proben, wurden jeweils 10 µl dieser Proben in die Amplifikation eingesetzt, während von den Kontrollen je 20 ng amplifiziert wurden. Die DNA wurde mit dem Fragmentationspuffer und der WGA Polymerase nach Herstellerangaben gemischt. Anschließend erfolgte die Amplifikation im Thermocycler wie folgt:

95°C	3 min	} 20 x
94°C	15 s	
65°C	5 min	

Die Proben wurden nach der Amplifikation noch einmal mit dem PCR Purification Kit von Qiagen aufgereinigt und die Konzentration erneut ermittelt.

4.2.2.8.2 Markierung der DNA mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy5 und Cy3

Es wurden jeweils 1 µg der präzipitierten Proben und der Kontrollproben mit Cy5 bzw. Cy3 markiert:

Amplifizierte DNA (1 µg)	X µl
Cy3 bzw. Cy5 Random Nonamere	40 µl
Ad 80 µl mit LiChrosolv Wasser	

Es erfolgte eine 10 minütige Hitzedenaturierung bei 98°C im Thermocycler. Anschließend wurden die Proben sofort auf Eis gestellt und der Klenow-Mix hinzugegeben:

dNTPs (10mM)	10 µl
LiChrosolv Wasser	8 µl
Klenow Fragment (3' - 5' Exonuclease) 50 U/µl	2 µl

Die Proben wurden durch Pipettieren gemischt und anschließend für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Dann wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 10 µl 0,5 M EDTA gestoppt. Zu jedem Reaktionsgefäß wurden 11,5 µl 5 M NaCl hinzugegeben und kurz gevortext. Dann wurden die Proben durch Zugabe von 110 µl Isopropanol gefällt. Dazu wurde 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und weitere 10 min bei 15.900 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 500 µl eiskaltem 80%igem Ethanol gewaschen. Es wurde für 2 min bei 15.900 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden in der Vakuumzentrifuge vollständig getrocknet.

4.2.2.8.3 Hybridisierung und Waschen der Arrays

Jedes Pellet wurde in 15 µl LiChrosolv Wasser resuspendiert und die Konzentration am Nanodrop mit dem Protokoll für Nukleotide gemessen. Jeweils 6 µg der Probe und der zugehörigen Kontrolle wurden gemischt und in der Vakuum Zentrifuge auf unter 5 µl eingengt. Dann wurde mit LiChrosolv Wasser auf 5 µl aufgefüllt. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung vorbereitet.

Pro Probe:

Hybridisierungspuffer (2x)	11,8 µl
Hybridisierungskomponente A	4,7 µl
Alignment Oligo	0,5 µl

Von diesem Mix wurden je 13 µl zu den 5 µl fluoreszenzmarkierter Probe gegeben und gemischt. Es wurde für 5 min bei 95°C gekocht, dann wurden die Proben bis zur Hybridisierung bei 42°C gehalten.

Die Arrays wurden zunächst entsprechend der Herstellerangaben durch das Aufbringen sog. Mixer für das Auftragen der Probe vorbereitet. Dann wurden 16 µl der Proben vorsichtig und blasenfrei auf die Arrays pipettiert. Die dafür notwendigen Löcher wurden verschlossen und die Arrays wurden über Nacht bei 42°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden die Waschlösungen entsprechend der Herstellerangaben vorbereitet, die Mixer vorsichtig von den Arrays entfernt und diese nacheinander in den drei Waschlösungen gewaschen.

4.2.2.8.4 Auswertung der NimbleGen Daten

Die Arrays wurden mit dem Axon 4000B Microarray Scanner unter Verwendung der Axon GenePix Software Version 4.1 gescannt. Hierbei wurden die Intensitäten so variiert, dass möglichst keine Bildpunkte in der Sättigung lagen. Außerdem wurde darauf geachtet, dass die Histogramme für Cy3 und Cy5 möglichst gut übereinander lagen. Die weitere Analyse der Daten wurde mit NimbleScan 2.6 durchgeführt. Hierbei wurden einzelne Signale zu Peaks zusammengefasst, wenn in einem Fenster von 500 bp mindestens 4 Sonden den vom System vorgegebenen Schwellenwert überschritten. Peaks mit einer *False Discovery Rate* (FDR) größer als 0,2 wurden verworfen. Alle übrigen wurden den entsprechenden *Tiles* zugeordnet. Anschließend wurden diese anhand des humanen Genoms HG18 den entsprechenden Genen zugeordnet. Weitere globale Analysen wurden mit Excel durchgeführt. Hierbei wurden zunächst die Intensitäten einzelner Peaks, die ein und demselben Promotor zugeordnet werden konnten, aufsummiert. Anschließend wurden Promotoren aus der Analyse verworfen, wenn zwei oder mehr mit einer einzigen *Tiled region* assoziiert waren und somit keine eindeutige Zuordnung der Signale zu den Promotoren möglich war. Dies war bei 6.631 Promotoren der Fall. Danach wurden die Modifikationsmuster in den einzelnen Proben miteinander verglichen.

Detailanalysen ausgewählter Promotorregionen wurden mit der Software SignalMap 1.9 durchgeführt.

4.2.2.8.5 Gene Ontology-Analysen

Um zu ermitteln, welche Genkategorien und *Pathways* in den entsprechenden Proben mit den beiden gegensätzlichen Histonmodifikationen assoziiert waren, wurden Gene Ontology (GO)-Analysen über die „Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery“ (DAVID) v6.7 durchgeführt [247,248]

Für die GO-Analysen wurden Promotoren verworfen, bei denen beide Proben dieselbe Modifikation trugen und der Quotient der Intensitäten zwischen 0,8 und 1,2 lag, da in diesem Fall die Unterschiede zu gering waren um aussagekräftig zu sein. GO-Kategorien wurden als angereichert betrachtet, wenn der *p-value* unter 0,001 bzw. im Fall der bivalenten Gene unter 0,05 lag.

4.2.3 Zellbiologische Methoden

4.2.3.1 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie werden Zellen mit Hilfe von Lichtstreuung und ggf. Fluoreszenzemission zeitgleich in Bezug auf mehrere Parameter untersucht. Im Durchflusszytometer gelangen Zellen einzeln in einem Trägerstrom aus PBS in den Focus eines Laserstrahls. Dieser wird abhängig von der Größe und Granularität der Zelle gestreut. Somit liefert die Streuung grundsätzliche Informationen über den Aufbau der entsprechenden Zelle. Die Streuung aufgrund der Zellgröße wird im sog. *Forward Scatter*, die aufgrund der Granularität im *Side Scatter* dargestellt.

Zusätzlich können Proteine, die auf der Zelloberfläche bzw. bei besonderer Vorbehandlung auch solche, die im Inneren der Zelle exprimiert werden, mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt werden. Die Emission der Fluorochrome nach Anregung mit einem Laser wird gemessen und gibt Hinweise auf die Stärke der Expression des jeweiligen Proteins.

Hier wurde mit dem Cytomics FC 500 Durchflusszytometer der Firma Beckman Coulter gearbeitet. Dieses Gerät ist mit Lasern der Wellenlänge 488 und 638 nm ausgestattet. Es können bis zu fünf verschiedenen Fluorochrome gleichzeitig detektiert werden.

4.2.3.1.1 Zellsortierung

Basierend auf der Technik des Durchflusszytometers, ist es möglich Zellen nach gewissen Oberflächenmarkern oder Eigenschaften auszusortieren. Hierbei ist es essentiell, die Zellen bei der Messung exakt voneinander zu trennen. Dazu wird der Trägerstrom zum Vibrieren gebracht, sodass sich einzelne Tropfen ablösen, die idealerweise nur eine Zelle enthalten. Diese Zellen werden dann, wie oben beschrieben, analysiert. Direkt nach der Analyse werden sie, entsprechend ihrer Fluoreszenzeigenschaften, mit einer elektrischen Ladung versehen. Anschließend durchlaufen sie ein elektrisches Feld, welches ihren Weg entsprechend ihrer Ladung ablenkt, sodass unterschiedliche Populationen voneinander getrennt werden können. Proben wurden zur Zellsortierung in die Core Flow Cytometry Facility der Uniklinik Düsseldorf zu Katharina Raba gegeben. Der dort vorhandene MoFlo XPD Sorter ist mit Lasern der Wellenlänge 355 nm, 488 nm, 635 nm ausgestattet und kann bis zu 12 Fluoreszenzparameter gleichzeitig analysieren.

4.2.3.1.2 Färbung für die Durchflusszytometrie

Pro Probe wurden bis zu 1 Mio. Zellen bei 400 x g abzentrifugiert und in 100-200 µl kaltem PBS aufgenommen. Anschließend wurden, abhängig von der Zellzahl und der Fluoreszenzintensität, 1,25-20 µl des jeweiligen Antikörpers hinzu gegeben und gevortext. Bei größeren Probenmengen wurde ein Mastermix für die Antikörper angesetzt und die entsprechende Menge auf die einzelnen Proben verteilt. Die Zellen wurden 20-30 Minuten im Dunklen bei 4°C inkubiert und anschließend mit PBS gewaschen und abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 300-500 µl PBS aufgenommen und die Probe am Durchflusszytometer gemessen.

4.2.3.2 Isolierung von CD34⁺ hämatopoietischen Progenitorzellen

4.2.3.2.1 Stammzellquellen

Beim erwachsenen Menschen beträgt der Anteil an CD34⁺ hämatopoietischen Progenitorzellen (HPC) im Knochenmark ca. 1,6% der mononukleären Zellen (*mononuclear cells* = MNCs) [279]. Normalerweise zirkuliert nur ein verschwindend geringer Anteil (ca. 0,07% der MNCs) von ihnen im peripheren Blut, sodass dieses keine Quelle zur Aufreinigung von HPC darstellt [280]. Da die Entnahme von CD34⁺ aus dem Knochenmark für den Spender mit einigen Risiken verbunden und auch recht unangenehm ist, wurde in den 1990er Jahren die Technik der Stammzellapherese entwickelt [280-282]. Hierbei werden zunächst die im Knochenmark befindlichen CD34⁺ HPC durch Gabe von *Granulocyte-Colony Stimulating Factor* (Granulozyten Kolonien stimulierender Faktor = G-CSF) mobilisiert (in der Düsseldorfer Apheresestation: 5 Tage à 10 mg G-CSF/kg Körpergewicht und Tag), sodass sie ins periphere Blut wandern und sich dort auf eine Konzentration von ca. 1,2% der MNCs anreichern [280]. Bei der Apherese selbst werden die HPC aus dem peripheren Blut des Spenders nach dem Prinzip der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (4.2.3.2.2) maschinell angereichert, während die nicht benötigten Bestandteile des Blutes dem Spender wieder zurückgegeben werden.

Eine weitere Stammzellquelle stellt Nabelschnurblut dar. Neonatale adulte CD34⁺ HPC sind im Blut der Nabelschnur mit bis zu 0,7% der MNC angereichert und können somit leicht gewonnen werden [279].

In dieser Studie wurden CD34⁺ HPC aus Nabelschnurblut, Apheresat und Knochenmark gesunder männlicher Probanden verwendet. Wurden nur mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells* = PBMC) benötigt, so wurde entweder ebenfalls

eine der oben erwähnten Quellen verwendet, oder unstimuliertes peripheres Blut gesunder Probanden. Alle Proben wurden mit Einverständnis des Spenders bzw. der Mütter entnommen und die gesamte Studie wurde von der Ethikkommission der Uniklinik Düsseldorf bewilligt. Nabelschnurblut wurde freundlicherweise von der Nabelschnurblutbank der Uniklinik Düsseldorf unter Leitung von Frau Prof. Dr. Gesine Kögler zur Verfügung gestellt. Apheresat, peripheres Blut und Knochenmark wurden von der Apheresestation unseres Instituts unter Leitung von Dr. Johannes Fischer zur Verfügung gestellt. Peripheres Blut von Spendern über 60 Jahren stammte zum Teil auch aus der Orthopädie der Uniklinik Düsseldorf und wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Marcus Jäger bzw. Dr. Christoph Ziskoven zur Verfügung gestellt.

4.2.3.2.2 Isolation von mononukleären Zellen des peripheren Bluts

Im Apheresat sind die mononukleären Zellen des peripheren Bluts (*peripheral blood mononuclear cells* = PBMC) schon stark angereichert, daher erfolgte hier keine weitere Isolation. Bei allen anderen Quellen hingegen wurden PBMC mittels Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation von den übrigen Blutbestandteilen getrennt. Dazu wurden die Proben 1:2 mit PBS/EDTA verdünnt und vorsichtig auf die Ficolllösung geschichtet. Anschließend wurde für 35 min bei Raumtemperatur und 945 x g ohne Bremse zentrifugiert. Die PBMC waren nun als weißer Ring in der Interphase sichtbar und wurden vorsichtig in ein neues Falcon-Röhrchen überführt. Es wurde zwei Mal mit kaltem PBS/EDTA gewaschen.

4.2.3.2.3 Erythrozyten-Lyse

Um die ggf. verbleibenden Erythrozyten zu lysieren, wurden die Zellpellets in 50 ml kaltem Ammoniumchlorid für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde bei 400 x g und 4°C für 7 min zentrifugiert. Die Zellen wurden dann erneut 2 mal mit kaltem PBS gewaschen.

4.2.3.2.4 CD34 Isolation

CD34-positive hämatopoietische Progenitorzellen wurden mit Hilfe des CD34 Microbeads Kits von Miltenyi aufgereinigt. Wenn eine besonders hohe Reinheit der Zellen erforderlich war, wie z.B. um *in vitro* NK-Zellen aus ihnen zu generieren, wurden vorher alle Zellen, die einen Lineagemarker auf der Oberfläche hatten, mit Hilfe des Lineage Cell Depletion Kits von Miltenyi aus der Probe entfernt.

Für die Lineage Depletion wurde ein Cocktail aus biotinylierten Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmarker (CD2, CD3, CD11b, CD14, CD15, CD16, CD19, CD56, CD123 und CD235a) von differenzierten hämatopoietischen Zellen verwendet. Nach 10 minütiger Inkubation bei 4°C wurden überschüssige Antikörper mit MACS (*Magnetic Activated Cell Sorting*)-Puffer abgewaschen (7 min, 4°C, 400 x g). Anschließend wurden an magnetische Kügelchen gekoppelte Antikörper gegen Biotin hinzugegeben und für 15 min bei 4°C inkubiert. Diese Sekundärantikörper binden an die biotinylierten Primärantikörper und ermöglichen über die Kopplung an die magnetischen Kügelchen eine Depletion der markierten Zellen in einem Magnetfeld. Überschüssige Antikörper wurden wie oben abgewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml MACS Puffer aufgenommen und über geeignete Trennsäulen (Miltenyi) in einem magnetischen Feld aufgereinigt. Der lineage-depletierte Durchfluss wurde anschließend für die weitere Aufreinigung der CD34-positiven Zellen verwendet.

Zur Isolation der CD34-positiven Zellen wurde die Probe in 300 µl MACS-Puffer aufgenommen und zunächst alle unspezifischen Bindestellen auf der Zelloberfläche mit 100 µl Fc-Rezeptor-Block pro 10⁸ Zellen abgesättigt. Anschließend wurde die gleiche Menge an magnetische Kügelchen gekoppelter Antikörper gegen CD34 hinzugegeben. Es wurde für 30 min bei 4°C inkubiert. Überschüssige Antikörper wurden wie oben abgewaschen. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml MACS Puffer aufgenommen und über geeignete Trennsäulen (Miltenyi) in einem magnetischen Feld aufgereinigt. Im Gegensatz zur Lineage-Depletion wurde hier die CD34-positive Fraktion aus der Säule eluiert. Dazu wurde die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und es wurden, abhängig von der Säulengröße, 1-5 ml MACS Puffer mit Hilfe eines Stempels durch die Säule gepresst um so die CD34-positiven, an die Säule gebundenen, Zellen abzulösen.

Die Reinheit der CD34-positiven Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Hierfür wurden sie mit einem Lineage Cocktail, CD34 und CD38 gefärbt. Die Zellen wurden nur verwendet, wenn der Anteil an CD34-positiven Zellen bei über 90% lag. War dies nicht der Fall, wurde die CD34 Anreicherung über die MACS-Säule wiederholt.

4.2.3.3 Zellkultur

4.2.3.3.1 Kultivierung von Suspensionszellen

Die Zellen wurden im jeweiligen Medium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Zelllinien wurden bei einer Dichte von ca. 0,5-0,8 Millionen Zellen pro ml gehalten, frische Zellen bei ca. 1-2 Millionen Zellen pro Milliliter. Etwa jeden zweiten Tag wurde frisches Medium hinzu gegeben.

4.2.3.3.2 Kultivierung von adhärenente Zellen

Adhärenente Zellen wurden in Zellkulturflaschen oder -Platten im jeweiligen Medium bei 37 oder 33°C und 5% CO₂ kultiviert. Wenn die Flaschen dicht bewachsen waren wurden die Zellen umgesetzt. Dazu wurde zunächst das Medium abgenommen. Dann wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend so lange in 1%igem Trypsin inkubiert, bis sie sich vom Boden lösten. Der Ablösevorgang wurde mit derselben Menge Medium gestoppt und die Zellen bei 300 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem Medium resuspendiert und die gewünschte Menge neu ausplattiert.

4.2.3.3.2.1 Beschichten der Flaschen

Adhärenente Zellen haften noch besser am Boden der Flasche bzw. der Platte, wenn diese zunächst mit 0,1%iger Gelatine beschichtet werden. Dazu wurde 2%ige Gelatine mit Injektionswasser verdünnt und auf die Flaschen gegeben, sodass der Boden bedeckt war. Die Flaschen bzw. Platten wurden 30-60 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurde die Gelatine wieder abgenommen und die Flaschen unter der Sterilbank trocknen gelassen. Ein Beschichten war vor allem dann nötig, wenn die Zellschicht lange halten sollte und gleichzeitig stark beansprucht wurde, sowie bei sehr empfindlichen Zellen.

Es wurden immer beschichtete Flaschen oder Platten verwendet, wenn Zellen der Linie EL08 als *Feeder* Zellen für die NK-Zellgenerierung ausplattiert wurden.

Ebenso wurden Flaschen für die „Bonner“ HEK293T, die für die Virusproduktion verwendet wurden, mit Gelatine beschichtet.

4.2.3.3.3 Zählen

Um die Zellen zu zählen wurden 20 µl Zellsuspension mit 20 µl Trypanblau vermischt und auf eine Neubauerzählkammer aufgetragen. Es wurden vier Großquadrate ausgezählt. Der um den Verdünnungsfaktor korrigierte Mittelwert geteilt durch den Kammerfaktor 100 ergibt die Konzentration in Millionen pro ml.

4.2.3.3.4 Einfrieren und Auftauen

Zum Einfrieren wurden die Zellen abzentrifugiert. Bis zu 10 Millionen Zellen wurden in 500 µl einer Mischung von gleichen Teilen des jeweiligen Kulturmediums und FBS aufgenommen und auf Cryoröhrchen verteilt. Anschließend wurden pro Röhrchen 500 µl des entsprechenden Zellmediums mit 20% DMSO hinzugegeben. Dann wurden die Zellen bei -80°C eingefroren und später in flüssigen Stickstoff überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen kurz bei 37°C erwärmt, in 10 ml Medium gewaschen und anschließend auf die gewünschte Dichte ausgesät.

4.2.3.3.5 Seneszenzassay

Im Zuge der Seneszenz erhöht sich die Expression der seneszenzassoziierten β -Galaktosidase, was man sich zu Nutze machen kann, um seneszente Zellen nachzuweisen [283]. β -Galaktosidase spaltet Galaktosyl-Reste von einer Reihe von Substraten wie z.B. Gangliosiden, Glycoproteinen oder Glycosaminoglycanen ab, und befindet sich normalerweise im sauren Milieu der Lysosomen. Ihre Aktivität ist leicht durch die Spaltung von 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galaktopyranosid (X-Gal) in Galaktose und 5-Bromo-4-chloro-3-hydroxyindol, welches im weiteren Verlauf zu einem unlöslichen Indigo-Farbstoff oxidiert wird, nachweisbar. Da β -Galaktosidase normalerweise ausschließlich im Lysosom zu finden ist, findet diese Nachweisreaktion nur bei sauren pH-Bedingungen statt.

Im Zuge der Seneszenz akkumuliert SA β -Galaktosidase. Sie liegt dann nicht mehr nur im Lysosom vor, sondern befindet sich auch im Zytoplasma, sodass ihre Aktivität nun auch bei pH6 detektierbar wird [284]. Durch die unterschiedliche Lokalisation von β -Galaktosidase in alten und jungen Zellen, kann über ihre Aktivität leicht das relative Alter einer Zellpopulation bestimmt werden.

Für den Seneszenzassay wurden je 1 Million Suspensionszellen aus der Kultur genommen und bei 300 x g für 7 min bei 4°C abzentrifugiert. Sie wurden 5 min in 1 ml 3% Formaldehyd bei Raumtemperatur fixiert, wie oben abzentrifugiert und anschließend in 1 ml PBS

aufgenommen. Die Zellen wurden auf zwei 15 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und wie oben abzentrifugiert. Anschließend wurden sie in der Färbelösung mit pH4 bzw. pH6 aufgenommen und in eine 24-Well-Platte überführt. Sie wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen geerntet und mehrfach mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen am Mikroskop ausgezählt und ggf. fotografiert. Hierbei sind Zellen, die bei dem jeweiligen pH-Wert eine aktive SA β -Galaktosidase aufweisen blau und Zellen, bei denen unter den gegebenen pH-Bedingungen keine Aktivität detektierbar ist, weiß gefärbt. Da nicht gleichzeitig mit Trypanblau angefärbt werden konnte, konnte der Anteil der toten Zellen nur indirekt über die Probe bei pH4 ermittelt werden. Hier sollten alle Zellen aktive β -Galaktosidase aufweisen und somit blau gefärbt sein. Tote Zellen, die keine β -Galaktosidaseaktivität mehr aufweisen erscheinen im Mikroskop weiß.

4.2.3.3.6 Mycoplasmentest

Kontaminationen mit Mycoplasmen sind ein häufiges Problem in der Zellkultur [285]. Bei Mycoplasmen handelt es sich um Bakterien der Klasse Mollicutes. Sie sind mit 0,1 μ m Durchmesser die kleinsten bekannten Procaryonten, besitzen keine Zellwand und wachsen als intrazelluläre Parasiten. Da sie keine Zellwand besitzen und zusätzlich durch ihre Wirtszelle geschützt sind, sind sie unempfindlich gegen viele Antibiotika, die auch in der Zellkultur verwendet werden. Sie können über bereits kontaminierte Kulturen in der Zellkultur verbreitet werden. Da sie jedoch auch den menschlichen Organismus befallen, wobei sie meist Erkrankungen des Bronchial- oder des Urogenitaltraktes verursachen, können sie leicht während der Arbeit durch den Experimentator oder durch Blutproben infizierter Spender in die Kultur gelangen [285].

Kontaminationen mit Mycoplasmen verändern nicht nur das Wachstumsverhalten der Zellen, sondern haben auch Auswirkungen auf Genexpression und Regulation. Daher ist es essentiell, dass nur mit Proben gearbeitet wird, die nicht mit Mycoplasmen kontaminiert sind [285].

Um sicher zu stellen, dass in der Zellkultur keine Kontamination mit Mycoplasmen vorlag, wurden PCR-basierte Tests durchgeführt. Dazu wurde, frühestens 24 Stunden nach dem letzten Splitten, ca. 1 ml Zellkulturüberstand abgenommen und bei 300 x g für 10 min abzentrifugiert. Anschließend wurden davon 100 μ l Überstand abgenommen und 5 min bei 96°C inkubiert. Hiervon wurden 4 μ l in die Test PCR eingesetzt.

Pro Probe:

Puffer (10x)	2,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
Primer (10 pmol/µl)	1,0 µl
MgCl ₂ (25 mM)	1,5 µl
Hot Star Taq Polymerase (5 U/µl)	0,2 µl
dH ₂ O	14,3 µl
Probe	4 µl

PCR-Programm

94°C	15 min	} 35 x
94°C	30 s	
63°C	30 s	
72°C	30 s	
72°C	7 min	
4°C	∞	

Als Positivkontrolle diente die im Mycoplasmen Detektions Kit von Minerva Biolabs zu diesem Zweck mitgelieferte DNA, die laut Hersteller Übereinstimmungen mit den wichtigsten Mycoplasmen Subtypen aufweist.

4.2.3.4 Überexpression und Herabregulation von Genen

Bei der Überexpression und der Herabregulation von Genen gibt es zum einen die Möglichkeit die Veränderungen stabil einzuführen, zum anderen können sie temporär eingeführt werden. Die stabile Überexpression bzw. Herabregulation wurde in dieser Arbeit mittels eines lentiviralen Systems durchgeführt (4.2.3.5). Hierbei wird, wie unten beschrieben, die Zielsequenz mittels eines lentiviralen Vektors in die Zellen eingebracht (4.2.3.5.3). Über homologe Rekombination wird sie stabil ins Genom der Zielzelle integriert. Hierbei sind allerdings sowohl der Ort, als auch die Anzahl der Integrationen willkürlich. Mit Hilfe von Lentiviren können auch Zellen, die sich nicht teilen, infiziert werden. Außerdem bleibt die eingeführte DNA-Sequenz dauerhaft aktiv und wird nicht, wie bei Retroviren, nach einiger Zeit abgeschaltet.

Zur temporären Beeinflussung der Genexpression eignet sich die Transfektion (4.2.3.4.2) von Vektoren oder siRNAs (*small interfering* = kleine interferierende RNAs) (4.2.3.4.1), wobei in dieser Arbeit nur siRNAs temporär in die Zellen eingebracht wurden.

4.2.3.4.1 Genregulation mittels RNA-Interferenz

Bei der RNA-Interferenz handelt es sich um einen evolutionär konservierten Mechanismus zur Stilllegung von Genexpressionen [286,287]. Hierbei werden doppelsträngige RNA Moleküle, wie in Abb. 11 schematisch dargestellt, zunächst durch die Enzyme Drosha und Dicer auf eine Länge von meist 21 Nukleotiden gekürzt. Anschließend werden die Doppelstränge aufgespalten und einer der beiden Stränge in den RISC Komplex (*RNA induced silencing complex* = RNA induzierter Stilllegungskomplex) integriert. So aktiviert kann der RISC Komplex an mRNAs binden, die komplementär zur inkorporierten kurzen RNA sind, und diese abbauen, sodass keine Translation mehr stattfinden kann. Dies führt zur Reduktion oder vollständigen Stilllegung der Expression des zugehörigen Gens [288,289].

Zu Forschungszwecken gibt es verschiedene Möglichkeiten sich diesen *Pathway* zu Nutze zu machen. Zum einen können direkt 21 Nukleotide lange doppelsträngige RNAs, die sog. siRNAs (*small interfering RNAs* = kleine interferierende RNAs) transient in die Zelle eingebracht werden. Diese werden dann direkt aufgespalten und in den RISC Komplex eingebaut. Zum anderen kann die Information zur Synthese einer doppelsträngigen RNA, der sog. shRNA (*short hairpin RNA* = kurze Haarnadel RNAs), über einen Vektor in die Zelle eingebracht werden. Hierzu wird eine DNA-Sequenz analog zur siRNA Sequenz einmal in sense und einmal in antisense Richtung in eine Expressionskassette und diese anschließend in einen entsprechenden Vektor eingefügt, der dann entweder transient durch Transfektion oder stabil durch Virusinfektion in die Zelle eingebracht werden kann. Der Aufbau der Kassette, die die shRNA Sequenz zum einen flankiert, und zum anderen das Ausbilden der für die Prozessierung wichtigen Haarnadelstruktur ermöglicht, ist für die Klonierung wichtig, und beeinflusst entscheidend den Erfolg der Genstilllegung [290].

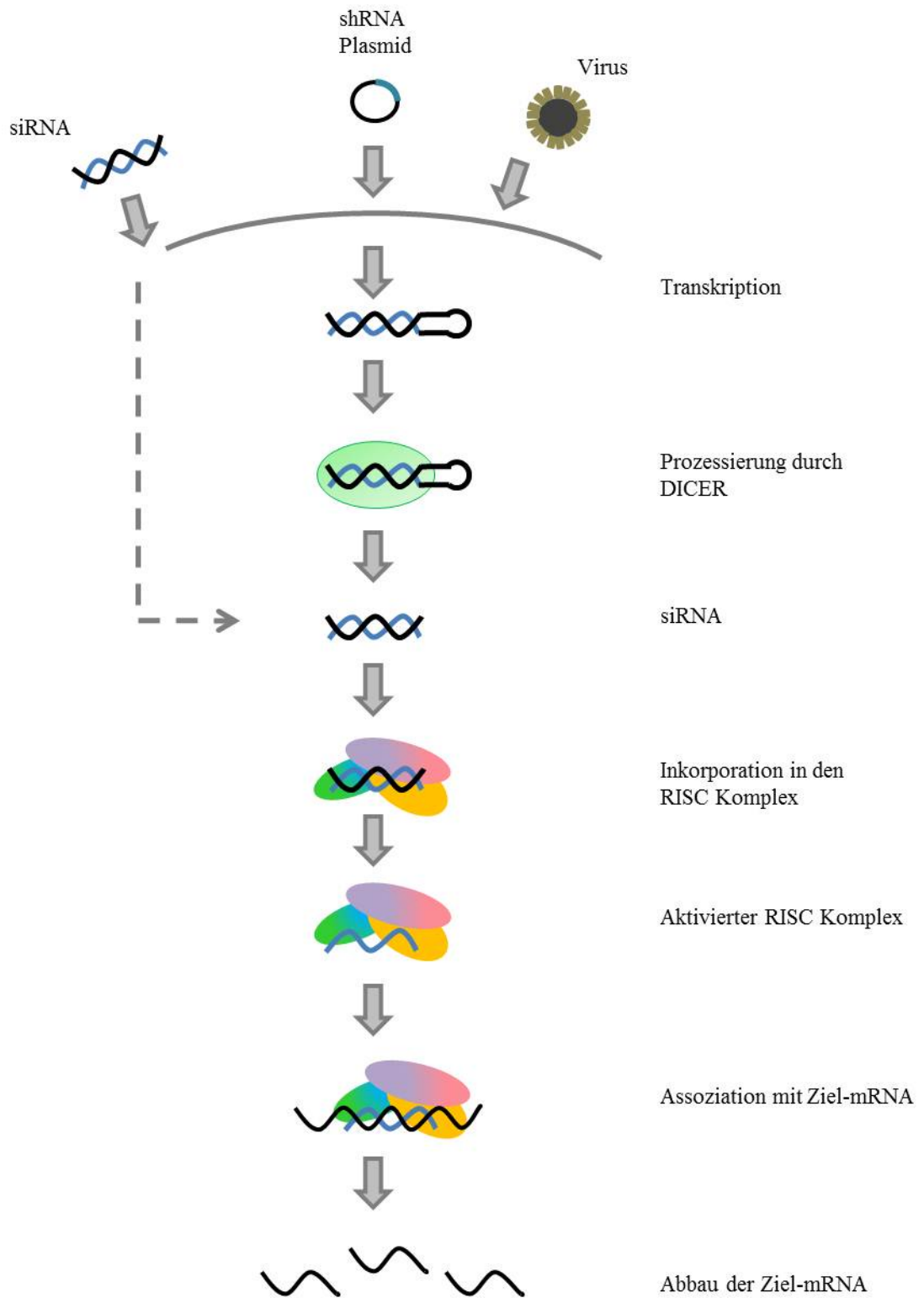


Abb. 11: Schematische Darstellung der Prozessierung von kleinen doppelsträngigen RNAs
Modifiziert nach SantaCruz Biotchnology, Gene Silencers, http://www.scbio.de/gene_silencers.html.

Neben einer shRNA, die auf der Sequenz einer publizierten siRNA basierte [220], wurden zwei weitere shRNAs designt. Dazu wurde die *EED* mRNA Sequenz mit Hilfe der siRNA-Design *Tools* von Sigma Aldrich und des RNAi Konsortiums (Broad Institute) analysiert. Beide Datenbanken lieferten geeignete shRNA Kandidatensequenzen. Von diesen wurden zwei Sequenzen ausgewählt, die nach den Informationen beider Datenbanken eine hohe Effizienz versprachen, ausschließlich *EED* als Zielgen hatten und die möglichst gut die publizierten Kriterien für erfolgreiche si und shRNAs erfüllten (z.B. die Abwesenheit von vier As bzw. Ts in der Sequenz oder in Verbindung mit der Haarnadel-Sequenz der Kassette, da diese Kombination an Nukleotiden ein Stopp-Signal für die RNA Polymerase III darstellt) [290,291].

Tab. 23: Verwendete siRNAs, alle stammten von Thermo Scientific Dharmacon

Name	Sequenz von 5' nach 3'	Quelle
EED siRNA	aagcacuauguuggccaugga	[220]
Kontroll siRNA (on-Target plus control siRNA)	unbekannt	Dharmacon

Tab. 24: Verwendete shRNAs, alle stammten von Thermo Scientific Dharmacon.

Sequenzabschnitte, die zur Kassette gehören, sind in Großbuchstaben dargestellt, die eigentlichen shRNA-Sequenzen in Kleinbuchstaben. Soweit nichts anderes angegeben, wurden die shRNAs selbst designt und in Form von DNA bestellt, um sie zu klonieren.

Name	Sequenz von 5' nach 3'	Quelle
sEED shRNA_2	CGCGTCCCCaagcactatgttggccatggaTTCAAGAGA tccatggccaacatagtgctTTTTTGAAAT	[220]
asEED shRNA_2	CGATTTCACAAAAaagcactatgttggccatggaTCTCTTGAA tccatggccaacatagtgctGGGGA	
sEED shRNA_3	CGCGTCCCCccagtgaatctaattgactaTTCAAGAGA tagtcacattagattaactggTTTTTGAAAT	
asEED shRNA_3	CGATTTCACAAAAaccagtgaatctaattgactaTCTCTTGAA tagtcacattagattaactggGGGGA	
sEED shRNA_4	CGCGTCCCCgcaaactttatgttgggattTTCAAGAGA aatcccaaacataaagttgcTTTTTGAAAT	
asEED shRNA_4	CGATTTCACAAAAgcaaactttatgttgggattTCTCTTGAA aatcccaaacataaagttgcGGGGA	
sLuc shRNA	CGCGTCCCCctgacgcggaataacttccaTTCAAGAGA tcgaagtattccgcgtcagTTTTTGAAAT	Dr. Rui Neves
asLuc shRNA	CGATTTCACAAAAactgacgcggaataacttccaTCTCTTGAA tcgaagtattccgcgtcagGGGGA	

4.2.3.4.2 Transfektion von siRNA

Die Transfektion von siRNAs erfolgte mittels Lipofektion. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofektamin 2000 verwendet. Dieses besteht aus Lipiden, die eine positive Kopfladung besitzen. Über diese Ladung ziehen sie zum einen die negativ geladenen siRNA Moleküle an und komplexieren sie, zum anderen docken sie so an die negativ geladene Zelloberfläche an. Somit werden die siRNA Moleküle effektiv zur Zelle hin transportiert. Über Lipidwechselwirkungen gelangen die Transfektionskomplexe dann in die Zelle, und die siRNA wird freigesetzt.

Einen Tag vor der eigentlichen Lipofektion wurden adhärente Zellen in 6-Well-Platten ausplattiert, sodass sie am Tag der Transfektion zu 70-90% konfluent waren. Sie wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ im entsprechenden Kulturmedium jedoch ohne Antibiotika kultiviert. Kurz vor der Transfektion wurde das Medium gewechselt, wobei wieder Medium ohne Antibiotika verwendet wurde. Pro Transfektion wurden 2 Mal 250 µl OptiMEM in Eppendorfgläsern vorgelegt. Anschließend wurden in eines der Eppendorfgläser je 5 µl Lipofektamin 2000 gegeben, leicht gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde die gewünschte Menge siRNA (zwischen 60 und 240 pmol) in das jeweils andere Eppendorfglas gegeben. Dieses Gemisch aus OptiMEM und siRNA wurde dann zu der Mischung aus OptiMEM und Lipofektamin gegeben. Es wurde vorsichtig mit der Pipette gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde alles auf die Zellen pipettiert und diese wie gewohnt kultiviert.

Neben der eigentlichen siRNA wurde auch immer dieselbe Menge einer Kontroll-siRNA (on-Target plus control siRNA von Thermo Scientific Dharmacon), die keinerlei Zielgene im humanen System haben sollte, eingesetzt

4.2.3.4.3 shRNA Hybridisierung

Um shRNAs klonieren zu können, müssen zunächst die beiden Einzelstränge miteinander hybridisiert werden. Dazu wurde jeder Einzelstrang auf eine Konzentration von 100 pmol/µl mit Wasser eingestellt. Anschließend wurden je 2 µl zusammengegeben und für 5 min bei 95°C inkubiert, um ggf. vorhandene Sekundärstrukturen zu lösen. Über einen Zeitraum von mindestens 30 min wurden die shRNAs dann langsam bei Raumtemperatur abkühlen gelassen. Während dieses Vorgangs lagern sich die komplementären Stränge aneinander und können anschließend wie unter 4.2.1.6 beschrieben, kloniert werden.

4.2.3.5 Virusproduktion

Um Proteine stabil über zu exprimieren oder herunterzuregulieren, wurden lentivirale Vektoren in Kombination mit Hüllproteinen aus der Familie der Foamy-Viren verwendet [292,293]. Hierbei wurden Viren produziert, die nur zu einer einzigen Infektion fähig sind und somit nur ein geringes Risiko für die Umwelt darstellen (Sicherheitsstufe S2) [294,295].

Die Herstellung der Viren erfolgte nach einem Protokoll aus dem Labor von Prof. Brüstle (Institut für rekonstruktive Neurobiologie, Universität Bonn). Es wurden drei getrennte Vektoren, die freundlicherweise von Prof. Hanenberg (HNO-Klinik, Universitätsklinik Düsseldorf) zur Verfügung gestellt wurden in die Zelllinie HEK293T transfiziert. Der Vektor pczHFVenv EM140 codiert für die Hüllproteine („Foamy“), der Vektor pCD/NL-BH codiert für die Enzyme, die zum Verpacken und Integrieren der DNA nötig sind („Helfer“), der dritte Vektor enthält das eigentliche Gen (pCL6) bzw. die shRNA (pCL2) (Abb. 7).

Zunächst wurden die HEK293T Zellen in mit Gelatine beschichteten Zellkulturflaschen amplifiziert, bis die gewünschte Zellzahl erreicht war.

4.2.3.5.1 Transfektion

Die drei benötigten Plasmide wurden mittels CaPO_4 -Transfektion in HEK293T Zellen eingebracht. Hierbei erzeugt man ein Präzipitat aus CaPO_4 und DNA indem man eine Na_2HPO_4 -haltige, HEPES gepufferte Lösung langsam mit CaCl_2 und DNA vermischt. Dieses Präzipitat lagert sich an die Zelloberfläche an und wird dann internalisiert.

Um eine gute Haftung der HEK293T-Zellen zu gewährleisten, wurden am ersten Tag der Virusproduktion Zellkulturplatten mit einem Durchmesser von 10 cm mit 5-10 ml einer 10 $\mu\text{g/ml}$ Poly-D-Lysin-Lösung in PBS beschichtet und dazu 30 min bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden einmal mit PBS gewaschen. Dann wurden ca. 3-5 Millionen HEK293T Zellen in MEF-Medium ausplattiert.

Am Morgen des zweiten Tages wurde das Medium gegen 9 ml 2% Advanced MEF Medium ausgetauscht. Ca. 1-2 Stunden danach erfolgte die Calciumphosphat Transfektion. Dazu wurden die entsprechenden Komponenten für jede Platte einzeln in der unten angegebenen Reihenfolge in einem Eppendorfgefäß zusammengegeben:

Material und Methoden

CaCl ₂ (2,5 M)	61,5 µl
Lentivektor-Plasmid	18,5 µg
pCD/NL-BH-Plasmid	9,25 µg
pczHFVenvEM140	9,25 µg
Wasser	ad 600 µl
HBS Puffer (2x)	600 µl

Die Proben wurden 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurde zu den Zellkulturplatten 10 µl 25 mM Chloroquine hinzugegeben, sodass die Endkonzentration 25 µM betrug. Anschließend wurde der Transfektionsansatz tropfenweise zu den Zellen gegeben und durch Schwenken gut verteilt. Nach 5-6 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ wurde das Medium gegen je 13 ml 5% Advanced MEF-Medium ausgetauscht.

Am Morgen des nächsten Tages wurde noch einmal Medium gewechselt und die Zellen für ca. 30 Stunden in 13 ml 5% Advanced MEF-Medium kultiviert.

4.2.3.5.2 Virusernte

Für die erste Ernte wurde das Medium komplett abgenommen und in Falconröhrchen überführt. Zur Erhöhung der Ausbeute wurden die Zellen weitere 24 Stunden lang in frischen 13 ml 5% Advanced MEF-Medium kultiviert. Die erste Ernte wurde zunächst für 5 min bei 400 x g und 4°C abzentrifugiert um tote Zellen zu pelletieren. Der Überstand wurde anschließend durch einen 0,45 µm Filter in ein Virusröhrchen überführt und bei 30.000 x g für 1,5 Stunden bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 2,5 ml Medium resuspendiert, für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, in ein Falconröhrchen überführt und über Nacht bei 4°C gelagert. Die zweite Ernte wurde analog zur ersten durchgeführt. Beide Ernten wurden vereinigt, à 500 µl aliquotiert und bis zur Infektion bei -80°C gelagert.

4.2.3.5.3 Infektion

4.2.3.5.3.1 Infektion von adhärennten Zellen

Um adhärennte Zellen zu infizieren, wurden diese einen Tag vor der Infektion in 6-Well-Platten ausplattiert, sodass sie am Tag der Infektion ca. 70-80% konfluent waren. Dann wurden zwischen 100 und 500 µl Virus auf die Zellen pipettiert und für ca. 48 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Der Virus wurde abgewaschen und die Zellen wie oben beschrieben gesplittet und weiter kultiviert.

4.2.3.5.3.2 Infektion von Suspensionszellen

Um Suspensionszellen effizient zu transduzieren, ist es notwendig, dass diese während der Infektion möglichst gut am Boden der Platte kleben und in engen Kontakt mit den Viruspartikeln kommen. Um dies zu erreichen wurden 24-Well-Platten mit $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ Retronektin beschichtet. Bei Retronektin handelt es sich um ein rekombinantes humanes Fibronektin-Fragment mit drei Domänen. Die zentrale heparinbindende Domäne, an die die Viruspartikel andocken können, wird flankiert von einer Zellbindenden Domäne und einer CS1-Domäne, an die ebenfalls Zellen binden können. So gelangen Virus und Zellen in räumliche Nähe.

Die beschichteten Platten wurden mindestens 24 Stunden bei 4°C inkubiert. Kurz vor der Infektion wurde das Retronektin abgenommen und auf eine neue Platte transferiert, bzw. nach der dritten Benutzung, verworfen. Die Platte wurde trocknen gelassen. Anschließend wurden 100.000 Zellen einer Zelllinie oder ca. 37.500 primäre Zellen in je 0,5-1 ml Medium ausplattiert. Dann wurde der Virusüberstand hinzugegeben, wobei für die primären Zellen ca. 200 μl verwendet wurden und für die Zelllinien zwischen 50 und 500 μl . Die Zellen wurden dann für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 kultiviert. Anschließend wurden sie bei $300 \times g$ für 7 min abzentrifugiert und mit PBS gewaschen um den Virus zu entfernen. Danach wurden sie unter den jeweiligen Standardbedingungen weiter kultiviert.

4.2.3.6 NK-Zell-Generierung

Um das lymphoide Differenzierungspotential von CD34^+ hämatopoietischen Stammzellen nach EED-Überexpression und Herabregulation zu untersuchen, wurden sie mit dem entsprechenden Vektor transduziert und anschließend zu NK-Zellen nach dem Protokoll von Miller *et al.* ausdifferenziert [296-299]. Für die Ausdifferenzierung wurden die infizierten CD34^+ HPC auf EL08-Feederzellen ausplattiert und mit Hilfe von ausgewählten Zytokinen im Medium in die NK-Zellrichtung gelenkt.

4.2.3.6.1 Vorbereitung für die NK-Zell-Generierung

Vorbereitend für die NK-Zell-Generierung wurden 24-Well-Zellkulturplatten mit 0,1%iger Gelatine wie unter 4.2.3.3.2.1 beschrieben, beschichtet. Pro Well wurden anschließend ca. 20.000 EL08 Zellen ausplattiert und bei 33°C und 5% CO_2 inkubiert, bis sie dicht gewachsen waren (ca. 96 Stunden). Um zu verhindern, dass die Zellen weiter proliferieren wurden sie mit 15 Gy bestrahlt. Anschließend wurden sie bei 37°C und 5% CO_2 weiter

inkubiert. Nach 24 Stunden wurde einmal das Medium gewechselt, anschließend wurden die Zellen bis zum Beginn der Generierung, jedoch maximal drei Wochen, bei 37°C und 5% CO₂ gehalten.

4.2.3.6.2 Durchführung der NK-Zell-Generierung

Die für die Generierung benötigten CD34⁺/Lin⁻ HPC wurden, wie unter 4.2.3.2.2-4.2.3.2.4 beschrieben, isoliert. Die Reinheit wurde durchflusszytometrisch bestimmt (4.2.3.1). Hierbei wurde darauf geachtet, dass der Anteil an Lin⁺ Zellen unter 5% lag. Jeweils 37.500 Zellen wurden auf Retronektin ausplattiert und, sobald sie sich am Boden abgesetzt hatten, mit 200 µl Virus infiziert (4.2.3.5.3.2). Anschließend wurden sie für 20-24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Danach wurden sie geerntet, abzentrifugiert und in 8 ml NK1 Medium aufgenommen. Von den vorbereiteten EL08 Platten wurde das Medium weitestgehend abgenommen und je 1 ml CD34er Suspension vorsichtig auf den Feeder gegeben. Die Platten wurden eine Woche bei 37°C und 5% CO₂ mit NK1 Medium kultiviert. Danach wurde das Medium gegen NK2 Medium ausgetauscht und die Kultivierung fortgesetzt. Von diesem Zeitpunkt an wurde das Medium immer dann gewechselt, wenn es sich gelb verfärbt hatte, Da die Transduktionseffizienz sehr gering war, wurden die GFP-positiven Zellen nach ca. einer Woche in NK2 Medium durchflusszytometrisch aufgereinigt (4.2.3.1.1). Je 40.000 Zellen pro Well wurden auf neue EL08 Platten ausplattiert und weiterkultiviert. 4-6 Wochen danach wurden die Zellen geerntet und die Expression der Oberflächenmarker durchflusszytometrisch untersucht. Hierbei wurden gleichzeitig erneut die GFP-positiven Zellen herausortiert, sodass sie für eine Transkriptanalyse verwendet werden konnten.

4.2.3.7 Kolonie-Assay

Um das myeloide Differenzierungspotential von CD34⁺ hämatopoietischen Progenitorzellen nach EED-Überexpression zu untersuchen, wurden sie mit einem EED-Überexpressionsvektor transduziert und anschließend in zähflüssigem MethoCult Medium, welches mit einem Zytokincocktail, der die Zellen in die myeloide Linie lenkt, versetzt ist, ca. drei Wochen lang kultiviert. Anschließend wurden die entstandenen Kolonien im Lichtmikroskop ausgezählt.

4.2.3.7.1 Vorbereitungen für den Kolonie-Assay

Zunächst wurde das MethoCult Medium, das schon vom Hersteller mit den Zytokinen SCF, GM-CSF, G-CSF, IL3 und Erythropoietin versetzt war, in Aliquots von 850 µl aufgeteilt und bis zur Verwendung bei -20°C weggefroren. Beim Aliquotieren wurde darauf geachtet, dass das Medium vorher gründlich durch Schütteln gemischt wurde und erst dann auf die einzelnen Röhrchen verteilt wurde, als alle Luftbläschen entwichen waren.

4.2.3.7.2 Durchführung des Kolonie-Assays

Die für den Kolonie-Assay benötigten CD34⁺/Lin⁻ HPC wurden, wie unter 4.2.3.2.2-4.2.3.2.4 isoliert und wie unter 4.2.3.5.3.2 und 4.2.3.6.2 infiziert. Die Platten wurden zunächst eine Woche bei 37°C und 5% CO₂ mit NK1 Medium kultiviert, damit die Zellen sich von der Virusinfektion erholen konnten, und genug Zeit für die Synthese von GFP hatten.

Danach wurden sie für den eigentlichen Kolonie-Assay durchflusszytometrisch direkt in eines der vorbereiteten, aufgetauten Aliquots des MethoCult Mediums sortiert (4.2.3.1.1). Hierbei wurden Zellen verwendet, die GFP aber kein CD14 exprimierten. Außerdem wurde zwischen CD34-positiven und negativen Zellen unterschieden. Es wurden jeweils 500 und 1000 Zellen pro Aliquot verwendet. Die einzelnen Proben wurden noch mit 100 µl 5%igem Humanalbumin versetzt und gründlich durch vortexen gemischt. Anschließend wurden sie bei 37°C stehen gelassen, bis alle Luftbläschen entwichen waren. Dann wurden jeweils 250 µl auf 3 Wells einer 24-Well-Platte verteilt und die Proben für ca. drei Wochen bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

4.2.3.7.3 Auswertung der Kolonie-Assays

Zur Auswertung der Kolonie-Assays wurden zunächst die einzelnen Kolonie-Arten in jedem Well ausgezählt. Hierbei wurde zwischen *Burst forming units-erythrocyte* (BFU-E), *Colony forming units-granulocyte, erythrocyte, monocyte, megacaryocyte* (CFU-GEMM), *Colony forming units- granulocyte, monocyte* (CFU-GM) und CFU-GM (Macrophage) unterschieden. Anschließend wurde pro Well der prozentuale Anteil jeder Kolonie-Art an der Gesamtzahl der Kolonien bestimmt und dann der Mittelwert sowie die Standardabweichung der jeweiligen Wells berechnet [300].

Des Weiteren wurde auch der Anteil der GFP-positiven Zellen nach dreiwöchiger Kultivierung durchflusszytometrisch (4.2.3.1) bestimmt. Hierzu wurden zunächst unter dem Lichtmikroskop alle Kolonien mit einem Anteil an roten Zellen aus den Wells herauspipettiert

und für die jeweiligen Proben vereinigt. Anschließend wurden die verbliebenen weißen Kolonien mit PBS-EDTA aus den Wells gespült und ebenfalls vereinigt. Alle Proben wurden gründlich mit PBS gewaschen und eventuell vorhandene Zellklumpen über 0,25 µm Zellsiebe entfernt. Um lebende Zellen zu markieren, wurden die Suspensionen mit einer 1:1.000 Verdünnung des Kernfarbstoffs DRAQ5 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden sie einmal mit PBS gewaschen und für 7 min bei Raumtemperatur und 300 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen und der Anteil an lebenden GFP-positiven Zellen im Durchflusszytometer bestimmt.

5. ERGEBNISSE

5.1 Screening zur Identifikation von epigenetischen Masterregulatoren der Alterung in hämatopoietischen Zellen

Um die der Alterung zu Grunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen, sollten in dieser Arbeit zunächst epigenetische Masterregulatoren identifiziert werden, die in hämatopoietischen Zellen aus Neugeborenen und Erwachsenen unterschiedlich stark exprimiert werden, und somit eine Rolle in der Alterung dieser Zellen spielen könnten. Dazu wurde die Expression von 43 epigenetischen Faktoren in $CD34^+$ hämatopoietischen Progenitorzellen (HPC) und $CD34^-$ Leukozyten aus Nabelschnurblut, G-CSF mobilisiertem peripherem Blut (Apheresat) und Knochenmark gesunder männlicher Donoren mittels MicroFluidic Card analysiert (Abb. 12). Die Knochenmarkproben dienten hierbei als interne Kontrolle, da der Wachstumsfaktor G-CSF die Mobilisation von Stammzellen fördert, und es nicht auszuschließen ist, dass er auch einen Einfluss auf die Expression verschiedener epigenetisch relevanter Faktoren haben könnte. Es wurden ausschließlich Zellen männlicher Spender verwendet, um sicherzustellen, dass hormonell basierte Unterschiede in der Genexpression solche, die tatsächlich alterungsbedingt sind, nicht überlagern.

Die meisten der untersuchten potentiellen epigenetischen Masterregulatoren der Alterung wiesen unterschiedliche Expressionsintensitäten zwischen Nabelschnurblut und Erwachsenen auf, wobei die Änderungen der Expressionsstärke mit einem *Fold Change* von ca. ± 2 häufig nur schwach ausgeprägt waren (Abb. 12). Stärkere Änderungen in der Expression folgten sowohl in Apheresat als auch in Knochenmark fast immer gleichen Trends. Effekte, die bei den $CD34^+$ HPC beobachtet werden konnten, fanden sich häufig auch bei den $CD34^-$ depletierten Leukozyten wieder, wenn auch nicht in demselben Ausmaß.

Ergebnisse

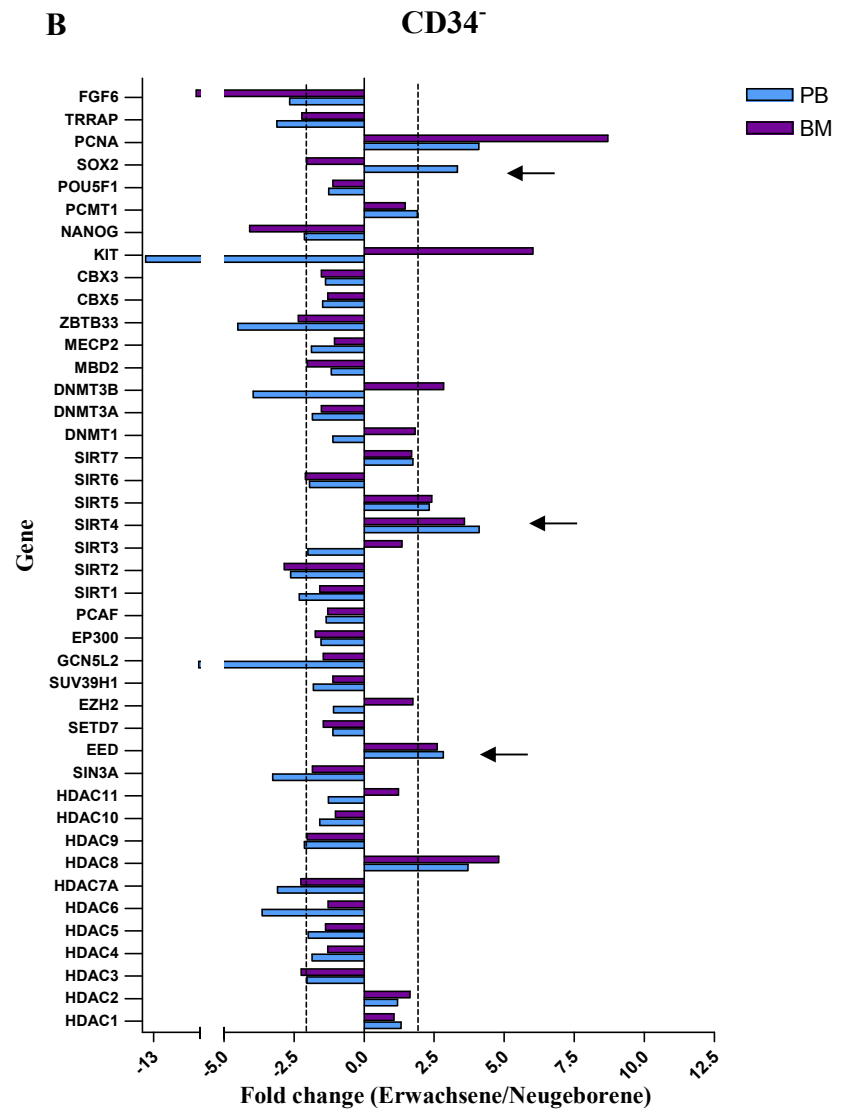
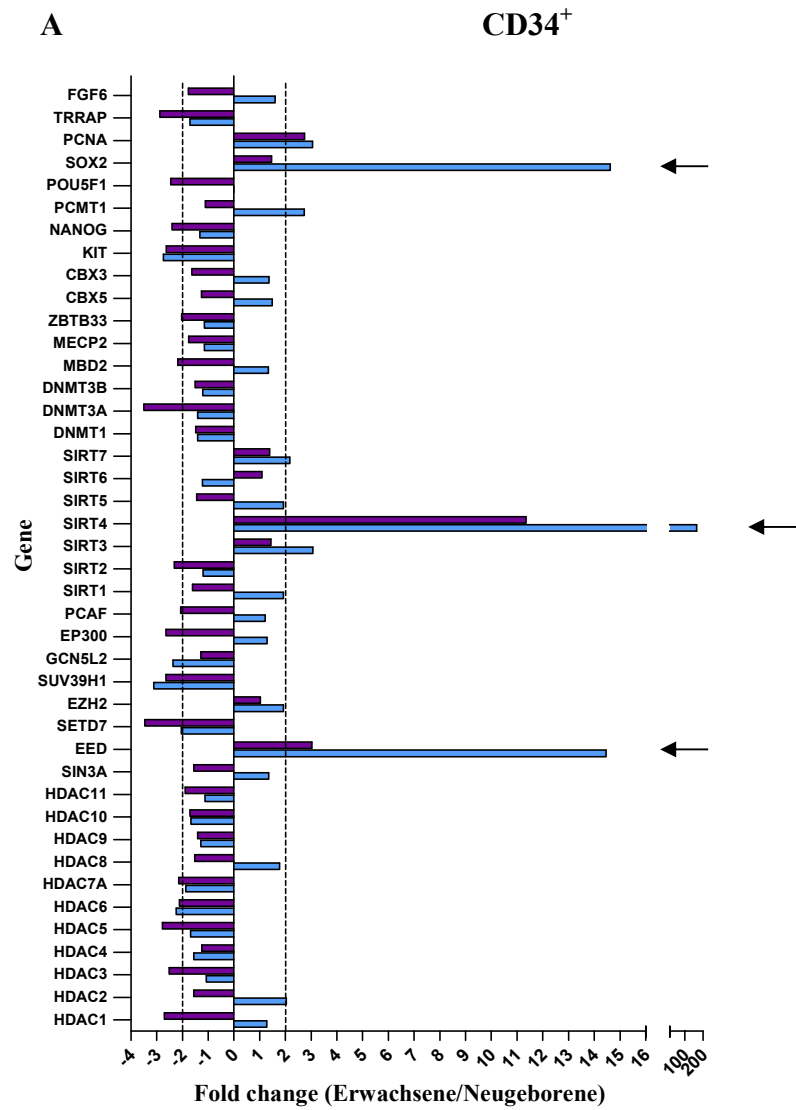


Abb. 12: Expressionsanalyse von 43 epigenetischen Faktoren in hämatopoietischen Zellen mittels MicroFluidic Card.

(A) CD34⁺ HPC wurden aus Nabelschnurblut (n = 4), Apheresat (PB, n = 5, durchschnittliches Alter: 44,6 Jahre, blau) und Knochenmark (BM, n = 1, Alter: 44 Jahre, lila) gesunder männlicher Donoren isoliert. (B) CD34 depletierten Leukozyten wurden ebenfalls aus Nabelschnurblut (n = 4), Apheresat (PB, n = 5, durchschnittliches Alter: 43,4 Jahre, blau) und Knochenmark (BM, n = 1, durchschnittliches Alter: 27 Jahre, lila) gesunder männlicher Donoren isoliert. Aus allen Zellen wurde RNA isoliert, die Expression der unterschiedlichen Faktoren analysiert und auf *GAPDH* normiert. Zur Berechnung des *Fold Change* wurde die normierte Expression auf den entsprechenden Wert der Nabelschnurblutprobe bezogen. Die Pfeile markieren jeweils die Gene, die in beiden Zellpopulationen deutlich hochreguliert werden.

Bei den CD34⁺ HPC wiesen die drei Faktoren *EED*, *SIRT4* und *SOX2* einen überdurchschnittlich starken Anstieg der Expression in den Proben der Erwachsenen auf. Dieser Anstieg konnte zu meist, wenn auch schwächer, ebenfalls in den CD34⁻ Zellen beobachtet werden, sodass diese drei Faktoren als Kandidaten für die weiteren Analysen in Frage kamen.

Da jedoch bisher nur für *EED*, nicht aber für *SOX2* und *SIRT4*, eine Rolle in der Hämatopoese beschrieben wurde, wurde *EED* für die weiteren Analysen ausgewählt.

EED ist eine Kernkomponente des *Polycomb Repressive Complex 2* (PRC2), der eine wichtige Rolle in der Hämatopoese und auch in der Alterung spielt. Da die genauen Zusammenhänge jedoch noch nicht vollständig untersucht sind, und die meisten Arbeiten in der Maus durchgeführt wurden, wurde im weiteren Verlauf dieser Arbeit der Fokus auf den PRC2, bzw. dessen Kernkomponenten *EED*, *EZH2* und *SUZ12* sowie auf seine Antagonisten *JMJD3* und *UTX* gelegt.

5.2 Detaillierte Expressionsanalysen der PRC2 Kernkomponenten und ihrer Antagonisten

5.2.1 Ausschluss des Einflusses eines *EED*-Pseudogens auf die Expressionsanalysen

Zunächst sollte untersucht werden, ob auch bei den übrigen Faktoren des PRC2 und den beiden Antagonisten eine Altersabhängigkeit der Expression besteht. Zu diesem Zweck sollten für alle Faktoren TaqMan Assays verwendet werden, da diese sehr gut reproduzierbare Ergebnisse liefern. Dies stellte sich im Falle von *EED* jedoch schwieriger dar, da der beste, zum damaligen Zeitpunkt verfügbare, TaqMan Assay für *EED* nicht nur die *EED* mRNA, sondern auch ein *EED*-Pseudogen auf dem X-Chromosom erkennt (*XEED*). Dieses Pseudogen stimmt gerade in dem Bereich, in dem der TaqMan Assay liegt, beinahe vollständig mit der eigentlichen *EED*-Sequenz überein (vgl. Anhang Abb. 49). Untersuchungen mit dem ExPASy Proteomics Server ergaben jedoch, dass diese Sequenz, die komplett in repetitive Elemente eingebettet ist, keine längeren offenen Leseraster beinhaltet, und somit kein funktionales, *EED*-ähnliches, Protein entstehen kann. Auch wenn das *EED*-Pseudogen vermutlich nicht transkribiert wird, kann seine DNA von dem verwendeten TaqMan Assay dennoch amplifiziert werden. Dieser umfasst zwar in der eigentlichen *EED*-Sequenz mehrere Exons, sodass hier keine genomische DNA amplifiziert werden kann, beim Pseudogen sind diese Exons jedoch fusioniert und nicht durch Introns getrennt. Im Falle von RNA-Proben, die trotz extensiven DNase Verdaus noch mit Spuren von DNA kontaminiert sind, könnte der Assay also durch Amplifikation der genomischen *XEED*-Pseudogensequenz die Ergebnisse verfälschen.

Um einen Einfluss der *XEED*-Pseudogensequenz auf die Ergebnisse der Expressionsanalysen auszuschließen, wurden drei Primerpaare erstellt, die zwischen *EED* und dem Pseudogen unterscheiden (vgl. Tab. 9 und Abb. 49). Eines der Paare amplifiziert nur cDNA, die mit der kurzen *EED* mRNA (NM_003797), welche auch für das funktionale Protein codiert, als Vorlage synthetisiert wurde (*EED* kurz). Ein anderes amplifiziert cDNA, die sowohl die kurze als auch die lange (NM_152991.1) *EED* mRNA Variante als Vorlage haben kann (*EED* gesamt). Das dritte diskriminierende Primerpaar amplifiziert nur das *EED* Pseudogen (*XEED*). Ein weiteres Primerpaar amplifiziert cDNA, die aus der langen *EED* mRNA Variante synthetisiert wurde, erkennt jedoch auch das *EED* Pseudogen (*EED* lang).

Mit diesen Primern wurde die *EED*-Expression stichprobenartig in drei CBs und vier Apheresatproben, die alle auch Teil der unter 5.2.2 beschriebenen Analysen waren, untersucht. Es zeigte sich sowohl für CD34⁺ HPC, als auch für CD34 depletierten

Ergebnisse

Leukozyten, dass in beiden Fällen nur minimale Mengen an Template für das *EED*-Pseudogen vorlagen (Abb. 13 A, B). Bei $CD34^+$ HPC war die Templatemenge des Pseudogens in Erwachsenen etwas höher als in Neugeborenen, bei $CD34$ depletierten Leukozyten war es umgekehrt. In beiden Zellpopulationen war die Menge der kurzen und der langen *EED*-Variante, sowie Gesamt-*EED* in Erwachsenen höher, als in Neugeborenen (Abb. 13 C, D). Auch wenn in $CD34^+$ HPC ein geringfügiger Anstieg an *XEED* in den Proben der Erwachsenen messbar war, zeigen die Ergebnisse, bei denen die Amplifikation von *XEED* ausgeschlossen ist deutlich, dass ein Anstieg in der *EED*-Expression nicht durch schwankende Mengen des *EED*-Pseudogens zu Stande kommt, sondern tatsächlich auf unterschiedliche Mengen *EED*-Transkript zurückzuführen ist, sodass der TaqMan Assay für die weiteren Analysen verwendet werden konnte.

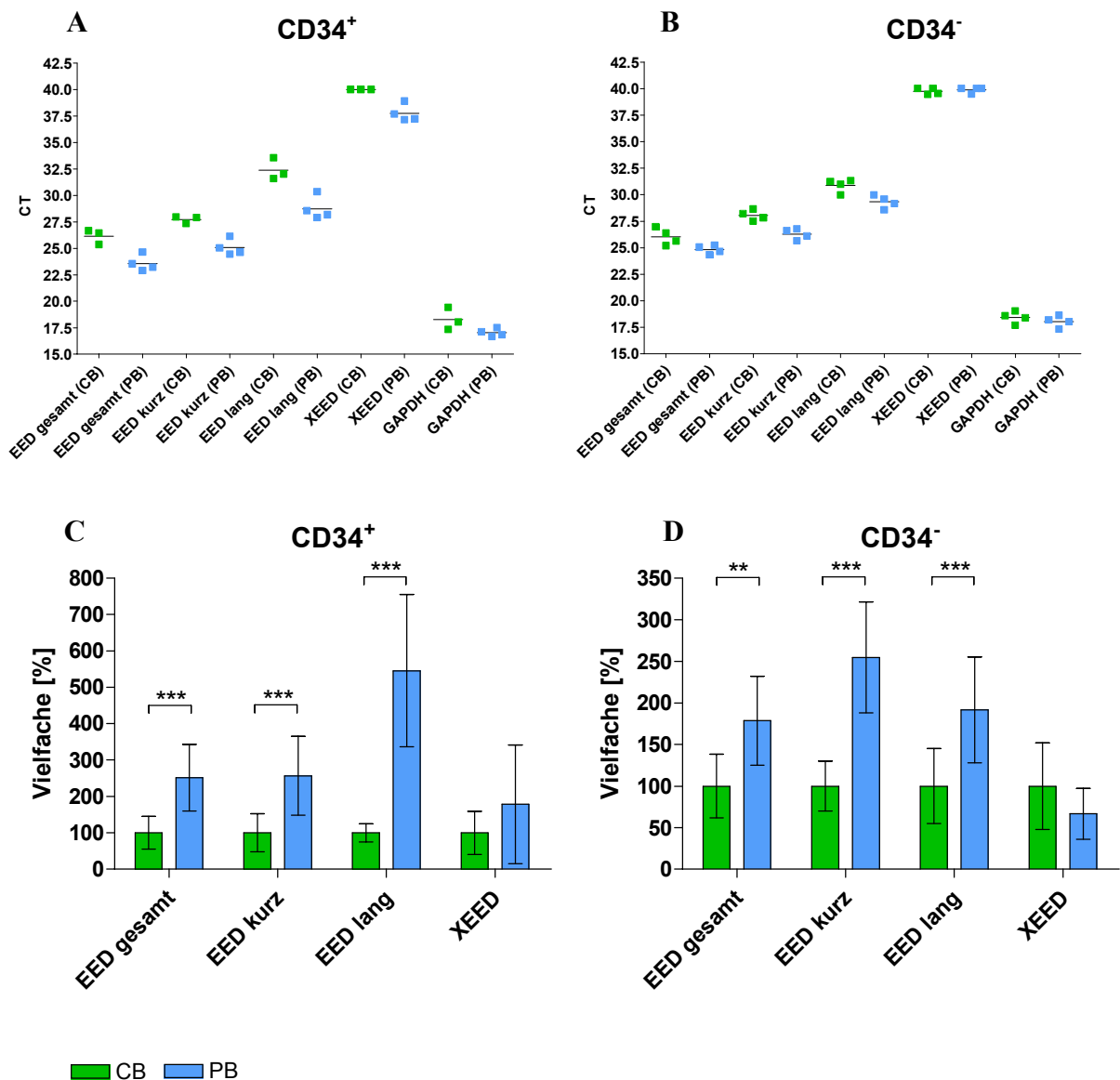


Abb. 13: Expressionsanalyse der einzelnen *EED* mRNA Varianten und des X-chromosomalen Pseudogens.

Die Expression der einzelnen *EED* mRNA Varianten wurde in CD34⁺ HPC (A, C) und CD34⁻ depletierten Leukozyten (B, D) aus Nabelschnurblut (CB, n = 3 für CD34⁺ und n = 4 für CD34⁻, grün) und Apheresat (PB, blau n = 4, durchschnittliches Alter 45,8 für CD34⁺ HPC bzw. 44,8 Jahre für CD34⁻ Leukozyten) untersucht. Die verwendeten RNA Proben stellen Stichproben aus der Gesamtheit der für Abb. 14 analysierten Proben dar. Die Transkriptmengen der verschiedenen *EED* Varianten und *XEED* wurden mit diskriminierenden Primern (vgl. Material und Methoden Tab. 9 und Anhang Abb. 49) bestimmt. Die entsprechenden CT-Werte sind in A und B dargestellt. Anschließend wurde auf *GAPDH* normiert und mit der $2^{-\text{ddCT}}$ Methode Vielfache in Bezug auf Nabelschnurblut bestimmt (C und D). Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt (***: p < 0,001; **: p < 0,01).

5.2.2 Expressionsanalyse der PRC2 Kernkomponenten und ihrer Antagonisten

Um eine klare Aussage bezüglich der Expressionsunterschiede von *EED*, *EZH2*, *SUZ12*, *JMJD3* und *UTX* zwischen Neugeborenen und Erwachsenen treffen zu können, wurde zunächst der Probenumfang im Vergleich zum Screening (Abb. 12) und der Test-PCRs (Abb. 13) erweitert. Die Expression der einzelnen Faktoren wurde in CD34⁺ HPC aus neun CBs, 17 Apheresaten (durchschnittliches Alter: 40 Jahre) und fünf Knochenmarkproben (durchschnittliches Alter: 37 Jahre) gesunder männlicher Spender mittels TaqMan Assays untersucht (Abb. 14 A, B).

Interessanterweise war in dieser erweiterten Stichprobe nur die Expression von *EED* sowohl in Apheresat als auch in Knochenmark signifikant gegenüber Nabelschnurblut erhöht. Die *EZH2* Expression blieb annähernd konstant, während *SUZ12* Levels sogar leicht abnahmen. Für den Antagonisten *JMJD3* konnte kein eindeutiger altersabhängiger Trend in der Expression ausgemacht werden, da sie bei CD34⁺ HPC aus Knochenmark im Vergleich zu denen aus Nabelschnurblut leicht abnahm, während bei Apheresat eine Zunahme mit dem Alter zu beobachten war. Die Expression des zweiten Antagonisten, *UTX*, war in den Zellen der Erwachsenen gegenüber denen der Neugeborenen reduziert.

Um einen Eindruck zu gewinnen, ob sich diese Ergebnisse auch auf differenzierte Leukozyten übertragen lassen, wurden die Analysen ebenfalls an CD34⁻ Zellen aus 13 CBs, 16 Apheresaten (durchschnittliches Alter: 39,9 Jahre) und drei Knochenmarkproben (durchschnittliches Alter: 43,5 Jahre) gesunder männlicher Spender durchgeführt. Hier bestätigten sich die Trends aus den CD34⁺ HPCs (Abb. 14 C, D).

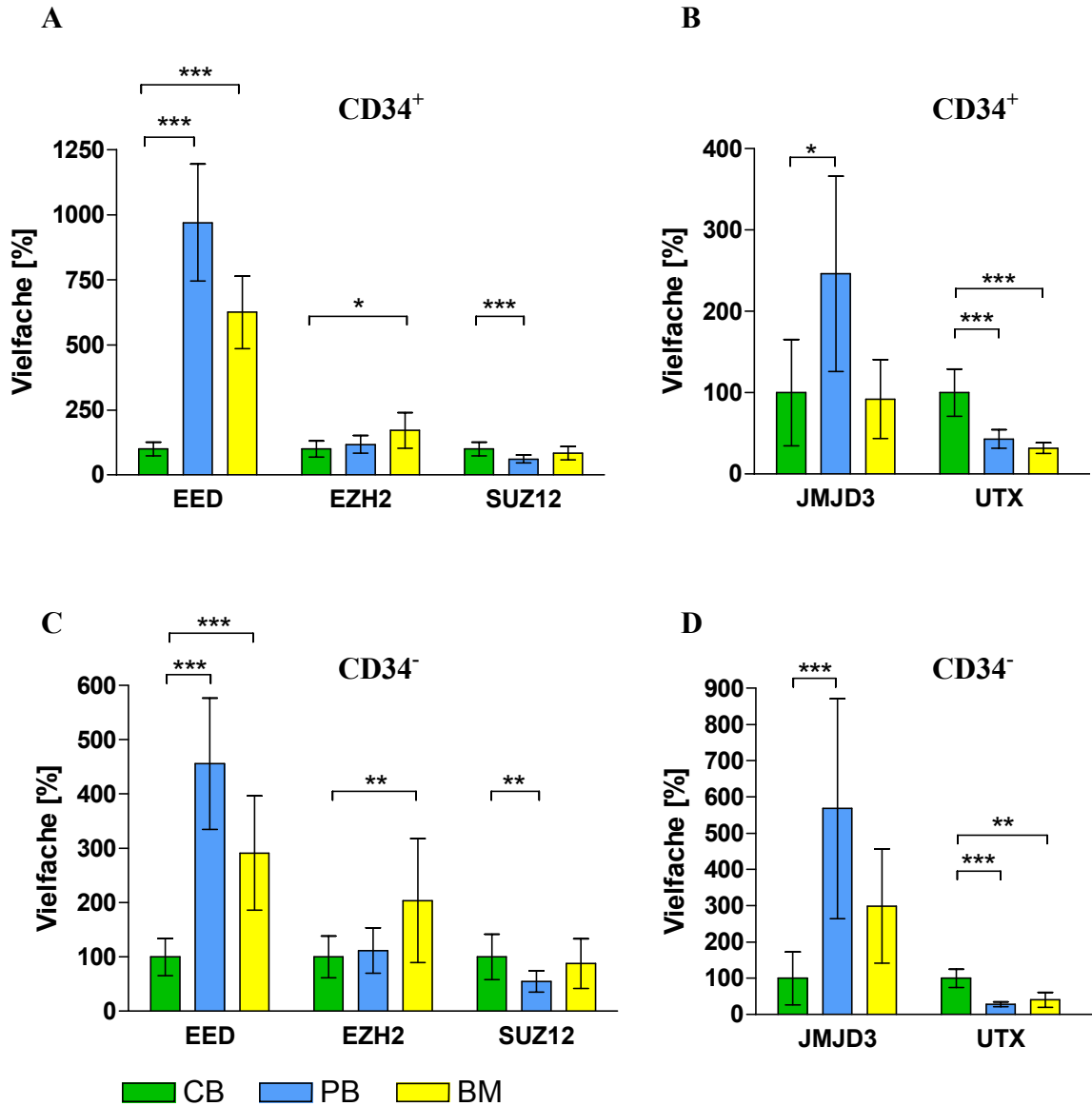


Abb. 14: Expression der drei PRC2 Mitglieder *EED*, *EZH2* und *SUZ12* (A und C) sowie der Histondemethylasen *JMJD3* und *UTX* (B und D) in CD34⁺ HPC (A und B) und in Leukozyten (C und D) aus Nabelschnurblut (CB, grün), Apheresat (PB, blau) und Knochenmark (BM, gelb). RNA wurde aus CD34⁺ HPC aus neun Nabelschnurblutproben, 17 Apheresaten (durchschnittliches Alter: 40 Jahre) und fünf Knochenmarkproben (durchschnittliches Alter: 37 Jahre) sowie aus CD34 depletierten Leukozyten aus 13 Nabelschnurblutproben, 16 Apheresaten (durchschnittliches Alter: 39,9 Jahre) und drei Knochenmarkproben (durchschnittliches Alter: 43,5 Jahre) isoliert. Die Transkriptmengen wurden mittels TaqMan Assays bestimmt und auf *GAPDH* normiert. Anschließend wurden mit der 2^{-ddCT} Methode Vielfache in Bezug auf Nabelschnurblut berechnet. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt (***: p < 0,001, **: p < 0,01, * p < 0,05).

5.2.3 Einfluss von G-CSF auf die Expression von *EED*

Für die Analysen der CD34⁺ Zellen von Erwachsenen wurden zu einem großen Teil G-CSF mobilisierte Blutproben (Apheresate) verwendet. Hierbei kann nicht ausgeschlossen werden, dass allein die Gabe von G-CSF bzw. die damit verbundenen Änderungen im Proliferations- und Zirkulationsverhalten der HPC die Expression der untersuchten Faktoren beeinflussen.

Da die Knochenmarkproben, bei denen keine Mobilisierung durch G-CSF stattgefunden hat, in den meisten Fällen ähnliche Ergebnisse lieferten, wie die Apheresate (Abb. 12 und Abb. 14), kann davon ausgegangen werden, dass, zumindest für die hier untersuchten Faktoren, ein möglicher G-CSF Einfluss keine Rolle spielt. Um dies noch einmal direkt zu bestätigen, wurden von vier gesunden männlichen Spendern (durchschnittliches Alter: 39,8 Jahre) Leukozyten vor und nach Gabe von G-CSF untersucht. Hierbei zeigte sich, dass die *EED*-Expression, wie auch die Expression aller anderen untersuchten Faktoren, unter G-CSF Einfluss sogar reduziert war (Abb. 15). Damit ist, zumindest im Falle von *EED*, ausgeschlossen, dass das G-CSF für die altersassoziierte Zunahme der Expression verantwortlich ist.

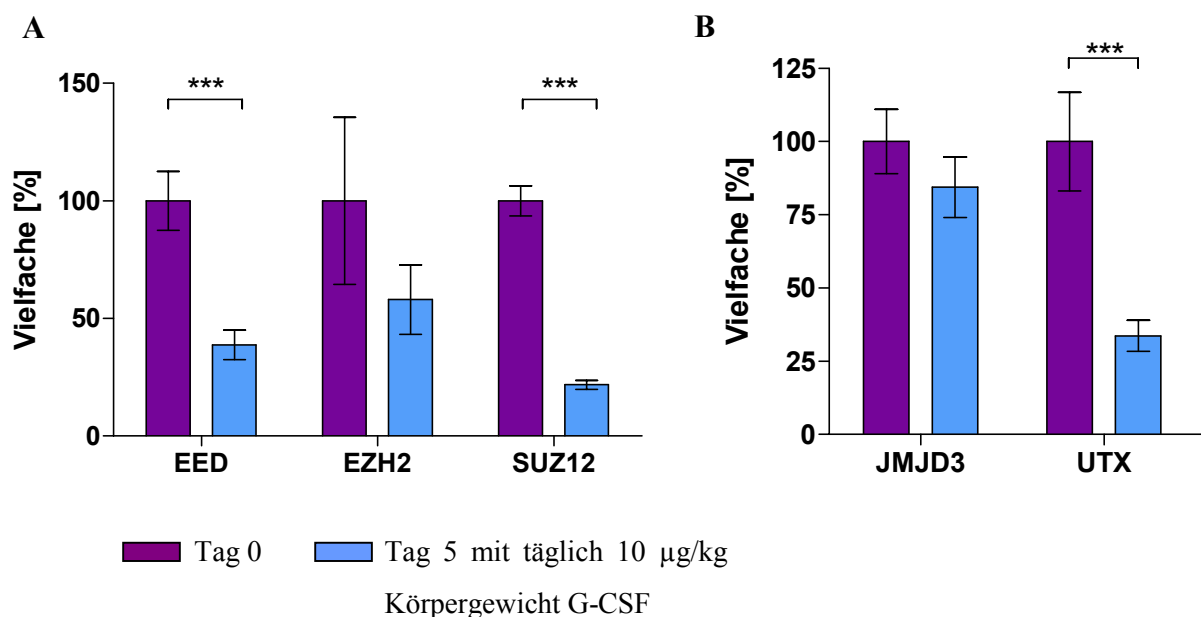


Abb. 15: Einfluss von G-CSF auf die Expression der drei PRC2 Mitglieder *EED*, *EZH2* und *SUZ12* (A) und der Histodemethylasen *JMJD3* und *UTX* (B).

Von vier gesunden männlichen Spendern (durchschnittliches Alter: 39,8 Jahre) wurde RNA aus Leukozyten vor und nach der Gabe von G-CSF (10 µg/kg Körpergewicht und Tag für fünf Tage) isoliert. Die Transkriptmengen der verschiedenen Faktoren wurden mittels TaqMan Assays bestimmt und auf *GAPDH* normiert. Anschließend wurden mit der 2^{-ddCT} Methode Vielfache in Bezug auf die nicht mobilisierte Probe bestimmt. Dargestellt sind jeweils der Mittelwert und das 95% Konfidenzintervall. Signifikanzen wurden mittels t-Test ermittelt (***: p < 0,001).

5.3 Rolle von *EED* in der Seneszenz von Fibroblasten

Aus dem murinen System ist bekannt, dass sich nicht alle Zelltypen im Zuge der Alterung gleich verhalten [32]. Daher sollte überprüft werden, ob in älteren Fibroblasten auch ein Anstieg an *EED*-Transkript nachzuweisen ist. Eine einfache Möglichkeit hierfür ist es, Fibroblasten von Kleinkindern zu kultivieren, bis diese seneszent werden und dauerhaft den Zellzyklus verlassen. Hierbei werden regelmäßig die Transkriptmengen der interessierenden Faktoren bestimmt. Mit diesem Ansatz kann in relativ kurzer Zeit die *in vivo*-Alterung durch Zellteilung nachgestellt werden, wobei zu beachten ist, dass Seneszenz und Alterung nicht identisch sein müssen.

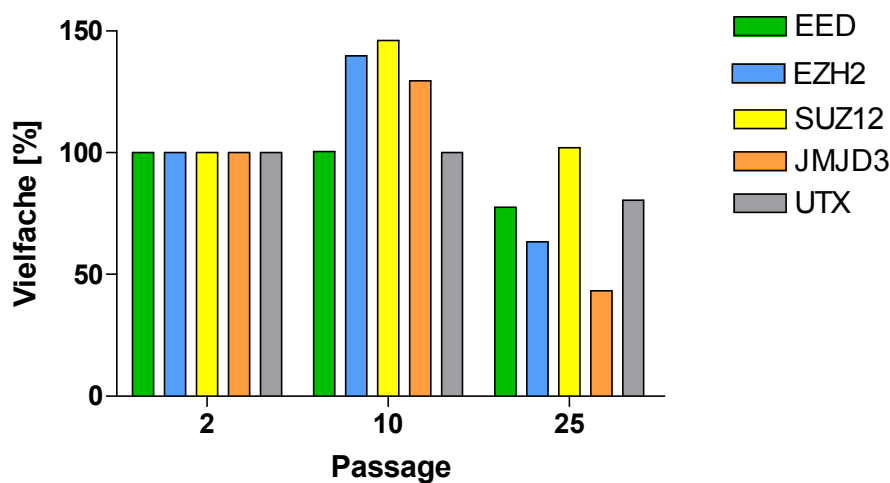


Abb. 17: Analyse des Expressionsverlaufs der drei PRC2 Mitglieder *EED* (grün), *EZH2* (blau) und *SUZ12* (gelb), sowie der Histondemethylasen *JMJD3* (orange) und *UTX* (grau) in Vorhautfibroblasten eines 2-jährigen Jungen bei Kultivierung bis zum seneszenzbedingten Ende der Proliferation.

Die Vorhautfibroblasten eines 2-jährigen Jungen wurden unter Standardbedingungen kultiviert und gesplittet, sobald sie konfluent waren. Von verschiedenen Passagen wurde RNA isoliert und die Transkriptmengen mittels TaqMan Assays bestimmt und auf *GAPDH* normiert. Anschließend wurden mit der 2^{ddCT} Methode Vielfache in Bezug auf die frühestmögliche Passage (Passage 2) bestimmt.

Bei der Langzeitkultivierung von humanen Fibroblasten bis zur seneszenzbedingten Einstellung der Zellteilung nach 27 Passagen, zeigten sich Änderungen in der Expression aller drei PRC2 Faktoren, sowie der Antagonisten *UTX* und *JMJD3* (Abb. 17). Die Expression aller Faktoren, mit Ausnahme von *EED* und *UTX*, nahm von Passage 2, auf die alle weiteren Zeitpunkte normiert wurden, zu Passage 10 hin zu. Von Passage 10 zu Passage 25 ging die Expression aller Faktoren zurück und sank, mit Ausnahme von *SUZ12*, deutlich unter das Ausgangsniveau. Der starke Rückgang der Expression aller Faktoren in Passage 25 hängt vermutlich mit dem seneszenzbedingten Vitalitätsverlust und der damit einhergehenden

deutlichen Verlangsamung der Zellteilung zusammen und stellt daher nur einen indirekten alterungsbedingten Effekt dar. Betrachtet man den Zeitraum von Passage 2 zu Passage 10, erkennt man jedoch Parallelen im Anstieg der Expression von *EZH2* und *JMJD3* zu den beobachteten Effekten in den Lymphozyten. Der Rückgang der Expression von *SUZ12* und *UTX* sowie der deutliche Anstieg der *EED* Expression finden sich in den Fibroblasten allerdings nicht wieder.

5.4 Alterungsassoziierter Anstieg der repressiven Histonmodifikation H3K27me3

Um festzustellen, ob die stärkere Expression von *EED* in Erwachsenen eine Auswirkung auf die vom PRC2 katalysierte Trimethylierung des Lysins 27 im Histon H3 (H3K27me3) hat, wurde die H3K27me3 Menge in einem ELISA untersucht. Da bekannt ist, dass allgemein die Menge an Histonen im Alter zurückgeht [271,272], hätte eine alleinige Messung von H3K27me3 im ELISA womöglich zu verzerrten Ergebnissen geführt. Daher wurde, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Rechtsmedizin, ein Verfahren entwickelt, das eine Normierung der H3K27me3 Menge auf Gesamt-H3 ermöglicht. Hierzu wurden zunächst Histone aus Leukozyten von Neugeborenen und Erwachsenen isoliert. Aus diesen wurde anschließend mittels *Fast Protein Liquid Chromatography* (FPLC) Histon H3 aufgereinigt (Abb. 18).

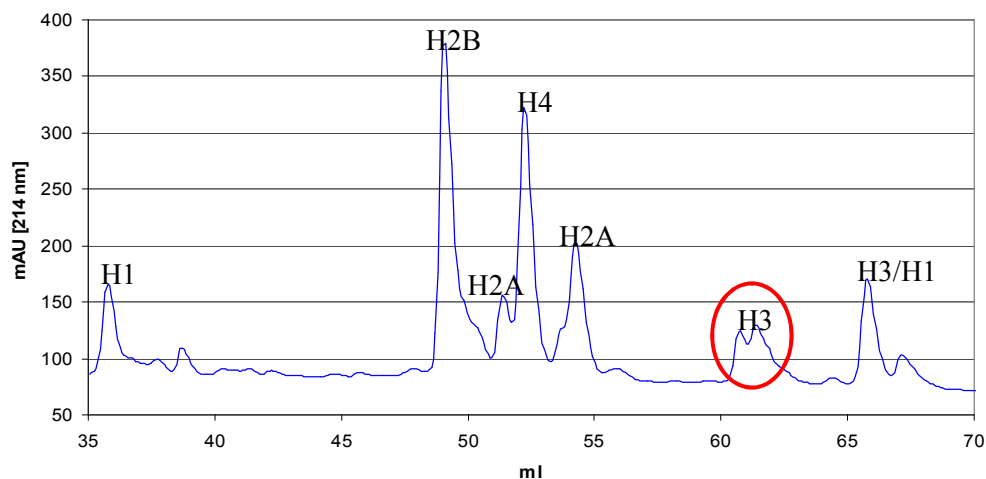


Abb. 18: Chromatogramm der FPLC-Aufreinigung von Histon H3 aus einem Histongemisch, isoliert aus CD34⁺ Leukozyten.

Histone wurden mittels FPLC aufgereinigt. Die einzelnen Peaks sind entsprechend der korrespondierenden Histone beschriftet. Der Peak für Histon H3 ist zusätzlich noch rot markiert.

Ergebnisse

Anschließend wurden gleiche Mengen aufgereinigtes Histon H3 in einen H3K27me3-spezifischen ELISA eingesetzt (Abb. 19). Hierbei zeigte sich, dass in den Proben der Erwachsenen tatsächlich signifikant mehr H3K27me3 als in den Nabelschnurblutproben vorlag.

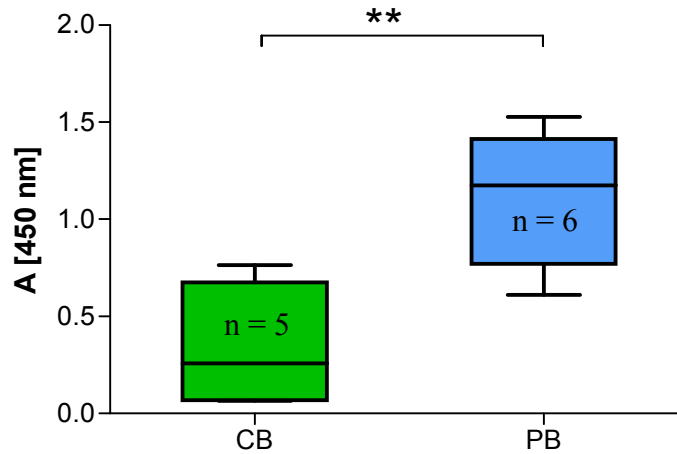


Abb. 19: Analyse von H3K27me3 mittels ELISA.

Histon H3 wurde aus Leukozyten aus Nabelschnurblut (CB, n = 5, grün) und Apheresat (n = 5) bzw. Knochenmark (n = 1) (beide zusammengefasst als PB, blau, durchschnittliches Alter = 41,1 Jahre) aufgereinigt. Gleiche Mengen H3 wurden in den ELISA eingesetzt und die Absorption bei 450 nm am ELISA Reader bestimmt.

Da bekannt ist, dass H3K27me3 häufig mit repetitiven Elementen assoziiert ist [204,301,302], haben wir uns die Frage gestellt, ob der gemessene Anstieg an H3K27me3 in Erwachsenen ausschließlich durch die repetitiven Elemente bestimmt ist. Um dies zu überprüfen wurden CD34⁺ HPC aus Nabelschnurblut und Apheresat mittels Chromatinimmunopräzipitation (ChIP) untersucht. Hierbei wurden Antikörper gegen H3K27me3 und, zur Normierung, Gesamt-H3 verwendet. Es zeigte sich, dass sowohl *LINE* Elemente, als auch bekannte Polycomb Targets wie der Östrogenrezeptor (*ESR*) [165] von der stärkeren Trimethylierung im Alter betroffen sind (Abb. 20 A, B).

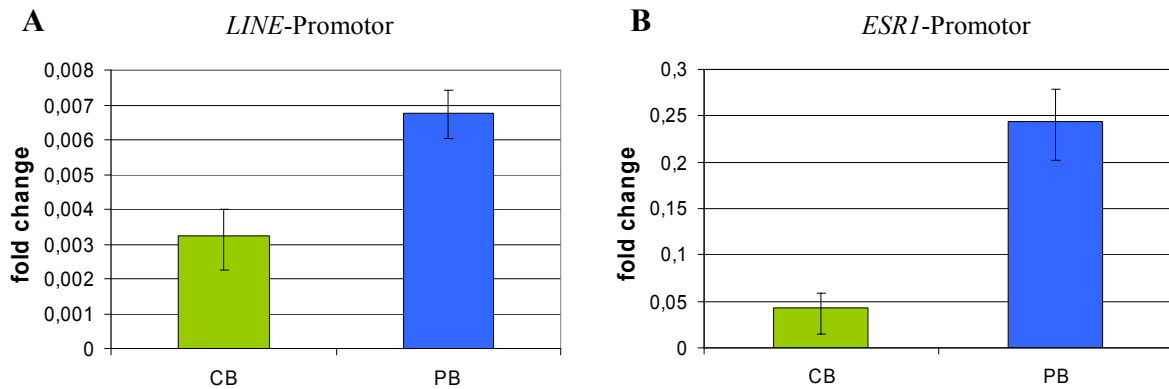


Abb. 20: H3K27me3 am *LINE*-und am *ESRI*-Promotor in CD34⁺ HPC.

CD34⁺ HPC wurden aus zwei Nabelschnurblutproben (CB, grün) und einem Apheresat (PB, blau, 46 Jahre) isoliert und im Falle der CBs vereinigt. Es wurden Chromatinimmunopräzipitationen mit Antikörpern gegen Gesamt-H3 und gegen H3K27me3 durchgeführt. Anschließend wurde mittels Real-Time PCR für ausgewählte Loci ermittelt, in welchem Ausmaß diese mit der repressiven Histonmodifikation H3K27me3 assoziiert waren. Zur Normierung wurden die input-korrigierten Werte auf die entsprechenden Werte für Gesamt-H3 bezogen (2^{-ddCT} -Methode). Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment. Alle Real-Time PCRs wurden in Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Fehlerbalken beziehen sich auf die nach der 2^{-ddCT} -Methode ermittelten Ranges dieser Dreifachbestimmungen.

5.4.1 Globale Analyse der Verteilung von H3K27me3 und H3K4me3 in HPC von Neugeborenen und Erwachsenen

Um auf globaler Ebene zu ermitteln, welche Gene von der stärkeren H3K27 Trimethylierung in Erwachsenen betroffen sind, wurden ChIP-Proben mittels NimbleGen 385K RefSeq Promotor-Arrays näher untersucht (ChIP-on-chip). Diese Arrays ermöglichen eine Analyse von insgesamt 24.659 humanen Promotoren, wobei 6.631 dieser Promotoren sowohl einem Gen stromaufwärts als auch einem Gen stromabwärts zugeordnet werden können und daher aufgrund ihrer Uneindeutigkeit von dieser Studie ausgeschlossen wurden.

Um eine optimale Reinheit der Proben zu gewährleisten, wurden alle Proben, die für die Arrays verwendet wurden, nach der Aufreinigung mit magnetischen Kügelchen noch durchflusszytometrisch auf Expression von CD34 sowie das Fehlen von *Lineage*-Markern hin sortiert. Da für die ChIP-on-chip Analysen mehr Zellen benötigt werden, als aus einer einzelnen Probe gewonnen werden können, wurden CD34⁺ HPC aus jeweils neun CBs bzw. fünf Apheresaten (34-54 Jahre, durchschnittliches Alter: 43,6 Jahre) vereinigt.

Es wurde nicht nur die Verteilung von H3K27me3, sondern auch die von Histon H3 mit trimethyliertem Lysin 4 (H3K4me3) bestimmt. Die aktivierende Histonmodifikation

H3K4me3 wurde in erster Linie deshalb mitgeführt, weil beide Modifikationen zusammen an ein und demselben Promotor vorkommen können. Sie bilden dann eine sog. bivalente Domäne aus. Die zugehörigen Gene werden nicht transkribiert, befinden sich jedoch in einem Zustand, der ein schnelles Aktivieren als Antwort auf äußere Faktoren ermöglicht. Bivalente Domänen wurden zunächst in embryonalen Stammzellen beschrieben, es zeigte sich jedoch, dass sie auch in differenzierten Zellen vorkommen [128-130,205]. Durch die simultane Analyse beider Modifikationen sollte so auch ein Eindruck über die Verteilung von bivalenten Modifikationen in beiden Altersgruppen gewonnen werden.

Zur Analyse der NimbleGen Daten wurden zunächst, wie unter 4.2.2.8.4 beschrieben, die einzelnen Signale zu Peaks zusammengefasst. Anschließend wurden die Intensitäten der Peaks, die eindeutig einem einzigen Promotor zugeordnet werden konnten, aufsummiert.

Sowohl in Erwachsenen, als auch in Nabelschnurblut wies nur ein kleiner Anteil aller untersuchten Promotoren eine oder beide Histonmodifikationen auf. Insgesamt waren in beiden Proben zusammen 2.436 Promotoren (13,5%) mit H3K27me3 assoziiert und 3.246 (18%) mit H3K4me3. Beide Histonmodifikationen waren in HPC von Erwachsenen stärker vertreten als in HPC von Neugeborenen (Abb. 21).

Ergebnisse

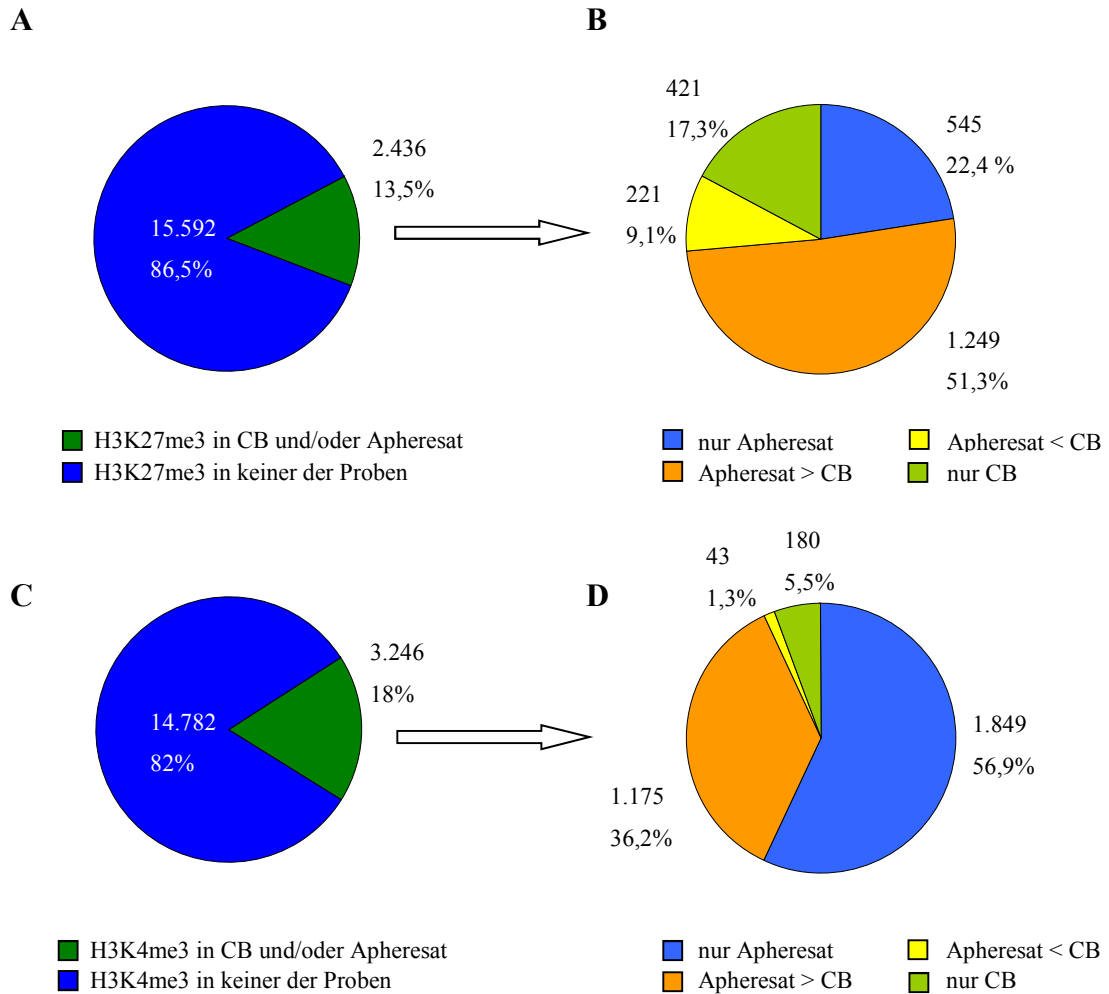


Abb. 21: Verteilung von H3K27me3 (A und B) und H3K4me3 (C und D) an den mit den NimbleGen Arrays untersuchten Promotoren.

Jeweils links (A und C) ist der Anteil aller analysierten Promotoren aus Nabelschnurblut (CB) und Apheresat zusammen dargestellt, der die jeweilige Modifikation in einer oder beiden Proben aufwies. In den rechten Diagrammen (B und D) ist für diese Fraktion detailliert dargestellt, in welchem Maße die jeweilige Modifikation in den beiden Proben vorkam.

22,4% aller mit H3K27me3 modifizierten Promotoren wiesen diese Modifikation ausschließlich in Erwachsenen auf, während 17,3% der so modifizierten Promotoren die repressive Markierung ausschließlich in HPC aus Neugeborenen besaßen. Ca. 60% der Promotoren waren sowohl in Apheresat, als auch in Nabelschnurblut mit H3K27me3 markiert. Bei der Mehrzahl dieser Promotoren überwog die repressive Markierung in Apheresat (Abb. 21 B).

Interessanterweise ließen sich dieselben Effekte sogar verstärkt bei H3K4me3 beobachten. Auch hier war die Markierung stärker in HPC von Erwachsenen als in solchen von Neugeborenen vorhanden. 56,9% aller mit H3K4me3 modifizierten Promotoren wiesen die

Ergebnisse

Markierung ausschließlich in Erwachsenen auf, während nur 5,5% der modifizierten Promotoren die Markierung ausschließlich in HPC aus Nabelschnurblut zeigten. Beinahe immer (96,5% der Fälle), wenn die aktivierende Markierung an ein und demselben Promotor in beiden Proben zu finden war, überwog sie in Erwachsenen (Abb. 21 D).

Die Menge an Promotoren mit bivalenten Histonmodifikationen war in beiden Proben ähnlich. So wiesen in HPC aus Erwachsenen 147 (3,0%) der Promotoren an denen modifizierte Histone gefunden wurden beide Histonmodifikationen auf, während in HPC aus Neugeborenen mit 130 Promotoren ca. 4,1% aller modifizierten Promotoren sowohl H3K27me3 als auch H3K4me3 aufwiesen (Abb. 22).

Betrachtet man die Verteilung der Histonmodifikationen innerhalb der jeweiligen Proben, so fällt auf, dass in HPC aus Nabelschnurblut mit ca. 56% der Anteil an Promotoren, die die reprimierende Histonmodifikation trug überwog, während sich die Verhältnisse in Apheresat genau entgegengesetzt darstellten (Abb. 22).

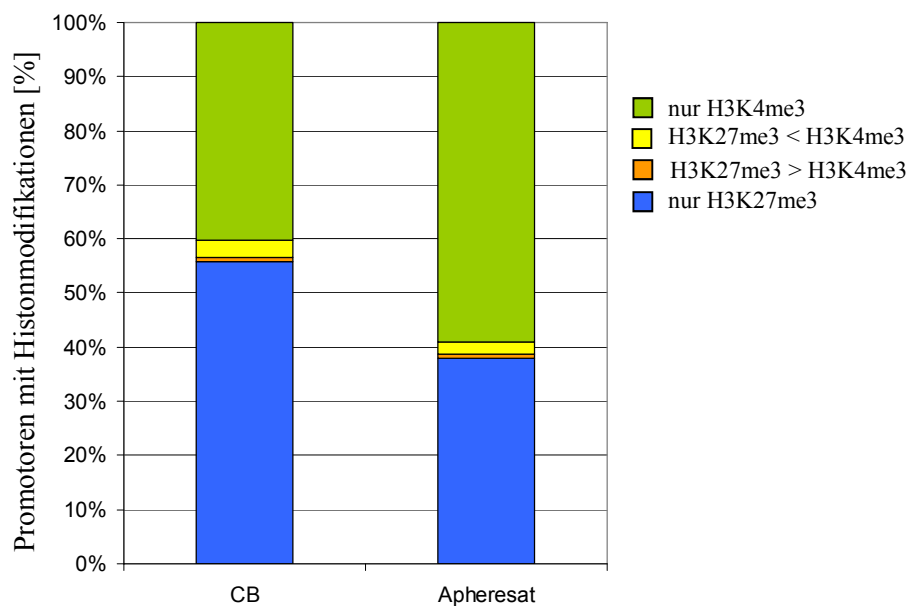


Abb. 22: Verteilung der mit H3K27me3 und/oder H3K4me3 modifizierten Promotoren innerhalb der untersuchten Proben.

Für Nabelschnurblut (CB) und Apheresat wurden jeweils die Anteile der beiden Histonmodifikationen an der Gesamtmenge der modifizierten Promotoren ermittelt.

5.4.2 Assoziation der modifizierten Promotoren mit zellulären Prozessen

Um zu ermitteln, ob Gene, die mit einer der beiden Histonmodifikationen assoziiert waren, distinkten zellulären Prozessen zuzuordnen sind, wurden *Gene Ontology* (GO)-Analysen über die DAVID-Plattform [247,248] durchgeführt.

In HPC aus Nabelschnurblut waren viele verschiedene Kategorien, die allgemeinen Zellfunktionen wie Transport, Signalweiterleitung, Transkription oder Adhäsion zugeordnet werden können, mit einer der beiden Markierungen assoziiert. Es konnte jedoch keine definitive Kategorie identifiziert werden, die eine bestimmte Modifikation nur in Nabelschnurblut aufwies. Dagegen fielen die Ergebnisse für HPC aus Apheresat eindeutiger aus. Auch hier waren allgemeine Zellfunktionen mit beiden Histonmodifikationen assoziiert. Zusätzlich waren hier jedoch auch auffällig viele Gene, die für die Entwicklung bzw. Differenzierung zuständig sind, mit einer der beiden Modifikationen assoziiert. Hierbei gab es allerdings bedeutende Unterschiede. So waren Gene, die für die Differenzierung in Richtung Hämatopoese wichtig sind, mit der aktivierenden Histonmodifikation H3K4me3 besetzt, während solche, die für andere Differenzierungslinien wichtig sind, die repressive Histonmodifikation H3K27me3 aufwiesen (Abb. 23 A-D), sodass ältere HPC vermutlich eine geringere Plastizität aufweisen, als jüngere.

Weiterhin zeigte sich in HPC von Erwachsenen, dass Gene, die zu *Apoptosepathways* gehören verstärkt H3K4me3 aufwiesen. Dies galt sowohl für Gene, die ausschließlich mit H3K4me3 modifiziert waren, als auch für solche, die bivalente Modifikationen aufwiesen (Abb. 23 A, C). Bei HPC aus Nabelschnurblut fanden sich keinerlei Apoptose-relevante *Pathways* mit einer oder beiden Modifikationen assoziiert. Das verstärkte Vorliegen von H3K4me3 an Promotoren von apoptoserelevanten Genen in HPC aus Erwachsenen deutet darauf hin, dass diese leichter aktiviert werden können als in HPC aus Nabelschnurblut, sodass hier vermutlich schon geringfügige externe Trigger Apoptose induzieren könne.

Ein weiterer interessanter Punkt ist, dass in HPC aus Erwachsenen *Pathways*, die mit Ubiquitinierung und damit mit Proteinabbau in Verbindung stehen im Vergleich zu HPC aus Nabelschnurblut verstärkt H3K4me3 aufwiesen (Abb. 23 A, C). Da im Zuge der Alterung beschädigte und fehlgefaltete Proteine in den Zellen akkumulieren [22,23], benötigen ältere HPC verstärkt die Ubiquitinierungsmaschinerie, die es ihnen ermöglicht zuverlässig die Proteine für den Abbau zu markieren.

Für die bivalenten Gene wurden bei beiden Proben aufgrund der relativ geringen Anzahl an Genen nur wenige assoziierte *Pathways* gefunden. Bei Nabelschnurblut beschränkten sich diese in erster Linie auf Gene, die für die Zelladhäsion wichtig sind, während sie bei

Apheresat ein breiteres Spektrum umfassten zu dem u.a. die apoptoserelevanten Gene, aber auch solche, die im Phosphatstoffwechsel oder im Zellzyklus eine Rolle spielen, zählten (Abb. 23 E).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass nicht nur quantitativ mehr modifizierte Histone in HPC aus Erwachsenen vorliegen, die qualitative Verteilung der besetzten Promotoren unterscheidet sich in beiden Altersgruppen ebenfalls und deutet darauf hin, dass HPC mit der Alterung an Plastizität verlieren. Durch die verstärkte H3K27-Trimethylierung an nicht-hämatopoieserelevanten Genen werden diese Entwicklungswege reprimiert, während durch H3K4me3 an Promotoren von hämatopoieserelevanten Genen diese Entwicklungsrichtung gefördert wird. Bei den zusätzlich auftretenden Veränderungen, die vermutlich die Apoptoseschwelle herabsetzen und die Ubiquitinierung von fehlgefalteten Proteinen fördern, kann es sich um allgemeine Alterungsphänomene handeln, die einen Schutz vor Entartung bieten.

Ergebnisse

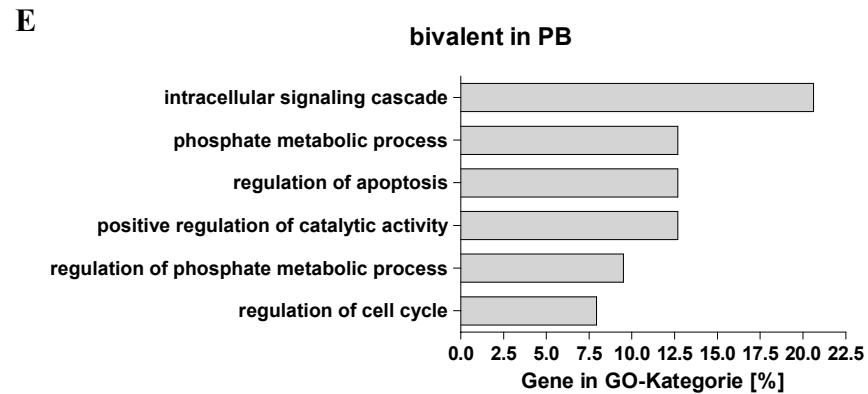
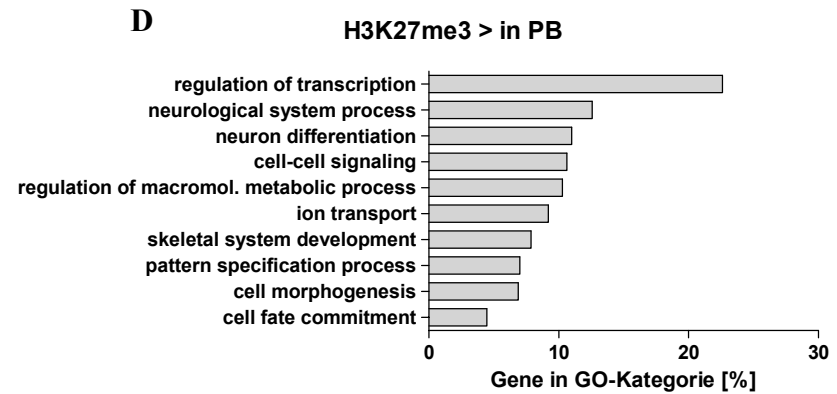
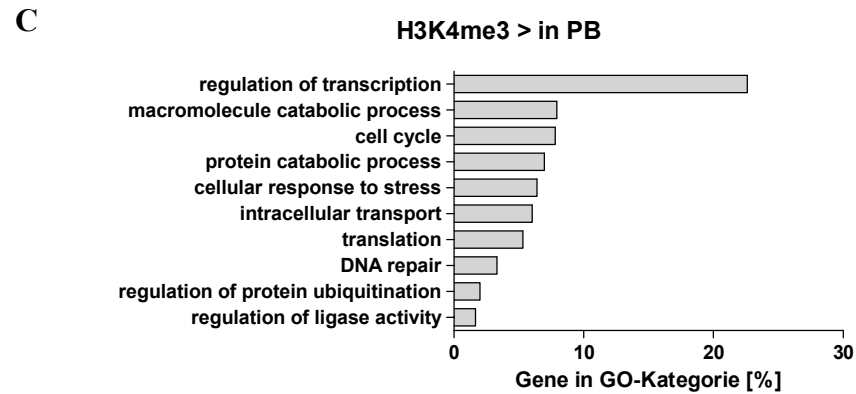
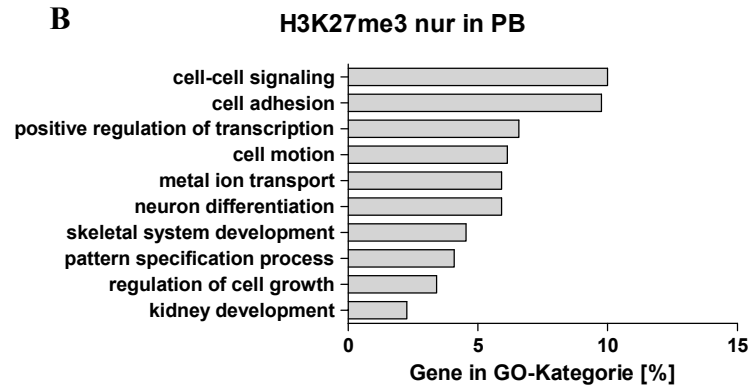
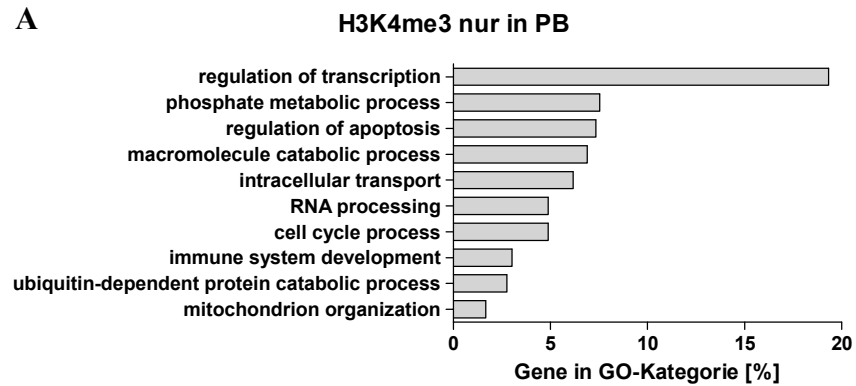


Abb. 23: Einordnung der modifizierten Gene in GO-Kategorien.

Mit Hilfe der DAVID-Plattform wurden alle Gene, die nur in Apheresat mit H3K27me3 oder H3K4me3 modifiziert waren, sowie diejenigen, die eindeutig in Apheresat eine der beiden Markierungen stärker als in Nabelschnurblut aufwiesen und solche, die ausschließlich in Apheresat bivalent waren, analysiert. Es wurden nur Gene analysiert, bei denen das NimbleGen Signal eindeutig dem jeweiligen Promotor zugeordnet werden konnte. Bivalente Gene wurden in den Analysen der einzelnen Histonmodifikationen nicht berücksichtigt. Wenn eine Modifikation sowohl in Apheresat als auch in Nabelschnurblut an demselben Promotor vorhanden war, wurde sie nur dann als stärker in Apheresat gewertet, wenn der Quotient zwischen den beiden Proben mindestens 1,2 betrug. Für die Einzelmodifikationen sind jeweils zehn Kategorien dargestellt, die einen signifikanten Anteil an Genen ($p\text{-value} < 0,001$), die die entsprechende Modifikation aufwiesen, beinhalten. Im Falle der Gene, die in Apheresat bivalent sind, sind sechs Kategorien dargestellt, die einen signifikanten Anteil an Genen ($p\text{-value} < 0,05$), die die entsprechende Modifikation aufwiesen, beinhalten.

5.4.3 Eine Gruppe alters- und krebsassoziierter Polycomb Zielgene weist in Erwachsenen verstärkt H3K27me3 auf

Vor einiger Zeit konnte von Teschendorff *et al.* für humane Blutzellen eine altersassoziierte DNA Hypermethylierung an einigen *Polycomb Group Target* (= Ziel) Genen (PCGT) nachgewiesen werden, welche im Gegensatz zu der im Alter beobachteten globalen DNA Hypomethylierung steht [105]. Die zu diesem Zweck untersuchten Polycomb Zielgene wurden aufgrund der publizierten Bindung von mindestens EED oder SUZ12 oder dem Vorliegen von H3K27me3 in humanen ES-Zellen als solche definiert [105,206]. PCGTs, die im Alter auf DNA-Ebene stark methyliert waren, waren auch in Eierstockkrebszellen häufig hypermethyliert im Vergleich zu gesunden Zellen und die betroffenen Gene wurden in den Krebszellen schwächer exprimiert als in gesunden Zellen. Daneben bestätigen Daten von Cui *et al.*, dass die betreffenden Promotoren nicht nur in ES-Zellen, sondern auch in HSC Polycomb Ziele darstellen [105,126].

63 der 64 in dieser Studie definierten altersassoziierten PCGTs konnten auch mit unserem NimbleGen Array untersucht werden. 46 davon waren wenigstens in einer der beiden Proben mit einer oder beiden Histonmodifikationen assoziiert. Von diesen wiesen 43 Promotoren (93,5%) in HPC von Erwachsenen mehr H3K27me3 auf, als in HPC aus Neugeborenen (Abb. 24). Neun Loci waren sogar nur in HPC aus Erwachsenen und nicht in denen aus Nabelschnurblut mit H3K27me3 assoziiert (Abb. 24). Somit korrelieren die Daten dieser Arbeit mit den Ergebnissen von Teschendorff *et al.* Die meisten der von Teschendorff *et al.* definierten altersassoziierten PCGTs haben demnach auch in HPC von älteren Probanden, und nicht nur in differenzierten Leukozyten, ein deutlich reprimiertes epigenetisches Profil im Vergleich zu denen aus Nabelschnurblut. Außerdem erstreckt sich die Repression über die

Ergebnisse

DNA-Methylierung hinaus auf die Polycomb vermittelte repressive Histonmodifikation H3K27me3.

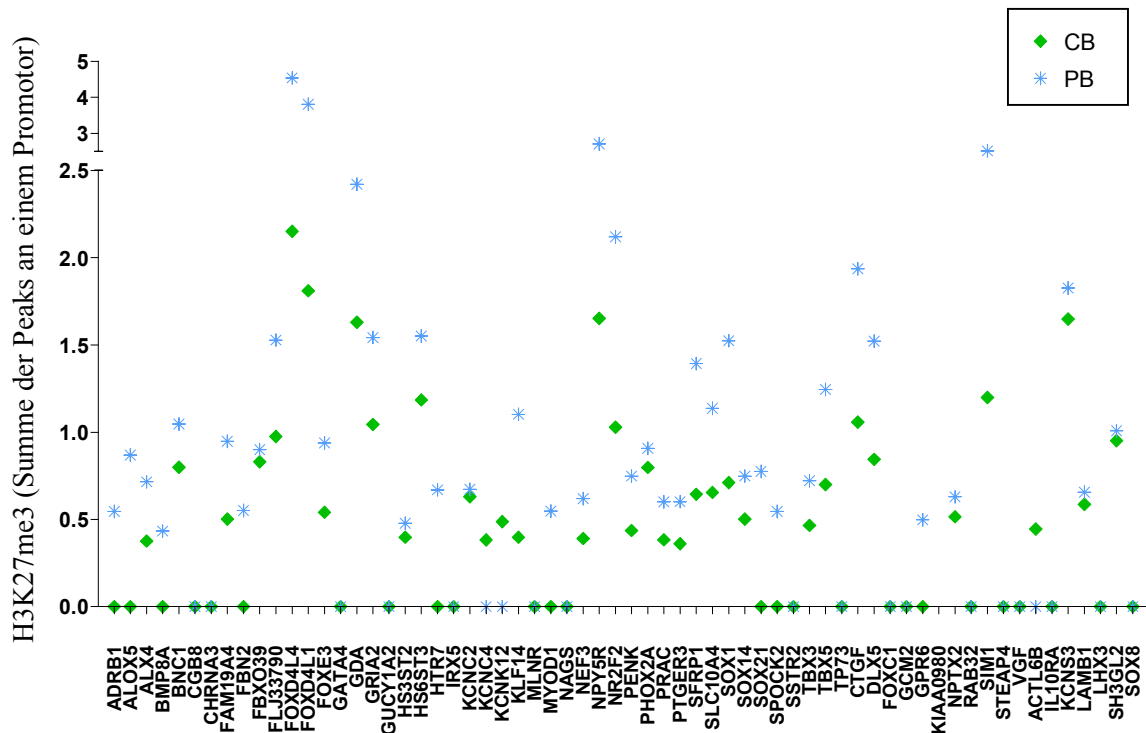


Abb. 24: H3K27me3 an den von Teschendorff *et al.* definierten altersassoziierten *Polycomb Group Target Genen* (PCGTs) in HPC aus Nabelschnurblut (grüne Rauten) und aus Apheresat (blaue Sterne).

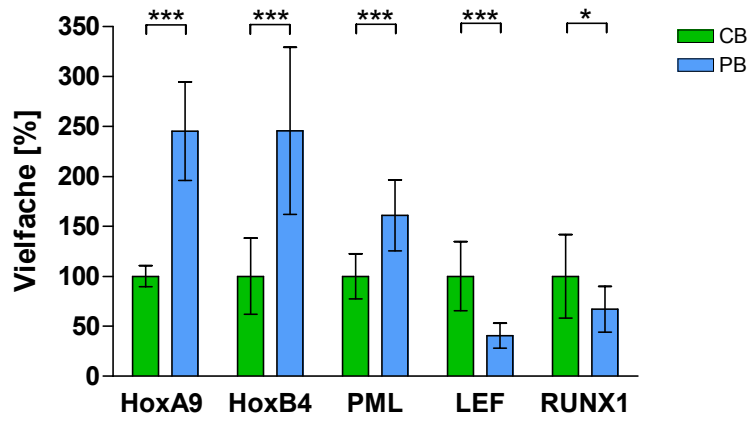
Mittels ChIP-on-chip Analyse wurde die Verteilung von H3K27me3 an den Promotoren der beschriebenen altersassoziierten PCGTs untersucht. Dargestellt ist jeweils die Summe der Intensitäten aller Peaks, die eindeutig dem entsprechenden Promotor zugeordnet werden konnten. Es wird deutlich, dass an den altersassoziierten PCGTs in den meisten Fällen die Stärke der Peaks in Apheresat die in Nabelschnurblut übertrifft.

5.4.4 Detailanalyse ausgewählter Gene

Um festzustellen, ob die beobachteten Änderungen bezüglich der Histonmodifikationen zwischen HPCs von jungen und alten Donoren sich auch in der Genexpression widerspiegeln, wurde die Transkriptmenge ausgewählter hämatopoieserelevanter Gene untersucht und mit der jeweiligen Detailanalyse der Histonmodifikationen im Promotorbereich verglichen. Hierbei zeigte sich, dass die Veränderungen der Histonmodifikationen meistens mit denen auf Transkriptebene korrelierten (Abb. 25).

Ergebnisse

A



B

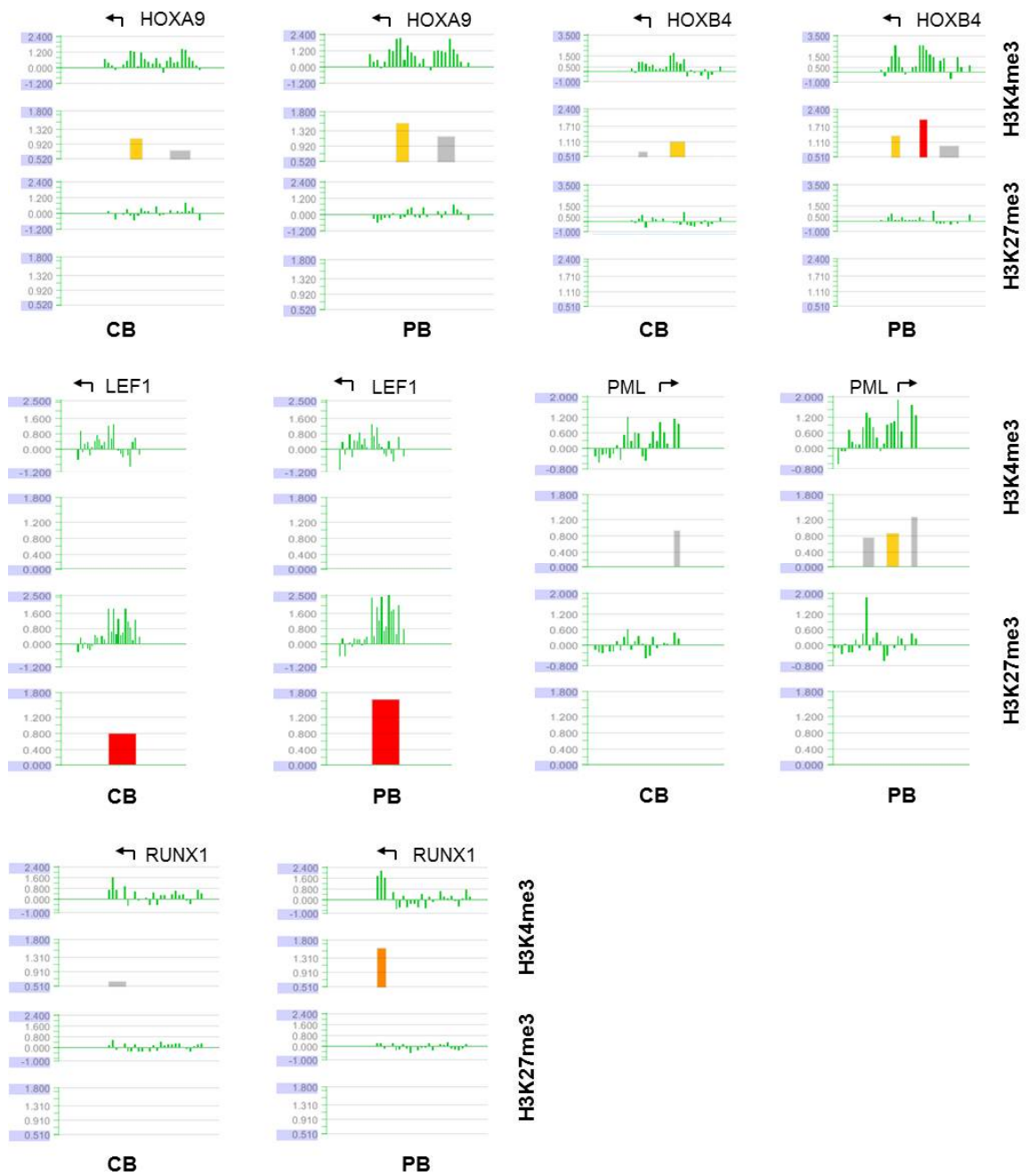


Abb. 25: Expression (A) und Histonmodifikationen (B) verschiedener hämatopoietischer Transkriptionsfaktoren in CD34⁺ HPC von Neugeborenen (CB) und Erwachsenen (PB).

(A) RNA wurde aus drei CB Proben (grün) und vier Apheresaten (blau, durchschnittliches Alter: 46 Jahre) isoliert und die Genexpression mittels Real-Time RT-PCR bestimmt und auf *GAPDH* normiert. Anschließend wurden mit der $2^{-\text{ddCT}}$ Methode Vielfache in Bezug auf Nabelschnurblut bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte und die jeweiligen 95% Konfidenzintervalle. Die Signifikanz wurde mittels T-Test berechnet (***) = $p < 0,001$; * = $p < 0,05$). (B) Für die Detailanalysen der Histonmodifikationen an den entsprechenden Promotoren wurden die NimbleGen Daten mit SignalMap v 1.9 analysiert. Für jedes Gen sind links die Werte für Nabelschnurblut und rechts die für Apheresat dargestellt. Jeweils im oberen Teil der Abbildung ist die Verteilung der Signale für H3K4me3 dargestellt, im unteren Teil die für H3K27me3. Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurden die einzelnen Signale (grüne Balken) bei ausreichender Intensität jeweils darunter zu Peaks zusammengefasst (vgl. 4.2.2.8.4). Hierbei ist die Farbgebung der Peaks ein Indikator für die jeweilige *false discovery rate*. Diese nimmt von grau über gelb und orange nach rot hin ab. Die Lage des Transkriptionsstarts und die Transkriptionsrichtung sind jeweils durch einen Pfeil angedeutet.

Von besonderem Interesse sind hier die beiden Transkriptionsfaktoren *LEF1* und *PML*, die eine entscheidende Rolle in der Lymphopoese bzw. Myelopoese spielen [303-310]. Im Zuge der Alterung wurde wiederholt beschrieben, dass die Lymphopoese zu Gunsten der Myelopoese abnimmt [68,69,71,72]. Eine mögliche Ursache hierfür spiegelt sich in den Transkriptionsmengen dieser beiden Faktoren wider. Während *LEF1*, der Faktor, der die Lymphopoese fördert, in HPC aus Adulten schwächer exprimiert wurde und deutlich mehr H3K27me3 im Promotorbereich aufwies als in HPC aus Nabelschnurblut, nahm die Expression von *PML*, begleitet von einer Erhöhung der aktivierenden Histonmodifikation H3K4me3 im Promotorbereich, im Zuge der Alterung zu.

Ebenso nahm die Expression ausgewählter *HOX* Gene (*HOXA9* und *HOXB4*) in adulten HPC zu, während bei beiden Genen auch verstärkt H3K4me3 im Promotorbereich zu finden war. Einzig bei *RUNX1* entsprach die reduzierte Transkription in adulten HPC nicht der Beobachtung auf Ebene der Histonmodifikationen, was zeigt, dass neben Histonmodifikationen auch andere Faktoren an der Regulation der Expression beteiligt sind.

5.5 Etablierung von Systemen zur Überexpression und Herabregulation von EED

5.5.1 Analyse der humanen *EED* mRNA Sequenz

Um die Effekte von EED auf die Hämatopoiese genauer zu untersuchen, wurden Modellsysteme entwickelt, anhand derer die Auswirkungen einer Überexpression sowie einer Herabregulation von EED analysiert werden konnten. Dazu war es essentiell, zunächst genaue Informationen über den Aufbau des EED Proteins und die zugehörige mRNA zu erhalten. Von *EED* sind bislang zwei unterschiedliche Splicevarianten bekannt. Diese unterscheiden sich im 3' Bereich [150], wobei die längere Variante ein vorzeitiges Stoppcodon beinhaltet, dessen Nutzung zu einem trunkierten, inaktiven Protein führt (vgl. 3.2.3.1.1). Beide Varianten haben jedoch den gleichen 5' Bereich der mRNA. Dieser ist insofern besonders, als dass er vier unterschiedliche Startcodons aufweist, die alle verwendet werden und sich in funktionalen Proteinen widerspiegeln (vgl. 3.2.3.1.1) [152,154]. Die diesbezüglich in der Literatur vorhandenen Untersuchungen wurden allerdings alle im murinen System durchgeführt und offenbarten Zweifel in Bezug auf die genaue Startposition von Eed1 [149]. Eine genaue Analyse der humanen mRNA Sequenzen im Vergleich mit der murinen Sequenz zeigte jedoch, dass die für die Maus beschriebenen Translationsstarts nicht vollständig auf das humane System übertragen werden können, obwohl das humane und das murine EED Protein größtenteils identisch sind (Abb. 26 A) [153].

Ergebnisse

A

```

NM_003797      CTAGCAGCGGGTCTGGAGATCGAAGGAACGGGCCAATTGCGGCTGAAACGCTCTTTGGAAGG 60
NM_152991.1   CTAGCAGCGGGTCTGGAGATCGAAGGAACGGGCCAATTGCGGCTGAAACGCTCTTTGGAAGG 60
Maus          -----GCGGGTCTGGAGATCGAAGGATTGAGCCAATTGCGGATGAAACGCTCTTGCCAGG 54
              ***** * ***** * ***** * *****

NM_003797      AGGAAGGGGGTGAGGGAGCATCCCTTTGAGTTTCGCCTCTTCTCGAGGCGGTGGTGGG-A 119
NM_152991.1   AGGAAGGGGGTGAGGGAGCATCCCTTTGAGTTTCGCCTCTTCTCGAGGCGGTGGTGGG-A 119
Maus          A--AGGGGGTGAGGGAGCAGCCCTTTGAGTTCCGCCTCGTCTCTAGGCGCTGGTGGGGA 111
              * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** *
              Startcodon
              G D I L N T A L L I Q R T L H R V D EED1 Maus

NM_003797      AGGGAGACATACTTAATACTGCCCTCTTAATCCAACGGACCTTACATC---GTGTAGACT 176
NM_152991.1   AGGGAGACATACTTAATACTGCCCTCTTAATCCAACGGACCTTACATC---GTGTAGACT 176
Maus          AGGGGACGTAGGAAAACCCCTGCCCTCTGAGCCAGCAGATCCGACGCTCGGTGCAAGT 171
              **** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
              Startcodon
              C R E G G G K R A R R E L G K G R S Q E EED1 human?

NM_003797      GCGGGAGGGCGGCGGAAAAGGGCAAGACGGAGTTGGGAAGGGAAGGAGCCAGGAAG 236
NM_152991.1   GCCGGGAGGGCGGCGGAAAAGGGCAAGACGGGAGTTGGGAAGGGAAGGAGCCAGGAAG 236
Maus          GTCGAGAGGGCGGCGGAAAACCGCCCGCCCGACCAAGGGACGGGAAGCAGCCGGGAAG 231
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
              Startcodon
              A A R E G A R A R P F F S S V36 A G S H A EED2

NM_003797      CCGCGGGAGGGCGGCGCGCG--CGCGCCCTTTTTCAGCAGTGTGGCGGGTTCGCACGC 294
NM_152991.1   CCGCGGGGAGGGCGCGCGCGCG--CGCGCCCTTTTTCAGCAGTGTGGCGGGTTCGCACGC 294
Maus          CCGTGGGGGAGGGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCG 291
              *** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

              R P P R R L G A I C D S G G G G G G G G
NM_003797      ACGCCCGCTCGGCGGCTGGGCGCGAATTGCGACAGTGGGGGGGGCGGTGGAGGTGGCGG 354
NM_152991.1   ACGCCCGCTCGGCGGCTGGGCGCGAATTGCGACAGTGGGGGGGGCGGTGGAGGTGGCGG 354
Maus          ACGCCCGCTCGGCGGCTGGGCGCGAATTGCGACAGTGGGGGGGGCGGCGGCGGTGGCGG 351
              ***** * * *****

              G S G N F A A S S G R A C L T A V W R R
NM_003797      CGGCAGCGGCAACTTTGCGGCAAGCTCGGGCGGGCTTGCTTGACGGCGGTGGCGGAG 414
NM_152991.1   CGGCAGCGGCAACTTTGCGGCAAGCTCGGGCGGGCTTGCTTGACGGCGGTGGCGGAG 414
Maus          CGCC---GGCAGCTTTGCGGCAAGCTCGGGCGGGCGGTGCTTGACGGCGGTGGCGGAG 408
              * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
              Startcodon
              P R P R R Q E P G G R R R N M95 S E R E V EED3

NM_003797      GCCCCGCCAGGCGGCAGGAACCTGGAGGGAGGCGGAGGAATATGTCGAGAGGGGAAGT 474
NM_152991.1   GCCCCGCCAGGCGGCAGGAACCTGGAGGGAGGCGGAGGAATATGTCGAGAGGGGAAGT 474
Maus          GCCCCGCCAGGCGGCAGGAACCTGGAGGGAGGCGGAGGAACATGTCGAGAGGGGAAGT 468
              ***** * * *****
              Startcodon
              S T A P A G T D M109 EED4

NM_003797      GTCGACTGCGCCGGCGGGAACAGACATGCTCGGCCAAGAAGCAGAAGCTGAGCAGTGA 534
NM_152991.1   GTCGACTGCGCCGGCGGGAACAGACATGCTCGGCCAAGAAGCAGAAGCTGAGCAGTGA 534
Maus          GTCGACTGCGCCGGCGGGAACAGACATGCTCGGCCAAGAAGCAGAAGTTGAGCAGCA 528
              ***** * * *****

```

B

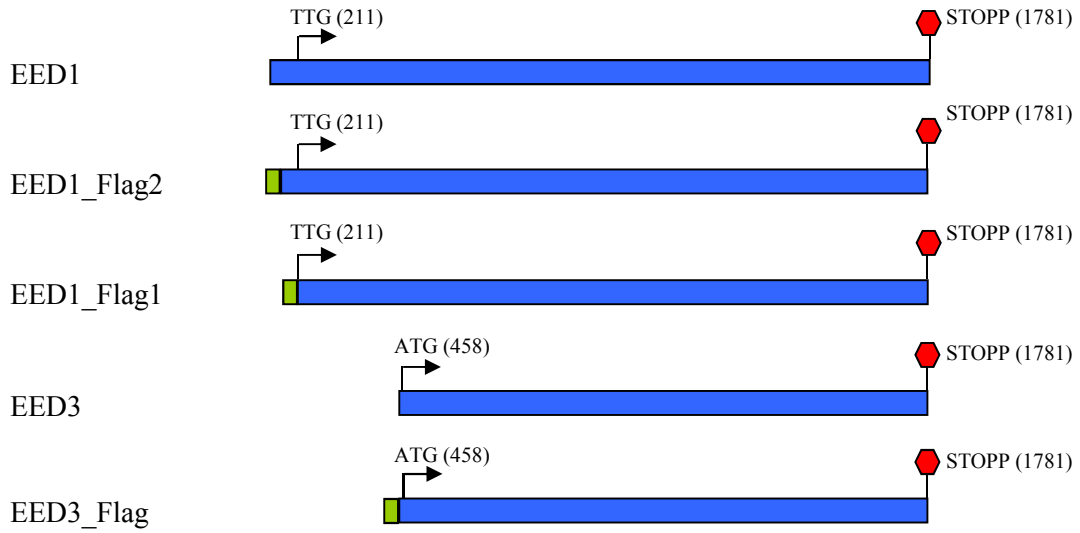


Abb. 26: Überblick über die verschiedenen *EED*-Überexpressionskonstrukte.

Im oberen Teil der Abbildung (A) ist ein Ausschnitt aus dem 5' Bereich eines Alignments beider humaner *EED* mRNAs mit einer der murinen *Eed* mRNAs dargestellt. Der Anfang der humanen Proteinsequenz wurde manuell hinzugefügt. Zur einfacheren Verfolgung des Leserasters wurden die Codons in der oberen Sequenz bis zum Startcodon von *EED3* abwechselnd in schwarz und blau dargestellt. Die unterschiedlichen Startcodons sind in rot markiert. Die exakte Lage des Startcodons für das humane *EEDI* ist nicht bekannt, vermutlich ist es das TTG an Position 211. Die Positionen der für die Klonierung verwendeten *sense* Primer sind als Pfeile dargestellt. Im unteren Teil der Abbildung (B) sind die einzelnen *EED*-Konstrukte in der Reihenfolge der verwendeten Primer schematisch dargestellt. Alle Konstrukte enden mit dem Stoppcodon der funktionalen *EED*-Variante, beginnen jedoch an bzw. kurz vor dem jeweils angegebenen Startcodon, dessen Position in der jeweiligen Sequenz durch einen Pfeil verdeutlicht wurde. Die bei einigen Sequenzen eingefügten Flag Tags sind in grün dargestellt.

Im murinen System wurden vier Translationsstarts beschrieben: V₁, V₃₆, M₉₅ und M₁₀₉, wobei nur bei den beiden Methioninen ein klassisches Startcodon (ATG) vorliegt. Die beiden Valine werden von alternativen Startcodons codiert [151,152]. Betrachtet man nun das Alignment der humanen und der murinen *EED* mRNA, so erkennt man, dass sich kurz vor dem V₃₆ das Leseraster verschiebt (

Abb. 26 A). Die entsprechenden Proteinsequenzen sind stromaufwärts von der Verschiebung des Leserasters nicht identisch. Diese Leserasterverschiebung hat zur Folge, dass es stromaufwärts vom GTG an Position 278 in der humanen mRNA Sequenz, die für V₃₆ codiert, kein weiteres GTG gibt, das als Startcodon für *EEDI* dienen könnte. Das einzige alternative Startcodon hier ist TTG an Position 211, das für ein Leucin codiert [311].

5.5.2 Analyse der *EED* 5' Region mittels 5' RACE

Da bis heute nicht bekannt ist, wo sich der Promotor von *EED* genau befindet, und wo der Startbereich für *EED1*, die längste Proteinvariante, liegt, sollte dieser Bereich mittels 5' RACE eingegrenzt werden. Entgegen der Erwartung, dass es nur einen *EED*-Promotor gibt, lieferte das 5' RACE-Verfahren drei verschiedene, klar getrennte Banden, die auf unterschiedliche Promotorbereiche hindeuten. Die Sequenzierung der Banden ergab allerdings, dass es sich nur bei zweien um putative Promotorbereiche handelt. Die dritte Bande entspricht der Amplifikation des *EED*-Pseudogens.

Ergebnisse

```

-601   TTGGCGTAGTTTCAGGGCCTATCCTTTAGCAGCTAAAAAGAGCACTTTGGC
-551   TGTAACTCATTGGAGTCTAGTCTCATAATGTTAGGATATTTCTATTTAAG
-501   TCTTAACCACTATTGGTAGCAACTGGAAGGATAATCATTCAATACAATAA
-451   ATAGTCAACAGAATAAATATCCGACAAGAATTTACGAAGCGTCTAGAGTA
-401   TAATTGGTAGCGCTTTGAAATCCACCCGGGATTGGAAACCGGGTAGA
-251   AAACACTCTGGTTTCAGCAAAAGAGAATCAAACAGAGGAGGGGCTTGGA
-301   GAGGCGGGTTTCGACGAACCCAGCGCAAGAGTACGCCACGGCGCCTGGC
-251   ATCCCCTGACCGGTACTTTCCATTGCCAGATGGGGGAAGCCAGGGGGAA
-201   GCAGTTACTGTTTTTGCATTTCTATCTTCAAGGAAGAATTAGGTTATGA
-151   ATAGTTCCGTGAATAGTCAGGAAGCGCTGTCTCCAAGTTCAAGATTAAG
-101   GAAACGTGGCATGCACAGCTAAAGCAAGAGGTGACGTCTTGTATCTTCCC
-51    CCGTTTCTGGGACATTGGTGGTGTAGCCCATTCACAGACTTTCCGCTCC
1      CTAGCAGCGGGTCGGAGATCGAAGGAACGGGCCAATTGGGCTGAAAAGT
51     CTTTGAAGGAGGAAGGGGGTGAGGGAGCATCCCTTTGAGTTTCGCTCT
101    TCTCGAGGCGGTGGTGGGAAGGGAGACATACTTAATACTGCCCTCTTAAT
151    CCAACGGACCTTACATCGTGTAGACTGCCGGGAGGGCGGCGGGAAAAGGG
201    CAAGACGGGAGTTGGGGAAGGGAAGGAGCCAGGAAGCCGCGCGGGAGGGC
251    GCGCGCGCGCGCCCTTTTTCAGCAGTGTGGGGTCCGACGCACGCCCC
301    GCCTCGGCGGCTGGGCGCGATTTGCGACAGTGGGGGGGGCGGTGGAGGTG
351    GCGGCGGCAGCGGCAACTTTGCGGCAAGCTCGGGCCGGGCTTGCTTGACC
400    GCGGTGTGGCGGAGGCCCGCCCCAGGCGGCAGGAACCTGGAGGGAGGCG
451    GAGGAATATGTCAGAGGGGAAGTGTGACTGCGCCGGCGGGAACAGACA
501    TGCCTGCGGCCAAGAAGCAGAAGCTGAGCAGTGACGAGAACAGCAATCCA
551    GACCTCTCTGGAGACGAGAATGTAAGTGCAGCTTCTGGCAGTTACGAGAC

```

EED 1?

EED 2

EED 3,4

Abb. 27: *In silico* Analyse des ersten Exons von *EED* (blau) sowie des angrenzenden genomischen 5' Bereichs (schwarz).

CpG Dinukleotide sind in orange dargestellt. Die Startcodons für EED2-4 sind rot markiert und unterstrichen, das putative Startcodon für EED1 ist nur rot markiert. Die grünen Abschnitte stellen die unterschiedlichen, mit 5' RACE ermittelten, putativen Transkriptionsstarts dar. Der von Proscan vorhergesagte Promotorbereich ist kursiv gedruckt, die unterschiedlichen von der NNPP v. 2.2 vorhergesagten möglichen Promotorregionen sind in lila markiert.

Wie in Abb. 27 dargestellt, befinden sich die beiden putativen Transkriptionsstarts, die mit 5' RACE ermittelt wurden (in der Sequenz grün umrahmt) stromaufwärts von dem ATG, das das Startcodon für EED3, die hauptsächliche EED-Variante, darstellt. Nur einer der beiden putativen Transkriptionsstarts schließt auch das GTG mit ein, das als Startcodon für EED2 dienen könnte. Das putative Startcodon für EED1 liegt jedoch noch weiter stromaufwärts. Um zu überprüfen, ob es sich bei den ermittelten putativen Transkriptionsstarts tatsächlich um Promotoren handeln kann, wurden *in silico* Promotoranalysen mit verschiedenen Programmen durchgeführt. Der von Proscan vorhergesagte Promotorbereich (kursiv dargestellt) umfasst genau den Bereich, der mittels 5' RACE als der weiter stromaufwärtsliegende putative Transkriptionsstart ermittelt wurde. Im gesamten Bereich um die beiden in Frage kommenden Transkriptionsstarts wurden mittels *Neural Network Promotor Prediction* (NNPP) v.2.2 unterschiedliche mögliche Promotorbereiche identifiziert. Hinzu kommt eine Häufung von CpG Dinukleotiden um die entsprechenden mit 5' RACE identifizierten Bereiche herum, sowie auch im 5' gelegenen genomischen Bereich. Die hohe Dichte der CpG-Dinukleotide

erfüllt die Voraussetzungen für das Vorliegen einer CpG-Insel [153], was ebenfalls nahe legt, dass in den entsprechenden Bereichen Promotoraktivität vorliegen könnte.

5.5.3 Herstellung verschiedener Überexpressionskonstrukte

Aufgrund dieser Analysen wurden verschiedene Überexpressionskonstrukte hergestellt (vgl. Abb. 26 B). Eines beginnt direkt beim ATG (Position 458) von EED3, sodass hier eine Überexpression von EED3 und 4 erfolgen sollte. Dieses wurde sowohl mit als auch ohne Flag Tag hergestellt. Da stromaufwärts von EED1 kein direkter Hinweis auf einen Promotor gefunden wurde, wurden hier drei Konstrukte hergestellt, die sich in der Länge ihres 5'-Bereichs unterscheiden. Eines beginnt direkt bei dem TTG (Position 211), das als Startcodon für EED1 in Frage kommt (EED1_Flag1), eines beginnt in dem Bereich, in dem sich bei der Maus das Startcodon für EED1 befindet (Position 171, EED1_Flag2). Beide wurden mit einem Flag Tag versehen. Bei beiden Varianten sollte in erster Linie ein Protein entstehen, das mit dem Flag Tag beginnt, da dieser zusätzlich zum ATG mit einer Kosak Sequenz versehen wurde, um den Translationsstart am Anfang des Tags zu stärken. Daneben sollten auch die anderen EED-Varianten synthetisiert werden. Ein weiteres Konstrukt beginnt stromaufwärts (Position 138) von den beiden anderen Transkripten und wurde ohne Flag Tag kloniert, sodass hier frei jeder Transkriptionsstart von der Zelle gewählt werden kann (EED1). Somit sollten hier vier EED-Varianten überexprimiert werden. Ein Vergleich der längsten EED-Variante mit den beiden Flag getaggen Varianten sollte dann Aufschluss auf den tatsächlichen Start von EED1 geben.

5.5.3.1 Test der EED-Überexpression in Zelllinien

Zunächst wurden die verschiedenen *EED*-Varianten in unterschiedlichen Zelllinien lentiviral überexprimiert. In den Lymphozytenlinien Jurkat, NK3.3 und K562 war keinerlei Änderung im Wachstumsverhalten der infizierten Zellen zu beobachten. Bei allen Zelllinien konnte für alle *EED*-Varianten eine starke Überexpression auf mRNA Ebene nachgewiesen werden (Abb. 28 A-C). Hierbei war zu beobachten, dass die jeweilige *EED*-Variante mit einem Flag Tag immer stärker exprimiert wurde, als die entsprechende Variante ohne Tag. Interessanterweise war das Verhältnis der Expressionsstärken der einzelnen *EED*-Varianten zueinander von Zelllinie zu Zelllinie unterschiedlich. So wurde *EED3_Flag* in NK3.3 und K562 am stärksten exprimiert, während in Jurkat *EED1_Flag2* die höchste Expression aufwies.

Ergebnisse

Bei der Betrachtung der anderen beiden Mitglieder des PRC2 zeigten sich, entgegen der Erwartungen aus der Literatur [138,147], keine mit *EED* gleichgerichteten Änderungen in der Expressionsstärke.

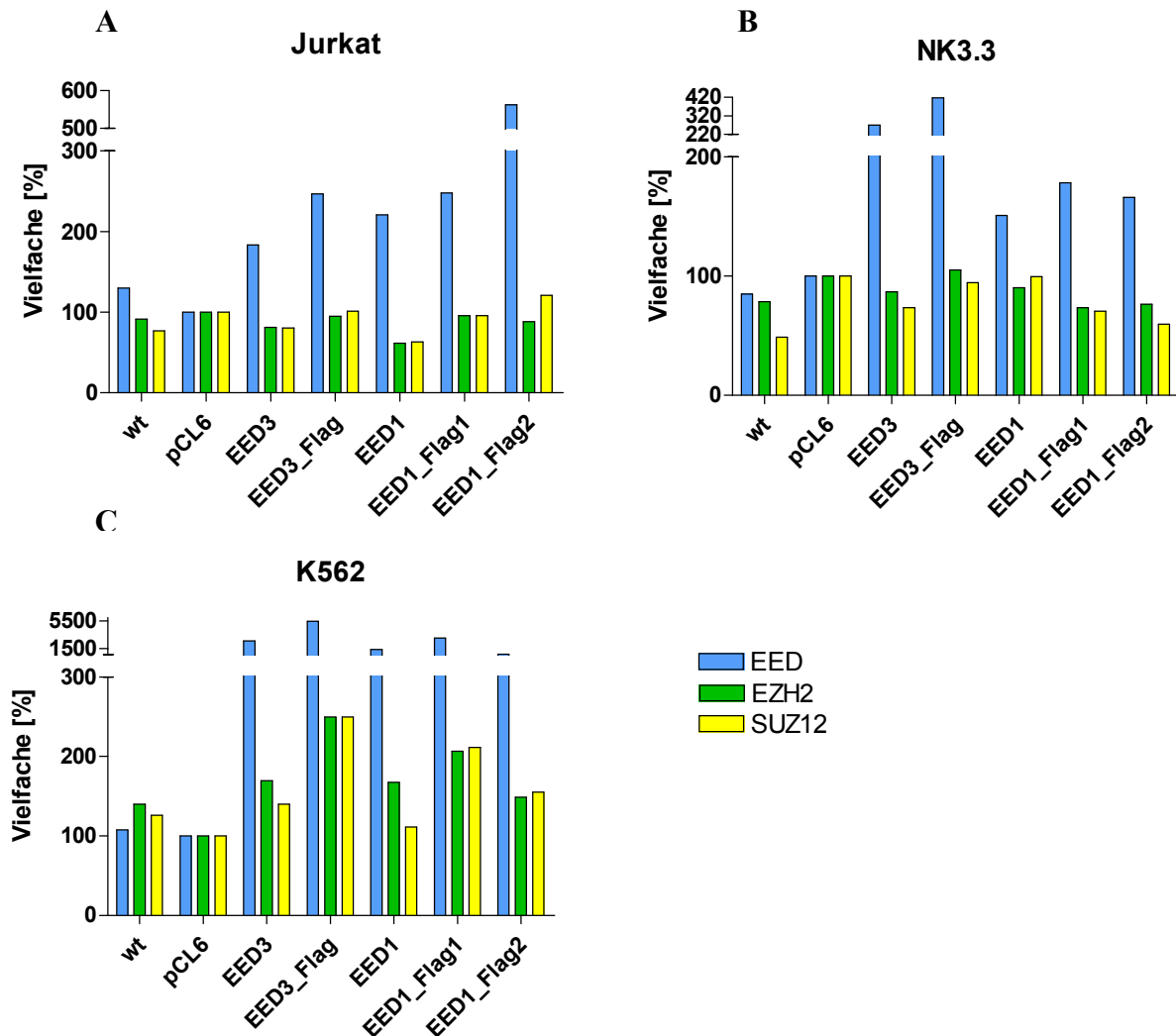


Abb. 28: Überexpression der *EED*-Varianten in Jurkat, NK3.3 und K562.

Die jeweilige Zelllinie wurde lentiviral mit den verschiedenen *EED*-Überexpressionskonstrukten sowie mit dem leeren pCL6-Vektor als Kontrolle infiziert. Mittels Real-Time RT-PCR wurden die Expressionsmengen der drei Kernkomponenten des PRC2, *EED* (blau), *EZH2* (grün) und *SUZ12* (gelb), analysiert. Die Expression wurde jeweils auf *GAPDH* normiert und anschließend mit der $2^{-\text{ddCT}}$ Methode Vielfache in Bezug auf die mit Leervektor transduzierten Zellen berechnet. Dargestellt ist jeweils ein exemplarisches Experiment.

Ergebnisse

Neben der Transkriptanalyse wurde zusätzlich die Expression der EED Protein-Varianten im Western Blot bestimmt (Abb. 29).

Hierbei zeigte sich, dass die EED-Menge durch Überexpression in den unterschiedlichen Zelllinien auch auf Proteinebene anstieg. Interessanterweise wurden jedoch nie alle theoretisch möglichen EED-Isoformen überexprimiert, sondern immer nur diejenige, deren Startcodon sich am Anfang des Vektors befand.

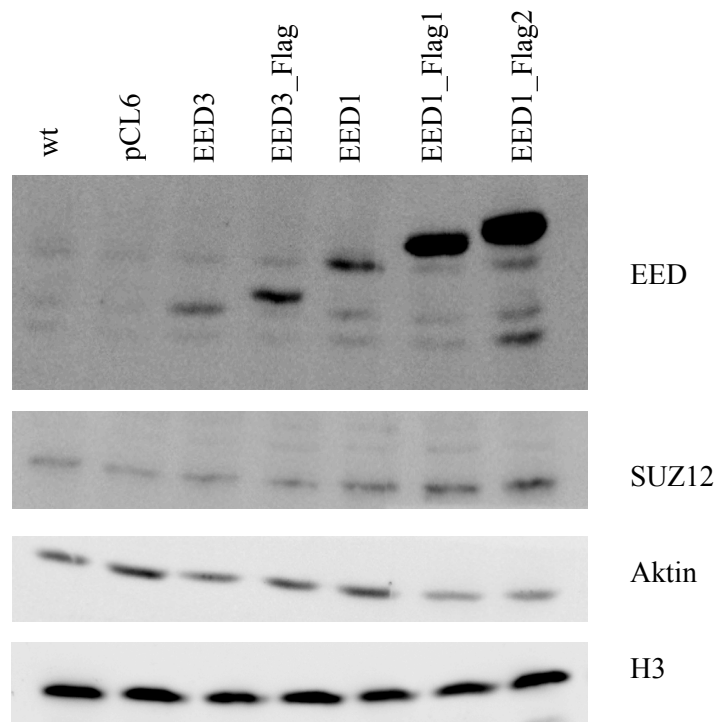


Abb. 29: Western Blot mit Kernextrakt aus Jurkat Zellen zur Analyse der verschiedenen EED-Isoformen.

Sowohl in Wildtyp Zellen (wt), als auch in Zellen, die mit dem Kontrollvektor (pCL6) infiziert wurden, waren die EED-Varianten 1, 3 und 4 nur schwach exprimiert, während EED2 nicht nachweisbar war. Überexpression der verschiedenen EED-Varianten führte zu einer verstärkten Expression der Variante, deren Startcodon als erstes im Vektor vorkommt. SUZ12 war in allen Proben beinahe gleich stark exprimiert, ebenso H3. Die Ladekontrolle Aktin nahm in ihrer Intensität bei den EED1 Proben mit Flag Tag sogar ein wenig ab.

Die Überexpression von EED3 führte zu einem Anstieg der Bande für das ca. 55 kDa große entsprechende Protein. Ein zusätzlicher Flag Tag erhöhte die Expression des Proteins leicht. Die Überexpression von EED1 (ohne Flag Tag) resultierte in der deutlichen Überexpression der längsten EED-Variante mit 69 kDa. Alle anderen Varianten waren weiterhin nur schwach exprimiert. Interessanterweise führte auch hier das Einfügen eines Flag Tags zu einer

Erhöhung der Überexpression, wovon im Falle von EED1_Flag2 sogar alle EED-Isoformen betroffen waren. Beide Varianten von EED1 mit Flag Tag unterschieden sich in ihrer Größe entsprechend der unterschiedlichen Länge der klonierten cDNA. Hierbei fiel auf, dass EED1_Flag2 selbst unter Berücksichtigung des Flag Tags deutlich größer ist als 69 kDa und somit nicht identisch ist mit EED1. Da *EED1_Flag2* auf Basis der Mausdaten kloniert wurde, bestätigt sich hier die Vermutung, dass im Menschen für diese Variante ein anderes, weiter stromabwärts liegendes, Startcodon verwendet wird. Bei diesem Startcodon könnte es sich um das TTG an Position 211 handeln, das als Ausgangspunkt für *EED1_Flag1* verwendet wurde. Die entsprechende Bande war nur geringfügig größer als die 69 kDa von EED1, was durch den Flag Tag zu Stande kommen kann. Somit liefert dieses Konstrukt einen Hinweis auf die genaue Lage des Startcodons für EED1.

EED2 konnte in diesem Western Blot nicht detektiert werden. Aus der Literatur geht jedoch hervor, dass diese Variante nur in pluripotenten Zellen und sehr selten in bestimmten Tumoren exprimiert wird [154], sodass die Expression von EED2 hier auch nicht zwingend zu erwarten war.

Die Expression von SUZ12 war, wie auf Grund der mRNA Daten zu erwarten war, trotz Überexpression von EED nicht bzw. nur geringfügig erhöht.

5.5.3.2 Einfluss der Überexpression von EED auf die Menge an H3K27me3

Um festzustellen, ob sich eine Erhöhung der EED-Expression auf die Menge an H3K27me3 auswirkt, und ob es hier Unterschiede zwischen den einzelnen Varianten gibt, wurde die H3K27me3-Menge im ELISA sowie im Western Blot bestimmt (Abb. 30).

Für die Analysen mittels Western Blot wurden fluoreszenzgekoppelte Sekundärantikörper verwendet, die es, bei Verwendung von Primärantikörpern aus unterschiedlichen Spezies, ermöglichen, sowohl Gesamt-H3 als auch H3K27me3 gleichzeitig in einem Blot zu detektieren. Dies hat den Vorteil, dass die Intensität der H3K27me3-Bande leicht auf die der Bande von Gesamt-H3 normiert werden kann, sodass selbst bei schwankender Histonmenge noch Veränderungen im Anteil von H3K27me3 nachgewiesen werden können. Es zeigte sich, dass bei Überexpression von EED tatsächlich der Anteil von H3K27me3 am Gesamt-Histon H3 zunahm. Diese Beobachtung traf auf alle EED-Varianten zu, wobei die Überexpression von EED3 eine deutlich geringere Erhöhung von H3K27me3 zur Folge hatte, als die der anderen EED-Varianten.

Ergebnisse

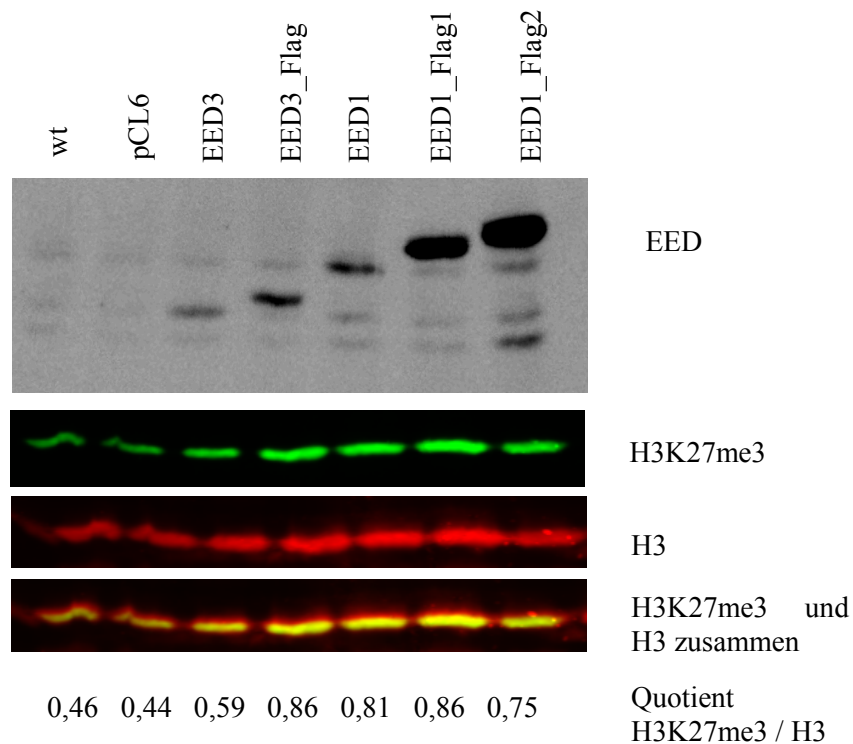


Abb. 30: Western Blot mit Kernextrakt aus Jurkat Zellen zur Analyse von H3K27me3

Sowohl in Wildtyp Zellen (wt), als auch in Zellen, die mit dem Kontrollvektor (pCL6) infiziert wurden, waren die EED-Varianten 1, 3 und 4 nur schwach exprimiert. Überexpression der verschiedenen EED-Varianten führte hingegen zu einer verstärkten Expression der Variante deren Startcodon als erstes im Vektor vorkommt (vgl. Abb. 29). Gesamt-H3 (rot) konnte in allen Proben in einem ähnlichen Ausmaß detektiert werden, während die Menge an H3K27me3 (grün) mit Überexpression von EED zunahm. Die Quotienten der Intensitäten von H3K27me3 und H3 in den jeweiligen Proben verdeutlichen noch einmal die Zunahme des Anteils von H3K27me3 an der Gesamt-Histon H3 Menge bei Überexpression von EED.

Erstaunlicherweise deuteten die Ergebnisse der ELISAs, entgegen der Western Blot Daten, darauf hin, dass Überexpression von EED3 sowohl in Jurkat (Abb. 31 A, C) als auch in NK3.3 (Abb. 31 B) zu einer Reduzierung der Menge an H3K27me3 führt.

Interessanterweise war das Bild bei Überexpression verschiedener EED-Varianten nicht mehr eindeutig. So konnte bei Überexpression von EED1_Flag1 eine gegenüber pCL6 deutlich erhöhte H3K27me3-Menge nachgewiesen werden, während sie bei Überexpression von EED1_Flag2 deutlich geringer war. EED1 und EED3_Flag lieferten zumindest bei niedrigen Proteinkonzentrationen ähnliche H3K27me3-Werte wie pCL6, während die H3K27me3-Levels bei EED3 Überexpression, abhängig von der Proteinkonzentration, höher oder niedriger als bei pCL6 lagen.

Ergebnisse

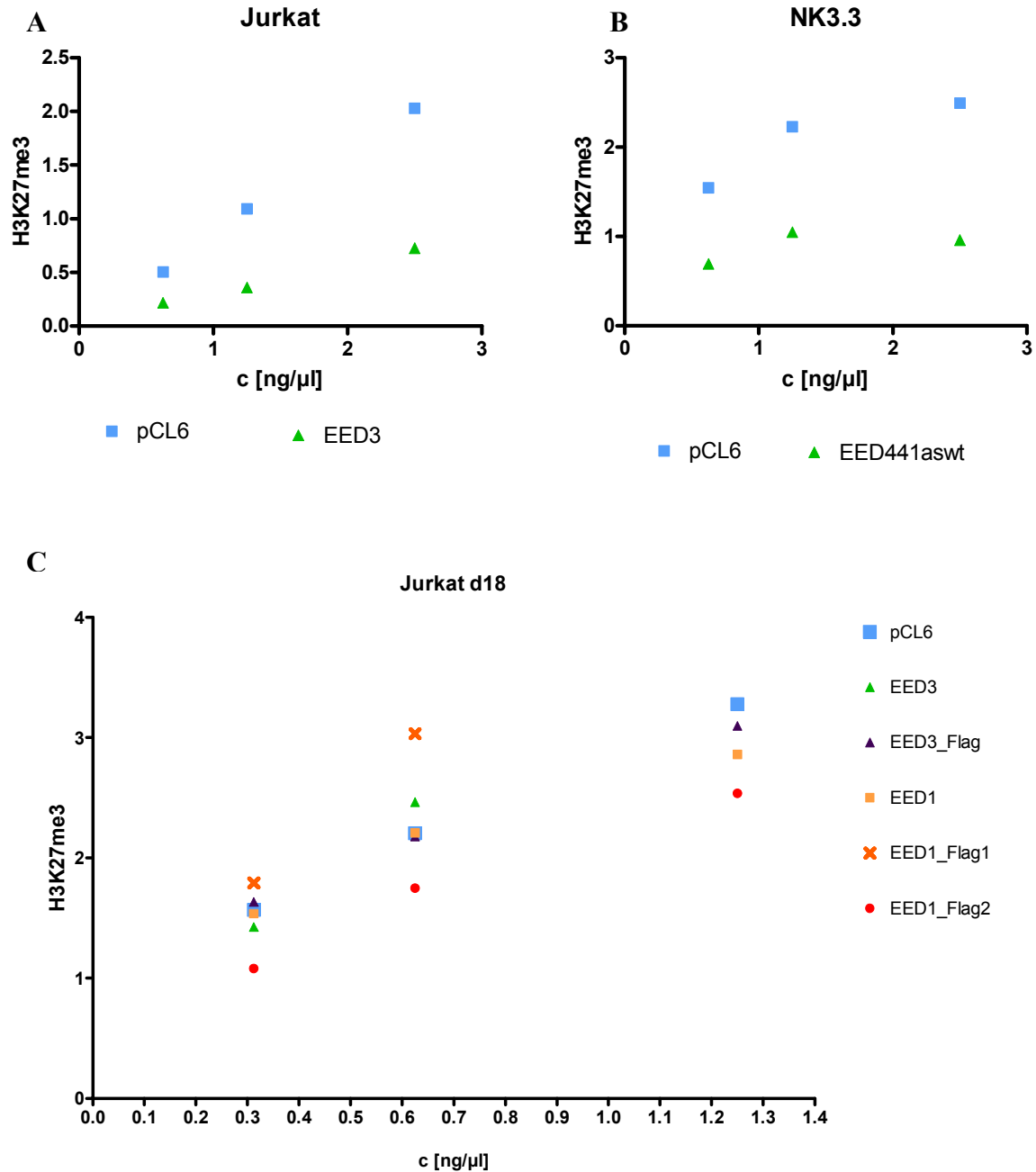


Abb. 31: H3K27me3 Menge im ELISA nach EED-Überexpression in Jurkat (A und C) und NK3.3 (B).

Es wurden jeweils mehrere Proteinkonzentrationen aufgetragen, um die Linearität des Assays zu kontrollieren. Sowohl in Jurkat, als auch in NK3.3 war die Menge an H3K27me3 bei EED3 überexprimierenden Zellen geringer, als bei Zellen, die mit dem leeren pCL6 Vektor infiziert wurden (A und B, jeweils exemplarische Abbildungen für bis zu 3 unabhängige Experimente). Bei der Überexpression mehrerer EED-Varianten (C) war das Ergebnis inkonsistent. In Abhängigkeit vom Überexpressionskonstrukt und z.T. auch von der eingesetzten Proteinmenge, wurde hier mal mehr und mal weniger H3K27me3 als in den mit pCL6 transduzierten Zellen detektiert.

Während im Western Blot immer Kernextrakte analysiert wurden, wurden für den ELISA Ganzzelllysate verwendet. Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Ergebnisse bezüglich der H3K27me3-Menge durch die Methode der Proteinpräparation bedingt sind, wurden bei einer Überexpression zum selben Zeitpunkt Proteine mit beiden Techniken isoliert und im Western Blot analysiert (Abb. 32). Es zeigte sich, dass hier bei den ELISA-Lysaten, analog zu den im ELISA gemessene Werten, tatsächlich die höchste Menge an H3K27me3 in den mit dem leeren pCL6 Vektor transduzierten Zellen gemessen wurde. Allerdings war der Anteil von H3K27me3 an Gesamt-H3 in allen EED-überexprimierenden Proben höher, als in den unbehandelten Zellen. Bei den Kernextrakten hingegen wiesen zwar auch alle infizierten Proben mehr H3K27me3 auf, als die uninfizierten Zellen, allerdings war hier, mit Ausnahme von EED3, die Menge von H3K27me3 in den EED-überexprimierenden Zellen höher, als in den mit Leervektor transduzierten.

Der Vergleich der beiden Proteinpräparationen zeigt, dass die Methode der Präparation einen entscheidenden Einfluss auf das Ergebnis nimmt. So ist es z.B. möglich, dass neusynthetisiertes, nicht-modifiziertes Histon H3, das noch nicht in den Zellkern gelangt ist, insgesamt das Histongleichgewicht verschiebt, und so der Eindruck entsteht, dass der Anteil von H3K27me3 an Gesamt-Histon H3 zurückgeht. Dies muss sich aber nicht auf die Verhältnisse im Zellkern, die für die Regulation der Genexpression relevant sind, auswirken, sodass die mit Kernextrakt erzielten Ergebnisse eher die physiologisch relevante Situation widerspiegeln.

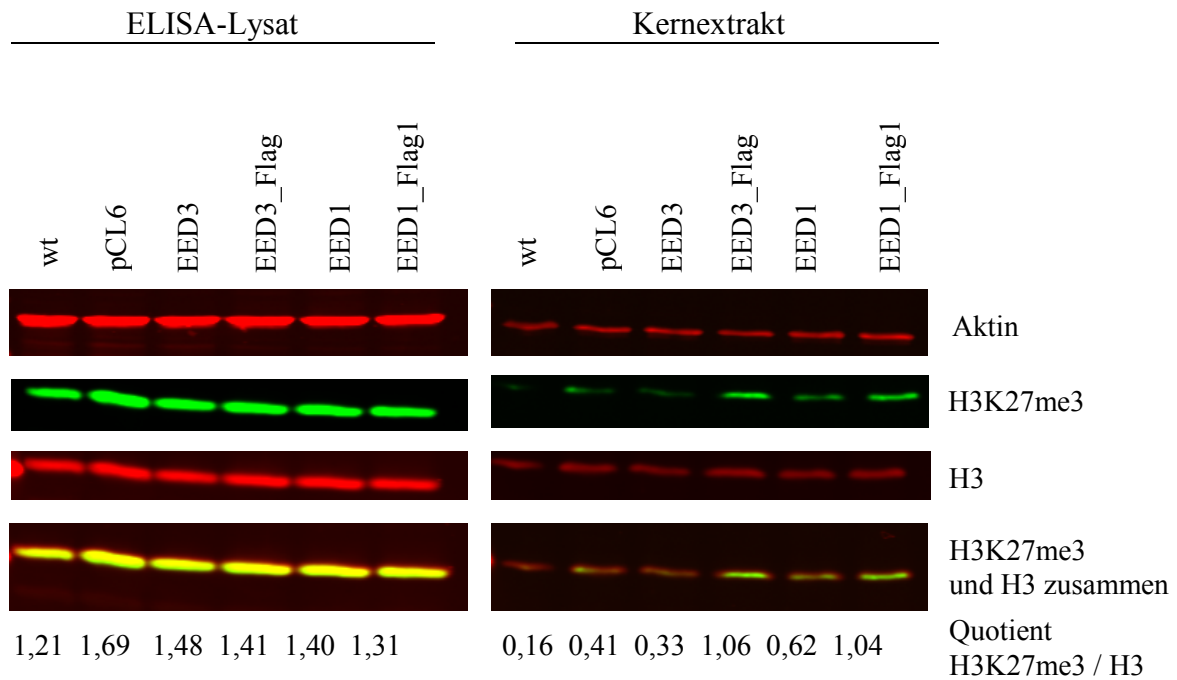


Abb. 32: Western Blot mit ELISA-Ganzzelllysat (links) und Kernextrakten (rechts) aus Jurkat 44 Tage nach Infektion.

In der oberen Reihe ist die Aktinkontrolle (rot) gezeigt, die in allen Proben einer Präparation ähnlich stark exprimiert ist. Darunter folgen H3K27me3 (grün) und Gesamt-H3 (rot). In der unteren Reihe ist die Überlagerung von H3 und H3K27me3 dargestellt. Der unter den Blots angegebene Quotient von H3K27me3 zu Gesamt-H3 verdeutlicht den Anteil des modifizierten Histons an der Gesamthistonmenge. Im Falle des ELISA-Lysats war der Anteil an H3K27me3 an Gesamt-H3 in den mit pCL6 transduzierten Zellen am höchsten, während beim Kernextrakt alle EED-Überexpressionen, außer die von EED3, einen höheren Anteil von H3K27me3 am Gesamt-H3 aufwiesen als die Kontrollen.

5.5.3.3 Einfluss der Überexpression von EED3 in der Langzeitkultur

Um festzustellen, ob sich am Überexpressionsverhalten mit der Zeit etwas verändert, wurde die Expression von *EED3* in NK3.3 über mehrere Wochen verfolgt (Abb. 33). Als Kontrolle dienten NK3.3 Zellen, die mit dem leeren pCL6-Vektor transduziert wurden. Bei beiden Kulturen wurden zehn Tage nach der Infektion, bzw. drei Wochen nach Beginn der Kultivierung, die GFP-positiven Zellen durchflusszytometrisch aufgereinigt, um reine Populationen zu erhalten und anschließend über mehrere Wochen kultiviert. Hier zeigte sich, dass die Stärke der Überexpression von *EED* im Allgemeinen schwankt, es war jedoch keine kontinuierliche Änderung der Expressionsstärke über die Zeit zu beobachten. Auch bei *EZH2*

und *SUZ12* konnte über die Zeit keine gerichtete Änderung in der Expressionsstärke beobachtet werden.

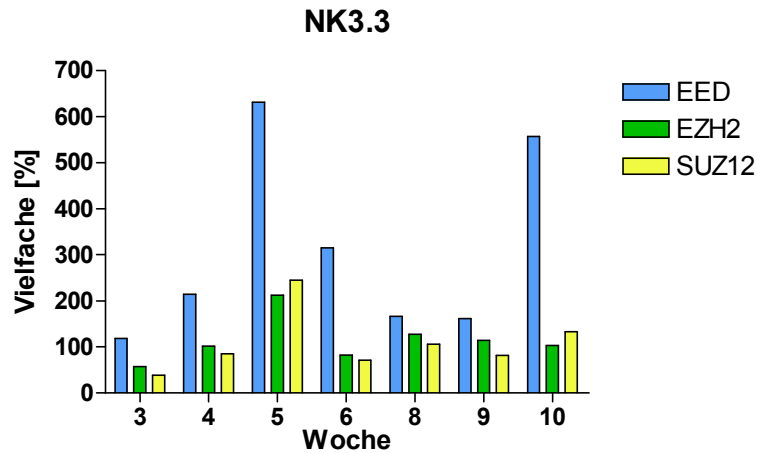


Abb. 33: Analyse der Transkriptmenge von *EED*, *EZH2* und *SUZ12* nach Überexpression von *EED3* in NK3.3 über einen Zeitraum von zehn Wochen.

NK3.3-Zellen wurden mit dem *EED3*-Überexpressionsvektor, sowie mit dem leeren pCL6 Vektor als Kontrolle infiziert und anhand ihrer GFP-Expression durchflusszytometrisch aufgereinigt. Anschließend wurden die Zellen über mehrere Wochen kultiviert und die Transkriptmenge der drei Kernkomponenten des PRC2, *EED* (blau), *EZH2* (grün) und *SUZ12* (gelb), mittels Real-Time RT-PCR bestimmt. Es wurde auf *GAPDH* normiert und mit der $2^{-\text{ddCT}}$ Methode Vielfache in Bezug auf die mit pCL6 transduzierten Zellen ermittelt.

Neben den Transkripten wurden auch die Menge an EED-Protein und modifiziertem Histon über die Zeit verfolgt (Abb. 34). Es zeigte sich, dass EED3 bei Überexpression auch auf Proteinebene sowohl 10 als auch 52 Tage nach Infektion verstärkt vorhanden war.

Die Menge an Gesamt-H3 stieg an Tag 10 in den mit EED3 transduzierten Zellen leicht an im Vergleich zu den Kontrollzellen, H3K27me3 stieg hier jedoch deutlich an, wie sowohl in den Einzelaufnahmen als auch am Quotienten zu erkennen ist.

Auch 52 Tage nach Infektion war der Anteil an H3K27me3 an Gesamt-Histon H3 bei EED-Überexpression im Vergleich zur pCL6-Kontrolle erhöht.

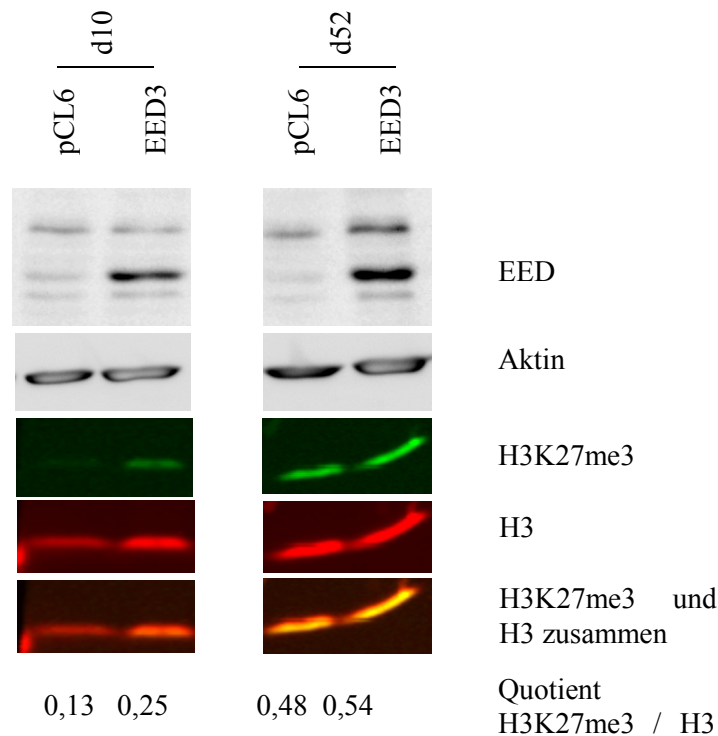


Abb. 34: Western Blot mit Kernextrakt aus NK3.3.

In Zellen, die mit dem Kontrollvektor (pCL6) infiziert wurden, waren die EED-Varianten 1, 3 und 4 nur schwach exprimiert. Überexpression von EED3 führte sowohl 10 als auch 52 Tage nach Infektion zu einer erhöhten Menge dieser Proteinvariante. Die Aktinexpression war jeweils zwischen der Kontrolle und der EED-überexprimierenden Probe vergleichbar. Der Anteil von H3K27me3 (grün) an Gesamt-H3 (rot) war in den mit EED3 transduzierten Zellen zu beiden Zeitpunkten deutlich höher als in den Kontrollzellen.

5.5.4 Einfluss der EED-Überexpression auf die Alterung von Zellen der Linie NK3.3

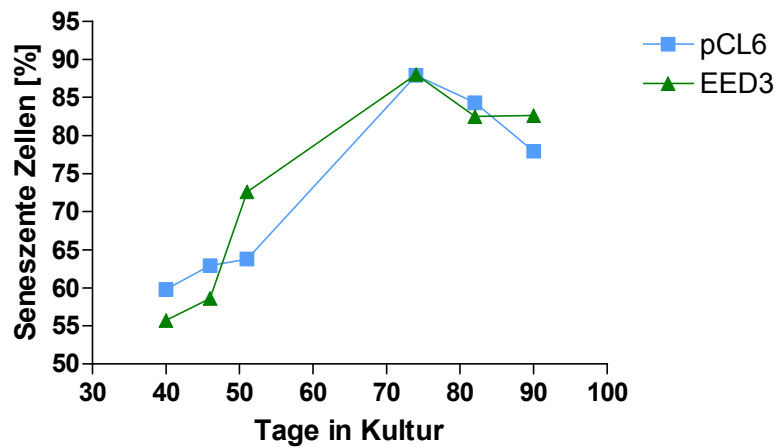
In CD34⁺ HPC sowie in Leukozyten konnte eine altersabhängige Zunahme der *EED*-Expression nachgewiesen werden. Daher sollte überprüft werden, ob die Überexpression von EED in der Zellkultur ebenfalls zu einer vorzeitigen Zellalterung führt. Um das relative Alter der Zellen zu bestimmen, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultur ein Seneszenzassay auf Basis der seneszenzassoziierten β -Galaktosidaseaktivität durchgeführt [283]. β -Galaktosidase ist normalerweise in den Lysosomen bei pH4 aktiv. Im Zuge der Alterung akkumuliert das Enzym jedoch auch im Zytoplasma, sodass dann eine Aktivität auch bei pH6 nachweisbar wird [284]. Die Enzymaktivität kann leicht durch die Spaltung des Substratanalogons X-Gal in Galaktose und 5-Bromo-4-chloro-3-hydroxyindol, welches im

weiteren Verlauf zu einem unlöslichen Indigo-Farbstoff oxidiert, detektiert werden. Je höher der Anteil an blau gefärbten Zellen bei pH6 ist, desto älter ist die gesamte Kultur.

NK3.3 ist eine der wenigen nicht- immortalisierten Zelllinien. Sie altert in Kultur und stellt im Allgemeinen nach sechs bis acht Wochen das Wachstum ein [258]. Daher eignet sie sich als Modellsystem zur Untersuchung der Auswirkungen von *EED* auf die Alterung. Zu diesem Zweck wurden bei NK3.3-Zellen aus der Langzeitkultur (vgl. 5.5.3.3) wöchentlich Seneszenzassays durchgeführt. Es zeigte sich jedoch kein Effekt der *EED*-Überexpression auf die Seneszenz von NK3.3 Zellen (Abb. 35 A, B).

Hierbei muss man jedoch, wie unter 5.3 erwähnt, beachten, dass Seneszenz und Alterung zwei unterschiedliche Phänomene darstellen.

A



B

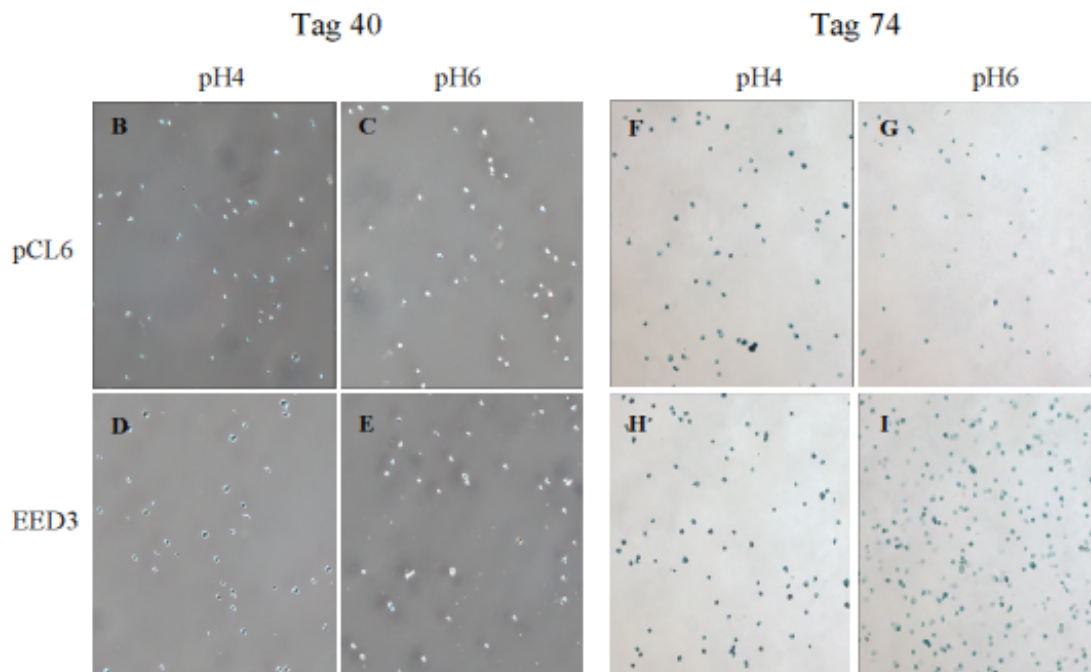


Abb. 35: Langzeitversuch zur Seneszenzinduktion durch *EED3*.

NK3.3-Zellen wurden lentiviral mit *EED3* sowie mit dem Kontrollvektor pCL6 infiziert. Die GFP-positiven Zellen wurden durchflusszytometrisch aufgereinigt und über einen Zeitraum von insgesamt 13 Wochen kultiviert. Über den gesamten Zeitraum nahm der Anteil an seneszenten Zellen sowohl in der *EED3*-überexprimierenden Kultur, als auch in der Kontrollgruppe zunächst zu, um dann leicht abzufallen (A). Im unteren Teil der Abbildung sind auflichtmikroskopische Abbildungen der Zellen nach 40 (B-E) und 74 (F-I) Tagen in Kultur dargestellt. Jeweils in der oberen Reihe (B, C, F und G) sind Zellen, die nur mit dem leeren Vektor infiziert wurden gezeigt, in der unteren Reihe (D, E, H und I) solche, die *EED3*-überexprimierten. Auf der jeweils linken Seite der Abbildung (B, D, F und H) sind Zellen unter den Kontrollbedingungen bei pH4 dargestellt, auf der rechten Seite (C, E, G und I) solche bei pH6.

5.5.5 Herabregulation von EED

Parallel zur Überexpression wurden auch die Auswirkungen von reduzierten Mengen an EED auf die Zellen und die Menge an H3K27me3 analysiert. Zu diesem Zweck wurden zwei verschiedene, selbst designte shRNAs (shRNA 3 und 4), sowie eine, die auf der Sequenz einer publizierten siRNA basiert, (shRNA 2; [220]) lentiviral in Jurkat eingebracht. Als Kontrolle diente neben dem leeren pCL2-Vektor die Luc shRNA, die gegen das Transkript des Luziferasegens gerichtet ist, und die daher in humanen Zellen keine Zielsequenz finden sollte. Sie wird allerdings trotzdem, wie die anderen shRNAs auch, prozessiert und dient daher als Kontrolle für Effekte, die allein aufgrund des Vorliegens von shRNAs auftreten können.

Wie schon bei der Überexpression, konnte auch bei der Herabregulation von *EED* kein Einfluss der shRNAs auf das Wachstumsverhalten beobachtet werden. Interessanterweise hatten alle shRNAs nur einen eher schwachen Einfluss auf die *EED*-Expression (Abb. 36 A). shRNA 2, die nach der Literaturvorlage erstellt wurde, reduzierte die Expression von *EED* am schlechtesten um nur ca. 25%. Die selbst designten shRNAs 3 und 4 führten zu einer Reduktion der Transkriptmenge auf 43 bzw. 57%. Bei allen shRNAs sank die Menge an *EZH2*-Transkript etwa auf das gleiche Maß wie die des *EED*-Transkripts. Die *SUZ12* Menge reduzierte sich nur bei den selbst designten shRNAs und stieg bei shRNA 2 sogar leicht über den Wert der mit Leervektor infizierten Zellen an.

Entsprechend der relativ schwachen Reduktion der *EED*-Expression auf mRNA Ebene, konnte auf Proteinebene gar kein Einfluss der shRNAs auf die EED-Menge nachgewiesen werden (Abb. 36 B).

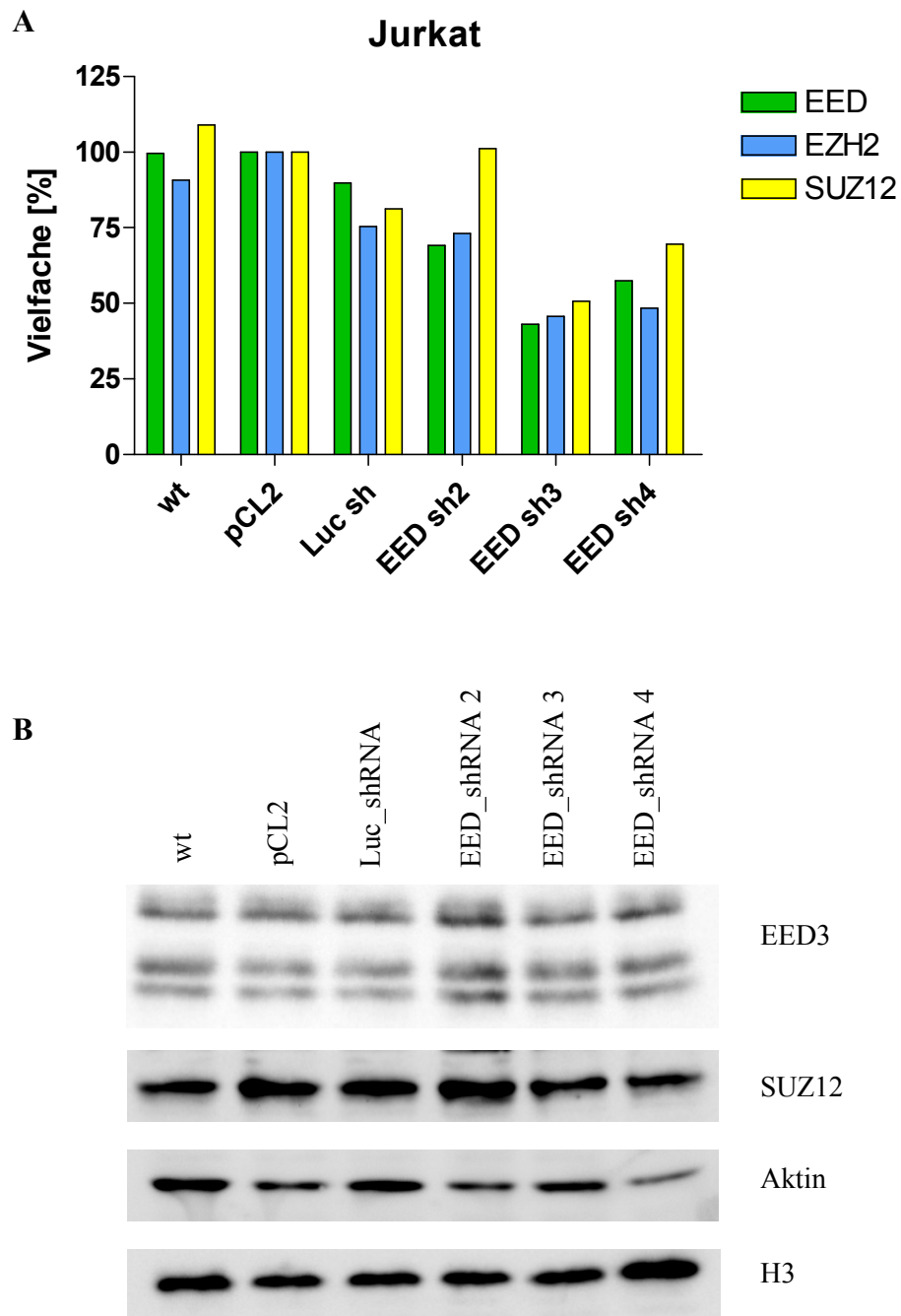


Abb. 36: Auswirkung der verschiedenen *EED* shRNAs auf die *EED*-Expression.

Jurkat Zellen wurden lentiviral mit verschiedenen *EED* shRNAs sowie mit dem leeren pCL2-Vektor und mit einer shRNA gegen Luziferase als Kontrolle transduziert. (A) Mittels Real-Time RT-PCR wurden die Expressionsmengen der drei Kernkomponenten des PRC2, *EED* (blau), *EZH2* (grün) und *SUZ12* (gelb), analysiert. Die Expression wurde jeweils auf *GAPDH* normiert und anschließend mit der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode Vielfache in Bezug auf die mit Leervektor transduzierten Zellen berechnet. (B) Aus den infizierten Zellen wurde Kernextrakt isoliert und in einem Western Blot analysiert. Bei keiner der verwendeten shRNAs nahm die *EED*-Expression auf Proteinebene ab. Auch die *SUZ12*-Expression sowie die Menge an H3 blieben in allen Proben konstant. Bei der Aktinkontrolle war eine Abnahme der Proteinmenge in den mit shRNA4 transduzierten Zellen zu beobachten. Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment.

Da die Herabregulation von EED mit shRNAs nicht erfolgreich war, wurde die siRNA, für die in der Literatur eine deutliche Reduktion der EED-Expression dokumentiert ist [220], als Alternative verwendet, obwohl dieselbe Sequenz als shRNA höchst ineffizient war. Die Versuche wurden in Hela Zellen durchgeführt, da sich Lymphozyten nur sehr schlecht lipofizieren lassen.

Im Gegensatz zu den shRNAs in Jurkat Zellen, hatte die siRNA einen deutlich negativen Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Hela Zellen. Während sich das Wachstum mit der *non-target* Kontroll siRNA nur geringfügig verlangsamte, wuchsen die mit der *EED* siRNA transfizierten Zellen kaum noch. Auf mRNA Ebene konnte sowohl nach 48 als auch nach 72 Stunden eine deutliche Reduktion der EED-Transkriptmenge auf 28 bzw. 40% nachgewiesen werden (Abb. 37 A, B). Allerdings hatten auch die nicht-transfizierten Kontrollzellen etwas weniger *EED*-Transkript als die, die mit der *non-target* Kontroll siRNA transfiziert wurden. Wie aufgrund der Überexpressionsdaten zu erwarten war, konnte nach 48 Stunden kein nennenswerter Rückgang der *EZH2* oder der *SUZ12* Expression nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise nahm die Menge beider Transkripte jedoch 72 Stunden nach Transfektion deutlich zu. Gleichzeitig fiel, wie auch bei *EED*, auf, dass auch hier die Zellen, die mit der *non-target* Kontroll siRNA transfiziert wurden, höhere Transkriptmengen aufwiesen, als die untransfizierten. Dies deutet darauf hin, dass die Transfektion einen erheblichen Einfluss auf die Genexpression hat.

Aufgrund des schlechten Wachstums der transfizierten Hela Zellen stellte sich die Analyse der Proteinmengen mittels Western Blot sehr schwierig dar und wurde nur für die Histone 72 Stunden nach Transfektion durchgeführt. Hier zeigte sich, dass die Transfektion mit *EED* siRNA zu einer deutlichen Reduktion von H3K27me3 im Vergleich zur *non-target* Kontroll siRNA führte (Abb. 37 C). Allerdings wiesen beide transfizierte Proben deutlich höhere Mengen an H3 und H3K27me3 als die unbehandelte Kontrolle auf, sodass ein Einfluss des Transfektionsmechanismus auf die Histonmenge und den Anteil der Modifikationen nicht auszuschließen ist.

Ergebnisse

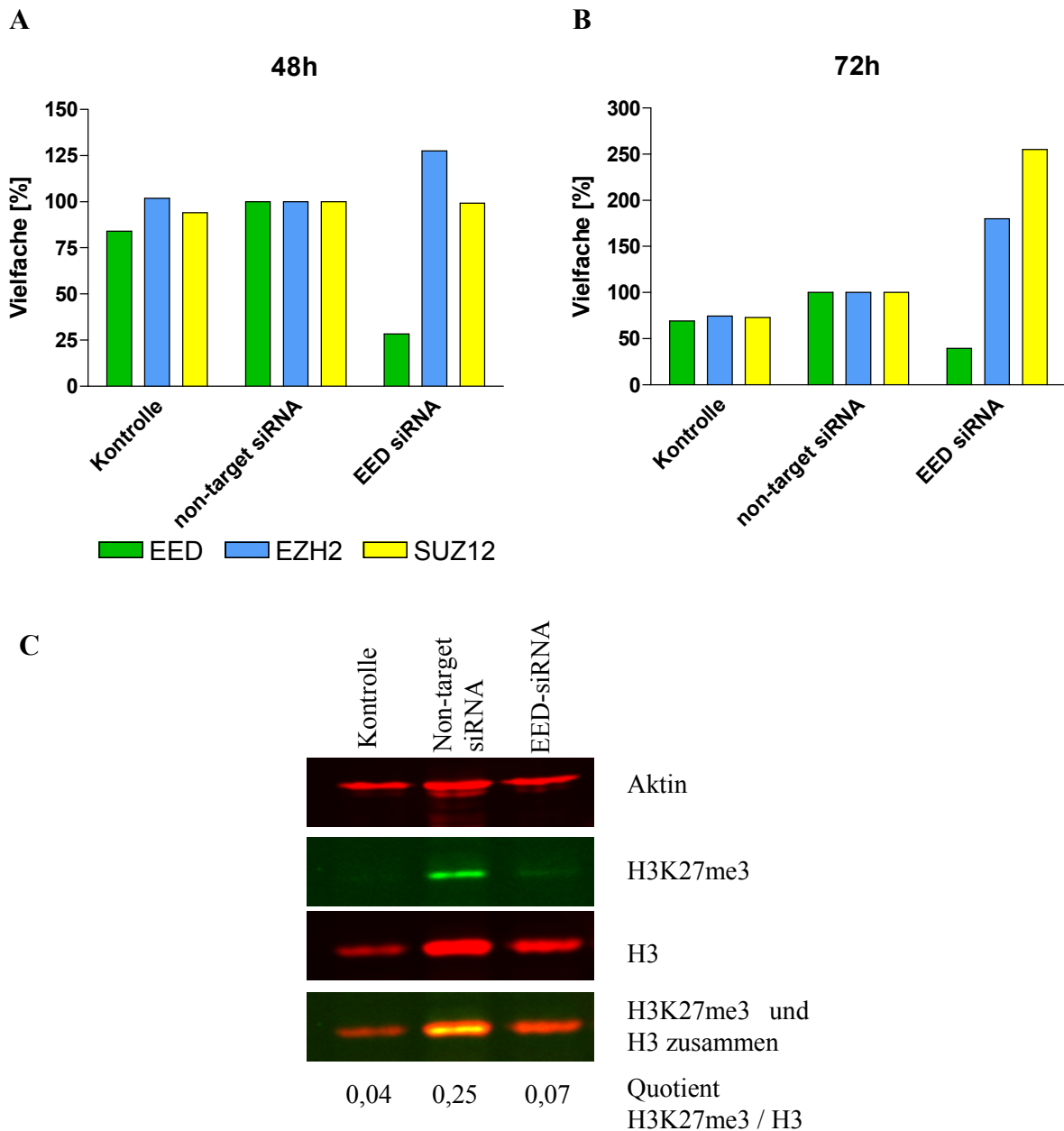


Abb. 37: Auswirkung einer *EED* siRNA auf die *EED*-Expression.

Hela Zellen wurden mit 60 pmol *EED* siRNA sowie mit derselben Menge *non-target* Kontroll siRNA transfiziert. Als weitere Kontrolle dienten untransfizierte Zellen, die jedoch mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden. (A und B) Mittels Real-Time RT-PCR wurden die Expressionsmengen der drei Kernkomponenten des PRC2, *EED* (blau), *EZH2* (grün) und *SUZ12* (gelb), nach 48 bzw. 72 Stunden analysiert. Die Expression wurde jeweils auf *GAPDH* normiert und anschließend mit der 2^{-ddCT} Methode Vielfache in Bezug auf die mit der *non-target* siRNA transfizierten Zellen berechnet. (C) Im Western Blot wurden die entsprechenden Kernextrakte 72 Stunden nach Transfektion analysiert. Während die Aktin Kontrolle (rot) in allen Proben etwa gleich stark nachgewiesen werden konnte, sind H3 (rot) und H3K27me3 (grün) in den mit der *non-target* siRNA transfizierten Zellen deutlich stärker vorhanden als in den untransfizierten und den mit *EED* siRNA transfizierten Zellen. Die Quotienten der Intensitäten von H3K27me3 und H3 in den jeweiligen Proben verdeutlichen, dass der Anteil von H3K27me3 an Gesamt-H3 in den mit *EED* siRNA transfizierten Zellen geringer ist, als in den mit der *non-target* siRNA transfizierten. Allerdings liegt er immer noch über dem der untransfizierten Zellen. Dargestellt ist jeweils ein exemplarisches Experiment.

5.6 Einfluss der *EED* Menge auf das Differenzierungspotenzial primärer CD34⁺ HPC

5.6.1 Einfluss der *EED*-Überexpression auf die NK-Zell-Generierung

Um zu überprüfen, ob die Überexpression von EED eine Auswirkung auf das lymphoide Entwicklungspotenzial von HPC hat, wurde eine *in vitro* NK-Zell-Generierung durchgeführt [296-299]. Hierzu wurden zunächst CD34⁺ HPC aus Nabelschnurblut isoliert und mit Überexpressionskonstrukten für *EED3* sowie dem leeren pCL6 Vektor als Kontrolle lentiviral transduziert. *EED3* wurde gewählt, da für diese Isoform zum einen das Potential zur Trimethylierung von H3K27 beschrieben ist [152], und zum anderen, da dieser Vektor in den bereits untersuchten Zelllinien meist zu einer geringeren Überexpression von EED führte als die übrigen Vektoren (vgl. Abb. 28 und Abb. 29). Dies entspricht wahrscheinlich eher dem physiologischen Anstieg von EED während der Alterung. Außerdem reagieren primäre Zellen häufig sehr sensibel auf Veränderungen in der Proteinmenge gewisser Faktoren, sodass eine geringere Überexpressionsmenge von den Zellen vermutlich besser toleriert wird.

Als weitere Kontrolle wurden uninfizierte Zellen mitgeführt. 16-20 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen auf murine *Feeder* Zellen ausplattiert und anschließend wie unter 4.2.3.6 beschrieben, kultiviert. Da die Transfektionseffizienz mit 2-3% bei den mit pCL6 transduzierten und ca. 0,65% bei den mit *EED3* transduzierten Zellen sehr gering war, wurden die GFP-exprimierenden Zellen zu Beginn der Kultivierung durchflusszytometrisch aufgereinigt.

Bei der anschließenden Kultivierung fiel auf, dass die infizierten Zellen insgesamt ähnlich schnell wuchsen, wie die uninfizierten Kontrollen und sich nach sechs Wochen Kultivierung, abhängig vom Nabelschnurblut, verzehn- bis verfünfundzwanzigfach hatten. Allerdings wurden die infizierten Zellen mit der Zeit von GFP-negativen überwachsen. So betrug nach sechs Wochen Kultivierung der Anteil an GFP-positiven Zellen in der pCL6 Kultur nur noch ca. 80%, während er bei *EED3*-überexprimierenden auf knapp 40% sank, was einer Nettoexpansion der GFP-positiven Zellen von nur etwa 1,7-fach entspricht (Abb. 39 A). Daher wurden am Ende der Kulturphase nach sechs bis sieben Wochen erneut die GFP-positiven Zellen unter gleichzeitiger durchflusszytometrischer Analyse verschiedener Oberflächenmarker aufgereinigt. Bei diesen Zellen wurde die Expression der drei Kernkomponenten des PRC2 auf mRNA Ebene untersucht. Es zeigte sich, dass hier, im Gegensatz zu den Zelllinien, nicht nur *EED* sondern auch *EZH2* und *SUZ12* in den mit *EED3*-transduzierten Zellen, gegenüber den Kontrollen deutlich stärker exprimiert waren (Abb. 38).

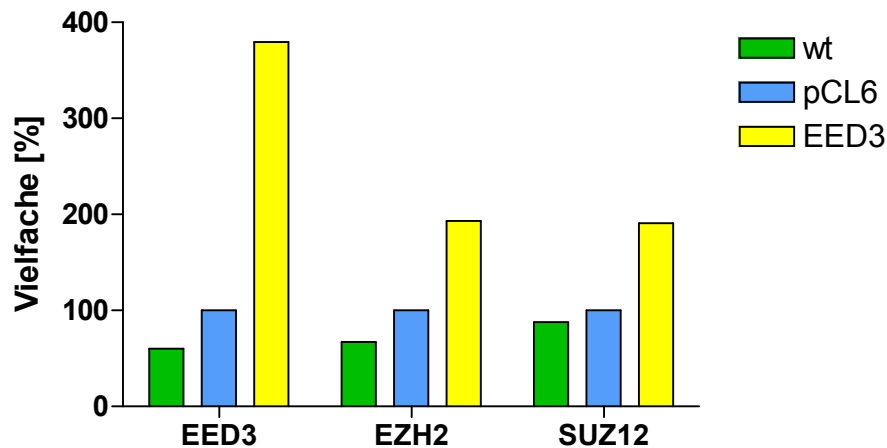


Abb. 38: Expression der drei Kernkomponenten des PRC2 nach sechs Wochen NK-Zell-Generierung.

CD34⁺ HPC wurden mit dem Vektor zur Überexpression von *EED3* (gelb) oder dem leeren pCL6-Vektor (blau) infiziert und über einen Zeitraum von sechs Wochen zu NK-Zellen ausdifferenziert. Die Expression von *EED*, *EZH2* und *SUZ12* in den GFP-positiven Zellen bzw. in der Gesamtpopulation der uninfizierten Zellen (grün) wurde mittels Real-Time RT-PCR bestimmt. Die jeweiligen Werte wurden auf *GAPDH* normiert und anschließend mit der 2^{-ddCT} Methode Vielfache in Bezug auf den leeren pCL6-Vektor berechnet. Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment.

Die Analyse der Oberflächenmarker ergab, dass die *EED3*-überexprimierenden Zellen nach sechs Wochen Kultivierung in ihrem Entwicklungsstatus deutlich von den unbehandelten sowie den pCL6-transduzierten Kontrollzellen abwichen (Abb. 39 B). So hatten sowohl die unbehandelten als auch die pCL6-transduzierten Zellen nach sechs Wochen zu über 90% CD56 auf der Oberfläche, während nur geringe Mengen an CD16 und CD14 nachweisbar waren. Die *EED3*-transduzierten Zellen wiesen nicht nur eine deutlich geringere Expansion der GFP-positiven Fraktion auf, es exprimierten hier auch nur etwa 20% der Zellen CD56. Dafür waren relativ große Fraktionen CD14⁺/CD56⁻ (31,9%) und CD16⁺/CD56⁻ (11%) nachweisbar. Zusätzlich trat in den *EED3*-transduzierten Zellen eine Population (5,8%) mit der ungewöhnlichen Kombination der Oberflächenmarker CD14 und CD56 auf.

Ergebnisse

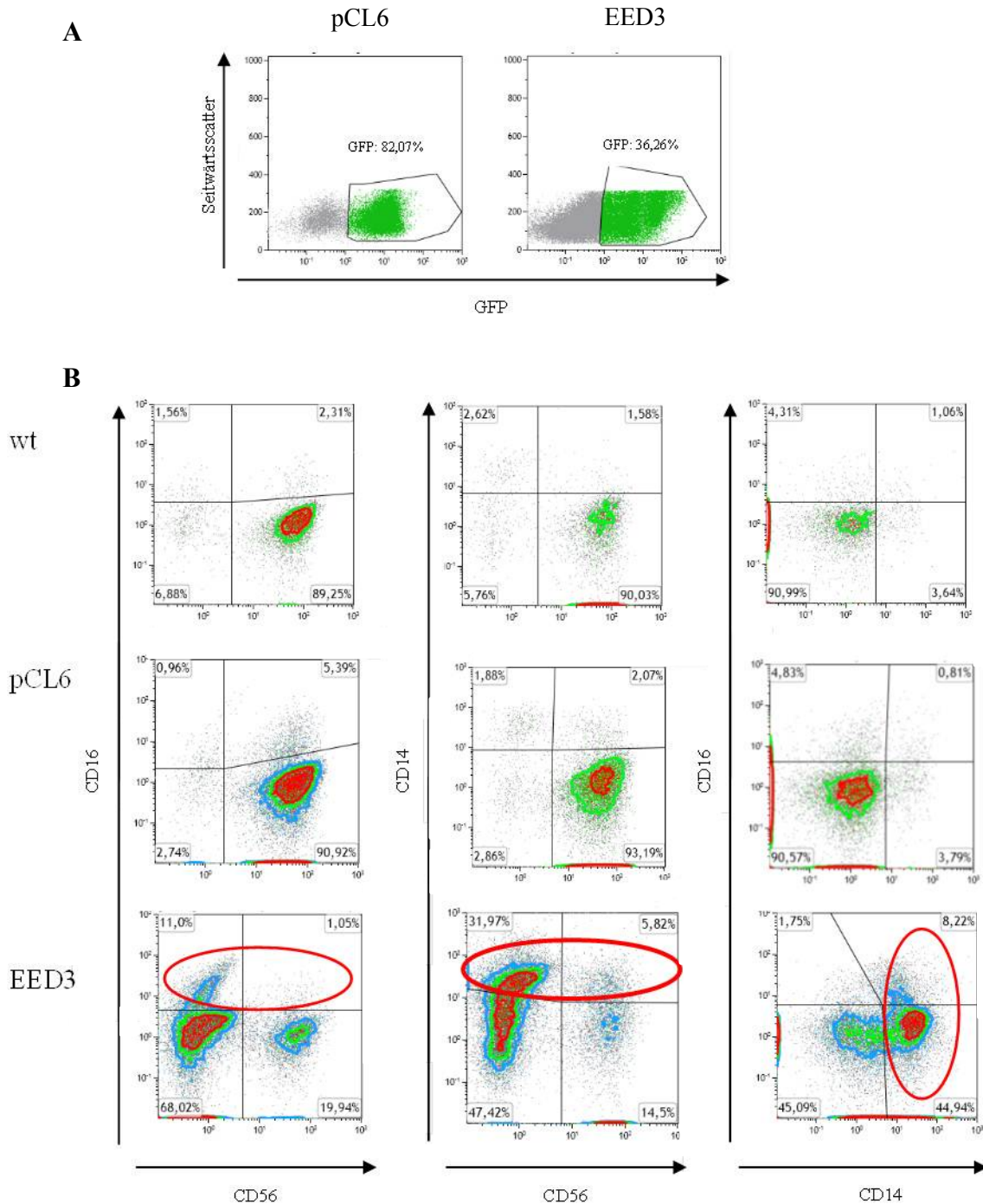


Abb. 39: Durchflusszytometrische Analyse einer NK-Zell-Generierungskultur nach sechs Wochen mit *EED3* Überexpression.

Nach sechswöchiger Generierung von NK-Zellen wurden *EED3*- und pCL6-transduzierte Zellen anhand ihrer GFP-Expression durchflusszytometrisch aufgereinigt (A). Gleichzeitig wurde hier und auch bei den uninfizierten Kontrollzellen die Expression mehrerer Oberflächenmarker durchflusszytometrisch bestimmt (B). In der Abbildung sind die Ergebnisse exemplarisch für die GFP-positiven Zellen, bzw., im Falle der uninfizierten Zellen, für die Gesamtpopulation, eines Experiments gezeigt. Bei den *EED3*-transduzierten Zellen war der Anteil an CD56-positiven Zellen geringer, als bei den Kontrollen. Daneben wurde hier eine höhere Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD16 nachgewiesen (rote Markierung).

Während CD16 ein Oberflächenmarker ist, der auch für NK-Zellen charakteristisch ist, war das Auftreten von CD14 unter diesen Kulturbedingungen völlig unerwartet. Daher wurde hier mittels Real-Time RT-PCR auch die Expression des Markers auf mRNA Ebene untersucht. Es zeigte sich, dass auch die *CD14*-Transkriptmenge in *EED3*-überexprimierenden Zellen erhöht war (Abb. 40).

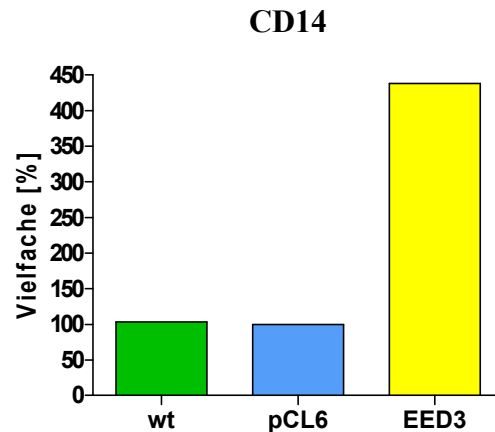


Abb. 40: CD14-Expression nach sechs Wochen NK-Zell-Generierung.

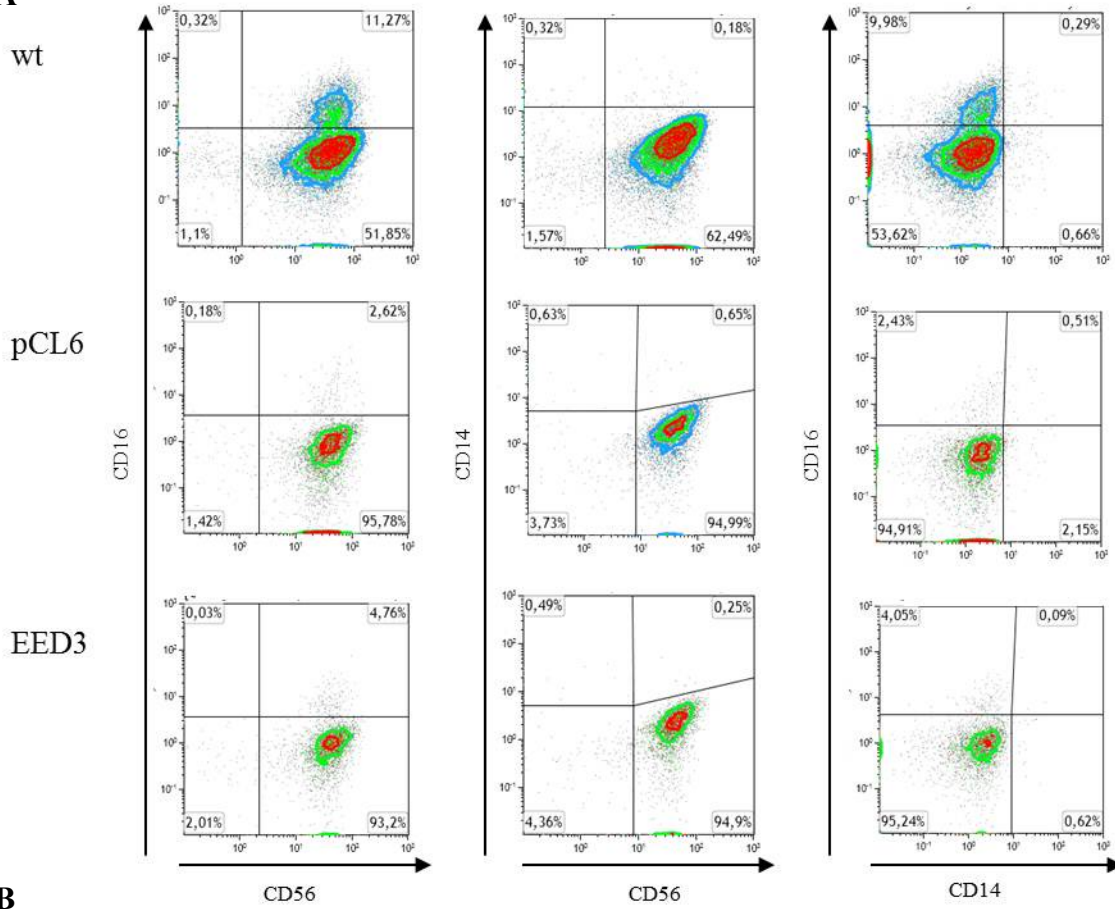
CD34⁺ HPC wurden mit dem Vektor zur Überexpression von *EED3* (gelb) oder dem leeren pCL6-Vektor (blau) infiziert und über einen Zeitraum von sechs Wochen zu NK-Zellen ausdifferenziert. Die Expression von *CD14* in den GFP-positiven Zellen bzw. in der Gesamtpopulation der uninfizierten Zellen (grün) wurde mittels Real-Time RT-PCR bestimmt. Die jeweiligen Werte wurden auf *GAPDH* normiert und anschließend mit der 2^{-ddCT} Methode Vielfache in Bezug auf den leeren pCL6-Vektor berechnet. Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment.

Nach einer weiteren Woche Kultivierung waren allerdings auch die *EED3*-überexprimierenden Zellen zu über 90% CD56-positiv und auch die Verteilung der übrigen Oberflächenmarker hatte sich an das Bild der pCL6-transduzierten Kontrollzellen angeglichen (Abb. 41 A). Auffällig war hier, dass zu diesem Zeitpunkt nur in den unbehandelten Wildtypzellen eine CD16⁺ Population auftrat. Diese war eine Woche eher nicht nachweisbar, während zu diesem frühen Zeitpunkt beide lentiviral transduzierten Proben CD16-positiv Zellen enthielten, die eine Woche später nicht mehr detektiert werden konnten.

Nach sieben Wochen Kultivierung wurde auch deutlich, dass sich aus den *EED3*-überexprimierenden Zellen reife NK-Zellen entwickelt hatten (Abb. 41 B). Der Anteil NKG2A⁺/CD56⁺ und KIR2DL3⁺/CD56⁺ Zellen war mit 39 und 16% zwar noch deutlich geringer als in den wildtypischen Zellen, (NKG2A⁺/CD56⁺ ca. 52% und KIR2DL3⁺/CD56⁺ ca. 26%), die Zellen wiesen mit dieser Kombination an Oberflächenmarker jedoch essentielle Charakteristika reifer NK-Zellen auf.

Ergebnisse

A



B

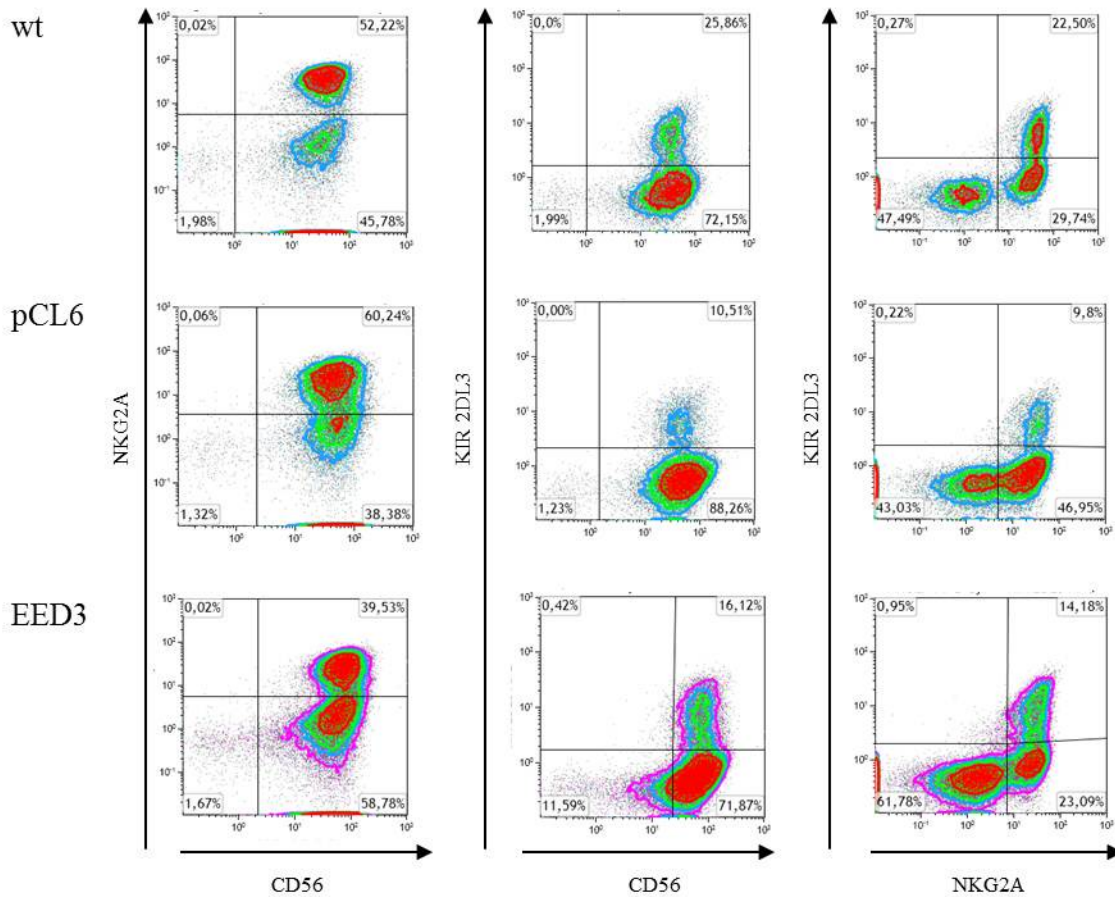


Abb. 41: Durchflusszytometrische Analyse einer NK-Zell-Generierungskultur mit *EED3*-Überexpression nach sieben Wochen.

Nach siebenwöchiger Generierung von NK-Zellen wurden *EED3*- und pCL6-transduzierte Zellen anhand ihrer GFP-Expression durchflusszytometrisch aufgereinigt. Gleichzeitig wurde hier und auch bei den uninfizierten Kontrollzellen die Expression mehrerer Oberflächenmarker durchflusszytometrisch bestimmt. In der Abbildung sind die Ergebnisse exemplarisch für die GFP-positiven Zellen, bzw., im Falle der uninfizierten Zellen, für die Gesamtpopulation, eines Experiments gezeigt.

5.6.1.1 Veränderung der Oberflächenmarker während der NK-Zell-Generierung

Während der NK-Zell-Generierung konnte nur in den *EED3*-transduzierten Zellen eine deutliche CD14-positive Population, die z.T. sogar ebenfalls für CD56-positiv war, nachgewiesen werden. Die unter 5.6.1 beschriebenen Ergebnisse geben jedoch keinerlei Hinweis darauf, ob diese Population spezifisch für die Überexpression von *EED3* ist, oder ob sie allgemein in einem relativ frühen Stadium der NK-Zell-Generierung, welches durch eine beginnende Expression von CD56 gekennzeichnet ist, auftritt. Da in der Literatur beschrieben ist, dass NK-Zell-Generierungskulturen zu frühen Zeitpunkten auch myeloide Zellen aufweisen [297,312], wurden weitere Generierungen durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Kontrollzellen auch myeloide Marker exprimieren, wenn sie erst zu einem geringen Anteil positiv für CD56 sind. Hierzu wurden die pCL6-transduzierten sowie die Wildtyp Kontrollzellen innerhalb der ersten drei Wochen der Generierung regelmäßig durchflusszytometrisch analysiert, bis die Kultur ein Stadium erreicht hatte, in dem ca. 20% der Zellen CD56-positiv war. Anschließend wurden die Kulturen weitergeführt, und zum Ende der Generierung nach sechs Wochen erneut durchflusszytometrisch untersucht. Zu diesem Zeitpunkt wurden auch die *EED3*-transduzierten Zellen, die vorher aufgrund ihrer geringen Anzahl nicht analysiert werden konnten, untersucht (Abb. 42). Es stellte sich heraus, dass die pCL6-transduzierten Kontrollzellen nach ca. zwei Wochen, als etwa 14% der Zellen CD56-positiv waren, auch die myeloischen Marker CD13, CD14 und HLA-DR auf der Oberfläche trugen. Eine Kombination von CD14 und CD56 konnte allerdings nicht beobachtet werden. Die Populationen, die HLA-DR oder CD14, beides Marker für reife myeloische Zellen, auf der Oberfläche trugen, waren mit ca. 14-20% eher klein, während beinahe 60% der Zellen positiv für den frühen myeloischen Marker CD13 waren. Ein ähnliches Bild konnte bei den uninfizierten Zellen beobachtet werden (vgl. Anhang Abb. 50). Zum Ende der Generierung, als die Rate der CD56-positiven Zellen in allen Kulturen auf über 90% angestiegen war, war die Expression der myeloischen Marker in keiner Probe (auch der *EED3*-transduzierten Probe nicht) mehr nachweisbar. Einzig CD16 wurde hier noch von den

Ergebnisse

transduzierten Zellen exprimiert, während es bei den uninfizierten Zellen zu diesem Zeitpunkt nicht detektiert werden konnte.

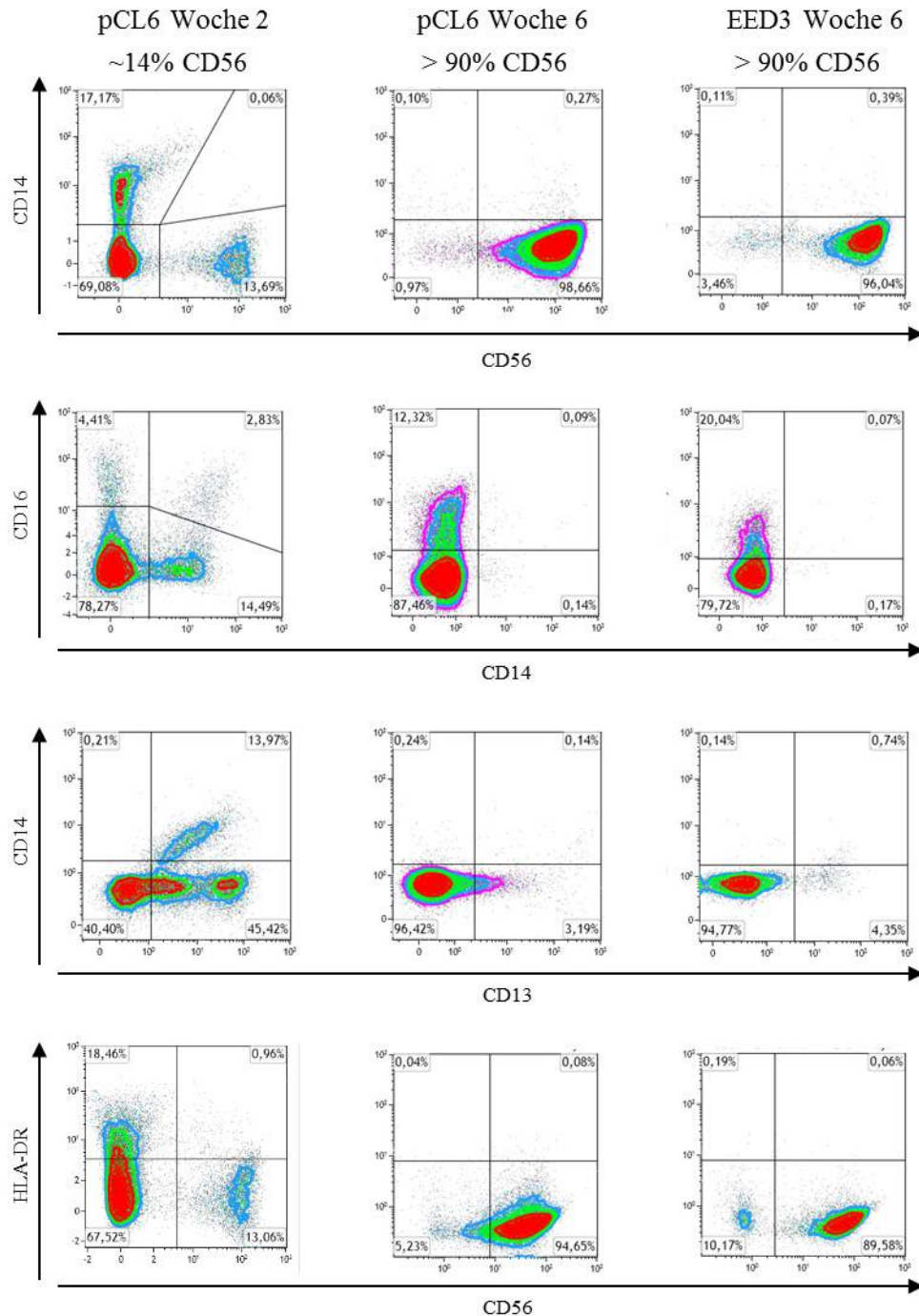


Abb. 42: Durchflusszytometrische Analyse einer NK-Zell-Generierungskultur nach zwei und sechs Wochen.

pCL6-transduzierte Zellen wurden nach zwei (links) und sechs (Mitte) Wochen Generierung von NK-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Nach sechswöchiger Generierung wurden ebenfalls *EED3*-transduzierte Zellen (rechts) analysiert. In der Abbildung sind die Ergebnisse exemplarisch für die GFP-positiven Zellen eines Experiments gezeigt.

5.6.1.2 Einfluss der *EED1*-Überexpression auf die NK-Zell-Generierung

Um festzustellen, ob *EED1* und *EED3* die gleichen Auswirkungen auf die Generierung von NK-Zellen haben, wurden die obigen Experimente z.T. auch mit *EED1*-überexprimierenden Zellen durchgeführt. Hier zeigte sich allerdings, dass die Zellen dieses Überexpressionskonstrukt äußerst schlecht tolerierten. So war die anfängliche Transfektionseffizienz mit nur 0,18% GFP-positiven Zellen noch geringer als bei *EED3* (0,64%). Die Zellen wuchsen in der Generierungskultur ebenso wie die *EED3*-überexprimierenden insgesamt vergleichbar mit den Kontrollzellen, die Zunahme an GFP-exprimierenden Zellen war jedoch deutlich schwächer (27% GFP⁺) als bei den pCL6-transduzierten Kontrollen (83%) und den *EED3*-transduzierten (53%), was detaillierte Analysen erschwerte (Abb. 43 A). Es zeigte sich allerdings, dass, ebenso wie bei der Überexpression von *EED3*, die Entwicklung der Zellen im Vergleich zu den Kontrollzelle verzögert ablief. So exprimierten bei den *EED*-transduzierten nach sechs Wochen Generierungskultur nur ca. 37% (*EED1*) bzw. 27% (*EED3*) der Zellen CD56 während beide Kontrollproben zu diesem Zeitpunkt schon um die 90% CD56⁺ Zellen aufwiesen (Abb. 43). Wie oben beschrieben, war auch hier zu beobachten, dass in den Proben, die wenige CD56⁺ Zellen aufwiesen viele CD14- und CD16-positive Zellen auftraten. Diese Populationen waren bei den *EED1*-überexprimierenden Zellen mit ca. 22% CD16⁺/CD56⁻ und ca. 36% CD14⁺/CD56⁻ sogar etwas stärker als bei den *EED3* überexprimierenden (13% CD16⁺/CD56⁻ und 27% CD14⁺/CD56⁻) aus demselben Nabelschnurblut. Auch die Population der CD14⁺/CD56⁺ doppelpositiven Zellen konnte hier nachgewiesen werden. Sie war mit ca. 6% in den *EED1*-transduzierten Zellen ebenfalls stärker ausgeprägt als in den *EED3*-transduzierten, wo sie nur etwa 2% betrug (Abb. 43 B).

Ergebnisse

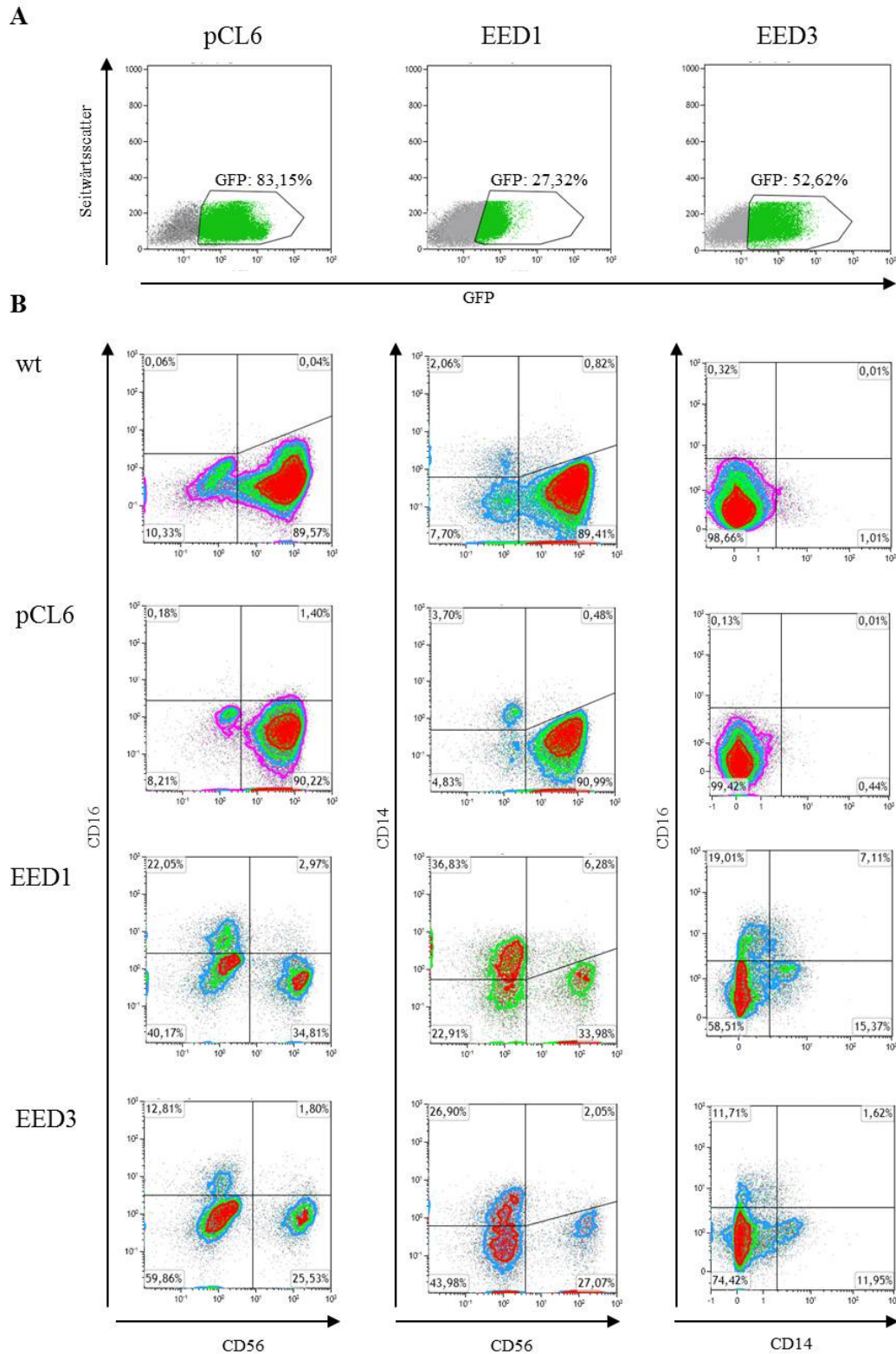


Abb. 43: Durchflusszytometrische Analyse einer NK-Zell-Generierungskultur mit Überexpression von *EED1* und *EED3* nach sechs Wochen. Nach sechswöchiger Generierung von NK-Zellen wurden *EED1*, *EED3* und pCL6 transduzierte Zellen anhand ihrer GFP-Expression durchflusszytometrisch aufgereinigt (A). Gleichzeitig wurde hier, sowie bei den uninfierten Kontrollen, die Expression mehrerer Oberflächenmarker durchflusszytometrisch bestimmt (B). Es sind die Ergebnisse exemplarisch für die GFP-positiven Zellen, bzw., im Falle der uninfierten Zellen, für die Gesamtpopulation, eines Experiments gezeigt.

5.6.2 Einfluss der Reduktion von *EED* auf die NK-Zell-Generierung

Um zu überprüfen, ob die Reduktion von *EED* eine Auswirkung auf das lymphoide Entwicklungspotential von HPC hat, wurde, wie oben beschrieben, eine *in vitro* NK-Zell-Generierung durchgeführt. In diesem Fall wurden die frisch isolierten CD34⁺ HPC mit *EED* shRNA2 und 3 transduziert. Diese beiden shRNAs wurden ausgewählt, da shRNA2 als siRNA in der Literatur zu einer starken Reduktion der *EED*-Expression geführt hat [220] und auch in dieser Arbeit in Hela-Zellen einen solchen Effekt hatte (Abb. 37). Die Reduktion der *EED*-Transkripte in Jurkat-Zellen war hingegen bei Transduktion von *EED* shRNA3 am stärksten (Abb. 36). Als Kontrollen wurden neben uninfizierten Zellen solche verwendet, die mit dem leeren pCL2 Vektor oder der Luc shRNA, die im humanen System keine Ziel-Sequenz besitzt, transduziert wurden.

Wie auch bei der Überexpression, war die Infektionseffizienz bei der Herabregulation mit 1,29% GFP-positiven Zellen bei shRNA2 und bis zu 6,31% GFP-positiven bei pCL2 sehr gering, sodass die infizierten Zellen zu Beginn der Generierung anhand ihrer Expression von GFP durchflusszytometrisch aufgereinigt wurden.

Zu diesem Zeitpunkt wurde aus den aufgereinigten Zellen auch RNA isoliert und auf die Expression der PRC2 Komponenten hin untersucht (Abb. 44). Es zeigte sich, dass beide shRNAs die Expression von *EED* deutlich, auf ca. 58% (*EED* shRNA2) bzw. 27% (*EED* shRNA3), reduzierten. Wie bei der Überexpression von *EED* in den frisch isolierten HPC, konnte auch hier beobachtet werden, dass, im Gegensatz zu den Versuchen in der Zellkultur, die Expression der beiden anderen Komponenten des PRC2, *EZH2* und *SUZ12*, die von *EED* folgte und somit ebenfalls, und auch in einem vergleichbaren Ausmaß, reduziert war.

Ergebnisse

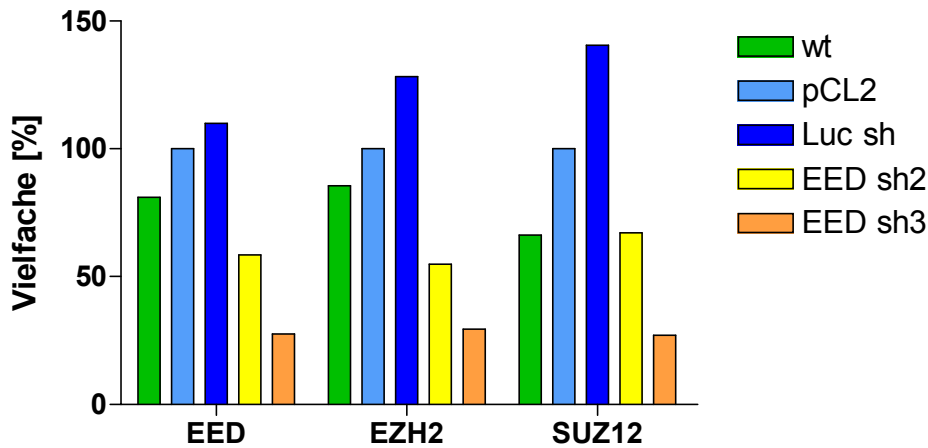


Abb. 44: Expression der drei Kernkomponenten des PRC2 nach ca. zweieinhalb Wochen NK-Zell-Generierung mit Herabregulation von EED.

CD34⁺ HPC wurden mit *EED* shRNA2 (gelb) oder 3 (orange) infiziert. Als Kontrollen dienten uninfizierte Wildtypzellen (grün), sowie mit dem leeren pCL2-Vektor (hellblau) oder der *Luc* shRNA (dunkelblau) transduzierte Zellen. Die Zellen befanden sich etwa zweieinhalb Wochen in der NK-Zell-Generierungskultur, und wurden dann anhand ihrer Expression von GFP durchflusszytometrisch aufgereinigt. Die Expression von *EED*, *EZH2* und *SUZ12* in den GFP-positiven Zellen bzw. in der Gesamtpopulation der uninfizierten Zellen (grün) wurde mittels Real-Time RT-PCR bestimmt. Die jeweiligen Werte wurden auf *GAPDH* normiert und anschließend mit der 2^{-ddCT} Methode Vielfache in Bezug auf den leeren pCL2-Vektor berechnet. Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment.

Am Ende der Generierung nach sechs Wochen wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker hin analysiert. Es zeigte sich, dass in diesen Kulturen die GFP-Expression besser erhalten blieb, als im Falle der Überexpression. So wiesen auch nach sechs Wochen noch alle Kulturen mindestens 66% GFP-positive Zellen auf (Abb. 45 A). Dies entsprach mindestens einer vierfach Nettoexpansion der GFP-exprimierenden Zellen und auch die Gesamtexpansion bewegte sich in dieser Größenordnung. Interessanterweise expandierten die Zellen, die mit *EED* shRNA3 transduziert waren sogar deutlich stärker, als die mit den Kontrollvektoren transduzierten, sowohl, was die Gesamtzellzahl angeht, als auch, was die GFP-positiven Zellen betrifft. Nach sechs Wochen Generierung war keine Verzögerung in der Entwicklung zu beobachten (Abb. 45). Alle Kulturen waren zu diesem Zeitpunkt ungefähr 80% CD56-positiv und wiesen in etwa das gleiche Muster bei der Expression von CD14, CD16 und CD56 auf. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch bei einem zu Anfang nicht durchflusszytometrisch aufgereinigten Teil derselben Generierungskultur die Expression der NK-Zellspezifischen Oberflächenmarker NKG2A und KIR2DL3 gemessen. Hierbei zeigte sich, dass die Zellen sich trotz Reduktion der *EED*-Expression weiterhin zu NK-Zellen entwickeln konnten.

Ergebnisse

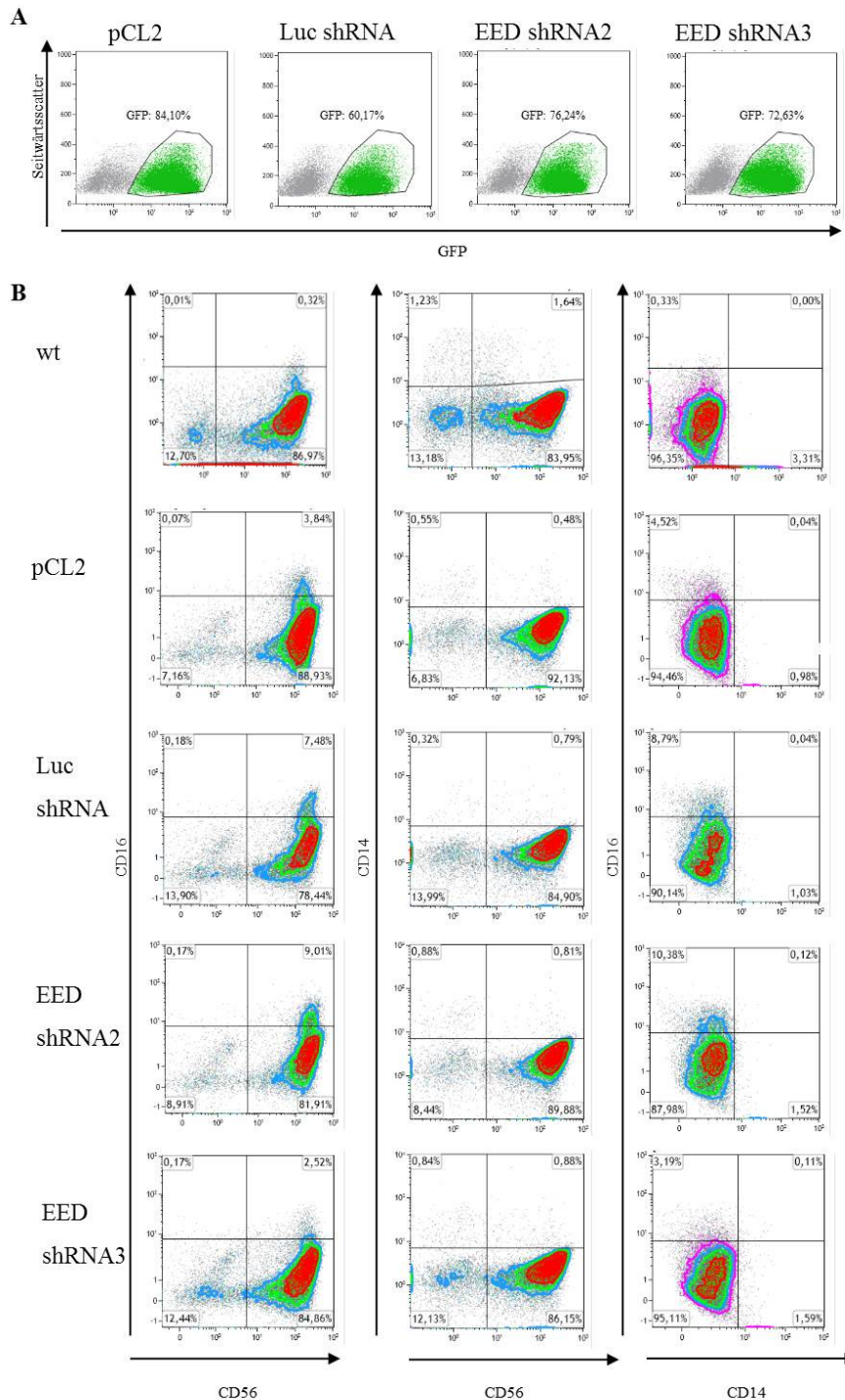


Abb. 45: Durchflusszytometrische Analyse einer NK-Zell-Generierungskultur mit Herabregulation von *EED* nach sechs Wochen.

Nach sechswöchiger Generierung von NK-Zellen wurden die mit *EED* shRNA2 oder 3, sowie die mit pCL2 oder der *Luc* shRNA transduzierten Zellen anhand ihrer GFP-Expression durchflusszytometrisch aus der Kultur herausortiert (A). Gleichzeitig wurde hier, sowie bei den uninfizierten Kontrollen, die Expression mehrerer Oberflächenmarker durchflusszytometrisch bestimmt (B). Es sind exemplarische Ergebnisse für die GFP-positiven Zellen, bzw., im Falle der uninfizierten Zellen, für die Gesamtpopulation, eines Experiments gezeigt.

Ergebnisse

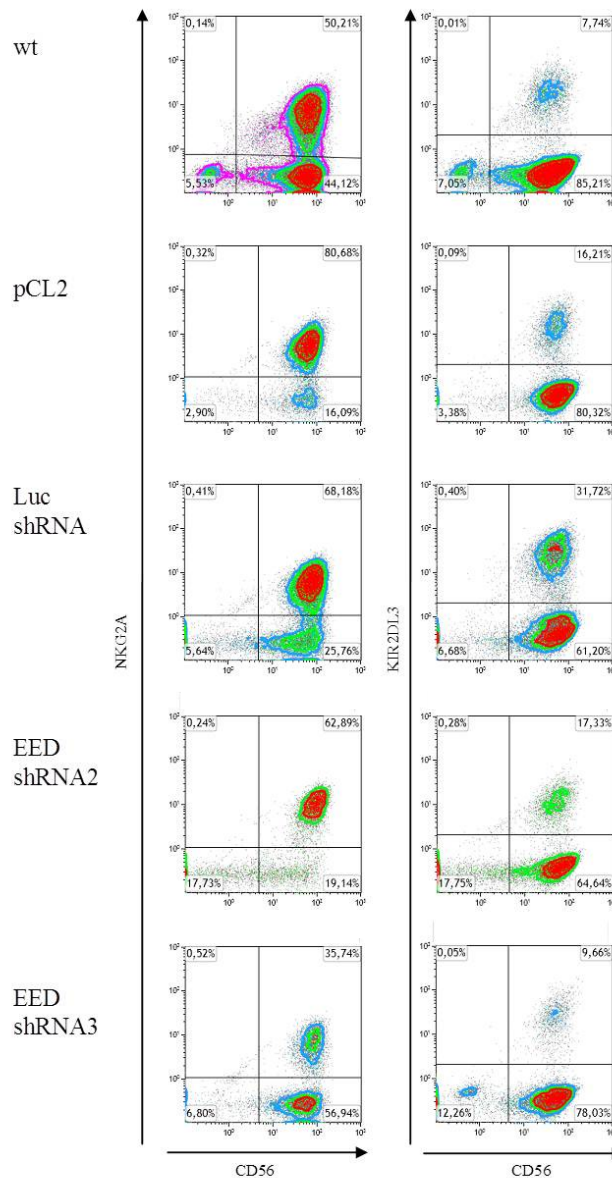


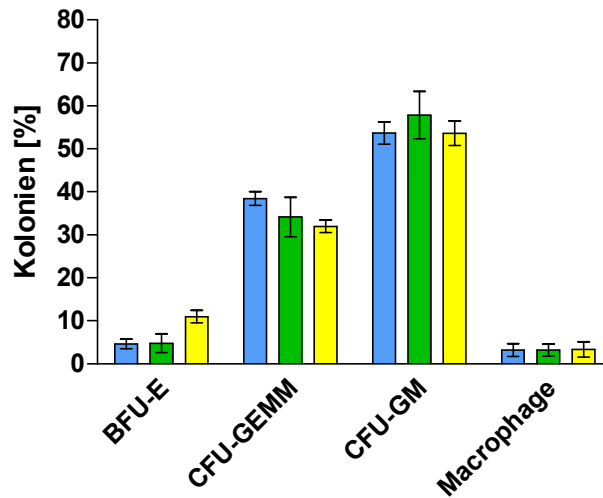
Abb. 46: Durchflusszytometrische Analyse einer zu Beginn nicht sortierten NK-Zell-Generierungskultur mit Herabregulation von *EED* nach sechs Wochen.

Nach sechswöchiger Generierung von NK-Zellen wurden die mit *EED* shRNA2 oder 3, sowie die mit pCL2 oder der *Luc* shRNA transduzierten Zellen, die am Anfang der Generierung nicht auf die Expression von GFP hin sortiert wurden, im Durchflusszytometer analysiert. Es sind exemplarische Ergebnisse für die GFP-positiven Zellen, bzw., im Falle der uninfizierten Zellen, für die Gesamtpopulation, eines Experiments gezeigt. Die hier gezeigten Proben stammten ursprünglich aus derselben Kultur, wie die in Abb. 45 gezeigten Proben.

5.6.3 Einfluss der *EED*-Überexpression auf die Myelopoiese

Um herauszufinden, ob die Überexpression von *EED3* die Myelopoiese beeinflusst, wurden Kolonie-Assays durchgeführt. Hierzu wurden zunächst, wie für die Generierung von NK-Zellen auch, CD34⁺ HPC aus Nabelschnurblut isoliert und mit Überexpressionskonstrukten für *EED3* bzw. dem leeren pCL6 Vektor als Kontrolle lentiviral transduziert. Als weitere Kontrolle wurden uninfizierte Zellen mitgeführt. 16-20 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen auf murine *Feeder* Zellen ausplattiert und anschließend für eine Woche wie unter 4.2.3.6 beschrieben, in NK1-Medium kultiviert. Anschließend wurde eine festgelegte Anzahl GFP-positiver Zellen, bzw. Gesamtzellen im Falle der uninfizierten Kontrolle, durchflusszytometrisch aufgereinigt und direkt in vorbereitetes MethoCult Medium überführt. Hierbei wurden nur Zellen heraussortiert, die kein CD14 exprimierten. Außerdem wurde zwischen CD34-positiven und negativen Zellen unterschieden. Nach ca. dreiwöchiger Kultivierung in MethoCult Medium wurden die unterschiedlichen Koloniearten im Lichtmikroskop ausgezählt (Abb. 47).

A



B

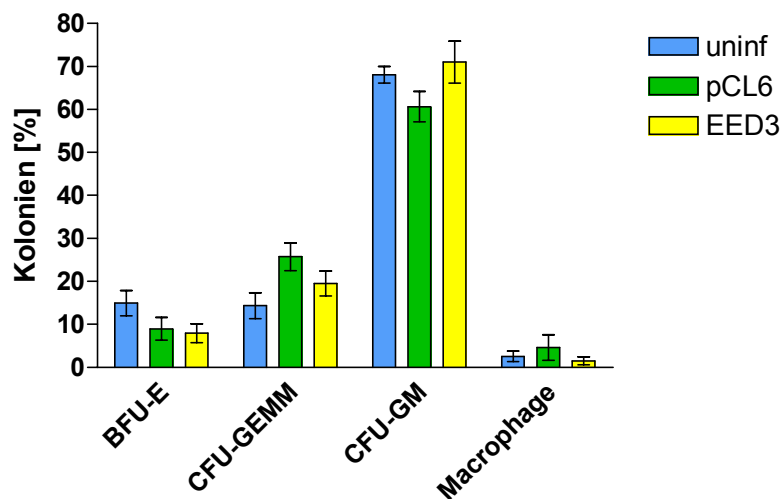


Abb. 47: Kolonie-Assay nach Überexpression von *EED3*.

Jeweils 500 oder 1000 GFP⁺/CD14⁻/CD34⁺ (A) oder GFP⁺/CD14⁻/CD34⁻ (B) Zellen wurden eine Woche nach Infektion mit *EED3* oder dem leeren pCL6 Kontrollvektor direkt in MethoCult Medium sortiert. Im Falle der uninflzierten Kontrollzellen wurde dieselbe Anzahl CD14⁻/CD34⁺ oder CD14⁻/CD34⁻ verwendet. Die entsprechenden Proben wurden auf drei Wells einer 24-Well-Platte aufgeteilt und drei Wochen lang kultiviert. Anschließend wurden die einzelnen Kolonien im Lichtmikroskop ausgezählt. Für jede Probe wurde einzeln der Anteil der entsprechenden Kolonien an der Gesamtzahl der Kolonien bestimmt und dann der Mittelwert gebildet. Die Fehlerbalken entsprechen der Standardabweichung der sechsfach Bestimmungen. Dargestellt ist ein exemplarisches Experiment.

Wie in Abb. 47 dargestellt, war die Verteilung der verschiedenen Koloniearten in allen drei Proben ähnlich. Auch die Gesamtzahl der Kolonien war meist in allen Proben ähnlich, wobei die Kolonien in den uninfizierten Proben etwas größer als in den infizierten waren und die Anzahl der Kolonien in den *EED3*-überexprimierenden, abhängig vom Nabelschnurblut, teilweise etwas geringer war, als bei den Kontrollzellen. Insgesamt kann man daher nur von einer geringfügigen infektionsbedingten Verlangsamung des Wachstums sprechen. Zwischen $CD34^+$ und $CD34^-$ Zellen gab es kleine Unterschiede bezüglich der Kolonieverteilung. So war in den $CD34^-$ Zellen in allen Proben der Anteil an CFU-GM-Kolonien mit ca. 70% etwas höher als in den $CD34^+$ Zellen.

Man muss bei der Auswertung der Kolonieassays allerdings beachten, dass der Anteil der GFP-positiven Zellen nach dreiwöchiger Kultivierung stark reduziert war. Im besten Falle betrug er noch 30%, sodass sich schwache überexpressionsbedingte Effekte in diesem System nicht klar zeigen können (Abb. 48).

Ergebnisse

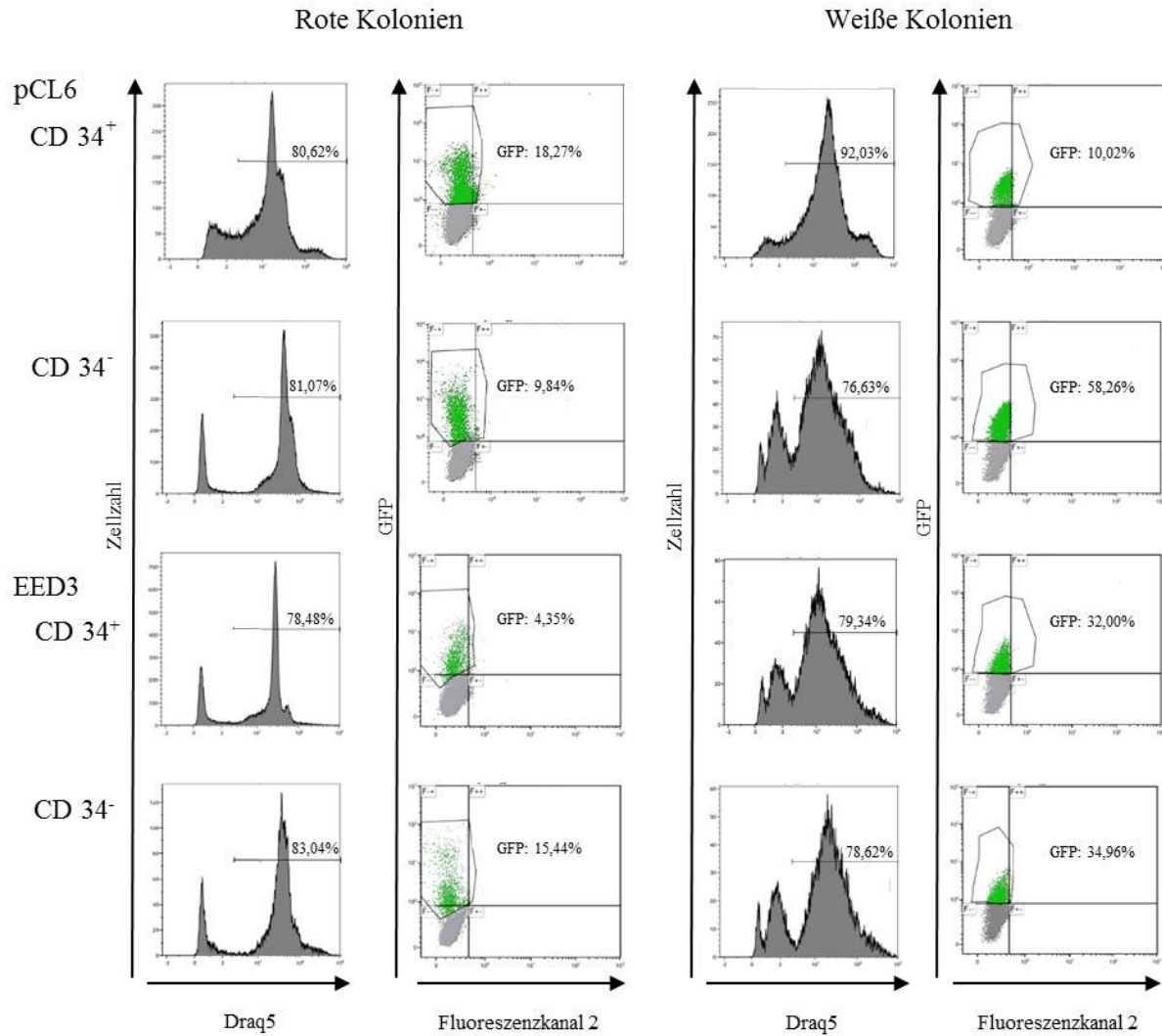


Abb. 48: Durchflusszytometrische Analyse der Zellen eines Kolonieassays.

Kolonien, die einen, wenn auch z.T. geringfügigen, Anteil an roten Zellen aufwiesen und solche, die ausschließlich aus weißen Zellen bestanden, wurden unter dem Lichtmikroskop mit Hilfe einer Pipette voneinander getrennt. Anschließend wurden die lebenden Zellen mit dem Kernfarbstoff Draq5 angefärbt und durchflusszytometrisch auf die Expression von GFP hin untersucht. Dargestellt ist jeweils ein exemplarisches Experiment.

6. DISKUSSION

6.1 Identifikation von *EED* als epigenetischen Masterregulator der Alterung in der Hämatopoiese

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob und wie epigenetische Masterregulatoren die Alterung von humanen Stammzellen beeinflussen. Hämatopoietische Stamm- und Progenitorzellen stellen hierfür ein attraktives Modell dar, da die Hämatopoiese zu den am besten untersuchten Differenzierungsprozessen im humanen System gehört und da das Immunsystem zugleich einen entscheidenden Beitrag zu Gesundheit und Lebensqualität im Alter leistet [43,49,51]. Des Weiteren können hämatopoietische Progenitorzellen (HPC) in einer für molekularbiologische und funktionale Untersuchungen ausreichenden Menge aus Nabelschnurblut, Knochenmark oder nach Mobilisierung auch aus peripherem Blut isoliert werden [10,279-282], sodass es möglich ist die physiologische Alterung anhand der Analyse von HPC aus Donoren unterschiedlichen Alters nachzuvollziehen.

Zur Identifikation von epigenetischen Masterregulatoren der Alterung wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst ein Screening von Faktoren, die eine Rolle bei der DNA-Methylierung, der Modifikation von Histonen oder der Verpackung von DNA spielen, durchgeführt (Abb. 12). Zusätzlich wurden in diesem Screening auch einige wichtige Regulatoren der Stammzellentwicklung, die eng mit epigenetischen Modifikationen interagieren, untersucht.

Ziel dieses Screenings war es zunächst durch den Vergleich von HPC aus jungen und alten Individuen Faktoren mit altersbedingter differenzieller Expression herauszufiltern. Unter den 43 Kandidaten, deren Expression in CD34⁺ HPC aus Nabelschnurblut sowie aus mobilisiertem peripherem Blut und Knochenmark erwachsener Donoren untersucht wurde, zeichneten sich insbesondere die drei Faktoren *SOX2*, *SIRT4* und *EED* durch erhöhte Expression in den Proben der Erwachsenen aus (Abb. 12 A). Da *EED* eine wichtige Rolle im Polycomb Repressiven Komplex 2 (PRC2) spielt, der in die Entwicklung, Differenzierung, Alterung und Entartung von hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen involviert ist, und da über die Rolle von *EED* in diesen Prozessen bislang nur wenig bekannt war, wurde der Focus dieser Arbeit auf die Funktion von *EED* in der Alterung von humanen HPC gelegt.

EED ist untrennbar mit den beiden anderen PRC2 Kernkomponenten *EZH2* und *SUZ12* verbunden, während die Histondemethylasen *JMJD3* und *UTX* der PRC2-vermittelten repressiven Histonmodifikation H3K27me₃ entgegen wirken, weshalb alle diese Faktoren mit in die Analysen einbezogen wurden (Abb. 14).

Um ein genaues Bild von den altersassoziierten Veränderungen der PRC2 Expression und der Expression der Antagonisten zu erhalten, wurden die mRNA-Levels für alle Faktoren in einer erweiterten Stichprobe von CD34⁺ HPC sowie auch in CD34 depletierten Leukozyten analysiert. Die Transkriptmessungen in dieser erweiterten Stichprobe ergaben, dass vor allem die Expression von *EED* sowohl in den CD34⁺ HPC als auch in den CD34 depletierten Leukozyten in den Proben der Erwachsenen signifikant gegenüber denen aus Nabelschnurblut erhöht war (Abb. 14 A, C). Die *EZH2* Expression war in den Zellen der Erwachsenen nur leicht, wenn auch im Falle von Knochenmark signifikant, erhöht. Die *SUZ12* Expression nahm hingegen geringfügig ab (Abb. 14 A, C). Bei allen drei Faktoren des PRC2 gab es zwischen den beiden verwendeten Stammzellquellen der erwachsenen Spender, Apheresat und Knochenmark, nur quantitative jedoch keine qualitativen Unterschiede.

Die Ergebnisse in dieser Arbeit demonstrieren, dass die Expression von *EED* und in einem geringeren Ausmaße auch die von *EZH2* im Gegensatz zu der von *SUZ12* sowohl in humanen HPC, als auch in humanen CD34 depletierten Leukozyten mit zunehmendem Alter ansteigt. Diese Beobachtung ist vor allem deshalb interessant, weil es diesbezüglich im humanen System noch keine Daten gibt, während Untersuchungen aus dem murinen System zeigen, dass *Ezh2* im Zuge der Alterung in HSC herabreguliert wird [62]. Daneben verbessert die *Ezh2* Überexpression jedoch auch die Fähigkeit von murinen HSC zur seriellen Transplantation [212], was zeigt, dass eine erhöhte Menge an *Ezh2* die Lebensdauer und das regenerative Potential dieser Zellen verlängern kann.

Über die Expressionsdaten hinaus konnte in der vorliegenden Arbeit zusätzlich gezeigt werden, dass die erhöhte *EED*-Expression auch mit einem deutlichen altersabhängigen Anstieg der Polycomb-vermittelten repressiven Histonmodifikation H3K27me3 einherging (Abb. 19). Um herauszufinden, ob der beobachtete altersabhängige Anstieg an H3K27me3 tatsächlich auf einer Zunahme von *EED* beruht, wurden Überexpressionsstudien durchgeführt, die eindeutig einen funktionalen Zusammenhang zwischen *EED*-Expressionsstärke und H3K27me3-Menge aufzeigen (Abb. 28-Abb. 30). Um des Weiteren auch die physiologische Relevanz dieser, durch die altersassoziierte *EED*-Überexpression verursachten, epigenetischen Veränderungen zu untersuchen, wurde ein *in vitro* Modell der Hämatopoiese etabliert, bei dem die Expressionsstärke von *EED* in HPC lentiviral reguliert wurde. Es zeigte sich, dass die Überexpression von *EED* die Myelopoiese nicht beeinflusste (Abb. 47), während bei der Ausdifferenzierung in die lymphoide Linie verstärkt Vorläuferzellen mit myeloiden Markern auftraten (Abb. 39-Abb. 41). Somit könnte eine erhöhte *EED*-Expression

in HPC älterer Individuen eine Ursache für die bekannte altersassoziierte Verschiebung des Gleichgewichts in der Hämatopoiese zu Gunsten der Myelopoiese darstellen [68,69,71,72].

6.1.1 Der Einfluss der PRC2-Antagonisten auf die altersassoziierte Zunahme von H3K27me3 ist vernachlässigbar

Die Expressionsdaten der PRC2 Antagonisten *JMJD3* und *UTX* lassen widersprüchliche Schlüsse zu. Im Falle von *JMJD3* konnte im Zuge der Alterung in Apheresatproben eine signifikante Zunahme beobachtet werden, während die Expression im Knochenmark nur leicht ($CD34^-$) bzw. gar nicht ($CD34^+$) erhöht war. Die Expression des zweiten Antagonisten, *UTX*, hingegen war in allen Proben aus Erwachsenen geringer, als in denen aus Nabelschnurblut (Abb. 14 B, D).

Während also die im Alter erhöhte Menge von *JMJD3* eher der PRC2 vermittelten altersassoziierten Zunahme von H3K27me3 entgegenwirken sollte, ist es möglich, dass der Rückgang von *UTX* den globalen Anstieg von H3K27me3 fördert. Da die Abnahme von *UTX* im Vergleich zur gleichzeitigen Zunahme von *EED* jedoch sehr gering ist, und da zusätzlich in dieser Arbeit auch der funktionale Zusammenhang zwischen *EED*-Überexpression und erhöhter H3K27me3-Menge gezeigt werden konnte, ist es unwahrscheinlich, dass der Rückgang von *UTX* allein für die im Zuge der Alterung beobachtete Zunahme von H3K27me3 verantwortlich ist.

6.1.2 G-CSF übt keinen Einfluss auf die Expression von *EED* aus

Mit Ausnahme von *JMJD3* gab es keine qualitativen Unterschiede bei den Expressionsstärken der untersuchten Faktoren zwischen Zellen aus Knochenmark und Apheresat. Dies deutet darauf hin, dass die Mobilisierung der HPC durch G-CSF sich nicht auf die Expression der untersuchten Faktoren auswirkt. Um dies zu bestätigen, wurden bei vier Spendern $CD34^-$ Zellen vor und nach Gabe von G-CSF analysiert (Abb. 15). Hier zeigte sich, dass die Expression aller analysierten Faktoren nach G-CSF-Gabe zurückging. Im Falle von *EED*, *EZH2* und *JMJD3* war diese Beobachtung der altersassoziierten Zunahme komplett entgegengerichtet, sodass hier ausgeschlossen ist, dass die Zunahme der Expression in der Alterung nur ein Artefakt der G-CSF-Gabe ist. Bei *SUZ12* und *UTX* ist ein Einfluss von G-CSF auf die Expression nicht völlig ausgeschlossen, da ein Expressionsrückgang sowohl in der Alterung, als auch bei G-CSF-Gabe beobachtet wurde. Allerdings war bei beiden Faktoren auch im Knochenmark der erwachsenen Donoren die Expression geringer als im

Nabelschnurblut, sodass man davon ausgehen kann, dass der G-CSF-Effekt hier nur eine sekundäre Rolle spielt.

6.1.3 Die *EED* Expression steigt mit zunehmendem Alter weiter an

Durch die parallele Untersuchung von CD34⁺ HPC und CD34 depletierten Leukozyten wurde deutlich, dass sich, mit Ausnahme von *JMJD3*, die Expression aller untersuchten Faktoren in beiden Zelltypen gleich verhielt. Dies kann man sich zu Nutze machen, um vom Expressionsmuster der Leukozyten von Spendern älter als 55 Jahre auf ihre hämatopoietischen Progenitorzellen zu schließen. Da Spender, die älter als 55 Jahre sind, in Düsseldorf, wie in den meisten anderen Transplantationszentren, von der Stammzellfremdspende ausgeschlossen sind, ist es kaum möglich HPC gesunder älterer Menschen zu erhalten. Eine Quelle hierfür wäre Knochenmark, das beim Einsetzen von Hüftprothesen gewonnen werden kann. Hierbei gibt es allerdings einige Schwierigkeiten. Zum einen kann man meist nur sehr geringe Mengen HPC aus diesen Proben isolieren, und die Qualität der gewonnenen mRNA ist nur selten ausreichend für umfangreiche Analysen. Zum anderen muss man beachten, dass viele in Frage kommende ältere Menschen Medikamente wie Cortison einnehmen, die die Hämatopoese beeinflussen, oder dass die Operation in Folge eines Sturzes durchgeführt werden muss, was bedeutet, dass eine Entzündungsreaktion vorliegt, die gerade im Bereich des Bruchs die Zusammensetzung der Blutzellen verändert. Aus diesen Gründen wurden in dieser Arbeit nur differenzierte Zellen gesunder älterer Spender untersucht. Die entsprechenden Daten zeigen jedoch deutlich, dass auch in höherem Alter die Expression von *EED* gegenüber Spendern mittleren Alters noch einmal ansteigt (Abb. 16). Es handelt sich hierbei also tatsächlich um einen altersassoziierten Effekt und ist nicht mit entwicklungsbedingten Unterschieden von Zellen vor und nach der Pubertät zu erklären.

Wie von Kamminga *et al.* in seriellen Transplantationen gezeigt wurde, ist eine Erhöhung der Ezh2-Menge in murinen HSC damit verbunden, dass diese ihr regeneratives Potential länger behalten, als Zellen mit wildtypischer Ezh2-Expression [212]. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass eine moderat erhöhte PRC2-Menge die gesunde Lebensspanne von HSC erhöht. Somit könnte der in dieser Arbeit gemessene Anstieg der *EED*-Menge ebenfalls in Zusammenhang mit einer gesunden Alterung stehen. Auf der anderen Seite deuten Ergebnisse von Herrera-Merchan *et al.* darauf hin, dass Ezh2-Überexpression in murinen HSC das Entstehen von myeloproliferativen Erkrankungen fördert [313], sodass die erhöhte *EED*-Expression in älteren Probanden eine Erklärung für die im Alter häufig zu beobachtende

Entartung von Blutzellen liefern könnte. Da die Polycomb-Menge, die für eine korrekte Genregulation notwendig ist, in Stammzellen allgemein wenig Spielraum hat [245], ist es gut möglich, dass eine initial positive Auswirkung der Erhöhung eines Polycomb-Faktors sich mit der Zeit ins Negative umkehrt.

Neben einem generellen altersassoziierten Anstieg der *EED*-Menge fällt auch auf, dass mit zunehmendem Alter das Expressionsniveau von *EED* stärker streut als bei Menschen mittleren Alters und vor allem als in Nabelschnurblut. Dies korreliert mit Beobachtungen, die auf der Ebene der DNA-Methylierung gezeigt haben, dass im Alter die epigenetischen Unterschiede zwischen den einzelnen Menschen zunehmen [109,110]. Daneben ist auch bekannt, dass Menschen, deren Immunsystem im Alter dem eines jungen Menschen ähnelt, meistens bei besserer Gesundheit sind, als Menschen, deren Immunsystem die alterstypischen Veränderungen aufweist [51]. Daher wäre es interessant, die Extrema der *EED*-Expression in einer erweiterten Stichprobe mit dem allgemeinen Gesundheitszustand der Spender zu korrelieren, um zu sehen, ob *EED*-Expression als Marker für die gesunde Alterung dienen kann. Niedrige *EED*-Expression könnte ein Zeichen für ein jugendliches, gesundes Immunsystem sein. Ein moderater Anstieg an *EED*-Transkript ermöglicht es vielleicht, dass HPC besser in der Lage sind die altersbedingt veränderten Ansprüche in der Hämatopoiese zu erfüllen, während zu viel *EED*-Transkript wiederum zu einer Entartung der Zellen führen könnte.

6.1.4 Die Polycomb vermittelte repressive Histonmodifikation H3K27me3 nimmt im Alter zu

Mittels eines modifizierten ELISAs, der eine direkte Normierung auf Histon H3 ermöglicht, konnte in dieser Arbeit erstmalig gezeigt werden, dass der Anstieg der *EED*-Expression in HPC von Erwachsenen mit einem Anstieg der PRC2-vermittelten Histonmodifikation H3K27me3 korreliert. Da bekannt ist, dass sich im Alter die Menge der Histone insgesamt reduziert [271,272], wurde, in Zusammenarbeit mit dem Institut für Rechtsmedizin, das verwendete FPLC und ELISA-basierte Verfahren zur Normierung auf die Gesamtmenge an Histon H3 entwickelt. Hierfür benötigt man noch eine sehr große Zellzahl, da der Materialverlust bei den einzelnen Schritten relativ hoch ist, sodass das Verfahren momentan nicht mit HPC durchführbar ist. Für größere Zellpopulationen wie z.B. Leukozyten, stellt es jedoch eine saubere Methode dar, um global Histonmodifikationslevel, korrigiert für Schwankungen in der Gesamt-Histonmenge, zu bestimmen.

Die ELISA-Ergebnisse nach vorgeschalteter H3-Aufreinigung zeigten, dass in den Leukozyten der Erwachsenen tatsächlich signifikant höhere Mengen an H3K27me3 vorlagen, als in denen aus Nabelschnurblut (Abb. 19). Sie geben jedoch keinen Aufschluss darüber, ob dies vorwiegend repetitive Sequenzen oder aber auch Gene betrifft. Aus diesem Grund, und um auch CD34⁺ HPC untersuchen zu können, wurden zusätzlich noch ChIP-Assays durchgeführt. Auf diesem Weg konnte gezeigt werden, dass es auch in HPC von Erwachsenen zu einem Anstieg an H3K27me3 kam, und dass dieser sowohl repetitive Elemente, als auch in der Literatur beschriebene PRC2-Zielgene wie den Östrogenrezeptor *ESR1* [165] betraf (Abb. 20 A, B).

6.2 Altersassoziierter Anstieg der antagonistischen Histonmodifikationen H3K27me3 und H3K4me3

Bislang wurden globale altersassoziierte epigenetische Veränderungen beinahe ausschließlich auf der Ebene der DNA-Methylierung untersucht [107,109,110], während die globalen Veränderungen von Histonmodifikationen bevorzugt in Differenzierungsmodellen analysiert wurden [126,205,314]. Es gibt jedoch aktuell weder Daten zur globalen Verteilung von H3K27me3 in humanen CD34⁺ HPC aus Nabelschnurblut, noch einen direkten Vergleich zwischen diesen Progenitorzellen und solchen aus Erwachsenen. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals die globalen Auswirkungen des altersassozierten H3K27me3-Anstiegs mittels ChIP-on-chip Analysen von HPC aus Nabelschnurblut und von Erwachsenen unter Verwendung von NimbleGen Promotor-Arrays analysiert. Hierbei bestätigte sich, dass in den Proben der Erwachsenen deutlich mehr Promotoren die repressive Histonmodifikation aufwiesen, als in den Proben der Neugeborenen. Zusätzlich war H3K27me3, wenn es in beiden Proben an demselben Promotor auftrat, in den HPC der Erwachsenen meist stärker als in denen aus Nabelschnurblut vorhanden (Abb. 21 A, B).

Da ebenfalls bislang keine Daten zu potentiellen altersassoziierten Veränderungen bei der globalen Verteilung der aktivierenden Histonmodifikation H3K4me3 existieren, wurde auch diese mittels ChIP-on-chip Assay im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht (Abb. 21 C, D). Dies ermöglichte zusätzlich die Analyse von altersassoziierten Veränderungen in der Verteilung von bivalenten Domänen, die sowohl die aktivierende als auch die repressive Histonmodifikation aufweisen, und für nicht oder nur schwach exprimierte Gene, die sich erst bei fortschreitender Differenzierung entweder in eine aktive oder inaktive Konformation auflösen, charakteristisch sind [126,128-130,205].

Auch für H3K4me3 war ein deutlicher altersassoziierter Anstieg zu beobachten. Hier waren sogar ca. 93% der Promotoren, die in einer der beiden Proben mit der Markierung assoziiert waren, entweder ausschließlich oder verstärkt in Apheresat betroffen (Abb. 21 C, D).

Betrachtet man beide Proben für sich, so erkennt man, dass in Nabelschnurblut über die Hälfte der modifizierten Promotoren H3K27me3 und nur ca. 40% der modifizierten Promotoren H3K4me3 aufwiesen (Abb. 22). In Apheresat waren insgesamt mehr Promotoren mit einer der beiden Markierungen assoziiert als in Nabelschnurblut, gleichzeitig kehrte sich das Verhältnis der Modifikationen zueinander um. So waren hier beinahe 60% der modifizierten Promotoren mit der aktivierenden Histonmodifikation verbunden, während nur knapp 40% die repressive Markierung aufwiesen (Abb. 22). Dies stellt eine Parallele zu den Beobachtungen auf DNA-Methylierungsebene dar [104,107]. Hier findet eine altersassozierte Hypomethylierung statt, die mit einer Genaktivierung einhergeht, was mit der in dieser Arbeit beobachteten Zunahme der aktivierenden Histonmodifikation korreliert.

Es gibt bis jetzt noch keine Daten, die den Alterungsprozess von Vertebraten direkt mit einer Veränderung der globalen Histonmodifikationslevels in Zusammenhang bringen. Allerdings konnte für *C. elegans* gezeigt werden, dass eine globale Reduktion von H3K4me3 mit einer Verlängerung der Lebenszeit assoziiert ist [315], während eine Reduktion von H3K27me3 die Lebenszeit von *Drosophila* verlängert [316], was darauf hin deutet, dass beide Modifikationen mit der Alterung zusammenhängen. Dies bestätigen auch die Daten dieser Arbeit, die zeigen, dass sowohl H3K27me3 als auch H3K4me3 in HPC älterer Donoren erhöht sind. Bei der Zunahme von H3K27me3 kann es sich um einen Mechanismus zur Kompensation der im Alter auftretenden DNA-Hypomethylierung handeln [104,107]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass sich DNA-Methylierung und H3K27me3 in vielen genomischen Bereichen, vor allem jedoch an Promotoren mit einem hohen CG-Gehalt, gegenseitig ausschließen [165,166,317]. Der Verlust von DNA-Methylierung, wie er auch im Alter zu beobachten ist, ermöglicht in murinen ES-Zellen, die keinerlei DNA-Methyltransferasen (DNMTs) exprimierten, erst das Auftreten von H3K27me3 an den betreffenden Loci [317]. Da die betroffenen Gene allerdings weiterhin reprimiert blieben, scheint das verstärkte Auftreten der repressiven Histonmodifikation einen kompensatorischen Mechanismus darzustellen, um die Expression von aberrant demethylierten Genen zu verhindern.

Auf der anderen Seite wurden in Tumorzellen jedoch auch Loci, an denen DNA-Methylierung und H3K27me3 gleichzeitig auftreten, gefunden [163,166,167,317,318]. Hier kann ein *Crosstalk* zwischen Polycomb Faktoren und DNMTs stattfinden, der dazu führt, dass die Gene, die in der Alterung H3K27me3 hinzugewonnen haben, mit der Zeit auch DNA-

Methylierung gewinnen. So nimmt zum einen die epigenetische Plastizität ab, zum anderen steigt aber auch das Risiko der aberranten Stilllegung von Tumorsuppressorgenen und damit das der Tumorentwicklung [161,162].

6.2.1 Globale Histonmodifikationsanalysen deuten auf eine fortschreitende Determinierung des Differenzierungspotentials in HPC aus älteren Individuen hin

Mit Hilfe von *Gene-Ontology* (GO)-Analysen wurden die Veränderungen in den Histonmodifikationen unterschiedlichen zellulären *Pathways* zugeordnet. Hierbei zeigte sich, dass die unterschiedlichen Histonmodifikationen in den HPC älterer Donoren deutlich andere Gengruppen betrafen, als in den HPC aus Nabelschnurblut.

Zunächst fielen hier die Gene auf, die eine Rolle in der Entwicklung oder Differenzierung spielen. Gehörten sie einem hämatopoiese-relevanten *Pathway* an, so waren sie in Apheresat verstärkt mit der aktivierenden Histonmodifikation H3K4me3 assoziiert. Im Gegensatz dazu wiesen Gene, die anderen Entwicklungslinien zugeordnet werden können, in Apheresat vermehrt die repressive Modifikation H3K27me3 auf (Abb. 23).

Viele entwicklungsrelevante Gene sind in ES-Zellen bivalent modifiziert, d.h. in ihrer Promotorregion findet man sowohl die repressive Histonmodifikation H3K27me3 als auch die aktivierende Modifikation H3K4me3. Im Zuge der Differenzierung lösen sich diese Domänen meist auf, sodass aktive Gene H3K4me3 und inaktive H3K27me3 behalten [128-130]. Dies entspricht in HPC aus Erwachsenen der Verteilung der Histonmodifikationen an Promotoren von Genen, die entweder mit der hämatopoietischen Entwicklung in Zusammenhang stehen oder nicht und deutet darauf hin, dass diese Zellen stärker in ihrem Entwicklungspotential determiniert sind, als HPC aus Nabelschnurblut. Dies könnte auch erklären, warum sich HPC aus Erwachsenen *in vitro* weniger effektiv ausdifferenzieren lassen, verglichen mit HPC aus Nabelschnurblut. Letztere sind in ihrem Entwicklungspotential flexibler und reagieren daher besser auf veränderte Umgebungsbedingungen und externe Differenzierungsstimuli. Die erhöhte epigenetische Flexibilität junger HSC könnte auch erklären, warum mit diesen Zellen bessere Ergebnisse bei der Stammzelltransplantation erzielt werden, als mit HSC älterer Spender [80].

6.2.2 Altersassoziierte Zellfunktionen weisen in Apheresat verstärkt die aktivierende Histonmodifikation H3K4me3 auf

Neben Genen, die für die Entwicklung innerhalb des Immunsystems wichtig sind, waren auch Gene, die mit Apoptose und Zelltod assoziiert sind, in Apheresat verstärkt mit H3K4me3 modifiziert (Abb. 23 A, C). In HPC aus Nabelschnurblut hingegen waren keinerlei apoptoserelevante Gene mit der aktivierenden Markierung assoziiert. Dies deutet darauf hin, dass Apoptoseprogramme in HPC aus Erwachsenen vermutlich leichter aktiviert werden können, als in HPC aus Neugeborenen. Im Laufe ihres Lebens haben HPC aus Erwachsenen vermehrt Schäden an DNA und anderen Makromolekülen akkumuliert [16,17,19,21-23,40]. Selbst wenn es sich nur um geringfügige Beschädigungen handelt, könnten diese dazu geführt haben, dass als Sicherheitsmaßnahme die Bereitschaft zur Induktion von Apoptose durch die veränderte Epigenetik gefördert wird. So ist die Schwelle zur Initiation des Apoptoseprogramms vermutlich bei HPC aus Erwachsenen niedriger, was dabei hilft zu verhindern, dass ältere, vorgeschädigte Zellen unter erneutem Einfluss von Stressoren entarten.

Eine weitere Gruppe von Genen, die in HPC aus Erwachsenen stärker mit H3K4me3 assoziiert ist, als in denen aus Nabelschnurblut, sind solche, die mit katabolischen Prozessen und der Ubiquitinierung in Verbindung stehen (Abb. 23 A, C). Ubiquitinierung ist essentiell für den Abbau von fehlgefalteten und beschädigten Proteinen über das Proteasom. Die Effizienz der proteasomalen Degradation nimmt mit der Alterung ab, was zu einer Anhäufung von defekten Proteinen in älteren Zellen führt [22,23]. Möglicherweise handelt es sich daher bei der Zunahme von aktivierenden Histonmodifikationen an Promotoren, deren Gene mit dem Proteinabbau assoziiert sind, um einen Kompensationsmechanismus. Da der Proteinabbau im Alter schlechter funktioniert und sich defekte Proteine ansammeln, die die Funktion der Zelle beeinträchtigen, könnte die epigenetische Aktivierung der für die Degradation verantwortlichen Proteine ihre leichtere Expression ermöglichen. Dies führt allerdings nicht zwangsläufig dazu, dass der Proteinabbau so effizient wie in jungen Zellen funktioniert, da die Menge der defekten Proteine dafür zu groß ist.

6.2.3 Qualitative Veränderungen der bivalenten Domänen

Im Gegensatz zu den Promotoren, die nur eine der beiden Histonmodifikationen aufwiesen, blieb der Anteil der Promotoren, die bivalent modifiziert waren, zwischen Nabelschnurblut und Apheresat mit 3 und 4,1% beinahe konstant (Abb. 22). Aufgrund der geringen Anzahl der so modifizierten Promotoren konnten für Nabelschnurblut keine charakteristischen, bivalent modifizierten *Pathways* ermittelt werden. Bei Apheresat hingegen waren neben allgemeinen Zellfunktionen wie Stoffwechsel und Zellzyklus, besonders viele bivalent modifizierte Gene, wie auch solche, die nur mit H3K4me3 modifiziert waren, mit Apoptose assoziiert (Abb. 23 E). Dies deutet ebenfalls darauf hin, dass dieser *Pathway* in älteren HPC verstärkt benötigt wird, und die entsprechenden Gene, falls sie nicht aktiv sind, leicht angeschaltet werden können.

6.2.4 H3K27me3 nimmt an altersassoziierten Polycomb Zielgenen zu und korreliert mit dem DNA-Hypermethylierungsstatus dieser Gene

Um die funktionale Relevanz der ermittelten Daten zu überprüfen, wurden sie mit den von Teschendorff *et al.* beschriebenen altersassoziierten Polycomb Gruppen Zielgenen (PGCT) verglichen [105]. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von 64 Genen, die in ES-Zellen Polycomb Gruppen Ziele darstellen, und die in der Alterung von differenzierten Leukozyten verstärkt eine Hypermethylierung auf DNA-Ebene aufweisen. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit darüber hinaus gezeigt werden, dass an 93,5% dieser PGCTs H3K27me3 im Zuge der Alterung in HPC ansteigt (Abb. 24). Da der PRC2 in der Lage ist DNA-Methyltransferasen zu rekrutieren [161] könnte das Vorhandensein von H3K27me3 an diesen Promotoren die Voraussetzung für die Zunahme der DNA-Methylierung in den reifen Blutzellen darstellen. Nicht nur im Alter, sondern auch in Tumoren sind, der globalen DNA-Hypomethylierung entgegengesetzt, vor allem Polycombzielgene aus ES-Zellen von DNA-Hypermethylierung und aberranter Stilllegung betroffen [162-164,166,167,318]. Die in dieser Arbeit durchgeführten GO-Analysen lassen darauf schließen, dass HPC die reprimierende Histonmodifikation H3K27me3 an Loci behalten, die in ES-Zellen bivalent sind, und die für die Hämatopoese nicht notwendig sind. Hier ist dann die Wahrscheinlichkeit groß, dass es im Laufe der Zeit zur Rekrutierung von DNMTs und damit zu *de novo* DNA-Methylierung kommt [161,162]. Dies beeinflusst das Entwicklungspotential der Zellen zunächst nicht, da es sich vermutlich vorwiegend um Gene handelt, deren Expression auch durch H3K27me3 allein reprimiert ist. Nimmt dieser *Crosstalk* zwischen PRC2 und DNMTs jedoch als Folge der

verstärkten Expression von EED zu, wird das Differenzierungspotential der Zellen gestört und sie entarten in Richtung Tumorstammzellen [162], was eine der Ursachen für die erhöhte Inzidenz von malignen Erkrankungen des Blutsystems im Alter sein kann.

6.2.5 Altersassoziierte Veränderungen der Histonmodifikationen führen zu Expressionsänderungen von hämatopoiese-relevanten Transkriptionsfaktoren

Neben den Histonmodifikationen wurde für ausgewählte Gene auch die Expression auf mRNA-Ebene analysiert (Abb. 25). Hierbei wurden mit *LEF1* und *PML* zwei Transkriptionsfaktoren gewählt, die für die Entwicklung in die lymphoide bzw. in die myeloide Linie essentiell sind [303-310]. Im Falle des Transkriptionsfaktors für die lymphoide Linie, *LEF1*, konnte in den HPC der Erwachsenen ein Rückgang der Expression beobachtet werden. Dieser korrelierte mit einer Zunahme von H3K27me3 am entsprechenden Promotor. Im Gegensatz dazu nahm die Expression von *PML*, der für die myeloide Entwicklung wichtig ist, in den Zellen der Erwachsenen zu, was mit einer Erhöhung der H3K4me3-Menge einherging. Beide Ergebnisse passen gut zu der Beobachtung, dass mit der Alterung die Lymphopoiese zu Gunsten der Myelopoiese zurücktritt [68,69,71,72].

Daneben wurde auch die Expression weiterer in der Hämatopoiese relevanter Transkriptionsfaktoren wie *HOXA9*, *HOXB4* und *RUNX1* untersucht. Sowohl die Expression von *HOXA9* als auch die von *HOXB4* nahm in den HPC von Erwachsenen im Vergleich zu denen aus Nabelschnurblut zu (Abb. 25 A). Dies ging in beiden Fällen mit einer Erhöhung der aktivierenden Histonmodifikation H3K4me3 im Promotorbereich einher (Abb. 25 B). Beide *HOX*-Gene spielen eine wichtige Rolle für die Erhaltung und Proliferation von hämatopoietischen Stammzellen [319,320]. Ihre erhöhte Transkription in Zellen älterer Spender gibt daher eine Erklärung für die Vergrößerung des Stammzellpools im Zuge der Alterung [31,64,79]. Neben seiner Funktion in primitiven Stammzellen ist *HOXA9* zusätzlich auch stark in myeloiden Progenitoren vertreten [321], sodass die höhere *HOXA9*-Transkriptmenge auch einen Hinweis auf die altersassoziierte Verstärkung der Myelopoiese geben kann [68,69,71,72]. *HOXA9*-Expression ist aber auch mit einer schlechten Prognose bei AML assoziiert [322] und im Gegensatz zur Überexpression von *HOXB4* führte Überexpression von *HOXA9* in Mäusen auch zu Leukämien [323], sodass die altersassoziierte höhere *HOXA9*-Expression womöglich auch im Menschen die Entartung der Zellen erleichtert.

Im Gegensatz zu den anderen Transkriptionsfaktoren scheint die Expression von *RUNX1*, einem essentiellen Transkriptionsfaktor sowohl für die Erhaltung von HSC, als auch für ihre

Differenzierung [324], nicht durch Polycomb oder Trithorax Faktoren kontrolliert zu sein. Die altersassoziierte Zunahme von H3K4me3 korrelierte hier nicht mit der Expressionsänderung (Abb. 25). Offensichtlich spielen in diesem Fall andere Faktoren eine Rolle bei der Regulation der Genexpression.

6.3 EED-Überexpression führt zu einem Anstieg von H3K27me3

Während EED bislang weder in humanen noch in murinen HSC überexprimiert wurde, wurden die Auswirkungen der Überexpression von Ezh2 auf das Differenzierungspotential und die Repopulationsfähigkeit muriner HSCs schon in verschiedenen Studien untersucht, allerdings mit widersprüchlichen Ergebnissen [212,313]. So wurde zum einen nachgewiesen, dass eine Erhöhung der Menge von Ezh2 die Fähigkeit muriner HSC zur seriellen Transplantation erhöht, ohne zu einer malignen Transformation zu führen [212], während neuere Studien darauf hindeuten, dass zu viel Ezh2 eine Ursache für myeloproliferative Defekte darstellt [313]. Aus verschiedenen humanen Blutkrebsentitäten weiß man weiterhin, dass sowohl der Verlust von EZH2 oder anderer Komponenten des PRC2 [235-237,241-244] als auch die Überfunktion von EZH2 [223-229] charakteristisch für entartete Zellen sind.

Da es bislang keine Daten zu den Auswirkungen einer Überexpression von EED auf die humane Hämatopoese gibt, wurde EED in dieser Arbeit in humanen HPC überexprimiert, um seinen Einfluss auf die Hämatopoese mittels *in vitro* Differenzierungsassays zu untersuchen.

Zu diesem Zweck war es allerdings zunächst notwendig die verschiedenen humanen EED-Isoformen näher zu charakterisieren, da sich die diesbezüglich im murinen System vorhandenen Informationen nicht vollständig auf das humane System übertragen lassen. Weiterhin wurden Promotoranalysen durchgeführt, da auch die genaue Lage des humanen *EED*-Promotors nicht bekannt ist.

6.3.1 Der putative EED-Promotorbereich liegt stromabwärts des bislang angenommenen Translationsstarts von EED1

Mit Hilfe von 5' RACE-Analysen konnten zwei mögliche EED-Promotorbereiche identifiziert werden (Abb. 27). Einer liegt direkt vor dem Startcodon von *EED2*, der andere in dem Bereich vor *EED3*. Beide befinden sich in einer CpG-Insel [153], und *in silico* Analysen bestätigten zu mindest für den stromaufwärts liegenden Bereich, dass hier Promotoraktivität vorliegen kann. Es wurde allerdings kein experimenteller Hinweis auf die Existenz von cDNAs, die deutlich über den Beginn von *EED2* hinausgehen, gefunden. Dies zeigt, dass ebenso wie im murinen System, die längste EED-Isoform deutlich weiter stromabwärts

beginnt, als ursprünglich angenommen. Möglicherweise ist ihr Startpunkt, wie im murinen System, das Codon, das bislang als Startcodon für EED2 galt, oder aber das alternative Startcodon TTG an Position 211 [149].

6.3.2 EED1 beginnt deutlich weiter stromabwärts als bislang angenommen

Da sowohl die 5' RACE-Ergebnisse, als auch die Daten von Montgomery *et al.* [149] darauf hindeuten, dass sich der Translationsstart von EED1 deutlich weiter stromabwärts als ursprünglich angenommen, befindet, wurden mehrere Varianten der *EED* cDNA kloniert, um einen Hinweis auf die exakte Länge von EED1 zu erhalten. Daneben wurde ebenfalls EED3 kloniert, da diese Isoform *in vitro* eindeutig mit der H3K27me3-Aktivität des PRC2 assoziiert wurde [152]. Bei einigen Konstrukten wurde zusätzlich ein Flag Tag eingefügt, der für weiterführende Experimente die Präzipitation von EED erleichtern kann (Abb. 26 B).

Die Überexpression aller Varianten war sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Proteinebene erfolgreich, wobei sich die Verhältnisse der mRNA-Expressionsstärken der einzelnen Konstrukte zueinander von Zelllinie zu Zelllinie unterschieden (Abb. 28). In keiner der untersuchten Linien folgten die Expressionsmuster der anderen beiden PRC2 Kernkomponenten *EZH2* und *SUZ12* denen von *EED*, und es war kein Einfluss auf das Wachstumsverhalten der Zellen zu beobachten.

Interessanterweise erhöhte die Einführung eines Flag Tags die Expression der jeweiligen *EED*-Variante sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene (Abb. 28 und Abb. 29), was zu mindest auf Proteinebene vermutlich mit der zusätzlich zum Flag Tag eingeführten Kosak-Sequenz, die für eine Erhöhung der Translationsrate bekannt ist, zusammenhängt. Auf Proteinebene wurden außer bei EED1_Flag2 nie alle theoretisch möglichen EED-Isoformen überexprimiert. Die erhöhte Expression beschränkte sich immer auf die Variante, deren Startcodon am Anfang der klonierten Sequenz lag, so wie es auch in der Studie von Montgomery *et al.* der Fall war [149]. Bei keiner Überexpression konnte EED2 detektiert werden. Dies entspricht der Beobachtung, dass nur pluripotente Zellen, sowie einige wenige Tumorzellen diese Isoform überhaupt exprimieren, und legt nahe, dass die hier verwendeten Jurkat-Zellen nicht zur Expression von EED2 in der Lage sind [154].

Wie aufgrund der 5' RACE-Daten zu erwarten war, zeigte die Überexpression der verschiedenen Varianten von EED1, dass das zugehörige Startcodon deutlich weiter stromabwärts liegt, als ursprünglich angenommen (Abb. 29). Während EED1_Flag2 ein deutlich zu hohes Molekulargewicht aufweist, stimmt die Größe von EED1_Flag1 gut mit der von wildtypischem EED1 überein (Abb. 29). Somit kommt das TTG an Position 211 oder

aber auch das ursprünglich für EED2 beschriebene GTG an Position 278 als Startcodon für das humane EED1 in Frage (Abb. 26 A, B).

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass das humane EED1 ebenso wie das murine Eed1, deutlich weiter stromabwärts beginnt, als bislang angenommen. Zusätzlich wurden mit dem GTG an Position 278 und dem TTG an Position 211 zwei putative neue Startcodons für EED1 beschrieben, die allerdings durch weitere Versuche verifiziert werden müssen. Die Kenntnis über den genauen Startpunkt von EED1, sowie über die exakte Lage des oder ggf. der Promotoren ermöglicht dann die genaue Analyse der Regulation von EED. Bislang ist hier nur bekannt, dass Transkriptionsfaktoren der E2F-Gruppe die Transkription von EED regulieren, und dass diese eng an den Zellzyklus gekoppelt ist [220]. Eine genaue Kenntnis der Kernpromotorregion könnte Hinweise geben, ob weitere Transkriptionsfaktoren an der Regulation von EED beteiligt sind, und welche Rolle sie für die altersassoziierte Überexpression und die Expression von EED in entarteten Zellen spielen. Die Funktion von epigenetischen Faktoren bei der Regulation von EED ist ebenfalls noch nicht bekannt. Die beiden in dieser Arbeit beschriebenen putativen Promotorregionen von EED liegen in einer CpG-Insel [153], sodass eine epigenetische Regulierung über DNA-Methylierung möglich wäre. Allerdings werden EED1, 3 und 4 nicht nur ubiquitär exprimiert, ihre Expression ist auch eng an den Zellzyklus gekoppelt [220], was eine Regulation über DNA-Methylierung oder Histonmodifikationen unwahrscheinlich erscheinen lässt, da sich diese nur langsam verändern. EED2 hingegen wird im Gegensatz zu allen anderen EED-Isoformen nicht ubiquitär, sondern nur in ES-Zellen und in einigen Tumoren exprimiert [154]. Möglicherweise existiert für diese EED-Isoform ein bis jetzt nicht identifizierter weiterer Promotor, für den eine epigenetische Regulation eher denkbar ist.

Auch microRNAs (miRs) kommen als epigenetische Regulatoren für die EED-Expression in Frage. Diesbezüglich konnte gezeigt werden, dass miR-30b und miR-30c in der Lage sind EED-Proteinlevel *in vitro* zu reduzieren. Zudem war die Expression dieser microRNAs *in vivo* der von EED entgegengesetzt, was mit dem Auftreten von Neuralrohrdefekten korrelierte [325]. Sowohl miR-30b als auch miR-30c gelten als Tumorsuppressoren, da sich unter ihren Zielgenen einige tumorfördernde Faktoren befinden [326-329], und beide scheinen im Zuge der Tumorgenese durch erhöhte c-MYC-Expression stillgelegt zu werden [330]. Ob sie jedoch eine Rolle in der Alterung spielen, ist bis jetzt nicht untersucht. Hier wäre es interessant herauszufinden, wie ihre Expression sich im Zuge der Alterung und der Entartung

von HPC verändert, und in wie weit dies mit der Expressionsstärke von EED und der repressiven Histonmodifikation H3K27me3 korreliert.

6.3.3 Durch Überexpression von EED3 kann der altersassoziierte Anstieg von H3K27me3 nachgestellt werden

Analysen im Western-Blot zeigten, dass die Überexpression aller EED-Varianten zu einer Zunahme von H3K27me3 führte (Abb. 30). Der Quotient zu Gesamt-H3 macht deutlich, dass sich tatsächlich der Anteil an H3K27me3 am Gesamt-Histon H3 erhöhte und dass es sich nicht um eine Veränderung in der gesamten Histonmenge handelte. Es wurde deutlich, dass bei EED3, der Isoform, die allgemein am schwächsten überexprimiert wird, auch der Anteil von H3K27me3 an Gesamt-H3 am geringsten war, sodass es hier eine Korrelation zwischen der EED-Menge und der Menge an modifiziertem Histon gibt. Man kann davon ausgehen, dass die schwache Zunahme von H3K27me3 bei Überexpression von EED3 eher die physiologische Alterung nachstellt als der starke Anstieg, der mit EED1 erzielt wurde. Daher wurde für die weiteren Versuche meistens nur EED3 verwendet.

6.4 Die Herabregulation von EED weist starke zelltypspezifische Unterschiede auf

Um die Einflüsse von EED auf die Hämatopoese umfassend zu untersuchen, wurde das Protein nicht nur überexprimiert, sondern auch mittels shRNA herabreguliert. Es gibt, ebenso wie bei der Überexpression, noch keinerlei Daten über die Auswirkung der shRNA-vermittelten Reduktion von EED in der humanen Hämatopoese. Allerdings wurde in der Maus gezeigt, dass eine Reduktion von SUZ12 durch Mutation eines Allels [211], sowie eine Reduktion von EED aufgrund des Vorliegens eines hypomorphen Allels [207,208] die Hämatopoese positiv beeinflussen. Daneben sind Mutationen oder Deletionen von Polycomb-faktoren im Menschen aber auch mit der Entstehung von ALL oder MDS assoziiert [235-237,241-244] was zeigt, wie wichtig das richtige Maß an Polycomb-funktion für die gesunde Hämatopoese ist [245].

Zur Reduzierung der EED-Transkriptmenge wurden in dieser Arbeit hauptsächlich shRNAs verwendet, da diese gegenüber siRNAs den Vorteil haben, dass sie stabil in die Zellen integrieren und sich somit für Langzeitversuche gut eignen. Des Weiteren werden sie mittels eines lentiviralen Vektorsystem mit einer höheren Erfolgsquote in primäre Lymphozyten eingebracht, als siRNAs. Die verwendeten shRNAs hatten keinen Einfluss auf das

Wachstumsverhalten von Jurkat Zellen, reduzierten die *EED*-Transkriptmenge nur geringfügig (Abb. 36 A) und wirkten sich auf Proteinebene gar nicht aus (Abb. 36 B). Da vor allem auf Proteinebene kein Effekt der shRNAs messbar war, wurde hier auch nicht untersucht, ob sich eine Änderung in Bezug auf H3K27me3 feststellen lässt.

Eine siRNA, deren Erfolg in der Literatur bereits beschrieben ist [220], reduzierte jedoch in HeLa die *EED*-Expression auf bis zu 30% der Ursprungsmenge (Abb. 37 A, B), obwohl dieselbe Sequenz als shRNA nur einen geringfügigen Einfluss auf die *EED*-Expression in Jurkat Zellen hatte. Es ist ein weit verbreitetes Phänomen, dass Sequenzen, die als siRNA sehr erfolgreich sind aus ungeklärten Gründen als shRNA häufig nicht wirksam sind [291], was auch hier der Fall war. Die HeLa-Zellen zeigten nicht nur einen deutlichen Rückgang der *EED*-Expression, sie stellten auch ihr Wachstum beinahe vollständig ein. Dieser Effekt wurde auch in der Publikation, in der die *EED* siRNA erstmals verwendet wurde, beschrieben und zeigt, dass eine gewisse Menge aller PRC2 Mitglieder notwendig ist, damit der Zellzyklus durchlaufen werden kann [220]. Aufgrund der geringen Proliferationsrate stand nur sehr wenig Zellmaterial zur Verfügung, sodass die Analyse im Western Blot auf H3K27me3 beschränkt werden musste und der Erfolg der *EED*-Reduktion auf Proteinebene nicht kontrolliert werden konnte. Das veränderte Wachstumsverhalten der Zellen gibt allerdings schon einen Hinweis darauf, dass sich die Reduktion des *EED*-Transkripts auch auf Proteinebene ausgewirkt haben muss. Das Ergebnis des Western-Blots zeigte eindeutig, dass die Herabregulation von *EED* im Vergleich zur Kontrollprobe, bei der eine *non-target* siRNA verwendet wurde, eine deutliche Reduktion der H3K27me3-Menge nach sich zog (Abb. 37 C). Allerdings war in beiden Proben die H3K27me3-Menge höher, als in der untransfizierten Probe, was darauf hindeutet, dass der Transfektionsvorgang an sich auch einen Einfluss auf die epigenetische Regulation der Expression hat. Leider konnte diese siRNA aufgrund der bekannten geringen Transfektionsrate von primären Lymphozyten durch Elektroporation, Nukleofektion oder Lipofektion für die *in vitro* Differenzierung von HPC nicht verwendet werden. Weil die siRNA Sequenz jedoch prinzipiell in der Lage ist die *EED*-Expression zu reduzieren, kann es durchaus möglich sein, dass dieselbe Sequenz als shRNA in primären Zellen, die empfindlicher auf Eingriffe reagieren als Zelllinien, einen Einfluss auf die *EED*-Expression hat.

6.5 Einfluss der EED-Menge auf das Entwicklungspotential von primären humanen CD34⁺ HPC

Da die Ergebnisse aus den Zelllinien die Funktionalität der verschiedenen EED-Überexpressionskonstrukte und in gewissem Maße auch die einiger shRNAs bestätigt haben, wurde in einem letzten Schritt der Einfluss der EED-Menge auf das Differenzierungspotential von CD34⁺ HPC untersucht. Zur Bestimmung des lymphoiden Potentials wurde die *in vitro* Differenzierung in Richtung NK-Zellen gewählt. Die einzelnen Stufen dieser Differenzierung sind in der Literatur gut beschrieben, und es handelt sich um ein Protokoll, das in unserem Labor gut etabliert ist [296-299,331]. Um das myeloide Entwicklungspotential zu begutachten, wurden Kolonie-Assays durchgeführt. Auch hierbei handelt es sich um eine gut etablierte Methode, die nicht nur einen Eindruck darüber vermittelt, ob die Zellen in der Lage sind in die myeloide Linie zu differenzieren, sondern auch, ob sich in Bezug auf die myeloiden Subpopulationen Unterschiede ergeben [300].

6.5.1 Überexpression von EED verlangsamt die NK-Zellentwicklung

Um die Auswirkungen der EED-Überexpression auf die lymphoide Differenzierung zu analysieren, wurde zunächst EED3 in CD34⁺ HPC überexprimiert und diese in Richtung NK-Zellen ausdifferenziert [296,331]. Es zeigte sich, dass sich die aus Nabelschnurblut isolierten primären CD34⁺ HPC allgemein sehr schlecht infizieren ließen, und dass sie vor allem den Vektor zur EED-Überexpression schlecht tolerierten (Abb. 39 A). Insgesamt kann man sagen, dass alle Proben, in Abhängigkeit vom Nabelschnurblut, ähnlich gut proliferierten, die Nettoexpansion der GFP-positiven Zellen betrug bei den EED3-überexprimierenden Kulturen jedoch nur etwa 1,7. Dies stellt nur knapp eine Verdopplung dar, während sich die GFP-positiven Zellen bei den pCL6-infizierten Kontrollen desselben Blutes in etwa verzwanzigfachen. Die vermehrte EED3-Expression führte also zu einer deutlich geringeren Zellexpansion. Dies zeigt, dass es sich bei primären HPC um ein sehr empfindliches System handelt. Zellen, die eine Störung der epigenetischen Regulation aufweisen, vermehren sich eher nicht. Dies schützt das hämatopoietische System vermutlich vor Entartung.

Nach sechswöchiger Kultivierung wiesen die EED3-transduzierten Zellen eine deutlich erhöhte EED-Expression auf, was von einem Anstieg der Transkription der beiden anderen Polycomb Faktoren *EZH2* und *SUZ12* begleitet wurde (Abb. 38). Eine Abhängigkeit der Expressionsstärke der einzelnen Polycomb Faktoren voneinander konnte beim *Knock-Out* von *SUZ* und *EED* nachgewiesen werden [138,147], und zeigt, dass ein Fehlen einer der

Kernkomponenten zu einer Instabilität des gesamten Komplexes führt. In der vorliegenden Arbeit konnte nun erstmals für primäre humane Zellen gezeigt werden, dass auch eine Überexpression einer der drei Kernkomponenten eine verstärkte Expression der anderen beiden Faktoren nach sich ziehen kann, was darauf hindeutet, dass sich auch die Anzahl der funktionalen Polycomb-Komplexe erhöht.

Eine Analyse der Oberflächenmarker zeigte, dass die EED3-transduzierten Zellen in ihrer Entwicklung gegenüber den Kontrollzellen verlangsamt waren. Während sowohl die uninfizierten Kontrollen, als auch die pCL6-transduzierten Zellen nach sechswöchiger Kultur über 90% CD56 positive Zellen aufwiesen, betrug dieser Anteil bei den EED3-transduzierten nur ca. 20%. Daneben traten bei den EED3 transduzierten Zellen relativ große Populationen an CD14⁺/CD56⁻ (32%) und CD16⁺/CD56⁻ (11%) auf, die in den beiden Kontrollproben jeweils maximal 2% der Zellen ausmachten. Insbesondere fiel eine CD14⁺/CD56⁺ doppelpositive Population auf, die keinem bekannten Zelltyp zugeordnet werden konnte. Sie betrug in den EED3-transduzierten Zellen etwa 6% während sie in den Kontrollen deutlich geringer ausfiel (Abb. 39 B).

CD16 ist ein klassischer NK-Zellmarker, dessen Expression in der NK-Zell-Entwicklung auch zu erwarten ist. CD14 hingegen ist als Marker von myeloiden Zellen bekannt und seine Expression zum Ende der NK-Zell-Generierung war ungewöhnlich. Daher wurde die im Durchflusszytometer ermittelte Expression von CD14 zunächst mittels Real-Time RT PCR bestätigt, um auszuschließen, dass es sich um ein Artefakt der Messung handelt (Abb. 40).

Während die Expression von CD14 zum Ende einer NK-Zell-Generierung ungewöhnlich ist, stellt sie in den ersten drei Wochen keine Seltenheit dar [297,312]. Es ist nicht nur so, dass während der NK-Zell-Generierung Zellen mit myeloiden Oberflächenmarkern entstehen, es konnte auch gezeigt werden, dass sich diese Zellen zu NK-Zellen weiterentwickeln [297]. Hierbei nimmt die Effizienz allerdings mit zunehmender Expressionsstärke des myeloiden Markers ab [297]. Des Weiteren gelang es zwei Arbeitsgruppen Vorläuferzellen mit myeloiden Eigenschaften in funktionale NK-Zellen auszudifferenzieren [297,312] und beide Arbeitsgruppen berichten auch von einer intermediären Co-Expression von CD56 und einem myeloiden Marker. Daher liegt es nahe, dass die in dieser Arbeit beobachteten CD14 positiven Zellen ebenfalls myeloide Zwischenstufen bzw. Umwege darstellen, die sich noch in funktionale NK-Zellen weiterentwickeln. Um dies zu überprüfen, wurden bei derselben Kultur eine Woche später erneut die Oberflächenmarker durchflusszytometrisch bestimmt (Abb. 41). Zu diesem Zeitpunkt hatten die EED3-überexprimierenden Zellen ihren Entwicklungsrückstand in Bezug auf die CD56-Expression gegenüber den Kontrollen

aufgeholt. Beinahe alle Zellen exprimierten CD56 und es waren, genau wie bei den pCL6-Kontrollzellen, kein CD14 und nur geringe Mengen an CD16 nachweisbar (Abb. 41 A). Das Auftreten der NK-Zell-Marker NKG2A und KIR2DL3 in allen drei Proben zeigt, dass sich in allen Fällen tatsächlich NK-Zellen entwickelt haben (Abb. 41 B). Aufgrund der geringen Anzahl an GFP-positiven Zellen in der EED3-transduzierten Kultur konnte die Funktionalität der NK-Zellen allerdings nicht überprüft werden.

6.5.1.1 Nachweis eines myeloiden „Umwegs“ bei der NK-Zell-Generierung

Da die EED3-überexprimierenden Zellen bei zunehmender Expression von CD56 den myeloiden Marker CD14 verloren, scheint es sich bei den CD14 positiven Zellen tatsächlich um eine Population auf dem Weg zur NK-Zelle zu handeln. Um dies genauer zu überprüfen, wurde die Expression verschiedener Oberflächenmarker bei den Kontrollzellen zu einem Zeitpunkt bestimmt, zu dem auch hier weniger als 20% der Zellen CD56 positiv waren. Sowohl die uninfizierten, als auch die pCL6-transduzierten Kontrollzellen exprimierten zu diesem Entwicklungszeitpunkt eine Reihe myeloischer Marker wie CD13, CD14, CD16 und HLA-DR (Abb. 42). Es gab jedoch so gut wie keine Zellen, die gleichzeitig auch CD56 exprimierten. Interessanterweise war mit ca. 60% CD13, ein Marker, der auch auf frühen myeloiden Zellen vorkommt, am stärksten vertreten, während CD14 und HLA-DR, deren Expression für reife myeloide Zellen charakteristisch ist, mit ca. 14-20% von deutlich weniger Zellen exprimiert wurden.

Nach sechs Wochen hatten sich die Zellen weiterentwickelt und in allen Gruppen, auch der mit EED3-transduzierten, betrug der Anteil an CD56 positiven beinahe 100% und mit Ausnahme von CD16 waren die myeloischen Marker nicht mehr messbar (Abb. 42). Diese Daten zeigen, dass die Expression von myeloischen Markern während der NK-Zell-Generierung nicht allein durch die Überexpression von EED3 zu Stande kommen. Sie sind vielmehr ein Zwischenschritt im normalen Entwicklungsablauf. Die Überexpression von EED3 verzögert diesen Ablauf allerdings, was man daran erkennt, dass die Mehrzahl der entsprechenden Zellen erst rund eine Woche nach den Kontrollzellen den für NK-Zellen essentiellen Marker CD56 exprimierten.

Der *in vitro* nachgewiesene verstärkte „Umweg“ über myeloide Zwischenstufen bei der NK-Zellentwicklung aufgrund von EED-Überexpression deutet darauf hin, dass die altersassoziierte verstärkte EED-Expression *in vivo* eine Ursache für den beschriebenen myeloiden Bias in der Hämatopoese bei älteren Individuen darstellt [68,69,71,72]. Durch die verstärkte EED-Expression verzögerte sich *in vitro* die NK-Zellentwicklung. Hierbei steht

nicht fest, ob dies daran liegt, dass die lymphoiden Vorläuferzellen vermehrt einen Umweg über myeloide Vorstufen in ihrer Entwicklung zur NK-Zelle durchlaufen, oder ob dies nur langsamer geschieht, als in jungen Zellen. Daneben ist es auch möglich, dass es den myeloiden Vorstufen, die nachweislich zur NK-Zell-Generierung fähig sind [297], durch die EED3-Überexpression erschwert wird diesen Entwicklungsweg einzuschlagen. Die erhöhte EED3-Expression könnte aufgrund der höheren H3K27me3-Menge dazu führen, dass bestimmte Entwicklungswege im Ansatz reprimiert sind und sich erst durch länger andauernde externe Stimuli, wie z.B. die hier über mehrere Wochen zugeführten Zytokine IL2 und IL15, die beide die NK-Zellentwicklung fördern, öffnen. *In vivo* unterliegen HPC allerdings den Einflüssen der verschiedensten Zytokine, sodass sie vermehrt den ihnen am leichtesten zugänglichen Entwicklungsweg, also bei erhöhter EED-Expression vermutlich den der Myelopoese, einschlagen.

6.5.1.2 Überexpression von EED1 verschärft den entwicklungsverzögernden Polycomb-Effekt in der NK-Zell-Generierung

Neben EED3 wurde auch EED1 während der NK-Zell-Generierung überexprimiert. Hier konnte man die gleichen Tendenzen wie bei der EED3-Überexpression beobachten, allerdings waren die Effekte z.T. noch verstärkt. Auch hier war die anfängliche Transduktionseffizienz sehr gering und die GFP-positiven Zellen expandierten nur schwach (Abb. 43 A). Die Entwicklung in Richtung NK-Zellen verlief bei Überexpression von EED1 noch langsamer, als bei Überexpression von EED3, was von einer noch stärkeren Expression der Oberflächenmarker CD14 und CD16 begleitet wurde (Abb. 43 B). Dass sich die Effekte der EED-Überexpression bei Verwendung von EED1 verstärken, könnte daran liegen, dass EED1 mit seinem längeren N-terminalen Ende effizienter an Histon H3 binden kann als EED3 und somit effizienter die Trimethylierung von H3K27 vermittelt. Sowohl für das zu EED homologe *esc* aus *Drosophila*, als auch für humanes/murines EED wurde nachgewiesen, dass das N-terminale Ende des Proteins für die Bindung zu H3 notwendig ist. Diese Daten beruhen allerdings auf N-terminal trunkeerten Versionen von EED3, die ihre Bindungsfähigkeit an H3 komplett verloren haben [145,146]. Ob die Länge des N-terminalen Endes von EED einen Einfluss auf seine Bindungsstärke zu Histon H3 hat, oder ob das bloße Vorhandensein der N-terminalen Aminosäuren, die in EED3 vorkommen, für eine maximale Bindung ausreicht, ist jedoch noch nicht untersucht. Möglicherweise dirigiert EED1 auch die Aktivität des PRC2 in Richtung der Methylierung von H1K26 [152,154], was auch einen Einfluss auf die

Lymphopoiese haben kann. Dieser Effekt ist bis jetzt allerdings nicht im Detail untersucht, und es ist nicht bekannt, in wie weit er *in vivo* tatsächlich eine Rolle spielt.

6.5.2 Herabregulation von EED hat keinen Einfluss auf die Lymphopoiese

Im Gegensatz zur Überexpression von EED hatte die Herabregulation dieses Faktors keinen Einfluss auf die NK-Zellentwicklung (Abb. 45 und Abb. 46), obwohl hier eine deutliche Transkriptreduktion beobachtet werden konnte, was die erhöhte Wirksamkeit der shRNAs in primären Zellen verdeutlicht (Abb. 44). Auch die beiden anderen Komponenten des PRC2 waren, entsprechend der Beobachtungen bei *Knock-Out* einer PRC2-Komponenten [138,147], in ihrer Expression deutlich reduziert (Abb. 44).

Da durch die *EED* shRNAs neben der EED-Expression auch die Expression der anderen beiden PRC2 Mitglieder zurückging, blieb vermutlich die Stöchiometrie der Komplexe erhalten, sodass diese weiterhin funktionsfähig waren. Offensichtlich war die PRC2 Menge trotz der Reduktion noch ausreichend um die epigenetische Integrität zu gewährleisten. Hierbei muss man bedenken, dass ES-Zellen sogar bei komplettem Verlust des PRC2 noch in der Lage sind wenigstens im Ansatz zu differenzieren [201]. Diese Fähigkeit verlieren sie erst bei gleichzeitigem *Knock-Out* des PRC1 [204]. Eine Reduktion der PRC2-Menge sollte daher die Differenzierung von HPC nicht verhindern, zumal der PRC1, der in gewissen Bereichen redundant zum PRC2 wirkt, hier nicht ausgeschaltet wurde, und die Ausmaße der Reduktion auf Proteinebene nicht bestimmt werden konnten. Daneben wurde für EED und SUZ12 auch gezeigt, dass sie eher eine reprimierende Wirkungen auf die Hämatopoiese haben [207,211], sodass ihre Reduktion sogar einen positiven Einfluss auf die Entwicklung haben könnte, was hier jedoch nicht beobachtet werden konnte.

6.5.3 EED-Überexpression hat keinen Einfluss auf die Myelopoiese

Neben dem lymphoiden Entwicklungspotential wurde auch das myeloide Entwicklungspotential von HPC, die mit EED3 transduziert wurden, analysiert. Hier konnten keine Veränderungen durch die EED-Überexpression beobachtet werden. Das Verhältnis der unterschiedlichen myeloiden Kolonien zueinander war in allen Proben ähnlich und hing eher von der Ausgangspopulation als von der EED-Überexpression ab (Abb. 47 A, B). Durchflusszytometrische Analysen zum Ende der Kultivierung zeigten wieder, dass die Zellen sowohl den Leervektor als auch den EED3-Überexpressionsvektor schlecht tolerierten (Abb. 48). Im Falle der Kolonien, die Erythrozyten und deren Vorstufen enthielten, kann dies

zum Teil dadurch erklärt werden, dass diese Zellen während ihrer Entwicklung den Zellkern verlieren und vermutlich ab dann auch nur noch die notwendigsten Gene exprimieren.

Bei den weißen Kolonien hingegen, die sich in Richtung der myeloiden Leukozyten entwickeln, muss der Verlust des GFP-Reporters andere Gründe haben. Es ist möglich, dass nur epigenetisch intakte Zellen überhaupt in der Lage sind Kolonien zu bilden. In diesem Fall müssten die wildtypischen Zellen jedoch deutlich mehr Kolonien bilden, als die, die mit EED3 transduziert wurden, was allerdings nicht der Fall war. Möglicherweise wird GFP aber auch im Zuge der Entwicklung stillgelegt. Hier könnte ein von Transkriptionsfaktoren fein abgestimmtes Programm ablaufen, das nur die Expression der benötigten Gene zulässt. Promotoren, die für die exprimierten aktivierenden Transkriptionsfaktoren keine Bindestelle aufweisen, werden stillgelegt. Ein Beispiel hierfür wäre die Polycomb Rekrutierung in ES-Zellen, die bevorzugt Promotoren betrifft, die keine Bindestellen für aktuell exprimierte Transkriptionsfaktoren aufweisen [158]. Um diese Hypothese zu überprüfen, könnte man im Vektor den Promotor um die Bindestelle eines in der Myelopoese relevanten Transkriptionsfaktors erweitern, und so feststellen, ob in Gegenwart dieses Faktors die GFP-Expression erhalten bleibt.

6.6 Einfluss von EED und PRC2 auf die Alterung im humanen hämatopoietischen System

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die Expression von *EED*, und in geringerem Maße auch die von *EZH2*, in HPC älterer Individuen im Vergleich zu HPC aus Nabelschnurblut ansteigt. Dies liegt vermutlich der ebenfalls in dieser Arbeit erstmals beschriebenen altersassoziierten Zunahme der repressiven Histonmodifikation H3K27me3 zu Grunde.

H3K27me3 findet sich in HPC aus erwachsenen Spendern vorwiegend an Genen, die für die Differenzierung in Linien außerhalb der Hämatopoese relevant sind und somit in HPC nicht benötigt werden. Außerdem sind Gene, die in ES-Zellen Polycomb Ziele darstellen, und für die bereits eine altersassoziierte DNA-Hypermethylierung beschrieben wurde [105], in HPC aus Erwachsenen ebenfalls stärker mit der repressiven Histonmodifikation assoziiert als in HPC aus Nabelschnurblut. An diesen Promotoren interagieren Polycomb-faktoren vermutlich mit DNMTs [161] und induzieren so eine *de novo* Methylierung an ursprünglich nicht oder nur schwach methylierten Loci, die sich dann in den differenzierten Zellen manifestiert. Nicht nur in der Alterung, sondern auch bei vielen Tumoren werden Polycombzielgene aus ES-

Zellen bevorzugt hypermethyliert [105,162-164], was vermutlich auf dem gleichen Mechanismus beruht. Es ist möglich, dass im Zuge der normalen Alterung zunächst nur bei wenigen Loci auf diese Weise die Genstilllegung verfestigt wird [162]. Erst wenn dieser Prozess sich weiter ausdehnt, z.B. in Folge der altersassoziierten Erhöhung der Polycombaktivität, betrifft er möglicherweise auch Gene, die für die gesunde Entwicklung der Zellen relevant sind oder die als Tumorsuppressoren wirken [162]. Diese Gene werden aberrant ausgeschaltet, was zur Entartung der HPC und zur Entstehung von Tumorstammzellen beitragen kann. Interessanterweise findet man auch in vielen hämatologischen Krebsarten eine Überexpression oder Überaktivität mindestens eines Polycomb-faktors [223-229], was diese Hypothese bestätigt. Daher ist es durchaus möglich, dass eine in der gesunden Alterung verstärkte *EED*-Expression langfristig auch dazu beiträgt, dass sich im Alter vermehrt Blutkrebserkrankungen ausbilden.

Entgegen der oben beschriebenen Beobachtung, dass bivalent Gene vermutlich durch *Crosstalk* von Polycomb-faktoren und DNMTs während der Alterung und der Tumorgenese aberrante DNA-Methylierung erwerben, wurden sowohl in einigen Tumoren, als auch in murinen ES-Zellen Loci beschrieben, an denen sich DNA-Methylierung und H3K27me3 gegenseitig ausschließen [165-167]. Zum einen sind hiervon CpG-Inseln mit hoher CpG-Dichte betroffen. Sind diese methyliert, so ist die repressive Histonmodifikation häufig abwesend, selbst wenn sie in direkt angrenzenden genomischen Regionen vorkommt [166]. Zum anderen konnte auch gezeigt werden, dass H3K27me3 in Zellen, bei denen die DNA-Methylierung pharmakologisch oder durch *knock-out* aller DNMTs inhibiert wurde, an vielen Loci, die in wildtypischen Zellen methyliert sind, neu erworben wird. Dieser Vorgang kompensiert zum Teil den Verlust der DNA-Methylierung und gewährleistet weiterhin die Repression der betroffenen Gene [166,167]. Aufgrund der großen Anzahl an Promotoren, für die in der vorliegenden Arbeit eine altersassoziierte Zunahme an H3K27me3 beobachtet werden konnte, ist es denkbar, dass auch dieser kompensatorische Mechanismus während der Alterung stattfindet. So könnte, abhängig vom betroffenen Locus, an einigen Promotoren die altersassoziierte bekannte DNA-Hypomethylierung durch Zunahme von H3K27me3 kompensiert werden, während dem entgegengesetzt an anderen Promotoren die vorhandene H3K27me3-Methylierung zu einer lokalen aberranten DNA-Hypermethylierung führt.

Um die Polycomb-vermittelten alterungsassoziierten Veränderungen im humanen hämatopoietischen System *in vitro* nachzustellen, wurde in dieser Arbeit die Überexpression von *EED* in humanen HPC etabliert. Trotz des starken Anstiegs der Expression aller drei

Polycombfaktoren nach EED-Überexpression waren die Auswirkungen auf das Differenzierungspotential von humanen HPC relativ gering. Auf Seiten der Lymphopoiese konnte eine deutliche Verzögerung der NK-Zell-Entwicklung beobachtet werden. Diese kam zu einem großen Teil dadurch zu Stande, dass sich intermediär verstärkt Zellen mit myeloischen Eigenschaften bildeten, die erst durch langanhaltenden Einfluss von NK-Zell-fördernden Zytokinen in die NK-Zell-Entwicklung wechselten. Dies passt mit den Beobachtungen zusammen, dass ältere HPC verstärkt in die myeloide Richtung differenzieren [68,69,71,72] und, dass Ezh2-Überexpression bei Mäusen myeloproliferative Defekte verursachen kann [313].

Allerdings scheint die durch Überexpression von EED induzierte Zunahme der Polycombaktivität nur relativ schwache Auswirkungen zu haben, denn die Differenzierung in die myeloide Linie wird durch die EED-Überexpression nicht verstärkt. Eine Erklärung hierfür liegt in der Beobachtung, dass die infizierten, EED-überexprimierenden Zellen, kaum proliferieren. Möglicherweise beschränkt hier ein intrinsischer Schutzmechanismus die Proliferation und Differenzierung von HPC, deren epigenetisches Regulationssystem zu stark beeinträchtigt ist, sodass die Entstehung von Blutkreberkrankungen verhindert wird.

7. AUSBLICK

7.1 Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der Rolle von EED und PRC2 in der gesunden und malignen Hämatopoese

Ausgehend von der altersassoziierten Erhöhung der *EED*-Expression, wurde in dieser Arbeit in verschiedenen *in vitro* Differenzierungsassays erstmals der Zusammenhang von *EED*-Expression und Differenzierungspotential von HPC untersucht. So konnte gezeigt werden, dass vermehrte *EED*-Expression in der Lymphopoese verzögernd wirkt, während kein Einfluss auf die Myelopoese festgestellt werden konnte. Dies bedeutet jedoch nicht, dass eine Zunahme der Polycombaktivität die Myelopoese unter keinen Umständen beeinflusst. Um dies genauer zu untersuchen wäre es zunächst einmal nötig die Stärke der *EED*-Überexpression zu modulieren und durch Einführen von Bindestellen für myelopoese-fördernde Transkriptionsfaktoren im Promotorbereich des Überexpressionsvektors die mutmaßliche Stilllegung des Vektors im Zuge der Differenzierung zu verhindern. Da die Überexpression von *EED1* stärkere Auswirkungen auf die Lymphopoese hat, als die von *EED3*, liegt es nahe, dass diese Isoform auch die Myelopoese stärker beeinflusst. Somit könnte auch ihre Überexpression helfen, die Rolle von *EED* während der Myelopoese besser zu verstehen.

Über die *in vitro* Differenzierungsassays hinaus, wäre es interessant, zu beobachten, wie sich die transduzierten Zellen langfristig verhalten. Dies ist in Kultur nicht möglich. Als Alternative könnte man *EED*-überexprimierende Zellen, bzw. solche, in denen es stabil herunterreguliert ist, in das Knochenmark von letal bestrahlten Mäusen transplantieren. Hier könnte dann der Beitrag der humanen Zellen zur Lymphopoese und zur Myelopoese bestimmt werden und man könnte feststellen, ob sich das Gleichgewicht zwischen den beiden Linien, analog zu den Beobachtungen während der Alterung, in Abhängigkeit von der *EED*-Expressionsstärke in Richtung der Myelopoese verschiebt [68,69,71,72].

Es wäre dann durch serielle Transplantation auch möglich festzustellen, ob die veränderte *EED*-Expression einen Einfluss auf das Langzeitrepopulationspotential der HPC hat und ob sich mit der Zeit maligne Transformationen des hämatopoietischen Systems entwickeln.

Um die Rolle von *EED* und des PRC2 während der Alterung im humanen hämatopoietischen System weiter zu konkretisieren, wäre es interessant die Expressionsmenge von *EED* mit dem Gesundheitszustand der Spender zu korrelieren, um herauszufinden, ob die Stärke der *EED*-Expression einen Indikator für gesunde Alterung darstellen kann. Außerdem müsste ermittelt

werden, ob die Menge an trimethyliertem H3K27 in HPC von Donoren älter als 60 Jahren weiterhin ansteigt und in wie weit dies mit der EED-Expression und dem Gesundheitszustand korreliert. Dies könnte wichtige Hinweise auf die Ursachen und Mechanismen der Stammzellalterung liefern.

Einen weiteren Hinweis auf die Funktion von Polycomb während der Alterung könnte auch die Untersuchung von Patienten der verschiedenen Blutkrebsentitäten liefern, da diese Erkrankungen meist erst mit fortgeschrittenem Alter auftreten. So wäre es interessant herauszufinden, ob MDS-Patienten, bei denen EZH2 nicht deletiert ist, EED oder EZH2 stärker exprimieren, als gesunde Probanden gleichen Alters. Sollte dies der Fall sein, könnten differentiell H3K27me₃-markierte Gene einen wichtigen Hinweis auf die Ursachen von MDS geben. Im Falle von akuter lymphoblastischer Leukämie wäre es außerdem möglich aus einem Patienten sowohl gesunde als auch entartete Lymphozyten zu isolieren und diese in Bezug auf Unterschiede in der Polycombexpression und der Verteilung von H3K27me₃ zu untersuchen.

Mittels ChIP-on-chip Analysen könnte überprüft werden, in wie weit sich die Bindung von H3K27me₃ und den verschiedenen Polycomb Faktoren im Alter und bei Tumorerkrankungen von dem Bild bei gesunden jungen Spendern unterscheiden. So ist es z.B. möglich, dass die überaktiven EZH2 Mutanten, die man häufig in Lymphomen findet [225-229], nicht nur verstärkt die Trimethylierung von H3K27 katalysieren, sondern dass sie auch bestimmte tumorspezifische Promotoren bevorzugen. Ebenso könnte die erhöhte Menge von EED, die in der Alterung zu beobachten ist, eine wichtige Rolle bei der Rekrutierung des PRC2 an seine Zielgene spielen. Wäre dies der Fall, müsste man in älteren Probanden verstärkt Promotoren finden, die nur EED und keinen der anderen Polycomb Faktoren gebunden haben. Die Bindung von EED an diese Promotoren könnte dann dafür sorgen, dass SUZ12 und EZH2 an die entsprechenden Loci rekrutiert werden, und dass sich erst dort neue aktive Komplexe bilden. Sollte die Chromatinimmunopräzipitation von nativem EED nicht möglich sein, könnte für diesen Fall eines der Flag Tag Konstrukte, die in dieser Arbeit generiert wurden, verwendet werden.

7.2 Weiterführung der Charakterisierung der verschiedenen EED-Isoformen

Um neben seiner Funktion in der Hämatopoese auch besser zu verstehen, wie EED reguliert wird, warum seine Expression im Zuge der Alterung ansteigt und welche Rolle die verschiedenen Isoformen spielen, müssten zunächst die in dieser Arbeit eingegrenzten *EED*-Promotoren näher charakterisiert werden. Zu diesem Zweck könnten z.B. Reporterassays durchgeführt werden, die Hinweise auf die minimale Promotorregion geben. Der Einfluss von Transkriptionsfaktoren auf die Expression von EED könnte in diesen Assays durch die Mutation von vorhandenen Bindestellen überprüft werden. So gibt es z.B. Hinweise darauf, dass sowohl EZH2 als auch EED über den pRb-E2F-*Pathway* reguliert werden [220], es ist jedoch nicht bekannt, ob es bei der Regulation Unterschiede für die verschiedenen EED-Isoformen gibt. Auch microRNAs können eine Rolle bei der Regulation von EED spielen. Hier gibt es Hinweise darauf, dass die microRNAs miR-30b und miR-30c die EED-Expression reprimieren [325]. Beide microRNAs gelten als Tumorsuppressoren deren Expression von dem Onkogen c-MYC reprimiert wird [326-330]. Über ihre Rolle in der Hämatopoese und der Alterung ist jedoch noch nichts bekannt. Hier wäre es interessant zu untersuchen, ob sich die Expression dieser microRNAs im Zuge der Alterung ändert, welche Konsequenzen dies für die EED-Expression hat, und ob auch andere epigenetische Faktoren an der Regulation von EED beteiligt sind.

Neben der Eingrenzung der Promotorregionen von EED, konnte in dieser Arbeit auch erstmals für das humane System gezeigt werden, dass die längste Isoform von EED, EED1, deutlich kürzer ist, als bisher angenommen. Um die genaue Länge des Proteins zu bestimmen, könnte man mit diskriminierenden Antikörper den translatierten 5' Bereich weiter eingrenzen. Allerdings wurden entsprechende Antikörper bisher nur im murinen System verwendet [152] und können vermutlich, da sich das humane und das murine EED im interessierenden Bereich stark unterscheiden, nicht verwendet werden. Als Alternative zur Bestimmung der genauen Länge von EED1 käme die Sequenzierung mittels Massenspektrometrie in Frage.

Für den Fall, dass sich bestätigt, dass EED1 an dem Startcodon, das ursprünglich für EED2 beschrieben wurde, beginnt, müsste dann das korrekte Startcodon für EED2 ermittelt werden. Dies könnte auch Aufschluss darüber geben, warum EED2 nur in pluripotenten Zellen und in wenigen Tumorarten exprimiert wird [154].

Insgesamt werden genauere Kenntnisse bezüglich des Aufbaus und der Regulation der unterschiedlichen EED-Isoformen helfen, ihre Rolle während der Hämatopoese, der Alterung

und der Tumorgenese zu verstehen. Auf Grundlage dessen könnten sich dann auch Therapieansätze für verschiedene Tumorentitäten ergeben.

8. ANHANG

8.1 Bei der MicroFluidic Card verwendete TaqMan Assays

Tab. 25: TaqMan Assays, die bei der MicroFluidic Card verwendet wurden

Gen	Assay		Gen	Assay
18S	Hs99999901_s1		KIT	Hs00174029_m1
ACTB	Hs99999903_m1		MBD2	Hs00187506_m1
CBX3	Hs00371848_m1		MECP2	Hs00172845_m1
CBX5	Hs00201656_m1		NANOG	Hs02387400_g1
DNMT1	Hs00154749_m1		PCAF	Hs00187332_m1
DNMT3A	Hs00602456_m1		PCMT1	Hs00193600_m1
DNMT3B	Hs00171876_m1		PCNA	Hs00427214_g1
EED	Hs00243609_m1		POU5F1	Hs01895061_u1
EP300	Hs00914223_m1		SETD7	Hs00363902_m1
EZH2	Hs00172783_m1		SIN3A	Hs00411592_m1
FGF6	Hs00173934_m1		SIRT1	Hs01009006_m1
GAPDH	Hs99999905_m1		SIRT2	Hs00247263_m1
GCN5L2	Hs00221499_m1		SIRT3	Hs00202030_m1
HDAC1	Hs00606262_g1		SIRT4	Hs00202033_m1
HDAC10	Hs00368899_m1		SIRT5	Hs00202043_m1
HDAC11	Hs00227335_m1		SIRT6	Hs00213036_m1
HDAC2	Hs00231032_m1		SIRT7	Hs00213029_m1
HDAC3	Hs00187320_m1		SOX2	Hs00602736_s1
HDAC4	Hs00195814_m1		SUV39H1	Hs00162471_m1
HDAC5	Hs00608357_m1		SUV39H2	Hs00226596_m1
HDAC6	Hs00195869_m1		TERT	Hs00162669_m1
HDAC7A	Hs00248789_m1		TRRAP	Hs00268883_m1
HDAC8	Hs00218503_m1		UBC	Hs00824723_m1
HDAC9	Hs00206843_m1		ZBTB33	Hs00406811_m1

8.2 Alignment der humanen *EED* mRNA Sequenzen mit dem X-chromosomalen *EED* Pseudogen

```

003797      -----CTAG-----CAGCGGG-----TC 13
152991      -----CTAG-----CAGCGGG-----TC 13
XEED       AGTCTGAGACCTTAAACTATGAAACTAGTACAAGAAACATTGGGGACAATGTCCTTTTC 60
           ****                **   ***                **

003797      GGAGATCGAAGGAACGGGCCAA-----TTG-----CGGCTGAAACGTCTTTGGA 57
152991      GGAGATCGAAGGAACGGGCCAA-----TTG-----CGGCTGAAACGTCTTTGGA 57
XEED       CCAGGACATTGGTCTGGGCAAAGATTTCTTGAGCAATACCTCACAAGCATAGGCAATCAA 120
           **.:*.:*.:*.:*.:*   ****.*          ***          *.:*.:*.:*.:*.:*

003797      AGGAGGAAGGGGGTGAGGGAGCATCCCTTTGAGTTTCGCCTCTTCT-CGAGGCGGTGGTG 116
152991      AGGAGGAAGGGGGTGAGGGAGCATCCCTTTGAGTTTCGCCTCTTCT-CGAGGCGGTGGTG 116
XEED       AGCAAACATGGACAAATGGG--ATCACATCAAGTTAAAAAGCTTCTGCATAGCAAAGGAT 178
           ** *... * ** .:.* ** . ****.* * .*****:..... ***** *.:*.:*.:*.:*.:*

003797      GGAAGGGAGACATACTTAATACTGCCCTCTTAAT-----CCAACGGA 158
152991      GGAAGGGAGACATACTTAATACTGCCCTCTTAAT-----CCAACGGA 158
XEED       ACAATCAGCAAAGTGAAGAGACAACCCACAAAATGGGAGAAAATATTTGCAAACCTACCCA 238
           . ** .. *.* : :.:* **.:***:~::~***          .:* ** *

003797      CCTTACATCGTGTAGACTGCCGGGAGGGCGCGGGGAAAAGGGCAAGACGGGAG--TTGGG 216
152991      CCTTACATCGTGTAGACTGCCGGGAGGGCGCGGGGAAAAGGGCAAGACGGGAG--TTGGG 216
XEED       TCTGACAAGGCATTAGTAACAGAATATATAAGGAGCTCAAACAAGTCTATAGGAAAAG 298
           ** ***: * .:~.. :.***.* . . . . * . . . . . *****: * . ** :~..*

003797      GAAGGGAAGGAGCCAGGAAGCCGCGCGGGAGGG-CGCGCGCGCGCGCCCTTTTTCAGCA 275
152991      GAAGGGAAGGAGCCAGGAAGCCGCGCGGGAGGG-CGCGCGCGCGCGCCCTTTTTCAGCA 275
XEED       TCTAATAATGTATCAAAAAATGGGCAAAGATTTGAATAGACATTTCTCAAAGAAGAT 358
           :~.. ** * : . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . *

003797      GTGTGGCGGGGTCGCACGCACGC-----CCGCCTCGG-----CGGCTGGGCGC 318
152991      GTGTGGCGGGGTCGCACGCACGC-----CCGCCTCGG-----CGGCTGGGCGC 318
XEED       GTACAAATGGCAAACAGGCATACGAAAAGGTGCTCAACATCACGATTATCAGAGAAATGC 418
           ** . . . . * : . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . *

003797      GATTTGCACAGTGGGGGGGCGGTGGAGGTGGCGGCGCAGCG----GCAACTTTGCGG 374
152991      GATTTGCACAGTGGGGGGGCGGTGGAGGTGGCGGCGCAGCG----GCAACTTTGCGG 374
XEED       AAATCAAACACTACAATGAGATATCATCTAATCCAGTTAAAACGGATTATATCAAAGA 478
           .:* . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . * . . . . *

003797      CAAGCTCGGGCCGG-GCTTGCTTGACGGCGGTGTGGCGGAGGCC-----CGCCCCAGGC 428
152991      CAAGCTCGGGCCGG-GCTTGCTTGACGGCGGTGTGGCGGAGGCC-----CGCCCCAGGC 428
XEED       CAAGCAATAGCAAATGCAGGCGAGGGTGTGGAGAAAAGGGAACCTCTTGACACTGTTGGT 538
           *****: . ** . . . . ** : ** :. * ** :. . . . * . . . . * . . . . *

003797      GGCAGG-----AACCTGGAGGGAG-----GCGGAG-----AATATG 460
152991      GGCAGG-----AACCTGGAGGGAG-----GCGGAG-----AATATG 460
XEED       GGCAATGTAATTAGTGCAACCACTATGGAGAACAGTGTGGAGGTCCCTCAAACAACCAA 598
           ****.          ****: * *****          * *****          ** .:~.

003797      TCCGAGAGGGAAGTGTGACTGCGCCGGCGGGAACAGACATGCCTGCGGCCAAGAAGCAG 520
152991      TCCGAGAGGGAAGTGTGACTGCGCCGGCGGGAACAGACATGCCTGCGGCCAAGAAGCAG 520
XEED       AAAGAGAGGGAATGTCAACTGTGCTGGTGGGATTAGACACGCTGCAGTGAAGAAGCAG 658
           :~..*****. ****.**** ** * ****: ***** ***** . * *****

003797      AAGCTGAGCAGTGACGAGAACAGCAATCCAGACCTCTCTGGAGACGAGAATGATGACGCT 580
152991      AAGCTGAGCAGTGACGAGAACAGCAATCCAGACCTCTCTGGAGACGAGAATGATGACGCT 580
XEED       AAGCTGAGCAGTGACGAGACCAGCAACCTCACCTCTCTGGAGAGGAGAATGATGATGCT 718
           ***** ***** . ***** ** : ***** ***** ***** *****

003797      GTCAGTATAGAAAGTGGTACAAACACTGAACGCCCTGATACACCTACAAACACGCCAAAT 640
152991      GTCAGTATAGAAAGTGGTACAAACACTGAACGCCCTGATACACCTACAAACACGCCAAAT 640
XEED       GTCAG--TAGAAAGTGGTACAATCACTGAACACCCTGATATACCTACAAACATGCCAAAT 776
           ***** ***** ***** . ***** . ***** ***** ***** *****

003797      GCACCTGGAAGGAAAAGTTGGGGAAAGGGAAAATGGAAGTCAAAGAAATGCAAATATTTCT 700
152991      GCACCTGGAAGGAAAAGTTGGGGAAAGGGAAAATGGAAGTCAAAGAAATGCAAATATTTCT 700
XEED       GCACCTGGAAGGCAAAGTTGGGGAAAGGGAAAATGGAAGTCAAAGAAATGCAAATGTGCT 836
           ***** . ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
    
```

Anhang

003797	TTCAAATGTGTAATAAGTCTCAAGGAAGATCATAACCAACCATTGTTTGGAGTTCAGTTT	760	
152991	TTCAAATGTGTAATAAGTCTCAAGGAAGATCATAACCAACCATTGTTTGGAGTTCAGTTT	760	
XEED	TTCAAATGTGTAATAAGTCTCAAGGAAGATCATAACCAACCATTGTTTGGAGTTCAGTTT	896	

003797	AACTGGCACAGTAAAGAAGGAGATCCATTAGTGTGCAACTGTAGGAAGCAACAGAGTT	820	
152991	AACTGGCACAGTAAAGAAGGAGATCCATTAGTGTGCAACTGTAGGAAGCAACAGAGTT	820	
XEED	AATTAGCACAGTAAAGAAGAAGATCCATTACTGTTGCAACTGTAGGAAGCAACAGAGTT	956	
	** * .*****		
003797	ACCTTGATGAATGTCATTACAAGGAGAAATCCGGTGTGCAATCTTACGTGGATGCT	880	
152991	ACCTTGATGAATGTCATTACAAGGAGAAATCCGGTGTGCAATCTTACGTGGATGCT	880	
XEED	ACCTTGATGAATGTCATTACAAGGAGAAATCCGGTGTGCAATCTTACGTGGATGCT	1016	

003797	GATGCTGATGAAAACCTTTTACACTTGTGCATGGACCTATGATAGCAATACGAGCCATCCT	940	
152991	GATGCTGATGAAAACCTTTTACACTTGTGCATGGACCTATGATAGCAATACGAGCCATCCT	940	
XEED	GATGCTGACG-AAACTTTTACACTTGTGCATGGACCTATGATAGCAATACGAGCCATCCT	1065	
	***** * *****		
	→		
003797	CTGCTGGCTGTAGCTGGATCTAGAGGCATAATTAGGATAATAAATCCTATAACAATGCAG	1000	
152991	CTGCTGGCTGTAGCTGGATCTAGAGGCATAATTAGGATAATAAATCCTATAACAATGCAG	1000	
XEED	-----AAGCATAATTGGGATGATTAATCCACAAACACGCAG	1102	
	* .***** .*** .** :***** * ***** *		
003797	TGTATAAAGCACTATGTTGGCCATGGAATGCTATCAATGAGCTGAAATCCATCCAAGA	1060	
152991	TGTATAAAGCACTATGTTGGCCATGGAATGCTATCAATGAGCTGAAATCCATCCAAGA	1060	
XEED	TGTAAAAAGCACTATATTGGCCACGGAATGCTATCAATGAGCTGAAATCCACCTTAGA	1162	
	**** :***** .***** *****		
003797	GATCCAAATCTTCTCCTGTGTAAGTAAAGATCATGCTTTACGATTATGGAATATCCAG	1120	
152991	GATCCAAATCTTCTCCTGTGTAAGTAAAGATCATGCTTTACGATTATGGAATATCCAG	1120	
XEED	GATCCAAATCTACTCCTATCAGTAAAGTAAAGATCATGCTTTATGATTATGGAATA----	1217	
	***** :***** .***** *****		
003797	ACGGACACTCTGGTGGCAATATTTGGAGCGTAGAAGGGCACAGAGATGAAGTTCTAAGT	1180	
152991	ACGGACACTCTGGTGGCAATATTTGGAGCGTAGAAGGGCACAGAGATGAAGTTCTAAGT	1180	
XEED	ATGGACACACTGGTGGCAATATTTGGAAGCATAGAAGGGCACAGAGTTGAAGTTCTAAGC	1277	
	* ***** :***** .***** .** .***** :*****		
003797	GCTGATTATGATCTTTTGGGTGAAAAATAATGTCCTGTGGTATGGATCATTCTCTTAAA	1240	
152991	GCTGATTATGATCTTTTGGGTGAAAAATAATGTCCTGTGGTATGGATCATTCTCTTAAA	1240	
XEED	GCTGGTTGTGATCTTTTGGGTGAAAAATAATGTCCTGTGGTATGGATCATTCTCTTAAA	1333	
	***** .** .***** *****		
003797	CTTTGGAGGATCAATTCAAAGAGAATGATGAATGCAATTAAGGAATCTTATGATTATAAT	1300	
152991	CTTTGGAGGATCAATTCAAAGAGAATGATGAATGCAATTAAGGAATCTTATGATTATAAT	1300	
XEED	CTTTGGTGGATCAATTCAAAGAGAATGATGAATTCATTAAGGAATCTTATGATTATAAC	1393	
	***** :***** .***** ***** *		
003797	CCAAATAAAACTAACAGGCCATTTATTCTCAGAAAATCCATTTTCTGATTTTCTTACC	1360	
152991	CCAAATAAAACTAACAGGCCATTTATTCTCAGAAAATCCATTTTCTGATTTTCTTACC	1360	
XEED	CCAAGTAAACTAACAGGCCATTTAATCTCAGAAAATCCATTTTCTGATTTTCTTACC	1452	
	**** .***** :***** :***** ***** *		
003797	AGAGACATACATAGGAATTATGTTGATGTGTGCGATGGTTAGGCGATTTGATACTTTCT	1420	
152991	AGAGACATACATAGGAATTATGTTGATGTGTGCGATGGTTAGGCGATTTGATACTTTCT	1420	
XEED	AGAGACATACACAGGAATTATGTTGATGTGTGCGATGGTTAGGCGATTTGATACTTTCT	1512	
	***** ***** *		
003797	AAGTCTTGTGAAAATGCCATTGTGTGCTGGAACCTGGCAAGATGGAAGATGATATAGAT	1480	
152991	AAGTCTTGTGAAAATGCCATTGTGTGCTGGAACCTGGCAAGATGGAAGATGATATAGAT	1480	
XEED	AAGTCTTGTGAAAATGCAGTTGTGT--TGGAACTGGCAAAACGGAAGGTGATATAGAT	1570	
	***** .***** .***** ***** *		
003797	AAAATTAACCCAGTGAATCTAATGTGACTATTCTTGGGCGATTGATTACAGCCAGTGT	1540	
152991	AAAATTAACCCAGTGAATCTAATGTGACTATTCTTGGGCGATTGATTACAGCCAGTGT	1540	
XEED	ACAATTAACCTGGTGAATCTAATGTGACTATTCTTGGGCGATTGATTGATTGATTGATTG	1630	
	* .**** .**** .**** .***** ***** *		
003797	GACATTTGGTACATGAGGTTTTCTATGGATTTCTGGCAAAAAGATGCTTGCATTGGGC	1600	
152991	GACATTTGGTACATGAGGTTTTCTATGGATTTCTGGCAAAAAGATGCTTGCATTGGGC	1600	
XEED	GATATTTGGTACATGAGGTTTTCTATGAATTTCTGGCAAAAAGATGCTTGCATTGGGC	1690	
	** ***** .***** .***** *****		

sEED kurz
934U19

sXEED1052
U22

asEED kurz
1118L19

asXEED
1214L20

sEED kurz
1514U18

sEED kurz
1557U21

- Diese Primer amplifizieren EED kurz (NM_003797) und lang (NM_152991)
- Diese Primer amplifizieren nur XEED
- Diese Primer amplifizieren EED kurz (NM_003797) und XEED
- Diese Primer amplifizieren EED kurz (NM_003797), lang (NM_152991) und XEED
- Diese Primer amplifizieren nur EED lang (NM_152991)

Abb. 49: Alignment der beiden humanen EED mRNA Splicevarianten mit dem X-chromosomalen EED Pseudogen.

Waagerechte Pfeile markieren die Position und Richtung der unterschiedlichen Primer, die design wurden, um die Expression der beiden EED-Splicevarianten sowie das Pseudogen voneinander zu unterscheiden. Das schwarze Rechteck umrahmt die Position der Sonde des TaqMan Assays.

8.3 Analyse von myeloischen Markern in einer wildtypischen NK-Zell-Generierungskultur

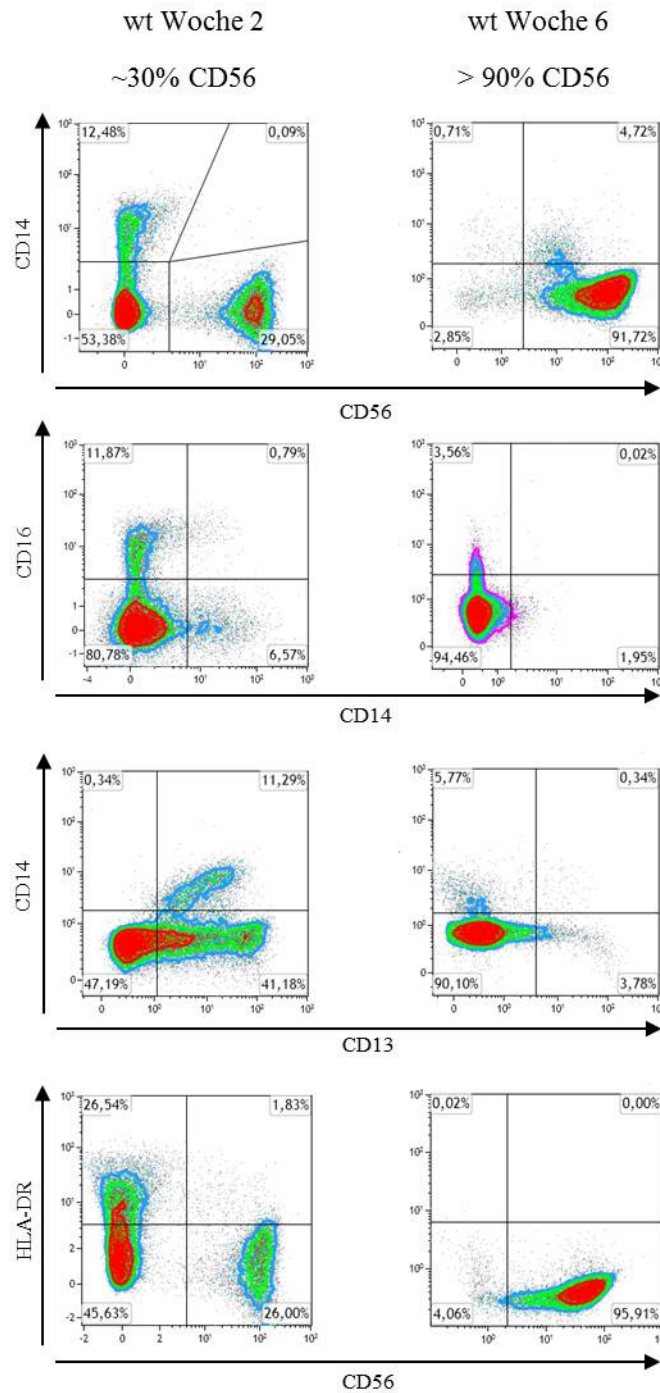


Abb. 50: Durchflusszytometrische Analyse einer wildtypischen NK-Zell-Generierungskultur nach zwei und sechs Wochen.

Zwei und sechs Wochen nach Beginn der NK-Zell-Generierung wurden die Zellen auf die Expression verschiedener Oberflächenmarker hin durchflusszytometrisch untersucht.

9. LITERATUR

1. European Commission, Directorate-General for Economic and Financial Affairs (2012) The 2012 Ageing Report, Economic and budgetary projections for the 27 EU Member States (2010-2060). ISBN 978-92-79-22850-6, European Union 2012.
2. Scully T (2012) Demography: To the limit. *Nature* 492: S2-3.
3. Kirkwood TB, Austad SN (2000) Why do we age? *Nature* 408: 233-238.
4. Iakova P, Awad SS, Timchenko NA (2003) Aging reduces proliferative capacities of liver by switching pathways of C/EBPalpha growth arrest. *Cell* 113: 495-506.
5. Conboy IM, Conboy MJ, Wagers AJ, Girma ER, Weissman IL, et al. (2005) Rejuvenation of aged progenitor cells by exposure to a young systemic environment. *Nature* 433: 760-764.
6. Zouboulis CC, Adjaye J, Akamatsu H, Moe-Behrens G, Niemann C (2008) Human skin stem cells and the ageing process. *Exp Gerontol* 43: 986-997.
7. Gruver AL, Hudson LL, Sempowski GD (2007) Immunosenescence of ageing. *J Pathol* 211: 144-156.
8. Berneburg M, Plettenberg H, Krutmann J (2000) Photoaging of human skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 16: 239-244.
9. Schmucker DL, Sanchez H (2011) Liver regeneration and aging: a current perspective. *Curr Gerontol Geriatr Res* 2011: 526379.
10. Rando TA (2006) Stem cells, ageing and the quest for immortality. *Nature* 441: 1080-1086.
11. Weissman IL (2000) Translating stem and progenitor cell biology to the clinic: barriers and opportunities. *Science* 287: 1442-1446.
12. Potten CS, Loeffler M (1990) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110: 1001-1020.
13. Hemberger M, Dean W, Reik W (2009) Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 526-537.
14. Orkin SH, Zon LI (2008) Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell* 132: 631-644.
15. Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL (2003) Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 Suppl 1: 11842-11849.
16. Nijnik A, Woodbine L, Marchetti C, Dawson S, Lambe T, et al. (2007) DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature* 447: 686-690.
17. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, et al. (2007) Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 447: 725-729.
18. Kamenisch Y, Fousteri M, Knoch J, von Thaler AK, Fehrenbacher B, et al. (2010) Proteins of nucleotide and base excision repair pathways interact in mitochondria to protect from loss of subcutaneous fat, a hallmark of aging. *J Exp Med* 207: 379-390.
19. Allsopp RC, Morin GB, DePinho R, Harley CB, Weissman IL (2003) Telomerase is required to slow telomere shortening and extend replicative lifespan of HSCs during serial transplantation. *Blood* 102: 517-520.
20. Shay JW, Wright WE (2007) Hallmarks of telomeres in ageing research. *J Pathol* 211: 114-123.
21. Allsopp RC, Weissman IL (2002) Replicative senescence of hematopoietic stem cells during serial transplantation: does telomere shortening play a role? *Oncogene* 21: 3270-3273.
22. Carrard G, Bulteau AL, Petropoulos I, Friguet B (2002) Impairment of proteasome structure and function in aging. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1461-1474.
23. Grillari J, Katinger H, Voglauer R (2006) Aging and the ubiquitinome: traditional and non-traditional functions of ubiquitin in aging cells and tissues. *Exp Gerontol* 41: 1067-1079.
24. Krutmann J, Morita A, Chung JH (2012) Sun exposure: what molecular photodermatology tells us about its good and bad sides. *J Invest Dermatol* 132: 976-984.
25. Carty MP, Hauser J, Levine AS, Dixon K (1993) Replication and mutagenesis of UV-damaged DNA templates in human and monkey cell extracts. *Mol Cell Biol* 13: 533-542.
26. Wogan GN, Hecht SS, Felton JS, Conney AH, Loeb LA (2004) Environmental and chemical carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 14: 473-486.

27. Brink TC, Demetrius L, Lehrach H, Adjaye J (2009) Age-related transcriptional changes in gene expression in different organs of mice support the metabolic stability theory of aging. *Biogerontology* 10: 549-564.
28. Schriener SE, Linford NJ, Martin GM, Treuting P, Ogburn CE, et al. (2005) Extension of murine life span by overexpression of catalase targeted to mitochondria. *Science* 308: 1909-1911.
29. Marchi S, Giorgi C, Suski JM, Agnoletto C, Bononi A, et al. (2012) Mitochondria-ros crosstalk in the control of cell death and aging. *J Signal Transduct* 2012: 329635.
30. Burhans WC, Weinberger M (2007) DNA replication stress, genome instability and aging. *Nucleic Acids Res* 35: 7545-7556.
31. Chambers SM, Shaw CA, Gatza C, Fisk CJ, Donehower LA, et al. (2007) Aging hematopoietic stem cells decline in function and exhibit epigenetic dysregulation. *PLoS Biol* 5: e201.
32. Zahn JM, Poosala S, Owen AB, Ingram DK, Lustig A, et al. (2007) AGEMAP: a gene expression database for aging in mice. *PLoS Genet* 3: e201.
33. Gredilla R, Garm C, Stevnsner T (2012) Nuclear and mitochondrial DNA repair in selected eukaryotic aging model systems. *Oxid Med Cell Longev* 2012: 282438.
34. Diderich K, Alanazi M, Hoeijmakers JH (2011) Premature aging and cancer in nucleotide excision repair-disorders. *DNA Repair (Amst)* 10: 772-780.
35. Jackson SP, Bartek J (2009) The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461: 1071-1078.
36. Park Y, Gerson SL (2005) DNA repair defects in stem cell function and aging. *Annu Rev Med* 56: 495-508.
37. Hayflick L (1965) The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp Cell Res* 37: 614-636.
38. Campisi J (2005) Senescent cells, tumor suppression, and organismal aging: good citizens, bad neighbors. *Cell* 120: 513-522.
39. Vicencio JM, Galluzzi L, Tajeddine N, Ortiz C, Criollo A, et al. (2008) Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path--a mini-review. *Gerontology* 54: 92-99.
40. Sharpless NE, DePinho RA (2007) How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 703-713.
41. Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L (2002) What is a natural killer cell? *Nat Immunol* 3: 6-8.
42. Chinn IK, Blackburn CC, Manley NR, Sempowski GD (2012) Changes in primary lymphoid organs with aging. *Semin Immunol* 24: 309-320.
43. DelaRosa O, Pawelec G, Peralbo E, Wikby A, Mariani E, et al. (2006) Immunological biomarkers of ageing in man: changes in both innate and adaptive immunity are associated with health and longevity. *Biogerontology* 7: 471-481.
44. Linton PJ, Dorshkind K (2004) Age-related changes in lymphocyte development and function. *Nat Immunol* 5: 133-139.
45. Miller RA (1996) The aging immune system: primer and prospectus. *Science* 273: 70-74.
46. Solana R, Pawelec G, Tarazona R (2006) Aging and innate immunity. *Immunity* 24: 491-494.
47. Borrego F, Alonso MC, Galiani MD, Carracedo J, Ramirez R, et al. (1999) NK phenotypic markers and IL2 response in NK cells from elderly people. *Exp Gerontol* 34: 253-265.
48. Almeida-Oliveira A, Smith-Carvalho M, Porto LC, Cardoso-Oliveira J, Ribeiro Ados S, et al. (2011) Age-related changes in natural killer cell receptors from childhood through old age. *Hum Immunol* 72: 319-329.
49. Le Garff-Tavernier M, Beziat V, Decocq J, Siguret V, Gandjbakhch F, et al. (2010) Human NK cells display major phenotypic and functional changes over the life span. *Aging Cell* 9: 527-535.
50. Solana R, Mariani E (2000) NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine* 18: 1613-1620.
51. Franceschi C, Bonafe M (2003) Centenarians as a model for healthy aging. *Biochem Soc Trans* 31: 457-461.
52. Morrison SJ, Weissman IL (1994) The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* 1: 661-673.
53. Kondo M, Weissman IL, Akashi K (1997) Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91: 661-672.

54. Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL (2000) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* 404: 193-197.
55. Galy A, Travis M, Cen D, Chen B (1995) Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity* 3: 459-473.
56. Kondo M, Scherer DC, King AG, Manz MG, Weissman IL (2001) Lymphocyte development from hematopoietic stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 11: 520-526.
57. Liu K, Nussenzweig MC (2010) Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev* 234: 45-54.
58. Ding L, Saunders TL, Enikolopov G, Morrison SJ (2012) Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481: 457-462.
59. Kiel MJ, Morrison SJ (2008) Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol* 8: 290-301.
60. Ikuta K, Weissman IL (1992) Evidence that hematopoietic stem cells express mouse c-kit but do not depend on steel factor for their generation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 1502-1506.
61. Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL (1988) Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241: 58-62.
62. Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, Ahlenius H, Sonu R, et al. (2005) Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9194-9199.
63. Christensen JL, Weissman IL (2001) Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 14541-14546.
64. Beerman I, Bhattacharya D, Zandi S, Sigvardsson M, Weissman IL, et al. (2010) Functionally distinct hematopoietic stem cells modulate hematopoietic lineage potential during aging by a mechanism of clonal expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 5465-5470.
65. Notta F, Doulatov S, Laurenti E, Poeppl A, Jurisica I, et al. (2011) Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* 333: 218-221.
66. Bhatia M, Wang JC, Kapp U, Bonnet D, Dick JE (1997) Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 5320-5325.
67. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B (1992) Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2804-2808.
68. Dykstra B, Olthof S, Schreuder J, Ritsema M, de Haan G (2011) Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 208: 2691-2703.
69. Cho RH, Sieburg HB, Muller-Sieburg CE (2008) A new mechanism for the aging of hematopoietic stem cells: aging changes the clonal composition of the stem cell compartment but not individual stem cells. *Blood* 111: 5553-5561.
70. Dykstra B, de Haan G (2008) Hematopoietic stem cell aging and self-renewal. *Cell Tissue Res* 331: 91-101.
71. Muller-Sieburg CE, Sieburg HB, Bernitz JM, Cattarossi G (2012) Stem cell heterogeneity: implications for aging and regenerative medicine. *Blood* 119: 3900-3907.
72. Dykstra B, Kent D, Bowie M, McCaffrey L, Hamilton M, et al. (2007) Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. *Cell Stem Cell* 1: 218-229.
73. Sieburg HB, Rezner BD, Muller-Sieburg CE (2011) Predicting clonal self-renewal and extinction of hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 4370-4375.
74. Wagner W, Horn P, Bork S, Ho AD (2008) Aging of hematopoietic stem cells is regulated by the stem cell niche. *Exp Gerontol* 43: 974-980.
75. Compston JE (2002) Bone marrow and bone: a functional unit. *J Endocrinol* 173: 387-394.
76. Mochizuki-Kashio M, Mishima Y, Miyagi S, Negishi M, Saraya A, et al. (2011) Dependency on the polycomb gene *Ezh2* distinguishes fetal from adult hematopoietic stem cells. *Blood* 118: 6553-6561.
77. Howlander N, Noone A.M., Krapcho M., Neyman N., Aminou R., et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/, based on November 2011 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2012.
78. Lansdorp PM, Dragowska W, Mayani H (1993) Ontogeny-related changes in proliferative potential of human hematopoietic cells. *J Exp Med* 178: 787-791.

79. Pang WW, Price EA, Sahoo D, Beerman I, Maloney WJ, et al. (2011) Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 20012-20017.
80. Kollman C, Howe CW, Anasetti C, Antin JH, Davies SM, et al. (2001) Donor characteristics as risk factors in recipients after transplantation of bone marrow from unrelated donors: the effect of donor age. *Blood* 98: 2043-2051.
81. Waddington CH (2012) The epigenotype. 1942. *Int J Epidemiol* 41: 10-13.
82. Leeb M, Wutz A (2012) Establishment of epigenetic patterns in development. *Chromosoma* 121: 251-262.
83. Fraga MF, Esteller M (2007) Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet* 23: 413-418.
84. Gargiulo G, Minucci S (2009) Epigenomic profiling of cancer cells. *Int J Biochem Cell Biol* 41: 127-135.
85. Esteller M (2007) Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8: 286-298.
86. Mellor J (2005) The dynamics of chromatin remodeling at promoters. *Mol Cell* 19: 147-157.
87. Gaffney DJ, McVicker G, Pai AA, Fondufe-Mittendorf YN, Lewellen N, et al. (2012) Controls of nucleosome positioning in the human genome. *PLoS Genet* 8: e1003036.
88. Espada J, Esteller M (2007) Epigenetic control of nuclear architecture. *Cell Mol Life Sci* 64: 449-457.
89. Banaszynski LA, Allis CD, Lewis PW (2010) Histone variants in metazoan development. *Dev Cell* 19: 662-674.
90. Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, et al. (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 10: 2709-2721.
91. Gardiner-Garden M, Frommer M (1987) CpG islands in vertebrate genomes. *J Mol Biol* 196: 261-282.
92. Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6-21.
93. Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, et al. (2007) Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet* 3: 2023-2036.
94. Woodcock DM, Crowther PJ, Diver WP, Graham M, Bateman C, et al. (1988) RglB facilitated cloning of highly methylated eukaryotic DNA: the human L1 transposon, plant DNA, and DNA methylated in vitro with human DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 16: 4465-4482.
95. Woodcock DM, Lawler CB, Linsenmeyer ME, Doherty JP, Warren WD (1997) Asymmetric methylation in the hypermethylated CpG promoter region of the human L1 retrotransposon. *J Biol Chem* 272: 7810-7816.
96. Liu WM, Maraia RJ, Rubin CM, Schmid CW (1994) Alu transcripts: cytoplasmic localisation and regulation by DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 22: 1087-1095.
97. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet* 13: 335-340.
98. Iskow RC, McCabe MT, Mills RE, Torene S, Pittard WS, et al. (2010) Natural mutagenesis of human genomes by endogenous retrotransposons. *Cell* 141: 1253-1261.
99. Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH (1998) Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 20: 116-117.
100. Howard G, Eiges R, Gaudet F, Jaenisch R, Eden A (2008) Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene* 27: 404-408.
101. Csankovszki G, Nagy A, Jaenisch R (2001) Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol* 153: 773-784.
102. Barlow DP (2011) Genomic imprinting: a mammalian epigenetic discovery model. *Annu Rev Genet* 45: 379-403.
103. Hermann A, Gowher H, Jeltsch A (2004) Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci* 61: 2571-2587.
104. Issa JP (1999) Aging, DNA methylation and cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 32: 31-43.

105. Teschendorff AE, Menon U, Gentry-Maharaj A, Ramus SJ, Weisenberger DJ, et al. (2010) Age-dependent DNA methylation of genes that are suppressed in stem cells is a hallmark of cancer. *Genome Res* 20: 440-446.
106. Issa JP, Ottaviano YL, Celano P, Hamilton SR, Davidson NE, et al. (1994) Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon. *Nat Genet* 7: 536-540.
107. Bocker MT, Hellwig I, Breiling A, Eckstein V, Ho AD, et al. (2011) Genome-wide promoter DNA methylation dynamics of human hematopoietic progenitor cells during differentiation and aging. *Blood* 117: e182-189.
108. Rakyan VK, Down TA, Maslau S, Andrew T, Yang TP, et al. (2010) Human aging-associated DNA hypermethylation occurs preferentially at bivalent chromatin domains. *Genome Res* 20: 434-439.
109. Fraga MF, Ballestar E, Paz MF, Ropero S, Setien F, et al. (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10604-10609.
110. Heyn H, Li N, Ferreira HJ, Moran S, Pisano DG, et al. (2012) Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 10522-10527.
111. Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-260.
112. Luger K (2006) Dynamic nucleosomes. *Chromosome Res* 14: 5-16.
113. Kouzarides T (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* 128: 693-705.
114. Luger K, Richmond TJ (1998) The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev* 8: 140-146.
115. Bernstein BE, Meissner A, Lander ES (2007) The mammalian epigenome. *Cell* 128: 669-681.
116. Banerjee T, Chakravarti D (2011) A peek into the complex realm of histone phosphorylation. *Mol Cell Biol* 31: 4858-4873.
117. Thompson PR, Fast W (2006) Histone citrullination by protein arginine deiminase: is arginine methylation a green light or a roadblock? *ACS Chem Biol* 1: 433-441.
118. Di Lorenzo A, Bedford MT (2011) Histone arginine methylation. *FEBS Lett* 585: 2024-2031.
119. Izzo A, Schneider R (2010) Chatting histone modifications in mammals. *Brief Funct Genomics* 9: 429-443.
120. Strahl BD, Allis CD (2000) The language of covalent histone modifications. *Nature* 403: 41-45.
121. Schubeler D, MacAlpine DM, Scalzo D, Wirbelauer C, Kooperberg C, et al. (2004) The histone modification pattern of active genes revealed through genome-wide chromatin analysis of a higher eukaryote. *Genes Dev* 18: 1263-1271.
122. Roh TY, Cuddapah S, Zhao K (2005) Active chromatin domains are defined by acetylation islands revealed by genome-wide mapping. *Genes Dev* 19: 542-552.
123. Marmorstein R, Roth SY (2001) Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis. *Curr Opin Genet Dev* 11: 155-161.
124. Bertrand P (2010) Inside HDAC with HDAC inhibitors. *Eur J Med Chem* 45: 2095-2116.
125. Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, et al. (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129: 823-837.
126. Cui K, Zang C, Roh TY, Schones DE, Childs RW, et al. (2009) Chromatin signatures in multipotent human hematopoietic stem cells indicate the fate of bivalent genes during differentiation. *Cell Stem Cell* 4: 80-93.
127. Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G (2007) Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* 128: 735-745.
128. Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, et al. (2006) A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125: 315-326.
129. Roh TY, Cuddapah S, Cui K, Zhao K (2006) The genomic landscape of histone modifications in human T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 15782-15787.
130. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, et al. (2007) Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448: 553-560.
131. Weishaupt H, Sigvardsson M, Attema JL (2010) Epigenetic chromatin states uniquely define the developmental plasticity of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 115: 247-256.
132. Lewis EB (1978) A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276: 565-570.

133. Jacobs JJ, van Lohuizen M (1999) Cellular memory of transcriptional states by Polycomb-group proteins. *Semin Cell Dev Biol* 10: 227-235.
134. Whitcomb SJ, Basu A, Allis CD, Bernstein E (2007) Polycomb Group proteins: an evolutionary perspective. *Trends Genet* 23: 494-502.
135. Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, et al. (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298: 1039-1043.
136. Cao R, Zhang Y (2004) SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* 15: 57-67.
137. Cao R, Zhang Y (2004) The functions of E(Z)/EZH2-mediated methylation of lysine 27 in histone H3. *Curr Opin Genet Dev* 14: 155-164.
138. Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Lazzerini Denchi E, Helin K (2004) Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *Embo J* 23: 4061-4071.
139. Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D (2002) Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes Dev* 16: 2893-2905.
140. Czermin B, Melfi R, McCabe D, Seitz V, Imhof A, et al. (2002) Drosophila enhancer of Zeste/ESC complexes have a histone H3 methyltransferase activity that marks chromosomal Polycomb sites. *Cell* 111: 185-196.
141. Muller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, et al. (2002) Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. *Cell* 111: 197-208.
142. Trojer P, Reinberg D (2007) Facultative heterochromatin: is there a distinctive molecular signature? *Mol Cell* 28: 1-13.
143. Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, et al. (2008) Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell* 32: 503-518.
144. Shen X, Liu Y, Hsu YJ, Fujiwara Y, Kim J, et al. (2008) EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell* 32: 491-502.
145. Margueron R, Justin N, Ohno K, Sharpe ML, Son J, et al. (2009) Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature* 461: 762-767.
146. Tie F, Stratton CA, Kurzhals RL, Harte PJ (2007) The N terminus of Drosophila ESC binds directly to histone H3 and is required for E(Z)-dependent trimethylation of H3 lysine 27. *Mol Cell Biol* 27: 2014-2026.
147. Montgomery ND, Yee D, Chen A, Kalantry S, Chamberlain SJ, et al. (2005) The murine polycomb group protein Eed is required for global histone H3 lysine-27 methylation. *Curr Biol* 15: 942-947.
148. Han Z, Xing X, Hu M, Zhang Y, Liu P, et al. (2007) Structural basis of EZH2 recognition by EED. *Structure* 15: 1306-1315.
149. Montgomery ND, Yee D, Montgomery SA, Magnuson T (2007) Molecular and functional mapping of EED motifs required for PRC2-dependent histone methylation. *J Mol Biol* 374: 1145-1157.
150. Rietzler M, Bittner M, Kolanus W, Schuster A, Holzmann B (1998) The human WD repeat protein WAIT-1 specifically interacts with the cytoplasmic tails of beta7-integrins. *J Biol Chem* 273: 27459-27466.
151. Denisenko ON, Bomszyk K (1997) The product of the murine homolog of the Drosophila extra sex combs gene displays transcriptional repressor activity. *Mol Cell Biol* 17: 4707-4717.
152. Kuzmichev A, Jenuwein T, Tempst P, Reinberg D (2004) Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3. *Mol Cell* 14: 183-193.
153. Schumacher A, Lichtarge O, Schwartz S, Magnuson T (1998) The murine Polycomb-group gene eed and its human orthologue: functional implications of evolutionary conservation. *Genomics* 54: 79-88.
154. Kuzmichev A, Margueron R, Vaquero A, Preissner TS, Scher M, et al. (2005) Composition and histone substrates of polycomb repressive group complexes change during cellular differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 1859-1864.
155. Ringrose L, Paro R (2007) Polycomb/Trithorax response elements and epigenetic memory of cell identity. *Development* 134: 223-232.

156. Sing A, Pannell D, Karaiskakis A, Sturgeon K, Djabali M, et al. (2009) A vertebrate Polycomb response element governs segmentation of the posterior hindbrain. *Cell* 138: 885-897.
157. Woo CJ, Kharchenko PV, Daheron L, Park PJ, Kingston RE (2010) A region of the human HOXD cluster that confers polycomb-group responsiveness. *Cell* 140: 99-110.
158. Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, et al. (2008) Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet* 4: e1000242.
159. Mendenhall EM, Koche RP, Truong T, Zhou VW, Issac B, et al. (2010) GC-rich sequence elements recruit PRC2 in mammalian ES cells. *PLoS Genet* 6: e1001244.
160. Arnold P, Scholer A, Pachkov M, Balwiercz PJ, Jorgensen H, et al. (2013) Modeling of epigenome dynamics identifies transcription factors that mediate Polycomb targeting. *Genome Res* 23: 60-73.
161. Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, et al. (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439: 871-874.
162. Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, et al. (2007) Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* 39: 157-158.
163. Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, et al. (2007) Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet* 39: 232-236.
164. Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, et al. (2007) A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet* 39: 237-242.
165. Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Bumber Y, et al. (2008) Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet* 40: 741-750.
166. Brinkman AB, Gu H, Bartels SJ, Zhang Y, Matarese F, et al. (2012) Sequential ChIP-bisulfite sequencing enables direct genome-scale investigation of chromatin and DNA methylation cross-talk. *Genome Res* 22: 1128-1138.
167. Rodriguez J, Munoz M, Vives L, Frangou CG, Groudine M, et al. (2008) Bivalent domains enforce transcriptional memory of DNA methylated genes in cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 19809-19814.
168. Srinivasan L, Atchison ML (2004) YY1 DNA binding and PcG recruitment requires CtBP. *Genes Dev* 18: 2596-2601.
169. Atchison L, Ghias A, Wilkinson F, Bonini N, Atchison ML (2003) Transcription factor YY1 functions as a PcG protein in vivo. *EMBO J* 22: 1347-1358.
170. Xi H, Yu Y, Fu Y, Foley J, Halees A, et al. (2007) Analysis of overrepresented motifs in human core promoters reveals dual regulatory roles of YY1. *Genome Res* 17: 798-806.
171. Li G, Margueron R, Ku M, Chambon P, Bernstein BE, et al. (2010) Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes Dev* 24: 368-380.
172. Shen X, Kim W, Fujiwara Y, Simon MD, Liu Y, et al. (2009) Jumonji modulates polycomb activity and self-renewal versus differentiation of stem cells. *Cell* 139: 1303-1314.
173. Peng JC, Valouev A, Swigut T, Zhang J, Zhao Y, et al. (2009) Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell* 139: 1290-1302.
174. Pasini D, Cloos PA, Walfridsson J, Olsson L, Bukowski JP, et al. (2010) JARID2 regulates binding of the Polycomb repressive complex 2 to target genes in ES cells. *Nature* 464: 306-310.
175. Guil S, Soler M, Portela A, Carrere J, Fonalleras E, et al. (2012) Intronic RNAs mediate EZH2 regulation of epigenetic targets. *Nat Struct Mol Biol* 19: 664-670.
176. Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammamaparast N, Wang JK, et al. (2010) Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 329: 689-693.
177. Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT (2008) Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science* 322: 750-756.
178. Hansen KH, Bracken AP, Pasini D, Dietrich N, Gehani SS, et al. (2008) A model for transmission of the H3K27me3 epigenetic mark. *Nat Cell Biol* 10: 1291-1300.

179. Petruk S, Sedkov Y, Johnston DM, Hodgson JW, Black KL, et al. (2012) TrxG and PcG proteins but not methylated histones remain associated with DNA through replication. *Cell* 150: 922-933.
180. de Napoles M, Mermoud JE, Wakao R, Tang YA, Endoh M, et al. (2004) Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation. *Dev Cell* 7: 663-676.
181. Buchwald G, van der Stoop P, Weichenrieder O, Perrakis A, van Lohuizen M, et al. (2006) Structure and E3-ligase activity of the Ring-Ring complex of polycomb proteins Bmi1 and Ring1b. *EMBO J* 25: 2465-2474.
182. Bracken AP, Dietrich N, Pasini D, Hansen KH, Helin K (2006) Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev* 20: 1123-1136.
183. Schoeftner S, Sengupta AK, Kubicek S, Mechtler K, Spahn L, et al. (2006) Recruitment of PRC1 function at the initiation of X inactivation independent of PRC2 and silencing. *EMBO J* 25: 3110-3122.
184. Tavares L, Dimitrova E, Oxley D, Webster J, Poot R, et al. (2012) RYBP-PRC1 complexes mediate H2A ubiquitylation at polycomb target sites independently of PRC2 and H3K27me3. *Cell* 148: 664-678.
185. Vincenz C, Kerppola TK (2008) Different polycomb group CBX family proteins associate with distinct regions of chromatin using nonhomologous protein sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16572-16577.
186. Dellino GI, Schwartz YB, Farkas G, McCabe D, Elgin SC, et al. (2004) Polycomb silencing blocks transcription initiation. *Mol Cell* 13: 887-893.
187. Lehmann L, Ferrari R, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Kurdistani SK, et al. (2012) Polycomb repressive complex 1 (PRC1) disassembles RNA polymerase II preinitiation complexes. *J Biol Chem* 287: 35784-35794.
188. Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstone JR, et al. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 119: 941-953.
189. Agger K, Cloos PA, Christensen J, Pasini D, Rose S, et al. (2007) UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* 449: 731-734.
190. Swigut T, Wysocka J (2007) H3K27 demethylases, at long last. *Cell* 131: 29-32.
191. Lee MG, Villa R, Trojer P, Norman J, Yan KP, et al. (2007) Demethylation of H3K27 regulates polycomb recruitment and H2A ubiquitination. *Science* 318: 447-450.
192. De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Notarbartolo S, Testa G, et al. (2007) The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell* 130: 1083-1094.
193. Lan F, Bayliss PE, Rinn JL, Whetstone JR, Wang JK, et al. (2007) A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. *Nature* 449: 689-694.
194. Hong S, Cho YW, Yu LR, Yu H, Veenstra TD, et al. (2007) Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 18439-18444.
195. Greenfield A, Carrel L, Pennisi D, Philippe C, Quaderi N, et al. (1998) The UTX gene escapes X inactivation in mice and humans. *Hum Mol Genet* 7: 737-742.
196. Barradas M, Anderton E, Acosta JC, Li S, Banito A, et al. (2009) Histone demethylase JMJD3 contributes to epigenetic control of INK4a/ARF by oncogenic RAS. *Genes Dev* 23: 1177-1182.
197. De Santa F, Narang V, Yap ZH, Tusi BK, Burgold T, et al. (2009) Jmjd3 contributes to the control of gene expression in LPS-activated macrophages. *Embo J* 28: 3341-3352.
198. Burgold T, Spreafico F, De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, et al. (2008) The histone H3 lysine 27-specific demethylase Jmjd3 is required for neural commitment. *PLoS One* 3: e3034.
199. O'Carroll D, Erhardt S, Pagni M, Barton SC, Surani MA, et al. (2001) The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Mol Cell Biol* 21: 4330-4336.
200. Faust C, Schumacher A, Holdener B, Magnuson T (1995) The *ee* mutation disrupts anterior mesoderm production in mice. *Development* 121: 273-285.
201. Chamberlain SJ, Yee D, Magnuson T (2008) Polycomb repressive complex 2 is dispensable for maintenance of embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cells* 26: 1496-1505.

202. Pasini D, Bracken AP, Hansen JB, Capillo M, Helin K (2007) The polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation. *Mol Cell Biol* 27: 3769-3779.
203. Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, et al. (2006) Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 441: 349-353.
204. Leeb M, Pasini D, Novatchkova M, Jaritz M, Helin K, et al. (2010) Polycomb complexes act redundantly to repress genomic repeats and genes. *Genes Dev* 24: 265-276.
205. Wei G, Wei L, Zhu J, Zang C, Hu-Li J, et al. (2009) Global mapping of H3K4me3 and H3K27me3 reveals specificity and plasticity in lineage fate determination of differentiating CD4+ T cells. *Immunity* 30: 155-167.
206. Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, et al. (2006) Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125: 301-313.
207. Lessard J, Schumacher A, Thorsteinsdottir U, van Lohuizen M, Magnuson T, et al. (1999) Functional antagonism of the Polycomb-Group genes *eed* and *Bmi1* in hemopoietic cell proliferation. *Genes Dev* 13: 2691-2703.
208. Majewski IJ, Ritchie ME, Phipson B, Corbin J, Pakusch M, et al. (2010) Opposing roles of polycomb repressive complexes in hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 116: 731-739.
209. van der Lugt NM, Domen J, Linders K, van Roon M, Robanus-Maandag E, et al. (1994) Posterior transformation, neurological abnormalities, and severe hematopoietic defects in mice with a targeted deletion of the *bmi-1* proto-oncogene. *Genes Dev* 8: 757-769.
210. Park IK, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, et al. (2003) *Bmi-1* is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. *Nature* 423: 302-305.
211. Majewski IJ, Blewitt ME, de Graaf CA, McManus EJ, Bahlo M, et al. (2008) Polycomb repressive complex 2 (PRC2) restricts hematopoietic stem cell activity. *PLoS Biol* 6: e93.
212. Kamminga LM, Bystrykh LV, de Boer A, Houwer S, Douma J, et al. (2006) The Polycomb group gene *Ezh2* prevents hematopoietic stem cell exhaustion. *Blood* 107: 2170-2179.
213. Lessard J, Baban S, Sauvageau G (1998) Stage-specific expression of polycomb group genes in human bone marrow cells. *Blood* 91: 1216-1224.
214. Bracken AP, Kleine-Kohlbrecher D, Dietrich N, Pasini D, Gargiulo G, et al. (2007) The Polycomb group proteins bind throughout the *INK4A-ARF* locus and are disassociated in senescent cells. *Genes Dev* 21: 525-530.
215. Agherbi H, Gaussmann-Wenger A, Verthuy C, Chasson L, Serrano M, et al. (2009) Polycomb mediated epigenetic silencing and replication timing at the *INK4a/ARF* locus during senescence. *PLoS One* 4: e5622.
216. Kim WY, Sharpless NE (2006) The regulation of *INK4/ARF* in cancer and aging. *Cell* 127: 265-275.
217. Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, et al. (2002) The polycomb group protein *EZH2* is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419: 624-629.
218. Varambally S, Cao Q, Mani RS, Shankar S, Wang X, et al. (2008) Genomic loss of microRNA-101 leads to overexpression of histone methyltransferase *EZH2* in cancer. *Science* 322: 1695-1699.
219. Weikert S, Christoph F, Kollermann J, Muller M, Schrader M, et al. (2005) Expression levels of the *EZH2* polycomb transcriptional repressor correlate with aggressiveness and invasive potential of bladder carcinomas. *Int J Mol Med* 16: 349-353.
220. Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, et al. (2003) *EZH2* is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *Embo J* 22: 5323-5335.
221. Klier CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, et al. (2003) *EZH2* is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11606-11611.
222. Fussbroich B, Wagener N, Macher-Goeppinger S, Benner A, Falth M, et al. (2011) *EZH2* depletion blocks the proliferation of colon cancer cells. *PLoS One* 6: e21651.
223. Neff T, Sinha AU, Kluk MJ, Zhu N, Khattab MH, et al. (2012) Polycomb repressive complex 2 is required for *MLL-AF9* leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 5028-5033.

224. Paul TA, Bies J, Small D, Wolff L (2010) Signatures of polycomb repression and reduced H3K4 trimethylation are associated with p15INK4b DNA methylation in AML. *Blood* 115: 3098-3108.
225. McCabe MT, Graves AP, Ganji G, Diaz E, Halsey WS, et al. (2012) Mutation of A677 in histone methyltransferase EZH2 in human B-cell lymphoma promotes hypertrimethylation of histone H3 on lysine 27 (H3K27). *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 2989-2994.
226. Bodor C, O'Riain C, Wrench D, Matthews J, Iyengar S, et al. (2011) EZH2 Y641 mutations in follicular lymphoma. *Leukemia* 25: 726-729.
227. Yap DB, Chu J, Berg T, Schapira M, Cheng SW, et al. (2011) Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood* 117: 2451-2459.
228. Morin RD, Johnson NA, Severson TM, Mungall AJ, An J, et al. (2010) Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet* 42: 181-185.
229. Sneeringer CJ, Scott MP, Kuntz KW, Knutson SK, Pollock RM, et al. (2010) Coordinated activities of wild-type plus mutant EZH2 drive tumor-associated hypertrimethylation of lysine 27 on histone H3 (H3K27) in human B-cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 20980-20985.
230. Knutson SK, Wigle TJ, Warholc NM, Sneeringer CJ, Allain CJ, et al. (2012) A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat Chem Biol* 8: 890-896.
231. Fiskus W, Pranpat M, Balasis M, Herger B, Rao R, et al. (2006) Histone deacetylase inhibitors deplete enhancer of zeste 2 and associated polycomb repressive complex 2 proteins in human acute leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 5: 3096-3104.
232. Fiskus W, Buckley K, Rao R, Mandawat A, Yang Y, et al. (2009) Panobinostat treatment depletes EZH2 and DNMT1 levels and enhances decitabine mediated de-repression of JunB and loss of survival of human acute leukemia cells. *Cancer Biol Ther* 8: 939-950.
233. Fiskus W, Wang Y, Sreekumar A, Buckley KM, Shi H, 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. *Blood* 114: 2733-2743.
234. Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, et al. (2007) Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev* 21: 1050-1063.
235. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, et al. (2012) The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 481: 157-163.
236. Simon C, Chagraoui J, Kros J, Gendron P, Wilhelm B, et al. (2012) A key role for EZH2 and associated genes in mouse and human adult T-cell acute leukemia. *Genes Dev* 26: 651-656.
237. Ntziachristos P, Tsirogos A, Van Vlierberghe P, Nedjic J, Trimarchi T, et al. (2012) Genetic inactivation of the polycomb repressive complex 2 in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Med* 18: 298-301.
238. Tefferi A, Vardiman JW (2009) Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med* 361: 1872-1885.
239. Haase D, Germing U, Schanz J, Pfeilstocker M, Nosslinger T, et al. (2007) New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood* 110: 4385-4395.
240. Cardoso C, Mignon C, Hetet G, Grandchamps B, Fontes M, et al. (2000) The human EZH2 gene: genomic organisation and revised mapping in 7q35 within the critical region for malignant myeloid disorders. *Eur J Hum Genet* 8: 174-180.
241. Ernst T, Chase AJ, Score J, Hidalgo-Curtis CE, Bryant C, et al. (2010) Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat Genet* 42: 722-726.
242. Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, et al. (2010) Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 42: 665-667.
243. Score J, Hidalgo-Curtis C, Jones AV, Winkelmann N, Skinner A, et al. (2012) Inactivation of polycomb repressive complex 2 components in myeloproliferative and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood* 119: 1208-1213.

244. Ueda T, Sanada M, Matsui H, Yamasaki N, Honda ZI, et al. (2012) EED mutants impair polycomb repressive complex 2 in myelodysplastic syndrome and related neoplasms. *Leukemia*.
245. Sauvageau M, Sauvageau G (2008) Polycomb group genes: keeping stem cell activity in balance. *PLoS Biol* 6: e113.
246. Kirmizis A, Bartley SM, Kuzmichev A, Margueron R, Reinberg D, et al. (2004) Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes Dev* 18: 1592-1605.
247. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4: 44-57.
248. Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37: 1-13.
249. Oostendorp RA, Harvey KN, Kusadasi N, de Bruijn MF, Saris C, et al. (2002) Stromal cell lines from mouse aorta-gonads-mesonephros subregions are potent supporters of hematopoietic stem cell activity. *Blood* 99: 1183-1189.
250. Oostendorp RA, Medvinsky AJ, Kusadasi N, Nakayama N, Harvey K, et al. (2002) Embryonal subregion-derived stromal cell lines from novel temperature-sensitive SV40 T antigen transgenic mice support hematopoiesis. *J Cell Sci* 115: 2099-2108.
251. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus. *J Gen Virol* 36: 59-74.
252. Rio DC, Clark SG, Tjian R (1985) A mammalian host-vector system that regulates expression and amplification of transfected genes by temperature induction. *Science* 227: 23-28.
253. DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, et al. (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7: 379-387.
254. Pear WS, Nolan GP, Scott ML, Baltimore D (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 8392-8396.
255. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med* 97: 695-710.
256. Gey GO, Coffman, W. D., Kubicek, M. T. (1952) Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer research* 12: 264-265.
257. Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G (1977) Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19: 621-626.
258. Kornbluth J, Flomenberg N, Dupont B (1982) Cell surface phenotype of a cloned line of human natural killer cells. *J Immunol* 129: 2831-2837.
259. Kahle P, Wernet P, Rehbein A, Kumbier I, Pawelec G (1981) Cloning of functional human T lymphocytes by limiting dilution: impact of filler cells and interleukin 2 sources on cloning efficiencies. *Scand J Immunol* 14: 493-502.
260. McIlvaine TC (1921) A buffer solution for colorimetric comparison. *The Journal of Biological Chemistry* 49: 183-186.
261. Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, et al. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-273.
262. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, et al. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
263. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, et al. (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
264. Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350.
265. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonak J, et al. (2006) The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27: 95-125.
266. Ohara O, Dorit RL, Gilbert W (1989) One-sided polymerase chain reaction: the amplification of cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 5673-5677.

267. Sambrook J, Russell DW, Irwin N, Janssen KA (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual* (3rd Edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
268. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
269. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
270. Young AL, Carter WG, Doyle HA, Mamula MJ, Aswad DW (2001) Structural integrity of histone H2B in vivo requires the activity of protein L-isoaspartate O-methyltransferase, a putative protein repair enzyme. *J Biol Chem* 276: 37161-37165.
271. Feser J, Truong D, Das C, Carson JJ, Kieft J, et al. (2010) Elevated histone expression promotes life span extension. *Mol Cell* 39: 724-735.
272. O'Sullivan RJ, Kubicek S, Schreiber SL, Karlseder J (2010) Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1218-1225.
273. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
274. Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 4350-4354.
275. Renart J, Reiser J, Stark GR (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 3116-3120.
276. Santourlidis S, Graffmann N, Christ J, Uhrberg M (2008) Lineage-specific transition of histone signatures in the killer cell Ig-like receptor locus from hematopoietic progenitor to NK cells. *J Immunol* 180: 418-425.
277. Pan G, Tian S, Nie J, Yang C, Ruotti V, et al. (2007) Whole-genome analysis of histone H3 lysine 4 and lysine 27 methylation in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell* 1: 299-312.
278. O'Geen H, Nicolet CM, Blahnik K, Green R, Farnham PJ (2006) Comparison of sample preparation methods for ChIP-chip assays. *Biotechniques* 41: 577-580.
279. Hao QL, Shah AJ, Thiemann FT, Smogorzewska EM, Crooks GM (1995) A functional comparison of CD34 + CD38- cells in cord blood and bone marrow. *Blood* 86: 3745-3753.
280. Lane TA, Law P, Maruyama M, Young D, Burgess J, et al. (1995) Harvesting and enrichment of hematopoietic progenitor cells mobilized into the peripheral blood of normal donors by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) or G-CSF: potential role in allogeneic marrow transplantation. *Blood* 85: 275-282.
281. Aschan J (2006) Allogeneic haematopoietic stem cell transplantation: current status and future outlook. *Br Med Bull* 77-78: 23-36.
282. Anderlini P, Rizzo JD, Nugent ML, Schmitz N, Champlin RE, et al. (2001) Peripheral blood stem cell donation: an analysis from the International Bone Marrow Transplant Registry (IBMTR) and European Group for Blood and Marrow Transplant (EBMT) databases. *Bone Marrow Transplant* 27: 689-692.
283. Dimri GP, Lee X, Basile G, Acosta M, Scott G, et al. (1995) A biomarker that identifies senescent human cells in culture and in aging skin in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9363-9367.
284. Lee BY, Han JA, Im JS, Morrone A, Johung K, et al. (2006) Senescence-associated beta-galactosidase is lysosomal beta-galactosidase. *Aging Cell* 5: 187-195.
285. Drexler HG, Uphoff CC (2002) Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 39: 75-90.
286. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, et al. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
287. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, et al. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411: 494-498.
288. Cullen BR (2005) RNAi the natural way. *Nat Genet* 37: 1163-1165.
289. Rao DD, Vorhies JS, Senzer N, Nemunaitis J (2009) siRNA vs. shRNA: similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev* 61: 746-759.

290. McIntyre GJ, Fanning GC (2006) Design and cloning strategies for constructing shRNA expression vectors. *BMC Biotechnol* 6: 1.
291. Taxman DJ, Livingstone LR, Zhang J, Conti BJ, Iocca HA, et al. (2006) Criteria for effective design, construction, and gene knockdown by shRNA vectors. *BMC Biotechnol* 6: 7.
292. Hill CL, Bieniasz PD, McClure MO (1999) Properties of human foamy virus relevant to its development as a vector for gene therapy. *J Gen Virol* 80 (Pt 8): 2003-2009.
293. Leurs C, Jansen M, Pollok KE, Heinkelein M, Schmidt M, et al. (2003) Comparison of three retroviral vector systems for transduction of nonobese diabetic/severe combined immunodeficiency mice repopulating human CD34+ cord blood cells. *Hum Gene Ther* 14: 509-519.
294. Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y (2012) Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J* 443: 603-618.
295. Trobridge GD (2009) Foamy virus vectors for gene transfer. *Expert Opin Biol Ther* 9: 1427-1436.
296. Miller JS, McCullar V, Verfaillie CM (1998) Ex vivo culture of CD34+/Lin-/DR- cells in stroma-derived soluble factors, interleukin-3, and macrophage inflammatory protein-1alpha maintains not only myeloid but also lymphoid progenitors in a novel switch culture assay. *Blood* 91: 4516-4522.
297. Grzywacz B, Kataria N, Kataria N, Bazar BR, Miller JS, et al. (2011) Natural killer-cell differentiation by myeloid progenitors. *Blood* 117: 3548-3558.
298. Miller JS, McCullar V, Punzel M, Lemischka IR, Moore KA (1999) Single adult human CD34(+)/Lin-/CD38(-) progenitors give rise to natural killer cells, B-lineage cells, dendritic cells, and myeloid cells. *Blood* 93: 96-106.
299. McCullar V, Oostendorp R, Panoskaltis-Mortari A, Yun G, Lutz CT, et al. (2008) Mouse fetal and embryonic liver cells differentiate human umbilical cord blood progenitors into CD56-negative natural killer cell precursors in the absence of interleukin-15. *Exp Hematol* 36: 598-608.
300. Areman E, Deeg JH, Sacher RA (1992) Bone marrow and stem cell processing: a manual of current techniques. FA Davis Company, Philadelphia.
301. Day DS, Luquette LJ, Park PJ, Kharchenko PV (2010) Estimating enrichment of repetitive elements from high-throughput sequence data. *Genome Biol* 11: R69.
302. Peters AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, et al. (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol Cell* 12: 1577-1589.
303. Khalfin-Rabinovich Y, Weinstein A, Levi BZ (2011) PML is a key component for the differentiation of myeloid progenitor cells to macrophages. *Int Immunol* 23: 287-296.
304. Labbaye C, Valtieri M, Grignani F, Puglisi R, Luchetti L, et al. (1999) Expression and role of PML gene in normal adult hematopoiesis: functional interaction between PML and Rb proteins in erythropoiesis. *Oncogene* 18: 3529-3540.
305. Wang ZG, Delva L, Gaboli M, Rivi R, Giorgio M, et al. (1998) Role of PML in cell growth and the retinoic acid pathway. *Science* 279: 1547-1551.
306. Gutierrez A, Jr., Tschumper RC, Wu X, Shanafelt TD, Eckel-Passow J, et al. (2010) LEF-1 is a prosurvival factor in chronic lymphocytic leukemia and is expressed in the preleukemic state of monoclonal B-cell lymphocytosis. *Blood* 116: 2975-2983.
307. Held W, Clevers H, Grosschedl R (2003) Redundant functions of TCF-1 and LEF-1 during T and NK cell development, but unique role of TCF-1 for Ly49 NK cell receptor acquisition. *Eur J Immunol* 33: 1393-1398.
308. Hovanes K, Li TW, Waterman ML (2000) The human LEF-1 gene contains a promoter preferentially active in lymphocytes and encodes multiple isoforms derived from alternative splicing. *Nucleic Acids Res* 28: 1994-2003.
309. Reya T, O'Riordan M, Okamura R, Devaney E, Willert K, et al. (2000) Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity* 13: 15-24.
310. Travis A, Amsterdam A, Belanger C, Grosschedl R (1991) LEF-1, a gene encoding a lymphoid-specific protein with an HMG domain, regulates T-cell receptor alpha enhancer function [corrected]. *Genes Dev* 5: 880-894.

311. Peabody DS (1989) Translation initiation at non-AUG triplets in mammalian cells. *J Biol Chem* 264: 5031-5035.
312. Perez SA, Sotiropoulou PA, Gkika DG, Mahaira LG, Niarchos DK, et al. (2003) A novel myeloid-like NK cell progenitor in human umbilical cord blood. *Blood* 101: 3444-3450.
313. Herrera-Merchan A, Arranz L, Ligos JM, de Molina A, Dominguez O, et al. (2012) Ectopic expression of the histone methyltransferase Ezh2 in haematopoietic stem cells causes myeloproliferative disease. *Nat Commun* 3: 623.
314. Araki Y, Wang Z, Zang C, Wood WH, 3rd, Schones D, et al. (2009) Genome-wide analysis of histone methylation reveals chromatin state-based regulation of gene transcription and function of memory CD8+ T cells. *Immunity* 30: 912-925.
315. Greer EL, Maures TJ, Hauswirth AG, Green EM, Leeman DS, et al. (2010) Members of the H3K4 trimethylation complex regulate lifespan in a germline-dependent manner in *C. elegans*. *Nature* 466: 383-387.
316. Siebold AP, Banerjee R, Tie F, Kiss DL, Moskowitz J, et al. (2010) Polycomb Repressive Complex 2 and Trithorax modulate *Drosophila* longevity and stress resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 169-174.
317. Hagarman JA, Motley MP, Kristjansdottir K, Soloway PD (2013) Coordinate Regulation of DNA Methylation and H3K27me3 in Mouse Embryonic Stem Cells. *PLoS One* 8: e53880.
318. Statham AL, Robinson MD, Song JZ, Coolen MW, Stirzaker C, et al. (2012) Bisulfite sequencing of chromatin immunoprecipitated DNA (BisChIP-seq) directly informs methylation status of histone-modified DNA. *Genome Res* 22: 1120-1127.
319. Sauvageau G, Thorsteinsdottir U, Eaves CJ, Lawrence HJ, Largman C, et al. (1995) Overexpression of HOXB4 in hematopoietic cells causes the selective expansion of more primitive populations in vitro and in vivo. *Genes Dev* 9: 1753-1765.
320. Thorsteinsdottir U, Mamo A, Kroon E, Jerome L, Bijl J, et al. (2002) Overexpression of the myeloid leukemia-associated Hoxa9 gene in bone marrow cells induces stem cell expansion. *Blood* 99: 121-129.
321. Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, et al. (1994) Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12223-12227.
322. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, et al. (1999) Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 286: 531-537.
323. Kroon E, Thorsteinsdottir U, Mayotte N, Nakamura T, Sauvageau G (2001) NUP98-HOXA9 expression in hemopoietic stem cells induces chronic and acute myeloid leukemias in mice. *EMBO J* 20: 350-361.
324. Lam K, Zhang DE (2012) RUNX1 and RUNX1-ETO: roles in hematopoiesis and leukemogenesis. *Front Biosci* 17: 1120-1139.
325. Song PP, Hu Y, Liu CM, Yan MJ, Song G, et al. (2011) Embryonic ectoderm development protein is regulated by microRNAs in human neural tube defects. *Am J Obstet Gynecol* 204: 544 e549-517.
326. Boominathan L (2010) The guardians of the genome (p53, TA-p73, and TA-p63) are regulators of tumor suppressor miRNAs network. *Cancer Metastasis Rev* 29: 613-639.
327. Tanic M, Yanowsky K, Rodriguez-Antona C, Andres R, Marquez-Rodas I, et al. (2012) Deregulated miRNAs in hereditary breast cancer revealed a role for miR-30c in regulating KRAS oncogene. *PLoS One* 7: e38847.
328. Ichikawa T, Sato F, Terasawa K, Tsuchiya S, Toi M, et al. (2012) Trastuzumab produces therapeutic actions by upregulating miR-26a and miR-30b in breast cancer cells. *PLoS One* 7: e31422.
329. Zhang J, Zhang H, Liu J, Tu X, Zang Y, et al. (2012) miR-30 inhibits TGF-beta1-induced epithelial-to-mesenchymal transition in hepatocyte by targeting Snail1. *Biochem Biophys Res Commun* 417: 1100-1105.
330. Chang TC, Yu D, Lee YS, Wentzel EA, Arking DE, et al. (2008) Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet* 40: 43-50.

331. Grzywacz B, Kataria N, Sikora M, Oostendorp RA, Dzierzak EA, et al. (2006) Coordinated acquisition of inhibitory and activating receptors and functional properties by developing human natural killer cells. *Blood* 108: 3824-3833.

10. DANKSAGUNG

Zum Abschluss gibt es jede Menge Menschen, bei denen ich mich bedanken möchte, denn ohne ihren Einfluss und ihre Hilfe wäre diese Arbeit nicht in dieser Form entstanden.

Mein erster Dank gilt Herrn Professor Dr. Markus Uhrberg, dafür dass er mir vertrauensvoll dieses NK-Zell-ferne Thema mit vielen Freiräumen bei der Bearbeitung überlassen hat. Außerdem möchte ich mich für alles bedanken was ich von ihm lernen durfte, und was mir so kein anderer hätte beibringen können.

Bei Herrn Professor Dr. Klein möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Herrn Professor Dr. Krutmann danke ich herzlich für die zwischenzeitliche Finanzierung und Herrn Dr. Marc Majora für die gute Zusammenarbeit während dieser Zeit und darüber hinaus.

Ein großer Dank geht an unseren kommissarischen Institutsleiter, Herrn Dr. Johannes Fischer, für die Bereitstellung der Apheresate und der Knochenmarksproben sowie für Anregungen und Unterstützung bei der Daten-Auswertung und den „Last-Minute“ Kolonie-Assays.

Bei Frau Professor Dr. Gesine Kögler möchte ich mich für die Bereitstellung der Nabelschnurblutproben bedanken.

Danke auch an das Team von der Orthopädie 2 für die Bereitstellung der Blutproben älterer Probanden und für die unvergesslichen Stunden, die ich PD Dr. Marcus Jäger im OP über die Schulter schauen durfte.

Danke an die Teams der Apherese und der CB-Bank, dass ihr immer zuverlässig meine Blutproben bereitgestellt habt und auch mal spontane Extra-Wünsche erfüllt habt. Hierbei sei vor allem Clarissa erwähnt, für ihre Einweisung in die Kolonie-Assays.

Danke an Frau Professor Dr. Ritz-Timme, Reimar, Alex, Inga und Bärbel aus der Rechtsmedizin für die vielen FPLCs und den regen Informationsaustausch.

Vielen Dank an PD. Dr. Helmut Hanenberg für die Bereitstellung der Vektoren, ohne die weder Überexpression noch Herabregulation möglich gewesen wären.

Ich möchte mich bei Herrn Dr. Raphael Margueron für den EED-Antikörper bedanken, der diese Arbeit entscheidend vorangebracht hat.

Danksagung

Vielen Dank an PD Dr. Csaba Mahotka, dass ich meine Blots bei euch scannen durfte. Danke an das gesamte Team der Patho, für die gute Atmosphäre, wenn ich bei euch zu Gast war und für den mittelgroßen Eisberg, den ich aus eurem Keller geholt habe.

Ein ganz dickes Danke an Katharina Raba, die mit mir auch noch die kleinsten Populationen gesortet hat, bei jedem FACS-Problem sofort zur Stelle war, mir mit Tipps und Tricks bei der Auswertung der Daten zur Seite gestanden hat und bei allem immer ganz viel Optimismus verbreitet hat.

Vielen Dank den beiden Gabis und dem HLA-Team für ungezählte Sequenzierungen, die manchmal auch ein bisschen kurzfristig kamen.

Bei Herrn Dr. Hans-Ingo Trompeter möchte ich mich für alle Ratschläge bezüglich Proteinen, für viele rettende Notfalllösungen und das eine oder andere Paper bedanken.

Vielen Dank auch an Julia, Steffi und Ron-Patrick aus der Hämatologie, die mir im Notfall immer mit dem richtigen Antikörper aushelfen konnten und sich vermutlich manchmal als unser erweitertes Lager gefühlt haben.

Danke auch an die Mitglieder der AG Kögler und der AG Sorg. Ohne eure Hilfe wäre so manches Gel nicht geblottet und so manche Zelle nie kultiviert oder gefärbt worden, von den TaqMan Daten ganz zu schweigen.

Bei der Truppe aus der dritten Etage möchte ich mich ganz herzlich für manche fröhliche Stunde bedanken.

Bei allen Mitgliedern der AG Uhrberg möchte ich mich für die langjährige Zusammenarbeit bedanken. Mit euch ist es nie langweilig geworden und ich werde die Zeit nie vergessen. Und auch wenn es keinen Einzug in diese Arbeit gefunden hat, danke ich allen jungen Müttern für ihre Blutproben auch aus ungewöhnlichen Situationen.

Robert, vielen Dank für die Unterstützung während deiner letzten Monate bei uns.

Bei Herrn Professor Wernet möchte ich mich für die Hilfe und Unterstützung bedanken. Ein kleiner Schubs von außen tut manchmal gut und lässt vieles in anderem Licht erscheinen.

Danke an Professor Adjaye für das Gefühl der Sicherheit während meines letzten Jahres und für die guten Aussichten, die mich bei Zweifeln immer motiviert haben.

Danksagung

Ein ganz besonderer Dank gilt Jens Brands, PD Dr. Simeon Santourlidis und Teodora Ribarska. Vielen Dank für eure fachliche Hilfe und ganz besonders für die moralische Unterstützung. Danke, dass ihr mich immer wieder aufgemuntert habt und nie zugelassen habt, dass Zweifel Überhand nehmen. Danke, dass ihr mich bei den steilen Aufstiegen begleitet und oft auch geschoben habt.

Jens, vielen Dank, für viele schöne gemeinsame Stunden an der Bench, im Labor, in Wien und auch sonst... Danke, dass du auch bei laborfernen Schwierigkeiten mein Kummerkasten bist und mich immer wieder aufmunterst.

Bei Andrea, Andi, Angela, Miriam und Matthias möchte ich mich herzlich für die Geduld bedanken. Ihr musstet oft zurückstecken, wenn ich mal wieder dem Labor den Vorzug gegeben habe. Danke für eure Unterstützung, die Aufmunterungen, die Ablenkung und für die vielen schönen Stunden, die wir trotz allem zusammen verbracht haben.

Bei allen Riedewalds möchte ich mich für die Unterstützung bedanken. Danke, dass ihr immer an mich geglaubt habt. Besonders Omas offenes Ohr war immer wichtig für mich und ohne Erichs Unterstützung hätten wir unser Leben nicht so gut neu ordnen können.

Der größte Dank gebührt meiner Mutter, die immer für mich da ist und immer an mich glaubt. Danke für deine Unterstützung, das mitternächtliche Mama-Taxi, die stundenlangen Gespräche und dafür, dass du mit mir gekämpft hast.

11.EIDESSTÄTLICHE VERSICHERUNG

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ich erkläre gleichzeitig, dass ich diese Dissertation in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch in keiner anderen Institution eingereicht habe.

Weiterhin erkläre ich, dass ich vorher noch keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen habe.

Düsseldorf, den 21.03.2013

(Nina Graffmann)