

Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors ONECUT 2 in Hodgkin-Lymphomzellen

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

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

Von: Patricia Maria Lein

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

Gutachter:innen:

Prof. Dr. rer. nat. Edemir Bayram, Halle (Saale)

PD Dr. rer. nat. Benno Weigmann, Erlangen

apl.Prof. Dr. med. Malte Kornhuber, Sangerhausen

Datum der Verteidigung: 22.04.2024

Referat

Fragestellung: Das Hodgkin-Lymphom (HL) ist eine maligne Erkrankung, die meistens von B-Lymphozyten ausgeht. Bei der Etablierung einer cDNA-Bank aus chemoresistenten HL-Zellen der Zelllinie L1236 wurde eine alternative Splicevariante des Transkriptionsfaktors ONECUT2 (OC2) entdeckt. Die neue Variante ONECUT2s (OC2s) zeichnet sich durch das Vorliegen einer isolierten CUT-Domäne ohne die sonst bei OC2 vorhandene Homöodomäne aus. Bei OC2 handelt es sich um einen gut charakterisierten Transkriptionsfaktor, der in verschiedenen Tumoren eine Rolle bei der Pathogenese spielt. Inwiefern OC2 und auch die neue Variante OC2s eine Rolle beim HL spielen, ist Gegenstand dieser Arbeit.

Methoden: OC2 und OC2s wurden mittels quantitativer qRT-PCR in verschiedenen Tumorzelllinien und Gewebearten analysiert. Zusätzlich wurden öffentlich verfügbare DNA-*MicroArray*-Datensätze untersucht. Auf Proteinebene wurden Durchflusszytometrie (FACS) und Westernblot-Analysen (WB) durchgeführt. Für Überexpressionsversuche wurden aus cDNA gewonnene und synthetisch hergestellte OC2- und OC2s-Sequenzen in den eukaryotischen Expressionsvektor pRTS-1 kloniert und die Überexpression mittels qRT-PCR, FACS, WB und Immunfluoreszenzmikroskopie bestätigt. Für den *knockdown* von OC2 und OC2s wurden siRNAs verwendet. Die Analyse der Genexpressionsprofile transgener Zellen erfolgte mittels DNA-*MicroArrays* und RNAseq.

Ergebnisse: Es zeigte sich, dass insbesondere bei HL-Zellen eine hohe simultane Expression der beiden Varianten vorlag. Die Überexpression und Analyse transgener Zellen ergab, dass beide Varianten verschiedene Gene in ihrer Expression beeinflussten, wobei der Effekt von OC2 ausgeprägter war. Besonders auffällig war die differentielle Expression des humanen endogenen Retrovirus ERV-FC1. Nach OC2-Überexpression zeigten sich hohe Expressionswerte für ERV-FC1. Dieses Phänomen bestätigte sich auch im Sinne einer Korrelation der OC2 und ERV-FC1 in unterschiedlichen Proben der HL-Linie L428. Auf Proteinebene konnte nachgewiesen werden, dass nach Überexpression vermehrt OC2-Protein produziert wird. Der Nachweis eines Proteinproduktes von OC2s gelang auch nach Überexpression nicht. Bei Immunfluoreszenzfärbungen ließen sich in den verwendeten Zellmodellen ein vermehrtes Vorkommen von OC2 im Zytoplasma und schwächer im Nucleus.

Schlussfolgerung: OC2 und OC2s haben Einfluss auf die Expression verschiedener Gene. Die Korrelation von OC2 mit ERV-FC1 könnte darauf hinweisen, dass die beiden Faktoren durch gemeinsame Signalwege reguliert werden und die Koexpression für die Pathogenese des HL relevant ist. Da bei OC2s kein Proteinnachweis gelang, liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um eine nicht-kodierende RNA handelt.

Lein, Patricia: Untersuchungen zur Rolle des Transkriptionsfaktors ONECUT 2 in Hodgkin-Lymphomzellen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2023.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
1 EINLEITUNG	1
1.1 Das Hodgkin-Lymphom (Morbus Hodgkin)	1
1.1.1 Geschichte und Epidemiologie	1
1.1.2 Klassifikation und Stadieneinteilung	1
1.1.3 Pathogenese	2
1.1.4 Therapie und Prognose	3
1.2 ONECUT2	4
1.2.1 Charakterisierung von ONECUT2	4
1.2.2 Funktion während der Embryogenese	5
1.2.3 OC2 als Regulator der Onkogenese bei verschiedenen Tumorentitäten	7
1.3 ONECUT2s	10
2 ZIELSTELLUNG	12
3 MATERIAL UND METHODIK	13
3.1 Material	13
3.1.1 Zelllinien und Gewebe	13
3.1.2 Medien und Lösungen für Suspensions- und adhärente Zellen	14
3.1.3 Bakterien	14
3.1.4 Medien und Agarplatten für Bakterien	14
3.1.5 Primer	15
3.1.6 Vektoren	15
3.1.7 siRNAs	17
3.1.8 Antikörper	18
3.1.9 Chemikalien, Enzyme, Lösungen und Reagenzien	19
3.1.10 Restriktionsenzyme	19
3.1.11 Puffer und Lösungen	20
3.1.12 Verwendete Kits	21
3.1.13 Verbrauchsmaterialien	21
3.1.14 Software und Internetprogramme	21
	II

3.1.15	Verwendete <i>MicroArray</i> -Datensätze	23
3.1.16	Verwendete Geräte und Materialien	23
3.2	Methoden	25
3.2.1	RNA-Isolation	25
3.2.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	26
3.2.3	cDNA-Synthese	26
3.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	26
3.2.5	Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)	27
3.2.6	Gelelektrophorese	28
3.2.7	Elution spezifischer Genfragmente	28
3.2.8	DNA-Isolierung	28
3.2.9	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	28
3.2.10	Klonierungsmethoden	29
3.2.11	Transformation in <i>E. coli</i>	32
3.2.12	Immunfluoreszenz-Färbung	33
3.2.13	Fluoreszenzmikroskopie	34
3.2.14	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence Activated Cell Scanning</i> , FACS)	34
3.2.15	Proteinisolation	35
3.2.16	SDS-PAGE	35
3.2.17	Westernblot	35
3.2.18	<i>MicroArray</i> -Analyse	36
3.2.19	Next Generation Sequencing	36
3.2.20	Zellkultur	37
3.2.21	Transfektion von L428-Zellen	37
3.2.22	Transfektion von HEK293-Zellen	38
3.2.23	Transfektion von A673-Zellen	38
3.2.24	Transfektion von SW480-Zellen	38
4	ERGEBNISSE	39
4.1	OC2- und OC2s-Expression in verschiedenen Geweben und Zelllinien	39
4.1.1	OC2- und OC2s-Expression in Gewebeproben	39
4.1.2	OC2- und OC2s-Expression in verschiedenen Tumorzelllinien	40
4.2	Korrelation von OC2 und OC2s-Expression	40
4.2.1	Analyse der relativen Expression von ONECUT2 in GPL570-basierten <i>MicroArray</i> -Datensätzen	41

4.2.2	Untersuchungen zur Expression von ONECUT2 und ONECUT2s auf Proteinebene	42
4.3	Überexpression von OC2- und OC2s in HEK293-Zellen	45
4.3.1	Transfektion des pRTS-1-Vektors	45
4.3.2	Analyse der Genexpression von OC2 und OC2s in transgenen HEK293-Zellen	46
4.3.3	Westernblot-Analyse der OC2 und OC2s überexprimierenden HEK293-Zellen	47
4.3.4	Immunfluoreszenzfärbung der transgenen HEK293-Zellen	48
4.4	Überexpression von OC2- und OC2s in A673-Zellen	49
4.4.1	Transfektion der pRTS-1-Vektoren in A673-Zellen	49
4.4.2	Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR	49
4.4.3	NGS-basierte Analyse der Genexpressionsmuster in OC2- und OC2s über- exprimierenden Zellen	51
4.5	Überexpression von OC2 und OC2s in SW480 Zellen	52
4.5.1	Generierung stabiler OC2- und OC2s-überexprimierender SW480 Zellen	52
4.5.2	Analyse des Genexpressionsmusters mittels qRT-PCR	52
4.5.3	Immunfluoreszenzfärbung zur intrazellulären Lokalisation von OC2	54
4.5.4	MicroArray-basierte Analyse der Genexpressionsmuster in OC2 und OC2s überexprimierenden Zellen	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.6	Untersuchungen zur Funktion von OC2 und OC2s in L428-Zellen	56
4.6.1	Transfektion der spezifischen siRNAs	56
4.6.2	NGS-Analyse der Genexpressionsmuster in den <i>knockdown-Zellen</i>	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.6.3	Transfektion der pRTS-1-Vektoren in L428-Zellen	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.6.5	Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.6.6	Westernblot-Analyse zum Proteinnachweis der transgenen Zellen	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.6.7	NGS-Analyse des Genexpressionsmusters	Fehler! Textmarke nicht definiert.
4.6.8	Korrelation der ERVFC1- und OC2-Expression in L428-Zellen	Fehler! Textmarke nicht definiert.
5	DISKUSSION	64
5.1	OC2s- und OC2-Expression korrelieren miteinander in verschiedenen Zelltypen	64
5.2	Modulation der Transkriptionsfaktorfunktion durch verschiedene ORFs	64

5.3	Intrazelluläre Lokalisation der beiden Splicevarianten	66
5.4	Handelt es sich bei OC2s um eine <i>long-non-coding RNA</i> mit HL-spezifischem Effekt?	68
5.5	OC2 als Regulator im Hodgkin-Lymphom	69
5.6	Mögliche Rolle von OC2 und ERVFC1 bei der Pathogenese des Hodgkin-Lymphom	71
6	ZUSAMMENFASSUNG	73
7	LITERATURVERZEICHNISS	74
8	THESEN	80
	Erklärung über vorherige Promotionsversuche und Selbstständigkeitserklärung	XI
	Danksagung	XII

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
5'-RACE-PCR	<i>Rapid amplification of 5'-cDNA ends</i>
6FAM	6-Carboxyfluorescein
Abb	Abbildung
ACSL5	<i>Acyl-CoA synthetase long chain family member 5</i>
AK	Antikörper
AKT =PKB	<i>Protein kinase B</i>
AML	Akute myeloische Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
AS	Aminosäure
ASPA	Aspartoacylase
ATCC	<i>American type culture collection</i>
ATRA	All-trans-Retinsäure
BC	<i>Buffy coat</i>
BCA	Bicinchoninsäure
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
bp	Basenpaar/e
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
bzw.	Beziehungsweise
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD300c	<i>CD300 antigen-like family member C</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CDP	<i>CCAAT-displacement protein</i>
cfu	<i>Colony forming unit</i>
cHL	Klassisches Hodgkin-Lymphom
cm	Zentimeter
CML	Chronisch myeloische Leukämie
Ct	<i>Threshold cycle</i>
CTA	<i>Cancer/testis antigen</i>
DEG	Differentiell exprimierte Gene
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dIN	Dorsale Interneurone

D. melanogaster	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DPBS	Dulbecco's PBS
ds	Doppelsträngig
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EBNA-1	<i>EBV nuclear antigen 1</i>
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EMT	Epitheliale-Mesenchymale-Transition
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinases</i>
et al.	<i>Et alii</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell scanning</i>
fc	<i>Fold change</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
FGFR3	<i>Fibroblast growth factor receptor 3</i>
FGF2	<i>Fibroblast growth factor 2</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyant
FOXA1	<i>Forkhead-Box-Protein A1</i>
FOXM1	<i>Forkehead box protein M1</i>
FSC	<i>Forward light scatter</i>
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
g/dL	Gramm pro Deziliter
g/L	Gramm pro Liter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GEO	<i>Gene expression omnibus</i>
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GI	Gastrointestinaltrakt
gtf	<i>General transfer format</i>
GZMB	Granzym B

h	Stunde
hsa-miR	<i>Homo sapiens</i> microRNA
HERV	Humanes endogenes Retrovirus
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
HIF1 α	Hypoxie-induzierter Faktor 1 α
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
HL	Hodgkin-Lymphom
HLA	Humane Leukozyten Antigene
HNF-3	<i>Hepatic nuclear factor 3α</i>
HNF4 α	<i>Hepatic nuclear factor 4α</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HRS	Hodgkin-Reed-Sternberg
IgG	Immunglobulin G
ISL1	<i>Insulin gene enhancer protein</i>
kb	Kilobasen
kDA	Kilodalton
L	Liter
LB	<i>Lysogeny broth</i>
lncRNA	<i>Long non-coding RNA</i>
LOC	Locus
m	Milli-
M	Molar
MAPK	<i>Mitogen-activated protein</i>
mCRPC	<i>Metastatic castration-resistant prostate cancer</i>
MCS	<i>Multiple-cloning-site</i>
min	Minute
miRNA	MikroRNA
mm ³	Kubikmillimeter
MOPS	3-N-(Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>Messenger-RNA</i> (Boten-RNA)
M-Zellen	<i>Microfold-Zellen</i>
n	Nano-
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
ncRNA	Nicht-kodierende RNAs
neg	Negativ

NLPHL	Noduläres Lymphozyten-prädominantes Hodgkin-Lymphom
NSCLC	Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom
OD	Optische Dichte
Oligo-dT	Oligo-Desoxythymidin
ORF	<i>Open reading frames</i>
ORI	<i>Origin of replication</i>
p	Kurzer Arm des Chromosoms
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAX5	<i>Paired box gene 5</i>
PBMC	<i>Pheripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> (phosphatgepufferte physiologische Salzlösung.)
PC	Prostatakarzinom
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerasekettenreaktion)
PE	Phycoerythrin
PEG10	<i>Paternally expressed 10</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFA	Paraformaldehyd
pH	Negativer dekadische Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration in wässriger Lösung
PI	Propidiumiodid
PNS	Peripheres Nervensystem
POU2F2	<i>POU class 2 homeobox 2</i>
PRF1	Perforin 1
PVDF	Mikroporöses Polyvinylidenfluorid
q	Langer Arm des Chromosoms
qRT-PCR	Quantitative real-time-PCR
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RB1	Retinoblastomprotein 1
REST	<i>RE1 silencing transcription factor</i>
RMA	<i>Robust multi-array average</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROCK1	<i>Rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1</i>
rpm	<i>Rounds per minute</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>

RT	Raumtemperatur
SATB	<i>Special AT-rich sequence binding protein</i>
SDS-	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
sec	Sekunde
SMAD3	<i>SMAD family member 3</i>
SSC	<i>Side light scatter</i>
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TBT	<i>Trans-blot-turbo Buffer</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TP53	Tumorprotein p53
TPM	<i>Transcripts per million</i>
TRAJ	<i>T cell receptor alpha joining</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Unit</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenprozent
V2	Ventrales Interneuron vom Subtyp 2
VE	Demineralisiertes Wasser
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
Vol	Volumen
w/v	Massen/Volumenprozent
WHO	<i>World health organization</i>
XAGE2	X antigen 2
XPO1	Exportin 1
X- α -Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl α -D-galactopyranosid
z. B.	Zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem
α -Helix	Alpha-Helix
β -Faltblatt	Beta-Faltblatt
Δ	Delta
μ	mikro

1 EINLEITUNG

1.1 Das Hodgkin-Lymphom (Morbus Hodgkin)

1.1.1 Geschichte und Epidemiologie

Der Morbus Hodgkin ist eine Erkrankung der Lymphknoten und des lymphatischen Systems. Charakteristisch für die Krankheit ist das Auftreten einkerniger Hodgkin-Zellen und/oder mehrkerniger Reed-Sternbergzellen. Diese maligne, entarteten Zellen machen allerdings nur 1 % der Tumormasse aus. Die übrigen 99 % bestehen aus reaktivem, entzündlich-granulomatösem Infiltrat (Shanbhag und Ambinder 2018).

Heutzutage wird zwischen der klassischen Form des Hodgkin-Lymphoms und dem „nodulär Lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphom“ unterschieden, welche sich morphologisch und immunhistochemisch unterscheiden (Alaggio et al. 2022)

Der Morbus Hodgkin hat zwei Häufigkeitsgipfel in der Bevölkerung von Industriestaaten. Der Erste befindet sich zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr (LJ) und der zweite Gipfel ab dem 75 LJ. Bei Kindern- und Jugendlichen unter 18 Jahren sind Lymphome die dritthäufigste Krebserkrankung. Zwischen 2009 und 2018 waren insgesamt 15,3 % aller diagnostizierten Krebserkrankungen im Kindes- und Jugendalter Lymphome. Während dieses Zeitraums wurde bei 3337 Kindern ein Lymphom diagnostiziert, davon 1634-mal ein Hodgkin-Lymphom. Aktuellen Daten zufolge liegt der Altersmedian für Hodgkin-Lymphome im Kindesalter bei 14 Jahren und 11 Monaten (Erdmann et al. 2020).

1.1.2 Klassifikation und Stadieneinteilung

Hodgkin-Lymphome werden nach Morphologie und Immunhistochemie in die klassischen Hodgkin-Lymphome (cHL) und die, selteneren nodulären Lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphome (NLPHL) untergliedert. Bei den klassischen Hodgkin-Lymphomen kann zusätzlich eine Klassifikation in 4 Subtypen anhand der verschiedenen Histologien erfolgen. Mit über 70 % ist der nodulär sklerosierende Untertyp der häufigste, gefolgt vom Mischtyp, der 20-25 % der cHL-Fälle ausmacht. Zusätzlich gibt es noch zwei seltene Subtypen des cHL, den lymphozytenreichen Typ und den lymphozytenarmen Typ mit 5 % und < 1 % (Shanbhag und Ambinder 2018). Zusätzlich wird die Krankheitsausbreitung durch die Ann-Arbor-Klassifikation bestimmt. Diese Unterteilung ist neben der Risikoeinteilung entscheidend für die Auswahl der Therapie. Die Ann-Arbor-Klassifikation ist eine anatomische Beschreibung des Krankheitsbefalls und wurde in der aktuell verwendeten Form zweimalig modifiziert: zum einen durch Costwold und zum anderen durch die *Union internationale contre le cancer* (UICC) (Lister et al. 1989). Sie wird ergänzt durch die A- und B-Kategorien, d.h. das Vorhandensein einer klinischen systemischen Manifestation von Allgemeinsymptomen wie Nachtschweiß,

persistierendes und/oder rekurrendes Fieber $>38\text{ }^{\circ}\text{C}$, Gewichtsverlust von $>10\%$ in den letzten sechs Monaten (Lister et al. 1989). Liegt eines dieser Symptome vor, so handelt es sich um die Kategorie B. Neben der anatomischen Einteilung gibt es heutzutage eine Ergänzung um vorliegende Risikofaktoren. Berücksichtigt werden vier Faktoren, für welche nach Studienlage eine prognostisch ungünstige Bedeutung nachgewiesen wurde. Hierzu zählen: Hohe Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG), ≥ 3 befallene Lymphknotenareale, ein großer Mediastinaltumor und ein extranodaler Befall (Shanbhag und Ambinder 2018). Therapieentscheidend ist eine Kombination aus Ann-Arbor-Klassifikation und Vorliegen von Risikofaktoren.

1.1.3 Pathogenese

Auch wenn der Morbus Hodgkin immunphänotypisch und histologisch gut charakterisiert ist und einige Risikofaktoren für einen ungünstigen Krankheitsverlauf ausgemacht werden konnten, bleibt die genaue Pathogenese weitestgehend ungeklärt. Im Besonderen auf genomischer Ebene ist noch wenig über mögliche dysregulierte Genexpressionsnetzwerke bekannt. Gerade Transkriptionsfaktoren könnten einen bisher unzureichend beschriebenen Einfluss mit onkogenem Potential im HL haben (Mathas et al. 2009). Die besondere Tumorzusammensetzung mit lediglich 1 % Tumorzellen erschwert eine genaue genomische Charakterisierung. Immunphänotypisch handelt es sich bei den Tumorzellen meist um B-Lymphozyten, die monoklonal von Zellen verschiedenen Reifegrades abstammen. Pathognomonisch sind einkernige Hodgkin-Zellen und mehrkernige Sternberg-Reed-Riesenzellen, die beide positiv für die Oberflächenmarker CD30 und CD15 sind und negativ für CD45. Eine bisher ungeklärte Rolle bei der Pathogenese spielt das Begleitinfiltrat. Mit 99 % macht es den Großteil der Tumormasse aus. Es wird vermutet, dass verschiedene Immunmodulationen dazu beitragen, dass die Tumorzellen vom körpereigenen Immunsystem nicht erkannt werden. Es kommt beispielsweise zur Ausbildung sogenannter erschöpfter T-Zellen, deren Dysregulation dazu führen kann, dass Krebszellen der Apoptose entgehen können. Zusätzlich scheint das besondere Tumorenvironment notwendig für die Tumorzellen zum Überleben zu sein (Nagpal et al. 2021; Shanbhag und Ambinder 2018).

Ein weiterer Faktor, der mit der Entstehung des cHL in Verbindung gebracht wird, ist die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus (EBV). Dieses DNA-Virus gehört zu den Gamma-Herpesviren mit onkogenem Potential. Häufig werden HL-Patient:innen auf eine vorhergegangene EBV-Infektion positiv getestet (Shanbhag und Ambinder 2018; Nagpal et al. 2021).

Auch eine Immunsuppression, entweder durch eine HIV-Infektion oder anderweitige medizinische Ursachen, scheint häufiger mit der Manifestation des HL einherzugehen (Shanbhag und Ambinder 2018). Zusammenfassend kann man sagen, dass zwar diverse Faktoren identifiziert werden konnten, die einen Ausbruch der Krankheit begünstigen, der

genaue Pathomechanismus jedoch ungeklärt bleibt. Die Therapieansätze sind dementsprechend noch nicht kausal ausgerichtet.

1.1.4 Therapie und Prognose

Bei der Therapieauswahl werden die Patient:innen zunächst altersabhängig einem Studienprotokoll zugeordnet. Patient:innen, die bei Diagnosestellung < 18 Jahre alt sind werden nach dem Euro-Net-PHL Therapiestudienprotokoll behandelt, während für >18-jährige Patienten das Protokoll der Deutschen Hodgkin-Lymphom Studiengruppe befolgt wird (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020).

Innerhalb der Protokolle ist die Einteilung in die Risikogruppen anhand der verschiedenen Risikofaktoren für die Wahl des Therapieansatzes entscheidend. Die verwendeten Chemotherapeutika werden als Polychemotherapie kombiniert verwendet, so dass sowohl zytotoxische als auch zytostatische Medikamente Verwendung finden. Anschließend wird häufig eine Radiotherapie durchgeführt. Bei dieser handelt es sich um eine lokale Bestrahlung der Regionen, die prätherapeutisch befallen waren. Es wird in der Regel mit einer Dosis zwischen 20-30 Gy, nach der *Involved-Site-Radiation*-Technik bestrahlt, diese hat zum Ziel das bestrahlte Feld möglichst klein zu halten (Deutsche Krebsgesellschaft, 2020). Die Prognose der Überlebenszeit nach Therapie ist bei HL-Patienten von ihrer Stadieneinteilung abhängig. Die Deutsche Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie gibt für Patienten aus der Studienprotokollgruppe DAL-HL-82 eine Überlebenswahrscheinlichkeit nach 13 Jahren von 100 % für die Stadien IA und IIA an. Die Wahrscheinlichkeit für die Stadien IIB und IIIA lagen bei 96 % und für die Stadien IIIB und IV bei 84 % (Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2018). Die aggressive Therapie führt somit zu einer guten Prognose des Hodgkin-Lymphoms, jedoch mit einer hohen Rate an therapiebedingten Folgeschäden. Neben durch Chemotherapeutika induzierten kardiovaskulären Schäden, der Entwicklung von neurokognitiven Störungen und einer langanhaltenden *Fatigue* ist vor allem die Entwicklung von sekundären Malignomen limitierend für die Lebenszeiterwartung nach der Therapie. Insgesamt beträgt die Rate an sekundären Malignomen 30 Jahre nach Diagnose des Morbus Hodgkin 15,1 % (Erdmann et al. 2020; Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie, 2018). Am häufigsten ist hierbei die Entwicklung von soliden Neoplasien in Form von Mammakarzinomen und Ösophaguskarzinomen.

Insgesamt zeigen die aktuellen Therapieleitlinien ein gutes Ansprechen des HL selbst, unter Anbetracht der hohen Rate an Therapiespätfolgen und Schäden muss jedoch eine Spezifizierung und Anpassung der Therapie erfolgen. Ein besseres Verständnis der Pathogenese, die Identifikation genetischer Programme und Faktoren, wie Transkriptionsfaktoren, die bei der Entwicklung und dem Progress des HL eine Rolle spielen, sind Voraussetzung dafür.

1.2 ONECUT2

1.2.1 Charakterisierung von ONECUT2

Transkriptionsfaktoren (TF) sind Proteine die sequenzspezifisch an die DNA binden können, um so die Transkriptionsrate von verschiedenen Genen zu beeinflussen. Die Bindung erfolgt durch sogenannte Bindedomänen, die mit dem DNA-Strang, den RNA-Polymerasen und weiteren Proteinen interagieren. Modifiziert wird die Interaktion von weiteren Proteinen und der Chromatinstruktur der DNA. Aufgabe der TF ist die Regulation der Transkriptionsinitiation. Durch Bindung an sogenannten Promotor- oder *Enhancer*-Regionen kann die Transkriptionsrate erhöht werden. Gegenteiliges erfolgt nach Bindung an *Silencer*-Sequenzen (Chatterjee et al. 2023). Die Klassifizierung der Transkriptionsfaktoren erfolgt anhand der in den entsprechenden Proteinen vorhandenen Domänen. Die TF der ONCUT-Familie, zu der auch der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte TF ONECUT 2 (OC2) zählt, ist Teil der Gruppe der Homöodomäne-assoziierten Transkriptionsfaktoren. Innerhalb dieser Gruppe lassen sich weitere Superklassen unterscheiden. Die Einteilung ist hierbei abhängig von der Expression weiterer funktioneller Domänen wie z. B. einer CUT-Domäne. Bei der CUT-Superfamilie dient diese CUT-Domäne neben der Homöodomäne als weitere funktionelle DNA-Bindungsstelle. Da innerhalb der Superklasse weitere Unterschiede in der Anzahl der CUT-Domänen bestehen, wird in die CUX-Klasse mit 3 CUT-Domänen, Die SATB (*special AT-rich sequence binding protein*)-Klasse mit 2 CUT-Domänen und die ONECUT-Klasse mit jeweils einer CUT-Domäne gegliedert. Die TFs aller drei Klassen sind hochkonserviert und kommen z.B. auch in *D. melanogaster* vor (Jacquemin et al. 1999). Beispiele hierfür sind das CDP (*CCAAT-displacement protein*)-Protein des Menschen und das CUT-Protein von *D. melanogaster*, beide zählen zur CUX-Klasse. Zur SATB-Klasse gehört beispielsweise das humane SATB1-Protein. In der ONECUT-Klasse sind aktuell für den Menschen drei Faktoren bekannt: ONECUT1 (= *hepatocyte nuclear factor 6*, HNF-6), ONECUT2 und ONECUT3. Diese drei Gene sind nicht als Cluster lokalisiert, sondern auf unterschiedlichen Chromosomen. ONECUT1 liegt auf dem humanen Chromosom 15 in der Bande q21.3, ONECUT2 auf dem humanen Chromosom in Bande q21.31 und ONECUT3 auf dem humanen Chromosom 19 in Bande p13.3. Zwischen ONECUT1 und 2 gibt es einige Übereinstimmungen in der DNA-Sequenz und dem Protein. Bis auf einzelne Aminosäuren teilen sich die Mitglieder der ONECUT-Klasse die Sequenz für die Homöodomäne aus 60 Aminosäuren (AS) und für die CUT-Domäne aus 65 AS (Jacquemin et al. 2003a). Aus der Primärsequenz ergibt sich für die Homöodomäne eine Tertiärstruktur aus 3 Alpha-Helices. Hierbei ist die dritte Alpha-Helix die für die spezifische DNA-Bindung relevante (Jacquemin et al. 1999). Zusätzlich finden sich an der dritten Helix noch zwei Besonderheiten in der Primärstruktur; so ist die AS an Position 48 normalerweise immer ein Tryptophan bei Homöodomänen, im Falle der ONECUT-Proteine steht allerdings ein Phenylalanin. An Position

50 haben die ONECUT-Proteine ein Methionin. Diese AS ist sonst bei keinem anderen Faktor an dieser Stelle der Homöodomänen nachgewiesen worden (Jacquemin et al. 1999).

Die Referenzsequenz des humanen ONECUT2 besteht insgesamt aus 504 AS (NP_004843.2). Das ATG an Position 88-90 der mRNA scheint das Initiator-Methionin zu kodieren. Die funktionell wichtigen Bereiche sind die CUT-Domäne an Position 331-403 und die Homöodomäne an Position 426-481. Dazwischen befindet sich eine Linker-Region, welche in gleicher Art auch bei ONECUT1 vorliegt. Vor der CUT-Domäne finden sich ein Poly-Histidin-Abschnitt und eine STP-Box (Serin/Threonin- und Prolin-reicher Abschnitt) aus 24 AS. Des Weiteren enthält OC2 an Position 22-35 eine konsekutive Glycin Abfolge. Diese Glycin-Abfolgen konnten bei weiteren Homöodomäne-Proteinen, die nicht Teil der CUT-Superklasse sind, gefunden werden (Jacquemin et al. 1999).

Die Interaktion der Proteine der ONECUT-Klasse erfolgt über zwei Wege. An bestimmten Sequenzen wird sowohl die CUT- als auch die Homöodomäne zum Binden der DNA benötigt. An anderen spezifischen Abschnitten dient lediglich die CUT-Domäne zur Interaktion. ONECUT1 zeigt zu beiden Bindearten die gleiche Affinität, während OC2 bevorzugt an Sequenzen bindet, für die nur die CUT-Domäne benötigt wird (Jacquemin et al. 1999). Über diese Möglichkeit der DNA-Interaktion kann OC2 wiederum die Expression anderer Gene regulieren. Diese regulierende Funktion scheint bei der Entwicklung diverser Organsysteme physiologisch eine Rolle zu spielen. So konnte im Mausmodell eine gewebespezifische und vom Entwicklungsstadium abhängige differentielle OC2-Expression in Gewebe aus entodermalem und ektodermalem Ursprung (Mitteldarm, Darmrohr und Nervensystem) gezeigt werden (Jacquemin et al. 2003a). Auch bei verschiedenen Tumorentitäten konnte eine entscheidende Rolle des Transkriptionsfaktor nachgewiesen werden (Yu et al. 2020).

1.2.2 Funktion während der Embryogenese

Als Transkriptionsfaktoren kommt den drei Mitgliedern der ONECUT-Klasse eine wichtige Rolle bei der Entwicklung zu. Die stadienabhängige Expression in verschiedenen Geweben ektodermalen oder entodermalen Ursprungs deutet dies bereits an. Tab.1 gibt einen Überblick über die Funktion von OC2 in den verschiedenen Keimblättern.

Tabelle 1. Übersicht der Funktion von OC2 während der Entwicklung.

Keimblatt	Funktion	Referenz
Entoderm	Hepatozytendifferenzierung und -migration	(Jacquemin et al. 2000)
	Ausbildung der Pankreasanlage	(Jacquemin et al. 2003b)
Ektoderm	Motoneuronendifferenzierung	(Roy et al. 2012; Harris et al. 2019)
	Interneuronendifferenzierung und -migration	(Roy et al. 2012; Harris et al. 2019)
	Retinogenese	(Kreplova, 2020; Klimova et al. 2015)

Aus dem Entoderm entwickeln sich unter anderem die Epithelien des Gastrointestinaltrakts, Pulmonaltrakts sowie Leber- und Pankreasparenchym. Besonders für OC1 ist bereits gut beschrieben, dass dieser TF eine entscheidende Rolle bei der Hepatoblastenmigration spielt, d.h. das Loslösen aus ihren Anlagen steuert und die Einwanderung der Hepatoblasten in das Septum transversum koordiniert. Zusätzlich wurden von OC1 beeinflusste Zielgene identifiziert, die für die Differenzierung der Hepatoblasten und deren Entwicklung zu Hepatozyten essentiell sind: *Hepatic nuclear factor 3 α* (FOXA1) und *Hepatic nuclear factor 4 α* (Hnf4 α) (Clotman et al. 2005). Für OC2 konnte eine redundante Rolle gezeigt werden, z. B. beeinflusst es die Expression von Hnf4 α wie OC1 über eine direkte Promotorbindung (Kropp und Gannon 2016). Ähnliches gilt für die entodermale Pankreasanlage von Mausembryonen. Es konnte eine hohe Expression der ONECUT-Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden (Jacquemin et al. 2003a). Es zeigte sich, dass beide TF der ONECUT-Familie simultan für die Ausbildung eines normalen Pankreas benötigt werden (Vanhorenbeeck et al. 2007).

Neben entodermalen Anlagen wurde OC2 auch in ektodermalem embryonalem Gewebe nachgewiesen (Jacquemin et al. 2003a; Francius und Clotman 2010). Aus dem Ektoderm entwickelt sich das zentrale Nervensystem (ZNS), periphere Nervensystem und die Epithelien verschiedener Sinneszellen wie der Retina.

Im Mausmodell zeigte sich, dass OC2 unter anderem für die Aktivierung des *insulin gene enhancer protein* (ISL1)-Gens notwendig ist (Roy et al. 2012; Toch et al. 2020). ISL1 ist für das Überleben und die Differenzierung verschiedener Subtypen neugebildeter Motoneurone essentiell (Roy et al. 2012). Auch bei verschiedenen Interneuronensubtypen konnte nachgewiesen werden, dass OC2 regulativ essentiell ist (Kabayiza et al. 2017). Erst durch das Vorhandensein von OC2 in Kombination mit OC1 erfolgt die korrekte Differenzierung und Verteilung von ventralen Interneuronen vom Subtyp 2 (V2) und dorsalen Interneurone (dIN) im Rückenmark. Dies erfolgt über die Interaktion von OC1/OC2 mit dem *POU class 2 homeobox 2*

(POU2F2)-Transkriptionsfaktor (Kabayiza et al. 2017; Harris et al. 2019; Masgutova et al. 2019). Zusammengefasst nimmt OC2, als Mitglied der ONECUT-Familie, eine außerordentliche Stellung als Regulationseinheit bei der Differenzierung, Verteilung und der Migration verschiedener Gewebearten während der embryonalen Entwicklung ein.

1.2.3 OC2 als Regulator der Onkogenese bei verschiedenen Tumorentitäten

Neben den vorstehenden beschriebenen physiologischen Funktionen von OC2 als Regulator verschiedener Netzwerke, die für die Entwicklung relevant sind, scheint der TF auch bei der Progression verschiedener Tumorarten eine entscheidende Rolle zu spielen (Kropp und Gannon 2016). Die Tab. 2 gibt einen Überblick über die beschriebenen Tumorentitäten, für die ein Effekt von OC2 beschrieben wurde, mit den jeweiligen Zielgenen (*Targets*) und den involvierten Signalwegen (*Pathways*).

Tabelle 2. Übersicht zu OC2 in Tumorentitäten. EMT=Epitheliale-Mesenchymale-Transition, GZMB = Granzym B, PRF1 = Perforin1, ROCK1 = *rho-associated, coiled-coil-containing protein kinase 1*, ACSL5 = *Acyl-CoA synthetase long chain family member 5*, RB1 = Retinoblastomprotein 1, TP53 = Tumorprotein p53, AR = Androgenrezeptor, FOXA1 = *forkhead-box protein A1*, PEG10 = *paternally expressed 10*, REST = *RE1 silencing transcription factor*, SMAD3 = *SMAD family member 3*, HIF1 α = Hypoxie-induzierter Faktor 1 α , FGF2 = *Fibroblast growth factor 2*, HGF = *Hepatocyte growth factor*, VEGF = *Vascular endothelial growth factor A*, AKT/ERK = *Protein kinase B /extracellular signal regulated kinases*, FGFR3 = *Fibroblast growth factor receptor 3*.

Entität	Effekt	Targets und Pathways	Referenz
Lungenkarzinom	<ul style="list-style-type: none"> - Tumorprogression\uparrow - Metastasierung \uparrow - CD8⁺-T-Zell-Dysfunktionalität \uparrow - <i>Stemness</i> \uparrow 	miR-543, <i>RAS-Pathway</i> , GZMB, PRF1	(Ma et al. 2019)
Kolorektales Karzinom	<ul style="list-style-type: none"> - Proliferation \uparrow - EMT \uparrow - Metastasierung in Lymphknoten \uparrow 	miR-429, has-miR139-5p, <i>BCL2-Pathway</i> , circ_0084615/miR-599, circ0001955/miR-145-5p	(Pavlič et al. 2021)

Fortsetzung Tabelle 2.

Magenkarzinom	- Proliferation ↑ - Intestinale Metaplasie ↑	ROCK1, ACSL5	(Shen et al. 2021)
Hepatozelluläres Karzinom	- Metastasierung ↑ - Gefäßinvasion ↑ - Schlechte Tumordifferenzierung	miR-9	(Liu et al. 2021)
Prostatakarzinom	- Proliferation ↑ - Metastasierung ↑ - Resistenzbildung ↑ - Reguliert Neuroendokrine Differenzierung - Zellplastizität ↑	RB1, TP53, AR, FOXA1, PEG10, REST, SMAD3- <i>HIF1α-Pathway</i>	(Rotinen et al. 2018)
Ovarialkarzinom	- Proliferation ↑ - EMT ↑ - Angiogenese ↑	FGF2, HGF, VEGF, <i>AKT/ERK-Pathway</i>	(Lu et al. 2018)
Mammakarzinom	- Induziert Tumor- <i>Stemness</i>	miR-9-5p, miR-195-5p, miR-203a-3p	(Shen et al. 2019)
Zervixkarzinom	- Proliferation ↑	miR-1298-3p	(Li et al. 2022)
Harnblasen-Karzinom	- Potenzieller Tumormarker		(Jong et al. 2023)
Hypophysen-Adenom	- Tumorprogression	miR-145-5p, FGFR3, <i>MAPK-Pathway</i>	(Jiang et al. 2023)

In einer Arbeit konnten Guo et al. zeigen, dass die Expression von OC2 in 15 soliden Krebstypen jeweils im Vergleich zu den Vorstufen erhöht war (Guo et al.). Interessant ist hierbei, dass vor allem bei den neuroendokrinen Tumoren der Prostata, Lunge und des ZNS-Unterschiede in der Höhe der relativen Expression zu sehen waren. Durch die OC2-Expression werden verschiedene Signalwege reguliert, unter anderem der Hypoxie-Signalweg im

Ovarialkarzinom. Hier scheint OC2 über eine Regulation des Hypoxie-induziertem Faktors 1 α (HIF1 α) zu einem Anstieg der Produktion des *vascular endothelial growth factor A* (VEGFA) und so zu einer Angiogenese des Tumors zu führen. Zusätzlich wirkt sich OC2 auf die Expression der Angiogenesefaktoren *hepatocyte growth factor* (HGF) und *fibroblast growth factor 2* (FGF2) aus, dies konnte durch ein *knockdown*-Modell gezeigt werden (Lu et al. 2018). Auch eine Beeinflussung des *RAS-Pathways* durch OC2 bei Lungenkarzinomen wurde beschrieben (Ma et al. 2019). Speziell im Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) zeigt sich ein immunmodulatorischer Einfluss auf das Tumormilieu durch OC2. Die Überexpression führt zur Herunterregulation von Granzyme B (GZMB) und Perforin1 (PRF1). Dies hat eine sogenannte T-Zell-Erschöpfung zur Folge und führt letztendlich zu einer Dysregulation der T-Zellantwort. Besonders hervorzuheben ist, dass dieses Phänomen auch durch OC2 Überexpression in peripherem Blut von Patienten mit NSCLC induzierbar war (Zhao et al. 2022). Besondere Aufmerksamkeit kommt OC2 beim Prostatakarzinom (PC) zu. Mehrere Arbeiten haben den TF als *Masterregulator* beschrieben, der eine große Anzahl an regulierten Zielgenen hat (Rotinen et al. 2018). Bei der Analyse von 38 Transkriptom-Datensätzen von insgesamt 2115 PC-Fällen zeigte OC2, neben dem Transkriptionsfaktor *enhancer of zeste homolog 2* (EZH2), die zweithöchste regulatorische Aktivität. Gefolgt wurde OC2 in der Analyse von den beiden TFs *forkhead box protein M1* (FOXM1) und *paired box gene 5* (PAX5) (Rotinen et al. 2018). Speziell bei der Genese der aggressiven Form des PC, *metastatic castration-resistant prostate cancer* (mCRPC), sowie der Entwicklung von Therapieresistenzen scheint, der Mechanismus der Androgen-Achsen-Suppression durch OC2 entscheidend (Rotinen et al. 2018; Qian et al. 2022). Bereits die alleinige Inaktivierung des Retinoblastomprotein 1 (RB1) durch OC2-induzierte Phosphorylierung ist ausreichend für die AR-Suppression (Qian et al. 2022). OC2 spielt auch bei verschiedenen Tumoren des Gastrointestinaltraktes (GI) eine Rolle (Ma et al. 2022; Kadkhoda et al. 2022; Shen et al. 2021). Sowohl bei der Epithelialen-Mesenchymalen-Transition (EMT) als auch bei der Lymphknotenmetastasierung kommt OC2 eine Schlüsselrolle in der Regulation verschiedener Gene zu. Durch die Veränderung der Genexpression verlieren die Zellen spezifische Eigenschaften und wandeln sich zu mesenchymalen Zellen um (Shen et al. 2021; Pavlič et al. 2021). Weiterhin zeigt OC2 einen regulatorischen Effekt auf die Balance zwischen Aktivierung und Inhibierung der Differenzierung von M-Zellen (*microfold*-Zellen) in den für die Immunantwort verantwortlichen Bereichen des Gastrointestinaltrakts, den sogenannten Peyer-Plaques (Luna Velez et al. 2023). Insgesamt handelt es sich bei OC2 um einen TF der bei zahlreichen Tumorentitäten eine regulatorische Rolle auf Proliferation, Metastasierung, Transition bzw. Induktion von Stammzeleigenschaften und Immunmodulation hat (Yu et al. 2020).

1.3 ONECUT2s

Ein Ansatz, um das genetische Programm des HL genauer zu verstehen, war die Etablierung einer cDNA-Bank aus chemoresistenten HL-Zellen, unter anderem der Linie L1236. Durch diese Methode konnte das Genexpressionsprofil der Hodgkin-Lymphom-Zellen charakterisiert werden (Staege et al. 2008; Staege et al. 2014). Hierbei fiel ein Transkript ins Auge, welches aus zwei Exons besteht. Die Sequenz des ersten Exons ist weitestgehend identisch mit der des schon bekannten Transkriptionsfaktors OC2. Die Sequenz des zweiten Exons ist jedoch verschieden und liegt in einer bisher uncharakterisierten Region des Gens. Die Annahme, dass es sich um eine alternative, bisher unbekannte Splicevariante des Transkriptionsfaktors OC2 handelt, liegt nahe. Im Folgenden wird diese neue Variante als ONECUT2s (OC2s) bezeichnet. Abb. 1 zeigt eine schematische Übersicht der Änderung des Splicemusters zwischen OC2 und OC2s.

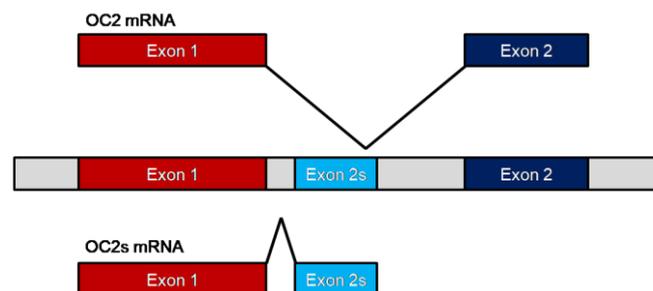


Abbildung 1. Schematische Darstellung der Splicevarianten OC2 und OC2s. OC2s entsteht durch Verwendung einer 5' vom zweiten Exon von OC2 gelegenen Splice-Acceptorstelle.

Vergleicht man nun die mRNA-Sequenzen von OC2 und OC2s genauer, fällt auf, dass bei OC2 der offene Leserahmen der mRNA 1514 bp lang ist, wobei das Exon 1 1228 bp und das Exon 2 286 bp lang sind. Bei der Variante OC2s ist das Exon1 hingegen nur 1073bp lang und das Exon 2s 380bp lang. Dieser Unterschied in der mRNA-Sequenz spiegelt sich auch bei dem potenziell kodierten Protein wider. Kommt es bei OC2 zur Bildung einer CUT-Domäne in Kombination mit einer Homöodomäne, so besitzt OC2s nur eine singuläre CUT-Domäne. Diese isolierte Expression einer CUT-Domäne als funktionelle Einheit unterscheidet OC2s von OC2 und ist, soweit bekannt, auch die erste beschriebene dieser Art.

Des Weiteren fiel bei der Sequenzierung der neuen Splicevariante eine andere Initiatorsequenz für die Translation mit sich unterscheidenden ORF (*open reading frames*) auf. Das Start ATG, welches bei der NCBI-Referenzsequenz für das Exon 1 an Position 344 steht (Jacquemin et al. 1999), liegt bei der von uns entdeckten Variante OC2s weiter in Richtung 3'-Ende verschoben an Position 671. Abhängig davon welches ATG verwendet wird resultieren verschieden große Proteine. In der Abb.2 ist schematisch dargestellt, wie die (potenziellen) Proteine aufgebaut sind.

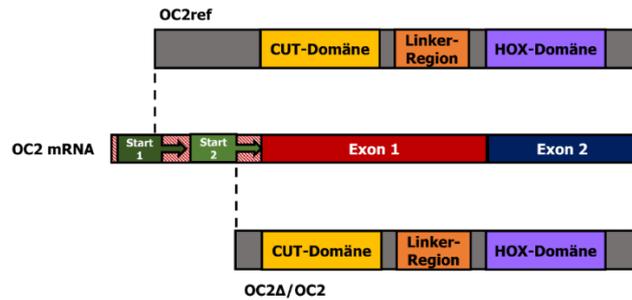


Abbildung 2. Schematische Darstellung der potenziellen Startkodons der OC2-mRNA nach Splicing und den resultierenden Proteinen. Start 1 symbolisiert das ATG-Triplet an Position 344 mit dem entsprechend bei NCBI beschriebenen OC2ref als AS-Sequenz. Start 2 symbolisiert das Triplet an Position 671 aus der cDNA-Bank unseres Labors mit dem kürzeren Protein OC2/OC2Δ als Produkt.

Direkt abhängig von der Startkodon-Auswahl ist die Länge der AS-Sequenz von Exon 1, jedoch ohne Einfluss auf die in ihm codierte CUT-Domäne; diese wird unabhängig von der Startkodon-Wahl exprimiert. Funktional wurde der Bereich in Exon 1 vor der CUT-Domäne bisher noch nicht weiter charakterisiert. Inwiefern die Auswahl des Startkodons und somit des ORF einen Einfluss auf die Funktionalität oder Translationsrate der Proteine hat, ist bisher nicht geklärt.

2 ZIELSTELLUNG

Gegenstand dieser Arbeit ist die Charakterisierung des Einflusses und der Funktion der beiden Varianten OC2s und OC2 in Zusammenhang mit dem Hodgkin-Lymphom und weiteren Tumorentitäten. ONECUT2 weist ein bedeutendes onkogenes Potential durch Modulation von Genexpression in diversen Tumoren auf. Der von uns entdeckten Splicevariante ONECUT2s könnte eine ähnliche Bedeutung zukommen. Bisherige Untersuchungen zu diesem TF beschränken sich auf solide Tumore. Es wurden bisher keine Daten zu einer möglichen Funktion des TF in malignen Erkrankungen des lymphatischen Systems veröffentlicht. Noch mehr gilt dies für die neue Variante OC2s. Bisher liegen keine Daten zu einer Charakterisierung der Variante OC2s für das HL oder eine andere Tumorentität vor. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist es daher, ein besseres Verständnis für die Funktion des Transkriptionsfaktors OC2 im Hodgkin-Lymphom zu erhalten. Hierzu sollen die verschiedenen Varianten in Expressionsvektoren kloniert und transgene Zellen generiert werden. Anschließend sollen von diesen Zellen und Zellen nach OC2-knockdown Genexpressionsprofile gewonnen werden, um einen Einfluss von OC2 und OC2s auf die Genexpression zu analysieren.

3 MATERIAL UND METHODIK

3.1 Material

3.1.1 Zelllinien und Gewebe

Die Zelllinien, die zur Erstellung der Arbeit genutzt wurden, bezogen wir zum Großteil von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig). RNA aus Geweben wurden von der Firma Agilent, Santa Clara, CA, USA bezogen. PBMCs (*peripheral blood mononuclear cells*) wurden aus *Buffycoats* gesunder Spender aus der Blutbank des Universitätsklinikums Halle isoliert. Die RNA-Isolation dieser Proben übernahm dankenswerterweise Frau Ines Volkmer (Department für operative und konservative Kinder- und Jugendmedizin, Halle). Für die Verwendung dieser Proben lag ein Ethikvotum der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vor. Die folgenden Zelllinien wurden verwendet: die lymphoblastoiden Zelllinien LCL73, LCL74, A2+2310 und NMIIb (Hoennscheidt et al. 2009), die Hodentumorzelllinie H12.1 (Casper et al. 1987), die B-Zelllinie A1 (Polack et al. 1996), die Burkitt-Lymphom-Zelllinie Raji (Pulvertaft et al. 1964), die myeloischen Leukämie-Zelllinien K562 (Lozzio und Lozzio 1973), Kasumi (Asou et al. 1991) und HL60 (Gallagher et al. 1979), die T-Zelleukämiezelllinie Jurkat (Schneider et al. 1977), die Ewing-Sarkom-Zelllinie SK-N-MC (Biedler et al. 1973), die Neuroblastomzelllinien SHSY5Y (Biedler et al. 1973) und SIMA (Marini et al. 1999), die Kolonkarzinomzelllinie HT-29 (Fogh J, 1975), die Mamakarzinom-Zelllinie MCF7 (Soule et al. 1973) und die Leberkarzinom-Zelllinie Hep3b (Aden et al. 1979). Die im Folgendem aufgeführten Zelllinien wurden unter anderem für Transfektionsversuche verwendet. Ursprünglich wurden HDLM2-Zellen aus dem Pleura-Erguss eines 74-Jahre alten Mannes mit HL gewonnen (Drexler et al. 1986), L428-Zellen aus dem Pleura-Erguss einer 37-jährigen Frau mit HL (Schaadt et al. 1980) und KM-H2 ebenfalls aus dem Pleuraerguss eines 37-jährigen Mannes mit HL (Kamesaki et al. 1986). L1236-Zellen wurde aus dem peripheren Blut eines 34-jährigen Mannes gewonnen (Wolf et al. 1996). L540-Zellen entstammen ursprünglich aus dem Knochenmark einer 20-jährigen Patientin mit HL (Diehl et al. 1981). Die Ewing-Sarkom-Zelllinie A673 wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen. Sie isolierte man aus dem Tumor eines 15 Jahre alten Mädchens (Giard et al. 1973). Die kolorektale Karzinom-Zelllinie SW480 stellte uns freundlicherweise Dr. Thomas Müller (Klinik für Innere Medizin IV, Uniklinikum Halle) zur Verfügung. Etabliert wurde die Zelllinie aus einem primären Adenokarzinom eines 50-jährigen Mannes (Leibovitz et al. 1976). HEK293-Zellen entstammen embryonalen Nierenzellen, die mit dem Adenovirus Typ 5 transformiert wurden (Soule et al. 1973, Graham et al. 1977).

3.1.2 Medien und Lösungen für Suspensions- und adhärente Zellen

Für die Kultivierung der Zellen wurden Medien und Lösungen verwendet, die in der Tab. 3 aufgelistet sind. In der Tab. 4 sind zusätzlich für die Zellkultur verwendeten Supplemente und Antibiotika aufgeführt.

Tabelle 3. Zellkultur-Medien und -Salzlösungen

Bezeichnung	Hersteller
<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i> (DMEM)	Biochrom GmbH, Berlin
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)1640 Medium	Biochrom GmbH, Berlin
phosphatgepufferte physiologische Salzlösung (PBS)	Lonza, Basel, Schweiz

Tabelle 4. Supplemente und Antibiotika

Doxycycline 5 mg/mL	SIGMA, St. Louis, Missouri, USA
Hygromycin B 50 mg/mL	Pan, Aidenbach
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin Gibco (ThermoScientific, Dreieich)
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep) (10,000U/mL)	Gibco (ThermoScientific, Dreieich)
Trypsin-EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Biochrom, Berlin
Natrium-Pyruvat (100 mM)	Gibco (ThermoScientific, Dreieich)

Als Kulturmedien wurden RPMI1640 mit 10 % FCS bzw. 20 % FCS oder DMEM mit 10 % FCS, jeweils mit 1 % Pen/Strep verwendet. Als Einfriermedium wurde RPMI1640 bzw. DMEM-Kulturmedium mit 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) eingesetzt.

3.1.3 Bakterien

Es wurden zwei verschiedenen Bakterien verwendet, *Escherichia coli XLI-blue* und *Escherichia coli XLI-gold*. Beide wurden von Stratagene, San Diego, California, United States bezogen.

3.1.4 Medien und Agarplatten für Bakterien

Für LB-Medium wurden 25 g LB-Medium Pulver (Carl Roth, Karlsruhe) in 1 L Wasser gelöst. Für Agar-Platten wurden 25 g LB-Medium und 15 g Agar Agar (Carl Roth) auf 1 L Wasser gebracht und mit 50 µg/mL Ampicillin (SIGMA-Aldrich, Darmstadt) versetzt.

3.1.5 Primer

Die Primer, die für Sequenznachweise über PCR verwendet wurden, sind in Tab. 5 zusammengetragen, die für die Sequenzierung und Klonierung verwendeten in Tab. 6. Hierbei stehen die Angaben der Basenpaare (bp) für die Größe des amplifizierten Produkts. Die Primer wurden bei Invitrogen (Karlsruhe), MWG (Ebersberg) oder von SIGMA (München) gekauft.

Tabelle 5. Nachweisprimer

Zielsequenz	Primersequenz in 5'-3'-Richtung	Produktgröße
ACTB	5'-GGCATCGTGATGGACTCCG	613 bp
	5'-GGTGAAGGTGGACAGCGA	
HPRT1	5'-ACCAGTCAACAGGGGACATAA	190bp
	5'-CTTCGTGGGGTCCTTTTCACC	
ONECUT2 Exon 1	5'-GCCATGGTCACCAGCAT	736bp
	5'-AGGGTGGTGGAACTTGTCAG	
ONECUT2 Exon 2	5'-AGATCACCATTTCAGCAG	426bp
	5'-TGGGTTTCTGGGATGCTTAG	
ONECUT2 Exon 2s	5'-TGCTTCGCCTATTAGCGAGT	333bp
	5'-TTGCTGATAAAATGGCCAGA	
pRTS-1 EGFP	5'-GCTGTTTTGACCTCCATAGAAGA	894bp
	5'-CACTGCATTCTAGTTGTGGTTTG	
ONECUT2	5'-AACGCAAAGAGCAAGAACCAA	458 bp
	5'-AAGATGGCGAAGAGTGTTCCG	

Tabelle 6. Klonierungs- und Sequenzierungsprimer

Zielsequenz	Primersequenz in 5'-3'-Richtung
pRTS-1	5'-TAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAA
	5'-GGGTCCATGGTGATACAAGG
ONECUT2	5'-AGATCACCATTTCAGCAG
	5'-TGGGTTTCTGGGATGCTTAG
ONECUT2s	5'-TGCTTCGCCTATTAGCGAGT
	5'-TTGCTGATAAAATGGCCAGA

3.1.6 Vektoren

Insgesamt wurden fünf verschiedenen Vektoren verwendet. Die Isolierung der OC2s-Sequenz aus der cDNA-Bank erfolgte über einen pCMV-Script-Vektor (Agilent Technologies, Waldbronn). Zum Vervielfältigen in Prokaryonten wurde zum einen der pUC19-SfiI-Vektor

(Bornkamm et al. 2005) und der pGEM-T Easy-Vektor (Promega, Walldorf) verwendet. Zur Überexpression in eukaryontischen Zellen kam der pRTS-1-Vektor (Bornkamm et al. 2005) zum Einsatz. Die synthetischen Sequenzen wurden in dem prokaryontischen pEX-A258 Vektor (Eurofin Gennomics, Freiburg) geliefert und aus diesem in pRTS-1 umkloniert. Bei dem pUC19-SfiI-Vektor handelt es sich um ein *high copy plasmid* mit einer *multiple-cloning-site* (MCS).

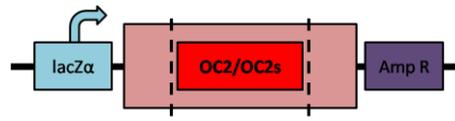


Abbildung 3. Schematische Übersicht des pUC19-Sfi Vektors. Lac-Operonsequenzen sind für Selektionszwecke vorhanden. Die MCS (hellrot) ermöglicht verschiedenen Restriktionsenzymen das Herausschneiden der Inserts, eine Ampicillin-Resistenz die Selektion in Prokaryonten.

Der pGEM-T Easy-Vektor ist ein linearisierter Vektor mit jeweils einem 3'-Thymidin-Überhang an beiden Enden. Dieser Überhang ermöglicht es einfach PCR-Produkte in den Vektor zu klonieren, da sie kompatible Enden für PCR-Produkte von Polymerasen sind, welche Desoxyadenosine an die 3'-Enden der PCR-Produkte während der PCR anfügen (Promega, 2015). Zusätzlich verhindern die Überhänge eine Rezirkulation des Vektors. Die MCS erlaubt, wie auch bei dem pUC19-Sfi1-Vektor, ein anschließendes Herausschneiden des Inserts durch Restriktionsenzyme und Übertragen in andere Vektoren. Zur Selektion in Prokaryonten ist eine Ampicillin-Resistenz in dem Vektor enthalten. Da der Vektor pGEM-T Easy nur zur Vervielfältigung in Bakterien genutzt werden kann, wurde für die Überexpression anschließend das pRTS-1-Vektorsystem verwendet.

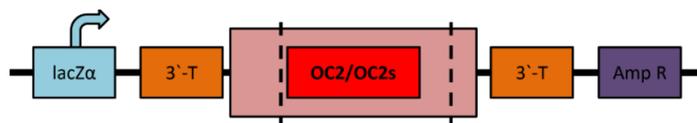


Abbildung 4. Schematische Übersicht über den pGEM-T Easy-Vektor. Der linearisierte Vektor hat 3'-T-Überhänge. Lac-Operonsequenzen sind für Selektionszwecke vorhanden. Mit Hilfe der MCS (hellrot) können mit verschiedenen Restriktionsenzymen Inserts herausgeschnitten werden, die gestrichelte Linie stellt eine mögliche Schnittstelle schematisch dar. Eine Ampicillin-Resistenz dient der Selektion in Prokaryonten.

Bei dem Vektor pRTS-1 handelt es sich um einen Expressionsvektor mit bidirektionalem Promotor $P_{tetbi-1}$ (*bi-directional tet-responsible promoter*), durch den zwei Gene gleichzeitig exprimiert werden können. Das gewünschte Insert wurde anstelle des Luciferasegens in den Vektor kloniert. Als Markergen diente das bereits im Vektor enthaltenen eGFP-Gen. Beide Gene können simultan exprimiert werden. Die Aktivität des Vektors ist darüber hinaus durch Zugabe von Doxycyclin induzierbar. Ohne Doxycyclin zeigt der Vektor eine kaum messbare Hintergrundaktivität. Nach Doxycyclin-Zugabe aktiviert der Tetracyclin-abhängige rtTA den $P_{tetbi-1}$ -Promotor und erlaubt somit die Expression der Inserts. Der Vektor enthält darüber hinaus eine Hygromycin-Resistenz für die Selektion in eukaryontischen Zellen und eine

Ampicillin-Resistenz für die Selektion in prokaryontischen Zellen. Damit der Vektor episomal repliziert werden kann, sind ein EBV-Replikationsursprung (oriP) und das EBNA1-Gen enthalten (Bornkamm et al. 2005).

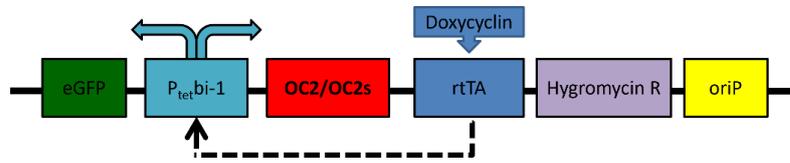


Abbildung 5. Schematische Übersicht des pRTS-1-Vektors. Der bidirektionale Promotor ($P_{tet^{bi-1}}$) reguliert die Expression des Markergens eGFP und des Inserts. Reguliert wird die Expression durch den von einem zweiten Promotor aus gesteuerten Doxycyclin-abhängigen rtTA. Der oriP ermöglicht die episodale Replikation zusammen mit EBNA1. Zur Selektion in Eukaryonten enthält der Vektor eine Hygromycin-Resistenz.

Für die Klonierung der synthetischen hergestellten Sequenzen (OC2ref, OC2 Δ , OC2sref, OC2s Δ) wurden sie von der Firma Eurofin Genomics in pEX-A258-Vektoren kloniert. Die Vektoren lagen als Plasmide vor und enthalten eine Ampicillin-Resistenz. In der Abb.6 ist der schematische Aufbau der Vektoren gezeichnet.

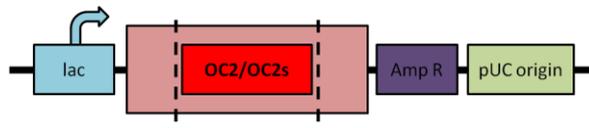


Abbildung 6. Schematische Darstellung des pEX-A258-Vektors. Lac-Operonsequenzen sind für Selektionszwecke vorhanden. Die MCS (hellrot) ermöglicht verschiedenen Restriktionsenzymen das Herausschneiden der Inserts, mögliche Schnittstellen sind schematisch mit gestrichelter Linie dargestellt. Eine Ampicillin-Resistenz ermöglicht die Selektion in Prokaryonten.

3.1.7 siRNAs

Für die *knockdown*-Versuche wurden spezifische siRNAs verwendet. ONECUT2 spezifische siRNAs konnten durch die Firma Qiagen erworben werden. Da mehrere zur Auswahl standen, die selektiv für einen OC2-*knockdown* sorgen sollten, ohne OC2s zu beeinflussen, wurde in Vorversuchen getestet, mit welcher siRNA bzw. Kombination der stärkste *knockdown* induziert werden konnte. Für die siRNA4 und siRNA6 konnte der stärkste Einfluss gezeigt werden, diese werden als siOC2 bezeichnet.

Für den siRNA basierten *knockdown* der neuen Splicevariante ONECUT2s, gab es keine vorgefertigten siRNAs zu bestellen. Von der Firma Merck wurden an unsere Bedürfnisse angepasste siRNAs bezogen. Zur Transfektionskontrolle sind diese an ein fluoreszierendes Molekül (6FAM) gekoppelt. Wie bei den OC2-siRNAs wurde bei der Erstellung darauf geachtet, dass sie lediglich OC2s herunterregulieren, ohne einen Einfluss auf OC2 zu nehmen. Aus den insgesamt drei gelieferten Sequenzen wurde wiederum nach Testung die mit dem größten Effekt auf die relative Expression für die folgenden Versuche ausgewählt. Die ausgewählte siRNA wird im Folgenden als siOC2s bezeichnet. Sowohl für siOC2 als auch

siOC2s wurden die jeweils passenden negativ siRNAs als Kontrollen mitgeführt. In der Tab. 7 sind die siRNAs und Kontrollen mit Hersteller aufgeführt.

Tabelle 7. Verwendete siRNA

Bezeichnung	Sequenzen	Hersteller
Hs_ONECUT2_4 (SI00665504)	5'-GGUGUUCACUGACCUCCAATT-3' 5'-UUGGAGGUCAGUGAACACCAG-3'	Qiagen (Hilden)
Hs_ONECUT2_6 (SI04181709)	5'-GGCGAACUUCACCUCUUAATT-3' 5'-UUAAGAGGUGAAGUUCGCCTG-3'	
Unspecific_AllStars_1 (SI03650318)	Keine Angabe	
XM_047437948.1[6FAM] CUGCCUUCGUGGGAGACA G [dT][dT]	5'-CUGCCUUCGUGGGAGACAG-3' 5'-CUGUCUCCCACGAAGGCAG-3'	Merck (Darmstadt)
MISSION siRNA Fluorescent Universal Negative Control, 6- FAM	Keine Angabe	

3.1.8 Antikörper

Für Immunhistochemische Färbungen sowie *Westernblots* wurden die in der Tab. 8 aufgeführten Primär-Antikörper und sekundären Antikörper verwendet.

Tabelle 8. Antikörper

Bezeichnung	Host	Isotyp/Markierung	Klonalität	Katalog Nr.	Hersteller
ONECUT2/OC2 Antibody	Kaninchen	IgG	polyclonal	NBP2-31658	Novus Biologicals (Centennial, USA)
ONECUT2 Antibody	Kaninchen	IgG	polyclonal	PA5-41109	ThermoScientific (Dreieich)
GAPDH-2	Maus	IgM	monoclonal	sc-47724	Santa Cruz Biotechnology (Dallas)

Fortsetzung Tabelle 8.

EGFP	Kaninchen	IgG	polyclonal	AB3080P	Chemicon®, SigmaAldrich, Darmstadt
Mouse anti- Rabbit IgG- HRP	Maus	HRP	monoclonal	sc-6728	Santa Cruz Biotechnology (Dallas)
PE F(ab') ₂ Donkey anti- Rabbit IgG (Multiple Adsorption)	Esel	PE	polyclonal	558416	BD (Becton Dickinson) Biosciences
Rabbit anti- mouse IgG- HRP	Kaninchen	HRP	monoclonal	sc-6721	Santa Cruz Biotechnology (Dallas)

3.1.9 Chemikalien, Enzyme, Lösungen und Reagenzien

Die verwendeten Chemikalien, Lösungen und Reagenzien sind bei den jeweiligen Methoden mitangegeben. Insofern die Enzyme nicht bei den Kits mitenthalten waren, werden sie bei den jeweiligen Methoden aufgeführt.

3.1.10 Restriktionsenzyme

Die Tab. 9 gibt eine Übersicht über die verwendeten Restriktionsenzyme, deren Puffer und spezifischen Schnittstellen.

Tabelle 9. Restriktionsenzyme

Enzym	Schnittstelle	Temp.	Puffer	Hersteller
<i>AgeI</i> HF	5'-ACCGGT	37 °C	CutSmart Buffer	New England Biolabs (Frankfurt am Main)
<i>EcoRV</i>	5'-GATATC	37 °C	O	ThermoScientific (Dreieich)
<i>NotI</i>	5'-GCGGCCGC	37 °C	O	ThermoScientific (Dreieich)
<i>NsiI</i> HF	5'-ATGCAT	37 °C	CutSmart Buffer	New England Biolabs (Frankfurt am Main)

Fortsetzung Tabelle 9.

<i>Sfi</i> I	5'-GGCCNNNNNGGCC	50 °C	G	ThermoScientific (Dreieich)
--------------	------------------	-------	---	--------------------------------

3.1.11 Puffer und Lösungen

DEPC-Wasser 0,1%ig

1 mL DEPC (Diethylpyrocarbonat)-Reagenz in 1 L Wasser.

Gelektrophorese

TAE-Puffer (50x)

2 M Tris-HCl pH 8,0; 5,75 % (v/v) Essigsäure und 50 mM EDTA.

Reagenzien für die Intrazelluläre Färbung

1 % BSA/PBS

0,5 % Triton X-100/PBS

4 % Methanol/Aceton-Gemisch (v/v 1:1)

Reagenzien für den Westernblot

Laemmli-Puffer (4x):

277,8 mM Tris-HCl pH 6,8; 44,4 % (v/v) Glycerol, 4,4 % LDS, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau;

Verwendet mit 100 µl β-Mercaptoethanol auf 900 µl 4x*Laemmli*-Puffer

10x SDS-Laufpuffer (BioRAD, Feldkirchen) (pH 8,2):

Verwendet als 1x SDS mit VE-H₂O aus 10x Stock verdünnt

0,6 M MOPS, 1,2 M Tris, 2 % (w/v) SDS, 130 mM Natriumhydrogensulfid

1x Trans-Blot Transfer Puffer (BioRAD, Feldkirchen) (pH 8):

25 mM Tris, 150 mM Glycin, 20 % (v/v) Ethanol

20 % (v/v) *Trans-Blot Turbo* 5x Transfer Buffer

20 % (v/v) Ethanol 100 %

TBST-Puffer:

171 mM NaCl, 1 % (w/v) 2 M Tris-HCl (pH 7,5), 0,1 % Tween 20

5 % *Milchpulver*

2,5 g *Milchpulver*

TBST auf 50ml auffüllen

3.1.12 Verwendete Kits

Die in der Tab. 10 gelisteten Kits wurden gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Tabelle 10. Kits und Hersteller

Produkt	Hersteller
BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	ThermoScientific, Dreieich
Expand High Fidelity PCR System	Merck, Darmstadt
GeneJET Gel Extraction Kit	ThermoScientific, Dreieich
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	ThermoScientific, Dreieich
High Pure PCR Product Purification Kit	Merck, Darmstadt
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Mannheim
Pierce™ BCA Protein Assay Kit	ThermoScientific, Dreieich
QIAamp DNA Mini Kit	Quiagen, Hilden
Lonza KitL	Lonza Bioscience, Köln
ClarityMax™ Western ECL-Substrate	BioRad, Feldkirchen
PromoFectin	PromoKine, Heidelberg

3.1.13 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie Zellkulturartikel, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden von den Firmen TPP (Trasadingen, Schweiz), Greiner Bio-One (Frickenhausen), Eppendorf (Hamburg), VWR (Darmstadt) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

3.1.14 Software und Internetprogramme

Zur Auswertung, Analyse und Generierung von Primern wurden verschiedene Software und Internetprogramme verwendet. Diese sind in der Tab. 11 zusammen mit ihrem Verwendungszweck und der Internetadresse aufgelistet.

Tabelle 11. Software und Internetprogramme

Bezeichnung	Funktion	Internetadresse
Blast (Altschul et.al. 1997)	Sequenzvergleich	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi (zuletzt aufgerufen am 23.07.2023)
dplyr-package	Datenformatierung	https://dplyr.tidyverse.org/ (zuletzt aufgerufen am 23.07.2023)

Fortsetzung Tabelle 11.

ExPASy Translation Tool	Umschreiben von DNA-Sequenzen in Proteinsequenzen	https://www.expasy.org/ (zuletzt aufgerufen am 23.07.2023)
GalaxyPlatform	Auswertung von NGS-Daten	https://usegalaxy.org/ (zuletzt aufgerufen am 23.06.2023)
ggplot2-package	Datenvisualisierung	https://ggplot2.tidyverse.org. (zuletzt aufgerufen am 23.07.2023)
Quest Calculate™ Peptide and Protein Molecular Weight Calculator	Berechnung des Molekular Gewichts von Proteinen	https://www.aatbio.com/tools/calculate-peptide-and-protein-molecular-weight-mw (zuletzt aufgerufen am 01.09.2023)
Rotor-Gene Q Series	Analyse der qRT-PCR Daten	www.qiagen.com/gb/resources/resourcedetail?id=9d8bda8e-1fd7-4519-a1ffb60bba526b57&lang=en (zuletzt aufgerufen am 15.03.2018)
RStudio 2022.02.1	Auswertung und Analyse von Datensets	https://posit.co/downloads/ (zuletzt aufgerufen am 23.02.2022)
SnapGene	Analyse von DNA und Vektoren	www.snapgene.com/products/snapgene_vjewer/ (zuletzt aufgerufen am 23.03.2018)
SWISS-MODEL Workspace/ GMQE	Analyse von Proteinsequenzen	https://swissmodel.expasy.org/ (zuletzt aufgerufen am 12.10.2023)
TAC 2.0	Auswertung von <i>MicroArray</i> Daten	www.thermofisher.com/de/de/home/life-science/microarray-analysis/microarray-analysis-instruments-software-services/microarray-analysis-software/affymetrix-transcriptome-analysis-console-software.html (zuletzt aufgerufen am 11.10.2018)
The Human Protein Atlas	Analyse von intrazellulären Proteinstrukturen	https://www.proteinatlas.org/ (zuletzt aufgerufen am 02.09.2023)
Uniprot	Proteinanalysen	https://www.uniprot.org/ (zuletzt aufgerufen am 02.09.2023)

Fortsetzung Tabelle 11.

Zeiss ZEN lite (blue edition)	Erstellung und Bearbeitung mikroskopischer Bilder	https://www.zeiss.de/mikroskopie/produkte/mikroskopsoftware/zen-lite.html#downloads (zuletzt aufgerufen am 02.07.2018)
-------------------------------	---	---

3.1.15 Verwendete *MicroArray*-Datensätze

Verschiedene öffentlich verfügbare *MicroArray*-Datensätze wurden von der Gene Expression Omnibus (GEO)-Datenbank heruntergeladen. Bei den Datensets handelt es sich um Datensätze, die verschiedenen HL-Zelllinien enthalten, Gewebeproben und Proben verschiedener Tumorentitäten und HL-Biopsien. In Tab. 12 sind die verwendeten Datensets zusammengefasst.

Tabelle 12. Gene Expression Omnibus (GEO) *Accession*-Nummern der verwendeten *MicroArray*-Datensätze

<i>Accession</i> -Nummer	Referenz
GSE20011	(Köchert et al. 2011)
GSE64985	(Nelms et al. 2016)
GSE39134	(Steidl et al. 2012)

3.1.16 Verwendete Geräte und Materialien

Die Tab. 13 listet die für die Arbeit benötigten Geräte auf.

Tabelle 13. Geräte

Geräte und Materialien	Bezeichnung	Hersteller
Zell-Zählkammer	Neubauer-Zählkammer	VWR, Darmstadt
Zentrifuge	Multifuge 1S-R, Megafuge 1.0	ThermoScientific, Dreieich
Mr. Frostie	Nalgene TM Cryo1C	VWR, Darmstadt
Fluoreszenz-Mikroskop	Axiovert 25	Zeiss, Jena
Gel-Elektrophorese-Laufkammern	Sub-Cell GT	BioRad, Feldkirchen
Gel-Elektrophorese Powersupply	PowerPac 2000	BioRad, Feldkirchen
Schüttler	KS260 Basic	IKA, Staufen
Rotator		ThermoScientific, Dreieich

Fortsetzung Tabelle 13.

Inkubator	BBD 6220	Heraeus, Hanau
Mikroskop Kamera	AxioCam MRm	Zeiss, Jena
Mikrowelle	SS-804H	Bosch, Stuttgart
Optical microscope	Axiovert25, Axiovert25 HBO50	Zeiss, Jena
Pipette controler	Accu-jet	Brand, Wertheim
Real Time PCR Machine	Rotor-Gene Q	Qiagen, Venlo, Holland
Real Time PCR Machine	Rotor-Gene RG-3000	Corbett Research, Cambridge, United Kingdom
Schüttel-Inkubator	SM-30 C	Edmund Bühler, Hechingen
SpeedVac	Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Sterile Arbeitsbank	HeraSafe	Heraeus, Hanau
Tisch Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, Hanau
Thermocycler	Mastercycler gradient	Eppendorf, Hamburg
ThermoMixer	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
ThermoMixer	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
UV Table	PH1um20W/M	Biotec-Fischer, Reiskirchen
UV transilluminator	Quantum	Vilber Lourmat, Eberhardzell
Vakuumpumpe	BVC21	Vacuubrand, Wertheim
Vortexer	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Water bath	GFL 1083	Thermolab, Burgwedel
Durchflusszytometer	CytoFLEX	Beckman Coulter Life Sciences, Krefeld
<i>Westernblot Blotting</i> System	Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	BioRad, Feldkirchen
ChemieDoc	ChemiDoc MP Imaging System	BioRad, Feldkirchen
Konzentrationsmessung	NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer	ThermoScientific, Dreieich
Acrylamid-Gel- Laufkammer	Mini-PROTEAN® Tetra Cell	BioRad, Feldkirchen
Nucleofector	Amxa Nucleofector2b	Lonza Bioscience, Köln

Fortsetzung Tabelle 13.

Chamberslide	Lab-Tek Chamberslide	NalgeNunc, Naperville
<i>MicroArrays</i>	HT2.0 Array	Affymetrix, ThermoScientific, Dreieich
Transferfilter für <i>Westernblots</i>	Trans-Blot-Turbo Mini-size Transfer stacks	BioRad, Feldkirchen
Membranen für <i>Westernblots</i>	TransBlot Turbo™ Mini-size PVDF Membrane	BioRad, Feldkirchen
Fertige <i>Westernblot</i> Protein Gele	Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Gels	BioRad, Feldkirchen

3.2 Methoden

3.2.1 RNA-Isolation

Bevor mit der Isolation der RNA begonnen wurde, erfolgte eine Vorbehandlung der Pipetten und des Arbeitsplatzes mit RNase Zap (Carl Roth, Karlsruhe), um vorhandene RNasen zu entfernen. Die Isolation wurde mit Hilfe des High Pure RNA Isolation Kit (Roche, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. RNA, die für DNA-*MicroArray*-Analysen verwendet werden sollte, wurde mit TriFast (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) isoliert. Dafür wurden die Zellen 10 min bei 210 g abzentrifugiert und das Pellet in 1 mL TriFast-Reagenz aufgenommen. Nach 5 min Inkubationszeit auf Eis wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer Spritze homogenisiert. Es schloss sich ein zehnminütiger Zentrifugationsschritt bei 12000 g und 4 °C an. Der Überstand, welcher die gewünschte RNA enthielt, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Chloroform (SIGMA-Aldrich, Darmstadt) ausgeschüttelt (15 sec). Nach einer Inkubation von 5 min und der Zentrifugation (15 min bei 12000 g und 4 °C) bildeten sich im Reaktionsgefäß drei Schichten. In der oberen, wässrigen Phase befand sich die RNA. Diese Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von Isopropanol (Carl Roth, Karlsruhe) wurde die RNA gefällt. Durch Vortexen, Inkubation für 10 min und einem anschließenden Zentrifugationsschritt (10 min bei 12000 g und 4 °C) lag die RNA als Pellet vor. Dieses wurde mit 80%-igem Ethanol (Carl Roth, Karlsruhe) gewaschen (5 min bei 7500 g) und anschließend getrocknet. Das Pellet wurde in DEPC-Wasser (20 - 100 µL) aufgenommen und für 10 min bei 65 °C inkubiert, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Anschließend erfolgte die Konzentrationsbestimmung am NanoDrop.

3.2.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen von DNA und RNA wurden am NanoDrop 2000 (ThermoFisher, Dreieich) gemessen. Nach dem Nullabgleich mit Hilfe des Elutionspuffers wurde 1 µl der Probe direkt auf den Sockel pipettiert und die Absorptionsmaxima bei 260 nm und 280nm bestimmt.

Aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 nm zu 280 nm konnte die Reinheit der Proben abgelesen werden. Der Quotient sollte sich zwischen 1,6 und 2,0 befinden.

3.2.3 cDNA-Synthese

Um Aussagen über das Genexpressionsprofil treffen zu können, musste die vorhandene RNA in komplementäre DNA, die als cDNA bezeichnet wird, umgeschrieben werden. Die verwendeten Komponenten (Tab.14) wurden 1 h bei 40 °C und anschließend 5 min bei 90 °C inkubiert. Der letzte Schritt diente der Inaktivierung der Reversen Transkriptase. Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

Tabelle 14. Komponenten und Mengen für die cDNA-Synthese

Menge	Komponente
4 µL	Puffer (5x)
1 µL	dNTPs (10 mM)
1 µL	Oligo d(T)12-18 Primer
1 µL	M-MLV Reverse Transkriptase (RNase H Minus)
x µl (1 µg RNA)	RNA
(13-x) µL	DEPC-Wasser

3.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Um ein bestimmtes Genprodukt klonieren oder sequenzieren zu können, musste es vorher amplifiziert werden, dies geschah per Polymerasekettenreaktion (PCR) und folgendem Mix:

Tabelle 15. Pipettierschema für die PCR

Menge	Komponente
5 µL	GoTaq® PCR-Puffer (5x)
0,5 µL	dNTPs (10 mM)
0,25 µL	<i>sense</i> Primer (25 µM)
0,25 µL	<i>antisense</i> Primer (25 µM)
0,2 µL	GoTaq®-Polymerase (5 U/µL)
2 µL	cDNA
16,8 µL	Nuklease-freies Wasser (Promega, Walldorf)

Für die PCR wurde das folgende Programm verwendet:

<u>Zyklen</u>	<u>Temperatur (Standard)</u>	<u>Zeit (Standard)</u>	<u>Reaktionsschritt</u>
1	95°C	5 min	Denaturierung
24-35	94°C	30 sec	Denaturierung
	60°C	30 sec	Primeranlagerung
	72°C	45sec	Elongation
1	72°C	5 min	Elongation

Die Zeiten für Denaturierung, Primeranlagerung und Elongation sowie die Temperatur für die Primeranlagerung wurden je nach Größe des zu erwartenden Produktes und Primersequenz angepasst.

3.2.5 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Die quantitative (real-time) PCR ist ein Verfahren, um die Menge an entstandenem PCR-Produkt in Echtzeit zu messen. Dies ist möglich, da ein Fluoreszenz-Farbstoff verwendet wurde, welcher in die DNA interkaliert. Nach jedem Zyklus, die die PCR durchlief, wurde die Fluoreszenzintensität gemessen. Der Ansatz wurde wie folgt pipettiert:

Tabelle 16. Pipettierschema des qRT-PCR-Mastermix

Menge	Komponente
5 µL	GoTaq® qPCR Master Mix (2x)
1 µL	<i>sense</i> Primer (25 µM)
1 µL	<i>antisense</i> Primer (25 µM)
2 µL	cDNA
6 µL	Nuklease-freies Wasser

<u>Zyklen</u>	<u>Temperatur (Standard)</u>	<u>Zeit (Standard)</u>	<u>Reaktionsschritt</u>
1	95°C	2min	Denaturierung
40	94°C	30 sec	Denaturierung
	60°C	30 sec	Primeranlagerung
	72°C	45 sec	Elongation

Als Referenz dienten die *housekeeping*-Gene Aktin (ACTB) oder Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT1). Als Negativ-Kontrolle wurde pro Primerpaar ein Ansatz mit Wasser und RNA mitgeführt. Die RNA-Kontrolle diente dazu, auszuschließen, dass die

RNA genomische DNA enthält. Die Auswertung erfolgte nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Methode (Livak und Schmittgen 2001).

3.2.6 Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Gelelektrophorese konnten DNA-Moleküle anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Dies ist möglich, da Nukleinsäuren negativ geladene Phosphatgruppen besitzen und zur Anode wandern. Die DNA wurde auf ein Agarosegel aufgetragen, wobei sich die Prozentigkeit der Agarose nach der Größe des erwarteten Produktes richtete (je kleiner das Produkt, umso höherprozentiger das Gel). Standardmäßig wurde ein 2%-iges Gel verwendet.

Dafür wurde die benötigte Menge Agarose (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) in 1xTAE-Puffer aufgenommen und in der Mikrowelle vorsichtig erhitzt, bis die Agarose sich gelöst hatte. Da es durch den Kochvorgang zu einem Flüssigkeitsverlust kam, wurde die Lösung nach dem Kochen erneut abgewogen und die Differenz mit destilliertem Wasser aufgefüllt. Anschließend wurde *MidoriGreen* (Nippon Genetics, Düren) in einer Konzentration von 4 % (v/v) zugegeben und die Flüssigkeit in eine Gelkammer mit Kamm gegossen. Die Proben wurden mit dem Ladepuffer (6x) (ThermoFisher, Dreieich) versetzt und in die Taschen pipettiert. Um die Größe der Produkte bestimmen zu können, wurde ein Größenstandard (ThermoFisher, Dreieich) mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei 8 V/cm. Anschließend wurde das Gel mit dem Imager Quantum ST5 (Vilber Lourmat, Eberhardzell) fotografiert.

3.2.7 Elution spezifischer Genfragmente

Sollten DNA-Fragmente aus dem Gel eluiert werden, wurden die Banden ausgeschnitten, abgewogen und anschließend mit Hilfe des GeneJET Gel Extraction Kit (ThermoFisher, Dreieich) nach Angaben des Herstellers eluiert. Es folgte die Konzentrationsbestimmung am NanoDrop.

3.2.8 DNA-Isolierung

Die Isolierung der genomischen DNA aus den Kulturzellen erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Venlo, Niederlande) nach Angaben des Herstellers. Es wurden für jede Isolation 5×10^6 Zellen eingesetzt und nach der Isolation die Konzentration am Spektrophotometer bestimmt.

3.2.9 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Zur Überprüfung von Inserts in Vektoren und Genprodukten wurde die isolierte DNA sequenziert. Genutzt wurde das BigDye™ Terminator Kit 1.1. (Life Technologies, Darmstadt). Dieses Kit basiert auf dem Kettenabbruchverfahren durch den Einbau von Didesoxyribonukleotiden. Ein Sequenzieransatz erfolgte in einem Volumen von 10 µL.

Tabelle 17. Pipettierschema für Sequenzierungs-Reaktion

Menge	Komponente
10-30 ng Fragment bzw. 300 ng Vektor	DNA
4 µL	BigDye-Mix
0,2 µL	Primer
ad 10 µL	HPLC-Wasser

<u>Zyklen</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>
30	96 °C	30 sec
	60 °C	4 min

Der Ansatz wurde mit 1 µL 3 M Natriumacetat (pH 4,6) und 25 µL 100%-igem Ethanol versetzt, gemischt und 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (15 min bei 12000 g), wobei die DNA pelletiert wurde. Das Pellet wurde mit 25 µL 70%-igem Ethanol gewaschen (5 min bei 12000 g) und getrocknet. Die Sequenzierung erfolgte im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität am ABI 3100 Genetic Analyzer C. Die erhaltenen Sequenzen wurden mit der NCBI-Datenbank verglichen.

3.2.10 Klonierungsmethoden

Für Klonierungen wurden verschiedene Vektorensysteme genutzt. Um die OC2-Sequenz überexprimieren zu können, musste diese zunächst mittels PCR vervielfältigt und in den Vektor pGEM-T Easy ligiert werden. Die im vorangegangenen Kapitel 3.1.6 beschriebenen Vorteile des Vektors ermöglichen eine einfache Vervielfältigung der Inserts in Prokaryonten. Da der Vektor bereits als geöffneter Leervektor vorliegt, konnten die Inserts direkt nach der Amplifikation durch eine PCR mit dem Vektor ligiert werden. Hierfür wurde ein Ligationsansatz wie in der Tab. 18 beschrieben pipettiert. Die Menge des benötigten Inserts in ng wurden durch folgende Formel berechnet: $10 \times 50\text{ng Vektor} \times \text{bp Insert} / \text{bp Vektor}$.

Tabelle 18. Pipettierschema Ligation pGEM-T Easy

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

Nach Vermischen der Komponenten wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die anschließende Transformation ist in Kapitel 3.2.11 beschrieben. Für die Transformation der pGEM-T Easy-Vektoren wurden 10 µl Ligationsansatz verwendet. Um OC2 in den pRTS-1-Vektor klonieren zu können musste er aus dem pGEM-T-Easy-Vektor in den pUC19-SfiI-Vektor kloniert werden. Hierfür wurde der pGEM-T-Easy-Vektor mit dem Restriktionsenzym *NotI* verdaut bei 37 °C für 1h und 20min bei 80 °C inaktiviert. Anschließend wurde simultan, wie im Folgenden beschrieben für die Klonierung von OC2s in den pUC19-SfiI-Vektor vorgegangen.

Um die aus der cDNA Bank gewonnen Sequenz von OC2s zu sichern, wurde diese Sequenzen zunächst aus dem pCMV-script-Vektor in den pUC19-SfiI-Vektor kloniert. Im Ersten Schritt wurde der pCMV-script-Vektor mittels des Restriktionsenzym *KpnI* geöffnet und das Insert herausgeschnitten. Der Verdau erfolgte bei 37 °C für 1h. Anschließend wurde das Enzym inaktiviert durch Inkubation bei 80 °C für 20min. Um passende rekombinante Enden für die Ligation mit dem pUC19-SfiI-Vektor zu generieren, wurde das Insert mit T4-Polymerase behandelt. Das nun *blunt end* vorliegende Insert konnte mit dem Restriktionsenzym *NotI* geschnitten werden, um ein passendes 3'-Ende zu erzeugen. Der pUC19-SfiI-Vektor wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen *NotI* und *EcoRV* bei 37 °C für 1h verdaut. Die Inaktivierung der Enzyme erfolgte 20min bei 80 °C. Sowohl Insert als auch Vektor wurden nach dem Verdau mit Gelelektrophorese entsprechend der Kapitel 3.2.6 und folgender Kapitel isoliert. Die Ligation des Inserts in den Vektor erfolgte anschließend entsprechend der Tab. 19.

Tabelle 19. Pipettierschema Ligation pUC19-SfiI.

Menge	Komponente
5 µl	Rapid Ligation Buffer (2x) T4 DNA Ligase
1 µl	pUC19-SfiI-T-Vektor
X µl	Produkt (Insert)
1 µ	T4-DNA-Ligase
10 µl	Nuclease-freies Wasser

Der Ligationsansatz wurde im Anschluss wie für die OC2-Vektoren bereits beschrieben bei Raumtemperatur für 1h inkubiert und dann in *E. coli* transformiert gemäß Kapitel 3.2.11. Es wurden 10µl des OC2s-Ligationsansatzes verwendet.

Für die Überexpression wurden die Inserts abschließend in den episomalen pRTS-1-Vektor kloniert. Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym *SfiI* verdaut, um linearisiert zu werden. Der Verdau erfolgte in einem Gesamtvolumen von 20 µL, der entsprechend Tab. 20 zusammengesetzt wurde. Die Reaktion wurde 1 h bei der entsprechenden Temperatur des Restriktionsenzym inkubiert und anschließend inaktiviert. Die verwendeten Enzyme, Puffer und Inkubationstemperaturen sind in Tab. 9 aufgeführt.

Tabelle 20. Pipettierschema „Restriktionsverdau“

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

Der Vektor wurde nach dem Verdau dephosphoryliert. Der Ansatz ist Tab. 21 zu entnehmen.

Tabelle 21. Pipettierschema „Dephosphorylierung“

Menge	Komponente
1 µg	DNA
1 µl	FastAP
2 µl	FastAP-Puffer

Dieser Ansatz wurde vorsichtig gemischt und abzentrifugiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 10 min. Anschließend mussten die Ansätze mit den Fragmenten noch per Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Die Banden, welche die korrekten Vektoren und Inserts enthielten, wurden aus dem Gel geschnitten. Die Isolation des Bandeninhalts erfolgte mit dem GeneJet Gel Extraktion Kit von ThermoFischer Scientific, Dreieich gemäß Herstellerprotokoll. Damit das Insert die passenden komplementären Sequenzüberhänge hatte, um in den pRTS-1-Vektor kloniert werden zu können, wurde der pUC19-SfiI-Vektors mit dem gleichen Enzym *SfiI* verdaut. Die entstehenden Enden des so entstehenden Inserts und pRTS-1-Vektors konnten so ligiert werden. Hierfür wurden 10 µl Ligationsansatz wie folgt zusammen pipettiert.

Tabelle 22. Pipettierschema „Ligation Expressionsvektoren“

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

Der Ansatz wurde vermischt und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Transformation erfolgte anschließend wieder in *E. coli* Bakterien. Auf Grund der Ampicillin-Resistenz des pRTS-1-Vektors erfolgte die Selektion durch Zugabe von Ampicillin zu den Nährmedien und Agarplatten. Als Kontrolle der erfolgreichen Klonierung wurde wieder ein Probeverdau durchgeführt. Auf diese Art und Weise konnten ein pRTS-1xOC2 und pRTS-1xOC2s generiert werden.

Ein zweiter Ansatz für die Überexpression war die Verwendung von kommerziell erworbenen Sequenzen, welche überexprimiert werden sollten. Diese wurden in einem pEX-A258-Vektor geliefert und in diesem auch analog über den pUC19-SfiI-Vektor zunächst vervielfältigt. Zu beachten war allerdings, dass abweichende Restriktionsenzyme zum Einsatz kamen. Um die Sequenzen aus dem Vektor pEX-A258 herauszuschneiden, wurden sie mit *AgeI* und *NsiI* bei 37 °C für 1h verdaut. Die Inaktivierung erfolgte im Anschluss durch 20min Inkubation bei 80 °C. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit der T4-Polymerase und verdau mit *NotI* wie oben beschrieben, um eine Klonierung in den pUC19-SfiI-Vektor zu ermöglichen. Auch die synthetischen Sequenzen wurden für die Überexpression in den pRTS-1-Vektor kloniert. Der Ablauf entspricht dem oben beschriebenen Protokoll. Am Ende entstanden vier Vektoren: pRTS-1xOC2ref, pRTS-1xOC2sref, pRTS-1xOC2Δ, pRTS-1OC2sΔ.

3.2.11 Transformation in *E. coli*

Transformiert wurde in *E. coli* XLI-blue oder *E. coli* Gold. Auf den Plasmiden befand sich eine Antibiotikaresistenz, welche die Selektion ermöglichte. Für die Transformation wurden 100 µL chemisch kompetente *E. coli* Zellen auf Eis aufgetaut und nach Zugabe des Plasmids/Vektors/DNA weitere 3 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42 °C. Die Zellen wurden für 2 min wieder auf Eis gestellt und nach der Zugabe von 900 µL LB-Medium (ohne Antibiotikum) für 1 h bei 37 °C schüttelnd bei 30 x g inkubiert. Dadurch konnten die Zellen die Antibiotikaresistenz ausbilden. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (5 min bei 4000 g), um die Zellen zu pelletieren. Das Medium wurde abgenommen, das Zellpellet in 50 µL LB-Medium resuspendiert und auf Agar-Platten mit Antibiotikum ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C. Nachdem auf den Platten Bakterienkolonien gewachsen waren, konnten einzelne mit einer Pipettenspitze entnommen werden. Diese Kolonien wurden mit 10 ml Nährmedium in einem

Zentrifugenröhrchen und dem entsprechenden Antibiotikum in einer Konzentration von 50 mg/ml über Nacht in einen Schüttler bei 37 °C und 3 x g inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte abschließend die Präparation der Bakterien und die Anlage eines Stocks. Für die Präparation wurden 8 von 10 ml Bakterienlösung in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 20 min bei 5000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Es wurde dann entsprechend des Herstellerprotokolls Genejet Plasmid Miniprep Kit von ThermoFischer Scientific, Dreieich, bei der Präparation vorgegangen. Die Konzentration des Eluats wurde mit Hilfe des NanoDrops gemessen und konnte bei -20 °C gelagert werden. Um zu überprüfen, dass die Kolonien auch die gewünschten Inserts enthielten, wurde ein Probeverlauf mit einem bestimmten Restriktionsenzym durchgeführt. Der Vorgang und das Schema sind in Kapitel 3.2.11 beschrieben. Per Gelelektrophorese konnten die geschnittenen Fragmente dann der Größe nach sortiert und mit ungeschnittenen Vektoren verglichen werden. Damit die Bakterien mit den korrekten Vektoren auf lange Sicht gesichert waren, wurden zusätzlich noch Glycerolstöcke angelegt. Aus diesen können kleinste Menge entnommen werden und nach Auftauen wieder in Kultur genommen werden, um den enthaltenen Vektor zu isolieren. Für die Stocks wurden 1 ml Bakterienlösung in 200 µl Glycerin in ein Kryo-Röhrchen gegeben. Nach 30 min Inkubation bei Raumtemperatur konnten die Röhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert werden.

3.2.12 Immunfluoreszenz-Färbung

Zwei verschiedene adhärenzte Zelllinien, HEK293 und SW480, wurden für die Immunfluoreszenz-Färbung verwendet. Es wurde individuell für jede Zelllinie vorgegangen. Bei beiden Zelllinien handelte es sich um mit dem Überexpressionsvektor pRTS-1 transfizierte Zellen. Da der Vektor erst durch die Zugabe von Doxycyclin auf Grund seines bidirektionalen Promotors, aktiviert wird, wurden die Zellen in 300 µl Medium mit 1 µl/ml Doxycyclin 24h vor geplanter Färbung ausgesät. Zusätzlich konnten die adhärenzten Zellen so in den *chamber slides* adhären. Da es sich bei den HEK293-Zellen um relative große Zellen handelt, wurden 30.000 Zellen pro well in 8-well *chamber slides* ausgesät.

Am nächsten Tag wurden die Zellen jeweils mit 300 µl PBS zweimal gespült, um Reste des Kulturmediums zu entfernen. Anschließend wurden mit 300 µl PFA (mit Saccharose) für 20min bei RT inkubiert. Es folgte wieder ein Waschschriff mit 300 µl PBS für 5 min. Um die Zellmembranen zu permeabilisieren wurden die Zellen auf Eis für 5 min mit 300 µl eines 0,5% Triton 100-X/PBS-Gemisches inkubiert. Es wurden alle Reste durch erneutes 3-maliges Waschen mit 300 µl PBS für 5 min entfernt. Geblockt wurde mit 300 µl eines 1% BSA/PBS-Gemisches bei RT. Im Anschluss wurde erneut dreimal mit 300 µl PBS gewaschen. Nun folgte die Inkubation des spezifisch bindenden Primärantikörpers bei 4 °C in einer Feuchtkammer über Nacht. Der Antikörper wurde, wie vom Hersteller empfohlen, auf eine Konzentration von 5 µg/mL verdünnt. Dafür wurden 0,72 µl der Antikörper-Stammlösung (1 mg/mL) in 0,4 mL 1 %

BSA/PBS gelöst und jeweils 100 µl der Verdünnung auf die *chamber slights* gegeben. Nach der Inkubation wurde 3x mit PBS gewaschen. Im letzten Schritt wurde das Präparat mit dem sekundären Antikörper inkubiert. Bei diesem handelte es sich um einen PE (Phycoerythrin)-markierten Antikörper, der spezifisch Kaninchen-IgG bindet. Für das Experiment wurde pro Millionen Zellen 20 µl der Stammlösung auf 100 µl Gesamtansatz verdünnt (1:40). Als Lösungsmedium wurde 1 % BSA/PBS-Gemisch gewählt. Pro *well* wurden 100 µl Sekundärantikörper in 1 % BSA/PBS verwendet und für 1 h in Alufolie gewickelt bei RT inkubiert. Bevor die gefärbten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden konnten, mussten sie ein letztes Mal, wie oben beschrieben, gewaschen werden, um alle Überreste ungebundenen sekundären AK zu entfernen.

Für die Färbung der SW480-Zellen wurden 500.000 Zellen in 200 µl Medium in *chamber slights* ausgesät. Auch diese Zellen waren mit dem Vektor pRTS-1 transgene Zellen; dementsprechend wurde zur Induktion des Vektors Doxycyclin (1 µg/mL) zugegeben. Zur Fixation der Zellen wurde im ersten Schritt das Medium entfernt und die Zellen 3x mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden pro Kammer 300 µl ein Methanol/Aceton-Mischung (1:1) zur Fixation der Zellen verwendet. Nach 15 min Inkubation im Brutschrank in der Mischung wurden die Zellen wieder 3x mit PBS gespült. Durch 60 min Inkubation im Inkubator mit 300 µl eines 0,5 % Triton 100-X/PBS-Gemisches pro Kammer wurden die Zellen permeabilisiert. Anschließend wurde 3x mal mit PBS gewaschen. Die Blockung unspezifischer Bindungsstellen und anschließenden Färbungen des Primär-AK (spezifische Polyklonale anti-OC2-Antikörper von ThermoFisher, Dreieich und sekundär-AK (Anti Rabbit IgG-PE) erfolgte wie oben beschrieben. Für die Darstellung der Zellkerne verwendeten wir Hoechst-Farbstoff (Invitrogen, ThermoScientific, Dreieich). Pro *well* wurden 10 µl Hoechst-Farbstoff zugegeben.

3.2.13 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Versuche und Bilder wurde ein Axiovert 25-Mikroskop der Firma Zeiss verwendet. Die Auswertung der Bilder erfolgte mit der passenden Software Zeiss ZEN lite (blue edition).

3.2.14 Durchflusszytometrie (*Fluorescence Activated Cell Scanning*, FACS)

Für die Arbeit wurden Sekundärantikörper verwendet, die an PE gekoppelt waren. Für die FACS-Analyse wurden die Zellen auf ca. $0,5 \times 10^6$ bis 1×10^6 pro Ansatz eingestellt und in FACS-Röhrchen übertragen. Da es sich bei OC2 um ein intrazellulär gelegenes Protein handelt, mussten die Zellen zunächst permeabilisiert werden. Dafür wurden sie in 250 µl Cytofix/CytoPerm (FisherScientific, Dreieich) aufgenommen und für 20 min bei 4 °C inkubiert. Es wurde für 5 min bei 100 x g zentrifugiert und die Zellen wurden im Anschluss zweimal mit 1 mL eines 1:10 Gemisches aus PermWash-Puffer (FisherScientific, Dreieich) und destilliertem Wasser gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte jeweils für 5 min bei 100 x g. Für die intrazelluläre FACS-Analyse wurde ein polyklonaler unkonjugierter Antikörper gegen

ONECUT2 verwendet. Dieser sollte beide Splicevarianten nachweisen können, da seine spezifische Bindungsstelle im Bereich der CUT-Domäne lokalisiert ist. Zu den Proben wurden nun 30 µl eines Gemisches des spezifischen Antikörpers, in einer Konzentration von 4 µg/mL, und destilliertem Wasser hinzugefügt. Für eine optimale Bindung erfolgte die Inkubation bei 4 °C für 30 min, vorher wurden die Proben vorsichtig gevortext. Nach Inkubation folgte ein erneuter Waschschrift mit 1 mL PermWash-Puffer für 5 min bei 100 x g. Dieser wurde zweimal wiederholt. Von dem Sekundären-AK wurden nun auf jeden Ansatz 60 µl eines 1:40 Gemisches mit PermWash Puffer gegeben und für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Es erfolgte erneut der zweimalige Waschschrift mit 1 mL PermWash für 5min bei 100 x g. Der Überstand wurde abdekantiert und die Zellen für die Analyse im Zytometer in 1 mL PBS resuspendiert.

3.2.15 Proteinisolation

Zur Proteinisolation mit Laemmli-Puffer wurden die Kulturzellen geerntet und 10 min bei 1000 g abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml Medium resuspendiert und gezählt. Anschließend wurden bei 4 °C und 1000 g 5 min erneut abzentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 1 ml kaltem PBS gelöst und 1×10^6 Zellen in ein 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden nun bei 4 °C und 1900 x g 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und es wurde ein letztes Mal 1 min bei 4 °C und 4400 g zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 100 µl 4x-Laemmli-Puffer (BioRAD, Feldkirchen) resuspendiert. Die Suspension wurde 1 min bei 50%iger Amplitude beschallt und 5 min bei 99 °C gekocht. Das Proteinisolat wurde bei -20 °C gelagert oder konnte direkt zum Laden genutzt werden.

3.2.16 SDS-PAGE

Die Auftrennung der Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese). Es wurden 10% *Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels* der Firma BioRad, Feldkirchen verwendet. Hierbei handelt es sich um vorgefertigte 10%-Polyacrylamidgele mit 10 Ladetaschen für je maximal 30 µl Probe. Pro Ladetasche wurden 10 µl in Laemmli-Puffer gelöstes Protein verwendet (1×10^5 Zellen) nebst 7 µl des Größenstandards *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher, Dreieich). Das Gel wurde bei 50 Volt für 60 min und anschließenden 30 min bei 80 Volt aufgetrennt. Für die SDS-PAGE wurde eine *MiniPROTEAN TetraCells*-Laufkammer verwendet mit 1xSDS-Laufpuffer.

3.2.17 Westernblot

Zum *Blotten* wurde eine 7,1 cm x 8,5 cm *TransBlotTurbo Mini-size PVDF-Membrane* (BioRad, Feldkirchen) und pro Membran jeweils vierzehn 7,1 cm x 8,5 cm *TransBlotTurbo Mini-size Stacks* Filterpapiere (BioRad, Feldkirchen) verwendet. Die PVDF-Membran wurde 5 min in Methanol und anschließend in 1x TBT-Puffer für 5 min inkubiert. Die Filterpapiere wurden für 5 min in 1x TBT-Puffer inkubiert. Anschließend wurden die Blätter, die Membran und das Gel bündig übereinandergelegt (7 Filterpapiere, 1 PVDF-Membran, Gel, 7 Filterpapiere).

Das *Blotting* erfolgte mit dem FastBlotTurbo System von BioRad, Feldkirchen, hierbei wurde das Programm für 2 Mini-Gele für 7 min verwendet. Nach dem Blotting wurde die Membran in VE-H₂O gewaschen für 5 min und in Ponceau S-Lösung (SIGMA Aldrich, Darmstadt) für 2 min inkubiert, um zu überprüfen, ob das *Blotting* erfolgreich war. Die Membran wurde mit TBST dreimal für 5 min gewaschen und anschließend für 1h in TBST mit 5 % Magermilchpulver (Carl Roth, Karlsruhe) bei RT blockiert, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Der Primärantikörper wurde in TBST mit 5 % Magermilchpulver verdünnt und die Membran über Nacht bei 4 °C mit diesem im Rotator (ThermoScientific, Dreieich) inkubiert. Nach einmal Waschen für 5 min und zweimal für jeweils 10 min mit TBST wurde der Sekundärantikörper ebenfalls in TBST mit 5 % Magermilchpulver verdünnt und für 1 h auf die Membran gegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Membran einmal für 5 min und zweimal für 10 min mit TBST gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte im ChemiDoc (BioRad, Feldkirchen). Dafür wurde pro Membran 1 ml Entwicklerlösung Clarity Max™ Western ECL-Substrate (BioRad, Feldkirchen) verwendet und diese anschließend für 5 min mit dieser inkubiert. Bei der Bildgebung wurde jeweils ein Auflichtbild als auch ein chemilumineszierendes Bild gemacht. Um die Membran für den nächsten Primärantikörper von den bereits gebundenen AK zu bereinigen, wurde die Restore™ PLUS *Westernblot* Stripping Buffer Lösung (ThermoScientific, Dreieich) verwendet. Bevor die Membranen 10 min mit dem *Stripping Buffer* bei RT inkubiert wurden, wurden sie 3-mal für 5 min in TBST gewaschen. Nach Applikation des Puffers wurde dieser Schritt wiederholt. Erneut wurden unspezifische Bindungsstellen durch einstündige Inkubation in 5 % Milchpulver bei RT blockiert. Anschließend konnte mit der Inkubation des Primär-AK fortgefahren werden.

3.2.18 *MicroArray*-Analyse

Für die Versuche wurden DNA-*MicroArrays* vom Typen GeneChip™ Human Transcriptome Array 2.0 der Firma Affymetrix, ThermoScientific, Dreieich, verwendet. Die Verarbeitung der RNA-Proben nebst Hybridisierung mit *MicroArrays* wurde dankenswerterweise von Herrn Vesselin (Core Facility Analyse, Universitätsklinikum Halle (Saale)) durchgeführt. Die gewonnenen Rohdaten wurden mithilfe der Transcriptome Analysis Console (TAC; version 4.0.2.15; Applied Biosystems, ThermoScientific, Dreieich) unter Anwendung des *Robust Multi-Array Average* (RMA)-Algorithmus in eine Texttabelle mit Signalintensitäten umgewandelt und anschließend in einer Excel-Tabelle weiter ausgewertet.

3.2.19 Next Generation Sequencing

Die analysierten RNA-Proben wurden auf 1 µg per 20 µl eingestellt und die Sequenzierung durch die Firma Novogene, Cambridge durchgeführt. Für die Auswertung der Datensets wurde die Galaxy-Plattform (Sloggett et al. 2013) verwendet. Das primäre *Mapping* wurde mittels HISAT2 auf das humane Referenz-Genom hg38 durchgeführt, wobei für die anschließende

Quantifizierung eine um humane endogene Retroviren und LINE1-Elemente erweiterte *general transfer format* (gtf)-Datei verwendet wurde. Diese Datei wurde dankenswerterweise von Frau Dr. K. Engel aus unserer Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Für die weitere Analyse wurden TPM (*transcripts per million*)-Werte der jeweiligen Proben berechnet. Die TPM-Werte bildeten die Grundlage für die weitere Analyse und Visualisierung der Daten. Beides erfolgte mittels R-Studio unter Verwendung des *dplyr*- bzw. *ggplot2*-Paketes (Wickham et al. 2016; Wickham et al. 2023) sowie mithilfe des Genesisprogramms (Sturn et al. 2002).

3.2.20 Zellkultur

Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen mit Kulturmedium im Brutschrank bei 37 °C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % und einem CO₂-Gehalt von 5 % kultiviert. Die Suspensionszellen wurden zweimal die Woche ca. 1:3 passagiert. Es wurde ein Drittel aus der alten Flasche entnommen, in eine neue Flasche überführt und mit 7 mL frischem Kulturmedium versetzt, adhärent wachsende Zellen wurden passagiert, wenn sie eine Konfluenz von etwa 90 % erreicht hatten. Um die Zellen zu passagieren, wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen. Um die Zellen vom Flaschenboden abzulösen, erfolgte die Zugabe von Trypsin/EDTA und die Inkubation bei 37 °C. Wenn sich alle Zellen abgelöst hatten, wurde frisches Kulturmedium zugegeben und ein Teil der Zellen in eine neue Flasche überführt.

Zur Kryokonservierung wurden die Zellen 10 min bei 300 g abzentrifugiert. Als Einfriermedium wurde Kulturmedium mit 10 % DMSO versetzt. In einer Dichte von etwa 5x10⁶ Zellen/mL Einfriermedium wurde das Zellpellet resuspendiert und in Kryoröhrchen überführt. In einem Einfriercontainer, welcher Isopropanol enthielt, wurden die Zellen in den -80 °C Schrank gelagert und langsam gefroren. Die langfristige Lagerung erfolgte in Stickstofftanks. Um Zellen aufzutauen, wurden die Proben im Wasserbad aufgetaut und sofort in ein Röhrchen mit vorgelegtem Kulturmedium überführt und zentrifugiert (10 min bei 300 x g). Der Überstand wurde abgesaugt, die Zellen in Kulturmedium resuspendiert und in eine Kulturflasche gegeben. Die Zellzahl konnte mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt werden. Die Probe wurde mit Trypanblau 1:10 verdünnt und in die Zählkammer pipettiert. Nur ungefärbte Zellen wurden in vier Großquadraten ausgezählt. Die Zellzahl wurde berechnet als:
Zellzahl pro Großquadrat x 10⁴ x Verdünnungsfaktor = Zellzahl/mL

3.2.21 Transfektion von L428-Zellen

Die Zelllinie L428 wurde mittels Amaxa Nucleofector System mit siRNA und mit dem Vektor pRTS-1 transfiziert. Gemäß der Hersteller-Empfehlung wurde für das Kit L verwendet und entsprechend des Protokolls vorgegangen. Die Zellen wurden auf eine Zellzahl von 1 x 10⁶

eingestellt und mit 2 µg Vektor bzw. 300 nM siRNA transfiziert. Die Expansion der Zellen erfolgte anschließend auf einer 12-*well* Platte.

3.2.22 Transfektion von HEK293-Zellen

Zur Transfektion der adhärenen HEK293-Zelllinie mit dem pRTS-1-Vektor wurde PromoFectin (PromoKine, Heidelberg) verwendet. Die Zellen wurden für die Transfektion 24 h vorher auf einer 6-*well* Platte mit einer Zellzahl von 1×10^6 ausgesät. Entsprechend des Hersteller-Protokolls wurden die Zellen in 2 mL Kulturmedium mit 3 µg DNA und 6 µl PromoFectin versetzt. Nach 5 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C wurden 2 mL frisches Kulturmedium zugegeben. Nach 24 h wurde das Kulturmedium ausgetauscht. Waren die *wells* bereits dicht besiedelt, konnten die Zellen wie in Kap. 3.2.20 beschrieben passagiert werden.

3.2.23 Transfektion von A673-Zellen

Für die Zelllinie A673 wurde wie auch für die HEK293-Zellen PromoFectin zur Transfektion mit dem pRTS-1 Vektor verwendet. Es wurde wie im Kap. 3.2.22 beschrieben vorgegangen. Um eine stabile transgene Zelllinie aus den A673 zu etablieren, mussten die Zellen nach der Transfektion selektiert werden. Da der pRTS-1 Vektor für die Resistenz gegen Hygromycin B kodiert, bilden Zellen nach Transfektion mit dem Vektor eine Resistenz gegen Hygromycin B aus. Um einen möglichst großen Selektionsdruck zu erzeugen, wurden die Zellen in den ersten drei Tagen nach der Transfektion auf eine hohe Hygromycin-Konzentration von 500 µg/mL eingestellt und danach für drei Wochen auf eine Konzentration von 100 µg/mL Hygromycin reduziert. Nach diesem Zeitraum konnten die Zellen als stabil transfiziert angesehen werden.

3.2.24 Transfektion von SW480-Zellen

Wie bei den oben beschriebenen Zelllinien handelt es sich auch bei SW480-Zellen um adhären wachsende Zellen. Entsprechend wurde wie oben beschrieben die Transfektionen vorgegangen. Wie auch bei den A673-Zellen sollte eine stabile transgene Zelllinie etabliert werden. Selektioniert wurde mit Hygromycin. Die Konzentration und Dauer der Selektion gleicht hierbei der für die Linie A673 verwendeten. So wurden auch die SW480-Zellen nach einem Zeitraum von 3 Wochen als stabil transfiziert angesehen.

4 ERGEBNISSE

4.1 OC2- und OC2s-Expression in verschiedenen Geweben und Zelllinien

Um das Expressionsmuster der neuen Transkriptvariante OC2s in verschiedenen Geweben und Tumorzelllinien zu analysieren, wurde ein *Screening* diverser Gewebe und Zelllinien auf die jeweilige Expression der Variante OC2s sowie der Referenzvariante OC2 durchgeführt. Die untersuchten Proben lagen bereits entweder als cDNA oder RNA im Labor vor oder wurden aus in Kultur befindlichen Zelllinien isoliert. Insgesamt wurden 12 Gewebetypen und 26 Zelllinien mittels qRT-PCR untersucht. Hierfür wurden jeweils drei Proben unabhängig voneinander getestet. Für die PCR wurden als Referenz ein Aktinprimer und jeweils OC2- und OC2s-spezifische Primer verwendet. Die Quantifizierung erfolgte mittels der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode.

4.1.1 OC2- und OC2s-Expression in Gewebeproben

In bereits früher veröffentlichten Arbeiten wurde eine hohe relative Expression des Transkriptionsfaktors OC2 in Lebergewebe beschrieben (Margagliotti et al. 2007). Dies bestätigte sich im durchgeführten *Screening*. So zeigte sich in Lebergewebe bei der Quantifizierung der relativen Expression durch die qRT-PCR die mit Abstand höchste Expression von OC2. Wie in Abb. 7 dargestellt, konnte in keinem anderen der untersuchten Gewebe eine vergleichbar hohe Expression von OC2 nachgewiesen werden. Lediglich Gehirngewebe zeigte eine moderat hohe OC2 Expression.

Interessanterweise fand sich im Lebergewebe auch eine erhöhte OC2s Expression. Diese war auch im Vergleich zu den anderen Proben die mit Abstand höchste relative Expression. Des Weiteren konnte eine relative hohe Expression der neuen Transkriptvariante in Hodengewebe nachgewiesen werden, jedoch nicht von der bereits bekannten Variante OC2 (Abb. 7).

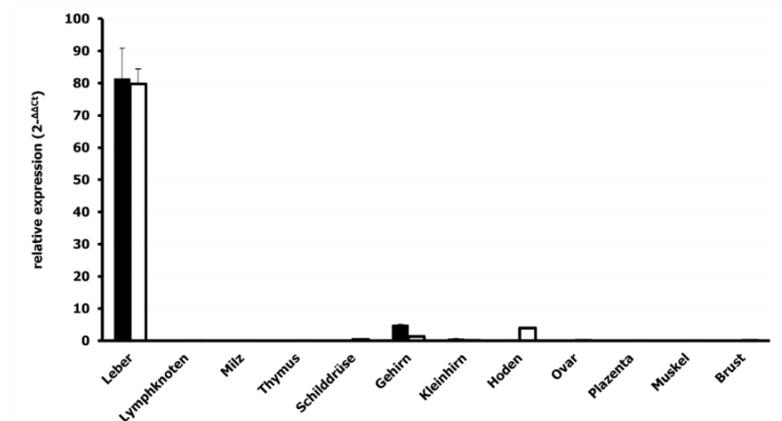


Abbildung 7. Relative Expression von OC2 und OC2s in verschiedenen Geweben. In Schwarz dargestellt ist die relative Expression von OC2 und in Weiß die relative Expression von OC2s. Als *housekeeping*-Gen wurde Aktin verwendet. Zur Bestimmung der relativen Expression wurde die $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode verwendet und der Median aller Proben als 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwert (n=3) und die Standardabweichung der Experimente.

4.1.2 OC2- und OC2s-Expression in verschiedenen Tumorzelllinien

Nachdem die neue Variante ursprüngliche in der Zelllinie L1236 zum ersten Mal entdeckt wurde, wurden zunächst weitere HL-Zelllinien auf die relative Expression der beiden Varianten untersucht. Wie in der Abb. 8 zu sehen ist, zeigte sich hierbei eine hohe relative Expression sowohl von OC2 als auch OC2s in allen untersuchten HL-Zelllinien. Besonders hohe Werte von OC2 als auch OC2s fanden sich in den Linien L1236 und HDLM2.

Neben den HL-Zelllinien wurden verschiedene weitere Tumorzelllinien untersucht. Die bereits in der Literatur beschriebene geringe OC2-Expression in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 bestätigte sich in diesem Screening. Auch die AML-Zelllinien Kasumi-1 und HL60 wiesen kaum eine OC2-Expression auf. Auffälligerweise unterschieden sich die Zelllinien aber in ihrer OC2s-Expression. Die Kolonkarzinomzellen zeigten kaum eine OC2s-Expression, wohingegen beide AML-Zelllinien eine moderat hohe Expression hatten. Genau gegenläufig erwies sich die Expression bei der Mammakarzinomzelllinie MCF7. Eine hohe OC2-Expression bei sehr niedriger OC2s-Expression wurde anhand der qRT-PCR nachgewiesen. In der Abb. 8 sind die relativen Expressionen von OC2 und OC2s aller untersuchten Zelllinien abgebildet.

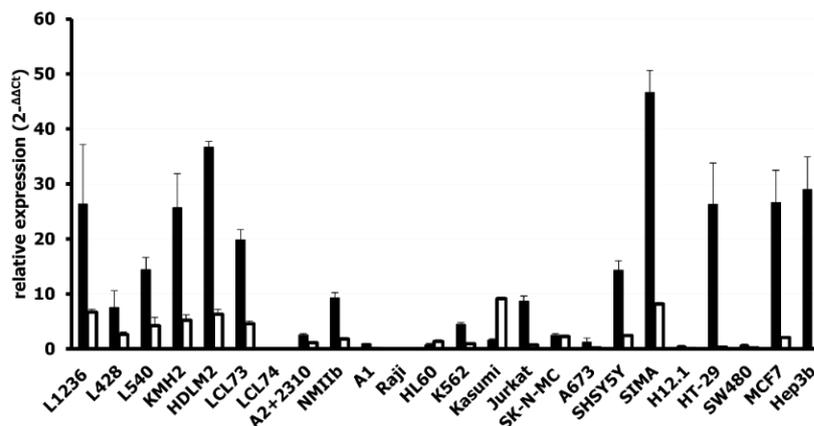


Abbildung 8. Relative Expression von OC2 und OC2s in verschiedenen Zelllinien. In Schwarz dargestellt ist die relative Expression von OC2 und in Weiß die relative Expression von OC2s. Als *housekeeping*-Gen wurde Aktin verwendet. Zur Bestimmung der relativen Expression wurde die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode angewendet und der Median als 1 gesetzt. Dargestellt sind Mittelwert ($n=3$) und die Standardabweichung der Experimente.

4.2 Korrelation von OC2 und OC2s-Expression

In den erhobenen Daten zeigte sich eine hohe relative Expression jeder der beiden Varianten in HL-Zelllinien. Trägt man die Expression der beiden Varianten gegeneinander auf, wie in Abb. 9, ist eine deutliche positive Korrelation über alle Proben zu erkennen. Gegenüber normalen Blutzellen (*Buffycoat*) zeigten sich in HL-Zellen erhöhte Werte beider Varianten. Neben Leber zeigten nur wenige andere Proben vergleichbar hohe Werte. Im nächsten Schritt wurde das *Screening* auf die Untersuchung von Patient:innen-Proben erweitert.

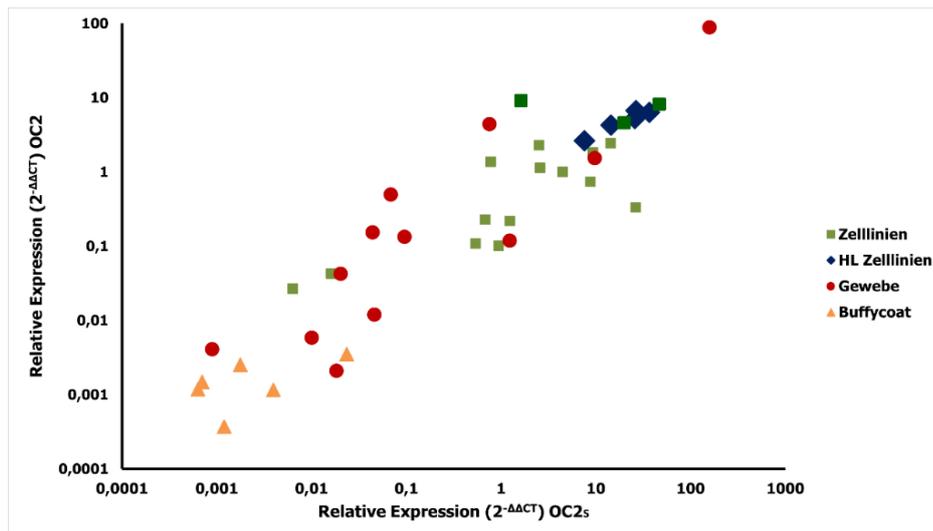


Abbildung 9. Vergleich der relativen Expression von OC2 und OC2s in verschiedenen Proben. Die Mittelwerte der relativen Expression von OC2 sind an der x-Achse aufgetragen, an der y-Achse die Mittelwerte der relativen Expression von OC2s. Mit grünen Vierecken sind die Proben von Zelllinien (außer HL), mit blauen Rauten die HL-Zelllinien, mit roten Punkten die Gewebeprobe und mit orangen Dreiecken die Buffycoats abgebildet. Verwendet wurden die Mittelwerte der relativen Expression der Proben ermittelt durch die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode.

4.2.1 Analyse der relativen Expression von ONECUT2 in GPL570-basierten *MicroArray*-Datensätzen

Die auffällige hohe relative Expression von OC2 in HL- Zelllinien war in der Literatur so bisher noch nicht beschrieben worden. Durch öffentlich zugängliche *MicroArray*-Datensätze (GSE39134, GSE64985, GSE20011) der GEO-Datenbank (unter Beschränkung auf den Arraytyp GPL570) konnten zusätzliche Patientenproben auf das Vorliegen zumindest von OC2 untersucht werden, da diese von den Sonden der Arrays erkannt werden. Die in Abb. 10 gezeigte Grafik visualisiert die Signalintensität für ONECUT2. Die Datensätze enthalten verschiedene Proben. So stammen aus dem Datensatz GSE20011 HL-Zelllinien und weitere Zelllinien, aus dem Datensatz GSE64985 Proben verschiedenster Gewebe und Tumorentitäten und aus dem Datensatz GSE39134 Biopsien von Hodgkin-Lymphom-Patient:innen. Erneut fällt besonders bei den HL-Zelllinien (rot) und den Proben aus HL-Biopsien (mit lila Punkt markiert) eine relativ hohe Signalintensität von ONECUT2 auf. Da es sich bei OC2s um eine bisher noch nicht beschriebene Variante handelt, enthalten *MicroArrays* bisher keine spezifische Sonde für die Detektion, sodass ein *Screening* der Daten auf die OC2s Expression durch diese Methode nicht möglich war.

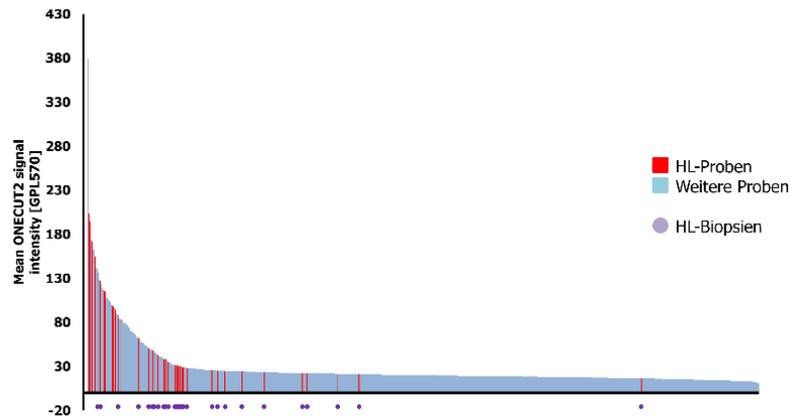


Abbildung 10. Signalintensität von OC2 in GPL570 *MicroArray*-Datensets. In der Abbildung sind Mittelwerte der Signalintensitäten der OC2-spezifischen *MicroArray*-Sonden verschiedener öffentlich verfügbarer Datensets (GSE39134, GSE64985, GSE20011) abgebildet. In Rot sind HL-Proben abgebildet, in blau Proben andere Gewebe und Entitäten und mit lila Punkten sind die Daten aus den Proben von HL-Biopsien markiert.

4.2.2 Untersuchungen zur Expression von ONECUT2 und ONECUT2s auf Proteinebene

Die bisher gezeigten *Screenings* beschränken sich auf die RNA-Ebene. Um herauszufinden, ob sich auch auf der Proteinebene ein hohes Vorkommen an ONECUT2 und ONECUT2s wiederfindet, wurden intrazelluläre FACS und *Westernblot*-Analyse von verschiedenen HL-Zelllinien durchgeführt.

Durch die FACS-Analyse konnten nach Färbung mit Antikörpern intrazellulär gelegene Proteine detektiert werden. Das genaue Vorgehen und die Präparation der Proben sind im Kap. 3.2.14 beschrieben. Der verwendete primäre Antikörper band an eine spezielle AS-Sequenz des ONECUT2-Proteins und konnte nach Zugabe eines sekundären fluoreszierenden Antikörpers durch das Durchflusszytometer erkannt werden. Da der Antikörper im Bereich der CUT-Domäne band, sollte er beide Varianten nachweisen können. Allerdings war eine Abgrenzung der beiden Moleküle durch diese Methode, nicht möglich.

Analog den obigen Experimenten wurden fünf HL-Zelllinien untersucht. Jeweils drei verschiedenen Ansätze pro Zelllinie wurden präpariert: Zellen, die ohne jeglichen AK markiert waren (ungefärbt), Zellen nur mit dem sekundär AK markiert (sekundärer AK) und Zellen mit dem anti-OC2-AK und dem Sekundär AK (Anti-OC2). In Abb. 11 wird exemplarisch an der Zelllinie HDLM2 die verwendete *Gating*-Strategie gezeigt.

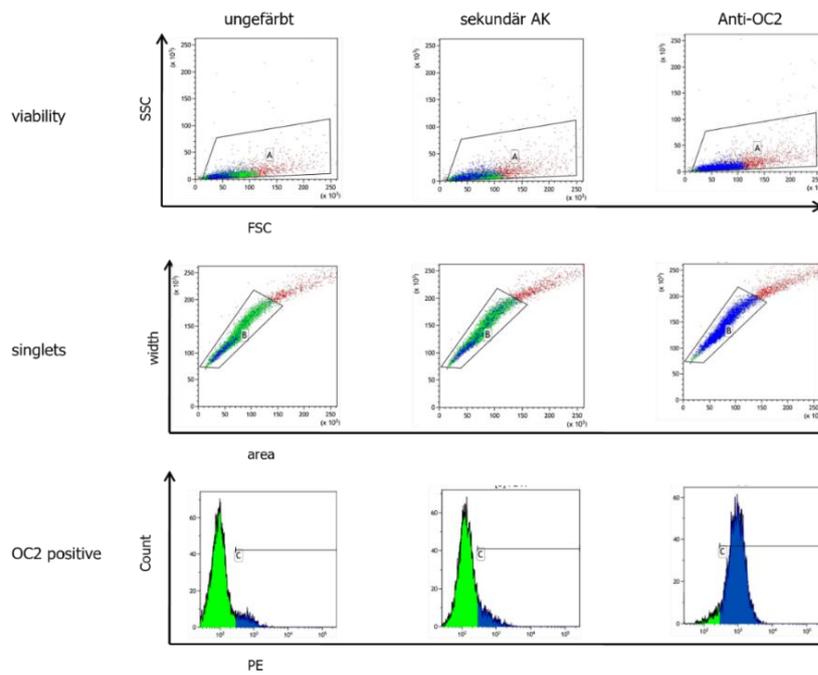


Abbildung 11. Intrazelluläre OC2-Färbung in HDLM2-Zellen. Repräsentative Abbildung der *Gating*-Strategie für die Zellen nach intrazellulärer OC2 Färbung. Es wurden Zellen ohne AK (ungefärbt), Zellen mit lediglich dem sekundären AK (sekundärer AK) und Zellen nach Inkubation mit OC2-AK (Anti-OC2) analysiert. Gate A entspricht allen lebendigen Zellen (*viability*), Gate B allen einzelnen Zellen (*singlets*) und Gate C allen OC2-positiven (OC2 positive). Die Abkürzungen stehen für *width* = Weite, *area* = Fläche, *Count* = Anzahl und PE = Phycoerythrin.

Zunächst wurde mittels SSC vs. FSC nach lebenden Zellen *gated*. Diese Population wurde anschließend von Dupletten bereinigt (FSC-area vs FSC-width). Durch Histogramme konnte somit das prozentuale Vorkommen von OC2 in den Zelllinien ermittelt werden. Die entsprechenden Histogramme sind in der Abb. 12 für alle fünf HL-Zelllinien dargestellt.

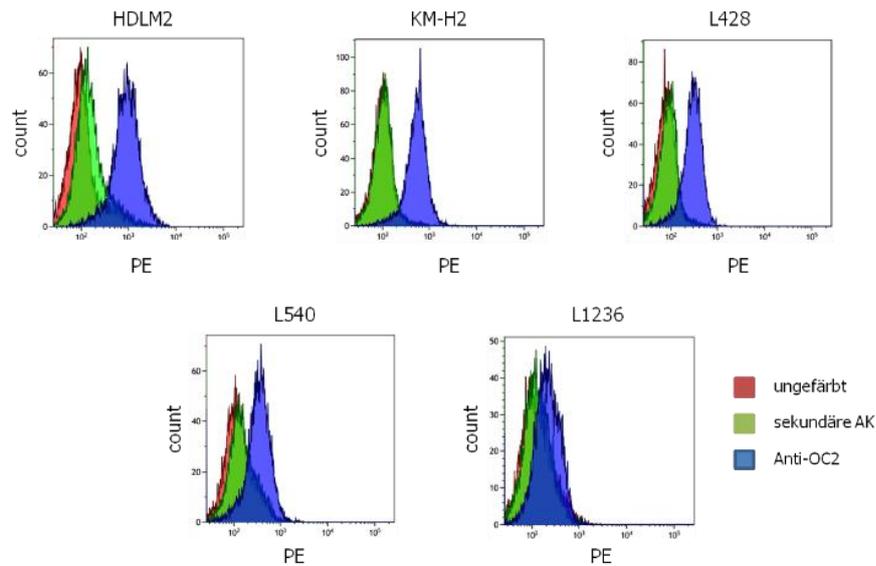


Abbildung 12. Histogramme verschiedener HL-Zelllinien nach intrazellulärer OC2-Färbung. Die Abbildung zeigt die Ergebnisse der FACS-Analyse nach intrazellulärer Färbung der fünf HL-Zelllinien. Für jede Zelllinie dargestellt ist der Vergleich zwischen den unbehandelten Zellen (ungefärbt) in Rot, den nur mit dem sekundären AK markierten Zellen in Grün und den mit sekundärem und Anti-OC2-Antikörper in Blau.

Es zeigte sich insgesamt bei allen Zelllinien ein hoher Anteil an OC2 positiven Zellen. Dieser ist in der Tab. 23 für die mit Anti-OC2 markierten Zellen zusammengefasst. Einen besonders hohen Prozentsatz zeigten die Zelllinien L428 und HDLM2 mit über 80 % OC2-positiven Zellen.

Tabelle 23. Prozentualer Anteil der OC2 positiv markierten Zellen nach intrazellulärer OC2 Färbung.

Zelllinie	PE (%)
HDLM2	88,87
KM-H2	71,96
L428	82,73
L540	35,55
L1236	13,29

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Proteinexpression stellte das Detektieren bestimmter Proteine per *Westernblot*-Analyse dar. Ein spezifischer Antikörper gegen ONECUT 2 war hierfür kommerziell erwerblich. Die spezifische Bindestelle des Antikörpers befand sich im Bereich der CUT-Domäne des OC2-Proteins und eignete sich dadurch zur Darstellung beider Transkriptvarianten. Unterscheiden ließen sich die beiden Varianten anhand der zu erwartenden Proteingröße. OC2 hat abhängig von dem verwendeten Startkodon eine Größe von 54,3 kDa oder 44,5kDa. Die neue Variante OC2s sollte eine errechnete Größe von 35,6 kDa haben. In Kap. 3.2.17 ist das methodische Vorgehen bereits beschrieben. Als Kontrolle wurde

ein Antikörper gegen die ubiquitär vorkommende Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die Abb.13 zeigt die *Blots* nach Inkubation mit passendem sekundärem Antikörper. Die fünf HL-Zelllinien wiesen unterschiedlich deutliche Banden zwischen 70 kDa und 40 kDa auf. Dies entspricht der Größe der bekannten OC2 Variante unter Verwendung des ORF wie es bei NCBI publiziert ist von 54,3 kDa. Wie bereits im FACS zeigten L428-Zellen und HDLM2-Zellen die deutlichsten Signale. Eine lediglich sehr schwache Bande ließ sich bei 35kDa nach Inkubation mit dem OC2-Antikörper nachweisen, was der berechneten Produktgröße der neuen Variante OC2s entspricht. Bei allen Proben stellte sich die GAPDH Kontrolle als kräftige Bande bei 35 kDa dar. Zusammenfassend konnte durch die Untersuchungen gezeigt werden, dass insbesondere in HL-Zellen eine hohe Expression als auch Protein-Konzentration der bekannten Variante OC2 vorlag. Die neue Transkriptvariante ergab ebenfalls eine hohe relative Expression auf RNA-Ebene, führte jedoch zu einer kaum detektierbaren Proteinbildung.

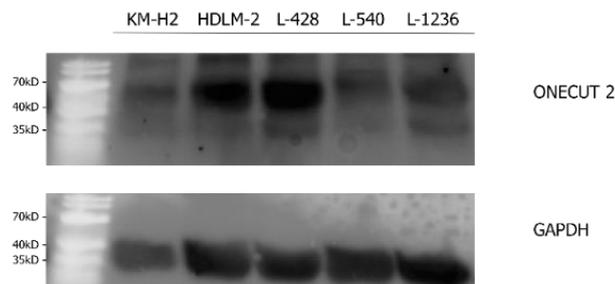


Abbildung 13. Westernblot-Analyse von OC2 und GAPDH in HL-Zelllinien. Gezeigt sind Ergebnisse der *Westernblot*-Analyse mit Antikörpern für OC2 und GAPDH. Als Größenreferenz wurden 7 μ L Marker aufgetragen. Die folgenden AK wurden verwendet: Anti-OC2-Rabbit/IgG (1,25 μ g/mL), und Anti-GAPDH-Mouse/IgG (1:1000).

4.3 Überexpression von OC2- und OC2s in HEK293-Zellen

Bei der Zelllinie HEK293 (*human embryonic kidney*) handelt es sich um eine einfach kultivierbare, adhärenzte Zelllinie mit hoher Proteinproduktion. Bei den untersuchten HL-Zelllinien handelt es sich um kleinere Zellen mit geringerer Proteinproduktion. Die Größe und Proteinmenge sollten für einen einfacheren Nachweis der Proteinprodukte nach Überexpression, sowohl in der Immunfluoreszenzfärbung als auch der WB-Analyse geeignet sein.

4.3.1 Transfektion des pRTS-1-Vektors

Die HEK293 Zellen wurden 24 h vor der Transfektion ausgesät, sodass sie adhärenz werden konnten. Anschließend erfolgte die Transfektion mittels Promofectin wie in Kap. 3.2.22 beschrieben. Zur Transfektion wurde der bereits beschriebene Überexpressionsvektor pRTS-1 verwendet, mit den Originalsequenzen als Insert (pRTS-1 x OC2 und pRTS-1 x OC2s). Als Kontrolle fungierte ein pRTS-1 Vektor ohne Insert (pRTS-1 x LV). Nach Transfektion wurden die Zellen für 24 h weiterkultiviert und expandiert. Für die folgenden Versuche wurden die transfizierten Zellen auf eine Anzahl von 300.000 Zellen/*well* eingestellt.

4.3.2 Analyse der Genexpression von OC2 und OC2s in transgenen HEK293-Zellen

Durch die qRT-PCR sollten die transfizierten Zellen auf die relative Expression von OC2 und OC2s nach Überexpression durch den pRTS-1-Vektor überprüft werden. Zur Aktivierung des Vektors wurde den Zellen Doxycyclin (1 µg/mL) zugegeben. Hierbei wurde für jedes Konstrukt ein *well* mit Doxycyclin aktiviert und eines ohne die Zugabe von Doxycyclin untersucht. 24 h nach Zugabe des Doxycyclin erfolgte die Ernte der Zellen, Isolation der RNA und Umschreiben dieser in cDNA, wie in Kap. 3.2.1 bis 3.2.3 dargestellt. Die qRT-PCR erfolgte mit Verwendung der spezifischen Primer zum Nachweis von OC2 oder OC2s. Als *housekeeping*-Gen wurde HPRT1 verwendet. In der Abb. 14 ist die relative Expression von OC2 abgebildet.

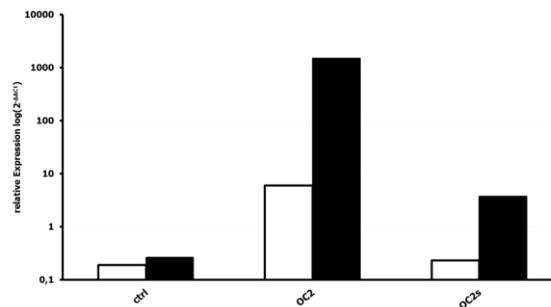


Abbildung 14. Relative Expression von OC2 in HEK293-Zellen nach Transfektion. In der Abbildung ist die relative Expression von OC2 in HEK293-Zellen dargestellt. Der weiße Balken zeigt die relative Expression ohne Doxycyclingabe. Der schwarze Balken zeigt die relative Expression mit Doxycyclin (1 µg/mL). Die Abkürzungen stehen für: Zellen mit einem Kontrollvektor (ctrl), Zellen mit pRTS-1xOC2 oder pRTS-1xOC2s transfiziert. Als *housekeeping*-Gen wurde HPRT-1 verwendet. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode. Der Median aus allen Proben wurde als 1 gesetzt. N=1.

Es ist zu sehen, dass die Zellen, welche mit dem pRTS-1 xOC2 Vektor transfiziert worden waren und bei welchen der Vektor mit Doxycyclin aktiviert wurde, eine im Vergleich zur negativ-Kontrolle deutlich erhöhte relative Expression von OC2 aufwiesen.

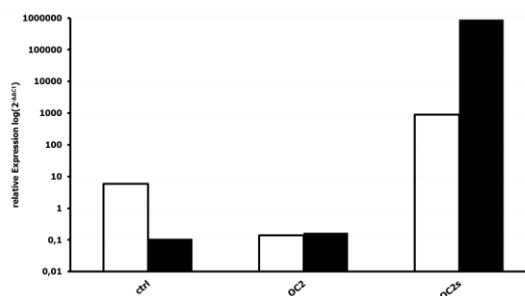


Abbildung 15. Relative Expression von OC2s in HEK293-Zellen nach Transfektion. In der Abbildung ist die relative Expression von OC2s in HEK293-Zellen dargestellt. Der schwarze Balken zeigt die relative Expression ohne Doxycyclingabe (OC2s D-). Der weiße Balken (OC2s D+) zeigt die relative Expression mit Doxycyclin (1µg/mL). Die Abkürzungen stehen für: Zellen mit einem Kontrollvektor (ctrl), Zellen mit pRTS-1xOC2 oder pRTS-1xOC2s transfiziert. Als *housekeeping*-Gen wurde HPRT1 verwendet. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode. Der Median aus allen Proben wurde als 1 gesetzt. N=1

In Abb. 15 dargestellt ist die relative Expression von OC2s. Wiederum zeigen die Zellen mit dem pRTS-1xOC2s-Vektor nach Doxycyclingabe die höchste relative Expression. Die

Kontrollen haben eine deutlich niedrigere Expression. Somit ist davon auszugehen, dass die Expression von OC2s durch die Vektoren erhöht werden konnte. Die anschließenden Versuche sollten überprüfen, ob sich dies auch auf die Proteinproduktion entsprechend auswirken würde.

4.3.3 Westernblot-Analyse der OC2 und OC2s überexprimierenden HEK293-Zellen

In den Untersuchungen der verschiedenen HL-Zelllinien auf Proteinebene ließ sich die bekannte Variante OC2 nachweisen, die neue Variante OC2s nur bedingt. Die niedrige Proteinproduktion der HL-Zellen stellte eine Limitation der Untersuchung dar. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass diese dazu führte, dass die neue Variante auf Grund von kleinen Proteinmengen nicht darstellbar war. In den HEK-Zellen sollte jedoch nach Transfektion mit dem Überexpressionsvektor pRTS-1 x OC2 oder pRTS-1 x OC2s ausreichend Protein produziert werden, sodass eine Detektion im WB möglich ist. Die in Kap. 4.2.2 beschriebene WB-Analyse wurde an transgenen HEK293-Zellen wiederholt. Der gleiche Antikörper zur Darstellung beider Varianten wurde verwendet. Methodisch wurde gemäß Kap. 3.2.17 vorgegangen. Als Kontrolle wurde EGFP zur Aktivitätsbestätigung des pRTS-1-Vektors und GAPDH als *housekeeping*-Kontrolle verwendet. Abb.16 zeigt die *Blots* nach Färbung mit den passenden Antikörpern.

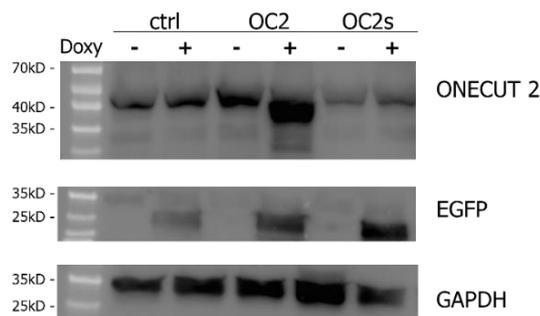


Abbildung 16. Westernblot-Analyse von OC2, EGFP und GAPDH der Zelllinie HEK293 nach Transfektion. Gezeigt sind Ergebnisse der *Westernblot*-Analyse mit Antikörpern für OC2, EGFP und GAPDH. Als Größenreferenz wurden 7 μ L Marker aufgetragen. Die folgenden AK wurden verwendet: Anti-OC2-Rabbit/IgG (1,25 μ g/mL), Anti-EGFP-Rabbit/IgG (1:500) und Anti-GAPDH-Mouse/IgG (1:1000). Die Zellen wurden nach Transfektion mit dem pRTS-1-Vektor mit (Doxy+) oder ohne Doxycyclinzugabe (-) analysiert.

Die beiden Kontrollbanden für EGFP und GAPDH wurden bei 25 kDa und 35 kDa wie zu erwarten sichtbar. Es zeigte sich bei den OC2 überexprimierenden Zellen eine deutliche Bande bei 44,5 kDa. Dies lässt sich mit der errechneten Proteingröße von OC2 unter Verwendung des ORFs, wie er in der cDNA-Bank entdeckt wurde und in dem pRTS-1 x OC2 Vektor enthalten ist, erklären. Bei den Zellen mit Leervektoren bzw. den transgenen Zellen ohne Doxycyclin zeigten sich jeweils schwächere Bande, ebenfalls im Bereich der errechneten Größe bei 44,5 kDa. Interessanterweise ließ sich auch in dieser Zelllinie nur sehr zart eine Bande bei 35,6 kDa für OC2s detektieren. Auch nach Überexpression der Variante per pRTS-1-Vektor kam es zu keiner stärkeren Proteinproduktion. Es zeigte sich somit erneut eine deutliche Proteinproduktion von OC2, jedoch kaum eine Proteinproduktion von OC2s.

4.3.4 Immunfluoreszenzfärbung der transgenen HEK293-Zellen

Zur Gewinnung zusätzlicher Informationen in Bezug auf die Funktion des OC2-Proteins führten wir an den transgenen Zellen eine Immunfluoreszenzfärbung durch. Hiermit sollte die Lokalisation der Proteine innerhalb der Zelle visualisiert werden. Die überexprimierenden Zellen wurden entsprechend Kap. 3.2.12 vorbereitet. Zur Färbung verwendeten wir einen OC2-spezifischen Antikörper, der im Bereich der CUT-Domäne binden sollte, sodass beide Varianten darstellbar sein sollten. Durch Zugabe eines zweiten Antikörpers, welcher mit einem Farbstoff gekoppelt war, der Licht in einem Wellenbereich von 576 nm emittierte, konnte die Lokalisation des Proteins intrazellulär sichtbar gemacht werden. In der Abb. 17 sind die Phasenkontrastaufnahmen und fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen abgebildet.

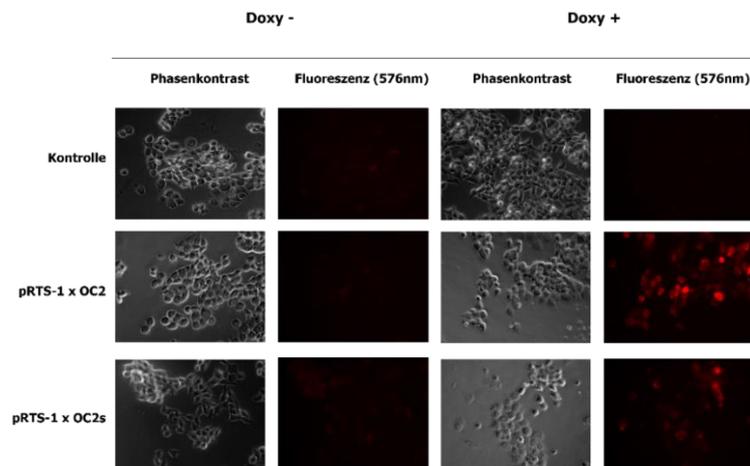


Abbildung 17. pRTS-1-transfizierte HEK293-Zellen nach Immunfluoreszenz-Färbung. In der Abbildung sind stabil transgene HEK293-Zellen nach Transfektion mit pRTS-1 x LV (Kontrolle), pRTS-1 x OC2 oder pRTS-1 x OC2s zu sehen. Die Aufnahmen erfolgten ohne (Doxy -) und mit (Doxy +) der Zugabe von Doxycyclin (1 µg/mL). Die Abbildungen zeigen die Aufnahme mittels Phasenkontrast- und Fluoreszenzmikroskopie. Für alle Aufnahmen wurde ein 20-faches Objektiv gewählt.

Die Zellen, welche mit dem Leervektor (Kontrolle) transfiziert worden waren, zeigten unabhängig von der Aktivierung des pRTS-1 Vektors ein schwaches Fluoreszenzsignal im Wellenlängenbereich des gewählten Antikörpers. Besonders stark sah man in den Zellen mit pRTS-1 x OC2-Vektor nach der Aktivierung (Doxy+) ein fluoreszierendes Signal. Im Vergleich zu allen anderen Proben, zeigte sich nach Aktivierung des pRTS-1 x OC2-Vektors die deutlichste Fluoreszenz. Für die pRTS-1 x OC2s-transfizierten Zellen zeigte sich zwischen den beiden Konditionen (Doxy -/Doxy +) nur ein dezenterer Unterschied. Vergleich man die Fluoreszenzbildung der beiden aktivierten Proben (pRTS-1 x OC2 Doxy + und pRTS-1 x OC2s Doxy +) war die Fluoreszenz nach OC2-Überexpression deutlich stärker. Zusammenfassend aus den Versuchen in den HEK-Zellen zeigte sich, dass wie in den vorausgegangenen Versuchen, die Überexpression der OC2-Sequenz des Vektors nachweislich zur Bildung eines Proteins führte. Die Bildung eines OC2s-Proteins war im WB und Immunfluoreszenzfärbungen nur

schwächer nachweisbar. In den Immunfluoreszenzaufnahmen war hierbei nicht zwischen den verschiedenen OC2-Varianten unterscheidbar.

4.4 Überexpression von OC2- und OC2s in A673-Zellen

Zur Analyse der Funktion von OC2 und der neuen Transkriptvariante wählten wir basierend auf den *Screening*-Untersuchungen die Zelllinien A673 und SW480 aus. Beide Zelllinien zeigten eine niedrige natürliche relative Expression von OC2 bzw. OC2s. Bei einer künstlich induzierten Überexpression erhofften wir uns somit einen deutlichen Effekt auf das Expressionsprofil der Zellen. Bei der Zelllinie A673 handelt es sich um eine adhärenz Ewing-Sarkom-Zelllinie, welche gut charakterisiert und einfach zu transfizieren ist. In den Versuchen verwendeten wir vier verschiedene Sequenzen zur Überexpression der Varianten. Die Idee war, zu untersuchen, inwiefern die verwendete Sequenz Einfluss auf die relative Expression und Funktion von OC2/OC2s hätten. Wie in Kapitel 1.3 beschrieben, ist bisher nicht geklärt, welcher ORF für die Translation von OC2, respektive OC2s, verwendet wird. Die Sequenzen OC2ref und OC2sref sind entsprechend der bei NCBI publizierten Sequenz, unter Verwendung des ATG an Position 344, generiert worden. Alternativ dazu verwendeten wir für OC2 Δ und OC2s Δ das ATG an Position 671, wie es in der cDNA-Bank sequenziert worden ist.

4.4.1 Transfektion der pRTS-1-Vektoren in A673-Zellen

Für die Transfektion der A673-Zellen wurde ebenfalls der episomal vorliegende Überexpressionsvektor pRTS-1 verwendet. Der genaue Vorgang wird in Kapitel 3.2.23 beschrieben. 48 h nach der Transfektion wurde das Kulturmedium auf eine Hygromycin B-Konzentration von 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ eingestellt und die Selektion wie oben beschrieben durchgeführt.

4.4.2 Analyse der Genexpression mittels qRT-PCR

Um die Genexpression der transfizierten Zellen zu analysieren, wurde eine qRT-PCR durchgeführt. Entsprechend den vorherigen Versuchen wurde 24 h vor RNA-Isolation Doxycyclin in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ zu den transfizierten Zellen gegeben und somit die Überexpression des Inserts induziert. Insgesamt wurden in diesem Experiment 10 Proben analysiert: Zellen mit Leervektor als Kontrolle (ctrl), Zellen mit der OC2-Referenzsequenz als Insert (pRTS-1xOC2ref), Zellen mit der OC2s-Sequenz mit ATG der Referenzsequenz als Insert (pRTS-1xOC2sref), Zellen mit der OC2-Sequenz entsprechend des verkürzten ORFs als Insert (pRTS-1xOC2 Δ), Zellen mit der OC2s-Sequenz entsprechend der klonierten Variante mit verkürztem ORF als Insert (pRTS-1xOC2s Δ). Alle Zellen wurden jeweils mit oder ohne Doxycyclin analysiert. In der qRT-PCR wurde das relative Expressionsniveau von OC2 und OC2s in allen Proben analysiert.

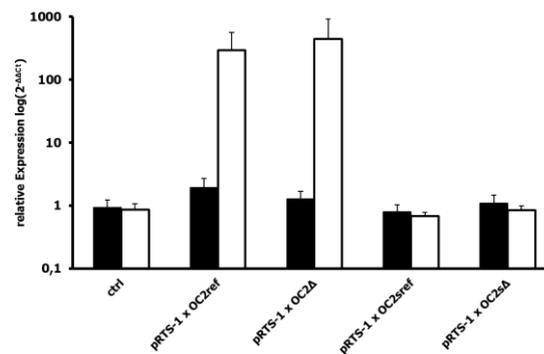


Abbildung 18. Relative Expression von OC2 in A673-Zellen nach Transfektion der synthetischen Sequenzen. In der Abbildung ist die relative Expression von OC2 in A673-Zellen dargestellt. Der schwarze Balken zeigt die relative Expression ohne Doxycyclingabe. Der weiße Balken zeigt die relative Expression mit Doxycyclin.

Die Abkürzungen stehen für: Zellen mit einem Kontrollvektor (ctrl), Zellen mit pRTS-1xOC2Δ, pRTS-1xOC2ref, pRTS-1xOC2sΔ und pRTS-1xOC2sref. Als *housekeeping*-Gen wurde HPRT-1 verwendet. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode. Der Median aus allen Proben wurde als 1 gesetzt. N=3.

Abb. 18 zeigt die relative Expression von OC2 in den Zellen, die mit den synthetischen Sequenzen transfiziert worden waren. Man erkennt eine Erhöhung der OC2-Expression in den beiden Proben, die mit einer der beiden OC2 überexprimierenden Sequenzen (pRTS-1OC2ref und pRTS-1xOC2Δ) transfiziert worden waren. Doxycyclin hatte, außer der gewünschten Vektoraktivierung, keinen Einfluss auf die Höhe der relativen Expression.

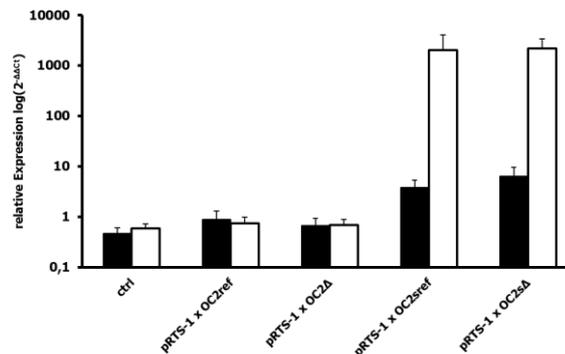


Abbildung 19. Relative Expression von OC2s in A673-Zellen nach Transfektion der synthetischen Sequenzen. In der Abbildung ist die relative Expression von OC2 in A673-Zellen dargestellt. Der schwarze Balken zeigt die relative Expression ohne Doxycyclingabe. Der weiße Balken zeigt die relative Expression mit Doxycyclin (1 μ g/mL). Die Abkürzungen stehen für: Zellen mit einem Kontrollvektor (ctrl), Zellen mit pRTS-1xOC2Δ, pRTS-1xOC2ref, pRTS-1xOC2sΔ und pRTS-1xOC2sref. Als *housekeeping*-Gen wurde HPRT1 verwendet. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode. Der Median aus allen Proben wurde als 1 gesetzt. N=3.

Abb. 19 stellt die relative Expression von OC2s in den verschiedenen transfizierten Zellen dar. Die Transfektion mit den synthetischen Inserts (pRTs1xOC2sΔ und pRTS-1xOC2sref) führte, zu einer erhöhten OC2s-Expression. Die Kontrolle durch die Zugabe von Doxycyclin zeigte

auch hier wieder den erhofften Effekt. Es wurde ausschließlich die Aktivierung induziert. Die überexprimierenden Zellen aus diesem Kapitel wurden für die weiterführenden Analysen der Genexpression verwendet.

4.4.3 NGS-basierte Analyse der Genexpressionsmuster in OC2- und OC2s überexprimierenden Zellen

Für die NGS-Analyse wurden die *fastq-files* der Proben über den Galaxy-Server analysiert. Zur Bestimmung der differentiellen Genexpression wurden die TPM-Werte berechnet. Abb. 20 bildet die *heatmap* der Gene ab, die einer Veränderung der Genexpression verglichen mit den Mittelwerten der Kontrollen aufweisen. Es wurde für die differentiellen Gene ein Schwellenwert des $fc > 10$ bzw. $< 0,01$ gewählt. Insgesamt sieht man an der *heatmap*, dass bestimmte Gensets in den OC2 überexprimierenden Zellen im Vergleich zu den Zellen ohne Überexpression einen doch deutlichen Unterschied in der Expression aufwiesen. Die Clusteranalyse zeigt hierbei, dass sich die OC2 bzw. OC2s überexprimierenden Zellen unabhängig von der Wahl des Start-ATG jeweils ähnlicher waren als die anderen Zellen.

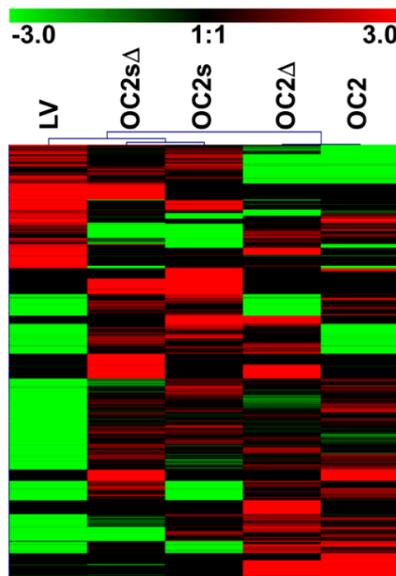


Abbildung 20. Differentielle Genexpression in A673-Zellen nach OC2- bzw. OC2s-Überexpression. Die *Clusteranalyse* (Pearson-Distanz, *complete linkage clustering*) zeigt die differentielle Expression von Genen nach Überexpression von OC2 (OC2 und OC2Δ) bzw. OC2s (OC2s und OC2sΔ). Die differentielle Expression wurde in Bezug auf den Wert der Kontrolle (LV) berechnet. Dargestellt werden Gene, deren fc mindestens 10/0,01 betrug und bei denen mindestens eine Probe mehr als 4 *reads* hatte.

Insgesamt wurden bei dieser Analyse 2278 Gene als differentiell exprimierte Gene (DEGs) identifiziert. Bei den regulierten Genen handelte es sich um miRNAs, endogene Retroviren und andere repetitive Elemente, aber auch um kodierende Gene, z. B. das Tumorentigen XAGE2 (X antigen 2), welches in OC2-transgenen Zellen durchschnittlich 17fach und in OC2s-transgenen Zellen durchschnittlich 3fach stärker exprimiert wurde als in den Kontrollzellen. Es zeigte sich

insgesamt, dass die Überexpression von OC2 (OC2 oder OC2Δ) einen stärkeren Einfluss auf die differentielle Expression zu haben scheint.

4.5 Überexpression von OC2 und OC2s in SW480 Zellen

Neben der im vorherigen Kapitel untersuchten Zelllinie, führten wir in der Zelllinie SW480 ebenfalls Überexpressionsversuche durch. Bei dieser Linie handelt es sich ebenfalls um eine adhärenz- und gut charakterisierte Zelllinie. Neben der im *Screening* aufgefallenen niedrigen Expression der beiden Varianten ist als interessant hervorzuheben, dass es sich bei der Zelllinie um eine aus einem Kolonkarzinom gewonnene Linie handelt. In der Literatur wird ein Effekt von OC2 auf Kolonkarzinome beschrieben (Ma et al. 2022; Jiang et al. 2021).

Dementsprechend erhofften wir durch Manipulation der Genexpression der beiden Varianten, einen deutlicheren Effekt als in den vorausgegangenen Versuchen.

4.5.1 Generierung stabiler OC2- und OC2s-überexpressierender SW480 Zellen

Für die Transfektion wurden die Zellen 24 h vorher ausgesät. Nachdem sie adhärenz geworden waren, erfolgte die Transfektion des Vektors mittels Promofectin. Die genaue Vorgehensweise ist in Kapitel 3.2.24 beschrieben. Um eine möglichst hohe Transfektionsrate zu erzielen, wurden die Zellen selektioniert. Ziel war es, wie entsprechend der Experimente mit der Zelllinie A673, eine stabil transgene Zelllinie zu erstellen.

4.5.2 Analyse des Genexpressionsmusters mittels qRT-PCR

Um die Expression der Zellen nach der Transfektion zu charakterisieren, wurde die relative Expression durch qRT-PCR analysiert. Hierfür wurden die stabil transfizierten Zellen mit Doxycyclin (1 µg/mL) aktiviert und 24 h nach der Zugabe zur RNA-Isolation geerntet.

Anschließend wurde aus der RNA cDNA transkribiert und diese für die qRT-PCR verwendet. Zusätzlich wurde wieder unter der Bedingung mit oder ohne Doxycyclinzugabe die Expression der Proben verglichen, um einen möglichen Doxycyclin-abhängigen Effekt auszuschließen. Die stabil transfizierten Zellen wurden auf zwei *wells* gesplittet und pro Vektor eines der *wells* durch die Zugabe von 1 µg/mL Doxycyclin aktiviert, während das andere ohne Doxycyclin blieb. Für das Experiment wurden somit 6 Proben analysiert: Zellen mit Leervektor als Kontrolle, jeweils mit oder ohne Doxycyclin, Zellen mit OC2 als Insert mit oder ohne Doxycyclin und Zellen mit der neuen Variante OC2s als Insert ebenfalls mit oder ohne Doxycyclin. In der Abb. 21 und Abb. 22 sind die Daten der qRT-PCR aus dem Experiment dargestellt.

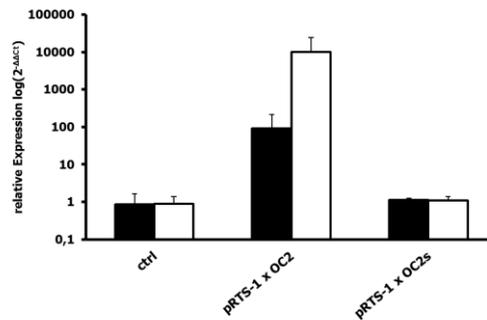


Abbildung 21. Relative Expression von OC2 in SW480-Zellen nach Transfektion. In der Abbildung ist die relative Expression von OC2 in SW480-Zellen dargestellt. Der schwarze Balken zeigt die relative Expression ohne Doxycyclingabe. Der weiße Balken zeigt die relative Expression mit Doxycyclin. Die Abkürzungen stehen für Zellen mit einem Kontrollvektor (ctrl), Zellen mit pRTS-1xOC2 und pRTS-1xOC2s. Als *housekeeping*-Gen wurde HPRT-1 verwendet. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode. Der Median aus allen Proben wurde als 1 gesetzt. N=3.

Abb. 21 stellt die relative Expression von OC2 dar. Zu sehen ist, dass die relative Expression von OC2 sowohl mit Doxycyclin als auch ohne Doxycyclin bei der Kontrolle (ctrl) ungefähr gleich blieb. Die höchste relative Expression zeigte sich bei der mit Doxycyclin aktivierten Probe, die mit dem OC2-Vektor transfiziert worden war. Die übrigen Proben wiesen ein niedrigeres Niveau der relativen Expression auf.

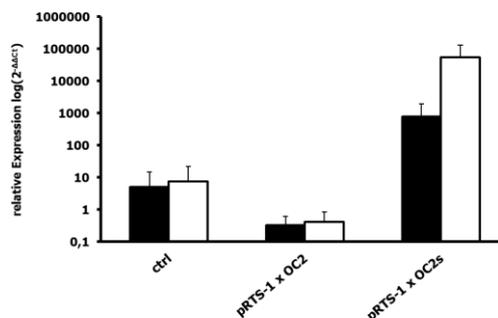


Abbildung 22. Relative Expression von OC2s in SW480-Zellen nach Transfektion. In der Abbildung ist die relative Expression von OC2s in SW480-Zellen dargestellt. Der schwarze Balken zeigt die relative Expression ohne Doxycyclingabe. Der weiße Balken zeigt die relative Expression mit Doxycyclin (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Die Abkürzungen stehen für Zellen mit einem Kontrollvektor (ctrl), Zellen mit pRTS-1xOC2 und pRTS-1xOC2s. Als *housekeeping*-Gen wurde HPRT1 verwendet. Die Analyse erfolgte mittels der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode. Der Median aus allen Proben wurde als 1 gesetzt. N=3.

Die Abb. 22 bildet die Ergebnisse des gleichen Versuchsansatzes mit OC2s spezifischen Primern ab. Wiederum zeigte sich hier durch die Zugabe von Doxycyclin kein Effekt auf die Genexpression in den Kontrollzellen. Die höchste OC2s Expression konnte in den OC2s überexprimierenden Zellen nach Doxycyclin-Aktivierung beobachtet werden.

4.5.3 Immunfluoreszenzfärbung zur intrazellulären Lokalisation von OC2

Die qRT-PCR eignet sich zum Nachweis der beiden Varianten auf Transkriptom-Ebene. Durch Immunfluoreszenzfärbung konnte zumindest für OC2 zusätzlich der Nachweis auf Proteinebene erfolgen sowie Informationen über die intrazelluläre Lokalisation gewonnen werden. Theoretisch handelt es sich bei OC2 um einen Transkriptionsfaktor, der überwiegend intranukleär lokalisiert sein sollte (Jacquemin et al. 1999). Dadurch, dass es sich bei SW480-Zellen um adhärenente Zellen handelt, eigneten sie sich besonders gut, um die Lokalisation von OC2 nach Überexpression mittels pRTS-1-Vektor zu untersuchen. Die Zellen wurden mit einem unkonjugierten OC2-spezifischen Antikörper von ThermoFischer markiert (siehe Kapitel 3.2.17). Verwendet wurden Zellen, die mit dem OC2-Überexpressionsvektor stabil transfiziert (pRTS-1xOC2) und als Kontrolle Zellen, welche mit einem Leervektor stabil transfiziert worden waren (pRTS-1xLV). Um induzierte mit nicht induzierten Zellen vergleichen zu können, wurden pro Vektor zwei Ansätze mitgeführt, je eine mit Doxycyclinzugabe und eine ohne. Die Zellen wurden 24 h nach der Doxycyclin-Zugabe (1 µg/mL) geerntet. Die Vorbereitung erfolgte entsprechend Kapitel 3.2.12. Um den Kern präzise darstellen zu können, wurden die Zellen zusätzlich mit Hoechst-Farbstoff eingefärbt. Es wurde entsprechend Kapitel 3.2.12 vorgegangen. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

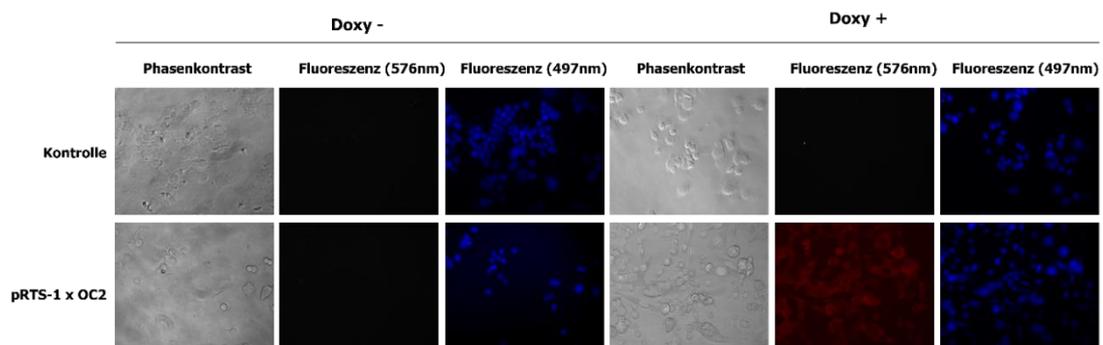


Abbildung 23. pRTS-1xLV transfizierte SW-480-Zellen nach immunhistochemischer Färbung. In der Abbildung sind stabil transgene SW-480-Zellen nach Transfektion mit pRTS-1xLV (Kontrolle) oder mit pRTS-1 x OC2 zu sehen. Die Aufnahmen erfolgten vor (Doxy -) und nach (Doxy +) der Zugabe von Doxycyclin. Die Abbildungen zeigen die Aufnahme mittels Phasenkontrastmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie für die OC2-Färbung und für die Hoechst-Färbung. Für alle Aufnahmen wurde ein 20-faches Objektiv gewählt.

In Abb. 23 wurden die Ergebnisse der Färbungen dokumentiert. Hierbei zeigte sich eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation des OC2 Proteins und weniger ein nukleäres Vorkommen. Die Kerne der SW480 Zellen stellten sich als kräftig gefärbt mit lediglich vereinzelt roten OC2 Farbsignalen dar. Diese Erkenntnisse deckten sich mit denen aus Kapitel 4.3.4. Hier hatte sich nach Immunfluoreszenzfärbung von transgenen HEK293-Zellen, ebenfalls ein vermehrtes OC2-Vorkommen im Zytoplasma und nur ein vereinzelt Vorkommen im Bereich des Zellkernes gezeigt. Besonders deutlich ist das in der Abb. 24 zu sehen. Bei dieser wurde mittels PowerPoint die beiden Fluoreszenzbilder der OC2-

Überexprimierenden Zellen übereinandergelegt. In den blauen Bereichen, welche dem Kern entsprechen, erkannte man nur vereinzelt rote Farbsignale.

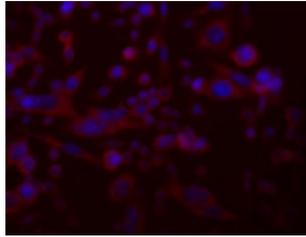


Abbildung 24. Immunfluoreszenzbild von transgenen SW-480-Zellen. Die Abbildung zeigt SW-480 Zellen nach Transfektion mit dem pRTS-1 x OC2 Vektor. Die Aufnahmen erfolgte nach Zugabe von Doxycyclin (1 μ g/mL). Die Abbildungen zeigen die Überlagerung der beiden Aufnahme mittels Fluoreszenzmikroskop für die OC2-Färbung (rot) und für die Hoechst-Färbung (blau). Für die Aufnahmen wurde ein 20-faches Objektiv verwendet.

4.5.4 *MicroArray*-basierte Analyse der Genexpressionsmuster in OC2 und OC2s überexprimierenden Zellen

Zur Charakterisierung der weiteren Funktion der beiden Transkriptvarianten wurden die transfizierten Zellen per *MicroArray*-Analyse auf ihre Genexpression untersucht. Hierbei wurden lediglich die mit Doxycyclin aktivierten Zellen verwendet. Als Kontrolle wurden Zellen, die mit dem Leervektor pRTS-1xLV stabil transfiziert waren, mitanalysiert. Die Zellen wurden nach der RNA-Isolation wie in Kap. 3.2.1 beschrieben für die Analyse aufgearbeitet. Die Expressionsveränderungen wurden im Vergleich zu den Mittelwerten der Leervektoren berechnet. Der *foldchange* für differentielle Gene wurde auf $fc > 3$ gesetzt. In Abb. 25 zeigt die *heatmap* die Gene mit entsprechendem *fc*. Insgesamt wurden 170 Gene hochreguliert und 415 Gene herunterreguliert.

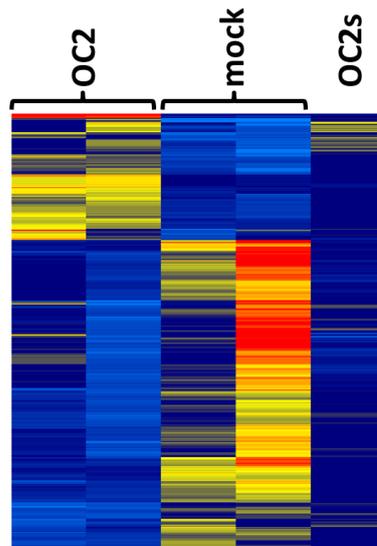


Abbildung 25. Differentielle Expression in SW-480 nach OC2- bzw. OC2s-Überexpression. Die abgebildete *heatmap* zeigt die differentielle Expression von 585 Genen nach Überexpression von OC2 (pRTS-1 X OC2) bzw. Überexpression von OC2s (pRTS-1 x OC2s). Die differentielle Expression wurde in Bezug auf den Mittelwert der Signal-Intensität der Kontrollen (mock) berechnet. Die Darstellung erfolgte logarithmisch. Die Grenze des fc wurden bei $fc > 3$ gewählt.

Auffällig ist, dass einige Gene in beiden OC2 überexprimierenden Proben hochreguliert waren. In den Kontrollen und den OC2s überexprimierenden Proben waren diese Gene jedoch nicht erhöht. Dasselbe Phänomen kann beobachtet werden bei einer kleinen Gruppe von Genen die nach OC2-Überexpression herunterreguliert scheinen, jedoch in den Kontrollen und den OC2s Proben ein ähnliches Expressionsniveau aufweisen

4.6 Untersuchungen zur Funktion von OC2 und OC2s in L428-Zellen

Im *Screening* konnte gezeigt werden, dass die HL-Zelllinien und auch HL-Patient:innen über eine hohe Expression von OC2 und OC2s verfügen. Da eine Aussage über eine potenzielle Funktion hieraus bisher noch nicht möglich ist, wurde die HL-Zelllinie L428 exemplarisch zur weiteren Funktionsanalyse ausgewählt.

4.6.1 Transfektion der spezifischen siRNAs

Der *knockdown* von OC2 wurde mittels siRNA durchgeführt. Eine Kombination zweier kommerziell erwerblicher siRNA in einer Konzentration von je 2 μg zeigte in Vorversuchen den stärksten Effekt. Die verwendeten siRNA waren spezifisch nur gegen die Referenzsequenz ONECUT2 gerichtet und nahmen idealerweise keinen Einfluss auf die Expression der alternativen Variante OC2s. Um diese herunterregulieren zu können, wurden siRNAs durch die Firma Sigma hergestellt. Hierbei zeigte eine der siRNAs nach mehreren Vorversuchen, den ausgeprägtesten Effekt bei einer verwendeten Konzentration von 300 nM siRNA. Für die Transfektion wurden die Zellen wie in Kap. 3.2.21 beschrieben vorbereitet. Die Transfektion erfolgte mit dem Amaxa-System. Die transfizierten Zellen wurden über 24 h kultiviert und

anschließend für die RNA-Isolation geerntet. Zur Überprüfung des knockdowns wurde anschließend eine qRT-PCR durchgeführt. In den Abb. 26 wird jeweils die relative Expression von OC2 und OC2s der Zellen nach knockdown gezeigt.

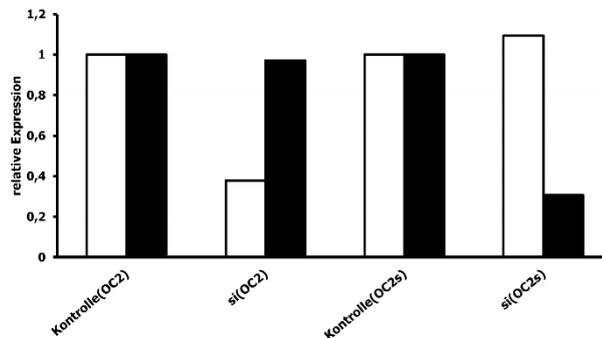


Abbildung 26. Relative Expression von OC2 (Weiß) und OC2s (Schwarz) in L-428-Zellen nach OC2-knockdown bzw. OC2s-knockdown. In der Abbildung ist die relative Expression von OC2 (weiße Balken) und OC2s (schwarze Balken) in L-428-Zellen dargestellt. Die Abkürzungen stehen für: Zellen transfiziert mit einer Kontroll-siRNA (Kontrolle (OC2) und Kontrolle (OC2s)), Zellen mit siRNA für einen OC2-knockdown (si (OC2)) oder OC2s-knockdown (si (OC2s)). Als *housekeeping*-Gen wurde HPRT1 verwendet. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode. Die Kontrollen wurden als 1 gesetzt. N=2

Hierbei wurde sowohl für den OC2-, als auch den OC2s-knockdown eine jeweils passende negativ siRNA als Kontrolle mit analysiert. Zu sehen ist in der Abbildung, dass die siRNAs für eine Herunterregulierung der relativen Expression der Zielstrukturen sorgen, ohne einen Einfluss auf die relative Expression der jeweilig anderen Variante zu haben. Die Kontrollen zeigten keine verringerte Expression von OC2 oder OC2s nach Transfektion.

4.6.2 NGS -Analyse der Genexpressionsmuster in den *knockdown*-Zellen

In Kapitel 3.2.19 ist die Vorbereitung der Proben beschrieben, sowie die bioinformatische Auswertung. Die *heatmap* in Abb.27 zeigt die TPM-Werte der Kontrollen und der transfizierten Zellen (siOC2 und siOC2s). Zum Filtern wurde erneut ein $fc > 10$ bzw. $< 0,1$ gegenüber dem Mittelwert der Kontrollen und eine minimale *read*-Anzahl wenigstens in einer Probe von 3 gewählt. Zusätzlich durften die Kontrollen maximal 3fach voneinander verschieden sein.

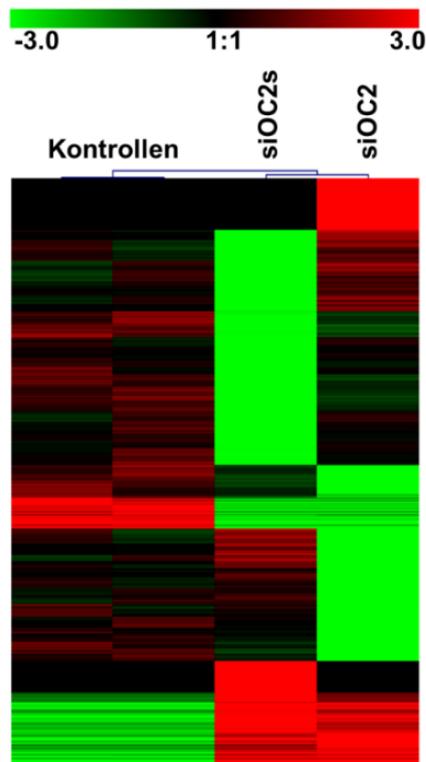


Abbildung 27. Differentielle Expression nach siRNA-Behandlung von L-428-Zellen. Die abgebildete *Clusteranalyse* (Pearson-Distanz, *complete linkage clustering*) zeigt die differentielle Expression von Genen nach OC2-*knockdown* (siOC2) bzw. OC2s-*knockdown* (siOC2s) und den entsprechenden Kontrollen in L-428 Zellen. Als Grenze des *fc* wurde 10/0,01 gewählt und es wurden nur Gene dargestellt, die mindestens in einer Probe 4 *reads* aufwiesen und bei denen die Kontrollen untereinander maximal um den Faktor 3 verschieden waren.

Es zeigte sich, dass insgesamt 931 Gene die Filterkriterien erfüllten. Die Expression der meisten Gene innerhalb der Kontrollen war relativ homogen, unterschied sich jedoch deutlich von den mit siRNA transfizierten Proben. Einige der Gene scheinen nach *knockdown* von OC2 oder OC2s im Vergleich zu den Kontrollen differentiell exprimiert zu sein. Bei Betrachtung der relativen Expression nach OC2s-*knockdown* bzw. OC2-*knockdown* fiel auf, dass viele Gene nur in einer Situation differentiell exprimiert waren. Interessant war, dass einige Gene sowohl nach OC2- als auch nach OC2s-*knockdown* im Vergleich zu den Kontrollen hoch- bzw. herunterreguliert werden. So war beispielsweise das immunologische relevante CD300c sowohl nach OC2- als auch nach OC2s-*knockdown* hochreguliert. Gegenläufig verhielt es sich z. B. für den Toll-*like* Rezeptor 8 (TLR8) oder die T-Zellrezeptorkomponente TRAJ59, welches in beiden *knockdown*-Situationen niedriger exprimiert war, als dies in den Kontrollen der Fall war.

4.6.3 Transfektion der pRTS-1-Vektoren in L-428-Zellen

Die Zellen wurden nach Einstellung auf eine Zellzahl von 1×10^6 transfiziert. Die Transfektion erfolgte mit jeweils 1 μg des Vektors entsprechend Kap. 3.2.21. Es wurden Vektoren mit Sequenzen von OC2 und OC2s transfiziert (pRTS-1 x OC2 und pRTS-1 x OC2s). Die

transfizierten Zellen wurden über einen Zeitraum von 8 Wochen selektioniert. Hierfür wurde das Kulturmedium auf eine Hygromycinkonzentration von 100 µg/mL eingestellt.

4.6.5 Analyse der Genexpression mittels qPCR

Zum Nachweis der spezifischen Überexpression wurden die transfizierten Zellen mit Doxycyclin (1 µg/mL) aktiviert und 24 h nach der Zugabe zur RNA-Isolation geerntet. Nach Umschreiben der RNA zu cDNA konnte durch spezifische Primer in der RT-qPCR die relative Expression der Transkriptionsvarianten ermittelt werden. Neben den durch Doxycyclin aktivierten Zellen wurden transfizierte Zellen ohne Doxycyclin-Aktivierung als zusätzliche Kontrolle mitgeführt. So sollte der Einfluss von Doxycyclin auf die Genexpression ausgeschlossen werden. Insgesamt wurden somit 6 verschiedene Transfektionsansätze analysiert: L-428 mit den Sequenzen pRTS-1 x OC2, pRTS-1 x OC2s und dem passenden Leervektor, jeweils mit Zugabe von Doxycyclin oder ohne Zugabe. Das Ergebnis der RT-qPCR für die relative Expression von OC2 ist in Abb. 28 dargestellt.

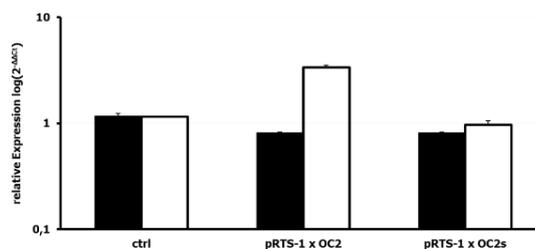


Abbildung 28. Relative Expression von OC2 in L-428-Zellen nach Transfektion. In der Abbildung ist die relative Expression von OC2 in L-428-Zellen dargestellt. Der schwarze Balken zeigt die relative Expression ohne Doxycyclingabe. Der weiße Balken zeigt die relative Expression mit Doxycyclin (1 µg/mL). Die Abkürzungen stehen für: Zellen mit einem Kontrollvektor (ctrl), Zellen mit pRTS-1xOC2 transfiziert, Zellen mit pRTS-1xOC2s transfiziert. Als *housekeeping*-Gen wurde HPRT1 verwendet. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der 2^{-ΔΔCt}-Methode. Der Median aus allen Proben wurde als 1 gesetzt. N=2.

Hierbei zeigte sich, dass die Transfektion und Aktivierung des Vektors zu einer gewünschten Erhöhung der relativen Expression in den Zellen führten, die mit dem pRTS-1 x OC2-Vektor transfiziert worden waren. Erfreulicherweise zeigte sich durch die qPCR zusätzlich, dass Doxycyclin keinen Einfluss auf die relative Expression zu haben schien.

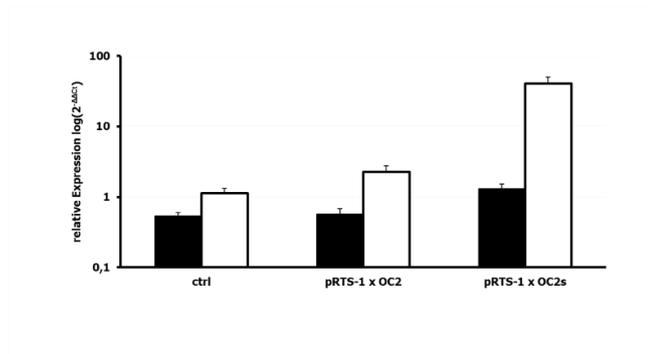


Abbildung 29. Relative Expression von OC2s in L-428-Zellen nach Transfektion. In der Abbildung ist die relative Expression von OC2s in L-428-Zellen dargestellt. Der schwarze Balken zeigt die relative Expression ohne Doxycyclingabe. Der weiße Balken zeigt die relative Expression mit Doxycyclin (1 µg/mL). Die Abkürzungen stehen für: Zellen mit einem Kontrollvektor (ctrl), Zellen mit pRTS-1xOC2 transfiziert, Zellen mit pRTS-1xOC2s transfiziert. Als *housekeeping*-Gen wurde HPRT1 verwendet. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode. Der Median aus allen Proben wurde als 1 gesetzt. N=2.

Auch in der Abb. 29, welche die relative Expression von OC2s darstellt, zeigte sich, dass der Vektor mit der Sequenz pRTS-1 x OC2s zu einer Überexpression der gewünschten Transkriptvariante führte. Wiederum ließ sich kein Einfluss durch die Doxycyclin-Zugabe auf die relative Expression feststellen.

4.6.6 Westernblot-Analyse zum Proteinnachweis der transgenen Zellen

Bereits in der qRT-PCR-Analyse zeigte sich, dass die Vektoren zu der gewünschten Überexpression der Sequenzen auf RNA-Ebene führten. Die Überexpressionszellen wurden entsprechend des Kap. 3.2.17 für den WB vorbereitet. Als Primärantikörper verwendeten wir erneut den AK aus Kap. 4.2.2. Als Kontrolle wurde ein Antikörper gegen EGFP verwendet, um die Aktivität des pRTS-1 Vektors zu überprüfen. GAPDH wurde wie in den zu früheren WB als Kontrolle mitgeführt. In der Abb. 30 sind die Blots mit Größenreferenz abgebildet.

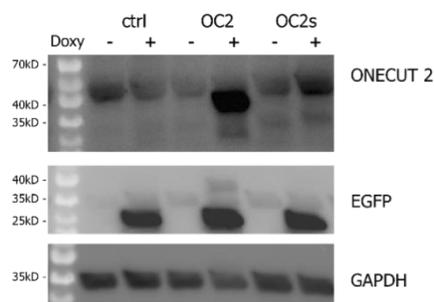


Abbildung 30. Westernblot-Analyse von OC2, EGFP und GAPDH in der HL-Zelllinie L-428 nach Transfektion. Gezeigt sind Ergebnisse der *Westernblot*-Analyse mit Antikörpern für OC2, EGFP und GAPDH. Als Größenreferenz wurden 7 µL Marker aufgetragen. Die folgenden AK wurden verwendet: Anti-OC2-Rabbit/IgG (1,25 µg/mL), Anti-EGFP-Rabbit/IgG (1:500) und Anti-GAPDH-Mouse/IgG (1:1000). Die Zellen wurden nach Transfektion mit dem pRTS-1 Vektor mit (D+) oder ohne Doxycyclinzugabe (D-) analysiert.

GAPDH war in allen Proben als deutliche Bande bei 35kDa detektierbar. Ebenfalls zeigten lediglich die mit Doxycyclin aktivierten Zellen eine Bande für das EGFP bei 25kDa. In der

Probe der pRTS-1 x OC2 D+ L428-Zellen zeigte sich nach Inkubation mit dem OC2-AK eine starke Bande bei ca. 40kDa. Dies wäre vereinbar mit der errechneten Größe von 44,5kDa nach Verwendung des ORF an Position 671. Da es sich bei dem Insert des Vektors pRTS-1 x OC2 um die Sequenz aus der cDNA-Bank handelte, mit korrelierendem ORF, entsprach dies der zu erwartenden Größe nach Überexpression. In der Probe der pRTS-1xOC2s D+ konnte wieder nur eine sehr schwache Bande bei der errechneten Größe von 35,6 kDa detektiert werden. Nach Überexpression wäre bei Translation der mRNA im Bereich dieser Größe eine stärkere Bande zu erwarten gewesen. Bereits in den anderen Zellen zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Eine Überexpression der OC2s-Sequenz führte zu einer Erhöhung der relativen RNA-Mengen, ein Proteinprodukt war jedoch nicht eindeutig detektierbar.

4.6.7 NGS-Analyse des Genexpressionsmusters

Basierend auf den Ergebnissen der qRT-PCR Analyse der transfizierten Zellen wurden diese für die NGS-Analyse ausgewählt. Die gewonnenen *Fastq*-Daten wurden erneut über den Galaxy-Server ausgewertet. In Abb.31 ist die *heatmap* mit den TPM-Daten der Proben dargestellt. Die Gene mit einer differentiellen Expression wurden durch Vergleich der Proben mit OC2 bzw. OC2s als Insert und Doxycyclin-Aktivierung zu den Mittelwerten aus allen Kontrollen (alle Proben ohne Doxycyclin und Leervektorkontrollen) berechnet. Abgebildet sind alle Gene, deren $fc > 10$ für die hochregulierten Gene betrug oder $fc < 0,01$ für die herunterregulierten Gene. In der *heatmap* sind insgesamt 373 differentiell exprimierte Gene zu erkennen. Insgesamt zeigt sich auch hier wieder ein unterschiedlicher Effekt der OC2- bzw. OC2s-Überexpression, es waren aber auch Gene dabei, die bei Überexpression von jeweils beiden Varianten reguliert wurden. Beispiele hierfür sind die mikro-RNA MIR7974 und die Aspartoacylase ASPA (beide hochreguliert durch OC2/OC2s) oder die uncharakterisierten Loci LOC124902699 und LOC112268038 (beide runterreguliert durch OC2/OC2s).

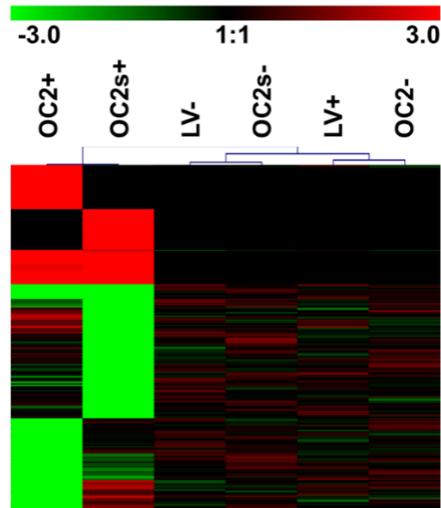


Abbildung 31. Differentielle Expression in L-428-Zellen nach OC2- bzw. OC2s-Überexpression. Die abgebildete *heatmap* zeigt die differentielle Expression von Genen nach Überexpression von OC2 bzw. OC2s. Proben, welche mit Doxycyclin behandelt wurden, wurden mit “+ “ bezeichnet, Proben ohne Behandlung mit “- “. Die differentielle Expression wurde in Bezug auf den TPM-Mittelwert aller Kontrollen (LV-, LV+ OC2- und OC2s-) berechnet. Die Grenze des *fc* wurden für hochregulierte Gene bei $fc > 10$ und herunterregulierte Gene bei einem $fc < 0,01$ gewählt.

Spannenderweise fanden sich auch einige humane endogene Retrovirus (HERV)-Sequenzen, die durch die Überexpression in ihrer Expression verändert werden. Bei HERV-Sequenzen handelt es sich um DNA-Abschnitte viralen Ursprungs, die in das menschliche Genom integriert wurden und dort inaktiv vorliegen. Bei verschiedenen Tumor- und Autoimmunerkrankungen wird eine Beteiligung endogener Retroviren an der Pathogenese diskutiert, so auch beim HL (Engel et al. 2021). Besonders fällt bei der Analyse der NGS-Daten die ERVFC1 Sequenz auf. Sie zeigte nach Überexpression von OC2 eine höhere Expression als die Kontrollen. Die OC2s-Überexpression führte zu keiner Veränderung der ERVFC1 Expression. Bei ERVFC1 handelt es sich um ein Mitglied der HERV-H/F-Familie, welches auf dem X-Chromosom lokalisiert ist (Wienand et al. 2019). Zwar konnte die Funktion dieses endogenen Retrovirus bisher noch nicht geklärt werden, jedoch wurde bereits in der Arbeit von Engel et al. 2021 eine besonders hohe relative Expression in L428-Zellen beschrieben.

4.6.8 Korrelation der ERVFC1- und OC2-Expression in L-428-Zellen

Zur Bestätigung der erhöhten Expression des endogenen Retrovirus ERVFC1 in OC2-exprimierenden HL-Zellen wurde die Expression per qRT-PCR überprüft. Verschiedene Präparate von L428-Zellen, in denen auch nach der oben erwähnten Arbeit von Engel et al. eine Expression von ERVFC1 zu erwarten war, wurden unter Verwendung spezifischer Primer für ERVFC1 mittels quantitativer qRT-PCR untersucht. Zusätzlich erfolgte die Bestimmung der Expression von OC2. Die Durchführung und anschließende Berechnung der qRT-PCR wurde, wie in Kapitel 3.2.5 beschrieben, durchgeführt wobei darauf verzichtet wurde, eine spezifische

Probe als Referenz zu verwenden ($2^{-\Delta Ct}$ -Methode). In der Abb. 32 ist die Korrelation der Expression von ERVFC1 und OC2 in den Zellen dargestellt.

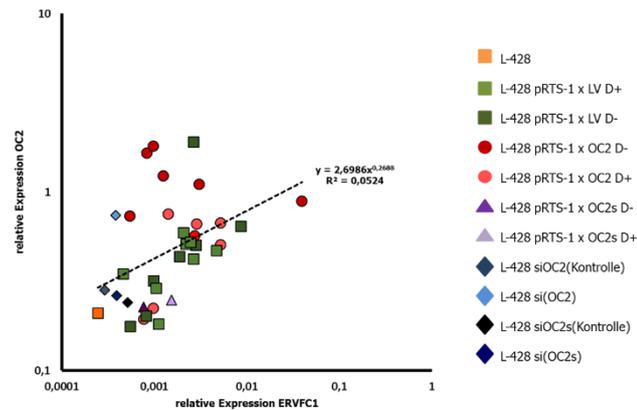


Abbildung 32. Vergleich der Expression von OC2 und ERVFC1 in verschiedenen Proben von L428-Zellen. Die Expression von OC2 ist an der y-Achse aufgetragen an der x-Achse die Werte der relativen Expression von ERVFC1. Verwendet wurden die Expressionswerte ermittelt durch die $2^{-\Delta Ct}$ -Methode. Bei den abgebildeten Proben handelte es sich um transgene L-428-Zellen und Kontrollen.

Eine positive Korrelation zwischen Expression von OC2 und ERVFC1 in den Proben ist zu erkennen. Diese Korrelation lässt sich gut mit der in den NGS-Daten beobachteten Erhöhung der ERVFC1-Expression nach OC2-überexpression in Einklang bringen.

5 DISKUSSION

5.1 OC2s- und OC2-Expression korrelieren miteinander in verschiedenen Zelltypen

Passend zu den bisher publizierten Arbeiten konnte in einigen Gewebearten, führend in der Leber (Jacquemin et al. 1999), und einigen Zelllinien wie z. B. MCF7 eine hohe relative Expression von OC2 nachgewiesen werden. Unter den Zelllinien stachen jedoch besonders die HL-Zelllinien mit einer hohen relativen Expression von OC2 heraus. OC2s zeigte sich ebenfalls in den HL-Zelllinien und der Leber hoch exprimiert. Bei Betrachtung der Korrelation der relativen Expression der beiden Varianten bestätigte sich der Eindruck, dass insbesondere in HL-Zelllinien und Leber beide Varianten simultan hoch exprimiert werden. Die hohe Expression in Lebergewebe erklärt sich unter anderem durch die Funktion des OC2 bei der Entwicklung und Hepatozytendifferenzierung (Jacquemin et al. 1999). Neu ist der Nachweis der hohen Werte in den HL-Zelllinien. Bisher wurde eine hohe OC2-Expression nur in soliden Tumoren wie dem Prostatakarzinom, dem Lungenkarzinom oder dem kolorektalen Karzinom beschrieben (Yu et al. 2020). Unseres Wissens liegen keine Arbeiten vor, die Ähnliches für das HL untersucht haben. Es scheint, dass ONECUT2 und auch ONECUT2s eine bisher noch nicht beschriebene Funktion im HL spielen könnten. Es kann insbesondere angenommen werden, dass die neue Variante, ähnlich wie für OC2 beschrieben, eine Rolle als Regulator der Genexpression spielen könnte. Auch die bioinformatische Analyse von *MicroArray*-Datensätzen zeigt eine höhere Signalintensität der OC2-Sonden in Proben, die von HL-Patienten oder von HL-Zelllinien stammten. Eine Aussage zu OC2s ist leider nicht möglich, da es sich um eine nicht publizierte Sequenz ohne spezifische Sonde auf den *MicroArrays* handelt.

5.2 Modulation der Transkriptionsfaktorfunktion durch verschiedene ORFs

OC2 als bereits gut beschriebener Transkriptionsfaktor (Jacquemin et al. 1999) spielt bei verschiedenen Tumoren, wie dem Prostatakarzinom (PC) (Rotinen et al. 2018) oder dem Nicht-Kleinzelligen-Lungenkarzinom (NSCL) (Zhao et al. 2022; Ma et al. 2019) eine entscheidende Rolle. Als sogenannter Masterregulator reguliert er im PC ein großes Netzwerk an verschiedenen Genen. Über die Bindung an die Promotorregion des jeweiligen Zielgens führt OC2 so zu einer Erhöhung der Transkription (Rotinen et al. 2018). Vor allem die Interaktion der beiden Funktionsdomänen, CUT- und Homeodomäne scheint wichtig für eine stabile Bindung an die DNA-Sequenz der Promotorsequenzen des Zielgens zu sein (Chatterjee et al. 2023). Vermutlich würde eine mögliche Funktion als TF im HL also ebenso eine Proteininteraktion voraussetzen. Tatsächlich konnten wir in WB und FACS-Analysen nach intrazellulärer OC2-Färbung zeigen, dass OC2 in den HL-Zelllinien auch als Protein deutlich nachweisbar war. OC2 liegt somit auf natürliche Art in HL-Zelllinien vor. Vergleich man die Größe der Proteinprodukte im WB, wurde deutlich, dass ein Unterschied zwischen dem künstlich überexprimierten OC2 und dem natürlich vorkommenden OC2 bestand. Das natürliche OC2 zeigte eine deutliche

Bande bei 54,3 kDa, während das künstlich überexprimierte etwas kleiner war. Das gleiche Ergebnis zeigte sich auch bei Überexpression in der HEK293-Zelllinie. Nach Überexpression durch pRTS-1 x OC2 konnte ein kleineres Proteinprodukt bei ca. 44,5 kDa detektiert werden, während bei den Kontrollen die Bande eher bei der 55kDa-Markierung für das natürliche OC2 zu detektieren war. Dieses Phänomen würde sich zwanglos durch die verschiedenen ORFs erklären lassen. In der bei NCBI publizierten Sequenz NM_004852.3 wird für das Startkodon die Position 344 (ORF1) angegeben. Aus dieser resultiert ein Proteinprodukt von 504 AS. Ein alternativer Translationsstart wäre jedoch das ATG-Triplet an Position 671 (ORF2). Dieses würde zu einem kürzeren Produkt aus 399AS führen. In der originalen OC2- und auch OC2s-Sequenz der Überexpressionsvektoren (pRTS-1 x OC2, pRTS-1 x OC2s) fungiert das ATG der Position 671 als Startkodon. Also wäre anzunehmen, dass aus der Überexpression der verkürzten Sequenz auch ein verkürztes Produkt im WB resultieren würde. In der Zelllinie A673 hatten wir mit Hilfe von synthetischen Sequenzen versucht, herauszufinden, ob die Wahl des ORFs für die Überexpression von OC2 oder OC2s einen Unterschied auf die Genexpression in den Zellen verursachen würde und somit anzunehmen wäre, dass es einen funktionalen Einfluss auf den TF haben könnte, ob der Bereich zwischen den Position 344 und 671 translatiert wird. Wie in Kap. 3.2.10 beschrieben, wurden in die Überexpressionsvektoren zum einen die Sequenzen entsprechend der bei NCBI publizierten Sequenz kloniert (pRTS-1 x OC2ref und pRTS-1 x OC2sref), zum anderen die verkürzten Sequenzen, wie wir sie aufgrund der aus der cDNA-Bibliothek isolierten OC2s-Sequenz verwendet hatten (pRTS-1 x OC2 Δ und pRTS-1 x OC2s Δ). Bei alleiniger Betrachtung der durch die Überexpression gezeigten relativen Expression von OC2 und OC2s zeigte sich, dass die mit der kürzeren Sequenz transfizierten, d.h. ORF2 (pRTS-1 x OC2 Δ und pRTS-1 x OC2s Δ) zu einer stärkeren Expression führten (Abb. 18 & Abb. 19). Bei der NGS-basierten Analyse der Genexpression transgener Zellen sahen wir auch einen stärkeren Einfluss auf die Genexpression nach Überexpression der OC2 Δ -Sequenzen. Es scheint somit die Effektivität des TF durch die Wahl des ORFs moduliert zu werden. Da besonders die Baseninteraktion essentiell für eine optimale DNA-Bindung bei TF ist, könnten die durch die Position des Startkodons ausgelöste Änderung der Sequenz bereits ausreichend sein, um diesen Unterschied auszulösen (Chatterjee et al. 2023). Aber auch die resultierende Proteinstruktur könnte einen Beitrag leisten. Berechnete man nämlich die Sekundärstruktur über das SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes (<https://swissmodel.expasy.org/>), zeigten sich einige Unterschiede je nach verwendetem Startkodon. In der Abb. 34 sind die vorhergesagten Sekundärstrukturen für das OC2-Protein in Abhängigkeit des verwendeten ORF1 (OC2ref) oder ORF2 (OC2) abgebildet.

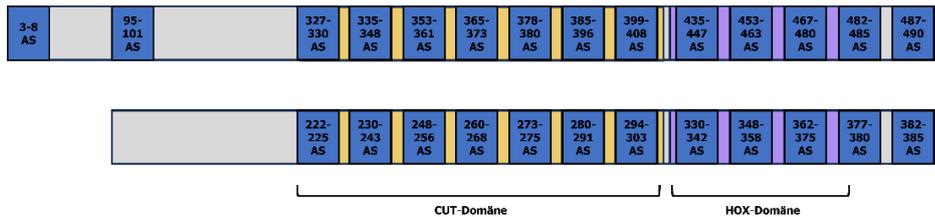


Abbildung 33. Schematische Darstellung der Sekundärstrukturen von OC2ref und OC2. In der Abbildung sind die durch SWISS-MODEL vorhergesagten Sekundärstrukturen von OC2ref und OC2 dargestellt. Die blauen Bereiche stellen Alpha-Helix-Strukturen (α) dar. Die Abbildung wurde mittels PowerPoint erstellt.

Ebenfalls in Abhängigkeit des ORFs ändert sich auch die vorhergesagte dreidimensionale Struktur des OC2-Proteins. Bei der Analyse durch das SWISS-MODEL konnte wir eine mögliche Faltung nach Verwendung des ORF1 oder des ORF2 vorhersagen lassen. Wie in der Abb. 34 gezeigt, resultiert eine sehr unterschiedliche räumliche Anordnung des Proteins.

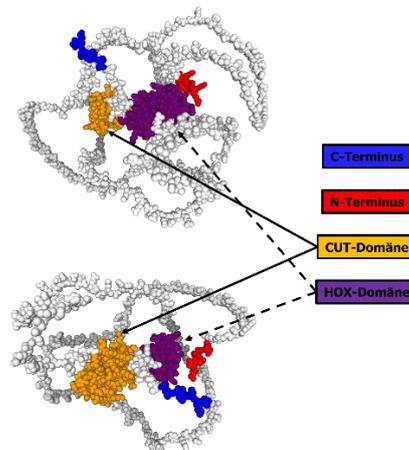


Abbildung 34. Mögliche dreidimensionale Strukturen des OC2-Proteins. Die Modelle wurden mittels SWISS-MODEL erstellt und mit PowerPoint bearbeitet.

Vor allem diese räumliche Anordnung hat entscheidenden Einfluss auf die Fähigkeit eines Transkriptionsfaktors an bestimmte DNA-Bereiche zu binden und mit anderen Faktoren zu interagieren (Chatterjee et al. 2023). Bereits leichte Änderungen können zu einem deutlichen Funktionsverlust führen.

Abschließend konnten wir mit unseren Methoden nicht final klären, ob die bisher publizierte Sequenz an der Stelle 344 (Jacquemin et al. 1999) oder doch diejenige an 671 zu der effektiven Form von OC2 führt.

5.3 Intrazelluläre Lokalisation der beiden Splicevarianten

Durch Immunfluoreszenzfärbung von transgenen OC2 oder OC2s überexprimierenden Zellen versuchten wir die Lokalisation innerhalb der Zellen nachzuweisen. Durch einen Vergleich zwischen Zellen mit Leervektor und nach Überexpression versuchten wir zusätzliche Informationen zu gewinnen, ob die Wahl des ORFs zu einer Veränderung der Protein-Lokalisation intrazellulär führen könnte. Zur Immunfluoreszenzfärbung eignen sich HEK293-

Zellen besonders, da sie eine adhärenzte Zelllinie mit großem Durchmesser und hoher Proteinsynthese sind. Zusätzlich färbten wir die Zelllinie SW480, die im Screening kaum eine Expression einer der beiden Splicevarianten zeigte. Zu erwarten wäre zumindest für die bekannte Variante OC2 eine Lokalisation überwiegend im Nukleus. Wie von Jacquemin et al. beschrieben, handelt es sich bei OC2 um einen Transkriptionsfaktor, der durch Bindung an DNA durch seine beiden Funktionsdomänen zu einer Steigerung der Transkription führen kann (Jacquemin et al. 1999). Bei der von uns durchgeführten Immunfluoreszenzfärbung in beiden Zelllinien zeigte sich, dass OC2 nach der Überexpression primär im Zytoplasma lokalisiert zu sein scheint. Besonders deutlich ist dies in der Abb. 24 zu erkennen. Für dieses Bild wurden die jeweiligen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen OC2-überexprimierender SW480-Zellen nach OC2-Färbung und Hoechst-Färbung übereinandergelegt. Bei den rot fluoreszierenden Strukturen handelt es sich um OC2, blau fluoresziert der Zellkern.

Es scheint in der Abb. 24, als wäre der Hauptteil der OC2 Proteine im Zytoplasma lokalisiert, mit einer Anreicherung im Bereich der Kernmembran und Zellmembran. Lediglich ein kleiner Teil scheint im Nukleus lokalisiert zu sein. Ebenso zeigt sich auch in den HEK293-Zellen eine eher zytoplasmatische Lokalisation für das OC2-Protein, sowohl nach Überexpression als auch bei den Zellen, die als Kontrolle dienen (Abb. 14). Bei online-Recherchen verschiedener Datenbanken konnten wir übereinstimmende Ergebnisse für die Lokalisation innerhalb der Zellen finden. In der „UniProt“ Datenbank (<https://www.uniprot.org/> zuletzt aufgerufen 12.10.2023), wird für das Protein ONECUT 2 eine Lokalisation sowohl im Zellkern als auch zytoplasmatisch (an das Aktinskelett angelagert) beschrieben. Die gleichen Informationen finden sich bei der „The Human Protein Atlas“ Datenbank (<https://www.proteinatlas.org/> zuletzt aufgerufen 12.10.2023). Dieses Projekt versucht durch eine Kombination mehrere Methoden wie Antikörper-Färbungen und Massenspektroskopie eine Landkarte verschiedenster Proteine in Geweben, Zelllinien und auf Subzellulärer Ebene zu erstellen (Thul et al. 2017). Es ist also anzunehmen, dass die von uns gezeigte Lokalisation des OC2-Proteins im Zytoplasma tatsächlich der Hauptort neben dem Kern darstellt. Man könnte auch spekulieren, dass im Zytoplasma die inaktive Form vorliegt und erst eine zusätzliche Komponente wie z. B. Phosphorylierungsvorgänge notwendig sind, um OC2 zu aktivieren und gegebenenfalls in den Zellkern zu transportieren. Zusammengefasst, konnte gezeigt werden, dass OC2 hauptsächlich zytoplasmatisch und nur bedingt im Zellkern lokalisiert ist. Vor allem nach Überexpression zeigt sich dies deutlicher. Ob es sich möglicherweise um ein inaktives Formen handelt, die erst durch Modifikation in die Aktive Form überführt wird oder doch die Wahl des Startcodons eine

Rolle spielt, wie bei der Größe des Proteinprodukts, konnten wir bisher noch nicht abschließend klären.

5.4 Handelt es sich bei OC2s um eine *long-non-coding RNA* mit HL-spezifischem Effekt?

Über die neue Variante OC2s sind außer einer bei NCBI als vorhergesagt aufgenommenen ähnlichen Sequenz (XM_054319377.1) keine Daten publiziert. Das Vorkommen einer OC2s-spezifischen RNA konnten wir durch qRT-PCR-Untersuchungen in verschiedenen Geweben und Tumorproben nachweisen. Bei Untersuchung der Sequenz zeigte sich ein potenzieller ORF (entsprechend dem an Position 671 der Referenzsequenz beginnenden). Um Herauszufinden, ob die mRNA-Sequenz in ein Protein translatiert wird, führten wir WB-Analysen in der HL-Zelllinie L428 und HEK293-Zellen durch. Wie in den entsprechenden Kapiteln beschrieben, konnten wir in beiden Zelllinien die bekannte OC2-Variante nachweisen. Der Nachweis eines OC2s-Proteins gelang jedoch auch nach Überexpression per pRTS-1 x OC2s-Vektor nur fraglich in den Zelllinien. Es zeigte sich jeweils nur eine sehr schwache Bande bei der errechneten Größe von 35,6 kDa, welche auch nach Überexpression der OC2s-Variante nicht stärker wurde. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der transgenen OC2s-überexprimierenden HEK293-Zellen, konnte nur ein schwacher Anstieg des Fluoreszenzsignals nach OC2s-Überexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen detektiert werden.

Experimentell konnten wir somit nicht sicher nachweisen, dass OC2s für ein Protein codiert. Wie in verschiedenen Arbeiten über die letzten Jahre gezeigt wurde, scheint eine Proteincodierung jedoch auch nicht unbedingt notwendig zu sein, damit eine RNA biologische Funktionen haben kann. Immer mehr nicht-codierende-RNAs (ncRNA) mit Einfluss auf Zellsignalwege und Genexpression wurden für verschiedensten Erkrankungen beschrieben (Statello et al. 2021). So nahm auch für Lymphome und speziell das HL die Bedeutung der ncRNAs in Form von miRNAs und lncRNAs zu (Cordeiro et al. 2017; Drillis et al. 2021; Li et al. 2020b). Denkbar wäre es, dass es sich auch bei der von uns entdeckten Variante um eine solche nicht-codierende RNA handelt. Auf Grund der Länge der OC2s-Sequenz von mehr als 200bp, würde es sich im speziellen um eine sogenannte *long-non-coding RNA* handeln. Als solche könnte OC2s als RNA in die Translation, post-translationale-Modifikation, Expression und verschiedene Signalwege der Zielgene regulativ eingreifen. Durch die NGS-Untersuchungen von OC2s-*knockdown*-Zellen konnte gezeigt werden, dass es zu einer differentiellen Expression verschiedener Gene kam. Überwiegend handelte es sich um miR-Sequenzen, die nach *knockdown* herauf- oder herunterreguliert wurden. Ein ähnliches Bild zeigte sich auch bei Überexpression von OC2s. In den beiden per NGS untersuchten Zelllinien L428 und A673 fanden sich dominierend miR-Sequenzen in ihrer Expression verändert. Auch bei Verwendung der *MicroArray*-Technik als alternative Methode zur Untersuchung der Genexpression zeigte sich bei der Analyse von OC2s-überexprimierenden SW480-Zellen nur

eine kleine Anzahl an Genen, hauptsächlich miR-Sequenzen, die differentiell exprimiert wurden. Da es sich bei SW480 und A673 um Zelllinien handelt, die unter natürlichen Bedingungen kaum OC2s exprimieren, war theoretisch ein deutlicherer Effekt auf die Genexpression zu erwarten gewesen. Im Endeffekt war dies bei unseren Daten nicht der Fall und die stärksten Änderungen der differentiellen Expression zeigten sich bei OC2s-Überexpression in L428-Zellen. Entsprechend könnte es sein, dass die Verwendung der alternativen Spliceform vor allem im Hodgkin-Lymphom eine spezifische Funktion erfüllt. Es sind bereits einige ncRNAs beschrieben worden, die speziell im HL eine Rolle spielen könnten. Diese ncRNAs regulierten unter anderem intrazelluläre Signalwege und führten so zu einer Beeinflussung der Apoptose, Proliferation oder Immunmodulation (Cordeiro et al. 2017). Ob es sich bei OC2s um eine ncRNA handelt, ist auf Grundlage der Daten jedoch nicht abschließend zu beweisen.

5.5 OC2 als Regulator im Hodgkin-Lymphom

WB und qRT-PCR konnten zeigen, dass OC2 in verschiedenen Zelllinien und Geweben sowohl auf Proteinebene als auch RNA-Ebene nachweisbar war. Interessanterweise zeigte sich insbesondere bei den HL-Zellen, wie oben erwähnt, eine besonders hohe Expression von OC2 und OC2s. Die Vermutung, dass OC2 beim HL eine besondere Rolle zukommt, lag nahe. Dies ließ sich durch Untersuchungen der Genexpressionsmuster noch einmal bestärken. Nach Überexpression der beiden Varianten in SW480 und A673-Zellen, zeigte sich bei der Analyse der differentiell exprimierten Gene ein schwächerer Effekt als bei der HL-Zelllinie L428. Es konnten einige miR-Sequenzen und HERV-Sequenzen identifiziert werden, die nach Überexpression von OC2 in den A673 Zellen differentiell exprimiert waren. Ebenso fiel das Tumorentigen XAGE 2 (*X-Antigen family member 2*) auf, welches unter anderem eine Rolle bei der Pathogenese des Ewing-Sarkomes spielen könnte (Zendman et al. 2002). Insgesamt waren die Effekte auf das Genexpressionsmuster jedoch schwächer ausgeprägt als bei den untersuchten L428 Zellen. Bereits bei den Untersuchungen der RNA-Produktion und Proteinproduktion fiel diese Zelllinie, neben den anderen HL-Zelllinien, besonders durch ein hohes OC2/OC2s Vorkommen auf. Jedoch konnte noch keine Aussage über die vermutete spezielle Funktion getroffen werden. Dies erfolgte durch die Untersuchungen der differentiellen Genexpression von HL-Zellen nach OC2-*knockdown* und OC2-Überexpression. Es sollte herausgefunden werden, ob OC2 im HL eine ähnliche Funktion als Regulator auf verschiedene Gene ausübt, wie es im PC (Rotinen et al. 2018) und NSCLC (Zhao et al. 2013) beschrieben ist. Nimmt man an, dass OC2 auch im HL als Transkriptionsfaktor fungiert, sollte der *knockdown* zu einer verminderten Expression oder Erhöhung der direkt durch OC2 regulierten Gene führen. Bei einer Überexpression sollten es zu einem Anstieg oder Verminderung der Genexpression kommen. Tatsächlich konnten in den NGS-Analysen der transfizierten Zellen einige Gene identifiziert werden, die durch eine Veränderung der OC2 Expression differentiell exprimiert

wurden. Ein Beispiel für ein nach OC2-*knockdown* herunterreguliertes Gen ist TLR8 (Toll-like Rezeptor 8). In anderen Tumorentitäten konnte für TLR8 eine Wirkung auf die Proliferation, Chemoresistenzbildung und Immunmodulation im Sinne einer tumorinduzierten Immunsuppression nachgewiesen werden (Grimmig et al. 2015; Ye et al. 2014). Ein Zusammenspiel der beiden Gene könnte somit unter anderem eine Rolle für die Modulation der Immunantwort im HL spielen. Gegenläufig verhielt es sich mit dem Oberflächenmarker CD300c. Dieses zeigte nach OC2 *knockdown* eine erhöhte Genexpression in den transgenen HL-Zellen. Das CD300c Molekül wird von verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert unter anderem auch von B-Lymphozyten (Jackson et al. 1992). CD300c scheint eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Immunsystems im Sinne einer Aktivierung der Cytokin- und Chemokineproduktion in Mastzellen und Natürlichen-Killerzellen zu spielen (Takashi et al. 2013). Die genaue Funktion des Moleküls für T-Zell oder B-Zell-Funktion ist aktuell noch nicht abschließend geklärt, jedoch wird auch hier eine Aktivierung der Immunzellen nach Rezeptor-Ligand-Bindung angenommen (Cui et al. 2018). Inwiefern eine mögliche Interaktion von CD300c und OC2 beim HL das Tumormilieu und die Immunreaktion beeinflussen, könnte ein spannendes Thema für weitere Untersuchungen sein.

Stärkeren Einfluss als der *knockdown* auf die differentielle Genexpression hatte allerdings die OC2-spezifische Überexpression in der HL-Zelllinie L428. Bei einem Großteil der Gene handelt es sich um sogenannte miRNAs. Das sind kleine nicht codierende RNA-Sequenzen zwischen 20-40 Nukleotiden, die unter anderem an der posttranskriptionalen Regulation von zellulären Signalwegen beteiligt sind. Für zahlreiche Tumorarten ist eine Interaktion von miRNA mit TF beschrieben, die die Funktionalität des TF erlaubt oder steigert. Für den bekannten TF OC2 wurden bereits in anderen Tumorentitäten miRNA-OC2-Interaktionen mit tumorförderndem Effekt beschrieben (Hu et al. 2019; Jiang et al. 2023; Ma et al. 2022). Es wäre denkbar, dass eine miRNA/OC2-Achse auch im HL einen proliferativen Effekt haben könnte. Ein Beispiel für eine potenzielle miRNA, die in den NGS-Daten aufgefallen war, ist die miR-7974. Nach Überexpression von OC2 zeigte sich eine deutlich erhöhte relative Expression als in den Kontrollen. Denkbar wäre, dass OC2 in seiner Funktion von einer miRNA-Interaktion abhängig ist und somit eine erhöhte Expression mit einem Anstieg der miRNA-Expression verbunden ist. Für die auffällige miR-7974 wurde bereits onkogenes Potenzial beschrieben. Laut Sexton et al. führt die Interaktion der miR-7974 mit XPO1 (Exportin 1) im Magenkarzinom zu einer Zunahme der Proliferation (Sexton et al. 2021). Dementsprechend könnte auch eine miRNA-OC2-Achse die Proliferation oder Metastasierung im HL fördern. Neben den miR fiel bei Analyse der NGS-Daten auf, dass unter den differentiiell exprimierten Genen nach OC2-Überexpression oder *knockdown* auch einige Elemente waren, die typisch für die Funktionalität von Immunzellen sind, weil sie zur Ausbildung derer Oberflächeneigenschaften relevant sind. Beispiele sind das oben diskutierte CD300c-

Oberflächenmolekül oder Gene, die relevant für die Ausbildung von T-Zell-Rezeptoren sind wie TRAJ59 (*T-cel- receptor-alpha-joining 14*) oder der ebenfalls oben erwähnte TLR8. Zu denken wäre an eine Modulation der Immunantwort durch ONECUT2. Typisch für das HL ist ein ausgedehntes Stroma, welches zum Großteil aus Immunzellen und inflammatorischen Komponenten besteht (Brune et al. 2021; Mauz-Körholz et al. 2015). Eine Rolle des OC2 als regulierende Einheit auf das Stroma und dessen immunologische Funktion könnte möglich sein. Es wäre denkbar, dass die Expression von OC2 zu einer Veränderung der T-Zell Funktionalität des Stromas des HL führen könnte, möglicherweise über eine Interaktion zwischen den HL-Tumorzellen und dem Stroma. Eine kürzlich publizierte Arbeit von Zhao et. all, zeigte bereits einen ähnlichen Effekt der OC2-Expression auf die Funktionalität, von in diesem Fall CD8⁺ T-Zellen. Bei Untersuchungen des Tumorumgebungsgewebes beim NSCLC korrelierte die Anzahl von erschöpften CD8⁺-T-Zellen im Tumorumgebungsgewebe positiv mit der Höhe der OC2-Expression (Zhao et al. 2022). Außerdem ließ sich diese T-Zell-Dysfunktionalität bei den Patienten auch durch OC2-Expressionserhöhung im peripheren Blut induzieren. Eigentlich normale CD8⁺ T-Zellen bildeten sich zu den gleichen dysfunktionalen und erschöpften T-Zellen aus, wie sie direkt in der Tumorumgebung lokalisiert sind (Zhao et al. 2013). Es kann beim Lungenkarzinom also bereits ein direkter immunologischer Einfluss durch von OC2 regulierten Gene beobachtet werden. Solche dysregulierten T-Zellen werden auch im Tumordinfiltrat des HL beschrieben. Was genau der Auslöser für die Ausbildung dieser beim HL ist, ist bisher nicht bekannt (Nagpal et al. 2021; Mathas et al. 2009). Denkbar wäre ein Netzwerk verschiedener Gene mit Einfluss auf die T-Zell-Funktionalität, reguliert durch bsw. eine OC2 bedingte Veränderung der Tumorzellen und deren immunphänotypischen Eigenschaften. Zusammengefasst ist eine Funktion von OC2 auf die Immunmodulation und die Proliferation des HL denkbar. Sie könnte vergleichbar mit der in den bereits beschriebenen soliden Tumoren aussehen. Um dies letztendlich beweisen zu können sind weitere Untersuchungen sowohl in Zellmodellen als auch an HL-Biopsien notwendig.

5.6 Mögliche Rolle von OC2 und ERVFC1 bei der Pathogenese des Hodgkin-Lymphom

Eine weitere Möglichkeit der Immunmodulation und Pathogenese, die für das HL diskutiert wird, ist der Einfluss von endogenen Retroviren (Engel et al. 2021; Schneider et al. 2019). Bei diesen handelt es sich um Sequenzen, die durch Infektion von Keimbahnzellen mit Viren in das menschliche Genom integriert worden sind. Verschiedene Arbeiten beschreiben das onkogene Potential dieser DNA-Elemente, unter anderem durch Immunmodulation, Zellfusion oder Beeinflussung der Genregulation (Bannert et al. 2018; Kassiotis 2014). Im Besonderen für hämatopoetische Tumorentitäten scheinen HERV-Sequenzen eine bisher unterschätzte Funktion zu haben und ihre Signifikanz für die Tumorentstehung und -progression wird mehr und mehr diskutiert, so auch für das HL (Barth et al. 2019; Engel et al. 2021). Spannenderweise fiel uns in

den NGS-Daten der überexprimierenden OC2-Zellen der HL-Zelllinien L428 ein Mitglied der HERV-H/F-Familie, ERVFC1, besonders ins Auge. Es zeigte sich eine im Vergleich zu den Kontrollen hohe Expression nach OC2-Überexpression. Bereits von Engel et al. wurde eine hohe relative Expression in der HL-Zelllinie L428 für diesen HERV beschrieben (Engel et al. 2021). Über die Funktion und mögliche Interaktion des HERVs mit TF wie OC2 kann in der Literatur aktuell jedoch nichts gefunden werden. Bei den von uns weiter durchgeführten Untersuchungen konnten wir eine positive Korrelation der relativen Expressionen von OC2 und ERVFC1 per qRT-PCR nachweisen (siehe Abb. 32). Es zeigt sich also, dass bei einer hohen OC2-Expression in L428 simultan eine hohe ERVFC1-Expression vorliegt und umgekehrt. Man könnte vermuten, dass die beiden Faktoren sich gegenseitig in ihrer Expression beeinflussen. Jedoch spricht dagegen, dass ein OC2-*knockdown* nicht automatisch zu einer Verminderung der ERVFC1-Expression führte, wie in den NGS-Daten der L428-Zellen nach *knockdown* zu sehen ist. Es ist eher zu vermuten, dass die OC2-Expression als auch ERVFC1-Expression durch dasselbe Gen reguliert werden. Hierbei scheint es sich um ein hoch spezifisches Netzwerk zu handeln, da in keiner der anderen untersuchten Zelllinien (A673 und SW480) eine ähnliche Korrelation nachweisbar war. Die Schlussfolgerung, dass die Regulation durch ein gemeinsames Steuerelement auf die relative Expression von OC2 und ERVFC1 im HL einen entscheidenden Einfluss auf die Pathogenese zu haben scheint, liegt nahe. Inwiefern sich die beiden Gene durch Modulation der Immunantwort und Zellsignalwege weiter beeinflussen, konnten wir noch nicht abschließend klären. Jedoch scheinen beide eine wichtige Rolle bei der Pathogenese des HL zu spielen und sollten als mögliche *targets* für eine spezifische Tumorthherapie weiter untersucht werden. Zur Identifikation des Steuerelementes der beiden Faktoren und differenzierteren Charakterisierung des Regulationsnetzwerkes müssen weiter Versuche wie bsw. Ko-Überexpressions oder *-knockdown*-Versuche durchgeführt werden.

6 ZUSAMMENFASSUNG

In der Arbeit konnte gezeigt werden, dass es sich bei einer neuartigen Sequenz aus einer cDNA-Bank von Hodgkin-Lymphomzellen um eine alternative Splicevariante des bekannten TF OC2 handelt. Diese neue Variante OC2s wurde hier erstmalig beschrieben und auf ihre Expression in verschiedenen Geweben und Tumorzelllinien untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass vor allem HL-Zelllinien, Hoden und Lebergewebe über eine hohe Expression verfügen. Der Nachweis eines Proteins der neuen Variante gelang weder durch WB noch durch Fluoreszenzfärbung eindeutig. Da auf Transkriptom-Ebene aber nach Überexpression ein Effekt auf das Genexpressionsprofil der transfizierten Zellen nachweisbar war, muss angenommen werden, dass es sich bei der neuen Variante OC2s um eine funktionelle RNA, gegebenenfalls eine ncRNA, handelt. Eine spezifische Funktion im HL scheint sehr wahrscheinlich, da hier die größten Auswirkungen einer veränderten Expression nachgewiesen werden konnten. Ähnliches zeigten wir für die bekannte Variante OC2. Im Gegensatz zu OC2s gelang der Nachweis von OC2 auf Proteinebene in allen untersuchten Zellmodellen. Wie bereits für andere Tumoren gezeigt, konnten wir auch im HL einige Gene identifizieren, die durch OC2 potenziell reguliert werden. Sowohl beim Vergleich der relativen Expression verschiedener Zelllinien als auch der bioinformatischen Analyse von *MicroArray*-Datensets konnten wir vor allem HL-Zelllinien und HL-Patienten:innenproben mit herausragenden hohen Werten identifizieren. Speziell bei den weiterführenden Untersuchungen im HL konnten wir zusätzlich eine positive Korrelation zwischen der Expression von OC2 und ERVFC1, einem humanen endogenen Retrovirus, nachweisen. Auf Grundlage unserer Daten ist denkbar, dass OC2 gemeinsam mit ERVFC1 eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese des HL einnehmen könnte.

7 LITERATURVERZEICHNISS

- Aden DP, Fogel A, Plotkin S, Damjanov I, Knowles BB. Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature*. 1979;282(5739):615-616. doi:10.1038/282615a0
- Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms [published correction appears in *Leukemia*. 2023 Sep;37(9):1944-1951]. *Leukemia*. 2022;36(7):1720-1748. doi:10.1038/s41375-022-01620-2
- Asou H, Tashiro S, Hamamoto K, Otsuji A, Kita K, Kamada N. Establishment of a human acute myeloid leukemia cell line (Kasumi-1) with 8;21 chromosome translocation. *Blood*. 1991;77(9):2031-2036.
- Bannert N, Hofmann H, Block A, Hohn O. HERVs New Role in Cancer: From Accused Perpetrators to Cheerful Protectors. *Front Microbiol*. 2018;9:178. Published 2018 Feb 13. doi:10.3389/fmicb.2018.00178
- Barth M, Gröger V, Cynis H, Staeger MS. Identification of human endogenous retrovirus transcripts in Hodgkin Lymphoma cells. *Mol Biol Rep*. 2019;46(2):1885-1893. doi:10.1007/s11033-019-04640-x
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*. 1973;33(11):2643-2652.
- Bornkamm GW, Berens C, Kuklik-Roos C, et al. Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res*. 2005;33(16):e137. Published 2005 Sep 7. doi:10.1093/nar/gni137
- Brune MM, Juskevicius D, Haslbauer J, Dirnhofer S, Tzankov A. Genomic Landscape of Hodgkin Lymphoma. *Cancers (Basel)*. 2021;13(4):682. Published 2021 Feb 8. doi:10.3390/cancers13040682
- Casper J, Schmoll HJ, Schnaidt U, Fonatsch C. Cell lines of human germinal cancer. *Int J Androl*. 1987;10(1):105-113. doi:10.1111/j.1365-2605.1987.tb00171.x
- Chatterjee A, Gallent B, Katiki M, et al. The homeodomain drives favorable DNA binding energetics of prostate cancer target ONECUT2. Preprint. bioRxiv. 2023;2023.06.13.544830. Published 2023 Jun 14. doi:10.1101/2023.06.13.544830
- Clotman F, Jacquemin P, Plumb-Rudewiez N, et al. Control of liver cell fate decision by a gradient of TGF beta signaling modulated by Onecut transcription factors. *Genes Dev*. 2005;19(16):1849-1854. doi:10.1101/gad.340305
- Cordeiro A, Monzó M, Navarro A. Non-Coding RNAs in Hodgkin Lymphoma. *Int J Mol Sci*. 2017;18(6):1154. Published 2017 May 29. doi:10.3390/ijms18061154
- Cui C, Su M, Lin Y, Lai L. A CD300c-Fc Fusion Protein Inhibits T Cell Immunity. *Front Immunol*. 2018;9:2657. Published 2018 Nov 15. doi:10.3389/fimmu.2018.02657
- Diehl V, Kirchner HH, Schaadt M, et al. Hodgkin's disease: establishment and characterization of four in vitro cell lines. *J Cancer Res Clin Oncol*. 1981;101(1):111-124. doi:10.1007/BF00405072
- Drexler HG, Gaedicke G, Lok MS, Diehl V, Minowada J. Hodgkin's disease derived cell lines HDLM-2 and L-428: comparison of morphology, immunological and isoenzyme profiles. *Leuk Res*. 1986;10(5):487-500. doi:10.1016/0145-2126(86)90084-6
- Drillis G, Goulielmaki M, Spandidos DA, Aggelaki S, Zoumpourlis V. Non-coding RNAs (miRNAs and lncRNAs) and their roles in lymphogenesis in all types of lymphomas and lymphoid malignancies. *Oncol Lett*. 2021;21(5):393. doi:10.3892/ol.2021.12654

- Engel K, Wieland L, Krüger A, et al. Identification of Differentially Expressed Human Endogenous Retrovirus Families in Human Leukemia and Lymphoma Cell Lines and Stem Cells. *Front Oncol.* 2021;11:637981. Published 2021 Apr 29. doi:10.3389/fonc.2021.637981
- Erdmann F, Kaatsch P, Grabow D, Spix C. German Childhood Cancer Registry - Annual Report 2019 (1980-2018). Institute of Medical Biostatistics, Epidemiology and Informatics (IMBEI) at the University Medical Center of the Johannes Gutenberg University Mainz, 2020. https://www.kinderkrebsregister.de/typo3temp/secure_downloads/42507/0/1c5976c2ab8af5b6b388149df7182582a4cd6a39/Buch_DKKR_Jahresbericht_2019_komplett.pdf (abgerufen am: 02.09.2023).
- Francius C, Clotman F. Dynamic expression of the Onecut transcription factors HNF-6, OC-2 and OC-3 during spinal motor neuron development. *Neuroscience.* 2010;165(1):116-129. doi:10.1016/j.neuroscience.2009.09.076
- Gallagher R, Collins S, Trujillo J, et al. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood.* 1979;54(3):713-733.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Hodgkin Lymphoms bei erwachsenen Patienten, Langversion 3.1, 2022; AWMF-Registernummer: 018/029 OL, <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hodgkin-lymphom/> (abgerufen am: 02.09.2023).
- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, et al. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51(5):1417-1423. doi:10.1093/jnci/51.5.1417
- Grimmig T, Matthes N, Hoeland K, et al. TLR7 and TLR8 expression increases tumor cell proliferation and promotes chemoresistance in human pancreatic cancer. *Int J Oncol.* 2015;47(3):857-866. doi:10.3892/ijo.2015.3069
- Guo H, Ci X, Ahmed M, et al. ONECUT2 is a driver of neuroendocrine prostate cancer. *Nat Commun.* 2019;10(1):278. Published 2019 Jan 17. doi:10.1038/s41467-018-08133-6
- H. Wickham (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis.* Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org/authors.html>. (abgerufen am: 23. Juli 2023)
- Harris A, Masgutova G, Collin A, et al. Onecut Factors and Pou2f2 Regulate the Distribution of V2 Interneurons in the Mouse Developing Spinal Cord. *Front Cell Neurosci.* 2019;13:184. Published 2019 Jun 5. doi:10.3389/fncel.2019.00184
- Hoennscheidt C, Max D, Richter N, Staeger MS. Expression of CD4 on Epstein-Barr virus-immortalized B cells. *Scand J Immunol.* 2009;70(3):216-225. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02286.x
- Hu J, Chen Y, Li X, et al. THUMP3-AS1 Is Correlated With Non-Small Cell Lung Cancer And Regulates Self-Renewal Through miR-543 And ONECUT2. *Onco Targets Ther.* 2019;12:9849-9860. Published 2019 Nov 19. doi:10.2147/OTT.S227995
- Jackson DG, Hart DN, Starling G, Bell JI. Molecular cloning of a novel member of the immunoglobulin gene superfamily homologous to the polymeric immunoglobulin receptor. *Eur J Immunol.* 1992;22(5):1157-1163. doi:10.1002/eji.1830220508
- Jacquemin P, Lannoy VJ, Rousseau GG, Lemaigre FP. OC-2, a novel mammalian member of the ONECUT class of homeodomain transcription factors whose function in liver partially overlaps with that of hepatocyte nuclear factor-6. *J Biol Chem.* 1999;274(5):2665-2671. doi:10.1074/jbc.274.5.2665
- Jacquemin P, Durviaux SM, Jensen J, et al. Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene *ngn3*. *Mol Cell Biol.* 2000;20(12):4445-4454. doi:10.1128/MCB.20.12.4445-4454.2000

- Jacquemin P, Durviaux SM, Jensen J, et al. Transcription factor hepatocyte nuclear factor 6 regulates pancreatic endocrine cell differentiation and controls expression of the proendocrine gene *ngn3*. *Mol Cell Biol*. 2000;20(12):4445-4454. doi:10.1128/MCB.20.12.4445-4454.2000
- Jacquemin P, Pierreux CE, Fierens S, van Eyll JM, Lemaigre FP, Rousseau GG. Cloning and embryonic expression pattern of the mouse *Onecut* transcription factor OC-2. *Gene Expr Patterns*. 2003;3(5):639-644. doi:10.1016/s1567-133x(03)00110-8
- Jacquemin P, Lemaigre FP, Rousseau GG. The *Onecut* transcription factor HNF-6 (OC-1) is required for timely specification of the pancreas and acts upstream of *Pdx-1* in the specification cascade. *Dev Biol*. 2003;258(1):105-116. doi:10.1016/s0012-1606(03)00115-5
- Jiang Z, Tai Q, Xie X, et al. EIF4A3-induced circ_0084615 contributes to the progression of colorectal cancer via miR-599/ONECUT2 pathway. *J Exp Clin Cancer Res*. 2021;40(1):227. Published 2021 Jul 12. doi:10.1186/s13046-021-02029-y
- Jiang Q, Lei Z, Wang Z, et al. Tumor-Associated Fibroblast-Derived Exosomal circDennd1b Promotes Pituitary Adenoma Progression by Modulating the miR-145-5p/ONECUT2 Axis and Activating the MAPK Pathway. *Cancers (Basel)*. 2023;15(13):3375. Published 2023 Jun 27. doi:10.3390/cancers15133375
- de Jong JJ, Pijpers OM, van Kessel KEM, et al. A Urine-based Genomic Assay Improves Risk Stratification for Patients with High-risk Hematuria Stratified According to the American Urological Association Guidelines. *Eur Urol Oncol*. 2023;6(2):183-189. doi:10.1016/j.euo.2022.08.002
- Kabayiza KU, Masgutova G, Harris A, Rucchin V, Jacob B, Clotman F. The *Onecut* Transcription Factors Regulate Differentiation and Distribution of Dorsal Interneurons during Spinal Cord Development. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:157. Published 2017 May 26. doi:10.3389/fnmol.2017.00157
- Kadkhoda S, Ghafouri-Fard S, Noorbakhsh F, et al. The importance of regulatory pathway mediated by Circ0001955 in colorectal cancer. *Exp Mol Pathol*. 2022;128:104819. doi:10.1016/j.yexmp.2022.104819
- Kamesaki H, Fukuhara S, Tatsumi E, et al. Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease. *Blood*. 1986;68(1):285-292.
- Kassiotis G. Endogenous retroviruses and the development of cancer. *J Immunol*. 2014;192(4):1343-1349. doi:10.4049/jimmunol.1302972
- Klimova L, Antosova B, Kuzelova A, Strnad H, Kozmik Z. *Onecut1* and *Onecut2* transcription factors operate downstream of *Pax6* to regulate horizontal cell development. *Dev Biol*. 2015;402(1):48-60. doi:10.1016/j.ydbio.2015.02.023
- Köchert K, Ullrich K, Kreher S, et al. High-level expression of Mastermind-like 2 contributes to aberrant activation of the NOTCH signaling pathway in human lymphomas. *Oncogene*. 2011;30(15):1831-1840. doi:10.1038/onc.2010.544
- Kropp PA, Gannon M. *Onecut* transcription factors in development and disease. *Trends Dev Biol*. 2016;9:43-57.
- Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND. Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res*. 1976;36(12):4562-4569.
- Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft, Deutsche Krebshilfe, AWMF): Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Hodgkin Lymphoms bei erwachsenen Patienten, Langversion 2.1, 2019; AWMF-Registernummer: 018/029 OL, <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/hodgkin-lymphom/> (abgerufen am: 02.09.2023).
- Li J, Zou J, Wan X, et al. The Role of Noncoding RNAs in B-Cell Lymphoma. *Front Oncol*. 2020;10:577890. Published 2020 Oct 23. doi:10.3389/fonc.2020.577890

- Li K, Zhou M, Zhang Y. MicroRNA-1298-3p induces tumor-suppressive effects in human cervical cancer cells via post-transcriptional suppression of ONECUT2. *Acta Biochim Pol.* 2022;69(4):737-743. doi:10.18388/abp.2020_5919
- Lister TA, Crowther D, Sutcliffe SB, et al. Report of a committee convened to discuss the evaluation and staging of patients with Hodgkin's disease: Cotswolds meeting [published correction appears in *J Clin Oncol* 1990 Sep;8(9):1602]. *J Clin Oncol.* 1989;7(11):1630-1636. doi:10.1200/JCO.1989.7.11.1630
- Liu D, Zhang T, Chen X, et al. ONECUT2 facilitates hepatocellular carcinoma metastasis by transcriptionally upregulating FGF2 and ACLY [published correction appears in *Cell Death Dis.* 2021 Dec 23;13(1):28]. *Cell Death Dis.* 2021;12(12):1113. Published 2021 Nov 27. doi:10.1038/s41419-021-04410-3
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001;25(4):402-408. doi:10.1006/meth.2001.1262
- Lozzio CB, Lozzio BB. Cytotoxicity of a factor isolated from human spleen. *J Natl Cancer Inst.* 1973;50(2):535-538. doi:10.1093/jnci/50.2.535
- Lu T, Wu B, Yu Y, et al. Blockade of ONECUT2 expression in ovarian cancer inhibited tumor cell proliferation, migration, invasion and angiogenesis [published correction appears in *Cancer Sci.* 2021 Jul;112(7):2928-2929]. *Cancer Sci.* 2018;109(7):2221-2234. doi:10.1111/cas.13633
- Luna Velez MV, Neikes HK, Snabel RR, et al. ONECUT2 regulates RANKL-dependent enterocyte and microfold cell differentiation in the small intestine; a multi-omics study. *Nucleic Acids Res.* 2023;51(3):1277-1296. doi:10.1093/nar/gkac1236
- Ma Q, Wu K, Li H, et al. ONECUT2 overexpression promotes RAS-driven lung adenocarcinoma progression. *Sci Rep.* 2019;9(1):20021. Published 2019 Dec 27. doi:10.1038/s41598-019-56277-2
- Ma T, Qiao T, Huang R, et al. Long Noncoding XLOC_006390 Regulates the Proliferation and Metastasis of Human Colorectal Cancer via miR-296/ONECUT2 Axis. *J Oncol.* 2022;2022:4897201. Published 2022 Jul 15. doi:10.1155/2022/4897201
- Margagliotti S, Clotman F, Pierreux CE, et al. The Onecut transcription factors HNF-6/OC-1 and OC-2 regulate early liver expansion by controlling hepatoblast migration. *Dev Biol.* 2007;311(2):579-589. doi:10.1016/j.ydbio.2007.09.013
- Marini P, MacLeod RA, Treuner C, et al. SiMa, a new neuroblastoma cell line combining poor prognostic cytogenetic markers with high adrenergic differentiation. *Cancer Genet Cytogenet.* 1999;112(2):161-164. doi:10.1016/s0165-4608(98)00269-6
- Masgutova G, Harris A, Jacob B, Corcoran LM, Clotman F. Pou2f2 Regulates the Distribution of Dorsal Interneurons in the Mouse Developing Spinal Cord. *Front Mol Neurosci.* 2019;12:263. Published 2019 Nov 7. doi:10.3389/fnmol.2019.00263
- Mathas S, Dörken B, Janz M. Die molekulare Pathogenese des klassischen Hodgkin-Lymphoms [The molecular pathogenesis of classical Hodgkin lymphoma]. *Dtsch Med Wochenschr.* 2009;134(39):1944-1948. doi:10.1055/s-0029-1237537
- Mauz-Körholz C, Metzger ML, Kelly KM, et al. Pediatric Hodgkin Lymphoma. *J Clin Oncol.* 2015;33(27):2975-2985. doi:10.1200/JCO.2014.59.4853
- Kreplova M, Kuzelova A, Antosova B, Zilova L, Jäggle H, Kozmik Z. Dose-dependent regulation of horizontal cell fate by Onecut family of transcription factors. *PLoS One.* 2020;15(8):e0237403. Published 2020 Aug 13. doi:10.1371/journal.pone.0237403
- Nagpal P, Descalzi-Montoya DB, Lodhi N. The circuitry of the tumor microenvironment in adult and pediatric Hodgkin lymphoma: cellular composition, cytokine profile, EBV, and exosomes. *Cancer Rep (Hoboken).* 2021;4(2):e1311. doi:10.1002/cnr2.1311

- Nelms BD, Waldron L, Barrera LA, et al. CellMapper: rapid and accurate inference of gene expression in difficult-to-isolate cell types. *Genome Biol.* 2016;17(1):201. Published 2016 Sep 29. doi:10.1186/s13059-016-1062-5
- Pavlič A, Urh K, Štajer K, Boštjančič E, Zidar N. Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Carcinoma: Comparison Between Primary Tumor, Lymph Node and Liver Metastases. *Front Oncol.* 2021;11:662806. Published 2021 May 11. doi:10.3389/fonc.2021.662806
- Polack A, Hörtnagel K, Pajic A, et al. c-myc activation renders proliferation of Epstein-Barr virus (EBV)-transformed cells independent of EBV nuclear antigen 2 and latent membrane protein 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(19):10411-10416. doi:10.1073/pnas.93.19.10411
- Pulvertaft, JV. CYTOLOGY OF BURKITT'S TUMOUR (AFRICAN LYMPHOMA). *Lancet.* 1964;1(7327):238-240. doi:10.1016/s0140-6736(64)92345-1
- Qian C, Yang Q, Freedland SJ, et al. Activation of ONECUT2 by RB1 loss in castration-resistant prostate cancer. *Am J Clin Exp Urol.* 2022;10(6):397-407. Published 2022 Dec 25.
- Rotinen M, You S, Yang J, et al. ONECUT2 is a targetable master regulator of lethal prostate cancer that suppresses the androgen axis. *Nat Med.* 2018;24(12):1887-1898. doi:10.1038/s41591-018-0241-1
- Roy A, Francius C, Rousso DL, et al. One cut transcription factors act upstream of Isl1 to regulate spinal motoneuron diversification. *Development.* 2012;139(17):3109-3119. doi:10.1242/dev.078501
- Schaadt M, Diehl V, Stein H, Fonatsch C, Kirchner HH. Two neoplastic cell lines with unique features derived from Hodgkin's disease. *Int J Cancer.* 1980;26(6):723-731. doi:10.1002/ijc.2910260605
- Schneider U, Schwenk HU, Bornkamm G. 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.* 1977;19(5):621-626. doi:10.1002/ijc.2910190505
- Schneider J, Volkmer I, Engel K, Emmer A, Staeger MS. Expression of A New Endogenous Retrovirus-Associated Transcript in Hodgkin Lymphoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2019;20(21):5320. Published 2019 Oct 25. doi:10.3390/ijms20215320
- Sexton, R. E., Al-Hallak, M. N., Al-Share, B., Li, Y., Aboukameel, A. Landesman, Y. Kashyap, T., Kim, S., Mohammad, R. M., Philip, P. A., Azmi, A. S. (2021). Mir-7974: An oncogenic miRNA that perpetuates gastric cancer [abstract]. *Cancer Res* 81(13_Suppl), Abstract nr 2383.
- Shanbhag S, Ambinder RF. Hodgkin lymphoma: A review and update on recent progress. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(2):116-132. doi:10.3322/caac.21438
- Shen M, Dong C, Ruan X, et al. Chemotherapy-Induced Extracellular Vesicle miRNAs Promote Breast Cancer Stemness by Targeting ONECUT2. *Cancer Res.* 2019;79(14):3608-3621. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-4055
- Shen C, Wang J, Xu Z, Zhang L, Gu W, Zhou X. ONECUT2 which is targeted by hsa-miR-15a-5p enhances stemness maintenance of gastric cancer stem cells. *Exp Biol Med (Maywood).* 2021;246(24):2645-2659. doi:10.1177/15353702211038496
- Sloggett C, Goonasekera N, Afgan E. BioBlend: automating pipeline analyses within Galaxy and CloudMan. *Bioinformatics.* 2013;29(13):1685-1686. doi:10.1093/bioinformatics/btt199
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1973;51(5):1409-1416. doi:10.1093/jnci/51.5.1409
- Staeger MS, Banning-Eichenseer U, Weissflog G, et al. Gene expression profiles of Hodgkin's lymphoma cell lines with different sensitivity to cytotoxic drugs. *Exp Hematol.* 2008;36(7):886-896. doi:10.1016/j.exphem.2008.02.014

- Staeger MS, Müller K, Kewitz S, et al. Expression of dual-specificity phosphatase 5 pseudogene 1 (DUSP5P1) in tumor cells. *PLoS One*. 2014;9(2):e89577. Published 2014 Feb 24. doi:10.1371/journal.pone.0089577
- Statello L, Guo CJ, Chen LL, Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions [published correction appears in *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021 Jan 8;:]. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2021;22(2):96-118. doi:10.1038/s41580-020-00315-9
- Steidl C, Diepstra A, Lee T, et al. Gene expression profiling of microdissected Hodgkin Reed-Sternberg cells correlates with treatment outcome in classical Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2012;120(17):3530-3540. doi:10.1182/blood-2012-06-439570
- Sturn A, Quackenbush J, Trajanoski Z. Genesis: cluster analysis of microarray data. *Bioinformatics*. 2002;18(1):207-208. doi:10.1093/bioinformatics/18.1.207
- Takahashi M, Izawa K, Kashiwakura JI, et al. Human CD300C delivers an Fc receptor- γ -dependent activating signal in mast cells and monocytes and differs from CD300A in ligand recognition. *J Biol Chem*. 2013;288(11):7662-7675. doi:10.1074/jbc.M112.434746
- Thul PJ, Åkesson L, Wiking M, et al. A subcellular map of the human proteome. *Science*. 2017;356(6340):eaal3321. doi:10.1126/science.aal3321
- Toch M, Harris A, Schakman O, et al. Onecut-dependent Nkx6.2 transcription factor expression is required for proper formation and activity of spinal locomotor circuits [published correction appears in *Sci Rep*. 2020 Aug 6;10(1):13531]. *Sci Rep*. 2020;10(1):996. Published 2020 Jan 22. doi:10.1038/s41598-020-57945-4
- Vanhorenbeeck V, Jenny M, Cornut JF, et al. Role of the Onecut transcription factors in pancreas morphogenesis and in pancreatic and enteric endocrine differentiation. *Dev Biol*. 2007;305(2):685-694. doi:10.1016/j.ydbio.2007.02.027
- Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 46, W296-W303 (2018).
- Wickham H, François R, Henry L, Müller K, Vaughan D (2023). *dplyr: A Grammar of Data Manipulation*. <https://dplyr.tidyverse.org>, <https://github.com/tidyverse/dplyr> (abgerufen am: 02.09.2023).
- Wienand K, Chapuy B, Stewart C, et al. Genomic analyses of flow-sorted Hodgkin Reed-Sternberg cells reveal complementary mechanisms of immune evasion. *Blood Adv*. 2019;3(23):4065-4080. doi:10.1182/bloodadvances.2019001012
- Wolf J, Kapp U, Bohlen H, et al. Peripheral blood mononuclear cells of a patient with advanced Hodgkin's lymphoma give rise to permanently growing Hodgkin-Reed Sternberg cells. *Blood*. 1996;87(8):3418-3428.
- ^a Ye J, Ma C, Hsueh EC, et al. TLR8 signaling enhances tumor immunity by preventing tumor-induced T-cell senescence. *EMBO Mol Med*. 2014;6(10):1294-1311. doi:10.15252/emmm.201403918
- Yu J, Li D, Jiang H. Emerging role of ONECUT2 in tumors. *Oncol Lett*. 2020;20(6):328. doi:10.3892/ol.2020.12192
- Zendman AJ, Van Kraats AA, Weidle UH, Ruiter DJ, Van Muijen GN. The XAGE family of cancer/testis-associated genes: alignment and expression profile in normal tissues, melanoma lesions and Ewing's sarcoma. *Int J Cancer*. 2002;99(3):361-369. doi:10.1002/ijc.10371
- Zhao Y, Zhou H, Ma K, et al. Abnormal methylation of seven genes and their associations with clinical characteristics in early stage non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2013;5(4):1211-1218. doi:10.3892/ol.2013.1161
- Zhao Y, Zhang Q, Tu K, et al. Single-Cell Transcriptomics of Immune Cells Reveal Diversity and Exhaustion Signatures in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front Immunol*. 2022;13:854724. Published 2022 Jul 6. doi:10.3389/fimmu.2022.854724

8 THESEN

1. Bei ONECUT2s (OC2s) handelt es sich um eine alternative Splicevariante des Transkriptionsfaktors ONECUT2.
2. Es gibt in der ONECUT2- bzw. ONECUT2s-DNA-Sequenz zwei verschiedene ATG-Triplets, die beide als Translationsursprung in Frage kommen. In Abhängigkeit des so genutzten offenen Leserahmens variiert die Größe und Struktur des Proteins.
3. Das ONECUT2-Protein hat eine für einen Transkriptionsfaktor untypische überwiegende zytoplasmatische Lokalisation.
4. ONECUT2 und ONECUT2s zeigen zumindest auf RNA-Ebene eine hohe Expression im Hodgkin-Lymphom.
5. Bei ONECUT2s handelt es sich möglicherweise um eine *long-non-coding RNA*.
6. ONECUT2 scheint eine spezifische Funktion im Hodgkin-Lymphom zu haben.
7. ERVFC1 und ONECUT2 werden möglicherweise gemeinsam im Hodgkin-Lymphom reguliert.

Erklärung über vorherige Promotionsversuche und Selbständigkeitserklärung

Erklärungen

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

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

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

Datum, Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich allen voran bei meinem Betreuer apl. Prof. Martin Staeger bedanken, für die ausgezeichnete Betreuung, die vielen Ratschläge und Diskussionen, sowie die permanente Unterstützung über all die Jahre und die finale Durchsicht der Arbeit.

Besonderer Dank gilt Frau Ines Volkmer, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht hätte entstehen können. Deine Geduld bei der Labor Einarbeitung war unvergleichlich und ohne dich hätte ich keine dieser Ergebnisse errarbeiten können.

Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Dr.rer.nat. Daniela Bräuer-Hartmann, für all die kritischen Diskussionen und neue Anregungen.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester bedanken, dafür dass sie mich ermutigt haben und immer für mich da waren mit einem offenen Ohr oder beruhigenden Worten.