

**Funktionelle Charakterisierung der
potenziell onkogenen somatischen *KMT2D* Stoppmutation
bei kardialen Angiosarkomen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
-Dr. rer. nat.-

Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Hannah Goldschmid

Gießen, März 2020

Dekan: Prof. Dr. Jürgen Janek

Erster Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Dammann

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Andreas Bräuninger

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	X
Tabellenverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Sarkome	1
1.2 Angiosarkome	1
1.2.1 Primäre kardiale Angiosarkome	2
1.2.1.1 Pathogenese	3
1.3 KMT2D	3
1.4 Verfahren zur Herstellung stabiler Gen defizienter Zellen <i>in vitro</i>	7
1.4.1 CRISPR/Cas9	8
1.4.2 Lentivirale Transduktion	10
1.5 Zielstellung der Arbeit	13
2 Material	15
2.1 Geräte	15
2.2 Verbrauchsmaterialien	18
2.3 Chemikalien und Reagenzien	20
2.4 Zellen	23
2.4.1 HUVEC	23
2.4.2 HeLa-Zellen	23
2.4.3 HEK 293T-Zellen	23
2.4.4 G55-Zellen	24
2.5 Zellkulturmedien und -reagenzien	24
2.6 <i>KMT2D</i> Sequenz für CRISPR/Cas9 Vektor	25
2.7 Verwendete Primer	26
2.8 Verwendete shRNAs	27
2.9 Verwendete TaqMan Gene Expression Assays	28
2.10 Puffer und Lösungen	28
2.11 Verwendete Kits	30
2.12 Antikörper	32
2.13 Software und Internetquellen	33
3 Methoden	35

3.1	Zellkultur	35
3.1.1	Kultivierung der Zellen	35
3.1.1.1	HUVEC	35
3.1.1.2	HeLa-Zellen	35
3.1.1.3	HEK 293T-Zellen	36
3.1.1.4	G55-Zellen	37
3.1.2	Auftauen der Zellen	37
3.1.2.1	HUVEC	37
3.1.2.2	HeLa-Zellen	37
3.1.3	Einfrieren der HeLa-Zellen	38
3.1.4	Transiente Transfektion	38
3.1.4.1	HUVEC	38
3.1.4.2	HeLa-Zellen	39
3.2	CRISPR/Cas9	39
3.2.1	Auswahl der einzelsträngigen DNA Oligonukleotide	39
3.2.2	Generierung der doppelsträngigen Oligonukleotide	40
3.2.3	Ligation Reaktion	41
3.2.4	Transiente Transfektion und Selektion der CRISPR Nuclease Vektor exprimierenden Zellen	42
3.3	Stabile Transduktion mittels Lentiviren	43
3.3.1	Herstellung der lentiviralen Partikel durch FuGene HD Transfektion	46
3.3.2	Titern der lentiviralen Partikel	48
3.3.3	Stabile <i>KMT2D</i> shRNA Transduktion in HUVEC	49
3.3.4	Einfrieren der stabil transduzierten HUVEC	50
3.4	Vervielfältigung und Aufreinigung von Plasmiden	50
3.4.1	Transformation in <i>E. coli</i>	50
3.4.2	Übernachtskultur und Glycerol-Stocks	51
3.4.3	Plasmidpräparation	51
3.5	PCR und Sanger-Sequenzierung	52
3.5.1	Fast-PCR-Reaktion	53
3.5.2	Agarose-Gelelektrophorese	54
3.5.3	Aufreinigung und Sanger-Sequenzierung des PCR-Produkts	54
3.6	Proteinnachweis mittels Western Blot Analyse	56
3.6.1	Herstellung von Zelllysaten	56
3.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	56
3.6.3	Proteintransfer auf PVDF-Membran	57
3.6.4	Proteinnachweis	58

3.7	DNA- und RNA-Extraktion aus Zellen	59
3.7.1	DNA-Extraktion	59
3.7.2	RNA-Extraktion	59
3.7.3	Konzentrationsbestimmung	60
3.8	RNA-Expressionsanalysen mittels TaqMan Assay	61
3.8.1	Reverse-Transkriptase-Reaktion	61
3.8.2	Quantitative-real-time-PCR	63
3.9	ATAC-Seq	64
3.9.1	Kernpräparation	66
3.9.2	Transposition und Adapterligation	66
3.9.3	Aufreinigung der transposierten DNA	66
3.9.4	Amplifikation der transposierten DNA	67
3.9.5	Aufreinigung der Library	71
3.9.6	Qualitätskontrolle	71
3.9.7	<i>Sequencing by Synthesis</i> Sequenzierung von Illumina	72
3.10	RNA-Seq	73
3.11	Fluoreszenzfärbungen des F-Aktin Filaments	75
3.12	Quantifizierung sich überlagernder HUVEC	75
3.12.1	Auszählung der sich überlagernden Zellen	75
3.12.2	Vermessung der sich überlagernden Zellen	76
3.13	Bestimmung der Proliferationsrate transduzierter HUVEC	77
3.14	Zellzyklusverteilung und Apoptose-Resistenz-Assay	77
3.15	Migration und Invasion	77
3.16	Soft Agar Colony Formation Assay	79
3.17	Statistische Auswertung	81
4	Ergebnisse	82
4.1	Generierung eines stabilen <i>KMT2D</i> Defizits in HUVEC	82
4.1.1	CRISPR/Cas9	82
4.1.2	Lentivirale Transduktion	85
4.2	Untersuchungen auf Veränderungen der Chromatinstruktur in <i>KMT2D</i> Knockdown Zellen	91
4.2.1	Verteilung der detektierten ATAC-Seq <i>Peaks</i> im Genom	92
4.2.2	Analyse der signifikant veränderten <i>Peaks</i>	95
4.2.2.1	Zuordnung der signifikant veränderten <i>Peaks</i> zu Super-Enhancern	95
4.2.2.2	GO-Analyse, der Genen zugeordneten, signifikant veränderten <i>Peaks</i>	96
4.3	Untersuchung differentiell exprimierter Gene in <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC	97

4.3.1	Validierung der RNA-Seq Ergebnisse	99
4.3.2	GO-Analyse der mittels RNA-Seq detektierten differentiell regulierten Gene	102
4.4	Veränderungen des Integrin Signalwegs in <i>KMT2D</i> Knockdown Zellen	105
4.4.1	Verstärkte Phosphorylierung von FAK in <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC	106
4.4.2	Verstärkte Phosphorylierung von MAPK in <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC	108
4.4.3	Veränderte F-Aktin Strukturen in <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC	109
4.4.4	Veränderte Zellanordnung und mehr überlagerte Zellen in <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC	113
4.4.5	Verminderte Zellproliferation in endothelialen Zellen mit einem <i>KMT2D</i> Knockdown	116
4.4.6	Veränderungen der Zellzyklusverteilung in <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC	117
4.4.7	Migrations- und Invasionsverhalten von HUVEC nach <i>KMT2D</i> Knockdown	122
4.4.8	Untersuchung der transduzierten HUVEC auf Ankermembran unabhängiges Wachstum	124
5	Diskussion	127
5.1	Etablierung eines stabilen <i>KMT2D</i> Defizits in HUVEC	127
5.2	Veränderungen der Chromatinstruktur in <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC	130
5.3	Differentiell exprimierte Gene in den <i>KMT2D</i> defizienten HUVEC	132
5.4	Veränderungen des Integrin Signalwegs in <i>KMT2D</i> Knockdown Zellen	134
5.4.1	In den <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC ist FAK dauerhaft verstärkt aktiv	135
5.4.2	Strukturelle Veränderungen des F-Aktin in den <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC	135
5.4.3	In <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC ist MAPK dauerhaft verstärkt phosphoryliert	136
5.4.4	Die <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC weisen eine verminderte Zellproliferation auf	137
5.4.5	Veränderter Zellzyklus in den <i>KMT2D</i> Knockdown Zellen	137
5.4.6	Verstärkte Invasion bei gleichbleibendem Migrationsverhalten der <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC	138
5.5	Ausblick	139
6	Zusammenfassung	140
7	Summary	142
	Anhang	144
	Literaturverzeichnis	167
	Danksagung	177
	Selbstständigkeitserklärung	178

Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
%	Prozent
% v/v	Volumenprozent
% w/v	Gewichtsprozent
x	x-fach, x-mal
°C	Grad Celsius
μ	Mikro
A	Ampere
A	Adenin
Ab	Antikörper
aq. dest.	<i>Aqua destillata</i>
ATAC	Assay for Transposase Accessible Chromatin
B	Belgien
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
Cas9	CRISPR-assoziiertes Protein 9
cDNA	copied DNA
CH	Schweiz
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	clustered, regularly interspaced, short palindromic repeats
crRNA	CRISPR RNA
Ct-Wert	Threshold Cycle

D	Deutschland
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dd	doppelt destilliert
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECGM1	Endothelial Cell Growth Medium
ECL	enhanced chemiluminescence
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal Growth Factor
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
F	Phenylalanin
FAM	6-Carboxy-Fluorescein
FBS	Fetal Bovine Serum
FC	fold change
FFPE	Formalin-fixiert, Paraffin-eingebettet
FI	Finnland
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
G	Guanin
GFP	grün fluoreszierendes Protein (green fluorescent protein)
GO-Analyse	Gene Ontology Analyse

GSEA	Gene Set Enrichment Analysis
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
H3K4me1	Histon 3 Lysin 4 Monomethylierung
HCl	Trizma hydrochloride
HDR	homology directed repair
HEK293T	human embryonic kidney 293T cells
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HEPES-BSS	HEPES-Buffered Saline Solution
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPV-18	Humanes Papillomvirus 18
HRP	Horseradish Peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells
k	Kilo
kB	Kilobasen
KMT2D	Histone-lysine N-methyltransferase 2D
l	Liter
LS	Rückwärtsprimer
m	Milli
M	Molar
m	Meter
m	monoklonal
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGB	Minor Groove Binder
min	Minute(n)
MLL2	mixed-lineage leukemia protein 2; Histone-lysine N-methyltransferase 2D
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	Messenger RNA

n	nano-
NaCl	Natriumchlorid
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NHEJ	non-homologous end-joining
NFQ	nicht-fluoreszierender Quencher
NL	Niederlande
nsc	non silencing control
p	piko
p	polyklonal
P/S	Penicillin/Streptavidin
PAM	proto-spacer adjacent motif
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	Quantitative-real-time-PCR
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde(n)
Seq	Sequenzierung
shRNA	small hairpin RNA
T	Thymin
T	Threonin
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS	Tris-Buffered Saline
TBST	Tris-Buffered Saline mit Tween20

T _m	Primer Melting Temperature
tNGS	targetiertes Next Generation Sequencing
tracrRNA	Trans-activating crRNA
TU	Transduktionseinheit
üN	über Nacht
US	Vorwärtsprimer
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
UV	Ultraviolett
V	Volt
VSV	Vesicular stomatitis Virus
Y	Tyrosin

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des KMT2D Proteins.	4
Abbildung 2: Schematische Darstellung des KMT2D Proteinkomplexes.	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Anlagerung des CRISPR/Cas9 Konstrukts an den Ziellokus.	8
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Reparaturmechanismen des, durch CRISPR/Cas9 erzeugten, Doppelstrangbruchs.	10
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Herstellung lentiviraler Partikel.	12
Abbildung 6: Schematische Darstellung zur Generierung des CRISPR Vektors.	41
Abbildung 7: Plasmidkarte für das shRNA tragende Plasmid pGIPZ.	44
Abbildung 8: Plasmidkarte für das Verpackungsplasmid psPAX2.	45
Abbildung 9: Plasmidkarte für das Membranplasmid pCI-VSVG.	46
Abbildung 10: Schematische Darstellung der TGX Stain-free Protein Gele.	57
Abbildung 11: Schematische Darstellung des ATAC-Seq.	66
Abbildung 12: Schematische Darstellung der Amplifikations-PCR.	68
Abbildung 13: Bestimmung der zusätzlichen Zyklenzahl.	70
Abbildung 14: Schematische Darstellung der <i>Sequencing by Synthesis</i> Sequenzierung von Illumina.	73
Abbildung 15: Schematische Darstellung des RNA-Seq.	74
Abbildung 16: Schematische Darstellung des Migrations- und Invasionsassays.	78
Abbildung 17: Schematische Darstellung des <i>Soft Agar Colony Formation Assays</i> .	80
Abbildung 18: Sequenzen der CRISPR transfizierten HeLa-Zellen und HUVEC.	84
Abbildung 19: Transiente Transfektion der verschiedenen shRNAs gegen <i>KMT2D</i> .	87
Abbildung 20: Kontrolle des, durch lentivirale Transduktion generierten, stabilen <i>KMT2D</i> Knockdowns in HUVEC.	90
Abbildung 21: Verteilung der ATAC-Seq <i>Peaks</i> im Genom.	94
Abbildung 22: Validierung der RNA-Seq Daten mittels TaqMan Expressionsanalysen.	101
Abbildung 23: <i>Enriched</i> GO-Analyse der im RNA-Seq als signifikant hochreguliertidentifizierten Gene.	103
Abbildung 24: <i>Enriched</i> GO-Analyse der im RNA-Seq als signifikant herunterreguliert identifizierten Gene.	104
Abbildung 25: Vereinfachte und gekürzte Darstellung des Integrin Signalwegs.	106
Abbildung 26: Zunahme an phosphorylierter FAK in den <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC.	107
Abbildung 27: Zunahme an phosphorylierter MAPK in den <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC.	109
Abbildung 28: Veränderungen in F-Aktin Strukturen und im Wachstumsmuster in <i>KMT2D</i> defizienten Zellen.	112

Abbildung 29: In <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC kommt es zu einer verstärkten Überlagerung der Zellen.	114
Abbildung 30: Eine reduzierte Zellproliferation in <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC.	117
Abbildung 31: Keine signifikanten Veränderungen der Zellzyklusverteilung in <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC.	119
Abbildung 32: Der <i>KMT2D</i> Knockdown zeigt keine signifikanten Auswirkungen auf die Apoptoseresistenz.	121
Abbildung 33: Verstärkte Zellinvasion bei gleichbleibender Migration in <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC.	123
Abbildung 34: Die <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC zeigen kein Ankermembran unabhängiges Wachstum auf.	125
Abbildung 35: Korrelationsanalysen der im ATAC-Seq Replikate.	144
Abbildung 36: Korrelationsanalysen der im RNA-Seq verwendeten Replikate.	158

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Mittels RNA-Seq detektierte differentiell exprimierte Gene in <i>KMT2D</i> Knockdown HUVEC.	99
Tabelle 2: Protein kodierende Gene in der Nähe der signifikant veränderten <i>Peaks</i>	145
Tabelle 3: GO-Analyse aller signifikant verstärkten ATAC-Seq <i>Peaks</i> .	146
Tabelle 4: GO-Analyse aller signifikant verringerten ATAC-Seq <i>Peaks</i> .	152
Tabelle 5: GO-Analyse der im RNA-Seq signifikant hochregulierten Gene.	159
Tabelle 6: GO-Analyse der im RNA-Seq signifikant herunterregulierten Gene.	163
Tabelle 7: Der <i>KMT2D</i> Knockdown induziert eine verstärkte Zellinvasion bei gleichbleibender Migration.	166

1 Einleitung

1.1 Sarkome

Sarkome sind eine heterogene Gruppe von seltenen Tumoren mit mesenchymalem Ursprung (Chen et al., 2019; Fletcher et al., 2002; Pennacchioli et al., 2012). Die verschiedenen Sarkome können in Knochensarkome (Osteosarkome und Chondrosarkome), Ewing's Sarkome und Weichteilsarkome eingeteilt werden. Dabei stellen die Weichteilsarkome die am häufigsten diagnostizierten Sarkome dar (Cormier and Pollock, 2004). Ungefähr 1% aller malignen Tumore sind Weichteilsarkome (Chen et al., 2019; Cormier and Pollock, 2004; Lewis and Brennan, 1996). Diese können überall im Körper auftreten, am häufigsten aber in den Extremitäten (59%) gefolgt vom Rumpf (19%), dem Retroperitoneum (15%) und dem Kopf- und Nackenbereich (9%) (Cormier and Pollock, 2004). Die Weichteilsarkome werden in mehr als 50 histologische Typen unterteilt, wie zum Beispiel in maligne fibröse Histiozytome (28%), Liposarkome (15%), Leiomyosarkome (12%), Synovialsarkome (10%), maligne periphere Nervenscheidentumore (6%), Rhabdomyosarkome (5%) sowie Angiosarkome (1-2%) (Coindre et al., 2001; Cormier and Pollock, 2004).

1.2 Angiosarkome

Angiosarkome sind vaskuläre Weichteilsarkome, die aus Endothelzellen hervorgehen. Sie sind sehr aggressiv und mit einer schlechten Überlebensrate verbunden (Huang et al., 2016; Young et al., 2010; Zietz et al., 1998). Angiosarkome treten bei Männern und Frauen ungefähr gleich häufig auf. Das mittlere Alter der Patienten liegt bei der Diagnose zwischen 52 und 67 Jahren (Weidema et al., 2019). Angiosarkome werden meist in der Leber, der Brust, der Haut und der Milz diagnostiziert (Patel et al., 2014). 50% der Angiosarkome entstehen im Kopf und Nackenbereich, die meisten davon auf der Kopfhaut von älteren Männern, die sich aufgrund der UV induzierten Pathogenese bilden (Patel et al., 2014; Shimozono et al., 2015). Weitere Ursachen für die Entstehung eines Angiosarkoms können unter anderem vaskuläre Läsionen sein. So entwickelt sich, beim Stewart-Treves Syndrom, aus einem chronischen Lymphödem, welches durch die Brustentfernung bei Brustkrebs entstand, ein Angiosarkom (Penel et al., 2011; Young et al., 2010). Dabei sind die genaue Pathogenese und der Zusammenhang eines Lymphödems und Angiosarkomen bis dato unbekannt (Gottlieb et al., 2012; Murgia and Gross, 2019). Es wurde allerdings postuliert, dass eine, durch das chronische Lymphödem entstandene lymphatische Blockade, das Wachstum der Lymphgefäße durch Zytokine anregt und dadurch die Entstehung von Angiosarkomen begünstigt (Gottlieb et al., 2012). Zusätzlich konnte bei Brustkrebspatientinnen, sowie non-Hodgkin-Lymphom-Patienten, beobachtet

werden, dass die Radiotherapie ebenfalls die Entwicklung von Angiosarkomen begünstigt. Bei diesen Patienten konnte 5-10 Jahre nach der Bestrahlung ein erhöhtes Auftreten von Angiosarkomen nachgewiesen werden (Penel et al., 2008; Young et al., 2010). Auch verschiedene Chemikalien werden mit der Entwicklung von Angiosarkomen, vor allem in der Leber, in Verbindung gebracht. So kann die Belastung durch Polyvinylchlorid (PVC), Arsen, Radium und anabolen Steroiden die Erkrankungsrate steigern (Penel et al., 2011; Young et al., 2010). Neben den externen Einflüssen können auch Keimbahnmutationen zu einer Erkrankung beitragen. So kann bei Patienten mit einer Neurofibromatose (Keimbahnmutation in *NF1*), einem Retinoblastom (Keimbahnmutation in *RB1*), mit dem Maffucci-Syndrom (Keimbahnmutationen in *IDH1* oder *IDH2*) oder dem Klippel-Trenaunay-Syndrom (Keimbahnmutation in *PIK3CA*) zusätzlich eine Angiosarkoms entstehen. (Hirbe and Gutmann, 2014; Kooi et al., 2016; Penel et al., 2008; Prokopchuk et al., 2016; Vahidnezhad et al., 2016; Young et al., 2010).

1.2.1 Primäre kardiale Angiosarkome

Lediglich 25% aller kardialen Tumore sind maligne Tumore, von diesen sind ungefähr 95% Sarkome. Die häufigste Entität der malignen kardialen Tumore stellen die Angiosarkome dar (Look Hong et al., 2012; Patel et al., 2014). Primäre kardiale Angiosarkome sind eine sehr seltene Gruppe von Weichteilsarkomen, die lediglich 1-2% aller Sarkomerkrankungen ausmachen (Weidema et al., 2019). Die Prävalenz an einem primären kardialen Angiosarkom zu erkranken ist bei Männern höher als bei Frauen. Das Durchschnittsalter der Patienten liegt zum Zeitpunkt der Diagnose zwischen 39 und 41 Jahren (Look Hong et al., 2012; Patel et al., 2014; Siontis et al., 2019). In den meisten Fällen entstehen die primären kardialen Angiosarkome im rechten Herzventrikel (Ge et al., 2011; Patel et al., 2014). Sie zeichnen sich durch ein sehr schnelles Wachstum aus. Mehr als 50% der Patienten mit einem kardialen Angiosarkom entwickeln Metastasen, meist in der Lunge, aber auch im Gehirn, den Knochen und dem Kolon, wodurch sie als sehr aggressive Neoplasien eingestuft werden (Butany et al., 2005; Look Hong et al., 2012; Patel et al., 2014). Da die Patienten sehr lange symptomfrei sind, wird die Diagnose meist erst gestellt, wenn der Tumor eine gewisse Größe erreicht hat oder Symptome aufgrund der Metastasen auftreten (Patel et al., 2014). Die häufigsten Symptome, die die Patienten entwickeln, sind Atemnot, Müdigkeit, Husten, Brustschmerzen und Herzinsuffizienz (Chen et al., 2019; Ge et al., 2011). Aufgrund der meist inoperablen Lage und der Resistenz gegenüber Chemotherapeutika und Strahlentherapie ist die Diagnose mit einer sehr schlechten Prognose verbunden (Oh et al., 2013; Patel et al., 2014). Die Überlebensdauer nach der Diagnose liegt meist nur zwischen 9 und 27 Monaten (Chen et al., 2019; Patel et al., 2014).

1.2.1.1 Pathogenese

Aufgrund der Seltenheit der primären kardialen Angiosarkome ist die Pathogenese weitestgehend unbekannt. Lediglich ein paar Studien, mit geringen Fallzahlen, sind veröffentlicht. In diesen konnten bisher Mutationen in *KRAS* (Onkogen), *TP53* (Tumorsuppressorgen) und *CDKN2A* (Tumorsuppressorgen) nachgewiesen werden (Garcia et al., 2000; Leduc et al., 2017; Naka et al., 1997). Um neue Erkenntnisse über die Pathogenese dieser Tumore zu erlangen, untersuchten Kunze *et al.* sechs kardiale Angiosarkome (Formalin-fixiert und Paraffin-eingebettetes (FFPE) Gewebe) mittels des targetierten *Next Generation Sequencing* (tNGS) (Kunze et al., 2014). Diese Fälle wurden auf Mutationen, in den 409 bei Malignomen am häufigsten mutierten Onkogene und Tumorsuppressorgene, hin untersucht. In zwei von sechs Fällen konnten verschiedene *missense* Mutationen in *KDR* (*Kinase Insert Domain Receptor*, *VEGFR2*) identifiziert werden. Zum ersten Mal wurde auch eine rekurrente Mutation in einem für Endothelien wichtigen Signalmolekül, der *PLCG1* (*Phospholipase C γ 1*), in zwei von sechs Fällen durch tNGS nachgewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass diese *PLCG1* Mutation zu einer Aktivierung des *PLCG1* Signalweges führt. Die Signaltransduktion über den *KDR/PLCG1* Signalweg spielt bei der Regulation der Proliferation und der Differenzierung in endothelialen Zellen eine wichtige Rolle (Shibuya, 2013). Es konnte also in vier von sechs kardialen Angiosarkomen eine Mutation im *KDR/PLCG1* Signalweg detektiert werden. In zwei dieser vier Fälle konnten, zusätzlich zu den Mutationen in *KDR* bzw. *PLCG1*, an verschiedenen Stellen Stoppmutationen in *KMT2D* (*Histone-lysine N-methyltransferase 2D*) identifiziert werden. In einem der Fälle konnten sogar zwei Stoppmutationen in der *KMT2D* kodierenden Region detektiert werden. Vermutlich führen diese *KMT2D* Mutationen zur Inaktivierung von *KMT2D* (Kunze et al., 2014). In kardialen Angiosarkomen konnte also rekurrent eine Mutation im *KDR/PLCG1* Signalweg, die zur Aktivierung dieses Signalweges führt, zusammen mit einer *KMT2D* inaktivierenden Mutation detektiert werden.

1.3 KMT2D

KMT2D (*Histone-lysine N-methyltransferase 2D*) auch *MLL2* (*mixed-lineage leukaemia protein 2*), genannt, kodiert für ein hochkonserviertes Mitglied der SET1 Familie von Histon Lysin Methyltransferasen. Insgesamt sind in höheren Eukaryoten sechs verschiedene Histon Lysin Methyltransferasen, die die Methylierung von Histon 3 Lysin 4 (H3K4) regulieren, bekannt. Diese können aufgrund ihrer Homologien in der Proteinsequenz und Zusammensetzung ihrer funktionellen Domänen in drei Gruppen eingeteilt werden. SET1A und SET1B bilden eine Gruppe, KMT2A und KMT2B eine weitere und KMT2C wird

zusammen mit KMT2D in eine Gruppe eingeteilt (Zhang et al., 2015). Die für jede Gruppe spezifische Zusammensetzung der funktionellen Domänen lassen die Vermutung zu, dass jede Gruppe eine spezialisierte Methylierung katalysiert und dadurch die Transkription bestimmter Gene reguliert. SET1A und SET1B katalysieren die Trimethylierung von H3K4, KMT2A und KMT2B die Dimethylierung von H3K4 und KMT2C reguliert zusammen mit KMT2D die Monomethylierung von H3K4 (Ford and Dingwall, 2015; Rao and Dou, 2015; Zhang et al., 2015). Es wird angenommen, dass es zwischen den Gruppen zu keinerlei funktionellen Überlappungen kommt (Zhang et al., 2015).

Das 5.537 Aminosäuren lange KMT2D Protein, mit einer Molekülmasse von ca. 600 kDa, besitzt in der N-terminalen Region zwei Cluster mit je drei *plant homeodomains* (PHD) und am C-Terminus eine enzymatisch aktive SET (*Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax*) Domäne (Froimchuk et al., 2017; Zhang et al., 2015). Eine schematische Darstellung des KMT2D Proteins ist in Abbildung 1 dargestellt.

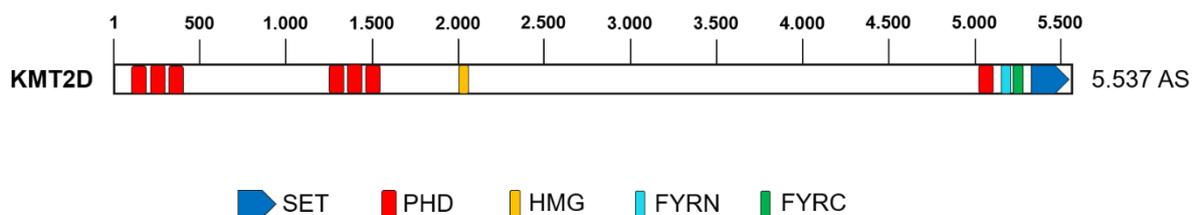


Abbildung 1: Schematische Darstellung des KMT2D Proteins.

Darstellung des 5.537 Aminosäuren (AS) langen KMT2D Proteins mit seinen funktionellen Domänen. Katalytische SET (*Su(var)3-9, Enhancer-of-zeste, Trithorax*) Domäne (blau), PHD (*plant homeodomains*) (rot), HMG (*high mobility group*) (gelb), FYRN (FY-reiche Domäne N-terminal) (hellblau) und FYRC (FY-reiche Domäne C-terminal) (grün). (Abbildung nach Froimchuk et al., 2017).

Die PHDs in der N-terminalen Region sind wichtig für die Bindung an Chromatin, indem sie die H4 Enden an Nukleosomen erkennen sowie für die Nukleosom Methylierung (Ford and Dingwall, 2015; Froimchuk et al., 2017). Die SET Domäne katalysiert die Bindung der Methylgruppen an Lysin und ist zusätzlich für die Proteinstabilität von KMT2D in Zellen von Bedeutung (Froimchuk et al., 2017; Ruthenburg et al., 2007). Die *high mobility group* (HMG), die in der ersten Hälfte des Proteins zu finden ist, ist für die DNA Erkennung von Bedeutung (Ford and Dingwall, 2015). Am C-Terminus befinden sich neben der SET Domäne noch zusätzlich eine PHD sowie Phenylalanin und Tyrosin (FY)-reiche N- und C-terminale Domänen (FYRN und RYRC) (Froimchuk et al., 2017). Diese FY-reichen Domänen finden sich häufig in Chromatin-assoziierten Proteinen, wobei die genaue Funktion bisher noch nicht bekannt ist.

Es ist bekannt, dass vor allem die beiden Aminosäuren Tyrosin 5426 (Y5426) und Tyrosin 5521 (Y5521) entscheidend für die enzymatische Aktivität von KMT2D *in vitro* sind (Froimchuk et al., 2017; Jang et al., 2017). KMT2D bildet mit PA1, PTIP, ASH2L, RbBP5, WDR5, DPY30, NCO6 und UTX einen Komplex, der eine hohe H3K4 Methyltransferaseaktivität aufzeigt (Froimchuk et al., 2017; Issaeva et al., 2007). Der Komplex ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

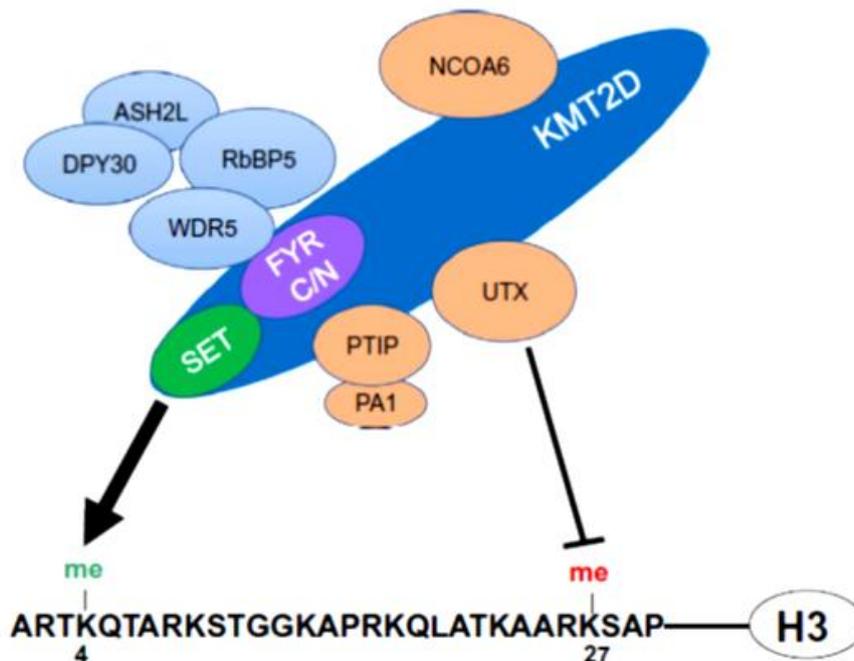


Abbildung 2: Schematische Darstellung des KMT2D Proteinkomplexes.

KMT2D bildet mit WRAD (WDR5, RbBP5, ASH2L, DPY30), UTX, NCOA6, PTIP und PA1 für die Methyltransferaseaktivität einen Komplex. Dabei ist die SET Domäne für die H3K4 Methyltransferaseaktivität von Bedeutung und UTX für die Demethylierung von H3K27. (Abbildung aus Froimchuk et al., 2017).

Die vier Untereinheiten WDR5, RbBP5, ASH2L und DPY30 bilden in diesem Komplex einen Zusammenschluss zu WRAD. Dieser Zusammenschluss findet sich in allen SET1 Histon Lysin Methyltransferasen und stimuliert die Aktivität der H3K4 Methyltransferase (Ernst and Vakoc, 2012). WRAD bindet über WDR5 direkt an die FYRN/FYRC Domänen nahe der SET Domäne von KMT2D. Die Untereinheiten UTX, PTIP und PA1 sind für den KMT2C und KMT2D Komplex spezifisch, wobei UTX als H3K27 Demethylase fungiert (Froimchuk et al., 2017). KMT2D bildet in diesem Komplex das Stützprotein und verhindert ein Auseinanderfallen des Komplexes in Zellen (Froimchuk et al., 2017; Jang et al., 2017).

KMT2D stellt in Säugetieren die wichtigste Methyltransferase für die Monomethylierung von H3K4 (H3K4me1) dar (Froimchuk et al., 2017; Zhang et al., 2015). In einem Histonmodifikationsprofil kann bei einem *KMT2D* Knockdown bei H3K4me1 die stärkste Reduktion beobachtet werden (Guo et al., 2013). Eine verstärkte Monomethylierung von H3K4 ist vor allem für *Enhancer* Regionen bekannt und ist für transkriptionell aktives Chromatin typisch (Ford and Dingwall, 2015; Guo et al., 2013; Zhang et al., 2015). *Enhancer* Regionen sind kurze, in ihrer Basenabfolge charakteristische DNA-Abschnitte von 200-500 bp, die Bindestellen für Transkriptionsfaktoren darstellen. Die daran gebundenen Transkriptionsfaktoren ermöglichen die Bindung und Aktivierung von KMT2D, wodurch die *Enhancer* Region über die H3K4me1 modifiziert und dadurch die Zugänglichkeit des Chromatins verändert wird. Durch diese Modifizierung können weitere Proteine binden, den *Enhancer* aktivieren und über verschiedene Protein-Protein-Wechselwirkungen die Verbindung zur Promotorregion eines Gens sowie die RNA Polymerase II Aktivität beeinflussen. Somit kann die Gentranskription reguliert werden (Campbell and Reece, 2009; Ford and Dingwall, 2015; Froimchuk et al., 2017; Guo et al., 2013).

Die Funktion von KMT2D als Hauptregulator von *Enhancern* in Zellen beeinflusst viele biologische Prozesse, wie die Regulation der Zellentwicklung, der Zelldifferenzierung, den Stoffwechsel sowie die Tumorsuppression. Kommt es durch homozygote Mutationen zu einem vollständigen Verlust von *KMT2D*, führt dies bei Mäusen zu embryonalen Letalität (Zhang et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass KMT2D sowohl die Gene für die Myogenese als auch die Gene für die Adipogenese beeinflusst. Zusätzlich reguliert KMT2D die Genexpression während der neuronalen Differenzierung sowie der embryonalen Stammzellentwicklung (Froimchuk et al., 2017). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass KMT2D die Genexpression während der Herzentwicklung und für die B-Zell Entwicklung steuert. So zeigen Mäuse mit einem gezielten *KMT2D* Knockdown in kardialen Vorläuferzellen schwere kardiale Defekte (Froimchuk et al., 2017). Neben den von Kunze *et al.* detektierten *KMT2D* Mutationen in kardialen Angiosarkomen, wurden Mutationen in *KMT2D* und anderen für chromatinmodifizierende Proteine kodierenden Genen auch mit angeborenen Herzkrankheiten assoziiert (Guo et al., 2013; Kunze et al., 2014).

Auch in anderen Tumorentitäten sind Mutationen in *KMT2D* bereits bekannt. Die am häufigsten detektierten *KMT2D* Mutationen in Malignomen sind *frameshift* und *nonsense* Mutationen in der SET oder einer PHD Domäne. So konnten bereits in Medulloblastomen, in Phäochromozytomen, in non-Hodgkin-Lymphomen sowie kutanen T-Zell-Lymphomen, in Karzinomen der Blase, Lunge und Gebärmutter Schleimhaut, in Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus, in Pankreastumoren und Prostatatumoren *KMT2D* Mutationen nachgewiesen werden (Froimchuk et al., 2017; Sun et al., 2019). Des Weiteren ist *KMT2D* sowohl in diffus

großzelligen B-Zell-Lymphomen als auch in folliculären Lymphomen am häufigsten mutiert und wird oft als Tumorsuppressor diskutiert (Lohr et al., 2012; Morin et al., 2011; Pasqualucci et al., 2011; Zhang et al., 2015). Zusätzlich wird durch die Funktion von KMT2D als Koaktivator des Tumorsuppressors p53 die Eigenschaft als Tumorsuppressor verstärkt, denn durch die Herunterregulation von *KMT2D* wird die Expression der Tumorsuppressoren *PTEN* und *TP53* ebenfalls reduziert (Froimchuk et al., 2017; Guo et al., 2012). So könnte ein möglicher Mechanismus für die Tumoringhibition darin bestehen, dass durch KMT2D die H3K4me1 verstärkt wird, was wiederum die Expression von Tumorsuppressoren unterstützt (Sun et al., 2019).

1.4 Verfahren zur Herstellung stabiler Gen defizienter Zellen *in vitro*

Um Gen defiziente Zellen zu generieren eignet sich die siRNA (*small interfering RNA*) Transfektion. Dabei werden kurze RNA Sequenzen, mit einer Länge von 20-25 Nukleotiden durch Endozytose von den Zielzellen aufgenommen. Die siRNA lagern sich in der Zelle an die komplementären RNA Moleküle an, wodurch die Expression der Gene verhindert wird. Da es sich bei der siRNA Transfektion um eine transiente Transfektion handelt und die siRNA nicht stabil ins Genom integriert wird, verdünnt sich diese durch die Proliferation der Zellen heraus und der Effekt des Genknockdowns kann nur kurzfristig untersucht werden. Außerdem zeigen viele Zellen auf die transiente Transfektion eine Stressantwort, sodass allein die Transfektion mit einer Kontroll siRNA zu erheblichen Nebeneffekten führen kann.

Um längerfristige Auswirkungen eines Gen Defizits untersuchen zu können, müssen stabile Gen defiziente Zellen hergestellt werden. Dafür eignet sich unter anderem die CRISPR/Cas9 (*Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated*) Methode sowie die lentivirale shRNA (*small hairpin RNA*) Transduktion. Bei der shRNA Transduktion wird die gegen die Zielsequenz gerichtete shRNA in Form eines Plasmids mittels Lentiviren in die Zielzellen eingebracht. Durch eine gezielte Antibiotikaselektion werden nur die Zellen kultiviert, die das Plasmid mit der shRNA besitzen. Die lentivirale Transduktion ist in 1.4.2 beschrieben.

Mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Methode kann stabil ein Genknockout erzeugt werden. Die Methode ist im Folgenden beschrieben.

1.4.1 CRISPR/Cas9

Seit ein paar Jahren ist die CRISPR/Cas9 (*Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated*) Methode eines der besten Verfahren in der zielgerichteten Veränderung der DNA, das auch als Genomeditierung bezeichnet wird. Das CRISPR/Cas9 System ist ursprünglich ein RNA-vermitteltes Abwehrsystem aus Bakterien und Archaeen gegen Viren (Jinek et al., 2012; Terns and Terns, 2011). Dieses System wurde so verändert, dass es für die genetische Modifikation von eukaryontischen Zellen genutzt werden kann. So wird es bei der Genomeditierung verwendet um Insertionen, Deletionen oder einen Austausch von spezifischen DNA-Sequenzen zu generieren, wodurch Gene gezielt ausgeschaltet oder Mutationen eingefügt werden können.

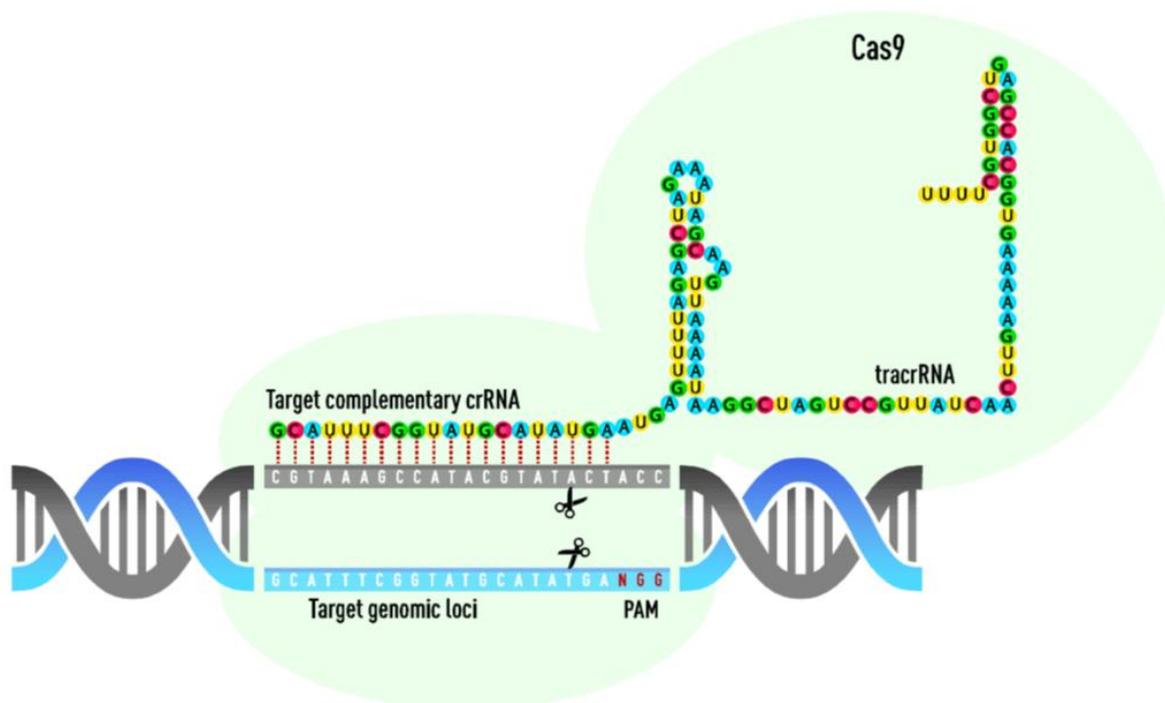


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Anlagerung des CRISPR/Cas9 Konstrukts an den Ziellokus.

Die crRNA (CRISPR RNA) bindet an die komplementäre Zielsequenz im Genom. Durch eine Haarnadelschleife verbundene tracrRNA (*trans-activating crRNA*) Region wird die Cas9 Nuklease (doppelsträngige DNA Endonuklease) zum Ziellokus geführt und induziert dort an der PAM Region einen Doppelstrangbruch. (Abbildung entnommen aus „GeneArt CRISPR Nuclease Vektor Kit“ Protokoll von Life Technologies).

Das CRISPR/Cas9 System besteht aus drei Hauptkomponenten. Zum einen aus der CRISPR-assoziierten Cas9 Nuklease, einer DNA Endonuklease, die die DNA an gewünschter Position schneidet. Die Cas9 Nuklease wird durch die so genannte crRNA (CRISPR RNA) an die gewünschte Zielsequenz geführt. Diese crRNA besteht aus einer zur Zielsequenz

komplementären RNA Sequenz und kann dadurch spezifisch an der zu verändernden Stelle im Genom binden. Des Weiteren wird die tracrRNA (*trans-activating crRNA*) benötigt, welche durch eine Haarnadelschleife mit der crRNA verbunden ist und mit Cas9 einen Komplex bildet. Durch diese beiden Komponenten wird die Cas9 zum spezifischen Genomlokus geführt, an dem sie schneiden soll. In Abbildung 3 ist schematisch das Binden des CRISPR/Cas9 Konstrukts an die Zielsequenz abgebildet.

Damit die Cas9 Nuklease wie gewünscht einen Doppelstrangbruch erzeugt, wird außerdem das so genannte *proto-spacer adjacent motif* (PAM) benötigt, welches direkt am 3'-Ende der zur crRNA komplementären Sequenz im Zielgenom liegt und Cas9 aktiviert (Swarts et al., 2012). Das PAM besteht aus drei Nukleotiden, einem beliebigen Nukleotid, gefolgt von zwei Guaninen (NGG). Es konnte gezeigt werden, dass trotz einer zur crRNA komplett komplementären Zielsequenz, bei fehlendem PAM die Cas9 nicht schneidet (Sternberg et al., 2014). Cas9 erzeugt in Richtung des 3'-Ende einen glatten DNA Doppelstrangbruch drei Basenpaare vom PAM entfernt (Barrangou and Doudna, 2016). Der durch die Cas9 Nuklease verursachte Doppelstrangbruch im Zielgenom wird anschließend von der Zelle durch *non-homologous end-joining* (NHEJ) repariert (Barrangou and Doudna, 2016). Das NHEJ ist ein Reparaturmechanismus der Zelle, bei dem die Enden eines Doppelstrangbruchs ohne homologe Sequenz wieder miteinander verbunden werden. Dadurch können Insertionen und/oder Deletionen entstehen, wodurch meist das Leseraster unterbrochen wird und *out of frame* Mutationen resultieren (Paquet et al., 2016) (siehe Abbildung 4). Alternativ kann der Doppelstrangbruch durch *homology directed repair* (HDR) geschlossen werden (Barrangou and Doudna, 2016). Dafür muss ein Template vorliegen, das homolog zum Ziellokus ist. Dieses Template stellt bei der CRISPR/Cas9 Methode die so genannte *guide*-RNA (gRNA) dar, die mittels Transfektion in die Zielzelle gebracht wird. Trägt die gRNA gewünschte Austauschmutationen, Insertionen oder Deletionen können diese über den HDR Reparaturmechanismus gezielt in die Zielsequenz eingebracht werden (Paquet et al., 2016) (siehe Abbildung 4).

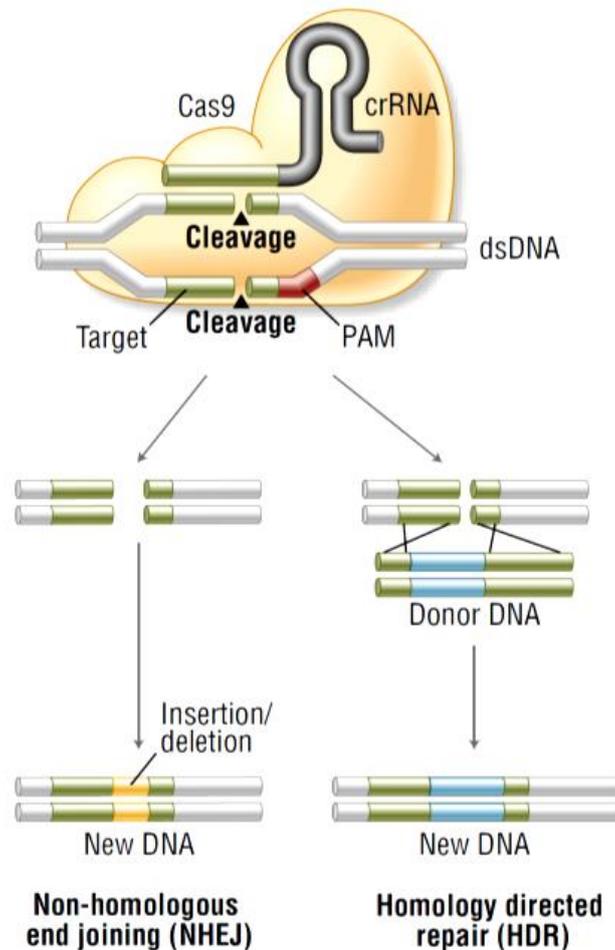


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Reparaturmechanismen des, durch CRISPR/Cas9 erzeugten, Doppelstrangbruchs.

Der durch die Cas9 Nuklease verursachte Doppelstrangbruch in der Zielsequenz kann einerseits durch das *non-homologous end-joining* repariert werden. Dadurch können Insertionen und/oder Deletionen entstehen, wodurch Gene inaktiviert werden können. Andererseits kann der Doppelstrangbruch auch durch *homology directed repair* geschlossen werden. Dafür wird ein Template, homolog zur Zielsequenz, benötigt. Mit Hilfe dieses Mechanismus können gezielt Austauschmutationen integriert werden. (Abbildung entnommen aus „*CRISPR/Cas9 and Targeted Genome Editing: A New Era in Molecular Biology*“ von New England BioLabs).

1.4.2 Lentivirale Transduktion

Die lentivirale Transduktion ist eine Methode, um stabil fremde DNA in Zellen einzubringen. Die Lentiviren gehören zur Familie der Retroviren und besitzen die Eigenschaft ihr virales Genom sowohl in sich teilende als auch in sich nicht teilende Zellen stabil einzubringen (Naldini et al., 1996a). Als weitere Vorteile der lentiviralen Transduktion zählen die Möglichkeit eine relativ lange Sequenz zu transduzieren, wobei das Transgen über Monate hinweg von den transduzierten Zellen exprimiert wird. Dadurch können Langzeiteffekte sehr gut beobachtet werden. Außerdem zeigen die behandelten Zellen nur eine sehr geringe Stressreaktion gegen

die lentivirale Transduktion (Debyser, 2003; Naldini et al., 1996b). Viele lentivirale Vektoren basieren auf dem Humanen Immundefizienz Virus (HIV) (Naldini et al., 1996a), wie auch die in dieser Arbeit verwendeten Lentiviren. Normalerweise tragen Lentiviren auf einem einzelsträngigen RNA Molekül alle Komponenten, die sowohl für die reverse Transkription in doppelsträngige DNA, für die Integration in das Genom der Zielzelle, für die Replikation sowie für die Virusverpackung und deren Knospung notwendig sind.

Die *packaging cells* sind die Zellen, die nach der Transfektion mit den benötigten Plasmiden die lentiviralen Partikel generieren, die für eine anschließende Transduktion in den Zielzellen verwendet werden. In dieser Arbeit wurden dafür HEK293T (*human embryonic kidney 293T*) Zellen verwendet. Aus Sicherheitsgründen wurde das für die lentivirale Transduktion verwendete System so konzipiert, dass die für die Integration der fremden DNA in die Zielzelle und für die Bildung der lentiviralen Partikel notwendigen Faktoren auf drei verschiedene Plasmide aufgeteilt wurden. Das bedeutet, um lentivirale Partikel herstellen zu können, müssen die *packaging cells* mit drei verschiedenen Plasmiden transfiziert werden.

Das erste Plasmid (pGIPZ) besteht aus dem retroviralen Grundgerüst und trägt die Bereiche, die in die lentiviralen Partikel gepackt werden und später in das Zielgenom integriert werden. Diese Bereiche werden über LTR (*long terminal repeat*) Bereiche flankiert. Über den 3'-SIN-LTR (*3'-self-inactivating long terminal repeat*) wird sichergestellt, dass nur replikationsdefiziente Partikel generiert werden. Um einen Genknockdown zu erzeugen, trägt dieses Plasmid unter einem CMV Promotor die shRNA Sequenz gegen das Zielgen, in dieser Arbeit eine shRNA Sequenz gegen *KMT2D* sowie eine Antibiotikaresistenz gegen Puromycin, mittels der erfolgreich transduzierte Zellen selektioniert werden können.

Das zweite Plasmid (psPAX2) ist das Verpackungsplasmid. Dieses Plasmid kodiert für Strukturproteine (kodierende Region *gag*) wie Kapside und Matrixproteine, die für die Verpackung der vom pGIPZ Plasmid kodierenden Bereiche, wie die shRNA, in die lentiviralen Partikel notwendig sind. Des Weiteren werden durch die kodierende Region *pol* die Enzyme reverse Transkriptase, Protease und Integrase kodiert, die die durch die LTRs flankierten Bereiche des pGIPZ Plasmids in das Genom der Zielzelle integrieren.

Das dritte Plasmid (pCI-VSVG) trägt die kodierende Region *env*, die für ein Glykoprotein des Vesicular stomatitis Virus (VSV) kodiert das in die Membran des Virus eingebaut wird.

Durch die Transfektion dieser drei Plasmide in die *packaging cells* werden Viruspartikel gebildet, die unter anderem die gegen das Zielgen gerichtete shRNA Sequenz tragen, diese auch in die Zielzelle transduzieren können aber durch den 3'-SIN-LTR replikationsdefizient sind. Das bedeutet, die verwendeten lentiviralen Partikel sind dahingehend verändert, dass sie nur in der Lage sind eine Zelle zu infizieren und das virale Genom zu integrieren, sich

jedoch nicht replizieren können und daher keine neuen viralen Partikel erzeugen können um weitere Zellen zu infizieren (Zufferey et al., 1998).

Zusätzlich zu der Aufteilung der für die Generierung von lentiviralen Partikel benötigten Faktoren auf drei verschiedene Plasmide, wurden die auf dem HIV basierenden viralen Vektoren dahingehend verändert, dass die Membranproteine nicht vom HIV stammen, sondern vom VSV. Solch veränderte Viren können ein sehr breites Spektrum an Wirtszellen infizieren (Zufferey et al., 1997).

Eine schematische Darstellung der Herstellung lentiviraler Partikel durch die Transfektion der drei Plasmide ist in Abbildung 5 gezeigt. Plasmidkarten der drei verwendeten Plasmide mit ihren funktionellen Bereichen ist in Abbildung 7, Abbildung 8 und Abbildung 9 (Material und Methoden) dargestellt.

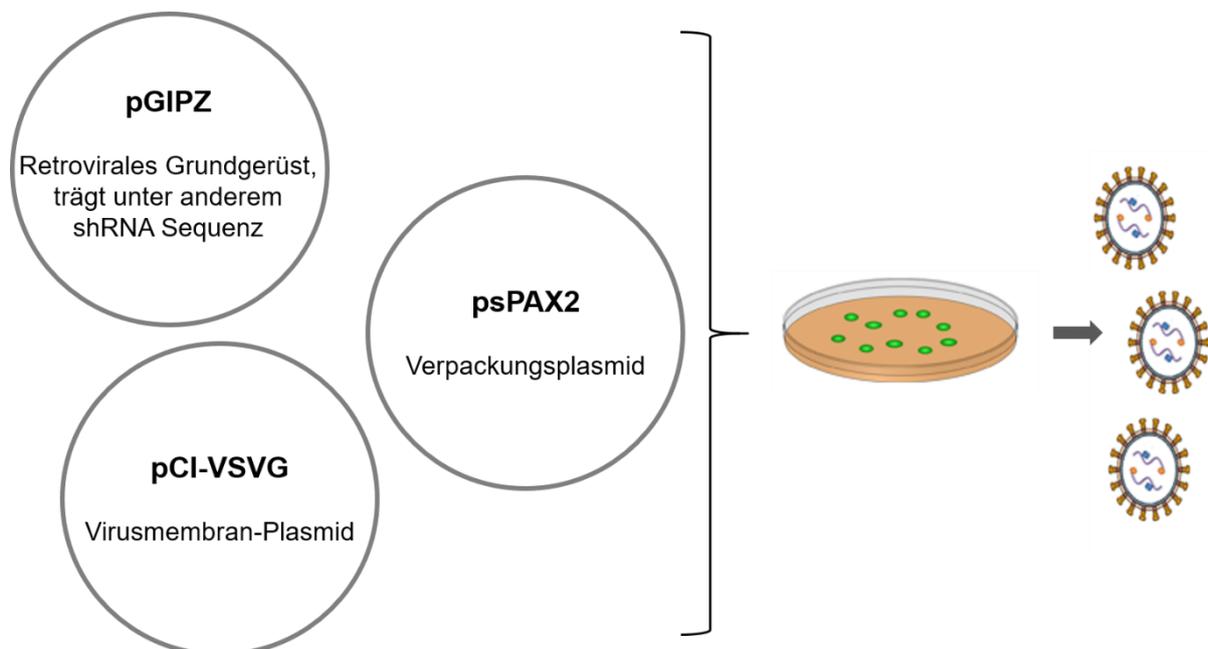


Abbildung 5: Schematische Darstellung der Herstellung lentiviraler Partikel.

Um lentivirale Partikel herzustellen müssen drei verschiedene Plasmide in *packaging cells* transfiziert werden. Ein pGIPZ Plasmid mit unter anderem unter einem CMV Promotor befindenden shRNA Sequenz gegen das Zielgen, das psPAX2 Plasmid, das Strukturproteine und Enzyme kodiert, um die durch das pGIPZ Plasmid kodierenden Bereiche zu Verpacken und in das Zielgenom zu integrieren und das pCI-VSVG Plasmid, das die Membran der lentiviralen Partikel bildet (Abbildung verändert nach „*Lentiviral Packaging Kits*“ von Origene).

1.5 Zielstellung der Arbeit

Primäre kardiale Angiosarkome sind sehr seltene Tumore mit einem schnellen Wachstum, die in der Regel aufgrund ihrer Lage inoperabel sind. Auch angesichts der fehlenden Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika und Strahlentherapie ist die Prognose der primären kardialen Angiosarkome besonders ungünstig. Die Pathogenese dieser Tumore ist weitestgehend unbekannt. Neben bereits bekannten Mutationen in *TP53*, *KRAS* und *CDKN2A* wurden in tNGS Untersuchungen von Kunze *et al.* zum ersten Mal in zwei von sechs Fällen verschiedene *missense* Mutationen in *KDR* identifiziert werden. Auch eine rekurrente Mutation in einem für Endothelien wichtigen Signalmolekül, der *PLCG1* wurde in zwei von sechs Fällen nachgewiesen. Es konnte also in vier von sechs kardialen Angiosarkomen eine Mutation im *KDR/PLCG1* Signalweg, der in endothelialen Zellen wichtig für die Regulation der Proliferation und der Differenzierung ist, nachgewiesen werden. Diese Mutationen im *KDR/PLCG1* Signalweg spielen für die Pathogenese der kardialen Angiosarkome eine wichtige Rolle. In zwei dieser vier Fälle konnten zusätzlich zu den *KDR* bzw. *PLCG1* Mutationen an verschiedenen Stellen Stoppmutationen in *KMT2D* identifiziert werden. Diese Stoppmutationen führen vermutlich zur Inaktivierung von *KMT2D*. *KMT2D* kodiert für eine Histon Lysin Methyltransferase, die die Monomethylsierung von H3K4 katalysiert. Auch in anderen Tumorentitäten, wie z.B. in non-Hodgkin-Lymphomen, T-Zell-Lymphomen und Lungenkarzinomen, konnten bereits *KMT2D* Mutationen nachgewiesen werden.

Um nun die Rolle von *KMT2D* für die Pathogenese der kardialen Angiosarkome besser zu verstehen, bestand das Ziel dieser Arbeit darin, die Auswirkungen der *KMT2D* Mutationen in kardialen Angiosarkomen zu untersuchen. Dafür wurden stabile *KMT2D* defiziente HUVEC erzeugt. Da kardiale Angiosarkome aus Endothelzellen hervorgehen wurden diese Zellen für die Analysen verwendet. Zur Etablierung der stabilen *KMT2D* defizienten HUVEC wurden zwei Methoden angewendet, zum einen die CRISPR/Cas9 Methode und zum anderen die lentivirale Transduktion. Da *KMT2D* ein chromatinmodifizierendes Protein ist, sollten die Auswirkungen der *KMT2D* Inaktivierung auf die Chromatinstruktur untersucht werden. Dazu sollte das ATAC-Seq Verfahren verwendet werden, mit dem zwischen für die Transposase zugänglichem und damit als offen bezeichnetem und geschlossenem Chromatin unterschieden werden kann. Um differentiell exprimierte Gene zu detektieren und dadurch Rückschlüsse über möglicherweise beeinflusste Signalwege ziehen zu können, sollten Genexpressionsanalysen durchgeführt werden. Dafür sollten die *KMT2D* defizienten Zellen mittels RNA-Seq sequenziert werden. Im Anschluss an diese beiden Sequenzierungsanalysen sollten funktionelle Versuche mit, in den *KMT2D* defizienten Zellen, differentiell regulierten Genen durchgeführt werden.

Zusätzlich sollte der Effekt des *KMT2D* Defizits in HUVEC auch auf zellulärer Ebene untersucht werden. Insbesondere lag das Augenmerk dabei auf der Proliferation sowie das Migrations- und Invasionspotential *KMT2D* defizienter HUVEC.

2 Material

2.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller & Firmensitz
Autoklav	2540EL	Tuttnauer, Breda; NL
Bioanalyzer	2100	Agilent Technologies, Santa Clara; USA
Blotkammer	Mini-Protean Tetra System	Biorad, Hercules; USA
Brutschrank	HERACell VIOS 160i CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
DNA Sequenzierer	3730xl DNA Analyzer	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
Durchflusszytometer	guava easyCyte HT	Merck Millipore, Burlington; USA
Fluorometer	Qubit	Life Technologies, Carlsbad; USA
Gelkammer	G45/1	Biometra, Göttingen; D
Imaging System	ChemiDoc Touch	Biorad, Hercules; USA
Inkubator	FC 420	Heraeus, Hanau; D
Konfokales Mikroskop	LSM 800	Zeiss, Oberkochen; D
Lichtmikroskop	090-135.002	Leica, Wetzlar; D
Magnetstäbchen	IKA RCT	IKA, Staufen; D

Magnetständer	Dyna Mag 2	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
pH-Messgerät	pH 1000L	VWR, Radnor; USA
Pipeteboy acu	IBS	Integra Biosciences, Hudson; USA
Pipetten	10 µl; 100 µl; 1.000 µl	Biohit, Helsinki; FI
	2 µl; 10 µl; 20 µl	Gilson, Middleton; USA
	10 µl; 20 µl; 100 µl; 1.000 µl	Eppendorf, Hamburg; D
Präzisionswaage	PM480 Delta Range	Mettler-Toledo, Greifensee; CH
Real-Time PCR System	Step One	Life Technologies, Carlsbad; USA
Reinstwassersystem	Direct-Q 3	Merck Millipore, Burlington; USA
Rollmischer	CAT RM 5	neoLab, Heidelberg; D
Rotator	Tube Rotator EU Plug	VWR, Radnor; USA
Schüttler	Swip KL-2	Edmund Bühler, Bodelshausen; D
Sonifizierer	Digital Sonifier 250	Branson, Dietzenbach; D
Spannungsgeber	EV231	Consort, Turnhout; B
	BI0105 LVD	Biometra, Göttingen; D
Spektrophotometer	Nanodrop	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA

Sterilbank	MSC-Advantage Class II Biological Safety Cabinets	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
Swinging bucket Rotor	AH-629	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
Thermoblock	Thermomixer comfort (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg; D
Thermozykler	Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler	Life Technologies, Carlsbad; USA
	Flex Cycler ²	Analytic Jena, Jena; D
Transfer System	Trans-Blot Turbo	Biorad, Hercules; USA
Ultrazentrifuge	Sorvall WX+ Ultra Series Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
Vortexer	Combi-Spin FVL-2400N	Kisker Biotech, Steinfurt; D
	Vortex-Genie 2	Scientific Industries, Bohemia; USA
Wasserbad	Schüttelwasserbad WB22	Memmert, Schwabach; D
	W350	Memmert, Schwabach; D
Zählkammer	Neubauer	LO-Laboroptik, Friedrichsdorf; D
Zentrifugen	5417R	Eppendorf, Hamburg; D
	5415D	Eppendorf, Hamburg; D
	5415R	Eppendorf, Hamburg; D
	5702R	Eppendorf, Hamburg; D

Biofuge 15R	Heraeus, Hanau; D
4K15	Sigma, Osterode am Harz; D
Combi-Spin FVL-2400N	Kisker Biotech, Steinfurt; D

2.2 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller & Firmensitz
12-, 24-, 96-Well Zellkulturplatten	Greiner bio-one, Frickenhausen; D
24-Well Companion Zellkulturplatten	BD Bioscience, Heidelberg; D
6-Well Zellkulturplatten	Sarstedt, Nümbrecht; D
BioCoat Control Zellkultureinsätze (24-Well Platten), 8 µm Poren	Corning, Amsterdam; NL
BioCoat Matrigel Invasionseinsätze (24-Well Platten), 8 µm Poren	Corning, Amsterdam; NL
Chambered Cell Culture Slides (8 Wells)	Corning, Amsterdam; NL
Deckgläschen (24 × 26 mm, 24 × 60 mm)	R. Langenbrinck, Emmendingen; D
DNA LoBind Tubes (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg; D
Einweg-Skalpell	pfm medical ag, Köln; D
Eppendorf Safe-Lock Tubes (2 ml)	Eppendorf, Hamburg; D
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen; D

Kanülen (1,2 x 40 mm)	BD Bioscience, Heidelberg; D
Kryo-Röhrchen CRYO.S	Greiner bio-one, Frickenhausen; D
MicroAmp Clear Adhesive Film	Life Technologies, Carlsbad; USA
MicroAmp Fast Optical 48-Well Reaction Plate (0,1 ml)	Life Technologies, Carlsbad; USA
MicroAmp PCR-Röhrchen (0,1 ml)	Life Technologies, Carlsbad; USA
Millex-HV PVDF Filter, 0,45 µm	Merck Millipore, Burlington; USA
Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gele 4-20% (12-, 15-Well)	Biorad, Hercules; USA
Objektträger, Super Frost	R. Langenbrinck, Emmendingen; USA
PA thick-walled-Ultrazentrifugenröhrchen	Herolab, Wiesloch; D
Petrischale, 92 x 16 mm	Sarstedt, Nümbrecht; D
Premium Surface Filter Tips (10 µl, 100 µl, 1.250 µl)	Nerbe plus, Winsen; D
Qubit Assay Tubes	Life Technologies, Carlsbad; USA
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Sarstedt, Nümbrecht; D
SafeSeal Tips premium (20 µl)	Biozym, Hessisch Oldendorf; D
Serologische Pipetten (5 ml, 15 ml, 25 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen; D
Trans-Blot Turbo Mini-size PVDF Membran	Biorad, Hercules; USA

Trans-Blot Turbo Mini-size Transfer Stacks	Biorad, Hercules; USA
Wägeschalen	Carl Roth, Karlsruhe; D
Zellkulturflaschen (T25, T75)	Sarstedt, Nümbrecht; D
Zentrifugen-Bucket	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA

2.3 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller & Firmensitz
6x DNA Loading Dye	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
Alexa Fluor 568 Phalloidin	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
Ampicillin	Life Technologies, Carlsbad; USA
aq. dest. (Aqua ad iniectabilia)	B Braun, Melsungen; D
Borsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis; USA
BSA	Sigma-Aldrich, St. Louis; USA
Clarity Western ECL Substrat	Biorad, Hercules; USA
Corbit Balsam	Hecht, Kiel-Hassee; D
Dithiothreitol (DTT)	AppliChem, Darmstadt; D
EDTA	Merck KGaA, Darmstadt; D

Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt; D
Ethanol (absolut)	Sigma-Aldrich, St- Louis; USA
Ethidiumbromid	Carl Roth, Karlsruhe; D
ExoSAP-IT	Applied Biosystems, Foster City; USA
Fx Cycle PI/RNase Staining Solution	Life Technologies, Carlsbad; USA
GeneRuler Low Range DNA Marker	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
Glycerol	Sigma-Aldrich, St. Louis; USA
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe; D
HiDi-Formamid	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
Igepal CA-630	Sigma-Aldrich, St. Louis; USA
Isopropanol	Sigma-Aldrich, St. Louis; USA
Kanamycin	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
LB Agar	Life Technologies, Carlsbad; USA
LB Broth	Life Technologies, Carlsbad; USA
MagicMarker XP Western Protein Standard	Life Technologies, Carlsbad; USA
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Sigma-Aldrich, St. Louis; USA
Methanol	Sigma-Aldrich, St. Louis; USA

Mineralöl	Sigma-Aldrich, St. Louis; USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth, Karlsruhe; D
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth, Karlsruhe; D
Noble Agar, Ultrapure	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
Nuklease-freies Wasser	Life Technologies, Carlsbad; USA
NuPAGE LDS Sample Buffer (4x)	Life Technologies, Carlsbad; USA
Sieve 3:1 Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf; D
SOC Medium	Life Technologies, Carlsbad; USA
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG	Life Technologies, Carlsbad; USA
Trans-Blot Turbo 5x Transfer Buffer	Biorad, Hercules; USA
Tris Base	Carl Roth, Karlsruhe; D
Triton X-100	Carl Roth, Karlsruhe; D
Trizma hydrochloride (HCl)	Sigma-Aldrich, St. Louis; USA
Trypan Blau	Life Technologies, Carlsbad; USA
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe; D

Vectashield

Linaris, Dossenheim; D

2.4 Zellen

2.4.1 HUVEC

Die *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC) sind humane, primäre Endothelzellen, die aus der Nabelvene gewonnen wurden. Da endotheliale Zellen die Ursprungszellen der Angiosarkome sind, wurden die HUVEC für die funktionellen Analysen verwendet. Die Zellen wurden von der Firma PromoCell in Kryo-Röhrchen bezogen. Bei den Zellen handelt es sich um gepoolte Zellen von mindestens vier verschiedenen Spendern. Da es sich dabei um Primärzellen handelt, wurden die HUVEC für die durchgeführten Versuche nur von Passage 1 bis 6 verwendet. Durch die relativ kurze Kultivierungsdauer wurden regelmäßig neue Zellpools bezogen und für die Versuche jeweils verschiedenen Zellpools verwendet. Die Zellen wurden in ECGM1 (*Endothelial Cell Growth Medium*) kultiviert.

2.4.2 HeLa-Zellen

Ursprünglich stammen die HeLa-Zellen von einem Zervixkarzinom einer 31-jährigen schwarzen Frau aus dem Jahr 1951 und sind die erste aneuploide, permanent kultivierte humane Epithelzelllinie. Die HeLa-Zellen sind mit dem humanen Papillomvirus 18 (HPV-18) infiziert. Die Zellen wurden vom DSMZ bezogen und als Kryo-Röhrchen im flüssigen Stickstoff gelagert. Für die Versuche wurden die Zellen bis Passage 25 verwendet. Da die Zellen einfach zu transfizieren sind, wurden diese für die Etablierung der CRISPR/Cas9 Methode verwendet. Die HeLa-Zellen wurden in RPMI 1640 Medium mit 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*) und 1% P/S (Penicillin/Streptavidin) kultiviert.

2.4.3 HEK 293T-Zellen

Die HEK (*human embryonic kidney*)-Zellen sind humane, embryonale Nierenzellen. Durch die Transfektion der HEK-Zellen mit der Adenovirus Typ 5 DNA wurde die HEK 293T Zelllinie etabliert. Die HEK 293T-Zellen wurden im Rahmen der Lentivirenherstellung als *packaging cells* verwendet (siehe 3.3) und daher aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Acker bezogen. Die

Zellen wurden bis Passage 6 für die Herstellung der Lentiviren verwendet. Kultiviert wurden die HEK 293T-Zellen in DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) mit 10% FBS.

2.4.4 G55-Zellen

Die G55-Zellen sind eine etablierte humane Glioblastomzelllinie. Diese Zellen wurden zum Titern der lentiviralen Partikel verwendet (siehe 3.3.2) und ebenfalls von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Acker bezogen. Diese Zellen wurden verwendet, da sich diese im Vergleich zu HEK 293T-Zellen oder HeLa-Zellen um etwas schwerer zu transfizierende Zellen handelt. Damit kann eine Transduktionseinheit ermittelt werden, die später besser auf die Transduktion der HUVEC übertragen werden kann. Die G55-Zellen wurden bis Passage 6 verwendet. Kultiviert wurden die G55-Zellen in DMEM mit 10% FBS.

2.5 Zellkulturmedien und -reagenzien

Substanz	Hersteller & Firmensitz
1x Phosphate-Buffered Saline (PBS)	Life Technologies, Carlsbad; USA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, Carlsbad; USA
Endothelial Cell Basal Medium	PromoCell, Heidelberg; D
Endothelial Cell Growth Medium (ECGM1)	PromoCell, Heidelberg; D
Fetal Bovine Serum (FBS)	Life Technologies, Carlsbad; USA
FluoroBrite DMEM	Life Technologies, Carlsbad; USA
FuGene HD Transfection Reagent	Promega, Madison; USA
Kristallviolett	Honeywell, Morristown; USA

Opti-MEM I Reduced Serum Media	Life Technologies, Carlsbad; USA
Penicillin/Streptavidin (P/S)	Life Technologies, Carlsbad; USA
Polybrene	Sigma-Aldrich, St. Louis; USA
PromoFectin-HUVEC	PromoKine, Heidelberg; D
Puromycin	Invivo Gen, San Diego; USA
Recovery-Cell Culture Freezing Medium	Life Technologies, Carlsbad; USA
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium, GlutaMAX Supplement	Life Technologies, Carlsbad; USA
Trypsin-EDTA (0.25%), phenol red	Life Technologies, Carlsbad; USA

2.6 *KMT2D* Sequenz für CRISPR/Cas9 Vektor

Benennung	Sequenz (5' – 3')	Exon
KMT2D-CRISPR-1 US	GGGGACACCACTGGACACCGGTTTT	3
KMT2D-CRISPR-1 LS	CGGTGTCCAGTGGTGTCCCCGGTG	
KMT2D-CRISPR-2 US	GGAGCATCAATCCCATCCAGGTTTT	11
KMT2D -CRISPR-2 LS	CTGGATGGGATTGATGCTCCCGGTG	
KMT2D -CRISPR-3 US	GGGGCTGCCAATGAAAATGGGTTTT	31
KMT2D -CRISPR-3 LS	CCATTTTCATTGGCAGCCCCGGTG	
KMT2D -CRISPR-4 US	GGTCGGAGGGCAGTGAGCGAGTTTT	31
KMT2D -CRISPR-4 LS	TCGCTCACTGCCCTCCGACCCGGTG	

KMT2D -CRISPR-5 US	GTGGTGGCAGAACCGACGGAGTTTT	31
KMT2D -CRISPR-5 LS	TCCGTCGGTTCTGCCACCACCGGTG	
KMT2D -CRISPR-6 US	GGTGAGACCCTCCCAGGAGGGTTTT	39
KMT2D -CRISPR-6 LS	CCTCCTGGGAGGGTCTCACCCGGTG	
KMT2D -CRISPR-7 US	GGAGTGCGAAATTAATACTGGGTTTT	20
KMT2D -CRISPR-7 LS	CCAGTTTAATTTTCGCACTCCCGGTG	

Die verwendeten Sequenzen wurden aus der Sabatini/Lander CRISPR pooled library entnommen (https://www.addgene.org/static/cms/filer_public/ac/24/ac241048-f8c6-4c88-97ea-3e0b9267cf66/sabatini_library_targets.xlsx) (zuletzt gesehen am 27.09.2019) (Wang et al., 2014). Um zu gewährleisten, dass die DNA Oligonukleotid Sequenz in richtiger Orientierung in den CRISPR Nuclease Vektor kloniert wird, müssen am forward Strang 3'-Ende die Nukleotide GTTTT angehängt werden. Der reverse Strang besteht aus der zielgenspezifischen Sequenz in reverser, komplementärer Orientierung mit einem Überhang bestehend aus CGGTG am 3'-Ende. Die Überhänge sind komplementär zu den Überhängen im CRISPR Nuclease Vektor und ermöglichen somit eine Ligation in den Vektor in der richtigen Orientierung. Die Exonangabe bezieht sich auf die Referenzsequenz NG_027827.1 (NCBI).

2.7 Verwendete Primer

Benennung	Sequenz (5' – 3')	Tm	Fragmentlänge
KMT2D_CRP_1_US	GGGCAGGTGTAAGGCCCTCAGG	68,73	147 bp
KMT2D_CRP_1_LS	CGGCGTTGTGCTCTCTGTAAGTGC	67,94	
KMT2D_CRP_2_US	GGGTAGACCTCCATAGGGGTCACAGG	68,24	200 bp
KMT2D_CRP_2_LS	CCCAGTGCCACCAGTCCTCTCC	68,21	

KMT2D_CRP_3_US	AGAGCTCACCAGGCGAGTCAGG	66,14	161 bp
KMT2D_CRP_3_LS	GCGACATAGCCCGTAAGACTGACC	65,81	
KMT2D_CRP_4_US	GGTGATGGGCAAAAAGCTTCAGC	66,73	197 bp
KMT2D_CRP_4_LS	GGCACCTTCTCCTCCAAGTCACC	66,16	
KMT2D_CRP_5_US	GGGTCTTCTCGCTTTTCGACAGG	66,14	150 bp
KMT2D_CRP_5_LS	CACAGGGAAGTTCCACCCATCG	66,61	
KMT2D_CRP_6_US	GCTGCTCTGCTCTGGCTTCTGG	66,76	198 bp
KMT2D_CRP_6_LS	CAGCCCTCAAGAGCCAAAGAGACC	67,26	
KMT2D_CRP_7_US	CCCCATCCCAGGACCTCACC	66,78	173 bp
KMT2D_CRP_7_LS	CTCTCTCAGTGGCAGGATGACAAGG	66,32	

2.8 Verwendete shRNAs

GIPZ KMT2D shRNA RHS4531-EG8085 glycerol set (Dharmacon)

Benennung	Bestellnummer	Sequenz (antisense)	Exon
nsc	RHS4346		
shRNA 1	V2LHS_172470	ATTCGGAACATGTAGATGC	52
shRNA 2	V2LHS_218753	TAATTTTCGCACTCCATGTG	20
shRNA 3	V3LHS_385020	TTCTCAGTCTCCATCTCGT	11
shRNA 4	V3LHS_385023	TTCTGTCAGCCACACACCT	19
shRNA 5	V3LHS_642852	TTCTGTACATTGTGCCGCA	34
shRNA 6	V3LHS_642855	TGAAGAACATGCACTTGGC	48

2.9 Verwendete TaqMan Gene Expression Assays

Gen Symbol	Assay ID	Hersteller & Firmensitz
<i>CLDN5</i>	Hs00533949_s1	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
<i>CLMP</i>	Hs00956747_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
<i>COL1A2</i>	Hs01028956_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
<i>DLL4</i>	Hs00184092_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
<i>GAPDH</i>	Hs99999905_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
<i>HAPLN1</i>	Hs01091999_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
<i>KMT2D</i>	Hs00231606_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
<i>NOTCH4</i>	Hs00965889_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
<i>SOX18</i>	Hs00746079_s1	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
<i>VCAN</i>	Hs00171642_m1	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA

2.10 Puffer und Lösungen

Agarose (1-2% w/v)	0,5 – 1 g Sieve 3:1 Agarose ad 50 ml TBE (0,5x)
Blocklösung (5% w/v)	2,5 g BSA ad 50 ml TBST
Glycerol (50% v/v)	10 ml Glycerol + 10 ml aq. dest.

LB Agar	6,4 g LB Agar ad 200 ml aq. dest.
LB Medium	5 g LB Broth ad 250 ml aq. dest.
Lysepuffer	5 µl 1 M Tris/HCl pH 7,4 + 5 µl 1 M NaCl + 1,5 µl 1 M MgCl + 0,8 µl Igepal CA-630 (100%) ad 500 µl Nuklease-freies H ₂ O
Sample Buffer (2x)	5 ml NuPAGE LDS Sample Buffer (4x) + 1 ml DTT (1 M) + 4 ml aq. dest.
SDS-Laufpuffer (10x)	30,3 g Tris Base + 144,13 g Glycin + 10 g SDS ad 1.000 ml aq. dest.
TBE (5x)	54,5 g Tris Base + 27,8 g Borsäure + 2,9 g EDTA ad 1.000 ml aq. dest.

TBS (20×)	18 g Tris Base + 137 g HCl + 175,6 g NaCl ad 1.000 ml aq. dest.
TBST (1×)	50 ml TBS (20×) + 1 ml Tween 20 +949 ml aq. dest.
Transfer Puffer (1×)	200 ml Trans-Blot Turbo 5x Transfer Buffer + 200 ml Ethanol (absolut) + 600 ml aq. dest.
Transposase-Mix	25 µl Tagment DNA Buffer + 2,5 µl Nextera Tagment DNA Enzyme 1 + 22,5 µl Nuklease-freies H ₂ O

2.11 Verwendete Kits

Kit	Hersteller & Firmensitz
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Life Technologies, Carlsbad; USA
DetachKit	PromoCell, Heidelberg; D
Differential Quik Stain Kit	Polysciences, Inc., Warrington; USA

DyeEx 2.0 Spin Kit	Qiagen, Venlo; NL
Dynabeads CD4 Positive Isolation Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
GeneAmp Fast PCR Master Mix (2x)	Life Technologies, Carlsbad; USA
GeneArt CRISPR Nuclease Vector Kit	Life Technologies, Carlsbad; USA
High Sensitivity DNA Analysis Kit	Agilent Technologies, Santa Clara; USA
iTaq Universal SYBR Green Supermix	Biorad, Hercules; USA
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen, Venlo; NL
NEBNext High-Fidelity 2x PCR Master Mix	New England Bio Labs, Frankfurt/Main; D
Nextera DNA Library Prep Kit 96 samples	Illumina, San Diego; USA
Nextera Index Kit 24 indexes – 96 samples	Illumina, San Diego; USA
Plasmid Midi Kit	Qiagen, Venlo; NL
Plasmid Mini Kit	Qiagen, Venlo; NL
QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen, Venlo; NL
Qubit dsDNA BR Assay Kit	Life Technologies, Carlsbad; USA
Qubit dsDNA HS Assay Kit	Life Technologies, Carlsbad; USA
RNase free DNase Set	Qiagen, Venlo; NL
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Venlo; NL

TaqMan Gene Expression Assay Life Technologies, Carlsbad; USA

TaqMan Reverse Transcription Reagents Life Technologies, Carlsbad; USA

2.12 Antikörper

Name	Spezies	Verdünnung	Hersteller & Firmensitz	Referenz
Anti-Mouse Immunglobulin/HRP	Kaninchen pAb	1:5.000	Dako, Santa Clara; USA	P0260
Anti-Rabbit Immunglobulin/HRP	Ziege pAb	1:5.000	Dako, Santa Clara; USA	P0448
FAK	Kaninchen pAb	1:1.000	Cell Signaling, Danvers; USA	3285
H3K4me1 (monomethyliert)	Kaninchen mAb	1:1.000	Cell Signaling, Danvers; USA	5326
H3K4un (unmodifiziert)	Maus mAb	1:8.000	Digenode, Liege; B	C15200149
P44/42 MAPK (Erk1/2)	Kaninchen mAb	1:4.000	Cell Signaling, Danvers; USA	4695
Phospho-FAK (Y397)	Kaninchen pAb	1:500	Cell Signaling, Danvers; USA	3283

Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (T202/Y204)	Kaninchen mAb	1:1.000	Cell Signaling, Danvers; USA	4370
--	------------------	---------	---------------------------------	------

mAb: monoklonaler Antikörper; pAb: polyklonaler Antikörper

2.13 Software und Internetquellen

Software, Internetquelle	Hersteller, Internetseite
Agilent 2100 Expert Software B.02.08.SI648	Agilent Technologies, Santa Clara; USA
CLC Sequence Viewer 7	Qiagen, Venlo; NL
GraphPad Prism 7	GraphPad Software, San Diego; USA
Image Lab 5.2.1	Biorad, Hercules; USA
InCyte 2.7	Merck Millipore, Burlington; USA
Integrative Genomics Viewer 2.3.75	Broad Institute, Cambridge; USA
Microsoft Office Paket 2010	Microsoft, Redmond; USA
Nanodrop 3.0.0	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
NCBI Blast	https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi
NCBI Publikationsdatenbank	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

Oligo Analysis Tool	https://www.eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/oligo-analysis/
Seq Scanner 2	Thermo Fisher Scientific, Waltham; USA
StepOne Software v2.3	Life Technologies, Carlsbad; USA
Tm Calculator	Life Technologies, Carlsbad; USA
UCSC Genome Browser	https://genome.ucsc.edu/
Vision4D Programm	Arivis AG, München; D
ZEN 2.5 lite	Zeiss, Oberkochen; D

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung der Zellen

3.1.1.1 HUVEC

HUVEC sind humane endotheliale Nabelschnurzellen, die für die funktionellen Analysen verwendet wurden, da Endothelzellen die Ursprungszellen der Angiosarkome sind. Die Kultivierung der HUVEC erfolgte in T25 Zellkulturflaschen, die mit 5 ml endotheliale Medium (Endothelial Cell Growth Medium, ECGM1) befüllt waren. Dieses Medium wurde zusätzlich mit einem *Supplement Mix* versetzt, welcher Wachstumsfaktoren, optimiert für endotheliale Zellen, enthält (0,02 ml/ml FCS; 0,004ml/ml *Endothelial Cell Growth Supplement*; 0,1 ng/ml EGF; 1 ng/ml bFGF; 90 µg/ml Heparin; 1 µg/ml Hydrocortison). Des Weiteren wurde dem Medium 1% Penicillin/Streptavidin zugesetzt. Die Zellen wurden bei 37°C, 100% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert.

Da es sich bei den HUVEC um adhärente Zellen handelt, ist zum Splitten der Zellen eine Trypsinierung notwendig. Dafür wurde das DetachKit von PromoCell verwendet. Dieses Kit enthält eine HEPES-BSS-, eine Trypsin/EDTA- und eine Trypsin-Neutralisierungs-Lösung. Für die Trypsinierung wurden die Zellen zunächst mit 2 ml HEPES-BSS gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin für 2 min bei 37°C im Inkubator inkubiert. Nachdem sich die Zellen, nach mehrmaligem Klopfen gegen die Zellkulturflasche, vom Boden gelöst hatten, wurde das Trypsin mit 2 ml Trypsin-Neutralisierungs-Lösung inaktiviert. Die sich dann in Suspension befindenden Zellen wurden bei 800 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml vorgewärmten ECGM1 resuspendiert. Anschließend wurde mittels Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt und entweder $1,25 \times 10^5$ oder $2,5 \times 10^5$ Zellen in eine neue T25 Zellkulturflasche überführt. Das Splitten der HUVEC erfolgte sobald die Zellen engen Kontakt zueinander aufwiesen und etwa 80% des Bodens der Zellkulturflasche bedeckt war. Da das Teilungspotential von primären Zellen in Kultur begrenzt ist, wurden die kultivierten HUVEC lediglich bis Passage 6 für die funktionellen Analysen verwendet. Dadurch wurden regelmäßig neue Kryo-Stocks von der Firma PromoCell bezogen und alle Analysen mit mindestens zwei verschiedenen Zellpools wiederholt.

3.1.1.2 HeLa-Zellen

HeLa-Zellen sind eine etablierte Zelllinie für humane Epithelzellen, welche gut für Zellkulturversuche geeignet sind, da sie sich leicht transfizieren lassen. Daher wurden sie vor

allem für die Etablierung der CRISPR/Cas9 Methode verwendet. Die Kultivierung der HeLa-Zellen erfolgte in T75 Zellkulturflaschen, die mit 20 ml RPMI Medium versehen wurden. Das Medium wurde zusätzlich mit 10% FBS und 1% Penicillin/Streptavidin (P/S) versetzt. Die HeLa-Zellen wurden bei 37°C, 100% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert.

Auch die HeLa-Zellen sind adhärenente Zellen und müssen daher zum Splitten ebenfalls trypsinisiert werden. Dafür wurden die Zellen zunächst mit 10 ml 1× PBS gewaschen bevor 10 ml Trypsin-EDTA (0,25%) Lösung zu den Zellen gegeben wurde. Die Zellen wurden für ca. 3 min im Inkubator bei 37°C inkubiert und anschließend mehrmals gegen die Zellkulturflasche geklopft, bis sich die Zellen vom Boden gelöst haben. Nachfolgend wurde, um das Trypsin zu neutralisieren, 10 ml RPMI Medium hinzugefügt und die gesamte Zellsuspension in ein 50 ml Falcon überführt. Nach einer Zentrifugation für 3 min bei 800 rpm wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 10 ml frischem RPMI mit 10% FBS und 1% P/S resuspendiert. Je nach gewünschter Menge an Zellen wurden 1 – 2 ml der gelösten Zellen in eine neue T75 Zellkulturflasche mit 20 ml RPMI mit 10% FBS und 1% P/S überführt. Wenn die HeLa-Zellen einen engen Kontakt zueinander aufzeigten und etwa 80% des Bodens der Zellkulturflasche bedeckt war, wurden sie gesplittet. Für funktionelle Analysen wurden die Zellen bis Passage 25 verwendet.

3.1.1.3 HEK 293T-Zellen

Die HEK 293T-Zellen sind eine humane, embryonale Nierenzelllinie, die ebenfalls sehr leicht zu transfizieren sind. Daher wurden sie für die Lentivirenherstellung als *packaging cells* verwendet (siehe 3.3). Die Kultivierung der HEK 293T-Zellen erfolgte in T75 Zellkulturflaschen, die mit 20 ml DMEM versehen wurden. Das Medium wurde zusätzlich mit 10% FBS versetzt. Die HEK 293T-Zellen wurden bei 37°C, 100% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert.

Obwohl die HEK 293T-Zellen adhärenente Zellen sind ist zum Splitten der Zellen keine Trypsinierung notwendig. Bei diesen Zellen wurde zum Splitten das alte Medium entfernt und die HEK 293T-Zellen mit Zugabe von frischem DMEM mit der Pipette vom Boden der Zellkulturflasche gespült und mehrmals resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen in einer 1:20 Verdünnung in eine neue Zellkulturflasche überführt. Sobald die HEK 293T-Zellen engen Kontakt zueinander aufwiesen und etwa 80% des Bodens der Zellkulturflasche bedeckt war, wurden sie gesplittet. Als *packaging cells* wurden die Zellen bis Passage 6 verwendet.

3.1.1.4 G55-Zellen

G55-Zellen sind eine humane Glioblastomzelllinie. Diese wurden zum Titern der lentiviralen Partikel verwendet (siehe 3.3.2). Die Kultivierung der G55-Zellen erfolgte in mit 20 ml DMEM versetzten T75 Zellkulturflaschen. Das Medium wurde zusätzlich mit 10% FBS versetzt. Die G55-Zellen wurden bei 37°C, 100% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ kultiviert.

Das Splitten der G55-Zellen erfolgt wie für die HeLa-Zellen beschrieben (siehe 3.1.1.2). Lediglich wird anstelle von RPMI Medium DMEM verwendet, welchem 10% FBS zugesetzt wurde. Zum Titern der lentiviralen Partikel wurden die G55-Zellen bis Passage 6 verwendet.

3.1.2 Auftauen der Zellen

Die HEK 293T-Zellen sowie die G55-Zellen wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Acker bezogen und in bereits kultivierter Form übernommen.

3.1.2.1 HUVEC

Das Auftauen der HUVEC muss schnell erfolgen und wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die von PromoCell in Form von Kryo-Stocks bezogenen Zellen, 5×10⁵ Zellen pro Kryo-Röhrchen, wurden aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und für 2 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Zellsuspension in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt, in welches 9 ml vorgewärmtes ECGM1 vorgelegt wurde und für 3 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Zellpellet in 1 ml frischem ECGM1 resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf zwei T25 Zellkulturflaschen aufgeteilt, welche zuvor mit 4,5 ml vorgewärmten ECGM1 befüllt wurden. Die Flaschen wurden im Inkubator bei 37°C, 100% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ gelagert. Nach 24 h wurde das Medium abgenommen und 5 ml frisches ECGM1 zu den HUVEC gegeben.

3.1.2.2 HeLa-Zellen

Zum Auftauen der HeLa-Zellen wurde der Kryo-Stock aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und für 2 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Die Zellsuspension wurde in ein 50 ml Falcon mit 20 ml vorgewärmtem RPMI mit 10% FBS und 1% P/S überführt und für 3 min bei 800 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 10 ml RPMI mit 10% FBS und 1% P/S aufgenommen. Die Gesamte Zellsuspension wurde in eine T75 Flasche mit 10 ml

RPMI mit 10% FBS und 1% P/S gegeben und die Zellen im Inkubator verwahrt. Nach 24 h wurde das Medium gegen 20 ml frisches RPMI mit 10% FBS und 1% P/S ausgetauscht.

3.1.3 Einfrieren der HeLa-Zellen

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die konfluent gewachsenen HeLa-Zellen wie in 3.1.1.2 beschrieben trypsinisiert und mit der Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt. $1 - 2 \times 10^6$ Zellen wurden zum Einfrieren verwendet. Diese wurden für 3 min bei 800 rpm zentrifugiert, bevor sie einmal in $1 \times$ PBS gewaschen wurden und anschließend in 1 ml *Recovery-Cell Culture Freezing Medium* aufgenommen wurden. Die Zellen wurden in ein Kryo-Röhrchen überführt und in ein mit Isopropanol befülltes Kühlgefäß gegeben. Dieses Gefäß wurde für 1 – 2 Tage bei -80°C gelagert. Dabei sorgt das Isopropanol für ein langsames und gleichmäßiges Einfrieren der Zellen. Im Anschluss wurden die Kryo-Röhrchen zur Langzeitaufbewahrung in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.1.4 Transiente Transfektion

3.1.4.1 HUVEC

Für eine transiente Transfektion der HUVEC wurde das nicht-liposomale Transfektionsreagenz PromoFectin-HUVEC verwendet. PromoFectin-HUVEC ist ein wasserlösliches polykationisches Polymer, an das die zu transfizierende DNA bindet und durch Endozytose von den Zellen aufgenommen wird. Die HUVEC wurden mindestens 24 h vor der transienten Transfektion in 12-Well Platten ($1 \times 10^5 - 5 \times 10^5$ Zellen/Well) ausplattiert. Zellen einer früheren Passage werden in der geringeren Anzahl ausplattiert, da diese im Vergleich zu einer späteren Passage eine etwas stärkere Proliferation zeigen. Für die Transfektion wurden zunächst zwei Mischungen angesetzt. Zum einen werden $6 \mu\text{l}$ PromoFectin-HUVEC mit $50 \mu\text{l}$ *Endothelial Cell Basal Medium*, ein Medium, welches keinerlei Wachstumsfaktoren enthält, versetzt. Zum anderen werden zu $1,5 - 3 \mu\text{g}$ Plasmid DNA ebenfalls $50 \mu\text{l}$ *Endothelial Cell Basal Medium* gegeben. Beide Mischungen wurden durch kurzes Vortexen gemischt und kurz anzentrifugiert. Anschließend wurde die PromoFectin-HUVEC Mischung zur DNA-Mischung gegeben, erneut durch kurzes Vortexen und anschließendem Herunterzentrifugieren gemischt und dann für 30 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurden die ausplattierten HUVEC einmal mit $500 \mu\text{l}$ $1 \times$ PBS gewaschen und 1 ml *Endothelial Cell Basal Medium* zugegeben. Das Transfektionsgemisch wurde zu den Zellen gegeben, indem es tröpfchenweise über das gesamte Well verteilt wurde. Die Zellen wurden anschließend für 4 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das *Endothelial*

Cell Basal Medium mit dem Transfektionsgemisch von den Zellen entfernt und durch 1 ml ECGM1 ersetzt.

3.1.4.2 HeLa-Zellen

Für eine transiente Transfektion der HeLa-Zellen wurde das nicht-liposomale Transfektionsreagenz FuGene verwendet. Die DNA bindet dabei an ein Polymer und wird in einen positiv geladenen Komplex verpackt, welcher durch Endozytose in die Zelle aufgenommen wird. Am Tag vor der Transfektion wurden 1×10^5 Zellen in eine 12-Well Platte ausplattiert. Vor der Transfektion wurde das Medium der Zellen durch frisches RPMI mit 10% FBS und 1% P/S ausgetauscht. Für das Transfektionsgemisch wurden zu 400 ng Plasmid DNA 2 μ l FuGene gegeben und mit serumfreiem RPMI Medium auf 100 μ l Endvolumen aufgefüllt und durch auf- und abpipettieren gemischt. Der gesamte Ansatz wurde für 15 min bei RT inkubiert, bevor er tröpfchenweise über das gesamte Well verteilt zu den Zellen gegeben wurde. Die Platten wurden anschließend für 48 h bei 37°C im Inkubator inkubiert.

3.2 CRISPR/Cas9

Für die Generierung der CRISPR/Cas9 *KMT2D* Plasmide wurde das GeneArt CRISPR Nuclease Vector Kit von Life Technologies verwendet.

3.2.1 Auswahl der einzelsträngigen DNA Oligonukleotide

Um den im Kit enthaltenen linearisierten CRISPR Nuclease Vektor zu vervollständigen, mussten zunächst zwei einzelsträngige DNA Oligonukleotide mit für den Vektor passenden Überhängen designet werden. Die Oligonukleotide bestehen aus einer 19 – 20 Nukleotid langen Sequenz des Zielgens, welche sich am 3'-Ende direkt neben einer NGG *proto-spacer adjacent motif* (PAM) Sequenz befindet, das aber nicht Bestandteil der Sequenz ist. Die verwendeten Sequenzen sind der „Sabatini/Lander CRISPR pooled library“ entnommen (https://www.addgene.org/static/cms/filer_public/ac/24/ac241048-f8c6-4c88-97ea-3e0b9267cf66/sabatini_library_targets.xlsx) (zuletzt gesehen am 27.09.2019). Diese Bibliothek beinhaltet sgRNA Sequenzen, die für die CRISPR/Cas9 Methode verwendet werden können. Dafür wurde zunächst ein Algorithmus entwickelt, mit dem *in silico* mögliche sgRNA Sequenzen detektiert werden können. Anschließend wurde ein Pool dieser sgRNA Sequenzen, die mit Barcodes versehen wurden, mittels Lentiviren in Zellen transduziert. Nachfolgend wurden die transduzierten Zellen sequenziert und ausgewertet, welche sgRNA

Sequenzen in den Zellen den besten Knockout erzeugten. Insgesamt sind jeweils 10 sgRNA Sequenzen für 7.033 Gene, sowie alle möglichen sgRNA Sequenzen für 84 Gene, die für ribosomale Proteine kodieren, in dieser Bibliothek enthalten (Wang et al., 2014). Um zu gewährleisten, dass die DNA Oligonukleotid Sequenz in richtiger Orientierung in den CRISPR Nuclease Vektor kloniert wird, müssen am forward Strang 3'-Ende die Nukleotide GTTTT angehängt werden. Der reverse Strang besteht aus der zielgenspezifischen Sequenz in reverser, komplementärer Orientierung mit einem Überhang bestehend aus CGGTG am 3'-Ende. Die Überhänge sind komplementär zu den Überhängen im CIRPSR Nuklease Vektor und ermöglichen somit eine Ligation in den Vektor in der richtigen Orientierung.

3.2.2 Generierung der doppelsträngigen Oligonukleotide

Die komplementären DNA Oligonukleotid Sequenzen wurden mittels einer Annealing Reaktion zu einer Doppelstrang Sequenz zusammengelagert, welche anschließend in den CRISPR Nuclease Vektor ligiert werden konnte. Für die Annealing Reaktion wurden 5 µl des forward Strangs (200 µM) mit 5 µl des reversen Strangs (200 µM) und 2 µl 10x Oligonucleotide-Annealing-Puffer mit 8 µl DNase/RNase-freiem Wasser gemischt. Der gesamte Ansatz wurde für 4 min bei 95°C in einem Heizblock inkubiert, bevor er innerhalb von 5 – 10 min auf 25°C abkühlt wurde. Durch das Erhitzen auf 95°C werden mögliche Bindungen oder Haarnadelschleifen, die sich innerhalb der einzelnen forward bzw. reverse Strängen gebildet haben, aufgehoben. Während des Abkühlens lagern sich dann die komplementären Basen zwischen den forward und den reversen Strängen aneinander, wobei eine doppelsträngige Sequenz mit den entsprechenden Überhängen für die Vektorligation entsteht (siehe Abbildung 6). Anschließend wurde der Ansatz vorsichtig für etwa 5 sec zentrifugiert und leicht gevortext. Dieser 50 µM Ansatz, welcher die doppelsträngige Sequenz enthält, wurde auf eine Arbeitslösung von 5 nM verdünnt.

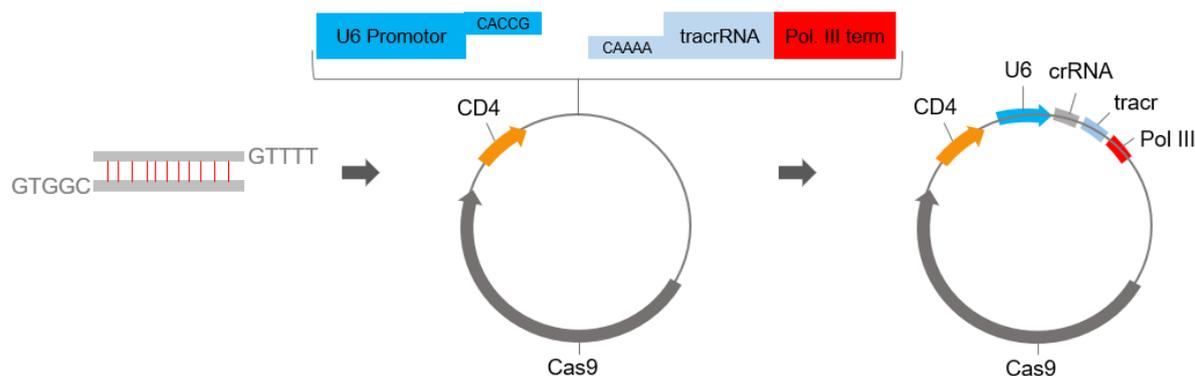


Abbildung 6: Schematische Darstellung zur Generierung des CRISPR Vektors.

Durch die Annealing Reaktion verbinden sich die beiden für das Zielgen designten DNA Oligonukleotid Sequenzen zu einer Doppelstrangsequenz. Diese wird in den linearisierten CRISPR Nuclease Vektor kloniert und zur Vervielfältigung in *E. coli* Zellen transformiert. Anschließend wird durch Sequenzierung das Insert kontrolliert und der Vektor kann in die Zielzellen transfiziert werden. Cas9: CRISPR-assoziierte Cas9 Nuklease; CD4: Reporter Gen für spätere Selektion mit CD4-Antikörper gekoppelten magnetischen Dynabeads; U6: Promotor für die Polymerase III abhängige Expression der Ziel-RNA; crRNA: CRISPR RNA; tracr: *trans-activating* crRNA; Pol III term: Polymerase III Terminator. (Abbildung verändert nach „GeneArt CRISPR Nuclease Vektor Kit“ Protokoll von Life Technologies).

3.2.3 Ligation Reaktion

Danach wurde die doppelsträngige Oligonukleotid Zielsequenz mit den zum CRISPR Nuclease Vektor komplementären Überhängen in den im Kit enthaltenen CRISPR Nuclease Vektor ligiert. Dafür wurden folgende Reagenzien in gelisteter Reihenfolge vereinigt:

5x Ligation Puffer	4 µl
Linearisierter GeneArt CRISPR Nuclease Vektor	2 µl
Doppelsträngige Oligonukleotid Lösung (5 nM)	2 µl
DNase/RNase-freies Wasser	11 µl
T4 DNA-Ligase	1 µl
	20 µl

Der Ansatz wurde durch auf- und abpipettieren gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gestellt und mit der Transformation in One Shot TOP10 Competent *E. coli*, wie in 3.4.1 beschrieben, sowie mit der Aufreinigung der Plasmid DNA, in

3.4.3 beschrieben, fortgefahren. Die aufgereinigte Plasmid DNA wurde anschließend mittels Sanger-Sequenzierung, wie in 3.5 beschrieben, auf die richtige Orientierung der in den Vektor ligierten Oligonukleotide hin kontrolliert und für nachfolgende transiente Transfektionen verwendet.

Der für die CRISPR/Cas9 Methode verwendete Vektor besitzt unter einem CMV Promotor eine für die CRISPR-assoziierte Cas9 Nuklease (eine doppelsträngige DNA Endonuklease) kodierende Region, eine zum Zielgen komplementäre CRISPR-RNA (crRNA) Sequenz und eine *trans-activating* crRNA (tracrRNA). Die crRNA und die tracrRNA führen die Cas9 Nuklease an den spezifischen Genomlokus. In dem verwendeten Vektor werden die crRNA und die tracrRNA zusammen von einem U6 Pol III Typ Promotor aus exprimiert. Pol III Promotoren wie der U6 Promotor, werden für gewöhnlich für die Expression von kurzen RNAs, wie siRNAs oder shRNAs, verwendet, da sie einen definierten Bereich für den Beginn und für die Termination der Transkription besitzen (Ma et al., 2014). Zusätzlich trägt der Vektor noch eine CD4 kodierende Region, wodurch erfolgreich transfizierte Zellen den Oberflächenrezeptor CD4 exprimieren. Darüber können die transfizierten Zellen mit Hilfe von CD4-Antikörper gekoppelten magnetischen Dynabeads selektioniert werden.

3.2.4 Transiente Transfektion und Selektion der CRISPR Nuclease Vektor exprimierenden Zellen

Der in *E. coli* vervielfältigte und anschließend aufgereinigte CRISPR Nuclease Vektor wurde, wie in 3.1.4 beschrieben, mittels transienter Transfektion in die HUVEC bzw. HeLa eingebracht. Durch die im Vektor enthaltene CD4 kodierende Region exprimieren erfolgreich transfizierte Zellen den Oberflächenrezeptor CD4, worüber die Zellen mit CD4-Antikörper gekoppelten magnetischen Dynabeads selektioniert werden können. Für eine Transfektion der HUVEC wurden je nach Passage zwischen 1×10^5 – 5×10^5 Zellen und für eine HeLa Transfektion 1×10^5 Zellen eingesetzt. Die transfizierten HUVEC bzw. HeLa wurden nach 48 h, wie in 3.1.1 beschrieben, trypsinisiert und ausgezählt. Die geernteten Zellen wurden für 5 min bei 420 g zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet zweimal mit je 1 ml im GeneArt CRISPR Nuclease Vektor Kit (Life Technologies) enthaltenen Puffer I gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Puffer I resuspendiert. Während die HUVEC bzw. HeLa gewaschen wurden, wurden die CD4-Antikörper gekoppelten magnetischen *Beads* wie folgt vorbereitet. Die *Beads* wurden gründlich gevortext, bevor je Ansatz 25 µl in ein frisches Reaktionsgefäß überführt wurden und für 1 min in einem Magnetständer inkubiert wurden. Anschließend wurde der Überstand aus dem Reaktionsgefäß entfernt, aus dem Magnetständer genommen und die *Beads* in 100 µl Puffer I resuspendiert. Die *Beads* wurden

erneut für 1 min im Magnetständer inkubiert und der Überstand erneut abgenommen. Anschließend wurden die *Beads* in 25 µl Puffer I resuspendiert.

Die gewaschenen HUVEC bzw. HeLa wurden anschließend zu den vorbereiteten *Beads* gegeben und für 30 min bei 4°C Kühschrank mit Hilfe eines Rotators gemischt, damit die CD4 exprimierenden Zellen an die *Beads* binden können. Nach einer einminütigen Inkubation im Magnetständer wurde der Überstand abgenommen, die *Beads* mit 500 µl Puffer I gewaschen und erneut für 2 min im Magnetständer inkubiert. Insgesamt wurden, die an den *Beads* gebundenen CD4 positiven Zellen, fünfmal gewaschen. Um die gebundenen Zellen von den *Beads* zu lösen, wurden die *Beads* nach dem letzten Waschen in 100 µl Puffer II resuspendiert und 10 µl DETACHaBEAD CD4 zugegeben. Der Ansatz wurde für 45 min im Rotator bei RT inkubiert und anschließend für 1 min im Magnetständer belassen. Der Überstand, indem sich nun die von den *Beads* gelösten und erfolgreich transfizierten Zellen befanden, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Um alle Zellen von den *Beads* zu waschen, wurden die *Beads* noch mindestens zweimal in 500 µl Puffer II resuspendiert, für 1 min im Magnetständer inkubiert und die Überstände vereinigt. Die erfolgreich transfizierten und selektionierten Zellen wurden anschließend für 6 min bei 420 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Zellen wurden dann für weitere Analysen verwendet.

3.3 Stabile Transduktion mittels Lentiviren

Alle Arbeiten, die mit Lentiviren in Zusammenhang stehen, wurden im S2 Labor von Prof. Dr. Acker (Neuropathologie) im Medizinischen Forschungszentrum Seltersberg der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt. Sowohl das Vektorsystem als auch der pGIPZ *non silencing control* (nsc) Vektor wurde von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Acker übernommen. Die pGIPZ shRNA Vektoren gegen *KMT2D* wurden von der Firma Dharmacon bezogen. Die Vektorkarten der verwendeten Vektoren mit den funktionellen Bereichen sind in Abbildung 7, Abbildung 8 und Abbildung 9 gezeigt.

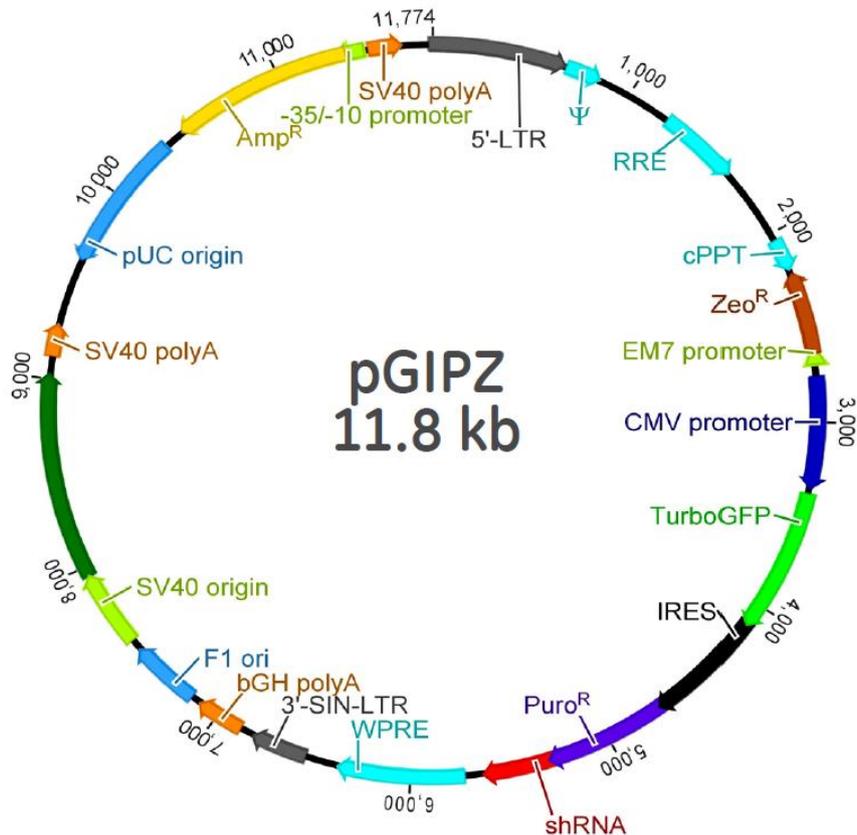


Abbildung 7: Plasmidkarte für das shRNA tragende Plasmid pGIPZ.

Die funktionellen Bereiche dieses Vektors sind dargestellt. Dieses Plasmid besteht aus dem retroviralen Grundgerüst, das anschließend in die lentiviralen Partikel verpackt wird und in das Zielgenom integriert wird. Das Plasmid trägt zusätzlich eine shRNA Sequenz gegen das Zielgen *KMT2D*. Durch die Puromycinresistenz kodierende Region (Puro^R) können erfolgreich transduzierte Zellen mit Hilfe des Antibiotika Puromycin selektioniert werden. Eine optische Kontrolle über eine erfolgreiche Transduktion ist über die TurboGFP kodierende Region gegeben. Durch die 3' *self-inactivating long terminal repeat* (3'-SIN-LTR) Region werden nur replikationsdefiziente Partikel gebildet. Die beiden LTR Regionen (5'-LTR und 3'-SIN-LTR) flankieren die Bereiche, die später in das Zielgenom integriert werden. Die Expression wird über einen CMV Promotor reguliert. (pGIPZ lentiviraler Vektor, Dharmacon).

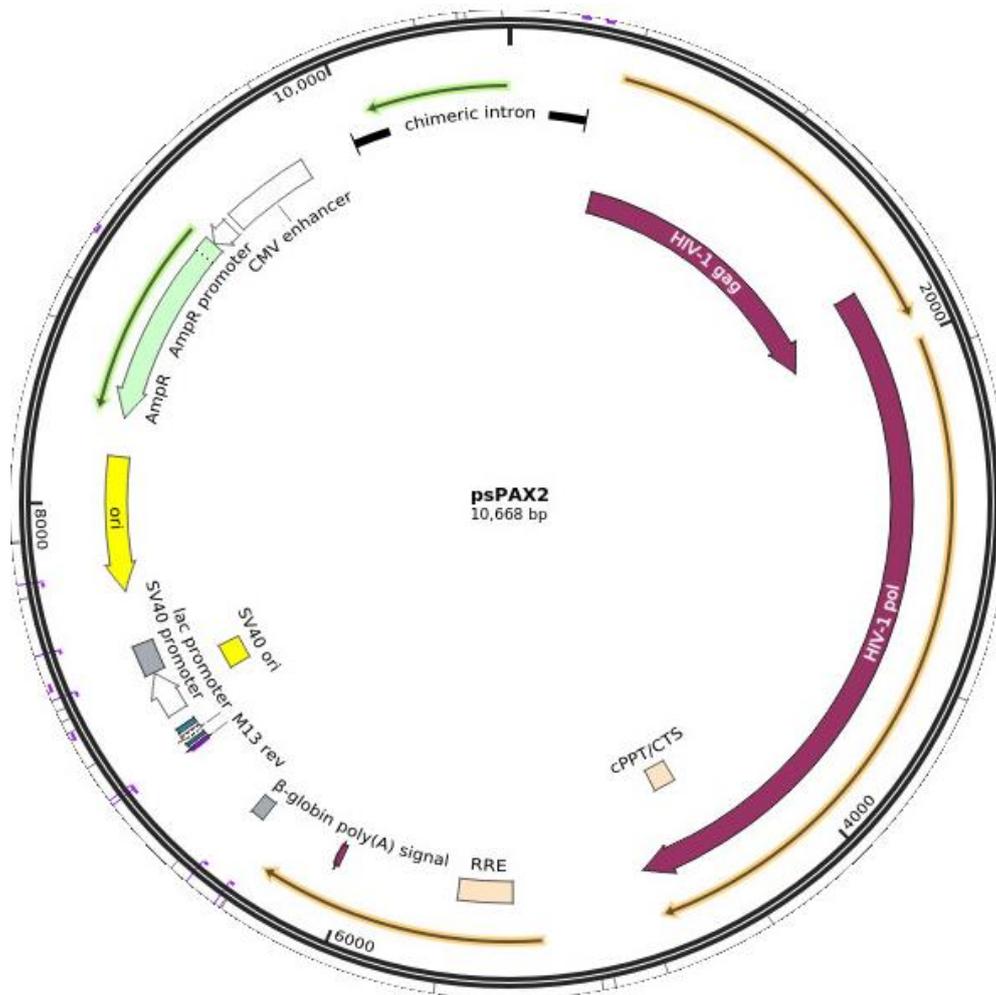


Abbildung 8: Plasmidkarte für das Verpackungsplasmid psPAX2.

Die funktionellen Bereiche dieses Vektors sind dargestellt. Dieses Plasmid kodiert mit der HIV-1 gag Region für Strukturproteine wie Kapside und Matrixproteine. Durch die HIV-1 pol Region werden die Enzyme reverse Transkriptase, Protease und Integrase kodiert. (psPAX2: Lentivirales Verpackungsplasmid, # 12260 Addgene, Didier Trono).

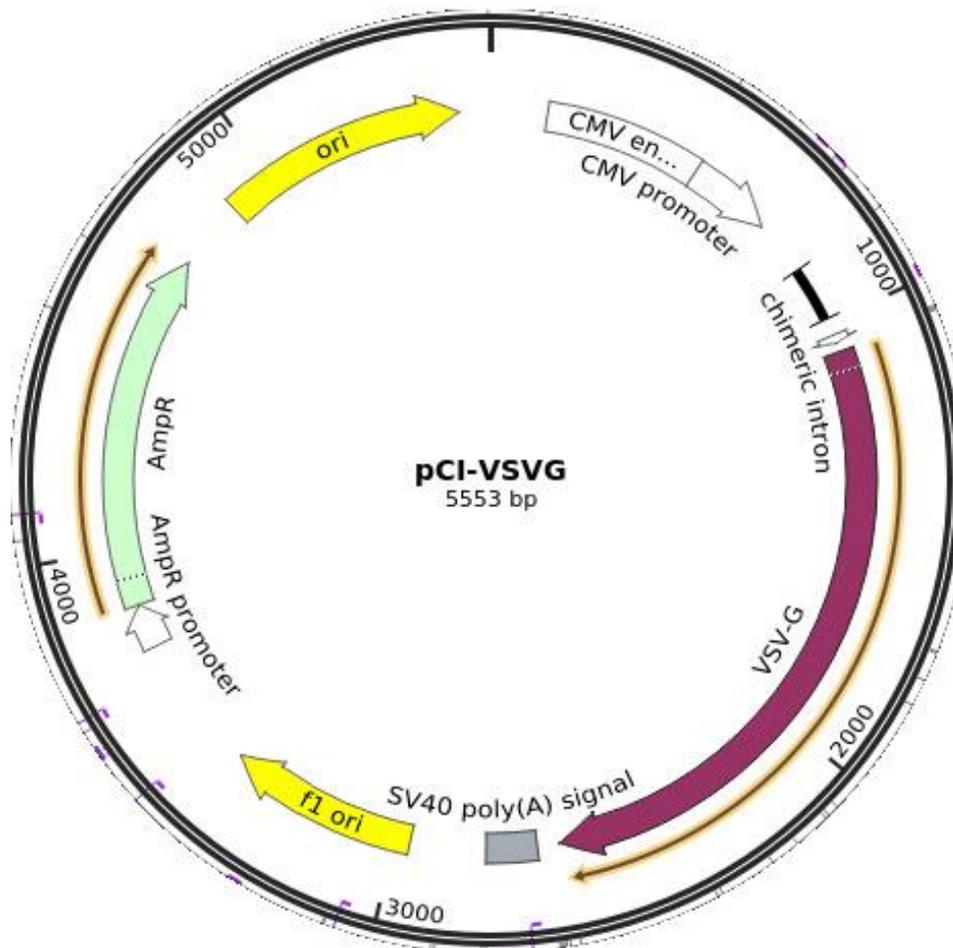


Abbildung 9: Plasmidkarte für das Membranplasmid pCI-VSVG.

Die funktionellen Bereiche dieses Vektors sind dargestellt. Dieses Plasmid kodiert mit der VSV-G Region ein Glykoprotein des VSV (Vesicular stomatitis Virus), das in die Membran der Virenpartikel eingebaut wird. Die Expression wird über einen CMV Promotor reguliert. (pCI-VSVG: lentivirales Membranplasmid, # 1733 Addgene, Garry Nolan).

3.3.1 Herstellung der lentiviralen Partikel durch FuGene HD Transfektion

Für die Herstellung der lentiviralen Partikel sind alle dafür notwendigen Faktoren, aus Sicherheitsgründen, auf drei verschiedenen Plasmide verteilt. Deshalb mussten die so genannten *packaging cells* (in dieser Arbeit HEK 293T-Zellen) mit dem pGIPZ Plasmid, dem psPAX2 Plasmid und dem pCI-VSVG Plasmid transfiziert werden (siehe auch 1.4.2). Das pGIPZ Plasmid (Abbildung 7) besteht dabei aus dem retroviralen Grundgerüst und trägt die Bereiche, die in die lentiviralen Partikel gepackt werden und später in das Zielgenom integriert werden. Diese Bereiche werden über die LTR Bereiche (5'-LTR und 3'-SIN-LTR) flankiert. Zusätzlich wird über den 3'-SIN-LTR (3'-*self-inactivating long terminal repeat*) sichergestellt, dass nur replikationsdefiziente Partikel generiert werden. Auch die shRNA Sequenz gegen das Zielgen *KMT2D* befindet sich auf diesem Plasmid. Durch die Puromycinresistenz und die

TurboGFP kodierende Regionen auf dem pGIPZ Plasmid können erfolgreich transduzierte Zellen später über das Antibiotikum selektioniert und über die GFP Expression per Auge am Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden. Über die GFP Expression wurden auch die Titer der lentiviralen Partikel bestimmt (siehe 3.3.2). Das psPAX2 Plasmid (Abbildung 8) kodiert für Strukturproteine, die für die Verpackung der shRNA notwendig sind und für Enzyme, welche die durch die LTRs flankierten Bereiche des pGIPZ Plasmids, unter anderem die shRNA, in das Genom der Zielzelle integrieren. Über das pCI-VSVG Plasmid (Abbildung 9) wird ein Glykoprotein kodiert, das in die Virusmembran eingebaut wird.

Es wurden lentivirale Partikel zur stabilen Transduktion mit den pGIPZ shRNA 1, 2 und 4 Vektoren gegen *KMT2D* und für den pGIPZ *non silencing control* (nsc) Vektor hergestellt. Die pGIPZ shRNA Vektoren wurden in Form von Glycerol-Stocks von der Firma Dharmacon bezogen. Zur Vervielfältigung und Aufreinigung aller benötigten Plasmide wurden wie in 3.4.2 beschrieben *E. coli* Übernachtskulturen angesetzt und anschließend die Plasmide mittels des Qiagen Plasmid Mini Kits aufgereinigt (siehe 3.4.3).

Am Tag vor der FuGene HD Transfektion wurden $4 - 5 \times 10^6$ HEK 293T-Zellen in T75 Zellkulturflaschen in DMEM mit 10% FBS ausplattiert. Pro Konstrukt wurden zwei Flaschen angesetzt. Am nächsten Tag, 2 h vor der Transfektion, wurde das Medium der HEK 293T-Zellen mit 8 ml frischem DMEM mit 10% FBS ausgetauscht. In einem autoklavierten 1,5 ml Reaktionsgefäß in welches 50 µl Opti-MEM vorgelegt wurde, wurde der Plasmidmix, durch Zugabe der drei benötigten Plasmide, wie folgt angesetzt:

pGIPZ Plasmid (shRNA bzw. nsc)	7,5 µg
Verpackungsplasmid psPAX2	4,875 µg
Hüllenplasmid pCI-VSVG	2,625 µg
	15 µg

Sowohl der Plasmidmix als auch das FuGene HD Transfektionsreagenz wurden auf Raumtemperatur erwärmt, bevor zu dem Plasmidmix langsam und tröpfchenweise 45 µl FuGene HD direkt in die Flüssigkeit gegeben wurden. Der fertige Transfektionsansatz wurde für 5 – 10 sec gevortext und für 20 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz tröpfchenweise zu den HEK 293T-Zellen in die Flaschen gegeben und für 18 – 20 h im Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Transfektionsansatz von den HEK 293T-Zellen abgenommen und durch 10 ml frischem DMEM mit 10% FBS ersetzt.

Sowohl 48 h als auch 72 h nach der Transfektion wurde der Überstand, der die lentiviralen Partikel enthält, von den HEK 293T-Zellen abgenommen und in einem sterilen 50 ml Falcon-Röhrchen bei 4°C gelagert. Die Überstände gleicher Ansätze wurden vereinigt. Um Zellen und Zelltrümmer zu entfernen wurden die gesammelten Überstände für 5 min bei 250 g zentrifugiert, bevor der Überstand durch einen 0,45 µm PVDF-Filter gegeben wurde.

Für das Aufkonzentrieren der lentiviralen Partikel wurde der Partikel enthaltende Überstand in ein steriles 38,5 ml Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert und in das Zentrifugen-Bucket gegeben. Die einzelnen Proben wurden auf 0,1 g genau austariert bevor sie für 4 h bei 20.000 g und 4°C ultrazentrifugiert wurden. Anschließend wurde der Überstand dekantiert. Um restliche Flüssigkeit zu entfernen, wurden die Ultrazentrifugenröhrchen für wenige Minuten invers auf ein Papierhandtuch gestellt, welches zuvor mit UV-Licht bestrahlt und dadurch sterilisiert wurde. Um die Viren zu lösen wurden 120 µl DMEM ohne FBS in das Ultrazentrifugenröhrchen gegeben und für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde ca. 30-mal vorsichtig, ohne Luftblasen zu bilden, auf- und abpipettiert und das resuspendierte Virenpellet in ein autoklaviertes 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Aufkonzentrierte lentivirale Partikel des gleichen Konstrukts wurden vereinigt. Die Partikel wurden noch einmal für 2 min bei 12.000 rpm und 4°C zentrifugiert, bevor der Überstand, in dem sich die Partikel befanden, in 0,1 ml PCR-Röhrchen zu je 20 µl aliquotiert wurde. Die aufkonzentrierten lentiviralen Partikel wurden bei -80°C gelagert.

3.3.2 Titern der lentiviralen Partikel

Mit Hilfe des Titerns wurde die Transduktionseinheit pro ml (TU/ml) der lentiviralen Partikel bestimmt. Es wurde also ermittelt, wie viele Zellen pro ml lentiviraler Partikel transduziert werden können. Um den Titer der Viren zu bestimmen, wurden G55-Zellen, eine humane Glioblastomzelllinie, wie im Protokoll von GE Healthcare beschrieben, mit verschiedenen Virusverdünnungen transduziert. Die G55-Zellen wurden verwendet, da es sich bei diesen Zellen im Vergleich zu HEK- oder HeLa-Zellen um etwas schwerer transduzierbare Zellen handelt. Damit kann eine Transduktionseinheit ermittelt werden, die besser auf die spätere Transduktion von HUVEC übertragen werden kann. Am Tag vor der Transduktion wurden pro zu titernde Virenpartikel in 11 Wells einer 24-Well Platte je 4×10^4 G55 Zellen in DMEM mit 10% FBS ausplattiert. Am Tag der Transduktion wurde, bevor der Virus zu den Zellen gegeben wurde, das Medium von den Zellen abgenommen und mit 225 µl frischem DMEM mit 10% FBS ersetzt. Für das Titern wurden die lentiviralen Partikel in einer fünffachen Verdünnungsreihe mit 80 µl serumfreiem DMEM mit 8 µg/ml Polybrene in zehn Schritten auf eine 9.765.625-fache Verdünnung gemischt. Dabei erhöht Polybrene, ein kationisches Polymer, die Effizienz der Transduktion indem es die Ladungsabstoßung zwischen den viralen

Partikeln und der Zelloberfläche neutralisiert und die viralen Partikel dadurch leichter in die Zielzelle eindringen können. Die Verdünnungsreihe des Virus wurde für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde jede Verdünnungsstufe der lentiviralen Partikel in je ein Well der G55 Zellen gegeben. Ein Well der G55 Platte diente jeweils als Negativkontrolle und wurde nicht transduziert. Der Virus wurde für ca. 18 h im Inkubator bei 37°C auf den Zellen inkubiert. Danach wurde das virusenthaltende Medium von den G55 Zellen abgenommen und frisches DMEM mit 10% FBS zugegeben. Die G55-Platten wurden für 48 h bei 37°C im Inkubator inkubiert. Da die erfolgreich transduzierten Zellen TurboGFP exprimierten, konnten die zu Zellkolonien herangewachsenen Zellen am Fluoreszenzmikroskop per Auge ausgezählt werden. Dafür wurde das Medium von den G55-Zellen abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und 250 µl fluoreszenzfreies Medium (FluoroBrite DMEM) pro Well zu den Zellen gegeben. Alle Verdünnungen in denen einzelne Kolonien unterschieden werden konnten, wurden ausgezählt und die Transduktionseinheit pro ml (TU/ml) nach folgender Formel berechnet:

Anzahl an GFP positiven Kolonien × Verdünnungsfaktor × 40 = TU/ml.

Anschließend wurde der Mittelwert aus den für die einzelnen Verdünnungen ermittelten Transduktionseinheit berechnet. Dieser Wert wurde auch für die spätere MOI-Bestimmung verwendet.

3.3.3 Stabile *KMT2D* shRNA Transduktion in HUVEC

In Vorversuchen wurde, die für die HUVEC am besten geeignete MOI (*Multiplicity of Infection*) bestimmt. Die MOI ist die Transduktionseinheiten pro Zelle, also die Anzahl an Virenpartikel, die auf eine Zelle kommen. Um einen bestmöglichen Knockdown zu erzielen musste die MOI ermittelt werden, die bei den HUVEC einen möglichst starken Knockdown hervorruft, ohne dass zu viele Zellen durch die Behandlung absterben. Dabei wurde sich an den MOIs orientiert, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Acker mit diesem Vektorsystem verwendet werden. So wurden HUVEC mit einer MOI von 20, 60 und 80 transduziert und die Stärke des Knockdowns durch qPCR und Western Blot Analysen ermittelt. Die mit MOI 80 transduzierten HUVEC zeigten dabei den stärksten *KMT2D* Knockdown bei einer Überlebensrate der Zellen nach Behandlung von über 80%, weshalb diese MOI auch für die weiteren Analysen verwendet wurde.

Für die stabile Transduktion wurden frisch aufgetaute HUVEC der Passage 1 verwendet. Je nach vorhandener Menge an lentiviralen Partikeln wurden zwischen 5×10^4 und 1×10^5 Zellen mit ECGM1 ohne P/S in eine 6-Well Platte ausplattiert. Am nächsten Tag wurde, entsprechend des zuvor ermittelten Titters der Viren, ein Gemisch aus Virus und Medium (ECGM1 ohne P/S

mit 8 µg/ml Polybrene) hergestellt. Das Virus-Medium-Gemisch mit MOI 80 wurde für 15 min bei RT inkubiert bevor es zu den HUVEC gegeben wurde und für ca. 18 h bei 37°C im Inkubator inkubierte. Anschließend wurde das Virus-Medium-Gemisch von den Zellen abgenommen und frisches ECGM1 ohne P/S zugegeben. 48 h später wurden die Zellen mit Puromycin selektioniert, damit nur die erfolgreich transduzierten HUVEC, welche den pGIPZ exprimieren und dadurch eine Resistenz gegenüber Puromycin tragen, übrigbleiben. Dafür wurde dem Medium ab diesem Zeitpunkt immer 0,5 µg/ml Puromycin zugesetzt. Erreichten die HUVEC eine Konfluenz von 80 – 90% wurden die Zellen trypsiniert (siehe 3.1.1.1) und in eine T25 Flasche umgesetzt. Nach mindestens dreimaligem Mediumwechsel konnten die transduzierten HUVEC in den S1 Bereich überführt werden, da sich danach keine letiviralen Partikel mehr im Medium befinden.

3.3.4 Einfrieren der stabil transduzierten HUVEC

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die, mittels Lentiviren stabil transduzierten HUVEC, in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dazu wurden die konfluent gewachsenen HUVEC wie in 3.1.1.1 beschrieben mit Hilfe des DetachKit trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellen wurden anschließend für 3 min bei 800 rpm abzentrifugiert und das Zellpellet einmal in 1× PBS gewaschen. Anschließend wurden zwischen $1,9 - 2,5 \times 10^5$ Zellen in 1 ml *Recovery-Cell Culture Freezing Medium* aufgenommen und in ein Kryo-Röhrchen überführt. Diese wurden in eine spezielle Kühlbox gegeben, welche mit Isopropanol befüllt war und für 1 – 2 Tage bei -80°C gelagert. Durch das Isopropanol wird ein langsames und gleichmäßiges Einfrieren der Zellen gewährleistet. Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Kryo-Röhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

3.4 Vervielfältigung und Aufreinigung von Plasmiden

3.4.1 Transformation in *E. coli*

Bei der Transformation wird DNA in Bakterien übertragen und in diesen repliziert und dadurch vervielfältigt. In dieser Arbeit wurden zur Vervielfältigung der später zu transfizierenden oder transduzierenden Plasmide diese in DH5α-T1 chemisch kompetente *E. coli* (Thermo Fisher Scientific) transformiert. Die chemisch kompetenten Zellen sind mit Calciumchlorid behandelt, wodurch die Anlagerung der Plasmid DNA an die Membran der *E. coli* ermöglicht wird. Für die Transformation wurden 25 µl der Bakterien auf Eis aufgetaut und anschließend 2 µl der Plasmid DNA (5 ng/µl) zugegeben und mit der Pipettenspitze zweimal vorsichtig verrührt. Der Bakterien-Plasmid Ansatz wurde für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock im

Wasserbad bei 42°C für 30 sec und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Durch den Hitzeschock öffnen sich Poren in der Zellmembran der *E. coli* wodurch das Plasmid einfacher in die Zelle gelangt. Zu dem Ansatz wurden 250 µl SOC Medium zugegeben und für 1 h bei 37°C und 225 rpm horizontal schüttelnd inkubiert. Danach wurde der Transformationsansatz in zwei verschiedenen Konzentrationen, 1:10 verdünnt und unverdünnt, auf einer LB-Agarplatte ausplattiert. Da jedes der verwendeten Plasmide eine Ampicillinresistenz trägt, wurde der LB-Agar vor dem Gießen mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt. Damit wurde sichergestellt, dass sich nur Zellen vermehren, die das Plasmid aufgenommen haben und damit die Resistent gegen Ampicillin ausgebildet haben.

3.4.2 Übernachtskultur und Glycerol-Stocks

Um die Bakterien, welche das zu vervielfältigende Plasmid tragen, zu vermehren wurde eine Übernachtskultur angesetzt. Dazu wurde mit einer 100 µl Pipettenspitze eine Bakterienkolonie von der LB-Agarplatte gepickt und in ein 50 ml Falcon, welches mit 5 ml LB Medium und 100 µg/ml Ampicillin befüllt war, überführt. Um die Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten, wurden mit Hilfe einer Kanüle Löcher in den Deckel des Falcons gestochen. Über Nacht wurde das Falcon bei 37°C und 250 rpm inkubiert.

Um die transformierten Bakterien langfristig aufzubewahren, wurden Glycerol-Stocks angelegt. Dazu wurden in einem Kryo-Röhrchen 500 µl der Übernachtskultur zu 500 µl Glycerol (50% v/v) gegeben, durch mehrmaliges Invertieren gemischt und bei -80°C aufbewahrt. Um damit neue Übernachtskulturen anzusetzen, kann mit einer Pipettenspitze aus den Glycerol-Stocks kleine Mengen der Bakterien herauskratzt werden und direkt in ein Falcon mit 5 ml LB Medium und 100 µg/ml Ampicillin überführt werden.

Um größere Mengen an Plasmid zu erhalten, wurde die Übernachtskultur auch in größeren Volumina angesetzt. Dafür wurden die aus den Glycerol-Stocks gekratzten Bakterien zuerst für 4 h bei 37°C und 250 rpm in einem Falcon inkubiert, das 2 ml LB Medium mit 100 µg/ml Ampicillin enthält. Der gesamte Ansatz wurde anschließend in einen 1 l Schikaneglas Kolben mit 100 ml LB Medium und 100 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C und 250 rpm inkubiert.

3.4.3 Plasmidpräparation

Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte mit Hilfe des Qiagen Plasmid Mini Kits nach Herstellerangaben. Dafür wurden 4 – 5 ml der Übernachtskultur in ein 15 ml Falcon-Röhrchen überführt und für 15 min bei 6.000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde

abgenommen, das Bakterienpellet in 300 µl Puffer P1 resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Danach wurden 300 µl Puffer P2 zu dem Ansatz gegeben und durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Das Gemisch wurde für 5 min bei RT inkubiert, bevor 300 µl kalter Puffer P3 zugegeben wurde und erneut durch Invertieren gemischt wurde. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden die lysierten Bakterien für 10 min bei 4°C und 16.100 g zentrifugiert. In dieser Zeit wurden die Qiagen Säulen 20 auf ein 15 ml Falcon gesetzt und mit 1 ml Puffer QBT equilibriert. Nach der Zentrifugation wurde der Plasmid-enthaltende Überstand auf die vorbereitete Säule gegeben und hindurchlaufen gelassen. Durch Ionen-Wechselwirkungen bindet die DNA an die Säule. Diese wurde anschließend zweimal mit 2 ml Puffer QC gewaschen. Die Plasmid DNA wurde mit 800 µl Puffer QF eluiert und in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Präzipitation der Plasmid DNA erfolgte durch die Zugabe von 560 µl Isopropanol, das durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt wurde. Die gefällte DNA wurde für 30 min bei 16.100 g und 4°C abzentrifugiert und der Überstand anschließend vorsichtig dekantiert. Das DNA Pellet wurde zum Waschen in 1 ml 70% EtOH resuspendiert und erneut für 10 min bei 16.100 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde wieder vorsichtig abgekippt und das Pellet für ca. 5 min an der Luft getrocknet, bevor es in 20 µl Nuklease-freiem Wasser gelöst wurde. Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des Qubit dsDNA HS Assay Kits.

Die Plasmidaufreinigung der Übernachtskulturen mit einem Volumen von 100 ml erfolgte mit dem Qiagen Plasmid Midi Kit, welches wie das bereits beschriebene Mini Kit angewendet wurde. Lediglich die Puffermengen, Inkubationszeiten und Zentrifugationsschritte wurden nach Herstellerangaben angepasst. Am Ende wurde die luftgetrocknete Plasmid DNA in 100 µl Nuklease-freiem Wasser aufgenommen und die Konzentration mit Hilfe des Qubits wie in 3.7.3 beschrieben bestimmt.

3.5 PCR und Sanger-Sequenzierung

Nach der Klonierung und Vervielfältigung des *KMT2D* CRISPR/Cas9 Vektors wurde mittels konventioneller Sanger-Sequenzierung die richtige Orientierung der Oligonukleotidsequenz kontrolliert sowie die Sequenz auf mögliche Fehler überprüft. Dafür wurde ein Bereich, der den Übergang zwischen Vektor und Oligosequenz sowie die gesamte die *KMT2D* spezifische Oligosequenz überspannt mittels PCR angereichert und sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte über die Kettenabbruchmethode, bei der Didesoxynukleotide, welche mit einem Farbstoff markiert sind, durch die DNA-Polymerase in den neu synthetisierten DNA-Strang eingebaut werden. Die Primer für die entsprechenden Bereiche der Plasmid DNA, welche für die PCR und für die Sanger-Sequenzierung verwendet wurden, wurden sowohl mit Hilfe des

Tm Calculators von ABI, als auch mit dem Tm Calculator von Eurofins designt. Dabei lag die Schmelztemperatur zwischen 65°C und 68°C und es wurde darauf geachtet, dass sich die Temperaturen zwischen dem Vorwärtsprimer (US) und dem Rückwärtsprimer (LS) nicht um mehr als 1°C unterscheiden. Des Weiteren sollten die Primer möglichst auf eine Kombination aus Guanin und/oder Cytosin enden (GC, CG, CC, GG) und in den letzten 5 Basen wenn möglich insgesamt 3 Guanine und/oder Cytosine enthalten. Die designten Primer hatten eine Länge von ca. 20 bp und wurden von Eurofins synthetisiert.

3.5.1 Fast-PCR-Reaktion

Für die Amplifikation der Plasmid DNA wurde diese zunächst auf eine Konzentration von 1 ng/µl verdünnt und dann wie folgt für die PCR in einem 0,1 ml MicroAmp PCR-Röhrchen eingesetzt:

2x GeneAmp Fast PCR Master Mix	10 µl
Nuklease-freies Wasser	5 µl
Vorwärtsprimer (5 pmol/µl)	2 µl
Rückwärtsprimer (5 pmol/µl)	2 µl
Plasmid DNA (1 ng/µl)	1 µl
	<hr/>
	20 µl

Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren wurde der gesamte PCR-Ansatz gemischt. Anschließend wurde dieser mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um Kontaminationen zu vermeiden. Das PCR-Programm wurde wie beschrieben im Veriti 96-Well Fast Thermal Cycler durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
Denaturierung	94°C	10 sec	} 40
Annealing/Elongation	63°C	20 sec	
Kühlung	4°C	∞	

3.5.2 Agarose-Gelelektrophorese

Um das Fast-PCR-Produkt zu kontrollieren wurde ein Teil davon mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf seine Länge überprüft. Mit 50 ml 0,5× TEB Puffer wurde ein 2%-iges Agarosegel angesetzt, welches mit 2 µl Ethidiumbromid versehen wurde. Das Gel wurde in die Elektrophorese Apparatur gesetzt und mit 0,5× TBE-Puffer bedeckt. 5 µl des Fast-PCR-Produkts wurden mit 10 µl Ladepuffer (6× DNA Loading Dye) versetzt und die gesamten 15 µl auf das Agarosegel gegeben. Als Längenmarker wurde der GeneRuler Low Range DNA-Marker verwendet. Bei 136 V wurde das Fast-PCR-Produkt so lange aufgetrennt, bis es die untere Hälfte des Gels erreichte.

3.5.3 Aufreinigung und Sanger-Sequenzierung des PCR-Produkts

Um aus der Fast-PCR-Reaktion nicht eingebauten Nukleotide und überschüssige Primer zu entfernen, wurden die Proben mit Hilfe von ExoSAP-IT enzymatisch aufgereinigt. Dazu wurden zu 5 µl des Fast-PCR-Produkts 2 µl ExoSAP-IT gegeben und der Ansatz bei 37°C für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte, zur Enzyminaktivierung, eine Inkubation bei 80°C für 15 min.

Das aufgereinigte Fast-PCR-Produkt wurde für die Sanger-Sequenzierung verwendet. Dafür wurde die Sequenzierungs-PCR mit dem BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit folgendermaßen angesetzt:

5x BigDye Puffer	2 μ l
Sequenzierprimer (5 pmol/ μ l)	1,5 μ l
Nuklease-freies Wasser	4,5 μ l
BigDye Mix 3.1	1 μ l
Aufgereinigtes Fast-PCR-Produkt	1 μ l
	10 μ l

Die Sequenzierungs-PCR wurde wie nachfolgend beschrieben in einem Cyler durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	96°C	1 min	
Denaturierung	96°C	10 sec	} 25
Annealing	50°C	5 sec	
Elongation	60°C	75 sec	
Kühlung	4°C	∞	

Nach der Sequenzierungs-PCR wurden die Proben über das DyeEx 2.0 Spin Kit aufgereinigt. Dafür wurden die Produkte der Sequenzierungs-PCR mit 10 μ l ddH₂O versetzt und auf die nach Herstellerangaben vorbereiteten DyeEx 2.0 Spin Säulen gegeben. Die Säulen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesteckt und für 4 min bei 2.800 rpm zentrifugiert. 10 μ l der aufgereinigten Probe der Sequenzierungs-PCR wurden mit 10 μ l HiDi-Formamid gemischt und mittels des 3730xl Genetic Analyzers durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt. Durch einen Laser wurden die Farbstoffe an den eingebauten Nukleotiden angeregt und detektiert. Mit der Sequenz Scanner Software 2 wurden die Sequenzen anschließend ausgewertet.

3.6 Proteinnachweis mittels Western Blot Analyse

3.6.1 Herstellung von Zelllysaten

Für die Gewinnung von Zelllysaten wurden die HUVEC wie in 3.1.1.1 beschrieben mittels des DetachKit von PromoCell trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 1× PBS gewaschen. Pro 1×10^5 Zellen wurden 20 µl 2× Sample Buffer zugegeben und die Zellen darin resuspendiert. Die lysierten Zellen wurden dreimal für 3 sec bei einer Amplitude von 10% mit dem Digital Sonifier 250 (Branson) sonifiziert. Die Zelllysate wurden bei -20°C gelagert.

3.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Western Blot Analysen wurde die so genannte *Stain-Free Imaging Technology* von Biorad verwendet. Dafür werden Polyacrylamidgele der Firma Biorad verwendet, bei denen alle geladenen Proteine mittels Fluorophorbindingen schon auf dem Gel sichtbar gemacht werden können. Bei dieser Methode entfällt auch die sonst übliche Ladekontrolle durch ein Housekeeping Gen, weil auf die Gesamtproteinmenge jeder Spur normalisiert werden kann.

Für die Auftrennung der Proteine wurden Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gele 4 – 20% verwendet, die in das Mini-Protean Tetra Blotkammer System eingespannt wurden. Die Laufkammer wurde mit 1× SDS-Laufpuffer bis zur Herstellermarkierung befüllt. Um Luftblasen aus den Geltaschen zu entfernen, wurden diese mit einer mit 1× SDS-Laufpuffer befüllten Spritze gespült. Bevor je 5 µl der Zelllysate auf das Gel aufgetragen wurden, wurden diese für 10 min bei 70°C und 550 rpm im Heizblock denaturiert und anschließend kurz abzentrifugiert. Zusätzlich zu den Proben wurden noch jeweils 3 µl der Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder und des MagicMarker XP Western Protein Standards aufgetragen. Die Multicolor-Ladder enthält farbstoffgekoppelte Proteine verschiedener Größen, welche nach der Gelelektrophorese sichtbar werden und auch nach dem Proteintransfer auf der Membran zu sehen sind. Die im MagicMarker enthaltenen Proteine können nach dem Proteintransfer auf die Membran vom sekundären Antikörper gebunden werden und somit mit Hilfe von Chemolumineszenz sichtbar gemacht und als Markerbanden verwendet werden. Bei 200 V wurden die Proteine für ca. 35 min, bis die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte, aufgetrennt.

3.6.3 Proteintransfer auf PVDF-Membran

Bevor die aufgetrennten Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen wurden, wurde das Gel zunächst in 1× SDS-Laufpuffer geschwenkt und für 2 min unter UV-Licht aktiviert. Durch das UV-Licht werden Tripel-Halogen-Verbindungen, welche in den Stain-free Gelen enthalten sind, aktiviert. Diese aktivierten Halogen-Verbindungen binden an Tryptophanreste im Protein und hängen diesen eine 58 Da (Dalton) kleine funktionelle Gruppe an, welches die Proteinfluoreszenz unter UV-Licht verstärkt und somit die Gesamtmenge an auf das Gel geladenem Protein sichtbar macht. Diese Gesamtproteinmenge kann nach dem Transfer auf die PVDF-Membran quantifiziert werden und die später durch die Antikörperbindung mit den jeweiligen Zielproteinen sichtbar gewordenen spezifischen Banden darauf normalisiert werden. Eine schematische Darstellung ist in Abbildung 10 dargestellt.

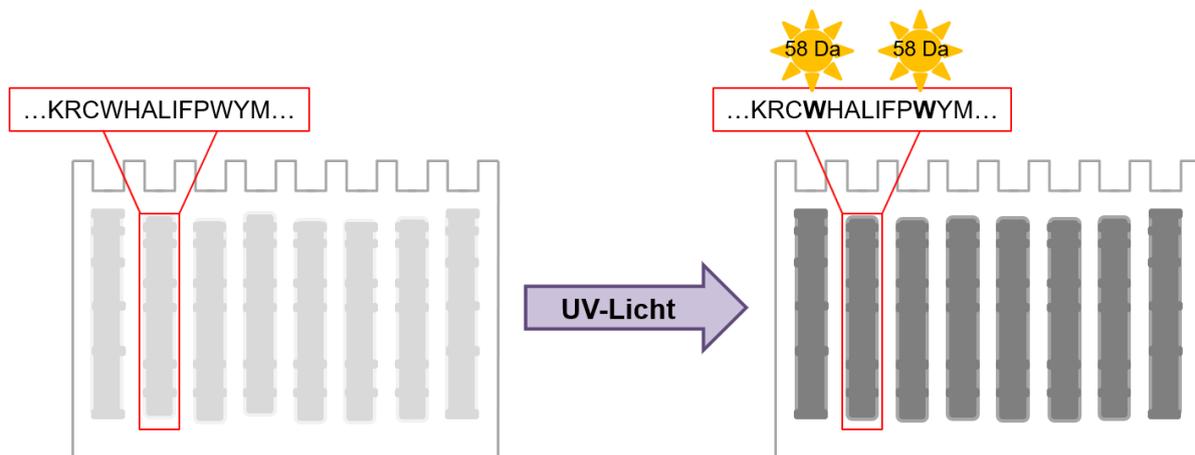


Abbildung 10: Schematische Darstellung der TGX Stain-free Protein Gele.

UV-Licht aktiviert die im Gel enthaltenen Tripel-Halogen-Verbindungen und fördert die kovalente Bindung einer 58 Da kleinen funktionellen Gruppe an die Tryptophanreste der auf das Gel geladenen Proteine. Diese funktionelle Gruppe verstärkt die Fluoreszenz der Proteine unter UV-Licht, wodurch die Gesamtmenge an Protein detektiert werden kann. Nach dem Proteintransfer auf die PVDF-Membran kann diese Gesamtproteinmenge quantifiziert und die durch die Antikörperbindung mit den jeweiligen Zielproteinen sichtbar gewordenen spezifischen Banden darauf normalisiert werden.

Die PVDF-Membran wurde vor der Verwendung für 2 – 3 min in Methanol aktiviert und anschließend bis zum Gebrauch in 1× Transfer Puffer inkubiert. Auch die zu verwendenden Filterpapiere wurden in 1× Transfer Puffer getränkt. In der Kammer des Trans-Blot Turbo Transfer Systems wurden die einzelnen Komponenten für den Proteintransfer zusammengesetzt. Auf das in 1× Transfer Puffer getränkte Filterpapier wurde die aktivierte PVDF-Membran gelegt, darauf das SDS-Gel mit den aufgetrennten Proteinen und

abschließend erneut ein in 1× Transfer Puffer getränktes Filterpapier. Dabei entstandene Luftblasen wurden mit einem Roller entfernt, bevor der Deckel des Transfer Systems aufgesetzt wurde. Mit Hilfe eines elektrischen Feldes von 25 V und 1,3 A wurden die aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf die Membran übertragen. Dabei wurde die Zeit an die Größe der später nachzuweisenden Proteine angepasst und variierte zwischen 5 und 10 min. Nach dem Transfer wurde die Membran in 1× TBST gewaschen, bevor unter UV-Licht die übertragene Gesamtproteinmenge fotografiert wurde. Diese wurde später für die Normalisierung und Quantifizierung der detektierten Proteinbanden verwendet.

3.6.4 Proteinnachweis

Die Membran wurde erneut für 2 – 3 min in 1× TBST gewaschen bevor sie für 1 h in der Blocklösung (5% BSA in 1×TBST) inkubiert wurde, um unspezifische Antikörperbindungen zu vermeiden. Um die spezifischen Proteine, gegen die der jeweilige Antikörper gerichtet ist, nachzuweisen wurde der entsprechende primäre Antikörper in der Blocklösung in einem 50 ml Falcon verdünnt und die Membran darin über Nacht bei 4°C auf dem Rollmischer inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal 5 min in 1× TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei RT mit dem sekundären HRP-gekoppelten Antikörper inkubiert. Dabei richtet sich der Sekundärantikörper gegen die Spezies-spezifischen Epitope des Primärantikörpers. Danach wurde die Membran viermal für 5 min in 1× TBST gewaschen bevor 1 ml einer 1:1 gemischten Clarity Western ECL Substrat Lösung, bestehend aus Clarity Western Peroxide Reagenz und Clarity Western Luminol/Enhancer Reagenz, gleichmäßig auf der Membran verteilt wurden. Im ChemiDoc Touch Imaging System wurden die antikörperspezifischen Banden durch die Chemolumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht und fotografiert.

Die anschließende Auswertung und Quantifizierung der Banden erfolgten mit Hilfe der Image Lab Software. Dabei wurde zuerst die Gesamtproteinmenge quantifiziert, welche nach dem Proteintransfer auf der PVDF-Membran detektiert wurde. Anschließend wurde die Intensität der antikörperspezifischen Proteinbanden bestimmt, indem die Pixelanzahl und die Intensität der Schwarzfärbung ermittelt wurde. Um die relative Intensität der Proteinbanden zu erhalten, wurde diese auf die Gesamtproteinmenge normalisiert.

3.7 DNA- und RNA-Extraktion aus Zellen

3.7.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion der Gesamt-DNA erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Mini Kits. Dabei wurden die Zellen durch einen Proteinase K Verdau lysiert und die DNA durch eine Zentrifugation an die Silicagelmembran in den QIAamp Mini Spin Säulen gebunden. Durch zwei Waschschriffe wird die gebundene DNA von noch vorhandenen Proteinen gereinigt. Die aufgereinigte DNA wird anschließend in Wasser eluiert und kann für weitere Analysen verwendet werden.

Für die DNA-Extraktion wurden die transfizierten Zellen zunächst wie in 3.1.1 beschrieben durch Trypsinierung vom Boden der Zellkulturflasche gelöst und für 4 min bei 420 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen und das Zellpellet in 200 µl 1x PBS resuspendiert. Für den Zellverdau wurden 20 µl der im Kit enthaltenen QIAGEN Protease/Proteinase K, sowie 200 µl Puffer AL zu den Zellen gegeben. Der Ansatz wurde für 15 sec puls-gevortext und für 10 min bei 56°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben kurz abzentrifugiert, bevor die DNA gefällt wurde. Die Fällung erfolgte über die Zugabe von 200 µl Ethanol (100%), puls-Vortexen für 15 sec und kurzes Abzentrifugieren. Die gefällte DNA wurde auf die ebenfalls im Kit enthaltenen QIAamp Mini Spin Säulen gegeben und durch einminütige Zentrifugation bei 8.000 rpm auf die Silicagelmembran der Säule gebunden. Vor dem Waschen der DNA wurde die Säule auf ein neues *Collection Tube* gesetzt und anschließend 500 µl AW1 Puffer auf die Säule gegeben. Nach einer erneuten Zentrifugation für 1 min bei 8.000 rpm wurde die Säule ein weiteres Mal auf ein neues *Collection Tube* gesteckt und 500 µl AW2 Puffer auf die Säule gegeben. Die Proben wurden für 3 min bei voller Geschwindigkeit zentrifugiert. Um Ethanolrückstände von der Säule zu entfernen, wurde die Säule in einem neuen *Collection Tube* für 1 min bei höchster Geschwindigkeit trocken zentrifugiert. Für die Elution der DNA wurde die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Die DNA wurde durch Zugabe von 30 µl Nuklease-freiem Wasser, einer Inkubation von 5 min bei RT und einer anschließenden Zentrifugation von 1 min bei 8.000 rpm von der Säule gelöst.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des Qubits und ist in 3.7.3 beschrieben.

3.7.2 RNA-Extraktion

Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen verwendet. Auch bei dieser Aufreinigung wurden die Zellen lysiert und homogenisiert. Damit die RNA besser an die in den RNeasy Mini Spin Säulen enthaltene Silicagelmembran binden kann, wurde das Lysat mit Ethanol gemischt. Das Lysat wurde auf die Säule gegeben und die RNA bindet an

die Silicagelmembran. Durch mehrere Waschschriffe wurde die gebundene RNA von Verunreinigungen wie Proteinen gereinigt. Um DNA-Rückstände zu entfernen, folgte ein DNase-Verdau auf der Säule. Die aufgereinigte RNA wurde in Wasser eluiert und kann für weitere Analysen verwendet werden.

Für die Extraktion der Gesamt-RNA wurden die geernteten Zellen einmal mit 1x PBS gewaschen, bevor sie in 350 µl RLT Puffer aufgenommen wurden. Zu dem Lyseansatz wurden 350 µl Ethanol (70%) zugegeben und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gut gemischt, bevor der gesamte Ansatz (700 µl) auf die im Kit enthaltenen RNeasy Mini Spin Säulen gegeben wurde. Die Proben wurden für 15 sec bei 8.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die nun auf die Säule gebundene RNA wurde mit 350 µl RW1 Puffer und einer Zentrifugation von 15 sec bei 8.000 g gewaschen und der Durchfluss erneut verworfen. Für den DNase-Verdau auf der Säule wurde das RNase free DNase Set verwendet. Dafür wurde für jede Probe, in einem extra Reaktionsgefäß, 10 µl DNase I Stock Lösung zu 70 µl RDD Puffer gegeben, durch Invertieren sanft gemischt und kurz abzentrifugiert. Der gesamte DNase I Inkubationsmix (80 µl) wurde anschließend direkt auf die Säule gegeben und für 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Säule erneut mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen und für 15 sec bei 8.000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde ebenfalls verworfen. 500 µl RPE Puffer wurden auf die Säule gegeben, für 15 sec bei 8.000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen, bevor erneut 500 µl RPE Puffer auf die Säule gegeben wurden. Es folgte eine Zentrifugation für 2 min bei 8.000 g. Um Ethanolrückstände des Waschpuffers zu entfernen, wurde die Säule auf ein neues *Collection Tube* platziert und für 1 min bei voller Geschwindigkeit trocken zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und die RNA, durch Zugabe von 30 µl RNase-freiem Wasser und einer Zentrifugation für 1 min bei 8.000 g, eluiert.

Die RNA-Konzentration wurde am Nanodrop, wie in 3.7.3 beschrieben, bestimmt.

3.7.3 Konzentrationsbestimmung

Mit Hilfe des Qubits wurde die DNA-Konzentration aufgereinigter Plasmid DNAs und der extrahierten Gesamt-DNAs bestimmt. Dafür wurden zwei Standardproben (#1 und #2), mit einer bekannten DNA-Konzentration, mit einem Fluoreszenzfarbstoff, welcher in die DNA interkaliert, versehen. Anschließend wurde der Farbstoff angeregt und die Intensität der Fluoreszenz spiegelt dabei die DNA-Konzentration wider. Durch die zwei Standardproben wurde eine Standardgerade erstellt, mit dieser anschließend der DNA-Gehalt der Probe bestimmt werden kann. Für DNA-Konzentrationen zwischen 10 pg/µl und 100 ng/µl wurde das Qubit dsDNA HS Assay Kit verwendet und für Konzentrationen von 0,1 ng/µl bis 1.000 ng/µl

das Qubit dsDNA BR Assay Kit. Für die Messung wurde 1 µl der DNA-Lösung verwendet und nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurde zunächst die Arbeitslösung hergestellt, für die pro Probe und pro Standard 1 µl ds-reagent (Fluoreszenzfarbstoff) mit 199 µl Puffer gemischt wurde. Anschließend wurden 190 µl diese Arbeitslösung mit jeweils 10 µl des Standards, #1 bzw. #2, vereinigt und durch leichtes Vortexen in einem Qubit Assay Tube gemischt. 1 µl der zu messenden Proben wurde mit je 199 µl der Arbeitslösung durch leichtes Vortexen in einem Qubit Assay Tube gemischt. Sowohl die fertigen Standards als auch die angesetzten Proben wurden vor der Messung kurz herunterzentrifugiert.

Die RNA-Konzentration wurde mit dem Nanodrop ermittelt. Dabei wird die Absorption von UV-Licht durch die Nukleinsäure gemessen und so der RNA-Gehalt bestimmt. Für die Messung wurde jeweils 1 µl RNA-Lösung verwendet.

3.8 RNA-Expressionsanalysen mittels TaqMan Assay

3.8.1 Reverse-Transkriptase-Reaktion

Für die RNA-Analysen wurde die RNA mittels TaqMan Reverse Transcription Reagents in cDNA umgeschrieben. Pro Ansatz kann ein maximales Volumen an RNA von 7,7 µl eingesetzt werden. Daher wurden je nach RNA-Konzentration 50-300 ng RNA in die Reaktion eingesetzt. Die Reverse-Transkriptase-Reaktion wurde in einem 0,1 ml PCR-Röhrchen angesetzt. Zur Kontrolle auf mögliche Kontaminationen wurde ein Gemisch aus allen RNA-Proben, die in einer Reversen-Transkriptase-Reaktion angesetzt wurden, ohne Reverse-Transkriptase (RT) mitgeführt.

Reagenz	Ansatz mit RT	Ansatz ohne RT
10x RT Buffer	2 µl	2 µl
25 mM MgCl ₂	4,4 µl	4,4 µl
Deoxy NTPs Mixture (2,5 mM)	4 µl	4 µl
Random Hexamers (50 µM)	1 µl	1 µl
RNase inhibitor (20 U/l)	0,4 µl	0,4 µl
MultiScribe Reverse Transkriptase (50 U/l)	0,5 µl	-
RNA	50-300 ng	50-300 ng
H ₂ O	auf 20 µl	auf 20 µl
	20 µl	20 µl

Durch Auf- und Abpipettieren wurde der gesamte Ansatz gemischt und im Flex Cycler nach folgendem Programm inkubiert:

Temperatur	Zeit
25°C	10 min
48°C	30 min
95°C	5 min
4°C	∞

Die synthetisierte cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.8.2 Quantitative-real-time-PCR

Um die relative RNA-Expression in den Zellen zu quantifizieren, wurde eine qPCR mit Hilfe von TaqMan Gene Expression Assays für ausgewählte Zielgene durchgeführt. Die TaqMan Gene Expression Assays bestehen aus spezifischen gegen das Zielgen gerichteten Vorwärts- und Rückwärtsprimern und einer speziellen Sonde, die zwischen den beiden Primern bindet. Die Sonde besitzt am 5'-Ende eine FAM (6-Carboxy-Fluorescein) Fluoreszenzfarbstoffmarkierung und am 3'-Ende einen so genannten *Minor Groove Binder* (MGB) und einen nicht-fluoreszierenden *Quencher* (NFQ), der das Fluoreszenzsignal von FAM unterdrücken kann. Während der Annealing-Reaktion binden sowohl die spezifischen Primer als auch die Sonde an die Zielgensequenz. Trifft die Taq-DNA-Polymerase während der Synthesisierung auf die TaqMan-Sonde wird diese durch die 5'-Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut. Dadurch wird der Fluoreszenzfarbstoff FAM vom *Quencher* getrennt und ein Fluoreszenzsignal kann detektiert werden. Mit jedem PCR-Zyklus nimmt die Fluoreszenzintensität proportional zu synthetisierten DNA-Menge zu.

Für die qPCR Analyse wurde die zuvor synthetisierte cDNA (siehe 3.8.1) auf Eis aufgetaut und in folgenden Reaktionsansatz eingesetzt:

TaqMan Small RNA Assay (genspezifisch)	1 µl
TaqMan Universal PCR Master Mix No AmpErase UNG	10 µl
Nuklease-freies H ₂ O	7 µl
cDNA	2 µl
	20 µl

Der Ansatz wurde in eine MicroAmp Fast Optical 48-Well Reaction Plate gegeben. Jede Probe wurde im Duplikat angesetzt. Als Kontrollen wurden jeweils cDNA Proben mitgeführt, welche ohne RT synthetisiert wurden, sowie Nuklease-freies Wasser ohne weitere Reagenzien. Die qPCR wurde im Step One Real-Time PCR System nach folgendem Programm durchgeführt:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung und Enzymaktivierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	15 sec	} 40
Annealing/Elongation	60°C	1 min	
Kühlung	4°C	∞	

Die RNA-Expression der untersuchten Gene wurde mit Hilfe des StepOne Software v2.3 analysiert. Dafür wurden die Daten in einem *Amplifikation Blot* dargestellt. Die Basislinie für die Hintergrundfluoreszenz wurde zwischen Zyklus 3 und 15 eingestellt, das bedeutet, die Fluoreszenz, die zwischen diesen beiden Zyklen detektiert wurde, wurde als Hintergrund gewertet. Der Zyklus, an dem sich die Fluoreszenz erstmals über die Hintergrundfluoreszenz hebt, gibt den Ct-Wert (*Threshold Cycle*) an (Wong and Medrano, 2005). Dabei überschreiten Proben, die das Zielgen stärker exprimieren, die Hintergrundfluoreszenz schneller und haben dadurch einen kleineren Ct-Wert (Heid et al., 1996). Als endogene Kontrolle wurde das Housekeeping Gen *GAPDH* mitgeführt. Darauf wurden die Ct-Werte des untersuchten Zielgens auf das Housekeeping Gen normalisiert ($\Delta Ct = Ct_{\text{Probe}} - Ct_{\text{Kontrolle}}$). Mit Hilfe dieser Normalisierung kann ausgeschlossen werden, dass stärkere Expressionen durch eine höhere Ausgangsmenge an RNA hervorgerufen werden.

3.9 ATAC-Seq

Im Zellkern liegt die DNA in kompakter Form als Chromatin vor. Dabei kann zwischen offenem Chromatin, das für die Transkription zugänglich ist und geschlossenem Chromatin unterschieden werden. Beim Chromatin bilden Nukleosome die kleinste Einheit. Dabei wird die negativ geladene DNA durch Interaktion mit den positiv geladenen Aminosäuren der Histone zu einer Art Perlenschnur aufgewickelt. Die DNA zwischen zwei Nukleosomen wird als *Linker*-DNA bezeichnet. Durch Wechselwirkungen zwischen den Histonfortsätzen und der *Linker*-DNA verdichtet sich das Chromatin weiter zu so genannten Chromatinfasern. Diese Fasern falten sich weiter auf zu Chromatinschleifen und schließlich zu Chromatiden (Campbell and Reece, 2009). Diese DNA-Verpackung führt zu mehr oder weniger zugänglichen Regionen. So sind z.B. Promotoren und *Enhancer* zugängliche Regionen, da Transkriptionsfaktoren in diesen Bereichen binden können (Buenrostro et al., 2016). Durch

Histonmodifikatoren, wie KMT2D, kann die Ladung der Aminosäuren der Histone und dadurch die Wicklung der DNA verändert werden, wodurch die Transkription von Genen direkt beeinflusst werden kann. So kann es durch diese Ladungsveränderungen zu einer Auflockerung des Chromatins kommen, wodurch für die Transkription benötigte Proteine leichter Zugang zu den Genen haben oder zu einer Verdichtung des Chromatins (Campbell and Reece, 2009).

Der ATAC-Seq (*Assay for Transposase Accessible Chromatin with high-throughput sequencing*) ist eine Methode, mit der die Zugänglichkeit des Chromatins genomweit untersucht werden kann und histonfreie DNA-Regionen detektiert werden können. Dabei wird eine hyperaktive Tn5-Transposase genutzt, die das zugängliche Chromatin schneidet und Adapter, die an der Tn5-Transposase gebunden sind, an die offenen Chromatinregionen ligiert. Mit Hilfe dieser Adapter können die offenen Chromatinregionen anschließend durch eine PCR vervielfältigt und durch *high-throughput*-Sequenzierung identifiziert werden (siehe Abbildung 11). Mit Hilfe dieser Methode können Informationen darüber gewonnen werden, welche Regionen des Genoms nukleosomreiche bzw. nukleosomfreie Regionen sind. Die ATAC-Seq-Methode besteht aus drei wesentlichen Reaktionen: Der Kernpräparation, der Transposition und der Amplifikation (Buenrostro et al., 2016). Bei der Kernpräparation werden die Zellen so behandelt, dass intakte Zellkerne, die das Chromatin enthalten, extrahiert werden. Bei der Transposition werden die offenen Chromatinbereiche durch die Tn5-Transposase geschnitten und die Adapter daran ligiert. Diese mit Adapter versehenen Bereiche werden anschließend bei der Amplifikation vervielfältigt und dann sequenziert.

Um durch den *KMT2D* Knockdown bedingte Veränderungen in der Chromatinstruktur analysieren zu können, wurde die ATAC-Seq Methode mit den transduzierten HUVEC (nsc, shRNA 1 und shRNA 2) durchgeführt. Dafür wurden die HUVEC wie in 3.1.1.1 beschrieben mit dem DetachKit von PromoCell trypsiniert und die Zellzahl bestimmt. 50.000 Zellen wurden pro Ansatz verwendet. Diese wurden zunächst einmal mit 1× PBS gewaschen bevor sie für 5 min bei 500 g und 4°C abzentrifugiert wurden.

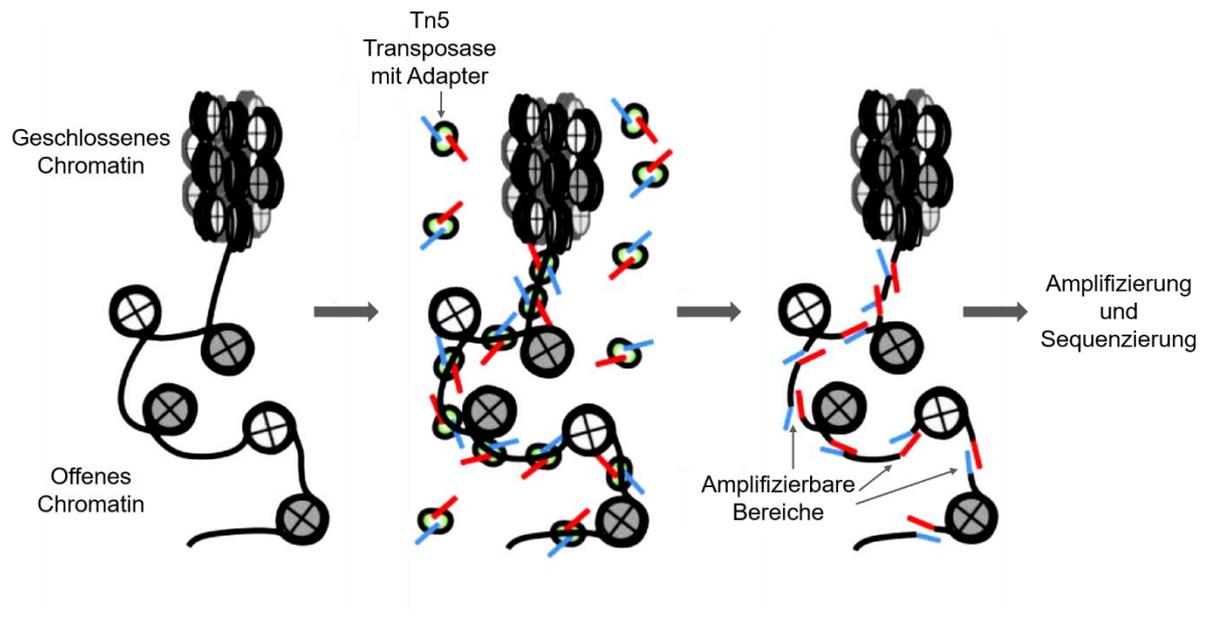


Abbildung 11: Schematische Darstellung des ATAC-Seq.

Die Tn5-Transposase schneidet die zugänglichen Stellen des Chromatins und ligiert daran gebundene Adapter. Mit Hilfe dieser Adapter können die offenen Chromatinbereiche amplifiziert und anschließend sequenziert werden. (Abbildung verändert nach Buenrosto et al., 2016).

3.9.1 Kernpräparation

Für die Kernpräparation wurde der Überstand abgenommen und 50 µl kalter Lysepuffer zu dem Zellpellet gegeben und dieses darin resuspendiert. Es folgte eine Zentrifugation für 10 min bei 500 g und 4°C. Der Überstand wurde danach erneut abgenommen und verworfen. Dadurch wurden lysierte Zellbestandteile entfernt. Die dadurch erhaltenen intakte Zellkerne konnten für die anschließende Transposition verwendet werden.

3.9.2 Transposition und Adapterligation

Bei der Transposition und der Adapterligation werden die offenen Chromatinstrukturen geschnitten und Adapter daran ligiert. Dabei wurden die extrahierten Zellkerne in 50 µl Transposase-Mix, aus dem Nextera DNA Library Prep Kit, resuspendiert und für 30 min bei 37°C und 300 rpm im Heizblock inkubiert.

3.9.3 Aufreinigung der transposierten DNA

Die anschließende Aufreinigung der transposierten DNA erfolgte mittels des MinElute PCR Purifikation Kits von Qiagen. Mit Hilfe dieses Kits kann DNA, die in Puffern mit einer hohen

Salzkonzentration gelöst ist, an eine Silicagelmembran binden und anschließend in einem Puffer mit einer niedrigen Salzkonzentration eluiert werden. Dieses Kit ermöglichte es die aufgereinigte DNA in einem sehr kleinen Elutionsvolumen zu lösen.

Für die Aufreinigung der transposierten DNA wurden die 50 µl Transposasereaktion mit 250 µl PB Puffer gemischt und auf die im Kit enthaltene Säule geladen. Diese wurde für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Säule wurde mit 750 µl PE Puffer gewaschen, erneut für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nachdem die Säule in ein neues 2 ml Auffanggefäß gesetzt wurde, wurde die Säule für 1 min bei 13.000 rpm trocken zentrifugiert. Danach wurde die Säule in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 10 µl EB Puffer auf die Membran der Säule gegeben und 1 min bei RT inkubiert. Nachdem die Säule für 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde konnte die aufgereinigte transposierte DNA üN bei -20°C gelagert werden.

3.9.4 Amplifikation der transposierten DNA

Für die Amplifikation der transposierten DNA wurde der PCR-Reaktions-Mix wie folgt angesetzt:

transposierte DNA	10 µl
Nuklease-freies Wasser	10 µl
Nextera Index N5XX	2,5 µl
Nextera Index N7XX	2,5 µl
NEBNext High-Fidelity 2x PCR Master Mix	1 µl
	50 µl

Die Nextera Indizes N5 und N7 sind verschiedene Adaptersequenzen mit verschiedenen Barcodes. Damit die amplifizierten Sequenzen bei der Sequenzierung den ursprünglichen Proben zugeordnet werden können, muss für jede Probe eine andere Nextera Index Kombination verwendet werden. Dies ist durch XX symbolisiert.

Die Anreicherungsreaktion beinhaltet einen kurzen Prä-Amplifikationsschritt. Dieser dient dazu, die Adapter an der transposierten DNA zu verlängern und zu vervollständigen. Dabei wird die transponierte DNA zwischen die Adapter, welche komplementäre Enden und eine

Barcode-Sequenz tragen, integriert. Dadurch entstehen komplementäre Fragmente, die anschließend in der PCR amplifiziert und später sequenziert werden. In Abbildung 12 ist eine schematische Darstellung gezeigt.

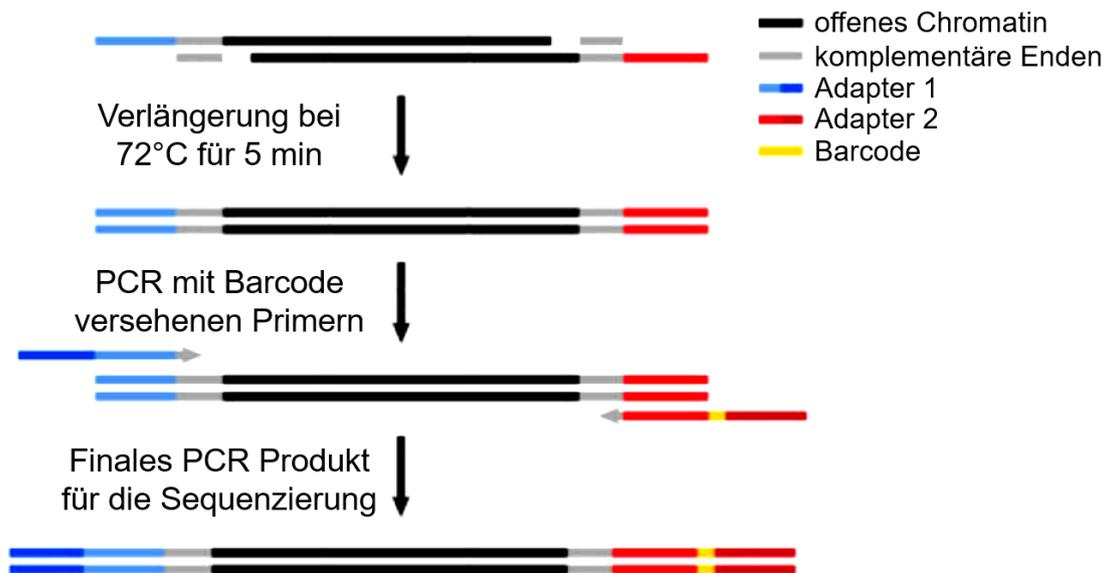


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Amplifikations-PCR.

Vor der Amplifikation der transposierten DNA müssen die Adapter bei 72°C für 5 min verlängert und vervollständigt werden. Während der darauffolgenden PCR wird die transponierte DNA zwischen die Adapter, welche komplementäre Enden und eine Barcode-Sequenz tragen, integriert. (Abbildung verändert nach Buenrostro et al., 2016).

Die angesetzte Anreicherungsreaktion wurde wie beschrieben im Flex Cycler durchgeführt.

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Kurze Prä-Amplifikation	72°C	5 min	
Enzymaktivierung	98°C	30 sec	
Denaturierung	98°C	10 sec	5
Annealing	63°C	30 sec	
Elongation	72°C	60 sec	
Kühlung	4°C	∞	

Bei der Amplifikation der angereicherten transposierten DNA und der Herstellung der Library soll eine Überamplifikation der Proben vermieden werden. Um dies zu vermeiden wurde mit Hilfe einer qPCR die geeignete Zyklenzahl bestimmt, die für eine ausreichende Amplifikation mittels PCR benötigt wird, ohne in eine Sättigung zu gelangen. Die qPCR Reaktion wird mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR Green durchgeführt. Dieser Farbstoff wird während der Amplifikation in die entstehenden Doppelstränge eingebaut und dabei die Intensität der Fluoreszenz detektiert (Pfaffl, 2001; Wong and Medrano, 2005). Dabei nimmt die Fluoreszenz mit der Menge an Amplifikat pro Zyklus exponentiell zu. Für die qPCR wurde folgender Mix angesetzt:

Initiales PCR-Produkt	5 µl
Nextera Index N5XX	0,25 µl
Nextera Index N7XX	0,25 µl
Nuklease-freies Wasser	2 µl
iTaq Universal SYBR Green Supermix	7,5 µl
	15 µl

Die qPCR wurde im Step One Real-Time PCR System nach folgendem Programm durchgeführt:

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	30 sec	
Denaturierung	98°C	10 sec	} 20
Annealing	63°C	30 sec	
Elongation	72°C	60 sec	
Kühlung	4°C	∞	

Mit Hilfe der StepOne Software v2.3 wurde der Verlauf der Amplifikation dargestellt. Um die zusätzliche Zyklenanzahl für die Amplifikation der Proben nach der Anreicherung zu bestimmen, wurde ΔRn gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Dabei gibt der ΔRn Wert die Intensität der Fluoreszenz der Probe an, wovon die Intensität der Hintergrundfluoreszenz abgezogen wurde. Die zusätzliche Anzahl der Zyklen ergibt sich dann aus der Anzahl der Zyklen die benötigt wurde, um ca. 1/3 der maximalen Fluoreszenzintensität zu erreichen. Diese wurde meist zwischen 7 und 9 Zyklen erreicht. Eine grafische Veranschaulichung der Bestimmung der zusätzlichen Zyklenzahl ist in Abbildung 13 dargestellt.

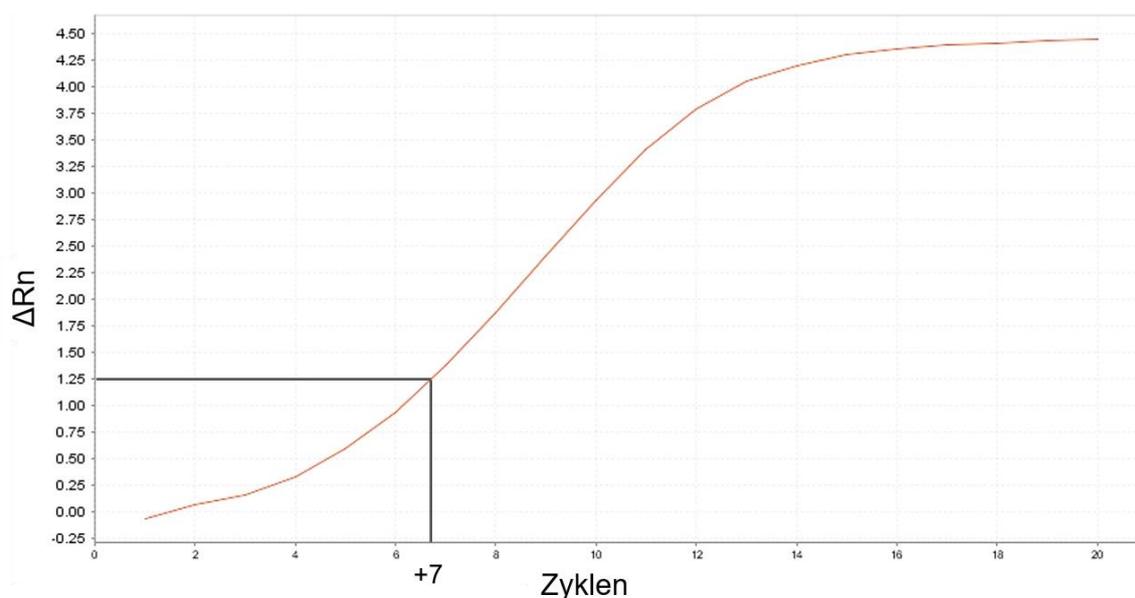


Abbildung 13: Bestimmung der zusätzlichen Zyklenzahl.

Amplifikation der zuvor angereicherten Proben. ΔRn ist gegen die Zyklenzahl aufgetragen. Die zusätzliche Zyklenzahl ergibt sich aus der Anzahl der Zyklen die benötigt wird, um ca. 1/3 der maximalen Fluoreszenzintensität zu erreichen.

Zur Herstellung der später zu sequenzierenden Library wurde das restliche PCR-Produkt der initialen PCR (45 µl) anschließend mit der ermittelten Zyklenzahl, nach folgendem Programm, weiter amplifiziert.

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	30 sec	
Denaturierung	98°C	10 sec	} 7 – 9
Annealing	63°C	30 sec	
Elongation	72°C	60 sec	
Kühlung	4°C	∞	

3.9.5 Aufreinigung der Library

Die amplifizierte Library wurde erneut mittels des MinElute PCR Purifikation Kit aufgereinigt. Die Durchführung war wie oben beschrieben, nur dass zu Beginn 45 µl der amplifizierten Library mit 225 µl PB Puffer versetzt und auf die Säule geladen wurde. Die aufgereinigte Library wurde am Schluss in 10 µl EB Puffer aufgenommen. 3 µl der Library wurden aliquotiert und für die nachfolgenden Qualitätsmessungen verwendet. Die restlichen 7 µl wurden bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert.

3.9.6 Qualitätskontrolle

Die Qualitätsbestimmung der Library erfolgte mit Hilfe des Agilent 2100 Bioanalyzers. Dabei werden die DNA-Fragmente der Library der Größe nach aufgetrennt und die Ergebnisse in einem Elektropherogramm, sowie in einem virtuellen Gelbild dargestellt. Bei einer erfolgreichen Durchführung sind Längenfragmente zwischen 150 und 1.000 bp zu erwarten.

Um in die Agilent Analyse die passende Konzentration der Libraries einsetzen zu können, wurde diese zunächst wie in 3.7.3 beschrieben mit Hilfe des Qubit dsDNA HS Assay Kit ermittelt. Anschließend wurden die Libraries in einer Konzentration von 500 – 700 pg/µl eingesetzt und mit Hilfe des Agilents dargestellt. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

3.9.7 Sequencing by Synthesis Sequenzierung von Illumina

Durch die Sequenzierung wird die Nukleotidabfolge der DNA-Fragmente jeder Library ermittelt. Die Sequenzierung der Libraries erfolgte auf dem NextSeq500 (Illumina) mit der *Sequencing by Synthesis* Methode. Durch einen Hybridisierungsschritt binden die, mit den Adapter versehenen, Library Sequenzen mit ausreichendem Abstand an zu den Adaptern komplementären Sequenzen auf der *Flow Cell*. Durch eine *Bridge-PCR* werden die Library Sequenzen amplifiziert, wodurch *Cluster* entstehen. Jedes *Cluster* ist eine Anhäufung von Kopien der jeweiligen Ursprungssequenz (Mardis, 2008). All diese dadurch getrennt voneinander entstandenen *Cluster* werden gleichzeitig sequenziert. Über die spezifischen Adaptersequenzen, die den Proben angehängt wurden, können die sequenzierten *Cluster* der jeweiligen Ursprungssequenz zugeordnet werden. Bei der Sequenzierung wird eine Base nach der anderen detektiert. Dazu werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide verwendet, an deren 3'-Ende eine Azido-Methylgruppe gebunden ist. Diese Azido-Methylgruppe dient als Terminator für die Polymerisation, so dass in jedem Zyklus immer nur ein Nukleotid eingebaut werden kann (Thiemann et al., 2014). In jedem Zyklus werden die vier verschiedenen Nukleotide zu den *Clustern* gegeben und eingebaut. Überschüssige Nukleotide werden anschließend gewaschen. Nach jedem Zyklus werden die eingebauten fluoreszenzmarkierten Nukleotide mit einem Laser angeregt und das für jedes *Cluster* eingebaute Nukleotid detektiert. Anschließend werden die Fluorophore mit Hilfe eines Waschschrittes entfernt, die am 3'-Ende blockierende Azido-Methylgruppe gespalten und das nächste Nukleotid für jedes *Cluster* kann eingebaut und ermittelt werden (Johnsen et al., 2013; Mardis, 2008; Thiemann et al., 2014). Eine schematische Darstellung der *Sequencing by Synthesis* Methode von Illumina ist in Abbildung 14 gezeigt.

Für die Sequenzierung wurde eine v2 Chemie mit 1x75 Zyklen und die *single end* Methode verwendet. Bei der *single end* Methode werden die amplifizierten Fragmente nur in eine Richtung sequenziert. Pro Probe wurden etwa 50 Mio *reads* generiert. Die Rohdaten wurden von Tobias Zimmermann aus der Arbeitsgruppe Bioinformatics and Systems Biology der Justus-Liebig-Universität Gießen analysiert.

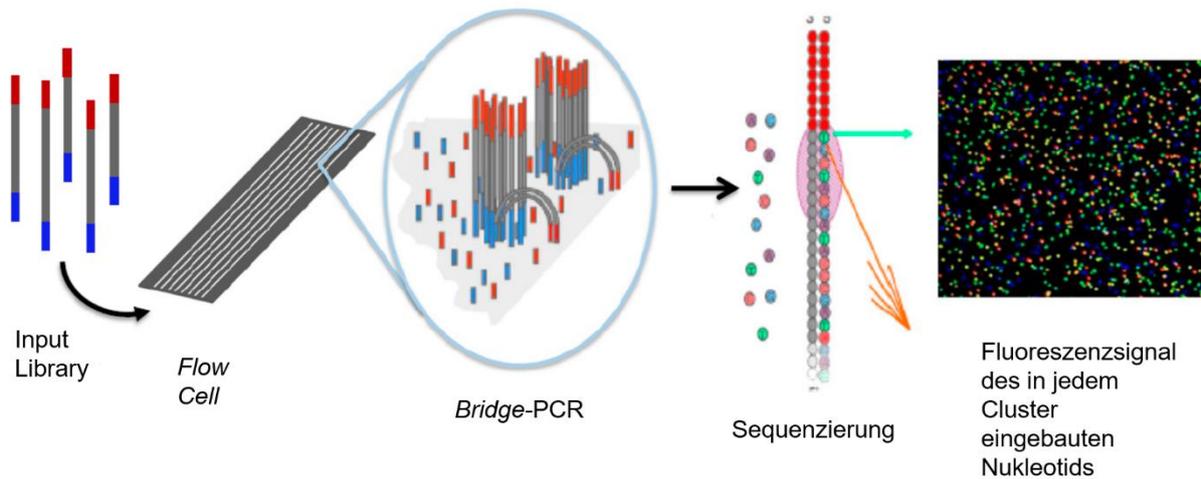


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Sequencing by Synthesis Sequenzierung von Illumina.

Die zu sequenzierenden Library Fragmente binden mittels der ligierten Adapter an die *Flow Cell* auf der sie mit Hilfe der Bridge-PCR amplifiziert werden. Die dadurch entstandenen *Cluster* werden durch fluoreszenzmarkierte Nucleotide Base für Base sequenziert. Durch einen Laser werden die eingebauten Nucleotide angeregt und für jedes *Cluster* detektiert. (Abbildung verändert nach Johnsen et al., 2013).

3.10 RNA-Seq

Durch die RNA-Sequenzierung (RNA-Seq) mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) können differentiell exprimierte Gene in Zellen detektiert werden. Der RNA-Seq mittels NGS ist ein neues Verfahren zur quantitativen Bestimmung der Genexpression. Dafür wird aus der Gesamt-RNA mittels Poly-A-Selektion die mRNA (*messenger RNA*) extrahiert und diese anschließend in cDNA umgeschrieben. Die mRNA ist der Teil der zellulären RNA, welcher für Proteine kodiert. Durch die nachfolgende Sequenzierung der cDNA und das Genom-Mapping werden die cDNA Fragmente mit dem Referenzgenom hg19 abgeglichen. Dabei wird die relative Anzahl der Transkripte der verschiedenen Gene für jede Probe gezählt und somit die exprimierten Gene detektiert. Beim Vergleich der relativen Anzahl der Transkripte zwischen den verschiedenen Proben können differentiell exprimierte Genen nachgewiesen werden. In Abbildung 15 ist ein Schema des Verlaufs dargestellt.

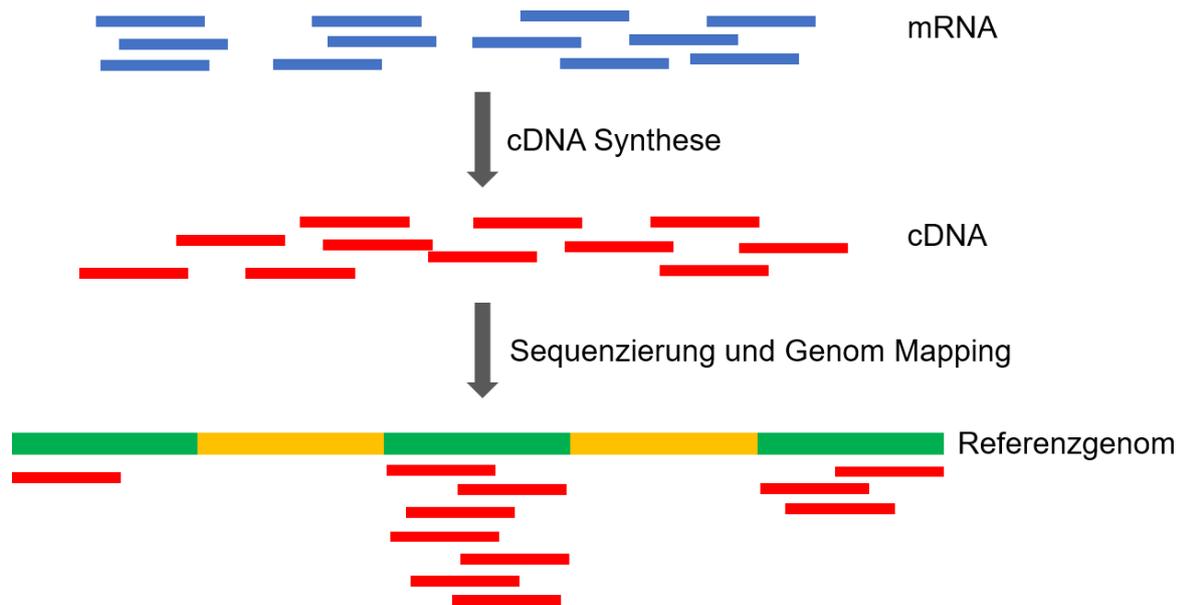


Abbildung 15: Schematische Darstellung des RNA-Seq.

Um differentiell exprimierte Gene zu detektieren wird die mRNA in cDNA umgeschrieben. Durch die anschließende Sequenzierung und das Genom-Mapping werden die cDNA Fragmente mit dem Referenzgenom hg19 abgeglichen, die Anzahl an cDNA Fragmenten, die einem Gen zugeordnet werden können, bestimmt und zwischen den einzelnen Proben verglichen. Dadurch können differentiell exprimierte Gene nachgewiesen werden.

Für die mit der nsc, shRNA 2 und shRNA 4 transduzierten HUVEC wurde ein RNA-Seq durchgeführt, um durch den *KMT2D* Knockdown hervorgerufene Veränderungen in der Genexpression zu detektieren. Dabei wurde die RNA aus den transduzierten HUVEC, wie in 3.7.2 beschrieben, extrahiert. Für jeden Ansatz wurde der RNA-Seq mit zwei verschiedenen Transduktionen durchgeführt. Die Library Präparation und die Sequenzierung wurden in Bad Nauheim im Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung in der Arbeitsgruppe von Stefan Günther durchgeführt. Für die Truseq Stranded mRNA Library Präparation wurden 300 ng der extrahierten RNA eingesetzt und das Low Sample Protokoll von Illumina nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Sequenzierung wurde auf dem NextSeq500 von Illumina durchgeführt (siehe 3.9.7). Dafür wurde eine v2 Chemie mit 1x75 Zyklen und die *single end* Methode verwendet. Pro Library wurden 40 Mio *reads* generiert. Die Rohdaten wurden anschließend von Tobias Zimmermann aus der Arbeitsgruppe Bioinformatics and Systems Biology der Justus-Liebig-Universität Gießen analysiert. Als differentiell regulierte Gene wurden nur Gene mit einem p-adj.-Wert $< 0,05$ und einem *fold change* von > 2 gewertet. Der p-Wert gibt dabei die prozentuale Wahrscheinlichkeit an, mit der die Daten als falsch positiv gewertet werden. Bei einem adjustierten p-Wert (p-adj.-Wert) wird dieser p-Wert zusätzlich noch mit der Benjamini-Hochberg-Methode korrigiert, um so durch eine Verifikation der Signifikanz durch multiple Tests, die falsch positiven Werte zu verringern. Der *fold change* gibt an, dass die als signifikant differentiell reguliert gewerteten Gene neben einem

p-adj.-Wert < 0,05 eine um mindestens Faktor 2 verringerte oder verstärkte Expression aufzeigen müssen. Für die Auswertung der differentiell regulierten Gene wurden die zwei shRNA 2 transduzierten Proben zusammen mit den zwei shRNA 4 transduzierten Proben gegen die beiden nsc transduzierten Proben verglichen. Dabei wurde jedes Replikat als einzelne Probe gewertet.

3.11 Fluoreszenzfärbungen des F-Aktin Filaments

Um Auswirkungen des *KMT2D* Knockdowns auf die F-Aktin Strukturen in HUVEC zu untersuchen, wurden transduzierte HUVEC mit Hilfe von Alexa Fluor 568 gekoppeltem Phalloidin angefärbt. Phalloidin ist ein toxisches bitykisches Peptid, welches aus dem Pilz *Amanita phalloides* gewonnen wird und ausschließlich an F-Aktin bindet (Faulstich et al., 2006). Für die Färbungen wurden 1×10^4 – 5×10^4 Zellen für 24 – 72 h auf *Culture Slides* in 300 μ l ECGM1 angezogen und anschließend nach den Herstellerangaben (Invitrogen) angefärbt. Dafür wurden die HUVEC zunächst zweimal mit 1x PBS gewaschen und anschließend für 15 min mit 4% Formalin in PBS fixiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit 1x PBS folgte eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,1% Triton X-100 für 15 min, wonach die Zellen nochmals zweimal mit 1x PBS gewaschen wurden. Für die Färbung wurde die 40x Methanol-Phalloidin-Stocklösung 1:40 in PBS verdünnt und in jedes Well des *Culture Slides* 50 μ l zugegeben und für 1 h bei RT in einer Feuchtkammer im Dunkeln inkubiert. Nach der Inkubation wurden die HUVEC zweimal mit 1x PBS gewaschen bevor sie mit Vectashield eingedeckelt wurden. Die Färbungen wurden am konfokalen Mikroskop LSM 800 ausgewertet und Bilder mit dem 40x Objektiv aufgenommen.

3.12 Quantifizierung sich überlagernder HUVEC

Um Veränderungen des Wachstumsverhaltens der *KMT2D* Knockdown HUVEC hinsichtlich der Zell-Zell-Kontakte und ihrer Anordnung zueinander zu untersuchen, wurden auf *Culture Slides* gewachsene und mit Vectashield eingedeckelte Zellen verwendet. Für die Analysen wurden nsc, shRNA 1 und shRNA 2 transduzierte HUVEC verwendet.

3.12.1 Auszählung der sich überlagernden Zellen

Von den auf den *Culture Slides* gewachsenen nsc, shRNA 1 bzw. shRNA 2 transduzierten Zellen wurden am LSM 800 mit dem 40x Objektiv zufällig Sichtfelder mit einer Größe von

348,79 × 263,03 µm im DAPI Kanal aufgenommen. Pro Gruppe (untransduzierte HUVEC, nsc, shRNA 1 bzw. shRNA 2 transduzierte HUVEC) wurden von je zwei biologischen Replikaten jeweils 10 solcher Sichtfelder aufgenommen und ausgewertet. Dafür wurde zuerst die absolute Anzahl der in den Sichtfeldern aufgenommenen DAPI-gefärbten Zellkerne ausgezählt. Anschließend wurden die Zellkerne ausgezählt, die sich, per Auge gewertet, zu mindestens 20% überlappten und daraus der prozentuale Anteil sich überlagernder Zellen berechnet.

3.12.2 Vermessung der sich überlagernden Zellen

Als zusätzliche Quantifizierung der sich überlagernden Zellen wurden neben den oben beschriebenen Sichtfeldaufnahmen auch Z-Stack-Aufnahmen von den auf den *Culture Slides* gewachsenen Zellen angefertigt. Bei Z-Stack-Aufnahmen entsteht eine Bilderserie aus verschiedenen Fokusebenen durch das Objekt. Dabei wird in einer vorgegebenen Schrittweite durch das Objekt fokussiert und die jeweilige Ebene fotografiert. Anschließend werden die Bilder zusammengefügt um eine 3-dimensionale Darstellung des Objekts zu erhalten.

Mit diesen Z-Stack-Aufnahmen konnte bestimmt werden, wie viele Zellen sich übereinanderlagern. Für die spätere Auswertung wurde die Höhe der sowohl einzeln vorliegenden Zellkerne als auch der sich überlagernden Zellkernen bestimmt. Dafür wurden erneut am LSM 800 mit dem 40× Objektiv Z-Stack-Aufnahmen mit einer Sichtfeldgröße von 159,73 × 159,73 µm aufgenommen. Dafür wurde manuell am Mikroskop, mit dem ZEN 2.5 Programm, die unterste und die oberste Ebene der sich überlagernden Zellkerne sowie der einzelnen Zellkerne eingestellt. Anschließend fokussierte das Programm automatisch durch die Zellen und fertigte mit einer Schrittweite von 0,31 µm jeweils ein Bild der Ebene an. Dadurch entstanden 3D-Bilder des aufgenommenen Bereichs. Diese 3D-Aufnahmen wurden danach in das Vision4D-Programm von arivis geladen und der Blickwinkel so gewählt, dass man von der X-Achse aus auf die Zellen schaut. Dadurch wird auf der vertikalen Achse die Höhe der Zellen angezeigt. Die Höhe der DAPI-gefärbten Zellkerne wurde dann mit Hilfe des Vermessungstools aus dem Vision4D-Programm bestimmt. Dafür wurde immer die höchste Stelle des Zellkerns verwendet, genauso wurde die höchste Stelle vermessen, wenn zwei Zellkerne übereinander lagen. Diese Vermessungen der Zellkerne wurden pro Gruppe an jeweils sechs zufällig aufgenommenen Z-Stack-Bildern vorgenommen und an ebenfalls zwei biologischen Replikaten. Dabei wurden alle sich in dem Sichtfeld befindenden Zellen vermessen.

3.13 Bestimmung der Proliferationsrate transduzierter HUVEC

Um Veränderungen in der Proliferationsrate der transduzierten HUVEC zu erkennen, wurden transduzierte und nicht transduzierte HUVEC zwischen Passage 2 und 6 verwendet. Von jedem Ansatz wurden jeweils 5×10^4 Zellen in ein Well einer 6-Well Platte mit je 2 ml ECGM1 mit und ohne 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Puromycin ausgebracht. Nach 72 h wurden die Zellen trypsiniert, die Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt und zwischen den Kohorten verglichen.

3.14 Zellzyklusverteilung und Apoptose-Resistenz-Assay

Um Veränderungen des *KMT2D* Knockdowns auf die Zellzyklusverteilung und auf die Apoptose Resistenz zu untersuchen, wurden jeweils 1×10^5 Zellen unbehandelter und zuvor transduzierter HUVEC (siehe 3.3.3) in ein Well einer 6-Well Platte mit 2 ml ECGM1 ausplattiert. Je ein Ansatz wurde zusätzlich mit dem apoptoseauslösenden Zytostatikum Cisplatin mit einer Konzentration von 45 μM für 24 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Alle Ansätze wurden im Triplikat angesetzt. Nach der Inkubation wurden die Zellen wie in 3.1.1.1 beschrieben trypsiniert, die gleichen Ansätze vereinigt und die Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden einmal mit 1x PBS gewaschen. Um die Zellen zu fixieren und zu permeabilisieren wurden diese anschließend in 500 μl 70% Ethanol resuspendiert und für 2 h bei -20°C inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 1x PBS wurden die fixierten und permeabilisierten Zellen in 250 μl Propidiumiodid (PI)/RNase-Puffer aufgenommen und für 30 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Da der fluoreszierende Farbstoff in die DNA interkaliert und somit die Fluoreszenzintensität proportional zum DNA Gehalt zunimmt, konnten die Zellen in vier Zellzyklusstadien eingeteilt werden: Sub-G1-Phase (apoptotische Zellen), G1-Phase (einfacher Chromosomensatz), S-Phase (DNA-Replikation) und G2-Phase (doppelter Chromosomensatz). Die Fluoreszenzintensität sowie die Zellzahl wurde mittels guava easyCyte Flow Durchflusszytometer gemessen.

3.15 Migration und Invasion

Um das Migrations- und Invasionsverhalten bestimmen zu können, wurden Matrigel Invasionseinsätze bzw. Control Zellkultureinsätze von BioCoat verwendet. Die Control Zellkultureinsätze wurden für die Bestimmung des Migrationsverhaltens verwendet. Sowohl die Invasions- als auch die Migrationseinsätze bestehen aus einer PET-Membran mit 8 μm großen Poren, durch die die Zellen hindurchmigrieren können. Zusätzlich befindet sich bei den Invasionseinsätzen auf der Membran eine Matrigel-Matrix, welche durch ihre

Zusammensetzung die extrazelluläre Matrix nachbildet. So können nur Zellen durch die Matrix gelangen, die Enzyme exprimieren, die die extrazelluläre Matrix degradieren können, wie zum Beispiel Matrix-Metalloproteinasen (Gilles et al., 2004). Um die Zellen zur Migration bzw. zur Invasion anzuregen wurden die Zellen in *Endothelial Cell Basal Medium*, ein Medium ohne Wachstumsfaktoren, aufgenommen. Die Zellkultureinsätze wurden in eine Well Platte gesetzt, die mit ECGM1, Medium mit Wachstumsfaktoren, versetzt war und als Chemoattraktant diente. Eine schemenhafte Darstellung des Migrations- und Invasionsassays ist in Abbildung 16 dargestellt.

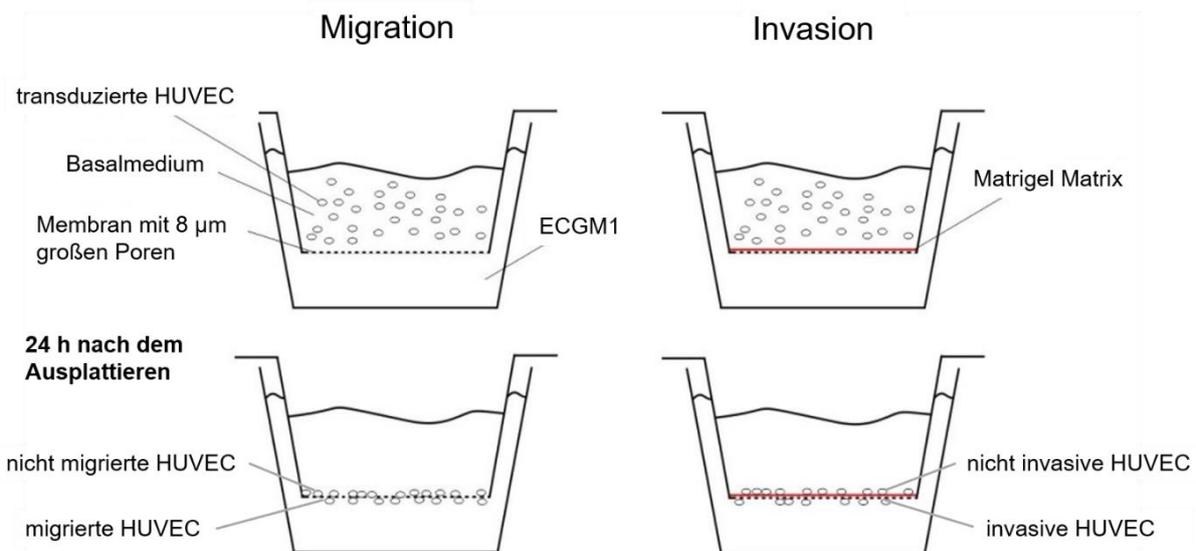


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Migrations- und Invasionsassays.

Die transduzierten HUVEC werden in *Endothelial Cell Basal Medium* aufgenommen und in den Migrations- bzw. Invasionseinsatz gegeben. Der Ansatz wird in ein Well einer 24-Well Platte gesetzt, das mit ECGM1, das als Chemoattraktant für die Zellen dient, befüllt ist. Dies veranlasst die Zellen durch die Poren zu migrieren. Bei dem Invasionsassay müssen die Zellen zusätzlich durch eine Matrigel Matrix, die die extrazelluläre Matrix nachbildet. Nach 24 h werden die nicht migrierten bzw. nicht invasiven Zellen entfernt und die migrierten bzw. invasiven Zellen am Lichtmikroskop ausgezählt. (Abbildung verändert nach Kunze, 2014).

Um die Auswirkungen des *KMT2D* Knockdowns auf die Migrations- und Invasionsfähigkeit der HUVEC zu untersuchen, wurden unbehandelte HUVEC und mit Lentiviren transduzierte HUVEC (nsc, shRNA 1 und shRNA 2) verwendet. Vor der Verwendung des Invasionseinsatzes musste die Matrigel-Matrix rehydriert werden. Dafür wurde der Einsatz in ein Well einer 24-Well Companion Zellkulturplatte gesetzt. Sowohl in den Invasionseinsatz als auch in das Well der Zellkulturplatte wurden 500 µl vorgewärmtes *Endothelial Cell Basal Medium* gegeben und für 2 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium vorsichtig, ohne die Matrigel Matrix zu zerstören, entfernt. Je Ansatz wurden 5×10^3 Zellen für die Untersuchungen

verwendet. Die Zellen wurden in *Endothelial Cell Basal Medium* aufgenommen und in die Migrations- bzw. Invasionseinsätze gegeben, welche sich in einem Well einer 24-Well Companion Zellkulturplatte befanden. In die Wells wurden zuvor 750 µl ECGM1 vorgelegt, das als Chemoattraktant für die Zellen diente. Es folgte eine Inkubation für 24 h im Brutschrank. Anschließend wurden die nicht migrierten bzw. nicht invasiven Zellen, welche sich noch an der Oberseite der Membran bzw. der Matrigel-Matrix befanden, durch ein Wattestäbchen entfernt. Dafür wurde mit diesem unter leichtem Druck über die Membran gerieben. Mit einem weiteren mit ECGM1 befeuchteten Wattestäbchen wurde dies wiederholt. Auf der Unterseite der Membran des Einsatzes befanden sich die migrierten bzw. invasiven Zellen. Diese wurden mit Hilfe des Diffential Quik Stain Kit zuerst fixiert und dann durch eine modifizierte Giemsa-Färbung angefärbt. Dafür wurden jeweils 500 µl der Fixier- bzw. Färbelösungen in ein Well einer 24-Well Companion Platte gegeben. Zwei Wells wurden zusätzlich noch mit jeweils 500 µl destilliertem Wasser befüllt. Jeder Migrations- bzw. Invasionseinsatz wurde mit Hilfe diese Färbereihe angefärbt. Dafür wurde der Einsatz für jeweils 2 min zuerst in der Fixierlösung und anschließend nacheinander für jeweils 2 min in beiden Färbelösungen inkubiert. Zuletzt wurden, um überschüssige Färbelösung zu entfernen, die Einsätze in den beiden mit Wasser befüllten Wells inkubiert. Zusätzlich wurde die Membran vorsichtig mit einer Pipette mit Wasser gespült. Nach der Färbung wurden die Einsätze an der Luft bei RT getrocknet, bevor die Membran vorsichtig mit einem Skalpell aus dem Einsatz geschnitten wurde. Mit Hilfe von Corbit-Balsam wurde die Membran auf einem Objektträger platziert und mit einem Deckglas eingedeckt. Anschließend konnten die migrierten bzw. invasiven Zellen unter dem Lichtmikroskop ausgezählt werden.

3.16 Soft Agar Colony Formation Assay

Die meisten Zellen und Zelllinien wachsen und teilen sich in der Regel nur, wenn die Zellen Kontakt zur extrazellulären Matrix haben. Auch HUVEC wachsen nur bei Kontakt zur extrazellulären Matrix und engem Zell-Zell Kontakt. Eine Eigenschaft einer sich transformierenden Zelle ist ein Ankermembran unabhängiges Wachstum, also die Fähigkeit der Zellen, sich auch ohne den sonst nötigen Kontakt zur extrazellulären Matrix, zu teilen und zu wachsen (Borowicz et al., 2014). Mit Hilfe des *Soft Agar Colony Formation Assays* soll untersucht werden, ob *KMT2D* Knockdown HUVEC ein Ankermembran unabhängiges Wachstum aufzeigen und erste Hinweise auf eine maligne Transformation der Zellen vorliegen.

Die Vorbereitung und das Ansetzen des *Soft Agar Colony Formation Assays* erfolgte unter der Sterilbank. Für den Assay wurden 1% und 0,6% Noble Agar in ECGM1 gelöst und

autoklaviert. Dieser Ansatz diente als Stocklösung. Zu Beginn wurde die untere höherprozentige Agarschicht gegossen, welche verhindern soll, dass die Zellen Kontakt zum Boden der Well Platten haben können und somit Kontakt zur darin nachgebildeten extrazellulären Matrix. Dafür wurde der 1% Noble Agar verflüssigt und 1:1 mit auf 37°C erwärmtem ECGM1 gemischt. Anschließend wurden von dem nun 0,5% Noble Agar 1,5 ml in ein Well einer 6-Well Platte gegossen und so verteilt, dass das gesamte Well bedeckt ist. Die 6-Well Platten wurden mit dem Deckel abgedeckt und für ca. 30 min bei RT gehalten, bis der Agar abgekühlt und sich verfestigt hat. In der Zeit, in der die untere Agarschicht fest wurde, wurden die HUVEC wie in 3.1.1.1 beschrieben trypsiniert und ausgezählt. Verwendet wurden unbehandelte HUVEC, mit nsc shRNA und mit den beiden *KMT2D* shRNAs transduzierte HUVEC. Als Positivkontrolle wurden K562-Zellen verwendet, da diese unabhängig ihrer Umgebung und unabhängig des Kontakts zur extrazellulären Matrix ein kolonienbildendes Wachstum aufzeigen. Von jeder Zellgruppe wurden jeweils 5×10^4 und 1×10^5 Zellen in 750 μ l Medium aufgenommen. Für die nicht transduzierten HUVEC wurde ECGM1 ohne Puromycin, für die transduzierten HUVEC ECGM1 mit Puromycin und für die K562-Zellen RPMI mit 10% FBS und 1% P/S verwendet. Die Zellsuspensionen wurden anschließend mit 750 μ l 0,6% Noble Agar, welcher auf 42°C erwärmt wurde, durch zwei bis dreimaliges Auf- und Abpipettieren gemischt und zügig auf die zuvor gegossene untere Agarschicht in das Well gegeben und darauf verteilt. Bei RT kühlte der Agar für ca. 30 – 60 min ab, bis er vollständig ausgehärtet war. Anschließend wurde die 6-Well Platte für 21 Tage im Brutschrank inkubiert. Um das Austrocknen des Agars zu verhindern wurde zweimal pro Woche 100 μ l des entsprechenden Mediums auf den Agar gegeben und darauf durch leichtes Schwenken verteilt. Eine schemenhafte Darstellung des *Soft Agar Colony Formation Assays* ist in Abbildung 17 dargestellt.



Abbildung 17: Schematische Darstellung des *Soft Agar Colony Formation Assays*.

Die untere 0,5% Noble-Agarschicht grenzt die Zellen zum Boden des Wells hin ab, dass diese keinen Kontakt zu der darin nachgebildeten extrazellulären Matrix bilden können. Die obere Noble-Agarschicht (0,3%) enthält die zu untersuchenden Zellen.

Nach der 21-tägigen Inkubation wurden die Kolonien mit Hilfe von Kristallviolett angefärbt. Dafür wurde 1 ml einer 0,005% Kristallviolett in 25% Methanol Lösung auf den Agar in das

Well gegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde fünfmal mit je 1 ml ddH₂O für 5 – 10 min gewaschen. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Kolonien gezählt.

3.17 Statistische Auswertung

Um die einzelnen Analysen auszuwerten und statistisch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen nachzuweisen, wurde ein zweiseitiger ungepaarter Student's *t*-Tests durchgeführt. Dabei wurden *p*-Werte < 0,05 als signifikant eingestuft. Aufgrund der Versuchsanzahl von in manchen Fällen *n*=3 konnten die Daten nicht auf eine Gauß-Verteilung überprüft werden. Daher wurde die Signifikanz für alle Daten zusätzlich mit dem nichtparametrischen zweiseitigen Mann-Whitney *U*-Test analysiert. Auch bei dieser Analyse wurden nur *p*-Werte < 0,05 als signifikant gewertet. In den Abbildungen wurden nur dann Signifikanzen angegeben, wenn die Unterscheide mit beiden statistischen Tests nachzuweisen waren. Der jeweils größere *p*-Wert ist in den Abbildungen gezeigt. Die gesamte statistische Auswertung, ausgenommen der ATAC-Seq Daten sowie der RNA-Seq Daten, welche von Tobias Zimmermann analysiert wurden, wurde mit dem GraphPad Prism 7 Programm durchgeführt.

4 Ergebnisse

In kardialen Angiosarkomen wurden in tNGS Analysen rekurrent *KMT2D* Stoppmutationen nachgewiesen. In einem Fall konnten sogar zwei *KMT2D* Stoppmutationen detektiert werden. Durch diese Mutationen kommt es vermutlich zur Inaktivierung des Gens, was die Vermutung nahelegt, dass *KMT2D* einen sehr wichtigen Faktor in der Pathogenese der kardialen Angiosarkome darstellt. Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit die Rolle von *KMT2D* in der Pathogenese von kardialen Angiosarkomen analysiert werden. Dazu wurden zunächst *KMT2D* defiziente Zellen generiert. Da sich Angiosarkome aus Endothelzellen entwickeln, wurden HUVEC für dieses Modell verwendet. Anschließend wurde, mittels molekularbiologischer Methoden, die dadurch verursachten Veränderungen in den *KMT2D* defizienten HUVEC detektiert und analysiert. Da auch längerfristige Veränderungen und Auswirkungen des *KMT2D* Defizits untersucht werden sollen, stellt die transiente Transfektion keine passende Methode dar. Außerdem sind HUVEC nur sehr schwer zu transfizieren, was zu Schwankungen in der Transfektionseffizienz und somit zu einer nicht ausreichenden Reproduzierbarkeit der Analysen führen kann. Daher wurde eine Methode gewählt, mit der HUVEC mit einem stabilen *KMT2D* Defizit generiert werden können. Dazu dient zum einen die CRISPR/Cas9 Methode, mit der ein kompletter Genknockout erzeugt werden kann. Zum anderen können auch durch die lentivirale Transduktion einer shRNA, die einen stabilen Knockdown in den Zielzellen hervorruft, langfristige Veränderungen detektiert werden. Da es sich bei den verwendeten HUVEC um Primärzellen handelt, wurden diese für die nachfolgenden Analysen nur bis Passage 6 genutzt, da diese in späteren Passagen nur noch ein reduziertes Wachstum aufweisen.

4.1 Generierung eines stabilen *KMT2D* Defizits in HUVEC

4.1.1 CRISPR/Cas9

Die CRISPR/Cas9 Methode ist ein Verfahren zur Inaktivierung von Genen. Mit Hilfe der crRNA, einer gegen das Zielgen komplementären RNA Sequenz, wird die Cas9 Nuklease an die gewünschte Zielsequenz geführt um dort gezielt die DNA zu schneiden. Über Reparaturmechanismen der Zelle wird der, durch das Schneiden der Cas9 entstandene Doppelstrangbruch repariert wodurch Insertionen und/oder Deletionen aber auch gezielt Austauschmutationen eingebaut werden können, um so einen Knockout zu erzielen (siehe 1.4.1).

Mit Hilfe eines Vektors, der für alle nötigen Faktoren, wie Cas9, die tracrRNA und CD4, worüber später selektioniert werden kann, kodiert, wurde das CRISPR/Cas9 System in die

Zelle eingebracht (siehe Abbildung 6). Vorab wurden die gegen *KMT2D* komplementären crRNA Sequenzen der „Sabatini/Lander CRISPR pooled library“ entnommen (siehe 3.2.1) und mittels zum Vektor komplementären Überhängen an der RNA Sequenz wurde die crRNA in den linearisierten Vektor integriert und der Vektor damit geschlossen (siehe 3.2). Der gegen *KMT2D* gerichtete CRISPR Vektor wurde mittels transienter Transfektion in die Zielzellen gebracht.

Da HUVEC generell sehr schwer zu transfizieren sind und es sehr schwer ist ein Vektor, wie den CRISPR Vektor, mit einer Größe von ca. 9.800 bp, in die Zellen einzubringen, wurde die CRISPR/Cas9 Methode zunächst in HeLa-Zellen getestet. Da die verwendeten crRNA Sequenzen, die aus der Library stammen, mit Hilfe eines Computerprogramms ermittelt wurden, wurde auch die Knockouteffizienz der verschiedenen crRNA zunächst *in vitro* in HeLa-Zellen untersucht. Dafür wurden insgesamt sieben verschiedene crRNA Sequenzen (siehe 2.6) ausgetestet. Alle sieben Sequenzen wurden jeweils in den CRISPR Vektor kloniert. Der fertige CRISPR Vektor wurde mit Hilfe des Transfektionsreagenz FuGene in HeLa-Zellen transfiziert. Aufgrund der im CRISPR Vektor enthaltenen CD4 kodierenden Region, exprimieren transfizierte Zellen den Oberflächenrezeptor CD4. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen über CD4-Antikörper gekoppelte magnetische *Beads* aufgereinigt (siehe 3.2.4). Im Schnitt exprimierten etwa 50% der in die Transfektion eingesetzten HeLa-Zellen CD4. Mittels PCR wurde die *KMT2D* Region, in der die crRNA bindet und die Cas9 schneiden soll, angereichert. Das PCR Produkt wurde nach der Sanger Methode sequenziert und auf eine erfolgreiche Targetierung der *KMT2D* Sequenz überprüft. Der durch das Schneiden der Cas9 am PAM entstandene Doppelstrangbruch wird durch die Reparaturmechanismen der Zelle geschlossen wodurch Insertionen und/oder Deletionen entstehen können. Diese sind in der Sanger Sequenz in Form von verschiedenen sich überlagerten Sequenzen erkennbar, die am PAM beginnen. In drei unabhängigen Transfektionen wurde die *KMT2D*-CRISPR-4 Sequenz als die crRNA Sequenz detektiert, die in den HeLa-Zellen konstant die meisten Mehrfachsequenzen in der *KMT2D*-Zielsequenz hervorruft (Abbildung 18A).

Nach der erfolgreichen Etablierung der CRISPR/Cas9 Methode in HeLa-Zellen wurde der CRISPR Vektor mit der ausgewählten *KMT2D*-CRISPR-4 crRNA Sequenz nun dazu verwendet, den Knockout in *KMT2D* stabil in HUVEC einzubringen. Mit Hilfe des Transfektionsreagenz PromoFectin-HUVEC wurde der CRISPR Vektor transient in die Zellen transfiziert. Wie bei den HeLa-Zellen wurden die HUVEC 48 h nach der Transfektion über magnetische *Beads* aufgereinigt. Nach dieser Selektion waren im Schnitt nur noch ca. 3% der zu Beginn in die Transfektion eingesetzten HUVEC übrig. Dies zeigt bereits, dass nur sehr wenige HUVEC transfiziert wurden und CD4 exprimieren. Durch eine PCR wurde die *KMT2D* Region, in der Cas9 schneiden soll, in den aufgereinigten HUVEC vervielfältigt. Mit Hilfe der

anschließenden Sanger Sequenzierung wurden die amplifizierten Bereiche auf eine erfolgreiche Targetierung der *KMT2D* Sequenz durch CRISPR/Cas9 überprüft.

In Abbildung 18 sind die Sanger Sequenzen der targetierten *KMT2D* Region der HeLa-Zellen (A) und der HUVEC (B) zu sehen. In den Sequenzen ist die zur im Vektor enthaltenen crRNA komplementäre Sequenz sowie das PAM, an dem Cas9 schneiden soll, eingezeichnet. Aus der Sequenz der HeLa-Zellen wird deutlich, dass in dem sequenzierten Zellpool die Originalsequenz zwar noch auszumachen ist, diese aber nicht mehr die dominante Sequenz darstellt (Abbildung 18A). Zusätzlich sind noch drei weitere Sequenzen erkennbar. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Cas9 in vielen HeLa-Zellen in *KMT2D* geschnitten hat und im Rahmen der Reparatur des Doppelstrangbruches Insertionen und/oder Deletionen eingefügt wurden, was zu einem möglichen Knockout des Gens führen kann. In den HeLa-Zellen konnte dieser Effekt in drei unabhängigen Transfektionen nachgewiesen werden.

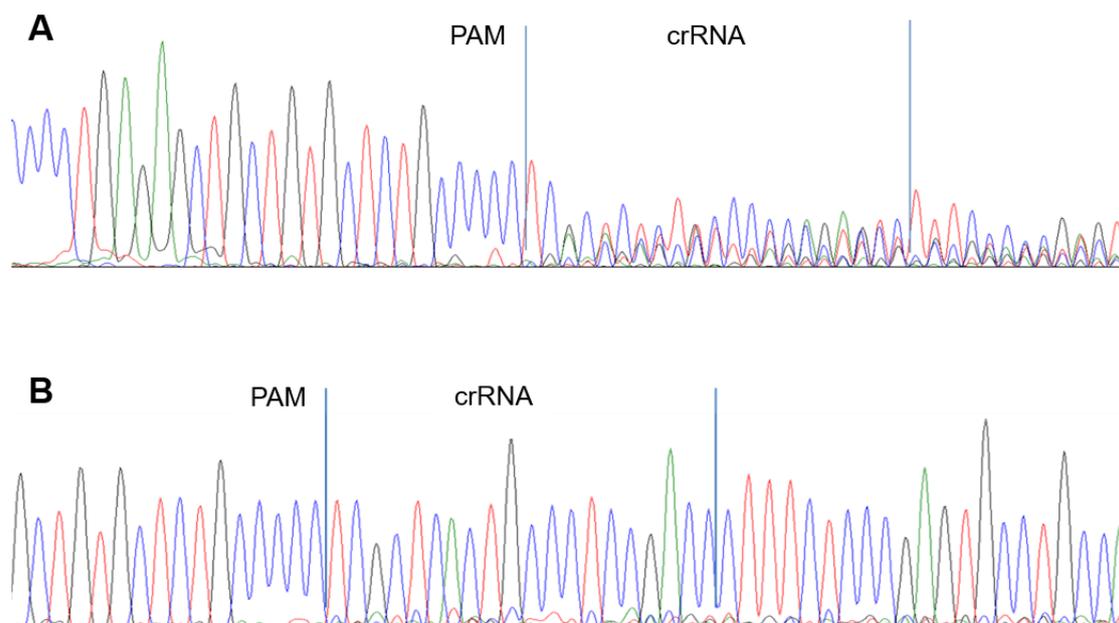


Abbildung 18: Sequenzen der CRISPR transfizierten HeLa-Zellen und HUVEC.

Nach transienter Transfektion des CRISPR Vektor und Aufreinigung der Zellen mittels CD4 *Beads*, wurden die Zellen via Sanger-Sequenzierung auf mehrfach-Sequenzen und damit auf einen möglichen Knockout in der *KMT2D* Sequenz untersucht. **A:** Die Sequenzierung der *KMT2D* Region in HeLa-Zellen mit der zur crRNA Sequenz des CRISPR Vektor komplementären Region und dem PAM an dem Cas9 schneidet. **B:** Die Sequenzierung der *KMT2D* Region in HUVEC mit der zur crRNA Sequenz des CRISPR Vektor komplementären Region und dem PAM an dem Cas9 schneidet.

Der gleiche CRISPR Vektor, der in den HeLa Zellen, den zu sehenden Effekt generierte, wurde auch für die Transfektion der HUVEC Zellen verwendet. Doch wie in Abbildung 18B deutlich

wird, ist der Effekt der Mehrfachsequenzen in den HUVEC Zellen fast nicht auszumachen. Trotz der CD4 Aufreinigung ist die Originalsequenz der *KMT2D* Region ist noch deutlich zu erkennen und stellt die dominante Sequenz dar. Sehr schwach sind zwei weitere Sequenzen erkennbar, was darauf schließen lässt, dass Cas9 nur in sehr wenigen Zellen in *KMT2D* geschnitten hat wodurch nur in wenigen HUVEC Insertionen und/oder Deletionen eingefügt wurden.

Um in den HUVEC mit der CRISPR/Cas9 Methode einen stärkeren Effekt zu erzeugen, wurde versucht die Methode für die Zellen zu optimieren und die Transfektionseffizienz zu erhöhen. Dafür wurden verschiedene Transfektionszeiten getestet und die Zellen schon 24 h bzw. erst 72 h nach der Transfektion mit den CD4 *Beads* aufgereinigt. Auch das Transfektionsreagenz FuGene wurde für die HUVEC getestet sowie die Transfektion mittels Elektroporation und mit Hilfe einer magnetunterstützten Methode. Um eine Optimierung der CD4 gekoppelten *Bead* Aufreinigung der transfizierten HUVEC zu erhalten wurden verschiedene Mengen an *Beads* ausgetestet. Auch für die Inkubation der transfizierten HUVEC mit den *Beads* wurden verschiedene Zeitspannen verwendet. Bei 4°C sollen die *Beads* bei ständiger Rotation an die transfizierten Zellen binden. Um diese Bindung an die *Beads* zu optimieren wurde dieser Schritt bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Allerdings konnte mit allen Optimierungsversuchen keine Verstärkung der Transfektionseffizienz und kein stärkerer Effekt im Rahmen von mehrfach-Sequenzen erreicht werden.

Aufgrund dessen, dass durch die CRISPR/Cas9 Methode in HUVEC nur sehr schwach ausgeprägt Mehrfachsequenzen nachzuweisen waren und somit vermutlich nur in sehr wenigen Zellen ein *KMT2D* Knockout vorliegt, wurde eine andere Methode zur Herstellung von stabil *KMT2D* defizienten HUVEC angewandt. Mittels lentiviraler Transduktion sollte ein *KMT2D* Knockdown stabil in die Zellen eingebracht werden.

4.1.2 Lentivirale Transduktion

Die lentivirale Transduktion ist eine Methode, um stabil DNA in Zellen einzubringen. Der Vorteil dieser Methode ist, dass relativ lange Sequenzen in die Zellen transduziert werden können und das Transgen über Monate hinweg von den behandelten Zellen exprimiert wird. Außerdem zeigen die transduzierten Zellen nur eine sehr geringe Stressreaktion gegen die lentivirale Transduktion. Ein mögliches Problem dieser Methode stellen unspezifische Effekte, die durch die transduzierte DNA oder durch die Transduktion selbst entstehen können, dar. Die Targetsequenzen werden oftmals mittels eines Algorithmus *in silico* ausgewählt, können aber *in vitro* zu unspezifischen Effekten führen. Um solche falschen Ergebnisse auszuschließen wurden die nachfolgenden Versuche jeweils mit unbehandelten HUVEC, mit nsc (*non silencing*

control) transduzierten HUVEC und mit mindestens zwei verschiedenen shRNAs gegen das Target *KMT2D* durchgeführt.

Da die Herstellung der lentiviralen Partikel aufwendig ist, wurden zunächst mittels transienter Transfektion sechs verschiedene shRNAs gegen *KMT2D* getestet und die Stärke des Knockdowns untersucht. Die sechs verschiedenen shRNAs, in Vektoren verpackt, die zur späteren Partikel Herstellung benötigt werden, stammen aus der von der Firma Dharmacon *in silico* erstellten Liste für shRNAs. Um zu ermitteln welche shRNAs den stärksten *KMT2D* Knockdown hervorrufen wurden die shRNA tragenden Vektoren transient in die späteren Zielzellen der Transduktion, HUVEC, transfiziert. Anschließend wurde der *KMT2D* Knockdown auf RNA Ebene untersucht. Dafür wurde aus den transfizierten HUVEC RNA extrahiert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Diese wurde in qPCR Analysen, mit einem TaqMan Gene Expression Assay für *KMT2D* eingesetzt. Aus drei unabhängigen Transfektionen wurde mittels qPCR Analysen der fold change der *KMT2D* Reduktion ermittelt und in Abbildung 19A dargestellt. Dabei konnte gezeigt werden, dass lediglich die shRNA 1 und shRNA 4 auf RNA Ebene eine *KMT2D* Reduktion nach transienter Transfektion um ca. 20% hervorrufen. Aufgrund der unterschiedlich starken *KMT2D* Reduktionen zwischen den verschiedenen Transfektionen zeigen die anderen shRNAs keinen eindeutigen Knockdown auf das *KMT2D* RNA-Level.

Der Effekt einer shRNA muss nicht zwangsläufig zu einer Reduktion der RNA Menge des targetierten Gens führen, sondern kann in manchen Fällen auch nur auf Proteinebene erkennbar sind. Daher wurden die Auswirkungen der *KMT2D* shRNA Transfektion auch auf Proteinebene untersucht. Dafür wurden Western Blot Analysen der shRNA transfizierten HUVEC durchgeführt. *KMT2D* ist selbst mit einer Größe von 600 kDa für Western Blot Analysen nicht geeignet, da Proteine dieser Größe nur sehr schlecht in Gele einlaufen und daher nicht gut aufgetrennt werden können. Da *KMT2D* die Monomethylierung von H3K4 (H3K4me1) katalysiert, wurde die relative Menge der H3K4me1 Modifikation im Western Blot für die Analyse der Knockdownintensität untersucht. In Abbildung 19B und C sind die relativen Mengen an H3K4me1, bezogen auf nsc, aus drei unabhängigen Transfektionen dargestellt. Wie auch schon in den qPCR Analysen festgestellt werden konnte, zeigen die mit der shRNA 1 sowie mit der shRNA 4 transfizierten HUVEC die stärkste H3K4me1 Reduktion (shRNA 1: $0,7 \pm 0,2$ und shRNA 4: $0,6 \pm 0,3$). Zusätzlich zeigen die mit der shRNA 2 transfizierten HUVEC ein ebenfalls reduziertes H3K4me1 Level mit einer relativen Menge von $0,8 \pm 0,2$.

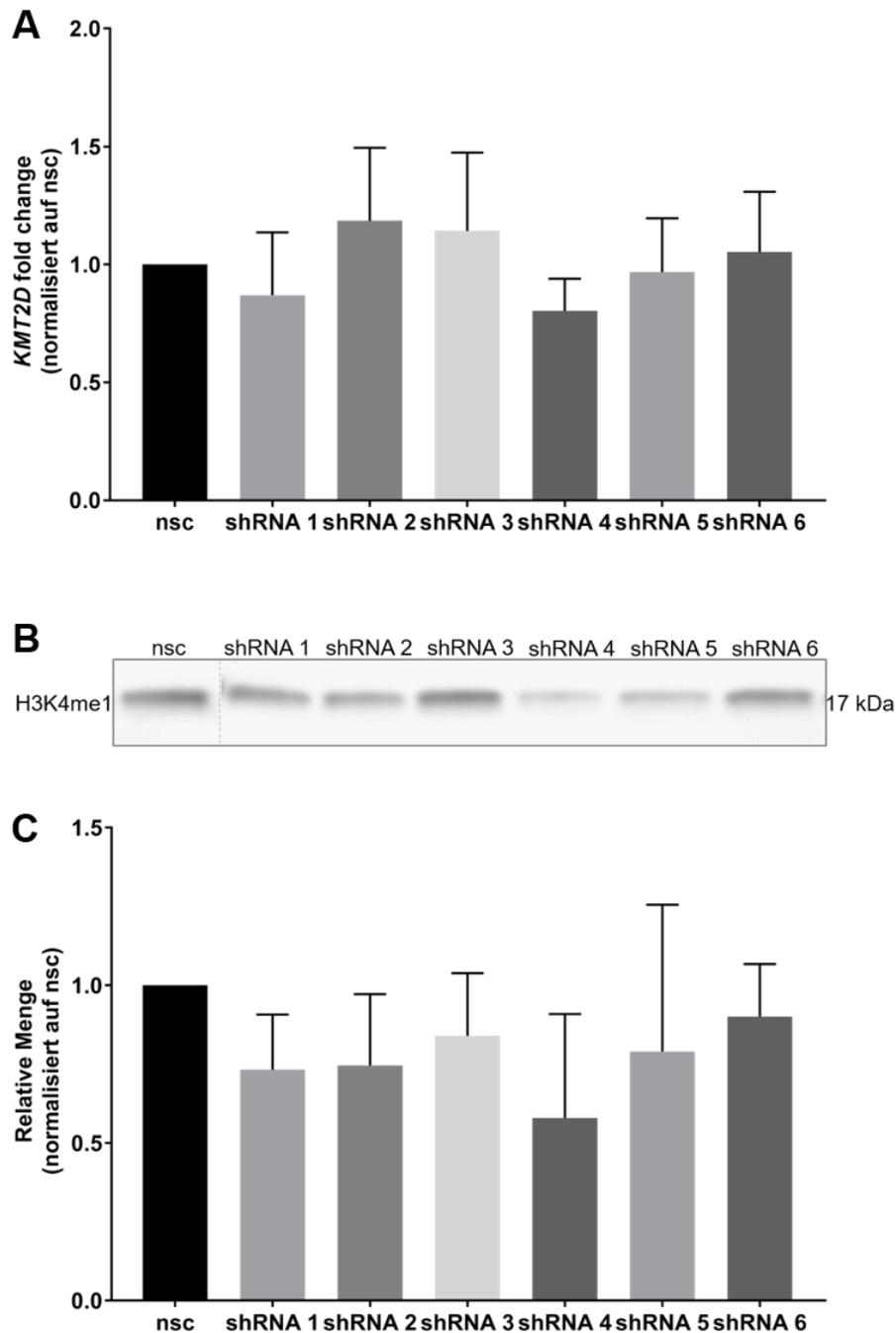


Abbildung 19: Transiente Transfektion der verschiedenen shRNAs gegen *KMT2D*.

Nach transienter Transfektion der sechs zur Verfügung stehenden shRNA Vektoren gegen *KMT2D* (shRNA 1-6) wurde die Stärke des Knockdowns mittels qPCR und Western Blot analysiert. **A:** Kontrolle der *KMT2D* Reduktion auf RNA Ebene durch qPCR Analysen. Gezeigt ist der mittlere *fold change* \pm SD von drei verschiedenen transienten Transfektionen. Normalisiert wurden die Werte auf das housekeeping Gen *GAPDH* und bezogen wurden sie auf die nsc transfizierten HUVEC. **B:** Für die transfizierten HUVEC sind die Western Blot Banden für die durch *KMT2D* katalysierte H3K4me1 abgebildet. Die Proben wurden auf derselben Membran *geblottet* und die umrahmten Banden stammen vom selben *Blot*. **C:** Dargestellt ist der Mittelwert der relativen Menge \pm SD von H3K4me1 der Western Blot Analysen aus drei unabhängigen Transfektionen. Die Werte sind auf die Gesamtproteinmenge jeder Spur normalisiert und auf die nsc transfizierten HUVEC bezogen.

Mit Hilfe der transienten Transfektion konnte gezeigt werden, dass die shRNA 1 sowie die shRNA 4 in den qPCR Analysen konstant die stärkste *KMT2D* Reduktion auslösen. Auch auf Proteinebene zeigten die shRNA 1 und shRNA 4 transfizierten HUVEC die stärkste Reduktion des H3K4me1 Levels. Zusätzlich konnte mit der shRNA 2 einen fast genauso starken Effekt auf die relative H3K4me1 Menge wie für die shRNA 1 nachgewiesen werden. Aufgrund der Ergebnisse der qPCR und Western Blot Analysen wurden für die shRNA 1, die shRNA 2 und für die shRNA 4 lentivirale Partikel hergestellt und diese für die weiteren Analysen verwendet (siehe auch 1.4.2 und 3.3).

Für die Herstellung der lentiviralen Partikel, die später für die Transduktion der Zielzellen verwendet werden, müssen *packaging cells* mit drei verschiedenen Plasmiden, pGIPZ, pCI-VSVG und psPAX2, transfiziert werden. Diese Plasmide kodieren für alle für die Generierung der lentiviralen Partikel notwendigen Faktoren, wie für die Bereiche, die später in das Zielgenom integriert werden, darunter die shRNA Sequenz gegen *KMT2D*; für Strukturproteine die für die Verpackung in die Partikel notwendig sind und für Proteine die in die Virusmembran eingebaut werden (siehe 1.4.2). Die in den *packaging cells* generierten lentiviralen Partikel, die in das Medium abgegeben wurden, wurden durch Ultrazentrifugation aus dem Medium abzentrifugiert und aufkonzentriert. Um für die spätere Transduktion der HUVEC die passende Menge an lentiviraler Partikel zu verwenden wurden die Partikel getitert um die Transduktionseinheit pro ml zu bestimmen. Für die Transduktion der HUVEC wurde eine optimale MOI von 80 ermittelt. Bei dieser Menge an lentiviralen Partikel zeigen die HUVEC einen starken *KMT2D* Knockdown bei einer Überlebensrate der Zellen nach der Behandlung von über 80%. Für die Transduktion wurde jeweils ein Pool an HUVEC der Passage 1 verwendet. Da es sich bei den HUVEC um Primärzellen handelt, bei denen ab Passage 6 die Wachstumsrate stark abnimmt, wurden für die nachfolgenden Analysen nur transduzierte HUVEC zwischen Passage 2 und 6 verwendet. Um für die Folgeversuche eine ausreichende Menge an transduzierten Zellen zur Verfügung zu haben, wurde jede Transduktion mindestens drei Mal unabhängig voneinander wiederholt. Insgesamt wurden die HUVEC sieben Mal mit der nsc shRNA transduziert, vier Mal mit der shRNA 2 und der shRNA 4 und für die shRNA 1 wurden drei Transduktionen durchgeführt.

Nach jeder Transduktion wurden die Zellen auf den *KMT2D* Knockdown hin analysiert. Dafür wurde der Knockdown sowohl auf RNA Ebene untersucht, als auch der Effekt auf die H3K4me1. Die Überprüfung des *KMT2D* Knockdowns nach der lentiviralen Transduktion mit den drei verschiedenen shRNAs (shRNA 1, shRNA 2 und shRNA 4) ist in Abbildung 20 dargestellt. Die Effekte der jeweiligen shRNA auf RNA Ebene, die mittels qPCR nachgewiesen wurden, sind in Abbildung 20A dargestellt. Der *KMT2D fold change* mit Standardabweichung, bezogen auf mit einem Kontrollvektor (nsc) transduzierte HUVEC, von mindestens drei verschiedenen lentiviralen Transduktionen, ist abgebildet. Mit allen drei shRNA Plasmiden

konnte eine deutliche Reduktion der *KMT2D* Expression auf RNA Level um etwa 50% erzeugt werden. Die shRNA 2 transduzierten HUVEC zeigen mit einem *fold change* von $0,5 \pm 0,1$ den stärksten Knockdown von *KMT2D* auf RNA Ebene. HUVEC die mit shRNA 1 transduziert wurden, weisen eine *KMT2D* Reduktion mit einem *fold change* von $0,5 \pm 0,7$ auf. Mit Hilfe des shRNA 4 Transduktion konnte in HUVEC eine stabiler *KMT2D* Knockdown mit einem *fold change* von $0,7 \pm 0,1$ generiert werden. Durch die Transduktion konnte also mit allen drei shRNAs im Vergleich zu der transienten Transfektion (siehe Abbildung 19) konstant eine stärkere Reduktion der *KMT2D* Expression erzeugt werden.

Auf Proteinebene wurde der *KMT2D* Knockdown durch die relative Menge an H3K4me1 kontrolliert. Neben der deutlich verringerten RNA Expression, die durch den *KMT2D* Knockdown erzeugt wurden, konnten auch auf Proteinebene Auswirkungen des Knockdowns beobachtet werden und ein verringertes Level an H3K4me1 nachgewiesen werden (Abbildung 20B). In Abbildung 20C ist die relative Menge von H3K4me1, normalisiert auf nsc transduzierte HUVEC, von mindestens drei verschiedenen Replikaten dargestellt. Alle *KMT2D* shRNA transduzierten HUVEC zeigen eine deutliche Reduktion des H3K4me1 Levels im Vergleich zu den nsc transduzierten und den nicht transduzierten HUVEC. Mit der Transduktion der shRNA1 konnte die relative Menge an H3K4me1 in HUVEC um ungefähr 35% (relative Menge = $0,6 \pm 0,1$) reduziert werden. Nach der shRNA 2 bzw. shRNA 4 Transduktion in HUVEC lag das H3K4me1 Level im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC bei einer Reduktion von ca. 60% (shRNA 2: $0,4 \pm 0,1$; shRNA 4: $0,4 \pm 0,2$). Um auszuschließen, dass das verringerte H3K4me1 Level nicht auf eine allgemeine, durch den *KMT2D* Knockdown hervorgerufenen Reduktion der H3K4 Menge zurückzuführen ist, wurde nach der *KMT2D* shRNA Transduktion auch die Menge an unmethyliertem H3K4 (H3K4un) detektiert. Wie in Abbildung 20B und Abbildung 20C erkennbar ist, hat der *KMT2D* Knockdown keinerlei Einfluss auf H3K4un. In der relativen Menge ist kein Unterschied zwischen den nsc transduzierten und den shRNA transduzierten HUVEC erkennbar. Daraus kann geschlossen werden, dass der *KMT2D* Knockdown wie erwartet nur einen Einfluss auf die von *KMT2D* katalysierte Monomethylierung von H3K4 hat und keinen auf die allgemeine Menge H3K4.

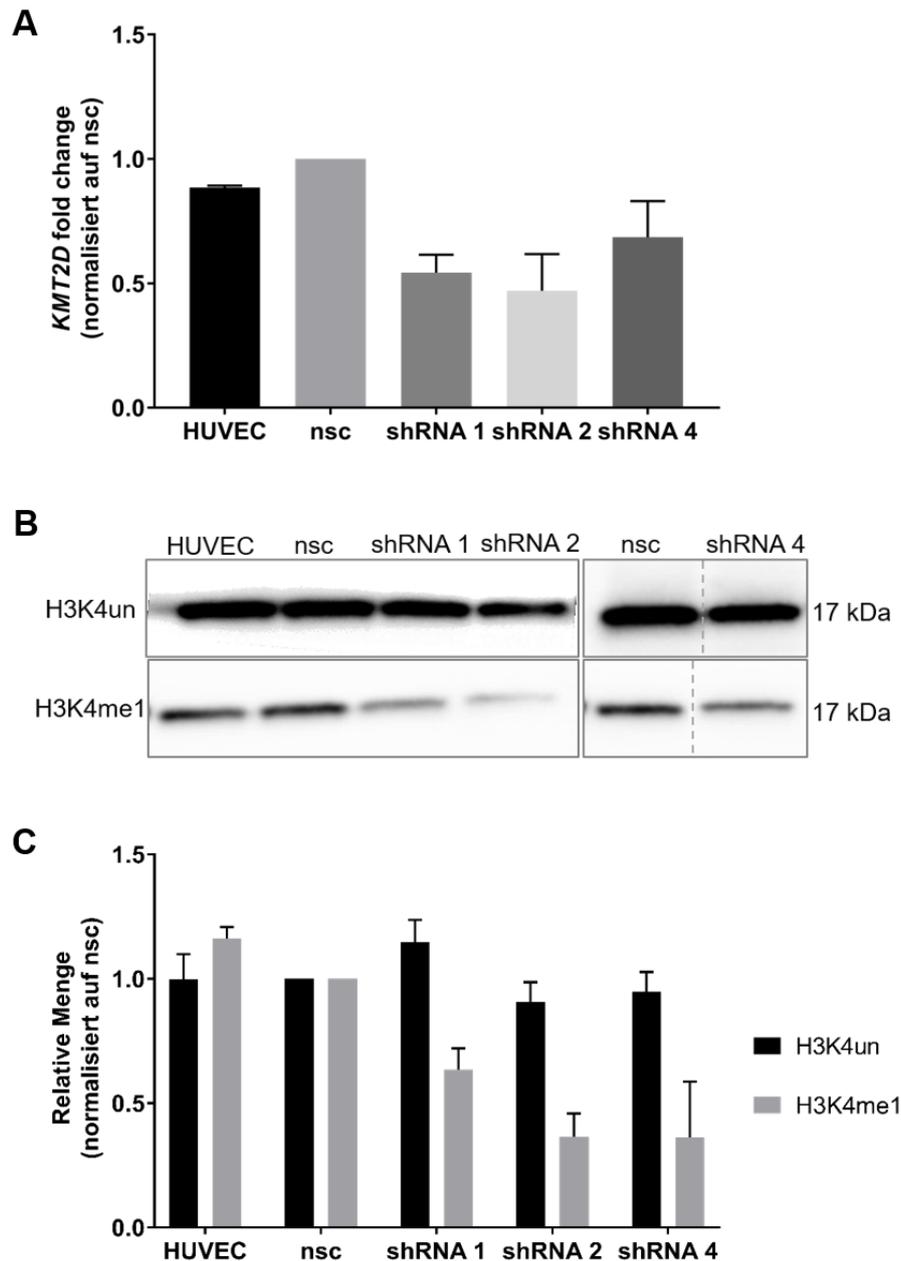


Abbildung 20: Kontrolle des, durch lentivirale Transduktion generierten, stabilen *KMT2D* Knockdowns in HUVEC.

Um den *KMT2D* Knockdown zu verifizieren, wurden unbehandelte HUVEC sowie mit nsc oder mit einer der drei shRNA transduzierten HUVEC mittels qPCR und Western Blot analysiert. **A:** Kontrolle des *KMT2D* Knockdowns auf RNA Ebene durch qPCR Analysen. Gezeigt ist der mittlere *fold change* \pm SD von mindestens drei verschiedenen Transduktionen. Normalisiert wurden die Werte auf das housekeeping Gen *GAPDH* und bezogen wurden sie auf die nsc transduzierten HUVEC. **B:** Mit Hilfe von Western Blot Analysen wurde die durch *KMT2D* katalysierte H3K4me1 untersucht sowie die unmethylierte Form von H3K4 (H3K4un). H3K4un und H3K4me1 wurden auf derselben Membran *geblottet* und die umrahmten Banden stammen vom selben *Blot*. **C:** Dargestellt ist der Mittelwert der relativen Menge \pm SD von H3K4me1 und H3K4un aus Western Blot Analysen von mindestens drei unabhängigen Transduktionen. Die Werte sind auf die Gesamtproteinmenge jeder Spur normalisiert und auf die nsc transduzierten HUVEC bezogen.

Bei den nachfolgenden Analysen sollten nur Effekte detektiert werden, die durch den *KMT2D* hervorgerufen werden. Deshalb wurden die Analysen mit HUVEC durchgeführt, die mit mindestens zwei verschiedenen shRNAs transduziert wurden. Dadurch können mögliche unspezifische Nebeneffekte, die durch die einzelnen shRNAs entstehen könnten, erkannt werden. Vorzugsweise wurden die Analysen mit shRNA 2 und shRNA 4 transduzierten HUVEC durchgeführt, da diese beiden shRNAs auf die von *KMT2D* katalysierte H3K4me1 den stärksten Einfluss zeigten. Jedoch hatten die shRNA 4 transduzierten HUVEC ein sehr schlechtes Zellwachstum, wodurch diese nicht für jeden Versuch verwendet werden konnten. In diesen Fällen wurden die shRNA 1 transduzierten Zellen eingesetzt.

Da die transduzierten HUVEC nur bis Passage 6 für die nachfolgenden Analysen verwendet wurden, wurden die shRNA transduzierten HUVEC, nachdem der *KMT2D* Knockdown überprüft wurde, in Kryo-Röhrchen zur Langzeitaufbewahrung eingefroren. Für die weiteren Analysen wurden die transduzierten HUVEC nach Bedarf wieder aufgetaut und erneut in Kultur genommen. Nach dem Auftauen der Zellen wurde jeweils mindestens eine Transduktion für jede shRNA auf die Beibehaltung des *KMT2D* Knockdown untersucht. Dafür wurden erneut qPCR und Western Blot Analysen durchgeführt, mit denen der Effekt des Knockdowns nachgewiesen werden konnte.

4.2 Untersuchungen auf Veränderungen der Chromatinstruktur in *KMT2D* Knockdown Zellen

Über die von *KMT2D* katalysierte Monomethylierung von H3K4 nimmt *KMT2D* Einfluss auf die Chromatinstruktur. (Ford and Dingwall, 2015; Ruthenburg et al., 2007). So neutralisiert die Monomethylierung die positive Ladung der Lysine in Histonen, wodurch die negativ geladene DNA weniger stark gebunden wird. Somit kommt es zu einer Auflockerung des Chromatins, wodurch Transkriptionsfaktoren besser binden können (Campbell and Reece, 2009).

Daher wurden die genomweiten Auswirkungen des *KMT2D* Knockdowns auf die Chromatinstruktur in transduzierten HUVEC untersucht. Für diese Analysen wurde ein ATAC-Seq durchgeführt (siehe 3.9). Bei dieser Methode wird die Zugänglichkeit des Chromatins genomweit untersucht und histonfreie Chromatinregionen detektiert. Hierfür wurden aus den transduzierten HUVEC Zellkerne, die das Chromatin enthalten, extrahiert. Anschließend wurden die offenen Chromatinbereiche durch Zugabe der Tn5 Transposase, an die Adapter gebunden sind, geschnitten. Die Adapter wurden dabei in die offenen Chromatinbereiche ligiert, sodass diese Bereiche anschließend amplifiziert und sequenziert werden konnten. Zur Auswertung wurden die sequenzierten Fragmente mit dem hg19 Genom abgeglichen und gezählt. Die dabei detektierten spezifischen Anreicherungen (*Peaks*)

spiegeln die Tn5 Transposase zugänglichen und damit die offenen Chromatinbereiche wider. Anschließend wurden die offenen Bereiche, die in den *KMT2D* Knockdown HUVEC detektiert wurden, mit denen in den nsc transduzierten HUVEC detektierten Bereichen verglichen. Der ATAC-Seq sollte für alle drei shRNAs durchgeführt werden. Allerdings konnte aus den shRNA 4 transduzierten HUVEC nicht genügend Chromatin für die Analysen isoliert werden. Daher wurden die Untersuchungen nur mit shRNA 1 und shRNA 2 transduzierten HUVEC durchgeführt. Für die Analysen wurde jeweils Chromatin aus zwei verschiedenen Transduktionen isoliert, sodass für jede shRNA ein biologisches Replikat analysiert werden konnte.

Um die Reproduzierbarkeit der Replikate beurteilen zu können, wurden für die jeweiligen Replikate eine Korrelationsanalyse durchgeführt, die im Anhang in Abbildung 35 dargestellt ist. Dabei wurde die Abdeckung der einzelnen Proben für die detektierten *Peaks* bestimmt. Diese wurde anschließend in log₂ Daten transformiert und die Korrelation zwischen den Replikaten nach Spearman berechnet. Dabei korrelieren die Proben bei einem Wert von 1 am besten. Für die nsc Replikate konnte ein Korrelationsfaktor von 0,93 bestimmt werden, für die shRNA 1 Replikate von 0,96 und die Replikate der shRNA 2 transduzierten HUVEC korrelieren mit dem Faktor 0,88 (siehe Anhang Abbildung 35). Es konnten also für die ATAC-Seq Proben sehr gute Korrelationen zwischen den jeweiligen Replikaten nachgewiesen werden, was für eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Proben spricht. Für die weiteren Auswertungen wurde jedes Replikat als einzelne Probe gewertet.

4.2.1 Verteilung der detektierten ATAC-Seq *Peaks* im Genom

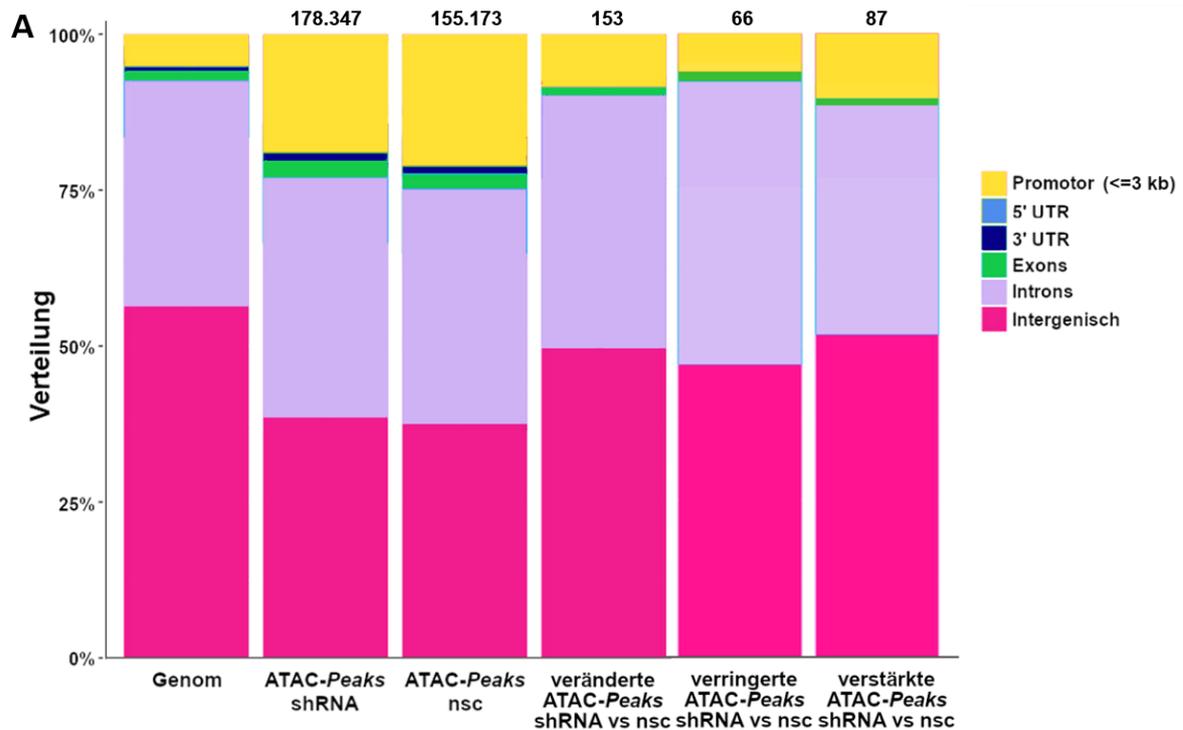
Um Veränderungen in der Zugänglichkeit des Chromatins ausmachen zu können, wurde zunächst die Verteilung, der mittels des ATAC-Seq detektierten *Peaks*, in die funktionellen Bereiche untersucht und in Abbildung 21A grafisch dargestellt. Dabei wird die Verteilung der offenen Chromatinstrukturen angegeben.

Der erste Balken zeigt die generelle, bereits bekannte Verteilung des Gesamtgenoms in die verschiedenen funktionalen Bereiche intergenische Region, Introns und Exons, 3' und 5' UTRs sowie in Promotorbereiche. Der größte Teil des Genoms stellt nichtkodierende Regionen dar. So macht der intergenische Bereich über 50% (56,5%) des Genoms aus gefolgt vom intronischen Bereich mit knapp 40% (36,1%). Die Promotorregionen stellen 5% (5,1%) des Gesamtgenoms dar. Als Promotorregion wurde der Bereich bis 3 kb in 5' Richtung vom ersten Exon eines Gens entfernt definiert. Zu den Exonstrukturen zählen knapp 2% (1,5%) des Genoms.

Betrachtet man nun die Verteilung der im ATAC-Seq detektierten *Peaks* für die shRNA Proben und die nsc transduzierten HUVEC ist sowohl eine ähnliche Anzahl an *Peaks* detektiert worden als auch eine sehr ähnliche Verteilung dieser auszumachen. In Summe sind für alle Replikate der shRNA transduzierten HUVEC 178.347 *Peaks* nachgewiesen worden, für die Replikate der nsc transduzierten Zellen 155.173 *Peaks*. Sowohl für die shRNA transduzierten Zellen als auch für die nsc transduzierten HUVEC sind die Promotorregionen im Vergleich zum Gesamtgenom deutlich angereichert. So konnten sowohl für die shRNA transduzierten HUVEC als auch für die nsc transduzierten Proben ca. 20% der *Peaks* Promotorbereichen zugeordnet werden (shRNA=18,9%; nsc=21,1%). Diese Anreicherung war zu erwarten, da die ATAC-Seq *Peaks* in offenen Chromatinbereichen liegen und diese sich zu einem großen Teil in den Promotoren befinden. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die offenen Chromatinstrukturen auch an den 5' UTR, 3' UTR und Exons angereichtert sind. Der 5' UTR Region konnten 0,05% des Gesamtgenoms zugeordnet werden und der 3' UTR Region 0,8%. Bei den shRNA transduzierten HUVEC zählen 0,1% der offenen Chromatinstrukturen zum 5' UTR und 1,3% zum 3' UTR. Bei den nsc HUVEC sind es 0,1% für die 5' UTR Region und 0,2% für die 3' UTR Region. Mit knapp 40% der *Peaks*, die intergenischen Regionen zugeordnet werden konnten, wird deutlich, dass im Vergleich zum Gesamtgenom nur sehr wenige offene Chromatinstrukturen in dieser Region detektierbar sind. So zählen 56,5% des Gesamtgenoms zu dieser Region, von dem offenen Chromatin der shRNA transduzierten HUVEC wurden lediglich 38,6% der intergenischen Region zugeordnet und von den nsc transduzierten HUVEC 37,6%.

Der Balken veränderte ATAC-*Peaks* shRNA vs nsc zeigt die Verteilung der signifikant veränderten *Peaks*, welche durch den Vergleich der shRNA transduzierten HUVEC mit den nsc transduzierten detektiert wurden. Als signifikant veränderte *Peaks* wurden jene mit einem p-adj. < 0,05 und einem *fold change* >< ±2 in die Verteilung mit einbezogen. Lediglich ca. 0,01% (153 *Peaks*) der für die shRNA bzw. nsc HUVEC detektierten *Peaks* zeigen eine signifikante Veränderung beim Vergleich zwischen den shRNA transduzierten HUVEC und den nsc transduzierten Zellen. Vergleicht man die Verteilung dieser *Peaks* mit der Verteilung für die shRNA bzw. nsc Proben (ATAC-*Peaks* shRNA bzw. ATAC-*Peaks* nsc) wird deutlich, dass die signifikant unterschiedlichen *Peaks*, von denen 50% (49,4%) dem intergenischen Bereich zugeordnet werden konnten, deutlich zunehmen und für den Promotorbereich mit knapp 10% (8,2%) deutlich abnehmen. Die signifikant veränderten *Peaks* wurden zusätzlich in verringerte und verstärkte *Peaks* unterteilt. Die Verteilung der separat betrachteten *Peaks* in die funktionellen Bereiche ist in den beiden rechten Balken dargestellt. Insgesamt waren 66 der detektierten *Peaks* in den shRNA transduzierten HUVEC im Vergleich zu den nsc transduzierten Zellen verringert. 87 *Peaks* waren in den shRNA HUVEC dagegen verstärkt. Bei der Zuordnung der *Peaks* in die funktionellen Bereiche wird deutlich, dass 10,3% der

verstärkten *Peaks* dem Promotorbereich zugeordnet werden konnte. Für die verringerten *Peaks* waren es dagegen nur 6,1%. Mit 45,5% konnten knapp 10% mehr der verringerten *Peaks* den Introns zugeordnet werden als dies für die verstärkten *Peaks* mit 36,8% der Fall war. Zum intergenischen Bereich zählten 51,7% der verringerten *Peaks* und 47,0% der verstärkten *Peaks*.



B

Anteil [%]	Promotor (<=3kb)	5' UTR	3' UTR	Exons	Introns	Intergenisch
Gesamtgenom	5,1	0,1	0,8	1,5	36,1	56,5
shRNA	18,9	0,1	1,3	2,6	38,5	38,6
nsc	21,1	0,1	1,2	2,4	37,7	37,6
shRNA vs nsc	8,2	0,0	0,0	1,3	41,1	49,4
verringert	6,1	0,0	0,0	1,5	45,5	51,7
verstärkt	10,3	0,0	0,0	1,2	36,8	47,0

Abbildung 21: Verteilung der ATAC-Seq *Peaks* im Genom.

Die im ATAC-Seq detektierten *Peaks*, aus zwei biologischen Replikaten für jeden Oligo, sind nach ihrer prozentualen Verteilung im Genom sortiert und dargestellt. Die *Peaks* für die shRNA 1 und shRNA 2 Replikate sind in shRNA zusammengefasst. Dabei wurde jedes Replikat als einzelne Probe gewertet. **A:** Dargestellt ist die Verteilung des Gesamtgenoms in die funktionellen Bereiche Promotor, 5' und 3' UTR, Exons, Introns sowie Intergenisch. Außerdem ist die Verteilung der detektierten *Peaks* der shRNA 1 und shRNA 2 Duplikate zusammengefasst (shRNA), die detektierten *Peaks* der nsc Duplikate und alle signifikant veränderten *Peaks* ($p\text{-adj.} < 0,05$; $FC >> \pm 2$) im Vergleich zwischen shRNA und nsc Proben dargestellt. Die absolute *Peak*-Anzahl ist über dem jeweiligen Balken angegeben. **B:** Die prozentuale Verteilung der detektierten *Peaks* aus A tabellarisch zusammengefasst.

Mit Hilfe der Verteilung der mittels ATAC-Seq detektierten Anteile an offenem Chromatin in die funktionellen Bereiche konnte nachgewiesen werden, dass die in den *KMT2D* Knockdown HUVEC im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC signifikant unterschiedlichen *Peaks* überwiegend in intronischen und intergenen Regionen liegen. Im intergenischen Bereich finden sich auch cis-regulatorische Elemente, wie *Enhancer*. Die Tabelle in Abbildung 21B fasst die in Abbildung 21A grafisch dargestellte Verteilung in die funktionellen Bereiche zusammen. Angegeben ist die prozentuale Verteilung der detektierten *Peaks* in die Bereiche der Promotorregion, der 5'- und 3' UTRs, in die Bereiche der Exons und Introns sowie in intergenische Regionen.

4.2.2 Analyse der signifikant veränderten *Peaks*

Um Hinweise auf mögliche Veränderungen in der Gentranskription oder auf biologische Prozesse zu erhalten, wurden die signifikant veränderten *Peaks* genauer analysiert. Dazu wurde analysiert, ob die veränderten *Peaks* mit *Enhancern* in Verbindung gebracht werden können. Des Weiteren wurden die *Peaks* den nächstgelegenen Genen zugeordnet, um mögliche Effekte der Veränderungen in der Chromatinstruktur auf diese Gene zu untersuchen.

4.2.2.1 Zuordnung der signifikant veränderten *Peaks* zu Super-*Enhancern*

Da die von *KMT2D* katalysierte Monomethylierung von H3K4 vor allem für *Enhancer* Regionen bekannt ist, wurde mit einer *Enhancer*-Analyse überprüft, ob die in den *KMT2D* Knockdown HUVEC detektierten signifikant veränderten *Peaks* möglichen Super-*Enhancern* zuzuordnen sind. Dafür wurden die signifikant veränderten *Peaks*, die nicht direkt am 5'-Ende eines Gens liegen und nicht mit einer *Transcription Start Site* oder einer Promotor Region überlappen, als potenzielle *Enhancer* gewertet. Anschließend wurde die räumliche Nähe der potenziellen *Enhancern* zueinander bestimmt. Alle potenziellen *Enhancer* die näher als 12 kb beieinander liegen werden zu einem möglichen Super-*Enhancer* zusammengefasst. Super-*Enhancer* sind Regionen, die aus mehreren eng beieinanderliegenden *Enhancern* bestehen und an diese Transkriptionsfaktoren gleichzeitig binden können, um so die Transkription zu verstärken. Zur Bestätigung der möglichen detektierten Super-*Enhancer* werden diese mit Datenbanken abgeglichen.

Von den insgesamt 87 signifikant verstärkten *Peaks* in den *KMT2D* Knockdown HUVEC im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC wurden 33 als potenzielle *Enhancer* gewertet. Als potenzielle *Enhancer* von den insgesamt 66 signifikant verringerten *Peaks*, die in den *KMT2D* Knockdown HUVEC detektiert wurden, wurden 41 *Peaks* detektiert. Die Bestimmung

der Distanz zwischen den potenziellen *Enhancern* zeigte, dass alle weiter als 12 kb voneinander entfernt liegen. Die in den *KMT2D* Knockdown HUVEC signifikant veränderten *Peaks* sind daher keinem Super-*Enhancer* zuzuordnen.

4.2.2.2 GO-Analyse, der Genen zugeordneten, signifikant veränderten *Peaks*

Um die Auswirkungen der Chromatinveränderungen in den *KMT2D* Knockdown HUVEC auf mögliche Gene und biologische Prozesse untersuchen zu können, wurden alle detektierten signifikant veränderten *Peaks* zunächst den nächstgelegenen Genen zugeordnet.

Die beim Vergleich der shRNA transduzierten HUVEC gegen die nsc transduzierten insgesamt nachgewiesenen 87 signifikant verstärkten ATAC-Seq *Peaks* konnten 76 verschiedenen Genen zugeordnet werden. Davon sind 39 Gene, etwa die Hälfte, proteinkodierende Gene. Eine Auflistung dieser für Proteine kodierenden Gene ist im Anhang in Tabelle 2A dargestellt. Die restlichen *Peaks* wurden RNA Genen wie *Putative Open Reading Frames*, Micro RNAs und *Long Intergenic Non-Protein Coding RNAs* zugeordnet. Die in den *KMT2D* Knockdown HUVEC detektierten 66 signifikant verringerten *Peaks* konnten insgesamt 50 Genen zugeordnet werden. Von diesen 50 Genen sind mehr als die Hälfte proteinkodierend. Die 33 Gene, die für ein Protein kodieren, sind im Anhang in Tabelle 2B aufgelistet.

Allerdings muss bei diesen Analysen berücksichtigt werden, dass die, durch *KMT2D* katalysierte, H3K4me1 Einfluss auf *Enhancer* nimmt und diese *Enhancer* sehr weit von den Genen, die sie regulieren, entfernt liegen können. Dabei könnte es bei dieser Analyse auch zu falschen Genzuordnungen der *Peaks* kommen. Denn die detektierten *Peaks* könnten *Enhancer* Regionen widerspiegeln die nicht auf das nächstgelegene Gen, sondern auf ein weiter entfernt liegende Gene Einfluss nehmen.

Um eine Übersicht über möglicherweise veränderte biologische Prozesse zu gewinnen wurden, GO-Analysen für die signifikant veränderten *Peaks* durchgeführt. Dafür wurden alle Gene, denen die *Peaks* zugeordnet werden konnten, verwendet. Die Gene, die den signifikant verstärkten *Peaks* zugeordnet werden konnten, wurden separat von den Genen der signifikant verringerten *Peaks* betrachtet. Um die mögliche Veränderung der biologischen Prozesse statistisch zu bewerten, sollte eine *Enriched* GO-analyse durchgeführt werden. Dabei wird überprüft, ob bekannte biologische Prozesse in der Gesamtliste an in der GO-Analyse verwendeten Genen überrepräsentiert (*enriched*) vorliegen. Doch aufgrund der geringen Genemenge, die für die signifikant verstärkten bzw. signifikant verringerten *Peaks* detektiert werden konnte, konnte keine *Enriched* GO-Analyse durchgeführt werden. Um trotzdem Hinweise auf möglicherweise veränderte biologische Prozesse zu erhalten, wurde sowohl für die Gene der verstärkten *Peaks* als auch für die Gene der verringerten *Peaks* eine *grouped*

GO-Analyse durchgeführt. Dabei werden die in Datenbanken eingetragenen biologischen Prozesse, mit denen die Gene assoziiert werden können, ohne statistische Bewertung der Zuordnung, aufgelistet.

Die insgesamt 76 Gene, denen die signifikant verstärkten *Peaks* der *KMT2D* Knockdown HUVEC zugeordnet werden konnten, wurden in der GO-Analyse 122 verschiedenen biologischen Prozessen zugeordnet. Eine Auflistung dieser Prozesse ist im Anhang in Tabelle 3 dargestellt. Es konnten lediglich sehr allgemeine biologische Prozesse wie die Regulation zellulärer Prozesse oder der Signaltransduktion detektiert werden.

Die signifikant verringerten detektierten ATAC-Seq *Peaks* konnten insgesamt 50 verschiedenen Genen zugeordnet werden. In der *grouped* GO-Analyse konnten diese Gene mit 99 verschiedenen biologischen Prozessen assoziiert werden. Eine Übersicht der zugeordneten Prozesse ist im Anhang in Tabelle 4 aufgelistet. Auch die Gene der, in den *KMT2D* Knockdown HUVEC im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC detektierten, verringerten *Peaks*, konnten ebenfalls nur allgemeinen biologischen Prozessen zugeordnet werden. So können die Gene z.B. mit zellulären metabolischen Prozessen oder der Zellkommunikation in Verbindung gebracht werden. Zusätzlich ist zu beachten, dass viele biologische Prozesse in beiden GO-Analysen aufgelistet wurden. So konnten von den 99 biologischen Prozessen, die den Genen der signifikant verringerten *Peaks* zugeordnet werden konnten, 79 Prozesse auch mit den Genen der signifikant verstärkten *Peaks* assoziiert werden.

Aufgrund der geringen signifikant unterschiedlichen *Peak*-Menge beim Vergleich der shRNA transduzierten HUVEC zu den nsc transduzierten konnten nur sehr geringe Effekte auf die Chromatinstruktur nachgewiesen werden.

4.3 Untersuchung differentiell exprimierter Gene in *KMT2D* Knockdown HUVEC

Da *KMT2D* durch die H3K4me1 *Enhancer*-Regionen reguliert und diese die Genexpression beeinflussen, wurden die Auswirkungen des *KMT2D* Knockdowns auf die Expression anderer Gene mittels RNA-Seq Analysen untersucht. Dafür wurde aus HUVEC der Passage 2 aus zwei verschiedenen Transduktionen mit den nsc, shRNA 2 und shRNA 4 Plasmiden die RNA mittels RNeasy Mini Kit extrahiert. Bevor die RNA extrahiert wurde, wurde der *KMT2D* Knockdown nochmals mittels qPCR und Western Blot Analysen überprüft. Für den RNA-Seq mittels *Next Generation Sequencing* (siehe 3.10) wurde aus der extrahierten RNA die mRNA, die am 3'-Ende eine poly-A Sequenz trägt, aus der Gesamt-RNA isoliert. Durch Bindung des poly-A Schwanzes der mRNA an magnetische Beads, an denen eine poly-T Sequenz angeheftet ist, wurde die mRNA isoliert. Aus dieser wurde cDNA synthetisiert und probenspezifische Indizes

daran ligiert, um anschließend die sequenzierten cDNA Stränge den Ausgangsproben zuordnen zu können. Die Sequenzierung wurde auf dem NextSeq500 von Illumina durchgeführt und für jede Probe im Schnitt 40 Mio *reads* generiert. Die *reads* der Proben wurden anschließend mit dem Referenzgenom hg19 abgeglichen und die Anzahl an *gemappten reads* für jede Probe gezählt. Um differentiell exprimierte Gene zu detektieren, wurden alle vier *KMT2D* Knockdown Proben (Replikate für shRNA 2 und Replikate für shRNA 4) als Einzelproben gewertet zusammengefasst und mit den nsc Proben verglichen.

Wie für die ATAC-Seq Proben wurde auch für die RNA-Seq Proben vor den Analysen die Qualität der Replikate mit Hilfe einer Korrelationsanalyse beurteilt. Dabei wurde die Abdeckung der einzelnen Proben für die detektierten Gene bestimmt, diese in log₂ Daten transformiert und die Korrelation zwischen den Replikaten berechnet. Für die nsc transduzierten Replikate sowie für die shRNA 2 Replikate konnte jeweils ein Korrelationsfaktor von 0,97 ermittelt werden. Die shRNA 4 Replikate wurde ein Korrelationsfaktor von 0,93 bestimmt (siehe Anhang Abbildung 36). Für alle drei Gruppen ging die Korrelation gegen 1, was eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Proben widerspiegelt.

Die zehn am stärksten hoch- und herunterregulierten Gene der RNA-Seq Analyse, bei der die Proben der shRNA 2 Transduktion und der shRNA 4 Transduktion zusammen gegen die nsc transduzierten HUVEC verglichen wurden (shRNA vs nsc), sind in Tabelle 1 aufgelistet. Dabei wurde jedes einzelne Replikat der vier shRNA Proben als separate Probe gewertet. In der Tabelle ist neben dem *fold change* auch der p-adj.-Wert angegeben. Insgesamt wurden 70 Gene detektiert, welche mit einem *fold change* > 2 und einem p-adj. < 0,05 als signifikant hochreguliert gewertet wurden. Die, durch den *KMT2D* Knockdown, am stärksten hochregulierten Gene sind *VCAN* (*Versican*), *HAPLN1* (*Hyaluronan and Proteoglycan Link Protein1*) und *CLMP* (*CXADR Like Membrane Protein*). Von insgesamt 63 signifikant herunterregulierten Genen (FC < -2; p-adj. < 0,05), die in den *KMT2D* shRNA transduzierten HUVEC gefunden wurden, sind die am stärksten herunterregulierten Gene, *SOX18* (*SRY-Box Transcription Factor 18*), *CLDN5* (*Claudin 5*) sowie *FAM110D* (*Family With Sequence Similarity 110 Member D*).

Tabelle 1: Mittels RNA-Seq detektierte differentiell exprimierte Gene in *KMT2D* Knockdown HUVEC.

Gen	Fold change shRNA vs. nsc	p-adj. shRNA vs. nsc
<i>VCAN</i>	18.79	9.80×10 ⁻²⁹
<i>HAPLN1</i>	7.38	5.97×10 ⁻¹²
<i>CLMP</i>	5.03	6.15×10 ⁻⁷
<i>COL1A2</i>	4.84	1.47×10 ⁻¹¹
<i>CST1</i>	4.11	7.32×10 ⁻⁵
<i>IGFBP3</i>	4.10	7.12×10 ⁻⁵
<i>RIMS2</i>	4.04	1.11×10 ⁻⁴
<i>SLC8A1</i>	3.92	9.58×10 ⁻⁶
<i>ITGB4</i>	3.88	3.16×10 ⁻⁵
<i>SLIT3</i>	3.76	1.87×10 ⁻⁴
+ 60 Gene	> 2	< 0.05
+ 53 Gene	< -2	< 0.05
<i>CCM2L</i>	-4.22	5.58×10 ⁻⁵
<i>DLL4</i>	-4.39	1.82×10 ⁻⁶
<i>MIR663AHG</i>	-4.47	1.21×10 ⁻⁵
<i>POU2F2</i>	-4.72	5.90×10 ⁻⁶
<i>SPNS2</i>	-4.76	2.30×10 ⁻⁸
<i>NOTCH4</i>	-4.77	4.51×10 ⁻⁶
<i>CXorf36</i>	-4.78	2.41×10 ⁻⁹
<i>FAM110D</i>	-5.37	2.89×10 ⁻⁷
<i>CLDN5</i>	-5.61	7.98×10 ⁻¹⁵
<i>SOX18</i>	-5.78	7.42×10 ⁻¹³

Gelistet sind die differentiell regulierten Gene, welche in allen vier shRNA transduzierten Proben im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC gefunden wurden, mit ihrem *fold change* und dem p-adj.-Wert. Die Top 10 hoch- und herunterregulierten Gene sind einzeln aufgelistet.

4.3.1 Validierung der RNA-Seq Ergebnisse

Um die Ergebnisse des RNA-Seq zu validieren, wurden jeweils vier der hochregulierten und vier der herunterregulierten Gene, welche in Tabelle 1 aufgelistet sind, mit Hilfe von qPCR-Analysen mit TaqMan Gene Expression Assays untersucht. Die Validierung wurde mit transduzierten HUVEC für alle drei *KMT2D* shRNAs (shRNA 1, shRNA 2 und shRNA 4) durchgeführt. Dafür wurde erneut Gesamt-RNA von den jeweils transduzierten HUVEC isoliert und für die cDNA Synthese eingesetzt. Für die Validierung der RNA-Seq Daten wurden Proben einer anderen Transduktion als für den RNA-Seq verwendet. Es wurden transduzierte HUVEC zwischen Passage 2 und 3 verwendet und der *KMT2D* Knockdown wurde vor den Analysen mittels Western Blot und qPCR überprüft. Die synthetisierte cDNA wurde anschließend für die qPCR Analysen verwendet. Die qPCR wurde für jede Probe im Duplikat angesetzt. Zur späteren Auswertung wurde bei jeder qPCR das *Housekeeping Gen GAPDH* mitgeführt,

worauf die Proben normalisiert wurden. Anschließend wurden die normalisierten Werte jeweils mit denen der nsc transduzierten Proben verglichen und darauf bezogen. Die daraus entstandenen *fold change* Werte sind in Abbildung 22 dargestellt.

Für die Validierung der hochregulierten Gene wurden die Gene *VCAN*, *HAPLN1*, *CLMP* und *COL1A2* (*Collagen Type 1 Alpha 2 Chain*) mittels qPCR analysiert (Abbildung 22A-D). Für *VCAN* wurde im RNA-Seq in den *KMT2D* Knockdown HUVEC eine erhöhte Expression mit einem *fold change* von 18,79 nachgewiesen. Die qPCR zeigte für shRNA 1 transduzierte HUVEC eine erhöhte *VCAN* Expression mit einem *fold change* von 127,9, für shRNA 2 einen *fold change* von 206,5 und für die shRNA 4 HUVEC von 289,7 (Abbildung 22A). Für *HAPLN1* wurde im RNA-Seq eine erhöhte Expression mit einem *fold change* von 7,38 nachgewiesen. In der qPCR lag der *fold change* für die shRNA 1 transduzierten Zellen bei 146,7 für die shRNA 2 bei 166,9 und für die shRNA 4 HUVEC bei 260,7 (Abbildung 22B). Der RNA-Seq detektierte eine Überexpression für *CLMP* in den *KMT2D* defizienten HUVEC mit einem *fold change* von 5,0. Mittels qPCR konnte eine erhöhte Expression für die shRNA 1 HUVEC mit einem *fold change* von 7,8, für die shRNA 2 HUVEC von 14,1 und für die shRNA 4 HUVEC von 5,8 nachgewiesen werden (Abbildung 22C). Im RNA-Seq wurde eine erhöhte *COL1A2* Expression mit einem *fold change* von 4,8 detektiert. Mittels qPCR konnte auch diese Überexpression validiert werden. So zeigten die shRNA 1 transduzierten HUVEC im Vergleich zu den nsc transduzierten eine verstärkte Expression mit einem *fold change* von 3,1, die shRNA 2 transduzierten HUVEC mit einem *fold change* von 4,5 und die shRNA 4 transduzierten HUVEC mit 7,7 (Abbildung 22D). Mittels qPCR konnten die im RNA-Seq gezeigten Auswirkungen des *KMT2D* Knockdowns auf die Genexpression ebenfalls nachgewiesen werden. Zusätzlich konnten die Effekte auch in den shRNA 1 transduzierten HUVEC, die im RNA-Seq nicht verwendet wurden, gezeigt werden. *VCAN*, *HAPLN1* und *CLMP* waren in den qPCR Analysen noch deutlicher hochreguliert als im RNA-Seq detektiert wurde.

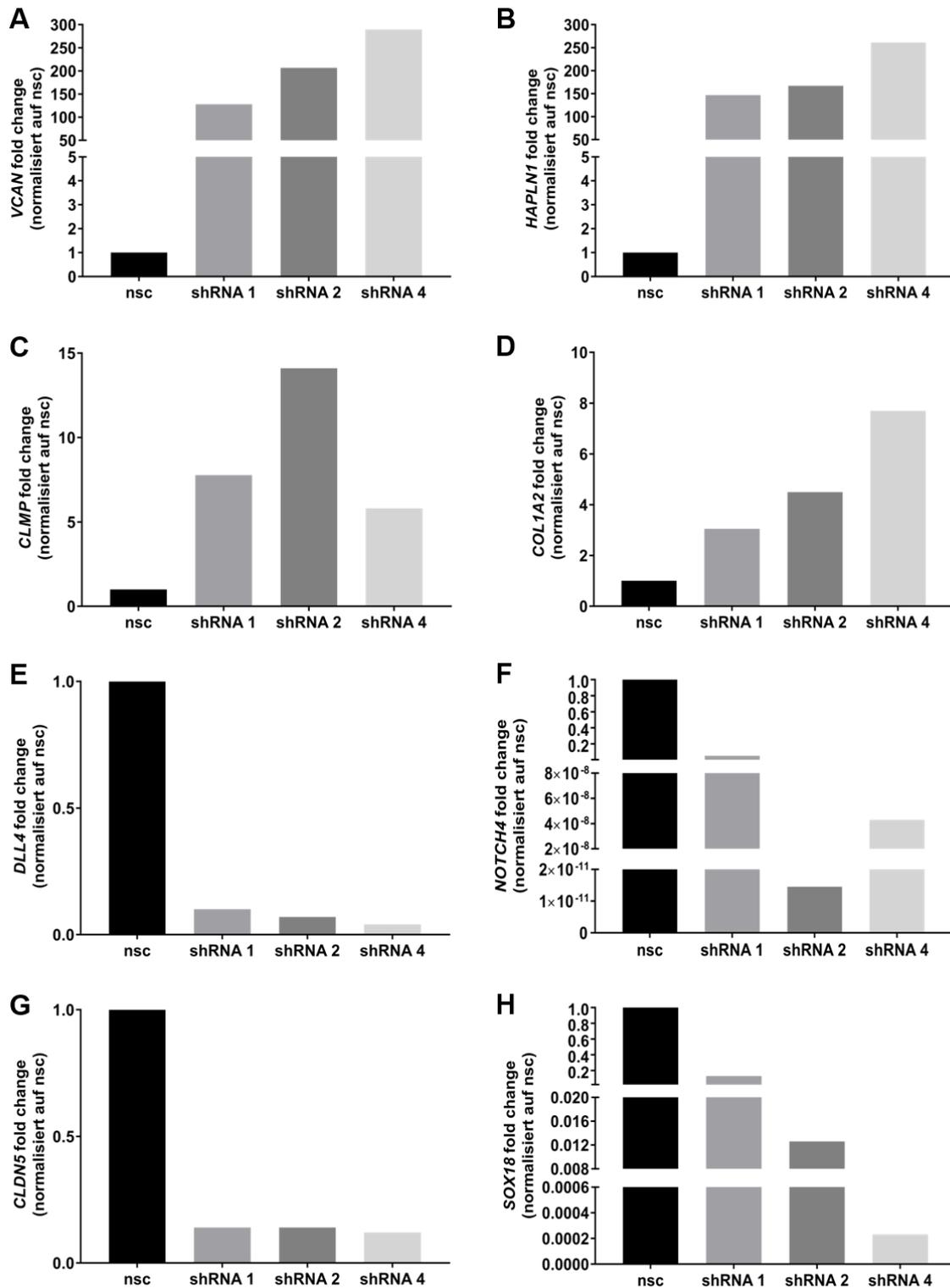


Abbildung 22: Validierung der RNA-Seq Daten mittels TaqMan Expressionsanalysen.

Die RNA-Seq Daten wurden durch qPCR Analysen von jeweils vier, der am stärksten hoch- und herunterregulierten Gene, validiert. Dargestellt ist der *fold change* jeder shRNA normalisiert auf das Houskeeping Gen *GAPDH* und bezogen auf die nsc transduzierten HUVEC. **A-D**: Validierung für vier, der in Tabelle 1 aufgelisteten, am stärksten hochregulierten Gene (*VCAN*, *HAPLN1*, *CLMP*, *COL1A2*). **E-H**: Validierung für vier, der in Tabelle 1 aufgelisteten, am stärksten herunterregulierten Gene (*DLL4*, *NOTCH4*, *CLDN5*, *SOX18*).

Die Ergebnisse des RNA-Seq für herunterregulierte Gene wurden ebenfalls durch qPCR Analysen mit Hilfe von TaqMan Gene Expression Assays für die Gene *DLL4* (*Delta Like Canonical Notch Ligand 4*), *NOTCH4* (*Notch Receptor 4*), *CLDN5* und *SOX18* überprüft (Abbildung 22E-H). Für *DLL4* wurde im RNA-Seq eine Herunterregulation in den *KMT2D* defizienten HUVEC mit einem *fold change* von 0,2 nachgewiesen. Mittels qPCR konnten im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC für die shRNA 1 HUVEC eine Reduktion mit einem *fold change* von 0,1, für die shRNA 2 HUVEC von 0,1 und für die shRNA 4 transduzierten HUVEC von 0,04 detektiert werden (Abbildung 22E). Für *NOTCH4* zeigte der RNA-Seq eine verringerte Expression in den shRNA HUVEC mit einem *fold change* von 0,2. In den qPCR Analysen konnte eine noch deutlich geringere Expression detektiert werden. Die shRNA 1 transduzierten HUVEC zeigten eine Herunterregulation mit einem *fold change* von 0,1 im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC, die shRNA 2 HUVEC von $1,5 \times 10^{-11}$ und die shRNA 4 HUVEC von $4,3 \times 10^{-8}$ (Abbildung 22F). Der RNA-Seq zeigte eine verringerte *CLDN5* Expression für die shRNA transduzierten HUVEC mit einem *fold change* von 0,2. In der qPCR zeigten alle shRNA transduzierten HUVEC (shRNA 1, shRNA 2 und shRNA 4) eine Herunterregulation mit einem *fold change* von 0,1 (Abbildung 22G). Für *SOX18* wurde im RNA-Seq eine verringerte Expression mit einem *fold change* von 0,2 nachgewiesen, in der qPCR für die shRNA 1 HUVEC von 0,1, shRNA 2 HUVEC von 0,01 und für die shRNA 4 transduzierten HUVEC von 0,0002 im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC (Abbildung 22H). Die Ergebnisse für die herunterregulierten Gene des RNA-Seq konnten ebenso mittels qPCR bestätigt werden und zeigen mittels qPCR auch in den meisten Fällen stärkere Herunterregulationen als im RNA-Seq.

4.3.2 GO-Analyse der mittels RNA-Seq detektierten differentiell regulierten Gene

Um Hinweise darauf zu bekommen welche biologischen Prozesse durch die, in den *KMT2D* Knockdown HUVEC detektierten, differentiell exprimierten Genen verändert sein könnten, wurden sowohl für die hoch- als auch für die herunterregulierten Gene *Enriched* GO-Analysen durchgeführt. Dabei wird überprüft, ob bekannte biologische Prozesse in der Gesamtliste an differentiell exprimierten Genen statistisch überrepräsentiert sind.

Für die *Enriched* GO-Analyse der im RNA-Seq, in den *KMT2D* defizienten HUVEC detektierten, hochregulierten Gene, wurden die insgesamt 70 Gene in die Analyse mit einbezogen, die allesamt eine signifikante Hochregulation mit einem p-adj. < 0,05 und einem FC > 2 beim Vergleich der vier Proben beider shRNAs mit den nsc transduzierten HUVEC zeigten. Insgesamt konnten die Gene 66 biologischen Prozessen zugeordnet werden. In der *Dotplot* Grafik in Abbildung 23 sind zehn der 66 biologischen Prozesse grafisch dargestellt.

Diese zehn ausgewählten biologischen Prozesse sind die mit am stärksten überrepräsentierten Prozesse, die endothelspezifisch sind und in Bezug zur Dedifferenzierung stehen. Die Gene Ratio, der p-adj.-Wert sowie die Anzahl sind mit in der Grafik angegeben. Dabei beschreibt die Gene Ratio den Quotienten aus der Gesamtzahl der differentiell regulierten, in die GO-Analyse eingesetzten Gene und der Anzahl an Genen, die dem biologischen Prozess zugeordnet werden konnten. Zusätzlich ist die Anzahl an Genen, die dem biologischen Prozess zugeordnet werden konnten, durch die Größe des Punktes in der Abbildung symbolisiert. Durch die signifikant hochregulierten Gene sind biologische Prozesse wie die Organisation der extrazellulären Strukturen und der extrazellulären Matrix beeinflusst, denn beiden Prozessen konnten von den insgesamt 70 Genen 14 Gene zugeordnet werden. Unter anderem werden diese Prozesse auch von den am stärksten hochregulierten Genen *VCAN*, *HAPLN1* und *COL1A2* beeinflusst. Aber auch das Zellwachstum und die Zellmigration könnten verändert sein. Neun der in der Gesamtgenliste verfügbaren Gene spielen im Zellwachstum eine Rolle und sieben in der Zellmigration. Eine Auflistung aller in der GO-Analyse detektierten biologischen Prozesse ist im Anhang in Tabelle 5 zu finden.

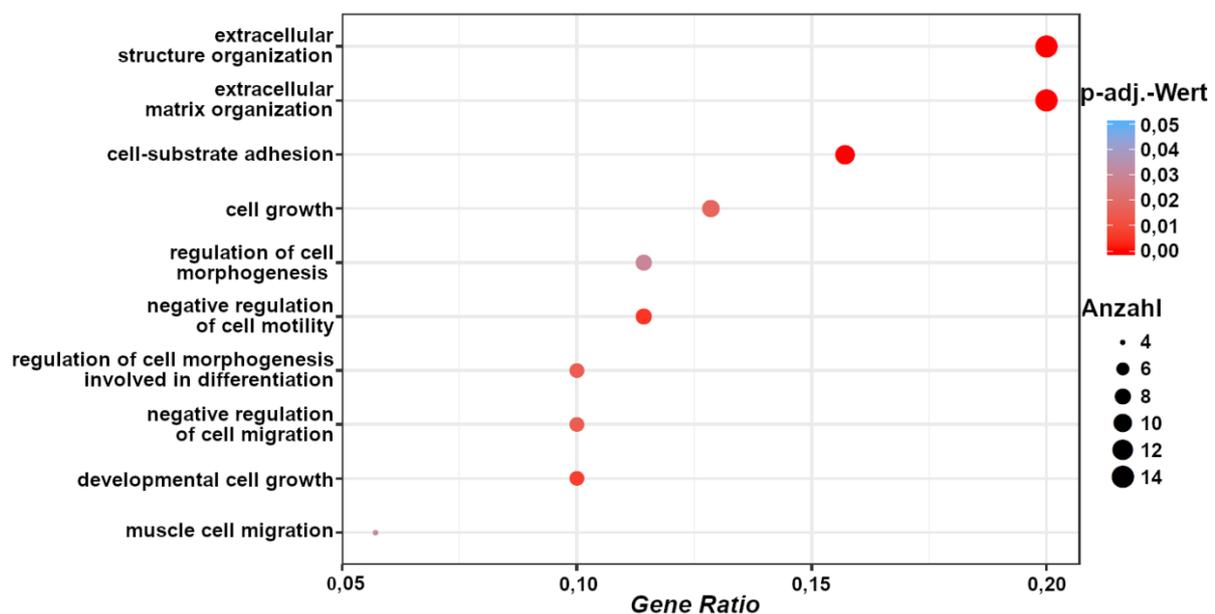


Abbildung 23: Enriched GO-Analyse der im RNA-Seq als signifikant hochreguliert identifizierten Gene.

Enriched GO-Analyse aller 70 im RNA-Seq (shRNA vs nsc) signifikant hochregulierten Genen (p-adj. < 0,05; FC > 2). In der *Dotplot* Grafik sind zehn der insgesamt 66 biologischen Prozesse, denen die hochregulierten Gene zugeordnet werden konnten, dargestellt. Gezeigt sind endothelspezifische Prozesse und Prozesse der Dedifferenzierung. Auch die Anzahl, die *Gene Ratio* und der p-adj.-Wert ist mit angegeben.

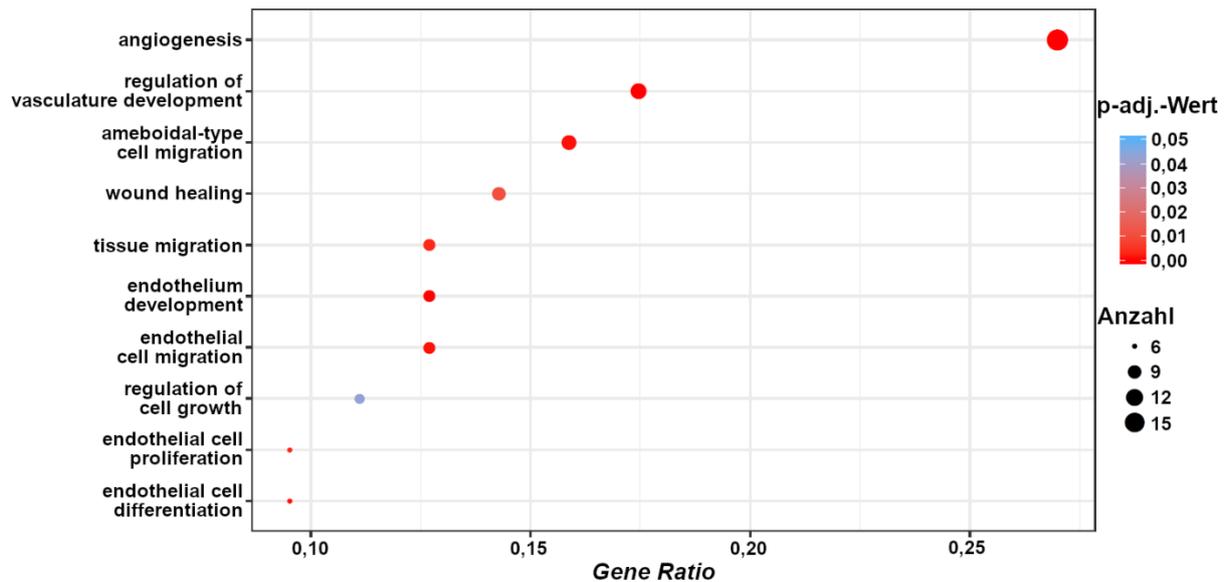


Abbildung 24: Enriched GO-Analyse der im RNA-Seq als signifikant herunterreguliert identifizierten Gene. Enriched GO-Analyse aller 63 im RNA-Seq (shRNA vs nsc) signifikant herunterregulierten Genen ($p\text{-adj.} < 0,05$; $FC < -2$). In der *Dotplot* Grafik sind zehn der insgesamt 46 biologischen Prozesse, denen die herunterregulierten Gene zugeordnet werden konnten, dargestellt. Gezeigt sind endothelspezifische Prozesse und Prozesse der Dedifferenzierung. Auch die Anzahl, die *Gene Ratio* und der *p-adj.-Wert* ist mit angegeben.

Für die *Enriched GO-Analyse* der im RNA-Seq, in den *KMT2D* defizienten HUVEC detektierten, signifikant herunterregulierten Gene, wurden die insgesamt 63 Gene, mit einem $p\text{-adj.} < 0,05$ und einem $FC < -2$, in die Analyse mit einbezogen. Diese Gene konnten insgesamt 46 biologischen Prozessen zugeordnet werden. In der *Dotplot* Grafik in Abbildung 24 sind zehn der insgesamt 46 biologischen Prozessen grafisch dargestellt. Auch diese Prozesse sind die mit am stärksten überrepräsentierten endothelspezifischen Prozesse und Prozesse die bei der Dedifferenzierung eine Rolle spielen. Die *Gene Ratio*, der *p-adj.-Wert* sowie die Anzahl sind ebenfalls in der Grafik mit angegeben. Durch die signifikant herunterregulierten Gene sind biologische Prozesse wie die Angiogenese und die Zellmigration beeinflusst. So konnten der Angiogenese von den insgesamt 63 Genen 17 Gene zugeordnet werden. Auch die am stärksten herunterregulierten Gene, *SOX18*, *DLL4* und *NOTCH4*, beeinflussen die Angiogenese. Die Veränderung der Migration wird durch mehrere biologische Prozesse deutlich. So konnten zehn Gene, darunter *SOX18* und *DLL4*, der amöbenartigen Zellmigration, acht Gene der Gewebemigration und sechs Gene der Endothelzellmigration zugeordnet werden. Generell konnten die signifikant herunterregulierten Gene in der GO-Analyse vielen endothelspezifischen biologischen Prozesse zugeordnet werden. So sind Prozesse wie die Endothelentwicklung, die Endothelzellmigration, die Endothelzellproliferation sowie die Endothelzelldifferenzierung beeinflusst. Alle in der

GO-Analyse, der signifikant herunterregulierten Gene, detektierten biologischen Prozesse sind im Anhang in Tabelle 6 aufgelistet.

Mit Hilfe des RNA-Seq der *KMT2D* defizienten HUVEC konnte gezeigt werden, dass *KMT2D* Einfluss auf die Genexpression von unter anderem *VCAN*, *COL1A2*, *HAPLN1* sowie *SOX18*, *CLDN5* und *NOTCH4* hat. Durch die anschließende *Enriched* GO-Analyse, der in den shRNA transduzierten HUVEC differentiell regulierten Genen, wurden biologische Prozesse detektiert, die durch den *KMT2D* Knockdown beeinflusst sein könnten. So finden sich unter anderem Veränderungen in der Extrazellulären Matrix, im Zellwachstum, im Migrationsverhalten sowie der Angiogenese und der Gefäßentwicklung. Vor allem die GO-Analyse der herunterregulierten Gene zeigte, dass in den *KMT2D* Knockdown HUVEC auch viele endothelspezifische Funktionen beeinflusst werden.

4.4 Veränderungen des Integrin Signalwegs in *KMT2D* Knockdown Zellen

Die drei hochregulierten Gene *VCAN*, *COL1A2* und *HAPLN1*, welche im RNA-Seq detektiert wurden, können alle mit dem Integrin Signalweg in Verbindung gebracht werden (Emsley et al., 2000; Wu et al., 2002, 2005). So kann Hyaluron an Versican binden, das wiederum an das zelloberflächen Glykoprotein β_1 -Integrin binden kann (Wu et al., 2002, 2005). Auch Kollagen wird von den Integrinen erkannt und gebunden. Das $\alpha_2\beta_1$ -Integrin wird von vielen Zelltypen an der Oberfläche exprimiert und dient dort als Rezeptor für Kollagen (Emsley et al., 2000). Deshalb wurde der Integrin Signalweg weiter untersucht. Eine vereinfachte Darstellung des Integrin Signalwegs ist in Abbildung 25 aufgezeigt.

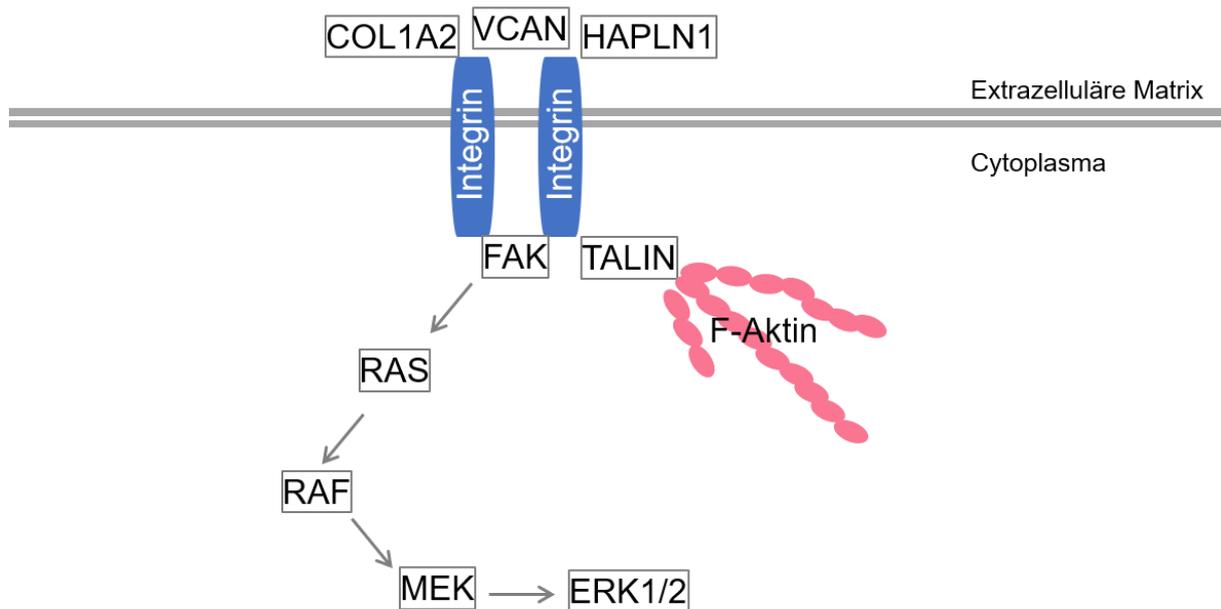


Abbildung 25: Vereinfachte und gekürzte Darstellung des Integrin Signalwegs.

Durch Ligandenaktivierung der Integrine werden viele intrazelluläre Signalwege, wie der MEK/ERK Signalweg, aktiviert. Aber auch die Aktinpolymerisierung kann durch Integrine aktiviert werden.

4.4.1 Verstärkte Phosphorylierung von FAK in *KMT2D* Knockdown HUVEC

FAK (*Focal adhesion kinase*) ist eine zyttoplasmatische Protein Tyrosin Kinase, die in der Integrin-vermittelten Signaltransduktion involviert ist. Bindet Integrin an FAK wird diese durch die Autophosphorylierung an Tyrosin 397 aktiviert. Dadurch entstehen Bindestellen für Proteine, die eine SH2-Domäne besitzen, wie Src Kinasen. Bindet die Src Kinase an FAK wird diese ebenfalls aktiviert, wodurch FAK an weiteren Tyrosinen phosphoryliert werden kann. Dadurch wird die Kinaseaktivität von FAK und die Interaktion mit anderen Proteinen gefördert (Harburger and Calderwood, 2009; Legate et al., 2009). Daher wurde zunächst die Phosphorylierung von FAK und damit die aktive Form von FAK mittels Western Blot Analysen untersucht.

Dazu wurden unbehandelte und transduziert HUVEC zwischen Passage 2 und 6 verwendet. Es wurden sowohl frisch aufgetaute als auch schon in Kultur gehaltene Zellen eingesetzt. Frisch aufgetaute Zellen wurden mindestens einmal gesplittet, bevor sie für die Analysen verwendet wurden und bei den *KMT2D* shRNA transduzierten HUVEC wurde vor der Verwendung in Experimenten der Knockdown überprüft. Für die Generierung von Zelllysaten wurden pro 1×10^5 Zellen 20 μ l 2xSample Buffer zugegeben und die Zellen darin resuspendiert und sonifiziert. Jeweils 5 μ l des Zelllysats wurden für die Western Blot Analysen verwendet. Da im Vergleich zu den shRNA 4 transduzierten HUVEC von den shRNA 1 und den shRNA 2

transduzierten Zellen, durch ihr besseres Zellwachstum, deutlich mehr Zelllysat zur Verfügung stand, wurden diese beiden shRNAs für die Analyse der p-FAK/FAK verwendet.

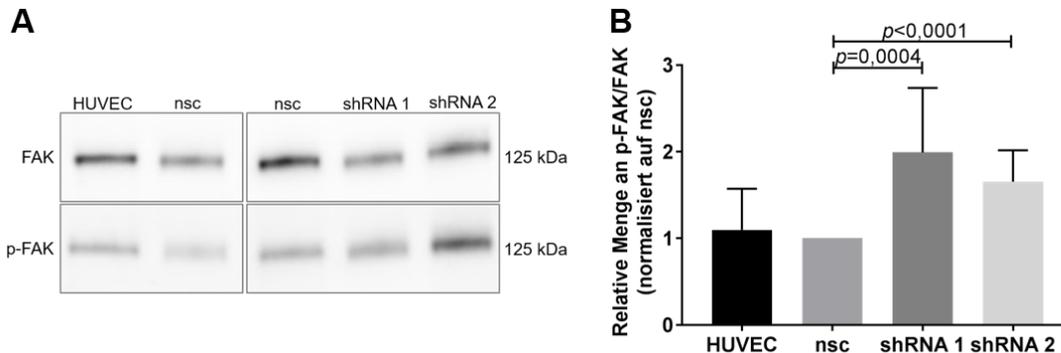


Abbildung 26: Zunahme an phosphorylierter FAK in den *KMT2D* Knockdown HUVEC.

Um die Phosphorylierung von FAK in den *KMT2D* Knockdown HUVEC zu untersuchen wurden unbehandelte und stabil transduzierte Zellen (HUVEC, nsc, shRNA 1 und shRNA 2) verwendet. **A:** Western Blot Analysen mit Lysaten von untransduzierten HUVEC und mit nsc, shRNA 1 oder shRNA 2 transduzierten HUVEC. Die FAK und p-FAK Proben wurden auf derselben Membran *gebblottet* und die umrahmten Banden sind vom selben *Blot*. **B:** Der Anteil an p-FAK zu FAK bezogen auf nsc in den *KMT2D* Knockdown HUVEC. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SD von sechs unabhängigen Experimenten. Zur Bewertung von signifikanten Unterschieden wurde ein Student's *t*-Test durchgeführt. Zusätzlich wurden alle Daten ebenfalls mit dem nichtparametrischen, zweiseitigen Mann-Whitney *U*-Test analysiert. Der höhere *p*-Wert ist in der Grafik angegeben.

In sechs unabhängigen Experimenten wurde die Menge an phosphoryliertem FAK (p-FAK) relativ zur unphosphorylierten Form (FAK) detektiert und mit den nsc transduzierten HUVEC verglichen. Die Proben für die FAK und p-FAK Detektion wurden auf derselben Membran *gebblottet* und alle FAK bzw. p-FAK Proben jeweils gleichlang entwickelt. Für die Auswertung der Western Blot Analysen und die Bestimmung der relativen Menge an p-FAK/FAK wurden die detektierten Banden zuerst auf das jeweilige Gesamtprotein normalisiert und anschließend der Quotient aus den normalisierten p-FAK und den normalisierten FAK Werten ermittelt. Um die relative Menge zu erhalten wurde dieser Quotient auf den Quotienten der nsc transduzierten HUVEC bezogen und der Mittelwert aus allen Experimenten berechnet. Diese mittlere relative Menge der *KMT2D* Knockdown HUVEC bzw. unbehandelten HUVEC bezogen auf die nsc transduzierten HUVEC ist in Abbildung 26 dargestellt. Mit einer mittleren relativen Menge an p-FAK/FAK von $1,1 \pm 0,2$ in den unbehandelten HUVEC im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC ist kein signifikanter Unterschied in der Phosphorylierung von FAK im Verhältnis zur unphosphorylierten Form detektierbar (Abbildung 26B). Mit einer relativen Menge an p-FAK/FAK in den shRNA 1 transduzierten HUVEC, normalisiert auf nsc transduzierte Zellen, im Durchschnitt von $2,0 \pm 0,3$, konnte ein signifikanter Anstieg

(Student's *t*-Test, $p=0,0004$) der phosphorylierten Menge an FAK nachgewiesen werden. In den shRNA 2 transduzierten HUVEC lag die mittlere relative Menge an p-FAK/FAK bei $1,7 \pm 0,2$ und war ebenfalls signifikant erhöht im Vergleich zu den nsc HUVEC (Student's *t*-Test, $p<0,0001$) (Abbildung 26B). In den *KMT2D* Knockdown HUVEC konnte also eine fast doppelt so hohe relative Menge an p-FAK im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC nachgewiesen werden.

4.4.2 Verstärkte Phosphorylierung von MAPK in *KMT2D* Knockdown HUVEC

Durch den Src-FAK Komplex wird die Phosphorylierung von FAK an den C-terminalen Tyrosinen 861 und 925 gefördert, wodurch eine Bindestelle für GRB2 (*Growth Factor Receptor Bound Protein 2*) entsteht (Schlaepfer et al., 2004). Durch die Bindung von GRB2 an FAK wird der Ras/Raf/MEK/MAPK Signalweg aktiviert (Hehlhans et al., 2007). Daher wurde als Nächstes mit Hilfe von Western Blot Analysen die Menge an phosphorylierter MAPK (p-MAPK) in den *KMT2D* Knockdown HUVEC untersucht. P-MAPK ist die aktive Form der MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*).

Die Durchführung war dabei gleich zu der für die p-FAK/FAK Analysen. Es wurden ebenfalls unbehandelte und nsc, shRNA 1 sowie shRNA 2 transduzierte HUVEC zwischen Passage 2 und 6 verwendet.

In sieben unabhängigen Experimenten wurde die Menge an phosphorylierter MAPK (p-MAPK) relativ zur unphosphorylierten Form (MAPK) detektiert und mit den nsc transduzierten HUVEC verglichen. Die Proben für die MAPK und p-MAPK Detektion wurden auf derselben Membran *gebottet* und alle MAPK bzw. p-MAPK Proben jeweils gleichlang entwickelt. Die Auswertung der Western Blot Analysen und die Bestimmung der relativen Menge an p-MAPK/MAPK erfolgte nach dem gleichen Verfahren wie für die p-FAK/FAK Analyse. Diese mittlere relative Menge der *KMT2D* Knockdown HUVEC bzw. unbehandelten HUVEC bezogen auf die nsc transduzierten HUVEC ist in Abbildung 27 zu sehen. Aus der Abbildung wird deutlich, dass die mittlere Menge an p-MAPK/MAPK für die unbehandelten HUVEC bei $1,6 \pm 0,6$ liegt. Allerdings schwankte diese Menge zwischen den einzelnen Experimenten, wodurch sein signifikanter Unterschied zu den nsc transduzierten HUVEC auszumachen war. Für die shRNA 1 transduzierten HUVEC, normalisiert auf nsc transduzierte HUVEC, konnte eine relative Menge an p-MAPK/MAPK von im Durchschnitt $1,8 \pm 0,4$ nachgewiesen werden. Mit einem p -Wert von 0,0483 (Student's *t*-Test) ist dieser Anstieg der Phosphorylierung der MAPK in den shRNA 1 transduzierten HUVEC im Vergleich zu den nsc HUVEC signifikant erhöht. In den HUVEC, die mit shRNA 2 transduziert wurden, konnte sogar eine noch höhere relative Menge an p-MAPK/MAPK nachgewiesen werden. Mit einer mittleren relativen Menge von $5,3 \pm 1,3$ ist

dieser Anstieg im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC mit einem p -Wert von 0,0004 (Student's t -Test) hoch signifikant. Anhand der Analyse der shRNA 1 und shRNA 2 transduzierten HUVEC wird deutlich, dass es in den *KMT2D* Knockdown HUVEC zu einem Anstieg der Menge an p-MAPK relativ zur Menge an MAPK kommt.

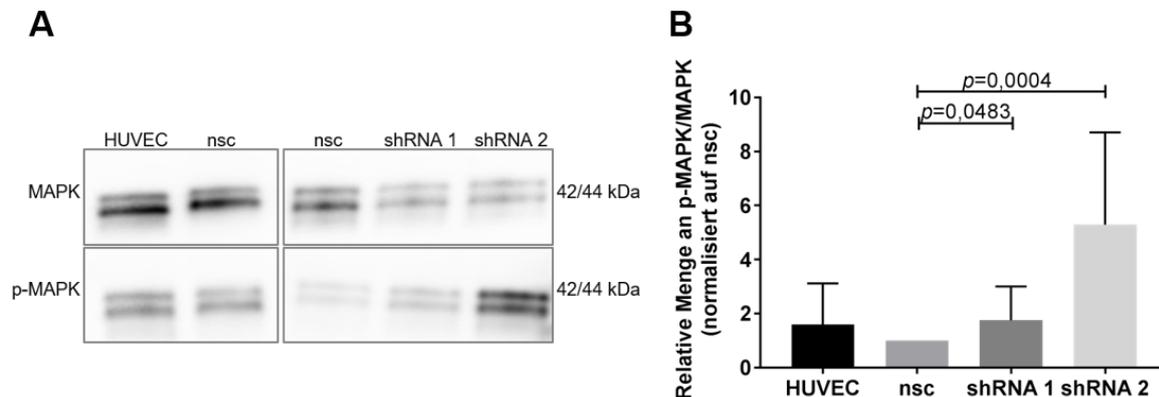


Abbildung 27: Zunahme an phosphorylierter MAPK in den *KMT2D* Knockdown HUVEC.

Um die Phosphorylierung von MAPK, unter anderem ein Ziel von FAK, in *KMT2D* Knockdown HUVEC zu untersuchen, wurden unbehandelte und stabil transduzierte Zellen (HUVEC, nsc, shRNA 1 und shRNA 2) verwendet. **A:** Western Blot Analysen mit Lysaten von untransduzierten HUVEC mit nsc, shRNA 1 oder shRNA 2 transduzierten HUVEC. Die MAPK und p-MAPK Proben wurden auf derselben Membran *geblottet* und die umrahmten Banden sind vom selben *Blot*. **B:** Der Anteil an p-MAPK zu MAPK normalisiert auf nsc in den *KMT2D* Knockdown HUVEC. Die Daten zeigen den Mittelwert \pm SD von sieben unabhängigen Experimenten. Zur Bewertung von signifikanten Unterschieden wurde ein Student's t -Test durchgeführt. Zusätzlich wurden alle Daten ebenfalls mit dem nichtparametrischen, zweiseitigen Mann-Whitney U -Test analysiert. Der höhere p -Wert ist in der Grafik angegeben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass in den *KMT2D* Knockdown HUVEC sowohl die relative Menge an p-FAK sowie die relative Menge an p-MAPK dauerhaft signifikant zunimmt.

4.4.3 Veränderte F-Aktin Strukturen in *KMT2D* Knockdown HUVEC

Über Zytoskelett-Verbindungsproteine kann eine direkte Verbindung zwischen Integrinen und dem Aktinzytoskelett hergestellt werden. Unter anderem stellt Talin mit seinen drei Aktin-bindenden Domänen solch ein Verbindungsprotein dar. Mit der N-terminalen FERM (4.1-Protein, Erizin, Radixin, Moesin) Domäne bindet Talin direkt an zytoplasmatische Enden der Integrine (Ciobanasu et al., 2018; Janiszewska et al., 2020; Lawson et al., 2012; Legate et al., 2009). Talin kann aber auch an FAK binden und darüber die Verbindung zum Aktinzytoskelett herstellen. Es konnte gezeigt werden, dass FAK ebenfalls an die FERM

Domäne von Talin binden kann und damit das Zytoskelett regulieren kann (Lawson et al., 2012). Da die in den *KMT2D* Knockdown HUVEC signifikant hochregulierten Gene *VCAN*, *COL1A2* und *HAPLN1* mit dem Integrin Signalweg assoziiert werden können und FAK in den Knockdown Zellen dauerhaft verstärkt aktiv vorliegt, wurde das Aktinzytoskelett näher analysiert.

Um die Auswirkungen des F-Aktins zu untersuchen, wurden zwischen 1×10^4 und 5×10^4 Zellen auf *Culture Slides* ausgesät. Die HUVEC, zwischen Passage 2 und 6, wurden zwischen 24 h und 72 h auf den *Slides* kultiviert, sodass etwa 80% der *Culture Slides* bedeckt waren. Anschließend wurden die Zellen mit Formalin fixiert und das F-Aktin wurde mittels Alexa Fluor 568 gekoppeltem Phalloidin (rot) und die Zellkerne mittels DAPI (Vectashield, blau) angefärbt. Phalloidin ist ein aus dem Pilz *Amanita phalloides* gewonnenes toxisches bicyklisches Peptid, das ausschließlich F-Aktin bindet. Für die Auswertung wurden mit einem konfokalen Mikroskop Bilder der Färbung aufgenommen. Aufgrund des sehr langsamen Zellwachstums der shRNA 4 transduzierten HUVEC wurden für diese Analysen die shRNA 1 und shRNA 2 transduzierten HUVEC verwendet, sodass nach der Kultivierung auf den *Culture Slides* in etwa gleichviele Zellen vorhanden sind.

In Abbildung 28 ist jeweils eine Übersichtsaufnahme, sowie eine Detailaufnahme untransduzierter HUVEC und der mit nsc, shRNA 1 oder shRNA 2 transduzierten HUVEC für jeden Farbkanal sowie eine Überlagerung aller Kanäle (merge) zu sehen. Da die transduzierten nsc und shRNA Plasmide zusätzlich eine tGFP Region tragen, exprimieren alle erfolgreich transduzierten Zellen GFP (grün), das in den Aufnahmen ebenfalls zu sehen ist. Die Übersichtsaufnahme der untransduzierten HUVEC in Abbildung 28A zeigt ein gleichmäßiges und flächendeckendes Wachstumsmuster, wodurch enge Zell-Zell-Kontakte zwischen den einzelnen Zellen entstehen. Auch die nsc transduzierten HUVEC weisen solch ein gleichmäßiges, flächendeckendes Wachstumsmuster auf (Abbildung 28C). Das Wachstumsverhalten und die Anordnung der Zellen zueinander ist bei den nsc transduzierten HUVEC im Vergleich zu den untransduzierten HUVEC nicht verändert. Die Detailaufnahmen der nicht transduzierten HUVEC (Abbildung 28B) und der nsc transduzierten Zellen (Abbildung 28D) zeigen, dass die Zellen eine eher rundlichere, kompaktere Zellform besitzen und sich das F-Aktin rings um das Zytoplasma anlagert. In den untransduzierten HUVEC liegt das F-Aktin sowohl in Bündeln organisiert wie auch in einzelnen Strängen vor. In den nsc transduzierten Zellen dagegen finden sich zum größten Teil nur F-Aktin Bündel, die deutlich vom Kern entfernt liegen.

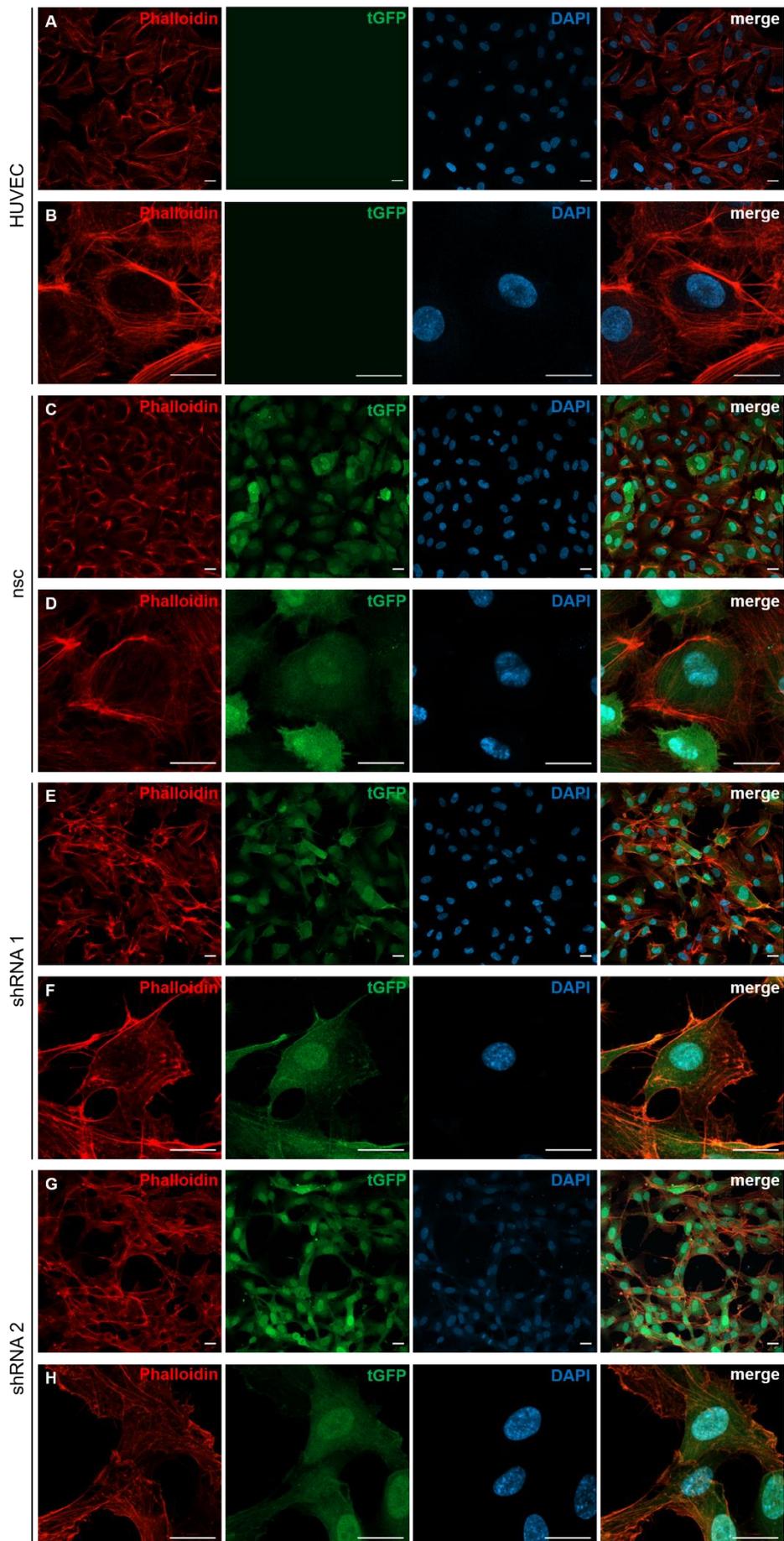


Abbildung 28: Veränderungen in F-Aktin Strukturen und im Wachstumsmuster in *KMT2D* defizienten Zellen.

Transduzierte HUVEC wurden auf *Culture Slides* ausgesät und mit Phalloidin (rot) und DAPI (blau) angefärbt. Aufgrund des im shRNA Plasmid enthaltenen turboGFPs (tGFP) exprimieren transduzierte HUVEC GFP (grün). Die einzelnen Farbkanäle sowie eine Überlagerung aller Kanäle (merge) wurden in Übersichtsaufnahmen mit einer Größe von 319,45 µm x 319,45 µm sowie in Detailaufnahmen mit einer Größe von 79,86 µm x 79,86 µm aufgenommen. **A:** Übersichtsaufnahme nicht transduzierter HUVEC. **B:** Detailaufnahme nicht transduzierter HUVEC. **C:** Übersichtsaufnahme nsc transduzierter HUVEC. **D:** Detailaufnahme nsc transduzierten HUVEC. **E:** Übersichtsaufnahme shRNA 1 transduzierter HUVEC. **F:** Detailaufnahme shRNA 1 transduzierten HUVEC. **G:** Übersichtsaufnahme shRNA 2 transduzierter HUVEC. **H:** Detailaufnahme shRNA 2 transduzierten HUVEC. Maßstabsbalken: 20 µm.

Die Übersichtsbilder der shRNA 1 bzw. shRNA 2 transduzierten HUVEC (Abbildung 28E und G) zeigen einen deutlich lockereren Zellverband im Vergleich zu den nsc transduzierten Zellen. Die Zellen liegen nicht mehr so dicht aneinander und die Zell-Zell-Kontakte sind weniger stark ausgeprägt. Außerdem sind größere Freiräume zwischen den Zellen erkennbar, die wie Löcher im Zellverband wirken. Diese zellfreien Bereiche sind in der Übersichtsaufnahme des shRNA 2 transduzierten HUVEC (Abbildung 28G) noch deutlicher zu erkennen als in den shRNA 1 transduzierten. Aus den Übersichtsbildern der *KMT2D* Knockdown HUVEC wird deutlich, dass die Zellen das gleichmäßige, flächendeckende Wachstum verloren haben. Die jeweiligen Detailaufnahmen der shRNA 1 und shRNA 2 transduzierten HUVEC (Abbildung 28F und H) zeigen eine länglichere Zellform und die Zellen bilden lange und spitze Zellfortsätze aus. Die von den nsc transduzierten HUVEC gezeigte rundliche Form ist in den *KMT2D* defizienten Zellen nicht mehr erkennbar. Im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC zeigen die Knockdown HUVEC eine deutlich veränderte Zellmorphologie. Die Organisation und die Verteilung des F-Aktins in den *KMT2D* Knockdown HUVEC ist nicht mehr wie in den nsc transduzierten HUVEC in Bündeln zusammengefasst, sondern bildet eher einzelne F-Aktin Stränge. Diese ziehen sich durch das gesamte Zytoplasma und sind bis dicht an den Zellkern anlagert. Außerdem ist die Verteilung des F-Aktins in der Zelle ungleichmäßiger. Vor allem in der Detailaufnahme der shRNA 1 transduzierten HUVEC (Abbildung 28F) ist deutlich zu sehen, dass Bereiche auszumachen sind, in denen kein oder nur sehr wenig F-Aktin vorhanden ist und wiederum Bereiche, an denen sich dicke Schichten aus F-Aktin finden lassen.

Diese Färbungen zeigen, dass es in den *KMT2D* Knockdown HUVEC zu einer Veränderung der Zellmorphologie sowie zu einer veränderten F-Aktin Verteilung und Anordnung in der Zelle kommt. Des Weiteren ist die Anordnung der Zellen zueinander und die Anordnung im Zellverband in den *KMT2D* defizienten HUVEC verändert.

4.4.4 Veränderte Zellanordnung und mehr überlagerte Zellen in *KMT2D* Knockdown HUVEC

In den Aufnahmen der F-Aktin Färbungen wurden für die *KMT2D* Knockdown HUVEC eine deutlich veränderte Anordnung der Zellen im Zellverband im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC erkannt (siehe Abbildung 28). Des Weiteren konnten in den Übersichtsaufnahmen der *KMT2D* Knockdown Zellen (Abbildung 28E und G) zum Teil übereinander angeordnete Zellen beobachtet werden, was in den nsc transduzierten HUVEC nicht zu sehen war. Um nun das Wachstumsverhalten und die Anordnung der transduzierten HUVEC zueinander zu bestimmen, wurden am Mikroskop Weitfeldaufnahmen der auf *Culture Slides* gewachsenen HUVEC aufgenommen. Wie für die F-Aktin Färbungen wurden zwischen 1×10^4 und 5×10^4 Zellen, zwischen Passagen 2 und 6, auf *Culture Slides* ausgesät. Nach spätestens 72 h wurden die Zellen mit Formalin fixiert und die Zellkerne mit DAPI (Vectashield, blau) angefärbt. Für die Auswertung wurden am Mikroskop pro Färbung sowohl für mit jeder shRNA transduzierte HUVEC als auch für untransduzierte Zellen 10 zufällig ausgewählte Weitfeldaufnahmen der Größe $348,79 \mu\text{m} \times 263,03 \mu\text{m}$ aufgenommen und ausgewertet.

Exemplarisch ist pro Gruppe jeweils eine Weitfeldaufnahme in Abbildung 29A-D gezeigt. Abbildung 29A zeigt eine für nicht transduzierte HUVEC, Abbildung 29B eine für die nsc transduzierten HUVEC, Abbildung 29C eine für die shRNA 1 transduzierten HUVEC und Abbildung 29D zeigt ein Weitfeldbild der shRNA 2 transduzierten HUVEC. Insgesamt wurden zwei unabhängige Färbungen ausgewertet, sodass für jede Gruppe 20 Weitfeldaufnahmen ausgezählt wurden. Für jede Aufnahme wurde die Gesamtzahl an abgebildeten Zellkernen sowie die Anzahl an Zellkernen, die sich nach optischer Einschätzung zu mindestens 20% überlagern, bestimmt (in Abbildung 29A-D rot umrandet). Daraus wurde für jede Aufnahme der prozentuale Anteil an sich überlagernden Zellen bestimmt. Der Mittelwert aller 20 ausgewerteten Aufnahmen ist für jede shRNA in Abbildung 29E gezeigt. Für alle Gruppen wurden mit den beiden Färbungen mindestens 1.000 Zellkerne ausgewertet.

Für die untransduzierten HUVEC konnten im Schnitt $5,2\% \pm 0,6$ sich überlagernde Zellen detektiert werden. Für die nsc transduzierten HUVEC war der prozentuale Anteil an sich überlagernden Zellen mit im Schnitt $5,5\% \pm 1,1$ nicht signifikant verändert. Für die shRNA 1 transduzierten HUVEC wurde im Schnitt ein prozentualer Anteil von $13,7\% \pm 1,2$ ausgezählt. Mit einem $p < 0,0001$ (Student's *t*-Test) ist dieser Anteil im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC hoch signifikant erhöht. Auch für die shRNA 2 transduzierten HUVEC ist der Anteil mit $13,7\% \pm 1,2$ im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC hoch signifikant erhöht ($p < 0,0001$). In den *KMT2D* Knockdown HUVEC konnte also ein hoch signifikant höherer prozentualer Anteil an sich überlagerten Zellen ausgemacht werden (Student's *t*-Test).

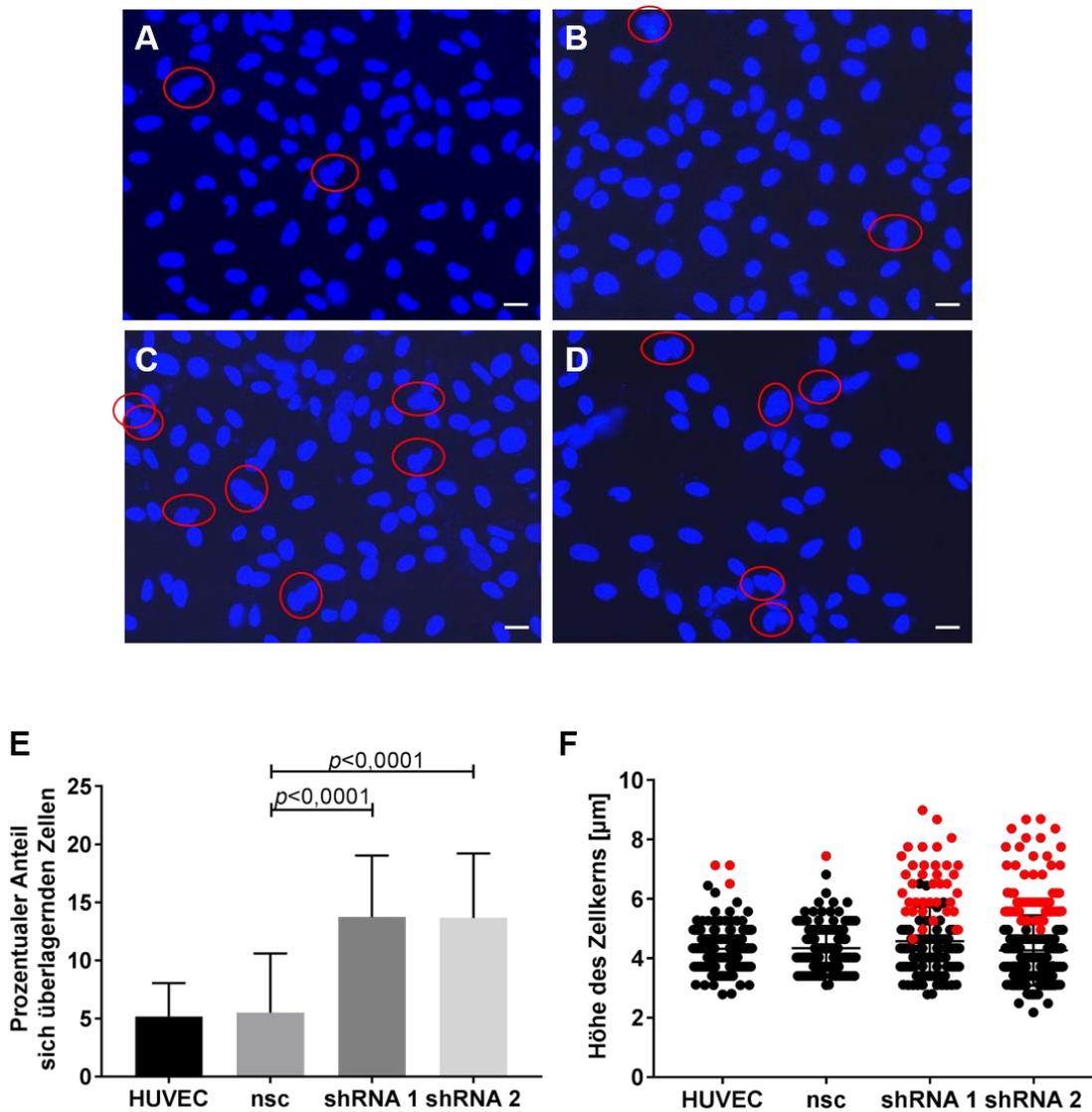


Abbildung 29: In *KMT2D* Knockdown HUVEC kommt es zu einer verstärkten Überlagerung der Zellen.

Nicht transduzierte und transduzierte HUVEC wurden auf *Culture Slides* ausgebracht und mit DAPI angefärbt. Am konfokalen Mikroskop wurden Weitfeldbilder mit einer Größe von 348,79 µm × 263,03 µm aufgenommen und sowohl die Gesamtanzahl der im Bild liegenden Zellkernen als auch die Anzahl an sich überlagernden Zellkernen (rot umrandet) ausgezählt. **A:** Weitfeldbild von nicht transduzierten HUVEC. **B:** Weitfeldbild von nsc transduzierten HUVEC. **C:** Weitfeldbild von shRNA 1 transduzierten HUVEC. **D:** Weitfeldbild von shRNA 2 transduzierten HUVEC. **E:** Für jede Gruppe wurden in zwei unabhängigen Färbungen zufällig jeweils zehn Bereiche ausgezählt. Der Mittelwert ± SD des prozentualen Anteils an sich überlagernden Zellkernen ist dargestellt. **F:** Z-Stack Bilder mit einer Grundfläche von 159,73 µm × 159,37 µm wurden aufgenommen und die Höhe aller abgebildeten Zellkerne gemessen. Für jede Gruppe wurden in zwei unabhängigen Experimenten je sechs zufällig ausgewählte Bereiche ausgewertet. Alle vermessenen Zellkerne sind in der Grafik als Punkt abgebildet, schwarz stellt die Höhe einzelner Zellkerne dar, rot die Höhe sich überlagernder Zellkerne. Zur Bewertung von signifikanten Unterschieden wurde ein Student's *t*-Test durchgeführt. Zusätzlich wurden alle Daten ebenfalls mit dem nichtparametrischen, zweiseitigen Mann-Whitney *U*-Test analysiert. Der höhere *p*-Wert ist in der Grafik angegeben. Maßstabsbalken: 20 µm.

Der prozentuale Anteil an sich überlagernden HUVEC wurde zusätzlich mit einer weiteren Methode überprüft. Dafür wurde die Höhe einzelner Zellkerne und die Höhe sich überlagernder Zellkerne gemessen. Dafür wurden Z-Stack Aufnahmen mit einer Grundfläche von $159,73 \times 159,73 \mu\text{m}$ und einer Schrittweite von $0,31 \mu\text{m}$ an einem konfokalen Mikroskop angefertigt und die Höhe aller abgebildeten Zellkerne mit Hilfe des Vision4D Programms ermittelt. Für diese Auswertung wurden, die für die Analysen des prozentualen Anteils sich überlagernden Zellen angefertigten Färbungen verwendet. Für die nicht transduzierten HUVEC sowie für die nsc, shRNA 1 bzw. shRNA 2 transduzierten Zellen wurden jeweils sechs zufällig ausgewählte Positionen auf den *Culture Slides* aufgenommen und die sich darin befindenden Zellkerne vermessen, sodass am Ende alle Zellkerne aus insgesamt 12 Positionen pro Gruppe ausgewertet wurden. In Abbildung 29F ist die Höhe jedes vermessenen Zellkerns dargestellt. Dabei symbolisiert ein schwarzer Punkt die Höhe eines einzelnen Zellkerns und ein roter Punkt die Höhe zweier sich überlagernder Zellkerne.

Für die untransduzierten HUVEC wurden insgesamt 209 einzelne Zellkerne und für die nsc transduzierten Zellen insgesamt 236 einzelne Zellkerne mit einer jeweils durchschnittlichen Höhe von $4,3 \pm 0,04 \mu\text{m}$ vermessen. In den ausgewerteten Aufnahmen konnten für die nicht transduzierten HUVEC dreimal sich überlagernde Zellkerne mit einer Gesamthöhe von im Schnitt $6,9 \pm 0,2 \mu\text{m}$ detektiert werden. Es konnte also ein prozentualer Anteil von 1,4% sich überlagernder Zellen nachgewiesen werden. Für die nsc transduzierten HUVEC wurden nur einmal zwei sich überlagernde Zellkerne mit einer Gesamthöhe von $7,4 \mu\text{m}$ vermessen, was einem Anteil von 0,4% an sich überlagernden HUVEC entspricht. Es konnte gezeigt werden, dass auch in der Vermessung der Zellkernhöhe zwischen den untransduzierten HUVEC und den nsc transduzierten kein Unterschied festgestellt werden kann. In den Aufnahmen für die shRNA 1 transduzierten HUVEC konnten insgesamt 169 einzelne Zellkerne mit einer Höhe von $4,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ gemessen werden. Zusätzlich wurden 38-mal zwei sich überlagernde Zellkerne mit einer Gesamthöhe von im Schnitt $6,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$ nachgewiesen. Insgesamt überlagern sich also 18,4% der shRNA 1 transduzierten HUVEC. Die 260, in den Aufnahmen der shRNA 2 transduzierten HUVEC, detektierten einzelnen Zellkerne haben eine durchschnittliche Höhe von $3,8 \pm 0,04 \mu\text{m}$. Zwei sich überlagernde Zellen wurden in diesen Aufnahmen 60-mal ausgemacht. Diese Überlagerung hat im Schnitt eine Höhe von $6,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$. Der prozentuale Anteil an sich überlagernden Zellen der in den shRNA 2 transduzierten HUVEC nachgewiesen wurde ist mit 18,8% gleich groß wie der für die shRNA 1 transduzierten Zellen und im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC deutlich erhöht.

Mit diesen Analysen konnte gezeigt werden, dass sich die Zellanordnung von *KMT2D* Knockdown HUVEC in der Zellkultur ändert. So kommt es im Zellverband in den *KMT2D* defizienten Zellen zu deutlich mehr Überlagerungen von zwei Zellen.

4.4.5 Verminderte Zellproliferation in endothelialen Zellen mit einem *KMT2D* Knockdown

Durch Integrine werden Signale in die Zelle geleitet, die Informationen über die Lokalisation, die lokale Umgebung sowie über die umgebende Matrix vermitteln. Diese Signale lösen zelluläre Antworten wie Zellmigration, Zellüberleben und Zelldifferenzierung aus und aktivieren weitere Signalwege (Harburger and Calderwood, 2009; Legate et al., 2009). Auch die Zellproliferation wird durch den Integrin Signalweg beeinflusst (Hayashido et al., 2014; Hynes, 2002), weshalb die Proliferation bei unbehandelten und transduzierten HUVEC als nächstes untersucht wurde. Es wurden Zellen zwischen Passage 2 und 6 für die Analyse verwendet und sowohl frisch aufgetaute als auch schon in Kultur gehaltene Zellen eingesetzt. Nach dem Auftauen wurden die Zellen mindestens einmal gesplittet, bevor sie für den Versuch ausplattiert wurden. Bei frisch aufgetauten transduzierten HUVEC wurde vor der Verwendung der Knockdown mittels Western Blot und qPCR überprüft. Für die Bestimmung der Zellproliferation wurden jeweils 50.000 Zellen (HUVEC, nsc, shRNA 1 bzw. shRNA 2) in einem Well einer 6-Well Platte ausgebracht. Nach 72 h wurden die Zellen trypsinisiert die absolute Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer bestimmt. Aufgrund der schlechten Kultivierbarkeit der shRNA 4 transduzierten HUVEC wurden diese Zellen für diese Analyse nicht verwendet.

Die gezählte Zellzahl für jedes einzelne Experiment ist in Abbildung 30 dargestellt. Die Durchschnittliche Zellzahl der unbehandelten HUVEC lag nach 72 h bei 150.000 ± 12.293 . Die Zellzahl der nsc transduzierten HUVEC lag nach 72 h bei 172.500 ± 9.523 . Im Schnitt verdreifachen sich HUVEC also innerhalb 72 h. Zwischen den unbehandelten HUVEC und den nsc transduzierten HUVEC sind für die Proliferation keine signifikanten Unterschiede detektierbar. Die absolute Zellzahl bei den shRNA 1 transduzierten Zellen lag, 72 h nach Ausbringung, im Schnitt bei 120.500 ± 10.579 . Die Proliferation ist im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC damit stark signifikant verringert (Mann-Whitney *U*-Test, $P=0,0034$). Auch für die shRNA 2 transduzierten HUVEC lag die absolute Zellzahl nach 72 h mit einem Durchschnitt von 109.000 ± 6.272 hoch signifikant unterhalb dem der nsc transduzierten HUVEC (Student's *t*-Test, $P<0,0001$).

In den *KMT2D* Knockdown HUVEC ist das Proliferationsverhalten im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC signifikant reduziert. So haben sich unbehandelte und nsc transduzierte HUVEC nach 72 h verdreifacht, die shRNA transduzierten HUVEC lediglich verdoppelt (2,3-fach vermehrt).

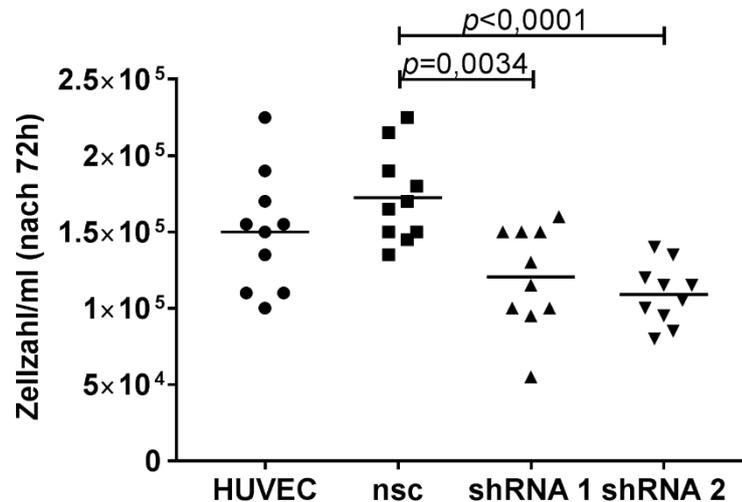


Abbildung 30: Eine reduzierte Zellproliferation in *KMT2D* Knockdown HUVEC.

Um das Proliferationsverhalten transduzierter und nicht transduzierter HUVEC zu untersuchen, wurden 5×10^4 Zellen in eine 6-Well Platte ausgesät und die absolute Zellzahl nach 72 h ermittelt. 10 Replikate von mindestens drei verschiedenen Transduktionen wurden ausgezählt. Alle zehn Datenpunkte sowie der Mittelwert sind in der Grafik abgebildet. Zur Bewertung von signifikanten Unterschieden wurde ein Student's *t*-Test durchgeführt. Zusätzlich wurden alle Daten ebenfalls mit dem nichtparametrischen, zweiseitigen Mann-Whitney *U*-Test analysiert. Der höhere *p*-Wert ist in der Grafik angegeben.

4.4.6 Veränderungen der Zellzyklusverteilung in *KMT2D* Knockdown HUVEC

Da sich in den *KMT2D* Knockdown HUVEC das Proliferationsverhalten verändert, wurde als nächstes untersucht, ob auch Veränderungen in der Zellzyklusverteilung auszumachen sind. Dafür wurden untransduzierte und transduzierte HUVEC fixiert und permeabilisiert und anschließend mit Propidiumiodid angefärbt. Dabei interkaliert der Fluoreszenzfarbstoff in die DNA wodurch die Fluoreszenzintensität proportional zum DNA-Gehalt zunimmt. Durch anschließende FACS Analysen wurde die Fluoreszenzintensität bestimmt, wodurch die Zellen in die Sub-G1-Phase, die G1-Phase, die S-Phase und die G2-Phase unterteilt werden konnten. Die shRNA 4 transduzierten HUVEC und die shRNA 2 transduzierten Zellen wurden für die Zellzyklusanalyse verwendet. Es wurden Zellen zwischen Passage 2 und 6 verwendet. Sowohl frisch aufgetaute als auch schon in Kultur gehaltene Zellen wurden eingesetzt. Frisch aufgetaute Zellen wurden mindestens einmal gesplittet, bevor sie für die Analyse angefärbt wurden.

In Abbildung 31A ist für jede Zellgruppe (HUVEC, nsc, shRNA 2 und shRNA 4) die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl in der FACS Analyse gezeigt. Daraus wurden die einzelnen Zellzyklusphasen ermittelt. So spiegelt der Bereich vor dem ersten *Peak* (R3) die Sub-G1-Phase und damit die apoptotischen Zellen und Zelltrümmer wider. Der erste *Peak*

(R4) erfasst die Zellen der G1-Phase, die Zellen mit einfachem Chromosomensatz. Der Bereich zwischen dem ersten und dem zweiten *Peak* (R5) stellt die S-Phase und damit die Phase der DNA-Replikation dar. Der zweite *Peak* (R6) umfasst die G2-Phase, also alle Zellen mit doppeltem Chromosomensatz. Der gesamte Bereich hinter dem zweiten *Peak* (R7) detektierte aneinandergelagerte Zellen. In diesem Bereich wurden kleine Zellklumpen von mindestens 2 Zellen detektiert. Mit den Bereichen R1 und R2 wurde zuvor festgelegt, welche der im FACS detektierten Zellen in die Analyse der Zellzyklusverteilung mit einbezogen werden. Diese beiden Bereiche wurden so gesetzt, dass alle detektierten Zellen und Zelltrümmer mitberücksichtigt werden.

Der Mittelwert des prozentualen Anteils jeder Zellzyklusphase aus 3 unabhängigen Versuchen wurde ermittelt und in Abbildung 31B grafisch dargestellt. Die prozentuale Verteilung in die Zellzyklusphasen der unbehandelten HUVEC zeigte, dass sich $43,1\% \pm 1,1$ der Zellen in der Sub-G1-Phase (schwarz) befanden und dadurch apoptotisch sind. $20,1\% \pm 2,1$ der Zellen konnten der G1-Phase (grau) zugeordnet werden, $3,7\% \pm 0,7$ der unbehandelten HUVEC befanden sich in der S-Phase (dunkelgrau), in der DNA-Replikation. Der G2-Phase (hellgrau), Zellen mit doppeltem Chromosomensatz, konnten $13,1\% \pm 0,2$ der Zellen zugeordnet werden. $20,1\% \pm 1,9$ der Zellen konnten keiner Phase zugeordnet werden, da es sich hierbei um aneinandergelagerte Zellen handelt (schraffiert). Die Transduktion mit dem nsc Plasmid veränderte diese Verteilung nicht signifikant. Der Anteil der Zellen in der Sub-G1-Phase lag für die nsc HUVEC bei $44,2\% \pm 0,6$, für die G1-Phase bei $18,8\% \pm 2,4$, für die S-Phase bei $3,3\% \pm 0,5$ und $13,4\% \pm 0,6$ der nsc transduzierten HUVEC befanden sich in der G2-Phase. $20,3\% \pm 2,3$ der detektierten nsc transduzierten Zellen waren aneinandergelagert.

Zur Untersuchung der Auswirkung auf die Zellzyklusverteilung in *KMT2D* Knockdown Zellen wurden shRNA 2 und shRNA 4 transduzierte HUVEC analysiert. In den shRNA 2 transduzierten HUVEC konnte in der G1-Phase mit $25,4\% \pm 2,1$ eine tendenzielle, aber nicht signifikante Zunahme beobachtet werden. Auch eine leichte Zunahme in der S-Phase mit $5,4\% \pm 0,7$ zeigte sich in den shRNA 2 HUVEC. Sowohl die Sub-G1-Phase mit $39,8\% \pm 3,2$ also auch die G2-Phase mit $11,2\% \pm 0,7$ waren etwas schwächer, aber nicht signifikant verändert, in den shRNA 2 transduzierten Zellen im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC. $18,2\% \pm 1,0$ der detektierten shRNA 2 transduzierten Zellen waren aneinandergelagert und konnten keiner Zellzyklusphase zugeordnet werden. Die shRNA 4 transduzierten HUVEC dagegen zeigten eine tendenzielle Zunahme der Zellen in der Sub-G1-Phase. $61,7\% \pm 9,1$ der Zellen wurden dieser Phase zugeordnet. Die stärkste Abnahme der shRNA 4 transduzierten HUVEC im Vergleich zu den nsc transduzierten konnte in der G2-Phase beobachtet werden. Mit $6,5\% \pm 2,1$ ist dieser Wert zwar nicht signifikant kleiner, aber auch dabei ist eine Tendenz erkennbar. Die Menge der shRNA 4 transduzierten Zellen, die der G1-Phase mit $22,4\% \pm 8,0$ bzw. der S-Phase mit $4,2\% \pm 0,9$ zugeordnet werden

konnten, ist im Vergleich zu den nsc transduzierten Zellen nahezu unverändert. $5,3\% \pm 1,7$ aneinandergelagerte Zellen wurden für die shRNA 4 transduzierten HUVEC detektiert.

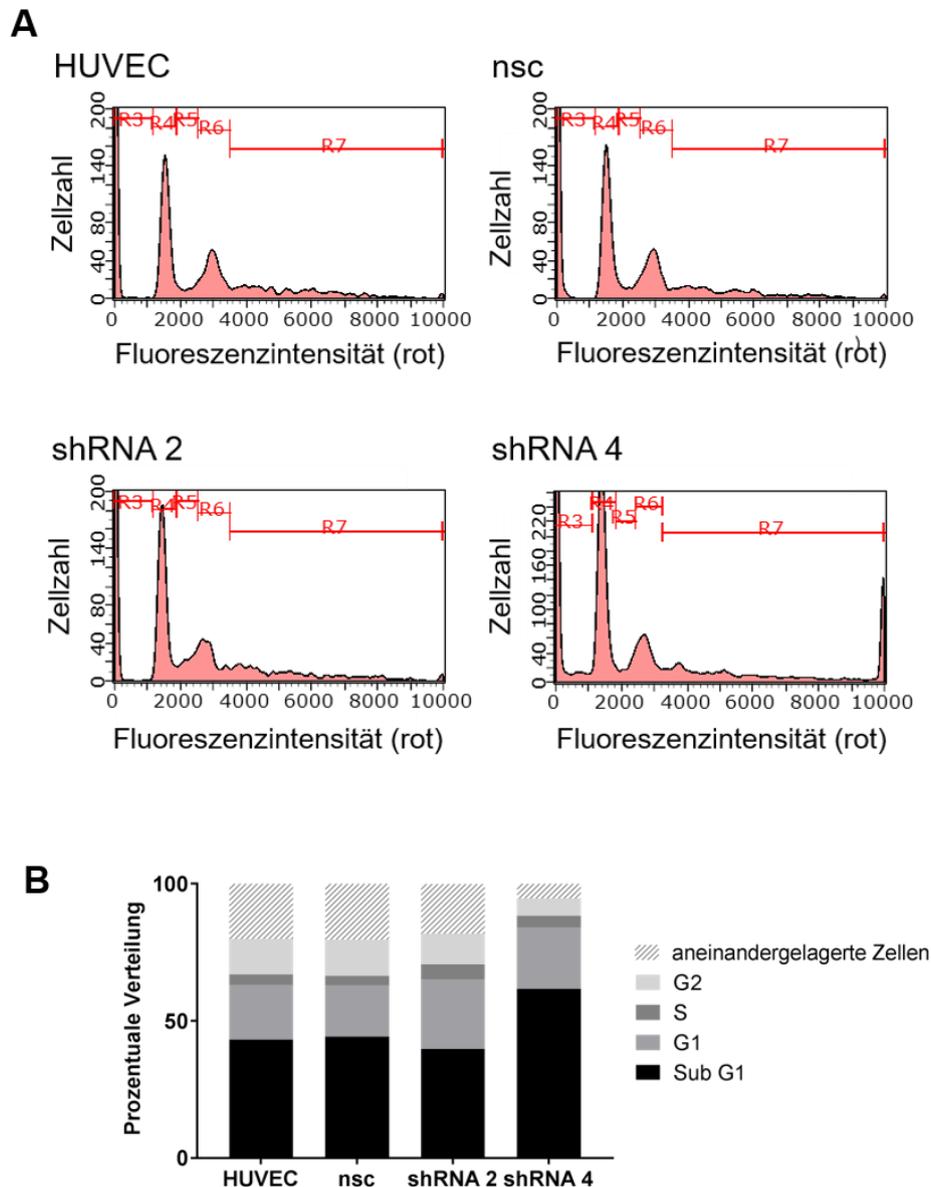


Abbildung 31: Keine signifikanten Veränderungen der Zellzyklusverteilung in *KMT2D* Knockdown HUVEC.

Um Veränderungen in der Zellzyklusverteilung zu detektieren, wurden unbehandelte HUVEC und transduzierte HUVEC (nsc, shRNA 2 und shRNA 4) mittels Propidiumiodid angefärbt und im FACS analysiert. **A:** Auswertung der FACS Analysen. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl für untransduzierte HUVEC sowie nsc, shRNA 2 und shRNA 4 transduzierte HUVEC. R3 gibt die Zellen der Sub-G1-Phase an, R4 die der G1-Phase, R5 die der S-Phase und R6 die der G2-Phase. R7 detektiert aneinandergelagerte Zellen von mindestens 2 Zellen. **B:** Prozentuale Verteilung aus drei unabhängigen Versuchen in die Zellzyklusphasen Sub-G1-Phase, G1-Phase, S-Phase und G2-Phase sowie die aneinandergelagerten Zellen für unbehandelte HUVEC, nsc, shRNA 2 und shRNA 4 transduzierte Zellen. Zur Bewertung von signifikanten Unterschieden wurde ein Student's *t*-Test durchgeführt. Zusätzlich wurden alle Daten ebenfalls mit dem nichtparametrischen, zweiseitigen Mann-Whitney *U*-Test analysiert.

Insgesamt wurde ein sehr hoher Anteil an apoptotischen Zellen und Zelltrümmern in den Analysen beobachtet. Da es sich bei den verwendeten HUVEC um primäre Zellen handelt ist der hohe Anteil an apoptotischen Zellen vermutlich darauf zurückzuführen. Mit über 60% war dieser Anteil in den shRNA 4 transduzierten Zellen am größten. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung für das geringe Zellwachstum der Zellen darstellen. In den *KMT2D* Knockdown HUVEC konnte in der prozentualen Verteilung der Zellzyklusphasen keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden.

Um zu überprüfen, ob es in den *KMT2D* Knockdown HUVEC zu Veränderungen der Apoptoseresistenz kommt, wurden sowohl die nicht transduzierten HUVEC als auch die transduzierten 24 h lang in 45 µM des apoptoseauslösenden Zytostatikums Cisplatin inkubiert. Anschließend wurde, wie für die oben untersuchte Zellzyklusverteilung, erneut nach einer Inkubation mit Propidiumiodid die Zellzyklusverteilung im FACS untersucht. Da sich die apoptotischen Zellen in der Sub-G1-Phase befinden, wurde der Fokus auf diese Phase gelegt. In Abbildung 32A ist für jede Zellgruppe (HUVEC, nsc, shRNA 2 und shRNA 4) die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl der FACS Analyse gezeigt. Dabei werden in dem Bereich R3 ebenfalls alle sich in der Sub-G1-Phase befindenden Zellen und damit apoptotischen Zellen und Zelltrümmer detektiert.

Die mittlere prozentuale Verteilung aus drei unabhängigen Versuchen ist in Abbildung 32B dargestellt. Der Anteil der Sub-G1-Zellen liegt in jeder Gruppe im Mittel bei über 50%. Es sind $60,0\% \pm 2,3$ der mit Cisplatin behandelten HUVEC apoptotisch. Für die nsc transduzierten Zellen liegt der Anteil bei $55,4\% \pm 6,9$ und für die shRNA 2 transduzierten HUVEC bei $51,0\% \pm 4,1$. Mit $68,1\% \pm 9,1$ zeigten die shRNA 4 transduzierten und mit Cisplatin behandelten Zellen den größten Anteil an apoptotischen Zellen.

Um die jeweilige Zunahme der Zellen in der Sub-G1-Phase besser beurteilen zu können, wurden die prozentualen Anteile mit dem Sub-G1-Anteilen aus der Zellzyklusverteilung ohne Cisplatin Behandlung (siehe Abbildung 31) verglichen. Dadurch konnte festgestellt werden, dass sich durch die Cisplatin Behandlung der Anteil an sich der in der Sub-G1-Phase befindenden Zellen für untransduzierte HUVEC um 16,9% erhöhte und für die nsc transduzierten HUVEC um 11,2%. Der Anstieg der Sub-G1-Phase durch Cisplatin war für die shRNA 2 transduzierten HUVEC mit ebenfalls 11,2% gleich stark wie für die nsc HUVEC. Bei den mit Cisplatin behandelten shRNA 4 transduzierten HUVEC konnte im Vergleich zu den shRNA 4 transduzierten Zellen ohne Cisplatin Behandlung eine Zunahme der Sub-G1-Phase um 6,4% nachgewiesen werden. Es wird deutlich, dass durch das Cisplatin der Anteil der Zellen, welche sich in der Sub-G1-Phase und damit in der Apoptose befinden, deutlich, aber nicht signifikant zunimmt.

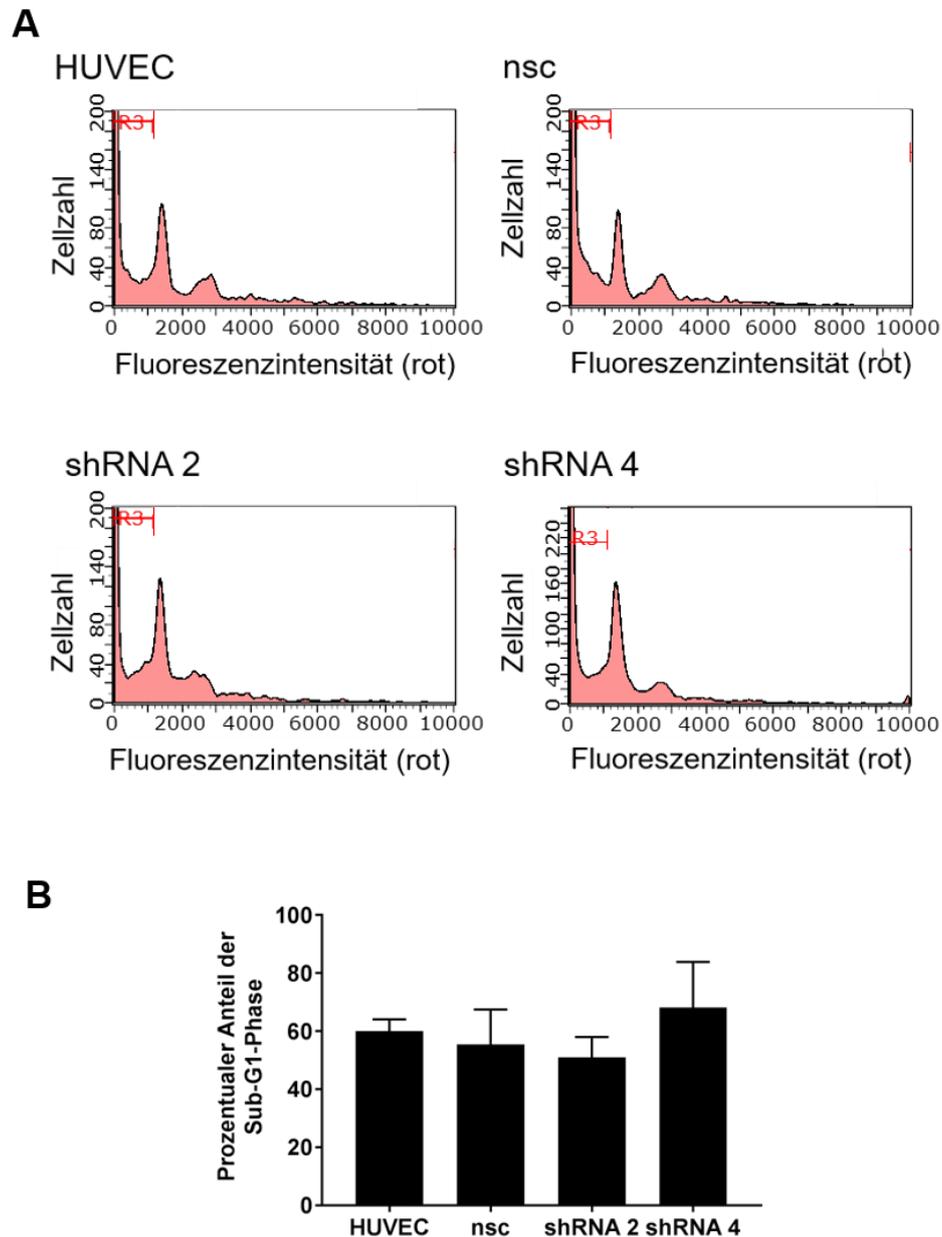


Abbildung 32: Der *KMT2D* Knockdown zeigt keine signifikanten Auswirkungen auf die Apoptoseresistenz. Um Veränderungen in der Apoptoseresistenz zu detektieren, wurden untransduzierte HUVEC und transduzierte HUVEC (nsc, shRNA 2 und shRNA 4) 24 h in 45 μ M Cisplatin inkubiert, anschließend mittels Propidiumiodid angefärbt und die Sub-G1-Phase im FACS detektiert. **A:** Auswertung der FACS Analysen. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl für Cisplatin behandelte untransduzierte HUVEC sowie nsc, shRNA 2 und shRNA 4 transduzierte HUVEC. R3 spiegelt die Sub-G1-Phase wider. **B:** Mittlerer prozentualer Anteil + SD der Sub-G1-Phase aus drei unabhängigen Versuchen nach Cisplatin Behandlung. Zur Bewertung von signifikanten Unterschieden wurde ein Student's *t*-Test durchgeführt. Zusätzlich wurden alle Daten ebenfalls mit dem nichtparametrischen, zweiseitigen Mann-Whitney *U*-Test analysiert.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Zellzyklusverteilung in den *KMT2D* Knockdown HUVEC im Vergleich zu den nsc transduzierten Zellen nicht verändert ist. Auch

für die Apoptoseresistenz lassen sich in den *KMT2D* Knockdown HUVEC im Vergleich zu den nsc transduzierten Zellen keine Veränderungen feststellen.

4.4.7 Migrations- und Invasionsverhalten von HUVEC nach *KMT2D* Knockdown

Durch die von den Integrinen weitergeleiteten Signale, beeinflusst der Integrin Signalweg auch die Zellmigration (Calderwood, 2004; Huttenlocher et al., 1996; Legate et al., 2009). Daher wurden die Auswirkungen des *KMT2D* Knockdowns auf das Migrations- und Invasionsverhalten der HUVEC untersucht. Für den Migrations- als auch für den Invasionsassay wurden nicht transduzierte und transduzierte HUVEC zwischen Passage 2 und 5 verwendet. Es wurden sowohl frisch aufgetaute als auch schon in Kultur gehaltene Zellen eingesetzt. Frisch aufgetaute Zellen wurden mindestens einmal gesplittet, bevor sie für den Versuch ausplattiert wurden. Aufgrund der schlechten Kultivierung der shRNA 4 transduzierten HUVEC wurden die shRNA 1 und shRNA 2 transduzierten Zellen für die Analysen verwendet. Pro Ansatz wurden 5×10^3 Zellen ausplattiert und in fünf unabhängigen Versuchen mit Zellen aus mindestens drei verschiedenen Transduktionen wurden die migrierten bzw. invasiven Zellen detektiert.

Für den Migrationsassay wurde ein Zweikammer-Zellkultursystem verwendet, in dem die Kammern durch eine Membran mit 8 μm großen Poren voneinander getrennt werden. Mit Hilfe eines Chemoattraktant werden die Zellen dazu angeregt, durch die Membran zu migrieren. Die migrierten Zellen werden anschließend gezählt. In Abbildung 33A ist das Ergebnis des Migrationsassays der HUVEC gezeigt. Im Schnitt migrieren $11,3\% \pm 5,2$ der untransduzierten HUVEC, $9,6\% \pm 5,2$ der nsc transduzierten HUVEC, $10,8\% \pm 4,6$ der shRNA 1 transduzierten Zellen und der prozentuale Anteil für die shRNA 2 transduzierten HUVEC lag bei $14,3\% \pm 9,0$. Zusätzlich wurde der durchschnittliche *fold change* normalisiert auf nsc transduzierte HUVEC der migrierten Zellen ermittelt und in der Abbildung dargestellt. Für die unbehandelten HUVEC liegt der mittlere *fold change* normalisiert auf nsc HUVEC bei $1,3 \pm 0,1$, für die shRNA 1 transduzierten HUVEC bei $1,3 \pm 0,2$ und der mittlere *fold change* der shRNA 2 transduzierten Zellen liegt bei $1,5 \pm 0,2$. In den *KMT2D* Knockdown HUVEC konnte keine signifikante Veränderung des Migrationsverhaltens im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC festgestellt werden.

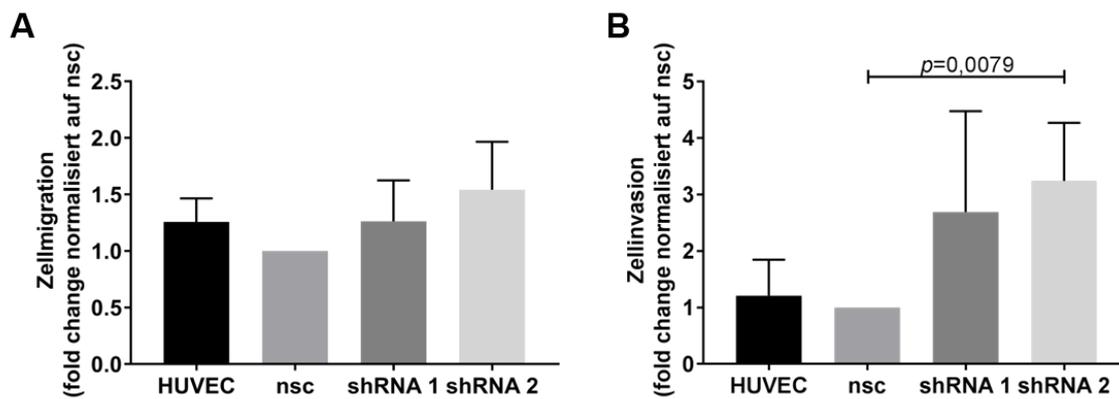


Abbildung 33: Verstärkte Zellinvasion bei gleichbleibender Migration in *KMT2D* Knockdown HUVEC.

Um die Migration und Invasion in *KMT2D* Knockdown HUVEC zu untersuchen, wurden unbehandelte HUVEC, nsc transduzierte HUVEC und HUVEC transduziert mit shRNA 1 bzw. shRNA 2 verwendet. Die Ergebnisse wurden aus fünf unabhängigen Experimenten ermittelt. **A:** Um das Migrationsverhalten der HUVEC zu untersuchen wurde ein Zweikammer Migrationsassay durchgeführt, bei dem die zwei Kammern durch eine Membran mit 8 μm großen Poren getrennt sind. Dargestellt ist der mittlere FC \pm SD normalisiert auf nsc transduzierte HUVEC. **B:** Um die Invasionsfähigkeit der Zellen zu bestimmen wurde ein Zweikammer Invasionsassay durchgeführt, bei dem die Kammern durch eine Membran mit 8 μm großen Poren getrennt sind, die mit einer Matrigelschicht überzogen ist. Der mittlere FC \pm SD normalisiert auf nsc transduzierte HUVEC ist angegeben. Zur Bewertung von signifikanten Unterschieden wurde ein Student's *t*-Test durchgeführt. Zusätzlich wurden alle Daten ebenfalls mit dem nichtparametrischen, zweiseitigen Mann-Whitney *U*-Test analysiert. Der höhere *p*-Wert ist in der Grafik angegeben.

Für den Invasionsassay wurde ein Zweikammer-Zellkultursystem verwendet, bei dem die Membran mit den 8 μm großen Poren zusätzlich noch mit einer Matrigel Matrix versehen ist, durch die nur invasive Zellen gelangen. In Abbildung 33B ist das Invasionsverhalten der nicht transduzierten und der transduzierten HUVEC gezeigt. Der prozentuale Anteil an invasiven Zellen für nicht transduzierte HUVEC lag bei 1,7% \pm 1,2 und ist damit in etwa gleich wie für die nsc transduzierten HUVEC, bei denen insgesamt 1,8% \pm 1,1 der Zellen ein invasives Verhalten zeigten. In den fünf durchgeführten Experimenten konnten mit 3,4% \pm 1,8 der shRNA 1 transduzierten HUVEC ein deutlich höheres invasives Verhalten im Vergleich zu den nsc transduzierten Zellen nachgewiesen werden. Bei den shRNA 2 transduzierten Zellen lag der Anteil mit 5,8% \pm 4,3 noch höher. Auch für den Invasionsassay wurde zusätzlich der durchschnittliche *fold change* normalisiert auf nsc transduzierte HUVEC der invasiven Zellen bestimmt und in der Abbildung dargestellt. Mit einem *fold change* von 1,2 \pm 0,6 für die untransduzierten HUVEC ist das Invasionsverhalten im Vergleich zu den nsc transduzierten Zellen nicht verändert. Für die shRNA 1 transduzierten HUVEC wurde ein durchschnittlicher *fold change*, relativ zu den nsc transduzierten HUVEC, von 2,7 \pm 0,8 nachgewiesen. Es konnte somit eine tendenzielle Zunahme der Invasionsfähigkeit der Zellen gezeigt werden, die allerdings nicht signifikant ist. Dieser Effekt ist in den shRNA 2 transduzierten HUVEC

deutlicher auszumachen. Im Vergleich zu den nsc transduzierten Zellen liegt der *fold change* dafür bei $3,2 \pm 0,5$. Diese erhöhte Invasion der shRNA 2 transduzierten HUVEC ist sowohl mit dem Student's *t*-Test ($p=0,0012$), wie auch mit dem Mann-Whitney *U*-Test ($p=0,0079$) sehr signifikant. In den *KMT2D* Knockdown HUVEC konnte im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC eine verstärkte Invasion beobachtet werden.

Sowohl für den Migrationsassay als auch für den Invasionsassay schwanken die Effekte zwischen den einzelnen Experimenten deutlich (siehe Anhang Tabelle 7). Nichtsdestotrotz konnte für die shRNA 1 transduzierten HUVEC im Vergleich zu den nsc transduzierten in vier der fünf Experimenten ein verstärktes Invasionsverhalten beobachtet werden. Für die shRNA 2 transduzierten HUVEC war dies in allen fünf Experimenten nachweisbar. Die *KMT2D* Knockdown HUVEC zeigen also eine deutlich erhöhte Invasivität im Vergleich zu den nsc transduzierten Zellen. Generell zeigen die Ergebnisse, dass der Anteil an migrierenden Zellen deutlich höher ist als der Anteil an invasiven Zellen. Doch das Migrationsverhalten ist in den *KMT2D* Knockdown HUVEC im Vergleich zu den nsc HUVEC nicht verändert.

4.4.8 Untersuchung der transduzierten HUVEC auf Ankermembran unabhängiges Wachstum

Aufgrund der verstärkten Invasionsfähigkeit der *KMT2D* Knockdown HUVEC und durch das veränderte Zellwachstum mit sich übereinanderlagernden Zellen konnten erste transformierende Eigenschaften in den Zellen nachgewiesen werden. Eine weitere solche Eigenschaft ist ein Ankermembran unabhängiges Wachstum, also die Fähigkeit der Zellen, sich auch ohne den sonst nötigen Kontakt zur extrazellulären Matrix, zu teilen und zu wachsen (Borowicz et al., 2014). Mit Hilfe des *Soft Agar Colony Formation Assays* wurden die Zellen auf ein von der extrazellulären Matrix unabhängiges Wachstum untersucht. Aufgrund des sehr schlechten Wachstums der shRNA 4 transduzierten HUVEC wurden diese für diesen Assay nicht verwendet. Es wurden sowohl frisch aufgetaute als auch in Kultur gehaltene Zellen zwischen Passage 2 und 6 verwendet. Frisch aufgetaute Zellen wurden mindestens einmal gesplittet, bevor sie für den Versuch ausplattiert wurden. In den *KMT2D* transduzierten HUVEC wurde nach dem Auftauen der Knockdown erneut überprüft. Für den *Soft Agar Colony Formation Assay* wurde in einer 6-Well Platte eine 0,5% Noble Agar Schicht gegossen, mit der verhindert wird, dass die anschließend ausplattierten Zellen Kontakt zum Boden des Wells und somit Kontakt zu der darin nachgebildeten extrazellulären Matrix haben. Pro Ansatz wurden 1×10^5 Zellen in einer 0,3% Nobel Agar Schicht auf dem 0,5% Agar ausplattiert und für 21 Tage im Inkubator inkubiert. Durch eine Kristallviolett Färbung wurden die Kolonien angefärbt. In Abbildung 34 sind die einzelnen Wells nach 21 Tagen abgebildet. In dem in Abbildung 34A

gezeigten Well wurden K562 Zellen ausgebracht, welche als Positivkontrolle dienen, da bekannt ist, dass diese myeloischen Zellen transformierende Wachstumseigenschaften besitzen und Kolonien, unabhängig des Kontakts zur extrazellulären Matrix, bilden. Die gebildeten Zellen waren deutlich bereits mit bloßem Auge zu erkennen. Abbildung 34B zeigt einen Ansatz für unbehandelte HUVEC und Abbildung 34C einen für nsc transduzierten HUVEC. Nach 21 Tagen konnten für beide Ansätze auch unter dem Mikroskop keine Kolonien erkannt werden. Abbildung 34D und E zeigen Wells, in denen die *KMT2D* Knockdown HUVEC ausgebracht wurden (Abbildung 34D shRNA 1 und Abbildung 34E shRNA 2). Auch die *KMT2D* Knockdown Zellen zeigen kein Kolonienwachstum. Der Versuch wurde in drei unabhängigen Wiederholungen, mit drei verschiedenen Transduktionen, durchgeführt und zeigte jedes Mal das gleiche Resultat.

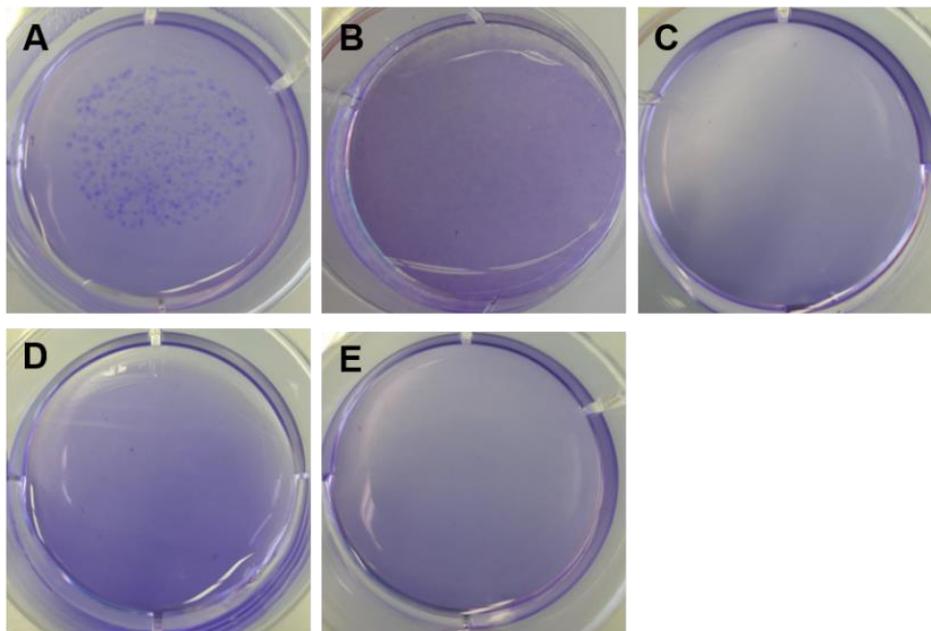


Abbildung 34: Die *KMT2D* Knockdown HUVEC zeigen kein Ankermembran unabhängiges Wachstum auf.

Um die transduzierten HUVEC auf mögliche transformierende Wachstumseigenschaften zu untersuchen, wurden 1×10^5 Zellen unbehandelter HUVEC und transduzierter HUVEC (nsc, shRNA 1 und shRNA 2) für den *Soft Agar Colony Formation Assay* eingesetzt. Als Positivkontrolle für den Assay wurden die koloniebildenden K562 Zellen verwendet. Die Zellen wurden in einer 6-Well Platte in 0,3% Noble Agar ausgebracht. Zur Abgrenzung des Plattenbodens diente eine 0,5% Noble Agar Schicht. Die Kolonien wurden nach 21 Tagen mit einer 0,005% Kristallviolett Lösung angefärbt. Die Kolonien waren mit bloßem Auge zu erkennen und wurden am Mikroskop kontrolliert. **A:** Gezeigt sind die Kolonien der K562 Zellen, die sich nach 21 Tagen gebildet haben. **B:** Aufnahme des Wells der unbehandelten HUVEC. **C:** Aufnahme der nsc transduzierten HUVEC. **D:** Aufnahme des Wells, in dem sich die shRNA 1 transduzierten HUVEC befanden. **E:** Aufnahme der shRNA 2 transduzierten HUVEC.

Durch den *Soft Agar Colony Formation Assay* konnte gezeigt werden, dass die *KMT2D* Knockdown HUVEC, wie die nsc transduzierten und die nicht transduzierten Zellen, kein Ankermembran unabhängiges Zellwachstum haben und für ein Zellwachstum der Kontakt zur extrazellulären Matrix vorhanden sein muss.

Zusammenfassend konnten in den *KMT2D* Knockdown HUVEC im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC Veränderungen auch auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden. So konnten Auswirkungen auf den Integrin Signalweg mit einer dauerhaften, signifikanten Zunahme der FAK Phosphorylierung, einer für die Integrin-vermittelten Signaltransduktion wichtige Protein Tyrosin Kinase, nachgewiesen werden. Auch die Phosphorylierung der MAPK war dauerhaft signifikant erhöht. Zusätzlich konnten Veränderungen des Aktinzytoskelettes detektiert werden. Es kam zu einer Veränderung der F-Aktin Strukturen in den Zellen und zu einem verändertet, weniger flächendeckenden Zellwachstum mit spitzeren Zellfortsätzen. Es wurden auch vermehrt übereinandergelagerte Zellen nachgewiesen. Die Proliferation war in den *KMT2D* Knockdown HUVEC signifikant verringert, wohingegen die Invasivität der endothelialen Zellen, bei gleichbleibendem Migrationsverhalten, deutlich zunahm. Ein Ankermembran unabhängiges Wachstum konnte in den *KMT2D* Knockdown HUVEC nicht beobachtet werden.

5 Diskussion

5.1 Etablierung eines stabilen *KMT2D* Defizits in HUVEC

Angiosarkome stellen die größte Gruppe der malignen kardialen Tumore dar. Die Pathogenese kardialer Angiosarkome ist bislang weitestgehend unbekannt. Kunze *et al.* untersuchte sechs kardiale Angiosarkome auf Mutationen in den häufigsten Tumorsuppressor- und Onkogenen. In vier der sechs untersuchten Fälle konnten Mutationen im *KDR/PLCG1* Signalweg detektiert werden. In zwei dieser vier Fälle konnten, zusätzlich zu den Mutationen in *KDR* bzw. *PLCG1*, an verschiedenen Stellen Stoppmutationen in *KMT2D* (*Histone-lysine N-methyltransferase 2D*) identifiziert werden. In einem der Fälle konnten sogar zwei Stoppmutationen in der *KMT2D* kodierenden Region detektiert werden. Vermutlich führen diese *KMT2D* Mutationen zur Inaktivierung von *KMT2D* (Kunze *et al.*, 2014). *KMT2D* katalysiert die Monomethylierung von H3K4, wodurch transkriptionell offene *Enhancer*-Regionen markiert werden (Ford and Dingwall, 2015; Zhang *et al.*, 2015). Als Regulator von *Enhancern* beeinflusst *KMT2D* in Zellen viele biologische Prozesse, wie die Regulation der Zellentwicklung, der Zelldifferenzierung sowie den Stoffwechsel (Zhang *et al.*, 2015). Auch in anderen Tumorentitäten wurden bereits *KMT2D* Mutationen beschrieben (Guo *et al.*, 2012; Kantidakis *et al.*, 2016). So ist bekannt, dass in über 70% der Lymphome die meisten detektierten *KMT2D* Mutationen Stoppmutationen darstellen, oder das Leseraster durch Insertionen und Deletionen verschoben wird (Guo *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2015).

In Endothelzellen, den Ursprungszellen der Angiosarkome, sollten die zelltypspezifischen Auswirkungen der *KMT2D* inaktivierenden Mutation sowie die Rolle von *KMT2D* in der Pathogenese von kardialen Angiosarkomen untersucht werden. Da für Angiosarkome keine Zelllinie zur Verfügung steht, sollte ein HUVEC Zellmodell mit einem stabilen *KMT2D* Defizit hergestellt werden. Da auch längerfristige Veränderungen und Auswirkungen untersucht werden sollten, sollte das *KMT2D* Defizit stabil in die HUVEC eingebracht werden. Als Methode dazu dient zum einen die CRISPR/Cas9 Methode und zum anderen die lentivirale Transduktion. Mit Hilfe der lentiviralen Transduktion einer shRNA kann ein stabiler Knockdown in den Zielzellen hervorgerufen werden und somit langfristige Veränderungen analysiert werden. Da es sich bei der *KMT2D* Stoppmutation um eine inaktivierende Mutation handelt, sollte mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Methode, mit der ein kompletter Genknockout erzeugt werden kann, stabile *KMT2D* Knockout Zellen etabliert werden. Da es sich bei HUVEC um Primärzellen handelt, die schwer zu transfizieren sind, war die Transfektion des CRISPR/Cas9 Plasmids mit einer Größe von ca. 9.800 bp äußerst problematisch. Daher wurde die Methode zunächst mittels HeLa-Zellen etabliert. HeLa-Zellen sind sehr einfach zu transfizierende Zellen und so hat die Transfektion des CRISPR/Cas9 Plasmids in HeLa-Zellen problemlos

funktioniert. Der CRISPR Vektor enthält eine CD4 kodierende Region, sodass transfizierte Zellen den Oberflächenrezeptor CD4 exprimieren. Darüber können später die transfizierten Zellen mit Hilfe von CD4-Antikörper gekoppelten magnetischen *Beads* aus dem Zellpool selektioniert werden. Die *KMT2D* Region, in der die crRNA bindet und die Cas9 schneiden soll, wurde mittels PCR angereichert und anschließend mit der Sanger Methode sequenziert. So konnte nach der *Bead* Selektion in den HeLa-Zellen eine deutliche Mehrfachsequenz nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass Cas9 in vielen HeLa-Zellen in *KMT2D* geschnitten hat. Im Rahmen der Reparatur des Doppelstrangbruches wurden Insertionen und/oder Deletionen eingefügt, was zu einem möglichen Knockout des Gens führen kann.

Mit Hilfe der *Bead* Selektion konnten für die HUVEC nur sehr wenige mit dem CRISPR Vektor transfizierte Zellen gewonnen werden. So blieben nach der Transfektion und der Selektion im Schnitt nur noch etwa 3% der eingesetzten Zellen für die anschließende Kultivierung übrig. Bei den HeLa-Zellen standen nach der Behandlung im Schnitt 50% der Zellen für eine weitere Kultivierung zur Verfügung. Aufgrund der sehr geringen Kultivierungsdichte, die für das Überleben der HUVEC von großer Bedeutung ist, war die Kultivierung der transfizierten HUVEC nur sehr schwer möglich. Zusätzlich konnte mit Hilfe der Sanger-Sequenzierung in diesen wenigen transfizierten Zellen eine sehr schwache Mehrfachsequenz detektiert werden, was darauf schließen lässt, dass Cas9 nur in sehr wenigen der transfizierten HUVEC geschnitten hat und somit nur äußerst wenige Zellen einen möglichen *KMT2D* Knockout tragen. Dadurch sind auch die Effekte dieses Knockouts auf Zielgene und auf zellulärer Ebene nur schwer nachzuweisen.

Um eine größere Zellzahl für die weitere Kultivierung der HUVEC zu erhalten wurde versucht, das System zu optimieren. Dafür wurde zunächst versucht, die Transfektionseffizienz zu steigern. Es wurden verschiedene Mengenverhältnisse zwischen dem zu transfizierenden CRISPR Vektor und dem Transfektionsreagenz PromoFectin HUVEC ausgetestet. Auch andere Transfektionsreagenzien und Methoden wurden getestet. So wurde versucht mit dem Transfektionsreagenz FuGene, welches für die HeLa-Transfektion verwendet wurde, eine höhere Transfektionseffizienz für die HUVEC zu erreichen. Als weitere Transfektionsmethoden wurden die Elektroporation sowie eine magnetunterstützte Methode angewandt. Zusätzlich zu den Transfektionsmethoden wurde auch die Zeit zwischen der Transfektion und der Ernte der Zellen variiert. So wurden die Zellen zum Teil bereits 24 h nach der Transfektion geerntet und in die *Bead* Selektion eingesetzt, oder zum Teil erst nach 72 h. Auch die Aufreinigung der *Beads* wurde, um eine größere Menge an transfizierten Zellen zu gewinnen, versucht zu optimieren. Es wurden verschiedene Mengenverhältnisse zwischen geernteten Zellen und verwendeter Anzahl an *Beads* getestet. Auch die Inkubationszeiten der geernteten HUVEC mit den magnetischen *Beads* wurden verändert sowie die Temperatur, bei der die Aufreinigung

durchgeführt wurde. Mit einer variierenden Anzahl an Waschschritten sowie deren Inkubationszeit während der *Bead* Selektion wurde ebenfalls versucht die Aufreinigung der geernteten HUVEC zu verbessern. Allerdings konnten mit diesen Optimierungsversuchen weder die Transfektionseffizienz noch die Stärke der Mehrfachsequenzen verbessert werden.

Auch die Literatur liefert nur sehr wenige Informationen über einen Genknockout in HUVEC mittels CRISPR/Cas9 Methode. So wurde z.B. in zwei Veröffentlichungen für das CRISPR/Cas9 System notwendige Elemente mittels viraler Transduktion in die HUVEC gebracht. Die Arbeitsgruppe von Gong *et al.* transduzierte die Cas9 mit Hilfe von Adenoviren in die Zellen und die sgRNA mittels Lentiviren (Gong *et al.*, 2017). In der Arbeit von Abrahimi *et al.* wurde zunächst stabile Cas9 exprimierende Endothelzellen mit Hilfe der lentiviralen Transduktion generiert und anschließend wurde der sgRNA tragende Vektor mittels Lentiviren in die Cas9 exprimierenden Zellen transduziert (Abrahimi *et al.*, 2015). Die in dieser Arbeit durchgeführten lentiviralen Experimente wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Acker Justus-Liebig-Universität Gießen generiert. Da kein genehmigtes und etabliertes CRISPR/Cas9 System zur Verfügung stand wurde auf das in dieser Arbeitsgruppe etablierte lentivirale shRNA System zurückgegriffen.

Mit diesem lentiviralen shRNA System, wird eine shRNA gegen das gewünschte Zielgen in die Zielzelle transduziert, wodurch ein stabiler Knockdown, aber kein Knockout erzeugt werden kann. Dieses System wurde für die HUVEC etabliert und optimiert, um damit ein Zelllinienmodell mit einem stabilen *KMT2D* Knockdown zu generieren. Da shRNA Sequenzen oft *in silico* erstellt werden und sie *in vitro* nicht immer den gewünschten Knockdown erzeugen, oder es zu unspezifischen Effekten kommen kann, wurden die Ergebnisse immer mit mindestens zwei verschiedenen shRNAs erstellt. Mittels transienter Transfektion wurden vorab die drei *KMT2D* shRNAs ausgewählt, die in den HUVEC konstant den stärksten Knockdown hervorrufen und mit denen anschließend lentivirale Partikel hergestellt werden. Dafür wurde auf RNA-Ebene mittels qPCR der *fold change* von *KMT2D* ermittelt. Da der Knockdown nicht immer auf RNA Ebene detektierbar, sondern manchmal auch nur auf Proteinebene erkennbar ist, wurde der Knockdown auch mit Hilfe von Western Blot Analysen untersucht. Aufgrund der Größe von ca. 600 kDa ist *KMT2D* selbst zu groß für die Analysen, da es nur sehr schlecht im Gel aufgetrennt werden kann. Deshalb wurde die von *KMT2D* katalysierte Monomethylierung von H3K4 (H3K4me1) analysiert. Auch andere Veröffentlichungen zeigten, dass eine Reduktion von H3K4me1 ein Indikator für einen *KMT2D* Knockdown darstellt (Ford and Dingwall, 2015; Guo *et al.*, 2013; Kantidakis *et al.*, 2016).

Nach jeder Transduktion wurde der *KMT2D* Knockdown durch qPCR Analysen auf RNA-Ebene sowie mittels Western Blot die relative Menge an H3K4me1 kontrolliert. Mit jeder, der durch die Transfektion, ausgewählten shRNAs (shRNA 1, shRNA 2 und shRNA 4) konnte

ein stabiler *KMT2D* Knockdown erzeugt werden, der sowohl auf RNA Ebene eine *KMT2D* Reduktion von ca. 50% hervorruft, als auch auf Proteinebene eine um etwa 50% verringerte H3K4me1 Expression induziert. Damit ist die Knockdowneffizienz die mittels Transduktion hervorgerufen werden konnte deutlich höher als mittels Transfektion.

Es ist bekannt, dass *KMT2D* die Monomethylierung von H3K4 an transkriptionell zugänglichen *Enhancer*-Regionen induziert (Ford and Dingwall, 2015; Zhang et al., 2015). Die H3K4me1 gibt also Hinweise auf offene Chromatinstrukturen. Durch den *KMT2D* Knockdown nimmt die relative Menge an H3K4me1 ab, was die Vermutung zulässt, dass der Knockdown zu einem Verlust an offenem Chromatin führt. Um die Veränderungen des *KMT2D* Defizits auf Chromatinebene zu untersuchen und Aufschluss über offene und geschlossene Chromatinbereiche zu erhalten wurde deshalb sowohl mit den nsc transduzierten HUVEC als auch mit den *KMT2D* Knockdown HUVEC ein ATAC-Seq durchgeführt.

5.2 Veränderungen der Chromatinstruktur in *KMT2D* Knockdown HUVEC

Durch die Monomethylierung von H3K4 hat *KMT2D* Einfluss auf die Chromatinstruktur indem es die positive Ladung der Lysine in Histonen neutralisiert. Dadurch wird die negativ geladene DNA weniger stark gebunden und es kommt zu einer Auflockerung des Chromatins (Campbell and Reece, 2009). Daher wurden die *KMT2D* Knockdown HUVEC mittels ATAC-Seq auf Veränderungen in der Chromatinstruktur untersucht. Dabei wird genomweit die Zugänglichkeit des Chromatins untersucht und histonfreie, offene Chromatinregionen detektiert. Diese offenen Bereiche werden amplifiziert und sequenziert und anschließend mit dem hg19 Genom abgeglichen und gezählt. Dadurch entstehen *Peaks*, spezifische Anreicherungen, die offene Chromatinbereiche widerspiegeln. Diese *Peaks* wurden in der anschließenden Auswertung zwischen den nsc transduzierten HUVEC und den *KMT2D* Knockdown HUVEC verglichen. Dabei wurden die shRNA 1 und shRNA 2 transduzierten HUVEC zusammen gegen die nsc transduzierten HUVEC verglichen. Jedes Replikat wurde als einzelne Probe gewertet sodass vier *KMT2D* Knockdown Proben (shRNA) gegen zwei Kontrollen (nsc) ausgewertet wurden.

Mit Hilfe der Korrelationsanalyse konnte gezeigt werden, dass die Reproduzierbarkeit der Replikate sehr hoch ist. Alle verwendeten Duplikate weisen einen Korrelationsfaktor von ca. 0,9 auf. Dies spricht daher für eine sehr hohe Verlässlichkeit der Daten. Beim Vergleich der shRNA transduzierten HUVEC gegen die nsc transduzierten konnten lediglich 153 signifikant veränderte *Peaks* nachgewiesen werden. Dies ist etwa 0,01% der für jede Gruppe detektierten Gesamtzahl an *Peaks* (ATAC-*Peaks* für shRNA: 178.347; ATAC-*Peaks* für nsc: 155.173). Die mittels ATAC-Seq erkennbaren offenen Chromatinstrukturen unterscheiden sich in den *KMT2D* Knockdown HUVEC daher nur kaum von den nsc transduzierten Zellen. Da es sich

bei dem Vergleich um den gleichen Zelltyp handelt wurden nicht so starke Veränderungen auf Chromatinebene erwartet, wie bei einem Vergleich zwischen zwei verschiedenen Zelltypen. Außerdem wurde *KMT2D* in den Zellen nur herunterreguliert und nicht ausgeschaltet, was zu einem schwächeren Effekt führt im Vergleich zu einem Knockout. Die größten Unterschiede zwischen den shRNA transduzierten HUVEC und den nsc transduzierten HUVEC in der offenen Chromatinstruktur konnten in intergenischen Regionen und in Promotor Bereichen detektiert werden. Es konnten im intergenischen Bereich sowohl mehr offene Chromatinstellen (verstärkte *Peaks*), als auch geschlossene Chromatinstellen (verringerte *Peaks*) nachgewiesen werden. Es ist bekannt, dass die H3K4me1 meist in intergenischen Regionen detektiert wird (Ford and Dingwall, 2015), wodurch es in diesen Bereichen verstärkt zu Auflockerungen in der Chromatinstruktur kommen kann.

In der intergenischen Region befinden sich auch cis-regulatorische Elemente, wie *Enhancer*. Eine H3K4me1 Anreicherung ist ein typischer Marker für eine *Enhancer* Region und mit transkriptionell offenem Chromatin assoziiert (Ford and Dingwall, 2015; Zhang et al., 2015). Daher wurde mittels *Enhancer*-Analyse überprüft, ob es sich bei den veränderten Chromatinstellen in den *KMT2D* Knockdown HUVEC um mögliche Super-*Enhancer* handelt. Dafür wurde die Distanz zwischen den signifikant veränderten *Peaks*, die nicht mit einer *Transcription Start Site* oder einer Promotor Region überlappen und daher einen potenziellen *Enhancer* darstellen, bestimmt. Von den insgesamt 87 signifikant verstärkten *Peaks* in den *KMT2D* Knockdown HUVEC im Vergleich zu den nsc transduzierten Zellen konnten 33 als potenzielle *Enhancer* gewertet werden. Von den insgesamt 66 signifikant verringerten *Peaks* waren es 41. Aufgrund der wenigen *Peaks*, die einen möglichen *Enhancer* widerspiegeln könnten, ist die Wahrscheinlichkeit, dass die *Peaks* nicht weiter als 12 kb voneinander entfernt liegen und dadurch einen Super-*Enhancer* bilden könnten, sehr gering. Wie zu erwarten, wurden keine veränderten Super-*Enhancer* in den *KMT2D* Knockdown HUVEC detektiert.

Für die GO-Analyse der signifikant veränderten *Peaks* wurden die verstärkten und verringerten *Peaks* der *KMT2D* Knockdown HUVEC den nächstgelegenen Genen zugeordnet. Dabei muss allerdings beachtet werden, dass es dadurch zu möglichen fehlerhaften Zuordnungen kommen kann. So kann das Chromatin für Transkriptionsbereiche oder *Enhancer* Bereiche offen oder geschlossen vorliegen die nicht das nächstgelegene Gen beeinflussen, sondern weiter entfernt liegende Gene regulieren. Deshalb wurden die *KMT2D* Knockdown HUVEC mittels RNA-Seq auf differentiell exprimierte Gene untersucht.

5.3 Differentiell exprimierte Gene in den *KMT2D* defizienten HUVEC

Durch die H3K4me1 der *Enhancer* Motive und die damit verbundene Auflockerung des Chromatins können Transkriptionsfaktoren besser binden wodurch die Gentranskription verstärkt werden kann (Campbell and Reece, 2009). Daher wurden neben Veränderungen in der Zugänglichkeit des Chromatins auch Effekte des *KMT2D* Knockdowns auf RNA Ebene untersucht. So wurden mit Hilfe des RNA-Seq differentiell exprimierte Gene in den *KMT2D* defizienten HUVEC detektiert. Dafür wurde die mRNA aus shRNA 2, shRNA 4 und nsc transduzierten HUVEC isoliert, in cDNA umgeschrieben und anschließend sequenziert. Diese sequenzierten cDNA-Fragmente wurden mit dem hg19 Genom abgeglichen und für jede Probe gezählt. Um differentiell exprimierte Gene zu detektieren wurden die *KMT2D* Knockdown HUVEC gegen die nsc HUVEC verglichen. Dabei wurden ebenfalls jedes Replikat als einzelne Probe gewertet, sodass die vier *KMT2D* Knockdown Proben (shRNA 2 und shRNA 4) mit den zwei nsc Proben verglichen wurden.

Um die Qualität der Duplikate beurteilen zu können, wurde die Korrelation zwischen den jeweiligen Replikaten untersucht. Mit einem Korrelationsfaktor von 0,93 bzw. 0,97 zeigen die Daten eine sehr gute Korrelation und damit eine sehr gute Reproduzierbarkeit der Effekte.

Trotz der geringen Unterschiede in den Chromatinstrukturen zwischen den nsc transduzierten HUVEC und den Knockdown Zellen konnten deutliche Expressionsunterschiede nachgewiesen werden. Insgesamt konnten 133 differentiell exprimierte Gene mit einem *fold change* > 2 bzw. < -2 und einem p-adj. < 0,05 detektiert werden. Davon waren 70 Gene signifikant hochreguliert und 63 zeigten eine signifikant verringerte Expression. Es konnten also fast genauso viele hochregulierte als herunterregulierte Gene in den Knockdown Zellen nachgewiesen werden. In den *KMT2D* Knockdown HUVEC ist im Vergleich zu den nsc transduzierten Zellen eine deutlich geringere H3K4me1 detektierbar, wodurch weniger transkriptionell zugängliche *Enhancer* vermutet werden und daher eher mehr herunterregulierte Gene zu erwarten gewesen wären. Die indirekten Effekte könnten dabei eine mögliche Erklärung für die hochregulierten Gene darstellen. So können auch Repressoren von Genen durch *Enhancer* verstärken, die nun aber durch die H3K4me1 weniger zugänglich sind und dadurch die Repression geschwächt und die Gene stärker exprimiert werden.

Die in den *KMT2D* Knockdown HUVEC am stärksten herunterregulierten Gene sind *SOX18*, *CLDN5* sowie *FAM110D*. Die GO-Analysen der herunterregulierten Gene zeigte, dass diese mit Veränderungen in der Angiogenese und im Zellwachstum sowie mit endothelspezifischen Prozessen wie Endothelzellproliferation und Endothelzelldifferenzierung in Verbindung gebracht werden können.

SOX18 kodiert für ein Endothelzell-spezifischen Transkriptionsfaktor, der für verschiedene Differenzierungs- und Entwicklungsprozesse, wie z.B. die kardiale Entwicklung und die Angiogenese, notwendig ist (Fontijn et al., 2008; Lefebvre et al., 2007; Timur et al., 2005). Auch in anderen Tumorentitäten können aberrante *SOX18* Expressionen detektiert werden. In den meisten Tumorentitäten ist *SOX18* stark exprimiert. So haben Patienten mit einem hepatozellulären Karzinom und einer *SOX18* Überexpression oft eine schlechte Prognose (Wang et al., 2015). Auch in Larynxkarzinomzellen und -Gewebe wurde eine erhöhte Expression nachgewiesen (Xu et al., 2019). Es konnte gezeigt werden, dass sowohl in hepatozellulären Karzinomzelllinien mit einem *SOX18* Knockdown sowie in Larynxkarzinomzellen mit einem *SOX18* Defizit unter anderem die Zellproliferation, der Zellzyklusverlauf, die Migration und Invasion wie auch die Apoptose verändert ist (Wang et al., 2015; Xu et al., 2019).

CLDN5 ist ein endothelspezifisches Mitglied der Claudin Familie, die die Bildung von *Tight Junctions* regulieren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine veränderte *SOX18* Expression mit Veränderungen des *CLDN5* Levels einhergeht (Fontijn et al., 2008).

In den *KMT2D* Knockdown HUVEC wurden die Gene *VCAN*, *HAPLN1* und *COL1A2* als am stärksten hochreguliert nachgewiesen. Durch die GO-Analyse konnte gezeigt werden, dass die hochregulierten Gene die Organisation der extrazellulären Strukturen und der extrazellulären Matrix beeinflussen. Aber auch das Zellwachstum und die Zellmigration könnten durch die Gene verändert sein.

VCAN kodiert für ein Proteoglykan das den Hauptbestandteil der extrazellulären Matrix bildet (Rahmani et al., 2006). In anderen Tumorentitäten ist *VCAN* ebenfalls bekannt. Bei Magenkarzinomen wird *VCAN* auch als prognostischer Biomarker untersucht und in Patienten mit akuter myeloischer Leukämie wurde ebenfalls eine erhöhte *VCAN* Expression nachgewiesen (Jiang et al., 2019; Yang et al., 2019).

Die Funktion von *HAPLN1* besteht darin, Proteoglykane an Hyaluronsäuren zu binden und dadurch die Zusammensetzung der extrazellulären Matrix (ECM) zu beeinflussen (Naba et al., 2012; Spicer et al., 2003). In Untersuchungen von malignen Melanomen konnte gezeigt werden, dass *HAPLN1* verstärkt von Tumorzellen sekretiert wird (Naba et al., 2012). Dies lässt die Vermutung zu, dass die *KMT2D* Knockdown HUVEC erste kanzerogene Eigenschaften entwickeln wodurch *HAPLN1* verstärkt exprimiert wird. Auch in Mesotheliomen konnte eine 23-fache Überexpression von *HAPLN1* nachgewiesen werden, wodurch die kanzerogenen Eigenschaften der Mesotheliome, wie die Proliferation, die Zellmotilität und die Invasion, verstärkt wurden (Ivanova et al., 2009).

Für Angiosarkom Zelllinien konnte bereits gezeigt werden, dass diese in Medium, das Substrate der extrazellulären Matrix, wie Collagen I und Fibronectin, beinhaltet, sich schneller anheften und eine verstärkte Signalweiterleitung sowie eine erhöhte Proliferation aufweisen

(Shaheen et al., 2017). So könnte es durch die *COL1A2* Überexpression zu einem erhöhten *COL1A2* Level in den *KMT2D* Knockdown Zellen kommen, was eventuell zu einer verstärkten Zelladhäsion führen kann.

Alle drei in den *KMT2D* Knockdown HUVEC hochregulierten Gene können mit dem Integrin Signalweg assoziiert. So stellen Kollagene und VCAN Liganden für Integrine dar (Wu et al., 2005). Außerdem interagiert VCAN mit einer Vielzahl an ECM- und Zelloberflächenproteine, wie zum Beispiel mit HAPLN1 und Typ I Kollagenen (Matsumoto et al., 2003; Wu et al., 2002, 2005). Auch in der Tumorgenese spielt der Integrin Signalweg eine wichtige Rolle. Die durch den Integrin Signalweg erzeugten Signale sind unter anderem für das Zellüberleben, für die Proliferation, für die Migration und für die Organisation des Zytoskeletts von großer Bedeutung (Harburger and Calderwood, 2009; Hynes, 2002). Deshalb wurden die Auswirkungen und die Veränderungen im Integrin Signalweg in den *KMT2D* Knockdown HUVEC genauer untersucht.

5.4 Veränderungen des Integrin Signalwegs in *KMT2D* Knockdown Zellen

Integrine sind transmembrane Zelladhäsionsrezeptoren welche die Interaktion der Zelle mit der extrazellulären Matrix vermitteln (Bianchi-Smiraglia et al., 2013; Hynes, 2002). Die meisten Integrine liegen inaktiv vor. Binden extrazelluläre Liganden, wie z.B. Collagen oder Versican, an Integrine, werden diese durch eine Konformationsänderung der extrazellulären Domäne aktiviert. Dadurch können intrazelluläre Liganden binden und die Integrine mit verschiedenen Signalwegen oder dem Zytoskelett verbinden (Calderwood, 2004). Je nach Liganden werden Informationen über die Lokalisation, die lokale Umgebung sowie über die umgebende Matrix vermittelt und es werden spezifische Signalwege aktiviert. Dadurch werden unter anderem die Zellmigration, das Zellüberleben und die Zelldifferenzierung reguliert (Harburger and Calderwood, 2009; Hynes, 2002; Legate et al., 2009). Integrine können unter anderem über die zytoplasmatische Protein Tyrosin Kinase FAK den MEK/ERK Signalweg anregen, wodurch unter anderem die Zellproliferation reguliert wird (Hayashido et al., 2014). In Brustkarzinomzellen wurde bereits gezeigt, dass Integrine über FAK und MEK die Tumorangiogenese und das Tumorwachstum regulieren (Bianchi-Smiraglia et al., 2013). Daher wurden die *KMT2D* Knockdown Zellen auf Veränderungen der FAK Phosphorylierung untersucht.

5.4.1 In den *KMT2D* Knockdown HUVEC ist FAK dauerhaft verstärkt aktiv

FAK wird durch die Integrinbindung an Tyrosin 397 autophosphoryliert und damit aktiviert. Dadurch entstehen Bindestellen für Proteine mit einer SH2-Domäne, wie z.B. Scr-Kinasen. Über einen Scr-FAK Komplex kann FAK an weiteren Tyrosinen phosphoryliert werden, wodurch die Kinaseaktivität von FAK und die Interaktion mit anderen Proteinen gefördert wird (Harburger and Calderwood, 2009; Legate et al., 2009). Die FAK Aktivierung über Integrine ist wichtig für die Regulation der Adhäsion und der Zellmigration (Bianchi-Smiraglia et al., 2013; Chen et al., 1996; Harburger and Calderwood, 2009).

Die Analysen der FAK Phosphorylierung in dieser Arbeit zeigten, dass in den *KMT2D* Knockdown HUVEC die relative Menge an p-FAK/FAK dauerhaft fast doppelt so hoch ist wie in den nsc transduzierten Zellen. Untersucht wurde in den Western Blot Analysen die Phosphorylierung von FAK an Tyrosin 397. Eine kürzlich veröffentlichte Studie zeigte, dass in Ewing-Sarkomgewebe und -Zelllinien die Phosphorylierung von FAK an Y397 zu einer verstärkten Bildung an fokalen Adhäsionen sowie einer verstärkten Zellmigration führt (Steinestel et al., 2019). Sowohl Integrine als auch FAK können mit Talin interagieren und dadurch das Zytoskelett regulieren (Calderwood et al., 2000; Legate et al., 2009), weshalb die *KMT2D* Knockdown HUVEC auf Veränderungen in der Strukturierung des Aktinzytoskeletts untersucht wurden.

5.4.2 Strukturelle Veränderungen des F-Aktin in den *KMT2D* Knockdown HUVEC

Talin ist ein Zytoskelett-Verbindungsprotein, das eine direkte Verbindung zwischen Integrinen und dem Aktinzytoskelett herstellen kann. Talin besitzt eine N-terminale FERM Domäne, die an zytoplasmatische Enden der Integrine binden kann und drei Aktin-bindende Domänen worüber eine Verbindung von Talin an F-Aktin zustande kommen kann (Ciobanasu et al., 2018; Janiszewska et al., 2020; Lawson et al., 2012; Legate et al., 2009). Anstelle von Integrinen kann auch phosphoryliertes FAK an die FERM Domäne von Talin binden und dadurch das Zytoskelett regulieren (Lawson et al., 2012).

Mit Hilfe von Phalloidin Färbungen wurde das F-Aktin in den nicht transduzierten und in den transduzierten HUVEC angefärbt. Die so visualisierten F-Aktin Filamente zeigten deutliche Unterschiede zwischen den nsc transduzierten HUVEC und den shRNA transduzierten. Die Anordnung des F-Aktins war in den *KMT2D* defizienten HUVEC nicht mehr in Bündeln um die Zellmembran herum organisiert, sondern bildete eher einzelne F-Aktin Stränge, die sich durch das gesamte Zytoplasma zogen. Außerdem ist die Verteilung des F-Aktins in der Zelle ungleichmäßiger.

Auch Veränderungen im Zellverband konnten detektiert werden. Die *KMT2D* Knockdown HUVEC ordneten sich wabenförmig zueinander an und bildeten zellfreie, lochartige Bereiche. Die Zellen bildeten außerdem lange spitze Zellfortsätze. Bei den untransduzierten HUVEC und den nsc transduzierten war ein flächendeckendes Zellwachstum mit engen Kontakten zwischen den einzelnen Zellen zu sehen. Diese Ergebnisse zeigten deutliche Unterschiede im Wachstumsverhalten der *KMT2D* shRNA transduzierten HUVEC und lassen den Schluss zu, dass der *KMT2D* Knockdown zur strukturellen Umgestaltung des F-Aktin sowie des Zytoskeletts führt. In HeLa Zellen konnte bereits durch ein reduziertes *KMT2D* Level eine abnormale Zytoskelettorganisation nachgewiesen werden (Ford and Dingwall, 2015; Issaeva et al., 2007). Es wurde ebenfalls ein netzartiges Zellwachstum sowie veränderte Zellfortsätze der *KMT2D* defizienten Zellen beschrieben (Issaeva et al., 2007).

Neben der aberranten F-Aktin Verteilung und dem wabenförmigen Zellverband der *KMT2D* Knockdown HUVEC konnten noch weitere Veränderungen im Wachstumsverhalten in den transduzierten HUVEC nachgewiesen werden. Unbehandelte HUVEC weisen normalerweise ein konfluentes Zellwachstum in der zweidimensionalen Ebene auf. In den *KMT2D* transduzierten HUVEC konnte ein Zellwachstum beobachtet werden, bei dem sich vermehrt zwei Zellen übereinander lagern. Damit konnten erste transformierende Eigenschaften der *KMT2D* Knockdown HUVEC nachgewiesen werden.

Die *KMT2D* Knockdown HUVEC zeigten Umstrukturierungen des F-Aktins und veränderte Wachstumseigenschaften, die erste Hinweise auf transformierende Eigenschaften bieten, die allesamt durch den Integrin Signalweg reguliert werden könnten.

5.4.3 In *KMT2D* Knockdown HUVEC ist MAPK dauerhaft verstärkt phosphoryliert

Die Aktivierung von FAK regt verschiedene Signalwege an. Es ist bekannt, dass durch den Src-FAK Komplex die FAK Phosphorylierung an den C-terminalen Tyrosinen 861 und 925 induziert wird. Dadurch kann GRB2 an FAK binden wodurch der Ras/Raf/MEK/MAPK Signalweg aktiviert wird (Hehlhans et al., 2007). Eine aberrante Regulation der MAPK Kaskade kann zu Tumoren und anderen Krankheiten führen (Roberts and Der, 2007). Denn über den MAPK Signalweg werden unter anderem das Zellüberleben, das Zellwachstum und die Proliferation gesteuert (Bianchi-Smiraglia et al., 2013; Harburger and Calderwood, 2009). Daher wurde die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von MAPK näher untersucht. In den *KMT2D* Knockdown HUVEC konnte eine dauerhaft erhöhte Phosphorylierung und damit eine dauerhaft verstärkte MAPK nachgewiesen werden. Zusätzlich dazu, zeigten die Ergebnisse der *Enriched* GO-Analyse, der in den *KMT2D* Knockdown HUVEC signifikant differentiell regulierten Gene, dass viele biologische Prozesse wie Zellproliferation,

Zellmigration und Zelldifferenzierung beeinflusst sein könnten. Deshalb wurde in den *KMT2D* Knockdown Zellen zelluläre Prozesse, wie die Proliferation und das Zellwachstum, in Form von Zellzyklus Analysen und Migrationsanalysen untersucht. Prozesse also, welche die Pathogenese der kardialen Angiosarkome begünstigen könnten.

5.4.4 Die *KMT2D* Knockdown HUVEC weisen eine verminderte Zellproliferation auf

Obwohl durch die Aktivierung der MAPK die Zellproliferation verstärkt wird (Zhang and Liu, 2002), wurde durch die Bestimmung der Zellzahlen von transduzierten und nicht transduzierten HUVEC nach 72 h deutlich, dass die *KMT2D* transduzierten HUVEC ein signifikant verringertes Proliferationsverhalten im Vergleich zu den nsc transduzierten Zellen aufwiesen. Auch in anderen Studien konnte eine Reduktion der Proliferationsrate, verursacht durch einen *KMT2D* Knockdown, beobachtet werden (Dawkins et al., 2016; Xiong et al., 2018). In der von Dawkins *et al.* veröffentlichten Studie konnte in Versuchen mit acht humanen pankreatischen Zelllinien eine verminderte Zellproliferation nach einer *KMT2D* siRNA Transfektion nachgewiesen werden (Dawkins et al., 2016). Auch in *KMT2D* siRNA transfizierten Magenkarzinom Zelllinien konnte nach 96 h eine signifikant verringerte Zellproliferation detektiert werden (Xiong et al., 2018).

Die im RNA-Seq detektierten, in den *KMT2D* Knockdown HUVEC, differentiell exprimierten Gene, könnten möglicherweise die Proliferation reduzieren. So regulieren z.B. die signifikant differentiell exprimierten Gene *SOX18*, *NOTCH4*, *DLL4* und *VCAN* unter anderem die Zellproliferation (Qian et al., 2016; Rahmani et al., 2006; Wang et al., 2015; Williams et al., 2006). Das am stärksten herunterregulierte Gen *SOX18* kodiert für einen endothelialen Transkriptionsfaktor, der über seine Zielgene unter anderem die Zellproliferation beeinflusst. Es konnte bereits gezeigt werden, dass ein verringertes *SOX18* Level sowohl in hepatozellulären Karzinomzelllinien, als auch in Zelllinien eines Larynxkarzinoms zu einer reduzierten Zellproliferation führt (Wang et al., 2015; Xu et al., 2019). Da *SOX18* auch die Phosphorylierung von JAK2 sowie STAT3 reguliert und dadurch den JAK2/STAT3 Signalweg beeinflusst, ist dies ein möglicher Mechanismus, worüber die Zellproliferation ebenfalls reguliert werden könnte (Xu et al., 2019).

5.4.5 Veränderter Zellzyklus in den *KMT2D* Knockdown Zellen

In den shRNA 2 transduzierten HUVEC konnte, im Vergleich zu den nsc transduzierten und den nicht transduzierten Zellen, ein prozentual höherer Anteil an Zellen in der G1-Phase detektiert werden. In dieser Phase befinden sich Zellen, die einen einfachen

Chromosomensatz tragen und sich nicht teilen. Es konnten also in den shRNA 2 transduzierten HUVEC ein leichter Anstieg an sich nicht teilenden Zellen in der Zellzyklusanalyse detektiert werden. So könnte ein Zusammenhang zwischen der verringerten Proliferation und der tendenziell veränderten Zellzyklusverteilung bestehen. Auch dieses Ergebnis könnte an der verringerten *SOX18* Expression liegen, denn in einer Zelllinie eines Larynxkarzinoms (Hep-2) konnte bereits gezeigt werden, dass eine *SOX18* Reduktion in den Zellen zu einem G1-Phasen Arrest führt (Xu et al., 2019).

In den shRNA 4 transduzierten HUVEC konnte dagegen ein tendenzieller Anstieg der Zellen in der Sub-G1-Phase beobachtet werden. Da dies ein Indikator für einen erhöhten Zelltod der Zellen darstellt, könnte dies eine mögliche Erklärung für die sehr schlechte Proliferationsrate der shRNA 4 transduzierten HUVEC bieten. Diese Zellen wurden aufgrund ihres schlechten Wachstums für die meisten Zellanalysen nicht verwendet. Auch eine ATAC-Seq Analyse war mit diesen Zellen nicht möglich, da sich die Zellen vermehrt in der Apoptose befanden und dadurch nicht mehr ausreichend intaktes Chromatin aus den Zellen extrahiert werden konnte. Da dieser Anstieg der Sub-G1-Phase nur in den shRNA 4 transduzierten Zellen und nicht auch in den shRNA 2 transduzierten Zellen zu beobachten war, spricht dies für einen unspezifischen Effekt der shRNA 4.

5.4.6 Verstärkte Invasion bei gleichbleibendem Migrationsverhalten der *KMT2D* Knockdown HUVEC

Die in dieser Arbeit nachgewiesene erhöhte Aktivität von FAK und MAPK in den *KMT2D* Knockdown HUVEC könnte das Zellverhalten beeinflussen. Beide Gene sind dafür bekannt, die Zellbewegung und die Zellinvasion mit zu beeinflussen (Sulzmaier et al., 2014; Zhang and Liu, 2002). Für *KMT2D* Knockdown Zellen wurde bereits ein verändertes Migrations- und Invasionsverhalten beschrieben. Allerdings finden sich widersprüchliche Beobachtungen bezüglich des Migrationsverhaltens. So zeigte Issaeva *et al.* in *KMT2D* defizienten HeLa-Zellen eine reduzierte Migration, Sun *et al.* zeigte dagegen eine verstärkte Migration in Blasenkrebszellen nach *KMT2D* siRNA Transfektion (Issaeva et al., 2007; Sun et al., 2019). Das Invasionsverhalten war in Zellen mit einem reduzierten *KMT2D* Level verstärkt (Sun et al., 2019). In dieser Arbeit konnte in den *KMT2D* defizienten HUVEC ebenfalls eine erhöhte Zellinvasion nachgewiesen werden. Allerdings zeigten sich für das Migrationsverhalten der transduzierten Zellen keine Veränderungen.

Insgesamt konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in endothelialen Zellen mit einem *KMT2D* Knockdown Veränderungen detektierbar sind, die auf einen veränderten, verstärkten Integrin Signalweg zurückzuführen sind. Zusätzlich dazu sind auch durch differentiell regulierte Gene biologische Prozesse wie die Differenzierung, die Zellproliferation, der Zellzyklus und die Zellinvasion beeinflusst. Diese nachgewiesenen Aberrationen können den transformierenden Eigenschaften zugeordnet werden und können die Pathogenese der kardialen Angiosarkome begünstigen.

5.5 Ausblick

In der GO-Analyse, der im RNA-Seq detektierten signifikant herunterregulierten Gene, wurden unter anderem die am stärksten herunterregulierten Gene *SOX18*, *CLDN5* und *NOTCH4* mit der endothelialen Zelldifferenzierung assoziiert. Da die Differenzierung einen großen Einfluss auf die Pathogenese der kardialen Angiosarkome haben kann, könnten in weiteren Analysen die Auswirkungen der verringerten Expression dieser Gene näher untersucht werden.

Außerdem zeigten die genomweiten Analysen der kardialen Angiosarkome von Kunze *et al.*, dass die *KMT2D* Stoppmutationen in den kardialen Angiosarkomen immer mit Mutationen in *KDR* oder *PLCG1* einhergehen (Kunze *et al.*, 2014). In weiteren Analysen könnten daher die Auswirkungen beider Mutationen in Kombination untersucht werden. Denn durch das Zusammenspiel der Mutationen könnten weitere pathogene Mechanismen aktiviert werden, die zur Entstehung kardialer Angiosarkome führen. Da in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass das lentivirale System sehr gut für die stabile Integration von Mutationen in HUVEC geeignet ist, könnte diese Methode auch verwendet werden, um beide Mutationen stabil in HUVEC einzubringen. Dabei kann auch die Reihenfolge, in der die Mutationen in die Zellen integriert werden, variiert werden.

6 Zusammenfassung

Primäre kardiale Angiosarkome sind eine sehr seltene Gruppe von Weichteilsarkomen, die 1-2% aller Sarkomerkrankungen ausmachen. Sie sind die häufigste Entität der malignen kardialen Tumore und gehen vom Endothel der Gefäße aus. Aufgrund ihres schnellen Wachstums und der hohen Metastasierungsrate ist die Prognose für erkrankte Patienten sehr ungünstig. Zudem sind primäre kardiale Angiosarkome aufgrund ihrer Lage oft inoperabel und weisen eine hohe Resistenz gegenüber Chemotherapeutika auf. Aufgrund der Seltenheit dieser Tumore ist deren Pathogenese weitestgehend unbekannt. Bisher sind Mutationen in *TP53*, *KRAS* und *CDKN2A* sowie rekurrente Mutationen in *KDR*, *PLCG1* und *KMT2D* bekannt. Darüber hinaus wurde bislang die Bedeutung des KDR/PLCG1 vermittelten Signalweges für die Pathogenese der kardialen Angiosarkome untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Auswirkungen der *KMT2D* Stopppmutationen, die vermutlich zur Inaktivierung des Gens führt, näher untersucht. Dazu wurde mit Hilfe der lentiviralen Transduktion ein stabiler *KMT2D* Knockdown in Endothelzellen (HUVEC) eingebracht.

KMT2D ist ein chromatinmodifizierendes Protein, das die Monomethylierung von H3K4 reguliert. Mittels ATAC-Seq Analysen konnten nur geringe Effekte in den *KMT2D* Knockdown HUVEC auf die Chromatinstruktur ausgemacht werden. Diese Effekte wurden vor allem im intergenischen Bereich detektiert. Durch RNA-Seq Analysen wurden die *KMT2D* Knockdown HUVEC auf differentiell exprimierte Gene untersucht. Dabei wurden insgesamt 70 signifikant hochregulierte Gene und 63 signifikant herunterregulierte Gene detektiert. Zu den am stärksten hochregulierten Gene zählen *VCAN*, *HAPLN1* und *CLMP*. Zu den am stärksten herunterregulierten Gene gehören *SOX18*, *CLDN5* sowie *NOTCH4*. Eine *Enriched* GO-Analyse der signifikant regulierten Gene zeigte u.a. mögliche Effekte auf den Aufbau der extrazellulären Matrix, das Zellwachstum, die Angiogenese sowie die Zellmigration.

Die in den *KMT2D* defizienten HUVEC stark hochregulierten Gene *VCAN*, *COL1A2* und *HAPLN1* sind Liganden für Intergine wodurch der Integrin Signalweg aktiviert werden kann. Es zeigte sich eine dauerhaft signifikante Zunahme der relativen Menge an phosphoryliertem FAK, ein wichtiges Signalmolekül im Integrin Signalweg, sowie an phosphorylierter MAPK in den *KMT2D* defizienten HUVEC. Zusätzlich konnten Veränderungen des Aktinzytoskeletts detektiert werden. Es konnte sowohl eine Veränderte F-Aktin Verteilung in der Zelle als auch ein verändertes, weniger flächendeckendes Zellwachstum mit spitzeren Zellfortsätzen beobachtet werden. Auch sich übereinander lagernde Zellen konnte in den shRNA transduzierten HUVEC deutlich häufiger beobachtet werden. Veränderungen in biologischen Prozessen konnten ebenfalls in den *KMT2D* Knockdown HUVEC detektiert werden. So zeigte sich in den *KMT2D* defizienten HUVEC eine deutliche Reduktion der Zellproliferation. Auch einen tendenziellen Anstieg der Zellen, die sich in der Sub-G1- bzw. G1-Phase befanden,

konnte in den *KMT2D* Knockdown HUVEC beobachtet werden. Allerdings zeigten die Knockdown Zellen keine signifikanten Veränderungen der Apoptoseresistenz. Des Weiteren wurde deutlich, dass die *KMT2D* Knockdown HUVEC im Vergleich zu den nsc transduzierten HUVEC eine erhöhte Invasivität hatten, das Migrationsverhalten der Zellen aber nicht verändert war.

Insgesamt wurde deutlich, dass in *KMT2D* Knockdown HUVEC der Integrin Signalweg beeinflusst ist, wodurch sich das Zellwachstum verändert und die transformierenden Eigenschaften und dadurch die Entstehung der kardialen Angiosarkome begünstigt werden könnten. So könnte durch die strukturellen Veränderungen des F-Aktin Zytoskeletts, der verstärkten Invasion und der Überlagerung der Zellen die Angiogenese der endothelialen Zellen gefördert werden.

7 Summary

Primary cardiac angiosarcomas are a rare type of soft tissue sarcomas at a frequency of only 1-2% of all sarcoma diseases. The angiosarcomas are the most common entity of the malignant cardiac tumors deriving from the vessel endothelium. Because of fast growing and their marked propensity to metastasize, prognoses for the patients are extremely poor. Additionally, due to their location angiosarcomas are frequently inoperable and have a resistance to chemotherapy. By reason of the rarity of these tumors knowledge regarding pathogenesis is very limited. Until now mutations in *TP53*, *KRAS* and *CDKN2A* as well as recurrent mutations in *KDR*, *PLCG1* and *KMT2D* are known. Furthermore, the meaning of the *KDR/PLCG1* signalling for pathogenesis of the cardiac angiosarcomas was determined. In this thesis, the effects of the *KMT2D* stop mutation, probably leading to gene inactivation, was examined. Therefore, a stable *KMT2D* knockdown in endothelial cells (HUVEC) via lentiviral transduction was gained.

KMT2D is a chromatin modifying protein, regulating the monomethylation of H3K4. *KMT2D* knockdown leads to changes in the chromatin structure in the intronic and in the intergenic region, demonstrated via ATAC-Seq analyses. By use of RNA-Seq analyses the influence of a *KMT2D* knockdown on other gene expressions was determined. In total, 70 significantly upregulated genes and 66 significantly downregulated genes were detected. The most upregulated genes were *VCAN*, *HAPLN1* and *CLMP*. The most downregulated genes were *SOX18*, *CLDN5* as well as *NOTCH4*. A subsequent enriched GO-analysis of in RNA-Seq detected significantly regulated genes showed, among others, changes in the structure of the extracellular matrix, in cell growing, in angiogenesis as well as in cell migration which can be evoked by the reduced *KMT2D* expression.

Inter alia the strong upregulated genes *VCAN*, *COL1A2* and *HAPLN1* can be associated with the integrin pathway. Effects of the *KMT2D* knockdown to the integrin signalling were displayed. A significant increase of relative amount of phosphorylated FAK, an important signal molecule of the integrin signalling, as well as of phosphorylated MAPK was detected in the *KMT2D* deficient HUVEC. Additionally, changes of the actin cytoskeleton were verified. A reorganization of the F-actin filaments and a modified less area-covering growing behaviour with more acute cell appendices were shown. Also, a more overlaying cell growth was detected in *KMT2D* deficient cells. On cellular level changes in the *KMT2D* knockdown HUVEC were demonstrated as well. An obvious reduction of cell proliferation was determined and a tendential increase of cells in the sub-G1- or in the G1-phase was also seen for the *KMT2D* knockdown HUVEC. However, the knockdown had no significant effect on apoptosis resistance. Moreover, in the *KMT2D* knockdown HUVEC the invasion is increased while migration behaviour of the cells was not modified.

In summary, in *KMT2D* knockdown HUVEC the integrin pathway could be influenced, whereby the cell growing is modified and the genesis of cardiac angiosarcomas is favoured. The structural modifications in F-actin cytoskeleton, the enhanced invasion as well as the overlaying cell growing could lead to angiogenesis and a cancerogenous growing behaviour of endothelial cells.

Anhang

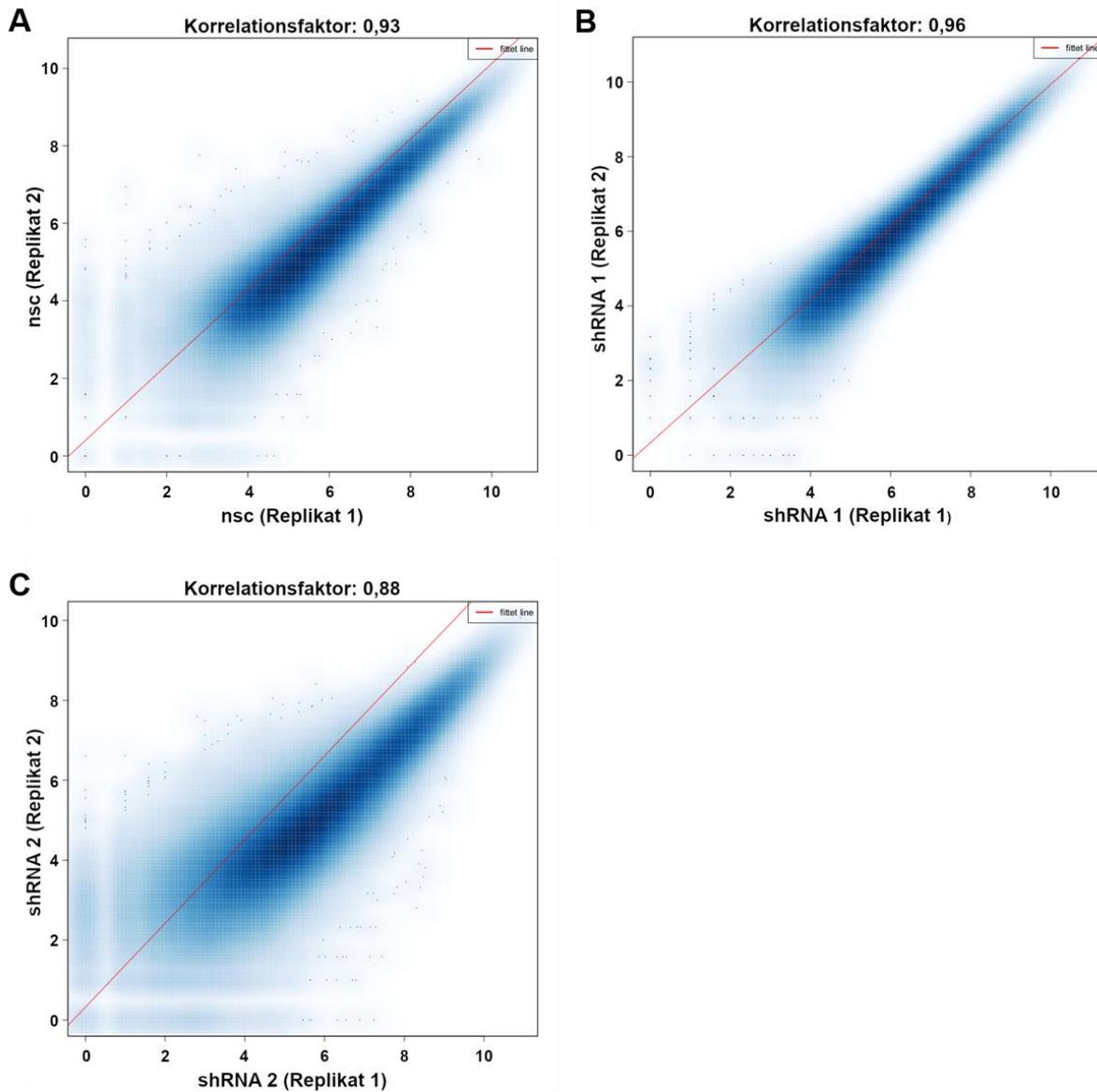


Abbildung 35: Korrelationsanalysen der im ATAC-Seq Replikate.

Für die Korrelationsanalyse wurde die Abdeckung der einzelnen Proben des ATAC-Seq für alle detektierten Peaks bestimmt. Diese wurde anschließend in log₂ Daten transformiert und die Korrelation zwischen den Replikaten nach Spearman berechnet. **A:** Der Korrelationsfaktor für die Replikate der nsc transduzierten HUVEC liegt bei 0,93. **B:** Der Korrelationsfaktor für die Replikate der shRNA 1 transduzierten HUVEC liegt bei 0,96. **C:** Der Korrelationsfaktor für die Replikate der shRNA 2 transduzierten HUVEC liegt bei 0,88.

Tabelle 2: Protein kodierende Gene in der Nähe der signifikant veränderten *Peaks*

A	Proteinkodierende Gene verstärkter <i>Peaks</i>	B	Proteinkodierende Gene verringertes <i>Peaks</i>
	<i>ADGRL2</i>		<i>ALDH8A1</i>
	<i>AGBL3</i>		<i>BCHE</i>
	<i>APCDD1L</i>		<i>BRD9</i>
	<i>ARHGEF10L</i>		<i>C4orf22</i>
	<i>C9orf92</i>		<i>C6orf118</i>
	<i>CYP27C1</i>		<i>CBFA2T3</i>
	<i>CYP4X1</i>		<i>EGF</i>
	<i>DAOA</i>		<i>EGLN3</i>
	<i>DCLK2</i>		<i>ERC2</i>
	<i>DPY19L4</i>		<i>EXPH5</i>
	<i>DPYSL3</i>		<i>FAR1</i>
	<i>EEF1E1</i>		<i>GNG12</i>
	<i>EFNA5</i>		<i>INTU</i>
	<i>FAT3</i>		<i>IZUMO3</i>
	<i>FIGN</i>		<i>JPH1</i>
	<i>FMO1</i>		<i>KCTD12</i>
	<i>HAPLN1</i>		<i>LOX</i>
	<i>KBTBD8</i>		<i>LRRFIP1</i>
	<i>MDGA1</i>		<i>NADK2</i>
	<i>MTNR1B</i>		<i>NCOA4</i>
	<i>NALCN</i>		<i>NPVF</i>
	<i>OAT</i>		<i>OR56B4</i>
	<i>PPP1R21</i>		<i>PDE10A</i>
	<i>PTGDR</i>		<i>PIP5K1C</i>
	<i>PTPRM</i>		<i>PLXNA2</i>
	<i>RAPGEF5</i>		<i>POM121L12</i>
	<i>RGS1</i>		<i>SCN7A</i>
	<i>SLC41A3</i>		<i>SYT14</i>
	<i>SLIT3</i>		<i>TAPT1</i>
	<i>SMLR1</i>		<i>TM2D3</i>
	<i>SPP1</i>		<i>TNS3</i>
	<i>SULF1</i>		<i>TRIM24</i>
	<i>TBX3</i>		<i>TTC8</i>
	<i>TRABD2B</i>		
	<i>TRAPPC8</i>		
	<i>TRPS1</i>		
	<i>TTC29</i>		
	<i>TXNDC8</i>		
	<i>ZNF789</i>		

Die in den *KMT2D* Knockdown HUVEC detektierten signifikant veränderten *Peaks* wurden den nächstgelegenen Genen zugeordnet. **A:** Liste der proteinkodierenden Gene, denen die signifikant verstärkten *Peaks* zugeordnet werden konnten. **B:** Liste der proteinkodierenden Gene, denen die signifikant verringerten *Peaks* zugeordnet werden konnten.

Tabelle 3: GO-Analyse aller signifikant verstärkten ATAC-Seq Peaks.

Biologischer Prozess	Anzahl	Gene Ratio	Gene
<i>regulation of biological process</i>	25	25/76	MTNR1B/ARHGEF10L/TXNDC8/MDGA1/ MIR548M/RAPGEF5/TBX3/EFNA5/DPYSL3/ TRPS1/SLIT3/MIR218-2/ADGRL2/DAOA/ PTPRM/DCLK2/SULF1/EEF1E1/NALCN/SPP1/ PTGDR/TRABD2B/ZNF789/RGS1/KBTBD8
<i>organic substance metabolic process</i>	22	22/76	ARHGEF10L/TXNDC8/OAT/MIR548M/TBX3/ EFNA5/TRPS1/SLIT3/LINC01151/CYP27C1/ MIR218-2/AGBL3/PTPRM/DCLK2/SULF1/ FMO1/EEF1E1/SPP1/PTGDR/TRABD2B/ ZNF789/KBTBD8
<i>regulation of cellular process</i>	22	22/76	MTNR1B/ARHGEF10L/TXNDC8/MDGA1/ RAPGEF5/TBX3/EFNA5/DPYSL3/TRPS1/ SLIT3/MIR218-2/ADGRL2/PTPRM/DCLK2/ SULF1/EEF1E1/SPP1/PTGDR/TRABD2B/ ZNF789/RGS1/KBTBD8
<i>cellular metabolic process</i>	19	19/76	ARHGEF10L/OAT/TBX3/EFNA5/TRPS1/ LINC01151/CYP27C1/MIR218-2/AGBL3/ PTPRM/DCLK2/SULF1/FMO1/EEF1E1/SPP1/ PTGDR/TRABD2B/ZNF789/KBTBD8
<i>primary metabolic process</i>	19	19/76	ARHGEF10L/OAT/TBX3/EFNA5/TRPS1/ LINC01151/CYP27C1/MIR218-2/AGBL3/ PTPRM/DCLK2/SULF1/FMO1/EEF1E1/SPP1/ PTGDR/TRABD2B/ZNF789/KBTBD8
<i>nitrogen compound metabolic process</i>	18	18/76	ARHGEF10L/OAT/TBX3/EFNA5/TRPS1/ LINC01151/MIR218-2/AGBL3/PTPRM/DCLK2/ SULF1/FMO1/EEF1E1/SPP1/PTGDR/ TRABD2B/ZNF789/KBTBD8
<i>cellular response to stimulus</i>	18	18/76	MTNR1B/ARHGEF10L/RAPGEF5/TBX3/ EFNA5/DPYSL3/SLIT3/MIR218-2/ADGRL2/ PTPRM/DCLK2/SULF1/FMO1/EEF1E1/SPP1/ PTGDR/TRABD2B/RGS1
<i>cell communication</i>	16	16/76	MTNR1B/ARHGEF10L/RAPGEF5/TBX3/ EFNA5/SLIT3/MIR218-2/ADGRL2/PTPRM/ DCLK2/SULF1/EEF1E1/SPP1/PTGDR/ TRABD2B/RGS1
<i>multicellular organism development</i>	16	16/76	MTNR1B/FAT3/TXNDC8/MDGA1/RAPGEF5/ TBX3/EFNA5/DPYSL3/TRPS1/SLIT3/PTPRM/ DCLK2/SULF1/SPP1/PTGDR/KBTBD8
<i>anatomical structure development</i>	16	16/76	MTNR1B/FAT3/TXNDC8/MDGA1/RAPGEF5/ TBX3/EFNA5/DPYSL3/TRPS1/SLIT3/PTPRM/ DCLK2/SULF1/SPP1/PTGDR/KBTBD8

<i>negative regulation of biological process</i>	16	16/76	MTNR1B/MIR548M/TBX3/EFNA5/DPYSL3/TRPS1/SLIT3/MIR218-2/DAOA/PTPRM/DCLK2/SULF1/EEF1E1/SPP1/TRABD2B/RGS1
<i>signal transduction</i>	15	15/76	MTNR1B/ARHGEF10L/RAPGEF5/EFNA5/SLIT3/MIR218-2/ADGRL2/PTPRM/DCLK2/SULF1/EEF1E1/SPP1/PTGDR/TRABD2B/RGS1
<i>cellular component organization</i>	15	15/76	ARHGEF10L/TXNDC8/MDGA1/OAT/FIGN/EFNA5/DPYSL3/TRPS1/SLIT3/HAPLN1/PTPRM/SULF1/TRAPPC8/SPP1/TRABD2B
<i>regulation of metabolic process</i>	13	13/76	ARHGEF10L/MIR548M/TBX3/EFNA5/TRPS1/SLIT3/MIR218-2/DAOA/SULF1/SPP1/TRABD2B/ZNF789/KBTBD8
<i>negative regulation of cellular process</i>	13	13/76	MTNR1B/TBX3/EFNA5/DPYSL3/TRPS1/SLIT3/MIR218-2/PTPRM/SULF1/EEF1E1/SPP1/TRABD2B/RGS1
<i>cellular developmental process</i>	13	13/76	TXNDC8/MDGA1/TBX3/EFNA5/DPYSL3/TRPS1/SLIT3/PTPRM/DCLK2/SULF1/EEF1E1/SPP1/KBTBD8
<i>biosynthetic process</i>	10	10/76	ARHGEF10L/OAT/TBX3/TRPS1/MIR218-2/SULF1/EEF1E1/SPP1/ZNF789/KBTBD8
<i>regulation of signaling</i>	10	10/76	MTNR1B/ARHGEF10L/EFNA5/SLIT3/MIR218-2/SULF1/EEF1E1/SPP1/TRABD2B/RGS1
<i>regulation of response to stimulus</i>	10	10/76	MTNR1B/ARHGEF10L/EFNA5/SLIT3/MIR218-2/SULF1/EEF1E1/SPP1/TRABD2B/RGS1
<i>positive regulation of cellular process</i>	9	9/76	MTNR1B/ARHGEF10L/TBX3/EFNA5/DPYSL3/SULF1/EEF1E1/SPP1/TRABD2B
<i>regulation of multicellular organismal process</i>	9	9/76	MTNR1B/MDGA1/TBX3/EFNA5/DPYSL3/TRPS1/PTPRM/SULF1/SPP1
<i>regulation of developmental process</i>	9	9/76	MDGA1/TBX3/EFNA5/DPYSL3/TRPS1/PTPRM/SULF1/EEF1E1/SPP1
<i>regulation of localization</i>	9	9/76	MTNR1B/EFNA5/DPYSL3/MIR218-2/PTPRM/DCLK2/SULF1/NALCN/SPP1
<i>positive regulation of biological process</i>	9	9/76	MTNR1B/ARHGEF10L/TBX3/EFNA5/DPYSL3/SULF1/EEF1E1/SPP1/TRABD2B
<i>response to chemical</i>	9	9/76	EFNA5/DPYSL3/SLIT3/PTPRM/SULF1/FMO1/EEF1E1/SPP1/PTGDR
<i>regulation of biological quality</i>	9	9/76	MTNR1B/TXNDC8/MDGA1/TBX3/EFNA5/CYP27C1/PTPRM/NALCN/SPP1

<i>anatomical structure morphogenesis</i>	8	8/76	TXNDC8/TBX3/EFNA5/SLIT3/PTPRM/SULF1/SPP1/KBTBD8
<i>cellular component biogenesis</i>	8	8/76	ARHGEF10L/TXNDC8/MDGA1/OAT/EFNA5/DPYSL3/TRPS1/TRABD2B
<i>movement of cell or subcellular component</i>	7	7/76	MDGA1/EFNA5/DPYSL3/SLIT3/MIR218-2/PTPRM/SULF1
<i>negative regulation of response to stimulus</i>	7	7/76	MTNR1B/SLIT3/MIR218-2/SULF1/SPP1/TRABD2B/RGS1
<i>regulation of molecular function</i>	7	7/76	MTNR1B/ARHGEF10L/EFNA5/MIR218-2/DAOA/SPP1/RGS1
<i>reproductive process</i>	6	6/76	TXNDC8/TBX3/SLIT3/SULF1/SPP1/PTGDR
<i>negative regulation of metabolic process</i>	6	6/76	MIR548M/TBX3/TRPS1/SLIT3/MIR218-2/DAOA
<i>small molecule metabolic process</i>	6	6/76	TXNDC8/OAT/CYP27C1/FMO1/EEF1E1/PTGDR
<i>regulation of cell proliferation</i>	6	6/76	TBX3/SLIT3/MIR218-2/PTPRM/SULF1/EEF1E1
<i>developmental process involved in reproduction</i>	6	6/76	TXNDC8/TBX3/SLIT3/SULF1/SPP1/PTGDR
<i>cell adhesion</i>	6	6/76	FAT3/MDGA1/EFNA5/HAPLN1/PTPRM/SPP1
<i>cell-cell signaling</i>	6	6/76	MTNR1B/TBX3/EFNA5/SULF1/SPP1/TRABD2B
<i>negative regulation of signaling</i>	6	6/76	MTNR1B/SLIT3/MIR218-2/SULF1/TRABD2B/RGS1
<i>negative regulation of developmental process</i>	6	6/76	TBX3/EFNA5/DPYSL3/PTPRM/SULF1/SPP1
<i>response to stress</i>	6	6/76	ARHGEF10L/TBX3/DPYSL3/FMO1/EEF1E1/SPP1
<i>response to external stimulus</i>	6	6/76	EFNA5/SLIT3/PTPRM/FMO1/SPP1/RGS1
<i>establishment of localization</i>	6	6/76	MTNR1B/TBX3/EFNA5/SLC41A3/NALCN/SPP1
<i>oxidation-reduction process</i>	5	5/76	TXNDC8/CYP27C1/CYP4X1/FMO1/TRABD2B
<i>positive regulation of metabolic process</i>	5	5/76	ARHGEF10L/TBX3/EFNA5/SPP1/TRABD2B
<i>negative regulation of cell proliferation</i>	5	5/76	SLIT3/MIR218-2/PTPRM/SULF1/EEF1E1
<i>cell death</i>	5	5/76	MTNR1B/TBX3/SLIT3/SULF1/EEF1E1

<i>system process</i>	5	5/76	MTNR1B/OAT/TBX3/PTPRM/SULF1
<i>negative regulation of multicellular organismal process</i>	5	5/76	MTNR1B/DPYSL3/PTPRM/SULF1/SPP1
<i>anatomical structure formation involved in morphogenesis</i>	5	5/76	TXNDC8/TBX3/PTPRM/SULF1/KBTBD8
<i>cell motility</i>	5	5/76	MDGA1/DPYSL3/MIR218-2/PTPRM/SULF1
<i>regulation of cellular component biogenesis</i>	5	5/76	ARHGEF10L/MDGA1/EFNA5/DPYSL3/TRABD2B
<i>response to endogenous stimulus</i>	5	5/76	EFNA5/SLIT3/SULF1/SPP1/PTGDR
<i>localization of cell</i>	5	5/76	MDGA1/DPYSL3/MIR218-2/PTPRM/SULF1
<i>secretion by cell</i>	4	4/76	MTNR1B/TBX3/EFNA5/SPP1
<i>positive regulation of signaling</i>	4	4/76	MTNR1B/SULF1/EEF1E1/SPP1
<i>positive regulation of multicellular organismal process</i>	4	4/76	MTNR1B/EFNA5/DPYSL3/SULF1
<i>regulation of locomotion</i>	4	4/76	DPYSL3/MIR218-2/PTPRM/SULF1
<i>negative regulation of locomotion</i>	4	4/76	DPYSL3/MIR218-2/PTPRM/SULF1
<i>positive regulation of cellular component biogenesis</i>	4	4/76	ARHGEF10L/EFNA5/DPYSL3/TRABD2B
<i>macromolecule localization</i>	4	4/76	MTNR1B/EFNA5/DCLK2/SPP1
<i>multicellular organism reproduction</i>	3	3/76	TXNDC8/SLIT3/SPP1
<i>cell growth</i>	3	3/76	EFNA5/SLIT3/SPP1
<i>regulation of growth</i>	3	3/76	EFNA5/SLIT3/SPP1
<i>developmental growth</i>	3	3/76	EFNA5/SLIT3/SPP1
<i>cellular homeostasis</i>	3	3/76	MTNR1B/TXNDC8/EFNA5
<i>actin filament-based process</i>	3	3/76	ARHGEF10L/EFNA5/DPYSL3
<i>multicellular organismal reproductive process</i>	3	3/76	TXNDC8/SLIT3/SPP1
<i>positive regulation of developmental process</i>	3	3/76	EFNA5/DPYSL3/EEF1E1

<i>taxis</i>	3	3/76	<i>EFNA5/SLIT3/PTPRM</i>
<i>hormone metabolic process</i>	2	2/76	<i>CYP27C1/SPP1</i>
<i>negative regulation of growth</i>	2	2/76	<i>SLIT3/SPP1</i>
<i>epithelial cell proliferation</i>	2	2/76	<i>PTPRM/SULF1</i>
<i>microtubule-based process</i>	2	2/76	<i>FIGN/EFNA5</i>
<i>cell cycle</i>	2	2/76	<i>FIGN/TBX3</i>
<i>gene silencing</i>	2	2/76	<i>MIR548M/MIR218-2</i>
<i>cellular process involved in reproduction in multicellular organism</i>	2	2/76	<i>TXNDC8/SLIT3</i>
<i>cellular potassium ion transport</i>	2	2/76	<i>MTNR1B/NALCN</i>
<i>multi-organism reproductive process</i>	2	2/76	<i>TXNDC8/SPP1</i>
<i>morphogenesis of a branching structure</i>	2	2/76	<i>TBX3/SULF1</i>
<i>sleep</i>	2	2/76	<i>MTNR1B/PTGDR</i>
<i>aging</i>	2	2/76	<i>TBX3/EEF1E1</i>
<i>positive regulation of response to stimulus</i>	2	2/76	<i>SULF1/EEF1E1</i>
<i>regulation of cell adhesion</i>	2	2/76	<i>MDGA1/EFNA5</i>
<i>response to biotic stimulus</i>	2	2/76	<i>FMO1/RGS1</i>
<i>cellular localization</i>	2	2/76	<i>EFNA5/DCLK2</i>
<i>response to other organism</i>	2	2/76	<i>FMO1/RGS1</i>
<i>sexual reproduction</i>	1	1/76	<i>TXNDC8</i>
<i>catabolic process</i>	1	1/76	<i>SPP1</i>
<i>secondary metabolic process</i>	1	1/76	<i>FMO1</i>
<i>collagen metabolic process</i>	1	1/76	<i>MIR218-2</i>
<i>immune response</i>	1	1/76	<i>RGS1</i>

<i>positive regulation of growth</i>	1	1/76	<i>EFNA5</i>
<i>rhythmic behavior</i>	1	1/76	<i>MTNR1B</i>
<i>positive regulation of behavior</i>	1	1/76	<i>MTNR1B</i>
<i>regulation of behavior</i>	1	1/76	<i>MTNR1B</i>
<i>positive regulation of cell proliferation</i>	1	1/76	<i>TBX3</i>
<i>stem cell proliferation</i>	1	1/76	<i>TBX3</i>
<i>cell division</i>	1	1/76	<i>FIGN</i>
<i>embryo implantation</i>	1	1/76	<i>SPP1</i>
<i>ovulation cycle process</i>	1	1/76	<i>SLIT3</i>
<i>regulation of reproductive process</i>	1	1/76	<i>SULF1</i>
<i>negative regulation of reproductive process</i>	1	1/76	<i>SULF1</i>
<i>multicellular organismal signaling</i>	1	1/76	<i>MTNR1B</i>
<i>cytokine production</i>	1	1/76	<i>SULF1</i>
<i>pattern specification process</i>	1	1/76	<i>TBX3</i>
<i>stem cell population maintenance</i>	1	1/76	<i>TBX3</i>
<i>multi-multicellular organism process</i>	1	1/76	<i>SPP1</i>
<i>innervation</i>	1	1/76	<i>SULF1</i>
<i>tissue migration</i>	1	1/76	<i>PTPRM</i>
<i>maintenance of cell number</i>	1	1/76	<i>TBX3</i>
<i>circadian rhythm</i>	1	1/76	<i>MTNR1B</i>
<i>ovulation cycle</i>	1	1/76	<i>SLIT3</i>
<i>positive regulation of circadian rhythm</i>	1	1/76	<i>MTNR1B</i>
<i>positive regulation of transport</i>	1	1/76	<i>SPP1</i>
<i>positive regulation of lipid localization</i>	1	1/76	<i>SPP1</i>
<i>negative regulation of transport</i>	1	1/76	<i>MTNR1B</i>

<i>negative regulation of cellular protein localization</i>	1	1/76	<i>DCLK2</i>
<i>negative regulation of establishment of protein localization</i>	1	1/76	<i>MTNR1B</i>
<i>regulation of circadian rhythm</i>	1	1/76	<i>MTNR1B</i>
<i>regulation of action potential</i>	1	1/76	<i>MTNR1B</i>
<i>response to abiotic stimulus</i>	1	1/76	<i>FMO1</i>

Grouped GO-Analyse aller signifikant verstärkten, Genen zugeordneten, *Peaks* des ATAC-Seq. Insgesamt konnten die Gene 122 biologischen Prozessen zugeordnet werden. Neben den biologischen Prozessen und den zugeordneten Genen sind die Anzahl und die *Gene Ratio* (Anzahl/Mengengröße) angegeben.

Tabelle 4: GO-Analyse aller signifikant verringerten ATAC-Seq *Peaks*.

Biologischer Prozess	Anzahl	Gene Ratio	Gene
<i>regulation of biological process</i>	20	20/50	<i>PLXNA2/CBFA2T3/INTU/OR56B4/TAPT1/NCOA4/EGLN3/TNS3/TRIM24/PIP5K1C/EXPH5/LRRFIP1/GNG12/EGF/LOX/NPVF/SCN7A/JPH1/BCHE/PDE10A</i>
<i>regulation of cellular process</i>	19	19/50	<i>PLXNA2/CBFA2T3/INTU/OR56B4/TAPT1/NCOA4/EGLN3/TNS3/TRIM24/PIP5K1C/EXPH5/LRRFIP1/GNG12/EGF/LOX/NPVF/JPH1/BCHE/PDE10A</i>
<i>cell communication</i>	15	15/50	<i>PLXNA2/ERC2/INTU/OR56B4/TAPT1/NCOA4/TRIM24/PIP5K1C/GNG12/EGF/LOX/NPVF/JPH1/BCHE/PDE10A</i>
<i>cellular response to stimulus</i>	15	15/50	<i>PLXNA2/INTU/OR56B4/TAPT1/NCOA4/EGLN3/TRIM24/PIP5K1C/GNG12/EGF/LOX/NPVF/JPH1/BCHE/PDE10A</i>
<i>cellular metabolic process</i>	13	13/50	<i>FAR1/CBFA2T3/NADK2/NCOA4/EGLN3/TRIM24/PIP5K1C/ALDH8A1/LRRFIP1/EGF/LOX/BCHE/PDE10A</i>
<i>organic substance metabolic process</i>	13	13/50	<i>FAR1/CBFA2T3/NADK2/NCOA4/EGLN3/TRIM24/PIP5K1C/ALDH8A1/LRRFIP1/EGF/LOX/BCHE/PDE10A</i>

<i>signal transduction</i>	13	13/50	PLXNA2/INTU/OR56B4/TAPT1/NCOA4/ TRIM24/PIP5K1C/GNG12/EGF/LOX/NPVF/ JPH1/PDE10A
<i>multicellular organism development</i>	13	13/50	PLXNA2/CBFA2T3/TTC8/INTU/TAPT1/NCOA4/ TNS3/EXPH5/GNG12/EGF/LOX/JPH1/BCHE
<i>anatomical structure development</i>	13	13/50	PLXNA2/CBFA2T3/TTC8/INTU/TAPT1/NCOA4/ TNS3/EXPH5/GNG12/EGF/LOX/JPH1/BCHE
<i>nitrogen compound metabolic process</i>	12	12/50	FAR1/CBFA2T3/NADK2/NCOA4/EGLN3/ TRIM24/ALDH8A1/LRRFIP1/EGF/LOX/BCHE/ PDE10A
<i>biosynthetic process</i>	12	12/50	FAR1/CBFA2T3/NADK2/NCOA4/EGLN3/ TRIM24/PIP5K1C/ALDH8A1/LRRFIP1/EGF/ LOX/PDE10A
<i>primary metabolic process</i>	12	12/50	FAR1/CBFA2T3/NADK2/NCOA4/EGLN3/ TRIM24/PIP5K1C/ALDH8A1/LRRFIP1/EGF/ LOX/PDE10A
<i>positive regulation of biological process</i>	10	10/50	CBFA2T3/INTU/TAPT1/NCOA4/EGLN3/TNS3/ TRIM24/EXPH5/LRRFIP1/EGF
<i>regulation of biological quality</i>	10	10/50	ERC2/NCOA4/TRIM24/PIP5K1C/ALDH8A1/ LOX/NPVF/SCN7A/JPH1/BCHE
<i>cellular component organization</i>	9	9/50	ERC2/TTC8/INTU/TAPT1/PIP5K1C/KCTD12/ BRD9/EGF/LOX
<i>positive regulation of cellular process</i>	9	9/50	CBFA2T3/INTU/TAPT1/NCOA4/EGLN3/TNS3/ TRIM24/EXPH5/EGF
<i>negative regulation of cellular process</i>	9	9/50	CBFA2T3/INTU/TRIM24/LRRFIP1/EGF/NPVF/ JPH1/BCHE/PDE10A
<i>regulation of signaling</i>	9	9/50	INTU/TRIM24/PIP5K1C/EGF/LOX/NPVF/JPH1/ BCHE/PDE10A
<i>negative regulation of biological process</i>	9	9/50	CBFA2T3/INTU/TRIM24/LRRFIP1/EGF/NPVF/ JPH1/BCHE/PDE10A
<i>establishment of localization</i>	9	9/50	ERC2/TTC8/NCOA4/PIP5K1C/EXPH5/EGF/ NPVF/SCN7A/JPH1
<i>response to chemical</i>	8	8/50	OR56B4/NCOA4/EGLN3/TRIM24/PIP5K1C/ GNG12/LOX/BCHE
<i>cellular component biogenesis</i>	8	8/50	ERC2/TTC8/INTU/TAPT1/PIP5K1C/KCTD12/ EGF/LOX
<i>regulation of metabolic process</i>	7	7/50	CBFA2T3/NCOA4/EGLN3/TRIM24/LRRFIP1/ EGF/LOX
<i>small molecule metabolic process</i>	7	7/50	FAR1/CBFA2T3/NADK2/EGLN3/ALDH8A1/ EGF/PDE10A

<i>regulation of cell proliferation</i>	7	7/50	CBFA2T3/INTU/EGLN3/TNS3/TRIM24/EGF/BCHE
<i>regulation of response to stimulus</i>	7	7/50	INTU/TRIM24/PIP5K1C/EGF/LOX/JPH1/PDE10A
<i>cellular localization</i>	7	7/50	PLXNA2/ERC2/NCOA4/PIP5K1C/EXPH5/EGF/JPH1
<i>cellular developmental process</i>	6	6/50	CBFA2T3/INTU/TAPT1/EXPH5/LOX/BCHE
<i>regulation of multicellular organismal process</i>	6	6/50	INTU/TAPT1/LRRFIP1/EGF/LOX/NPVF
<i>regulation of localization</i>	6	6/50	PLXNA2/EXPH5/EGF/NPVF/SCN7A/JPH1
<i>response to external stimulus</i>	6	6/50	TRIM24/PIP5K1C/GNG12/LOX/SCN7A/BCHE
<i>catabolic process</i>	5	5/50	CBFA2T3/TRIM24/ALDH8A1/EGF/PDE10A
<i>positive regulation of metabolic process</i>	5	5/50	CBFA2T3/NCOA4/EGLN3/TRIM24/EGF
<i>movement of cell or subcellular component</i>	5	5/50	PLXNA2/TNS3/PIP5K1C/EGF/LOX
<i>secretion by cell</i>	5	5/50	ERC2/PIP5K1C/EXPH5/EGF/NPVF
<i>cell-cell signaling</i>	5	5/50	ERC2/PIP5K1C/EGF/NPVF/BCHE
<i>system process</i>	5	5/50	TTC8/OR56B4/NPVF/SCN7A/BCHE
<i>anatomical structure morphogenesis</i>	5	5/50	PLXNA2/TTC8/INTU/EGF/LOX
<i>cell motility</i>	5	5/50	PLXNA2/TNS3/PIP5K1C/EGF/LOX
<i>localization of cell</i>	5	5/50	PLXNA2/TNS3/PIP5K1C/EGF/LOX
<i>regulation of molecular function</i>	5	5/50	EGLN3/LRRFIP1/EGF/LOX/JPH1
<i>oxidation-reduction process</i>	4	4/50	FAR1/CBFA2T3/EGLN3/ALDH8A1
<i>negative regulation of cell proliferation</i>	4	4/50	CBFA2T3/INTU/TRIM24/BCHE
<i>negative regulation of signaling</i>	4	4/50	EGF/NPVF/BCHE/PDE10A
<i>macromolecule localization</i>	4	4/50	TTC8/NCOA4/EXPH5/EGF
<i>negative regulation of metabolic process</i>	3	3/50	CBFA2T3/TRIM24/LRRFIP1
<i>cell death</i>	3	3/50	EGLN3/TRIM24/LOX

<i>cellular homeostasis</i>	3	3/50	NCOA4/LOX/JPH1
<i>ossification</i>	3	3/50	INTU/TAPT1/LOX
<i>pattern specification process</i>	3	3/50	PLXNA2/TTC8/INTU
<i>positive regulation of multicellular organismal process</i>	3	3/50	TAPT1/LRRFIP1/EGF
<i>regulation of developmental process</i>	3	3/50	TAPT1/EGF/LOX
<i>response to stress</i>	3	3/50	CBFA2T3/EGLN3/LOX
<i>response to endogenous stimulus</i>	3	3/50	NCOA4/LOX/BCHE
<i>immune system development</i>	2	2/50	CBFA2T3/LOX
<i>positive regulation of cell proliferation</i>	2	2/50	TNS3/EGF
<i>positive regulation of signaling</i>	2	2/50	INTU/EGF
<i>anatomical structure formation involved in morphogenesis</i>	2	2/50	PLXNA2/EGF
<i>positive regulation of developmental process</i>	2	2/50	TAPT1/EGF
<i>regulation of locomotion</i>	2	2/50	PLXNA2/EGF
<i>taxis</i>	2	2/50	PIP5K1C/LOX
<i>positive regulation of response to stimulus</i>	2	2/50	INTU/EGF
<i>positive regulation of transport</i>	2	2/50	EXPH5/EGF
<i>negative regulation of response to stimulus</i>	2	2/50	EGF/PDE10A
<i>negative regulation of transport</i>	2	2/50	EGF/NPVF
<i>response to biotic stimulus</i>	2	2/50	GNG12/SCN7A
<i>response to abiotic stimulus</i>	2	2/50	CBFA2T3/EGLN3
<i>response to other organism</i>	2	2/50	GNG12/SCN7A

<i>reproductive process</i>	1	1/50	<i>NCOA4</i>
<i>hormone metabolic process</i>	1	1/50	<i>ALDH8A1</i>
<i>regulation of immune system process</i>	1	1/50	<i>LOX</i>
<i>leukocyte migration</i>	1	1/50	<i>PIP5K1C</i>
<i>learning or memory</i>	1	1/50	<i>BCHE</i>
<i>epithelial cell proliferation</i>	1	1/50	<i>INTU</i>
<i>neural precursor cell proliferation</i>	1	1/50	<i>EGF</i>
<i>cell cycle</i>	1	1/50	<i>EGF</i>
<i>cell cycle process</i>	1	1/50	<i>EGF</i>
<i>actin filament-based process</i>	1	1/50	<i>PIP5K1C</i>
<i>cell division</i>	1	1/50	<i>INTU</i>
<i>exocytic process</i>	1	1/50	<i>ERC2</i>
<i>developmental process involved in reproduction</i>	1	1/50	<i>NCOA4</i>
<i>cell adhesion</i>	1	1/50	<i>PIP5K1C</i>
<i>morphogenesis of a branching structure</i>	1	1/50	<i>EGF</i>
<i>cytokine production</i>	1	1/50	<i>LRRFIP1</i>
<i>post-embryonic development</i>	1	1/50	<i>TAPT1</i>
<i>molting cycle process</i>	1	1/50	<i>INTU</i>
<i>molting cycle</i>	1	1/50	<i>INTU</i>
<i>negative regulation of multicellular organismal process</i>	1	1/50	<i>NPVF</i>
<i>positive regulation of locomotion</i>	1	1/50	<i>EGF</i>
<i>positive regulation of cellular component biogenesis</i>	1	1/50	<i>TAPT1</i>
<i>positive regulation of DNA-binding transcription factor activity</i>	1	1/50	<i>LRRFIP1</i>

<i>positive regulation of cellular protein localization</i>	1	1/50	<i>EGF</i>
<i>positive regulation of establishment of protein localization</i>	1	1/50	<i>EXPH5</i>
<i>negative regulation of lipid localization</i>	1	1/50	<i>EGF</i>
<i>regulation of cellular component biogenesis</i>	1	1/50	<i>TAPT1</i>
<i>response to estrogen</i>	1	1/50	<i>TRIM24</i>
<i>detection of stimulus</i>	1	1/50	<i>OR56B4</i>
<i>maintenance of location</i>	1	1/50	<i>JPH1</i>
<i>microtubule organizing center localization</i>	1	1/50	<i>PLXNA2</i>

Grouped GO-Analyse aller signifikant verringerten, Genen zugeordneten, *Peaks* des ATAC-Seq. Insgesamt konnten die Gene 99 biologischen Prozessen zugeordnet werden. Neben den biologischen Prozessen und den zugeordneten Genen sind die Mengengröße und die *Gene Ratio* (Anzahl/Mengengröße) angegeben.

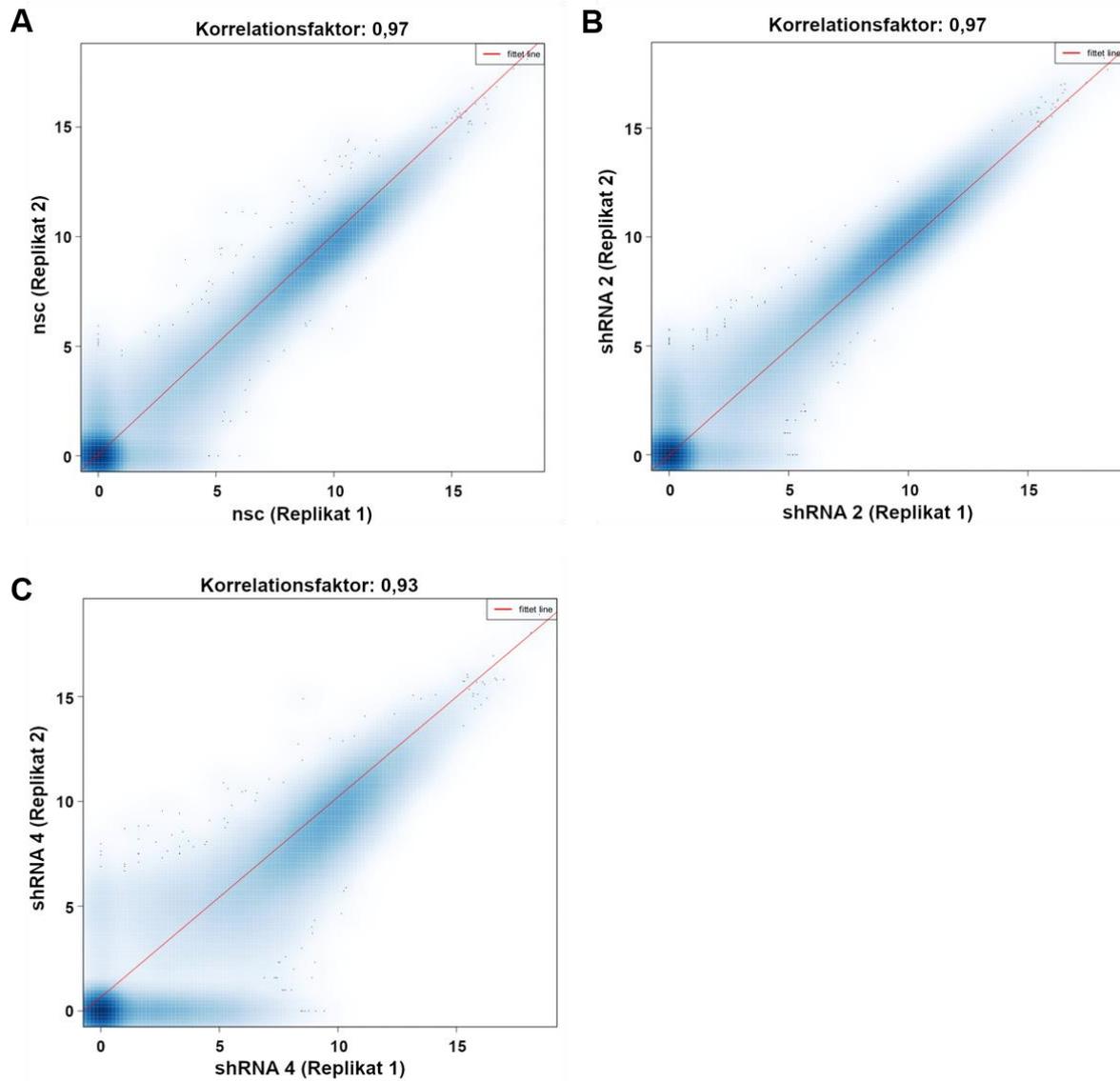


Abbildung 36: Korrelationsanalysen der im RNA-Seq verwendeten Replikate.

Für die Korrelationsanalyse wurde die Abdeckung der einzelnen Proben des RNA-Seq für alle detektierten Gene bestimmt. Diese wurde anschließend in log₂ Daten transformiert und die Korrelation zwischen den Replikaten nach Spearman berechnet. **A:** Der Korrelationsfaktor für die Replikate der nsc transduzierten HUVEC liegt bei 0,97. **B:** Der Korrelationsfaktor für die Replikate der shRNA 2 transduzierten HUVEC liegt bei 0,97. **C:** Der Korrelationsfaktor für die Replikate der shRNA 4 transduzierten HUVEC liegt bei 0,93.

Tabelle 5: GO-Analyse der im RNA-Seq signifikant hochregulierten Gene.

Biologischer Prozess	Anzahl	Gene Ratio	p-adj.	Gene
extracellular matrix organization	14	14/70	3,54×10 ⁻⁷	VCAN/HAPLN1/COL1A2/ITGB4/LRP1/COL3A1/FBLN5/FBLN1/ANTXR1/COL6A2/HAS2/ABI3BP/ITGA4/COL6A1
extracellular structure organization	14	17/70	9,87×10 ⁻⁷	VCAN/HAPLN1/COL1A2/ITGB4/LRP1/COL3A1/FBLN5/FBLN1/ANTXR1/COL6A2/HAS2/ABI3BP/ITGA4/COL6A1
cell-substrate adhesion	11	11/70	0,0001	ITGB4/LRP1/EDIL3/COL3A1/FBLN5/FBLN1/ANTXR1/HAS2/ARHGAP6/ABI3BP/ITGA4
regulation of neuron projection development	9	9/70	0,02	PLXNA4/RIMS2/LRP1/SEMA3A/IL1RAPL1/ITM2C/NDRG4/CXCL12/NEGR1
cell growth	9	9/70	0,02	PLXNA4/IGFBP3/RIMS2/SLIT3/LRP1/SEMA3A/FBLN5/CXCL12/ITGA4
blood circulation	9	9/70	0,02	COL1A2/SLC8A1/SEMA3A/SMAD7/HEY2/KCNMB1/CXCL12/PTGS1/CACNG8
circulatory system process	9	9/70	0,02	COL1A2/SLC8A1/SEMA3A/SMAD7/HEY2/KCNMB1/CXCL12/PTGS1/CACNG8
negative regulation of cell motility	8	8/80	0,01	IGFBP3/LRP1/SEMA3A/COL3A1/SMAD7/FBLN1/NDRG4/CXCL12
negative regulation of cellular component movement	8	8/70	0,01	IGFBP3/LRP1/SEMA3A/COL3A1/SMAD7/FBLN1/NDRG4/CXCL12
negative regulation of locomotion	8	8/70	0,01	IGFBP3/LRP1/SEMA3A/COL3A1/SMAD7/FBLN1/NDRG4/CXCL12
forebrain development	8	8/70	0,01	PLXNA4/SLC8A1/LRP1/SEMA3A/COL3A1/NOTCH3/EPHA5/CXCL12
regulation of cell growth	8	8/70	0,02	PLXNA4/IGFBP3/RIMS2/SLIT3/LRP1/SEMA3A/FBLN5/CXCL12
regulation of cell morphogenesis	8	8/70	0,03	PLXNA4/RIMS2/LRP1/SEMA3A/IL1RAPL1/FBLN1/CXCL12/HAS2

<i>neuron projection extension</i>	7	7/70	0,002	<i>PLXNA4/RIMS2/SLIT3/LRP1/SEMA3A/CXCL12/ITGA4</i>
<i>developmental cell growth</i>	7	7/70	0,01	<i>PLXNA4/RIMS2/SLIT3/LRP1/SEMA3A/CXCL12/ITGA4</i>
<i>developmental growth involved in morphogenesis</i>	7	7/70	0,01	<i>PLXNA4/RIMS2/SLIT3/LRP1/SEMA3A/CXCL12/ITGA4</i>
<i>telencephalon development</i>	7	7/70	0,01	<i>PLXNA4/SLC8A1/LRP1/SEMA3A/COL3A1/EPHA5/CXCL12</i>
<i>negative regulation of cell migration</i>	7	7/70	0,01	<i>IGFBP3/LRP1/SEMA3A/COL3A1/SMAD7/NDRG4/CXCL12</i>
<i>regulation of cell morphogenesis involved in differentiation</i>	7	7/70	0,01	<i>PLXNA4/LRP1/SEMA3A/IL1RAPL1/FBLN1/CXCL12/HAS2</i>
<i>negative regulation of cell development</i>	7	7/70	0,02	<i>LRP1/SEMA3A/COL3A1/PTHLH/FBLN1/ITM2C/NOTCH3</i>
<i>positive regulation of cell adhesion</i>	7	7/70	0,04	<i>EDIL3/SMAD7/CXCL12/HAS2/ABI3BP/ITGA4/IL18</i>
<i>regulation of cell-substrate adhesion</i>	6	6/70	0,02	<i>LRP1/EDIL3/FBLN1/HAS2/ARHGAP6/ABI3BP</i>
<i>axon guidance</i>	6	6/70	0,02	<i>PLXNA4/SLIT3/LRP1/SEMA3A/EPHA5/CXCL12</i>
<i>neuron projection guidance</i>	6	6/70	0,02	<i>PLXNA4/SLIT3/LRP1/SEMA3A/EPHA5/CXCL12</i>
<i>cell-matrix adhesion</i>	6	6/70	0,02	<i>ITGB4/LRP1/COL3A1/FBLN5/ARHGAP6/ITGA4</i>
<i>negative regulation of cell adhesion</i>	6	6/70	0,04	<i>LRP1/SMAD7/FBLN1/CXCL12/ARHGAP6/ARHGDIG</i>
<i>positive regulation of neuron projection development</i>	6	6/70	0,04	<i>RIMS2/LRP1/IL1RAPL1/NDRG4/CXCL12/NEGR1</i>
<i>cell junction organization</i>	6	6/70	0,05	<i>ITGB4/LRP1/CADM3/SMAD7/ARHGAP6/CADM1</i>
<i>artery morphogenesis</i>	5	5/70	0,003	<i>LRP1/COL3A1/SMAD7/NOTCH3/HEY2</i>
<i>artery development</i>	5	5/70	0,01	<i>LRP1/COL3A1/SMAD7/NOTCH3/HEY2</i>
<i>axon extension</i>	5	5/70	0,01	<i>PLXNA4/SLIT3/LRP1/SEMA3A/CXCL12</i>

<i>adherens junction organization</i>	5	5/70	0,02	<i>LRP1/CADM3/SMAD7/ARHGAP6/CADM1</i>
<i>response to glucose</i>	5	5/70	0,04	<i>SLC8A1/LRP1/COL6A2/EPHA5/SYBU</i>
<i>response to hexose</i>	5	5/70	0,04	<i>SLC8A1/LRP1/COL6A2/EPHA5/SYBU</i>
<i>response to monosaccharide</i>	5	5/70	0,04	<i>SLC8A1/LRP1/COL6A2/EPHA5/SYBU</i>
<i>axon extension involved in axon guidance</i>	4	4/70	0,001	<i>PLXNA4/SLIT3/SEMA3A/CXCL12</i>
<i>neuron projection extension involved in neuron projection guidance</i>	4	4/70	0,001	<i>PLXNA4/SLIT3/SEMA3A/CXCL12</i>
<i>extracellular matrix assembly</i>	4	4/70	0,002	<i>COL1A2/FBLN5/ANTXR1/HAS2</i>
<i>cellular response to amino acid stimulus</i>	4	4/70	0,02	<i>COL1A2/COL3A1/PDGFC/COL6A1</i>
<i>regulation of smooth muscle cell migration</i>	4	4/70	0,02	<i>IGFBP3/LRP1/NDRG4/HAS2</i>
<i>smooth muscle cell migration</i>	4	4/70	0,02	<i>IGFBP3/LRP1/NDRG4/HAS2</i>
<i>regulation of axon extension</i>	4	4/70	0,02	<i>PLXNA4/LRP1/SEMA3A/CXCL12</i>
<i>substrate adhesion-dependent cell spreading</i>	4	4/70	0,03	<i>FBLN1/ANTXR1/HAS2/ITGA4</i>
muscle cell migration	4	4/70	0,03	<i>IGFBP3/LRP1/NDRG4/HAS2</i>
<i>regulation of extent of cell growth</i>	4	4/70	0,03	<i>PLXNA4/LRP1/SEMA3A/CXCL12</i>
<i>response to amino acid</i>	4	4/70	0,04	<i>COL1A2/COL3A1/PDGFC/COL6A1</i>
<i>cell recognition</i>	4	4/70	0,05	<i>VCAN/SEMA3A/TUB/CADM1</i>
<i>protein heterotrimerization</i>	3	3/70	0,004	<i>COL1A2/COL6A2/COL6A1</i>
<i>regulation of axon extension involved in axon guidance</i>	3	3/70	0,005	<i>PLXNA4/SEMA3A/CXCL12</i>
<i>regulation of axon guidance</i>	3	3/70	0,01	<i>PLXNA4/SEMA3A/CXCL12</i>
<i>negative regulation of smooth muscle cell migration</i>	3	3/70	0,02	<i>IGFBP3/LRP1/NDRG4</i>
<i>heterophilic cell-cell adhesion via plasma</i>	3	3/70	0,02	<i>CADM3/IL1RAPL1/CADM1</i>

<i>membrane cell adhesion molecules</i>				
<i>aorta morphogenesis</i>	3	3/70	0,02	<i>LRP1/COL3A1/HEY2</i>
<i>presynapse assembly</i>	3	3/70	0,03	<i>PCDH17/CBLN2/IL1RAPL1</i>
<i>regulation of extracellular matrix organization</i>	3	3/70	0,03	<i>LRP1/ANTXR1/HAS2</i>
<i>presynapse organization</i>	3	3/70	0,03	<i>PCDH17/CBLN2/IL1RAPL1</i>
<i>chemokine-mediated signaling pathway</i>	3	3/70	0,03	<i>SLIT3/CXCL12/ACKR1</i>
<i>ventricular septum morphogenesis</i>	3	3/70	0,04	<i>SLIT3/SMAD7/HEY2</i>
<i>protein trimerization</i>	3	3/70	0,04	<i>COL1A2/COL6A2/COL6A1</i>
<i>response to chemokine</i>	3	3/70	0,04	<i>SLIT3/CXCL12/ACKR1</i>
<i>cellular response to chemokine</i>	3	3/70	0,04	<i>SLIT3/CXCL12/ACKR1</i>
<i>regulation of insulin secretion involved in cellular response to glucose stimulus</i>	3	3/70	0,05	<i>LRP1/EPHA5/SYBU</i>
<i>regulation of extracellular matrix assembly</i>	2	2/70	0,04	<i>ANTXR1/HAS2</i>
<i>facial nerve development</i>	2	2/70	0,04	<i>PLXNA4/SEMA3A</i>
<i>facial nerve morphogenesis</i>	2	2/70	0,04	<i>PLXNA4/SEMA3A</i>
<i>negative regulation of platelet-derived growth factor receptor signaling pathway</i>	2	2/70	0,05	<i>LRP1/NDRG4</i>

Enriched GO-Analyse aller 70 im RNA-Seq (shRNA vs nsc) signifikant hochregulierten Genen (p-adj. < 0,05; FC > 2). Angegeben sind alle 66 biologische Prozesse, denen die Gene zugeordnet werden konnten. Gelb hinterlegt sind die Prozesse, die endothelspezifisch sind oder mit der Dedifferenzierung assoziiert werden können und in der *Dotplot* Abbildung 23 grafisch dargestellt sind. Zusätzlich sind die Anzahl, die *Gene Ratio* (Anzahl/Mengengröße) und der p-adj.-Wert angegeben.

Tabelle 6:GO-Analyse der im RNA-Seq signifikant herunterregulierten Gene.

Biologischer Prozess	Anzahl	Gene Ratio	p-adj.	Gene
angiogenesis	17	17/63	1,43×10 ⁻⁸	RASIP1/RAMP2/FLT4/ PPP1R16B/IL1A/NPR1/ CEACAM1/CD34/CD40/EFNA1/ JUP/TNFAIP2/NOTCH4/DLL4/ DYSF/VASH1/SOX18
regulation of angiogenesis	11	11/63	1,79×10 ⁻⁵	RAMP2/PPP1R16B/IL1A/NPR1/ CEACAM1/CD34/CD40/EFNA1/ JUP/DLL4/VASH1
regulation of vasculature development	11	11/63	3,85×10 ⁻⁵	RAMP2/PPP1R16B/IL1A/NPR1/ CEACAM1/CD34/CD40/EFNA1/ JUP/DLL4/VASH1
ameboidal-type cell migration	10	10/63	0,0008	PRR5L/FLT4/CEACAM1/CD40/ ARHGAP4/EFNA1/JUP/DLL4/ VASH1/SOX18
wound healing	9	9/63	0,01	ARRB1/PLAU/IL1A/CEACAM1/ CD34/CD40/CCM2L/NOTCH4/ DYSF
epithelial cell differentiation	9	9/63	0,02	PDE2A/PPP1R16B/MYO7A/ CEACAM1/CD34/JUP/NOTCH4/ SOX18/CLDN5
endothelium development	8	8/63	1,79×10 ⁻⁵	PDE2A/PPP1R16B/CEACAM1/ CD34/NOTCH4/DLL4/SOX18/ CLDN5
endothelial cell migration	8	8/63	0,001	FLT4/CEACAM1/CD40/EFNA1/ JUP/DLL4/VASH1/SOX18
epithelial cell migration	8	8/63	0,003	FLT4/CEACAM1/CD40/EFNA1/ JUP/DLL4/VASH1/SOX18
epithelium migration	8	8/63	0,003	FLT4/CEACAM1/CD40/EFNA1/ JUP/DLL4/VASH1/SOX18
tissue migration	8	8/63	0,003	FLT4/CEACAM1/CD40/EFNA1/ JUP/DLL4/VASH1/SOX18
regulation of endothelial cell migration	7	7/63	0,001	FLT4/CEACAM1/CD40/EFNA1/ JUP/DLL4/VASH1
positive regulation of vasculature development	7	7/63	0,002	RAMP2/PPP1R16B/IL1A/ CEACAM1/CD34/CD40/JUP
regulation of epithelial cell migration	7	7/63	0,004	FLT4/CEACAM1/CD40/EFNA1/ JUP/DLL4/VASH1
epithelial cell proliferation	7	7/63	0,04	FLT4/PPP1R16B/CEACAM1/ CD34/DLL4/DYSF/VASH1

regulation of cell growth	7	7/63	0,04	KIF26A/CCDC85B/SEMA3G/ NPR1/CEACAM1/FAM107A/ ARHGAP4
vasculogenesis	6	6/63	0,0003	JUNB/RASIP1/RAMP2/ CEACAM1/CD34/SOX18
endothelial cell differentiation	6	6/63	0,001	PDE2A/PPP1R16B/CEACAM1/ NOTCH4/SOX18/CLDN5
blood vessel endothelial cell migration	6	6/63	0,002	CD40/EFNA1/JUP/DLL4/VASH1/ SOX18
endothelial cell proliferation	6	6/63	0,003	FLT4/PPP1R16B/CD34/DLL4/ DYSF/VASH1
positive regulation of angiogenesis	6	6/63	0,005	RAMP2/PPP1R16B/IL1A/CD34/ CD40/JUP
epithelial cell development	6	6/63	0,01	PDE2A/PPP1R16B/MYO7A/ NOTCH4/SOX18/CLDN5
endothelial cell development	5	5/63	0,001	PDE2A/PPP1R16B/NOTCH4/ SOX18/CLDN5
regulation of blood vessel endothelial cell migration	5	5/63	0,004	CD40/EFNA1/JUP/DLL4/VASH1
sprouting angiogenesis	5	5/63	0,01	RAMP2/FLT4/PPP1R16B/ CEACAM1/DLL4
regulation of endothelial cell proliferation	5	5/63	0,01	FLT4/PPP1R16B/DLL4/DYSF/ VASH1
Rho protein signal transduction	5	5/63	0,02	RASIP1/ARRB1/ARHGEF17/ ARHGAP4/PLEKHG1
regulation of vascular permeability	4	4/63	0,002	PDE2A/RAMP2/NPR1/ CEACAM1
establishment of endothelial barrier	4	4/63	0,003	PDE2A/PPP1R16B/SOX18/ CLDN5
regulation of Notch signaling pathway	4	4/63	0,03	ARRB1/NRARP/NOTCH4/DLL4
regulation of phosphatidylinositol 3- kinase signaling	4	4/63	0,05	PRR5L/PPP1R16B/CEACAM1/ IER3
negative regulation of vascular permeability	3	3/63	0,003	PDE2A/RAMP2/CEACAM1
regulation of vasculogenesis	3	3/63	0,003	RAMP2/CEACAM1/CD34
lymphangiogenesis	3	3/63	0,003	FLT4/VASH1/SOX18
lymph vessel morphogenesis	3	3/63	0,004	FLT4/VASH1/SOX18

<i>lymph vessel development</i>	3	3/63	0,01	<i>FLT4/VASH1/SOX18</i>
<i>regulation of endothelial cell differentiation</i>	3	3/63	0,02	<i>CEACAM1/NOTCH4/CLDN5</i>
<i>negative regulation of blood vessel endothelial cell migration</i>	3	3/63	0,02	<i>JUP/DLL4/VASH1</i>
<i>negative regulation of Notch signaling pathway</i>	3	3/63	0,02	<i>ARRB1/NRARP/DLL4</i>
<i>blood vessel remodeling</i>	3	3/63	0,03	<i>FLT4/CEACAM1/DLL4</i>
<i>labyrinthine layer development</i>	3	3/63	0,04	<i>JUNB/PCDH12/VASH1</i>
<i>negative regulation of blood coagulation</i>	3	3/63	0,04	<i>PLAU/CEACAM1/CD34</i>
<i>negative regulation of hemostasis</i>	3	3/63	0,04	<i>PLAU/CEACAM1/CD34</i>
<i>negative regulation of coagulation</i>	3	3/63	0,04	<i>PLAU/CEACAM1/CD34</i>
<i>regulation of granulocyte differentiation</i>	2	2/63	0,05	<i>ZBTB46/CEACAM1</i>
<i>cGMP metabolic process</i>	2	2/63	0,05	<i>PDE2A/NPR1</i>

Enriched GO-Analyse aller 63 im RNA-Seq (shRNA vs nsc) signifikant herunterregulierten Gene (p-adj. < 0,05; FC < -2). Angegeben sind alle 46 biologische Prozesse, denen die Gene zugeordnet werden konnten. Gelb hinterlegt sind die Prozesse, die endothelspezifisch sind oder mit der Dedifferenzierung assoziiert werden können und in der *Dotplot* Abbildung 24 grafisch dargestellt sind. Zusätzlich sind die Anzahl, die *Gene Ratio* (Anzahl/Mengengröße) und der p-adj.-Wert angegeben.

Tabelle 7: Der *KMT2D* Knockdown induziert eine verstärkte Zellinvasion bei gleichbleibender Migration.

Absolute Werte der einzelnen Migrations- und Invasionsexperimente.

Experiment	Anzahl ausgesäeter Zellen	Anzahl an migrierten Zellen				Anzahl an invasiven Zellen			
		HUVEC	nsc	shRNA 1	shRNA 2	HUVEC	nsc	shRNA 1	shRNA 2
1	5.000	774	681	707	1.413	39	162	101	571
2	5.000	759	694	761	675	169	121	296	459
3	5.000	211	131	248	238	24	12	66	53
4	5.000	721	616	646	829	113	96	193	170
5	5.000	359	282	349	421	86	69	198	187

Literaturverzeichnis

- Abrahimi, P., Chang, W.G., Kluger, M.S., Qyang, Y., Tellides, G., Saltzman, W.M., and Pober, J.S. (2015). Efficient gene disruption in cultured primary human endothelial cells by CRISPR/Cas9. *Circ. Res.* 117, 121–128.
- Barrangou, R., and Doudna, J.A. (2016). Applications of CRISPR technologies in research and beyond. *Nat. Biotechnol.* 34, 933–941.
- Bianchi-Smiraglia, A., Paesante, S., and Bakin, A. V. (2013). Integrin $\beta 5$ contributes to the tumorigenic potential of breast cancer cells through the Src-FAK and MEK-ERK signaling pathways. *Oncogene* 32, 3049–3058.
- Borowicz, S., Van Scoyk, M., Avasarala, S., Karuppusamy Rathinam, M.K., Tauler, J., Bikkavilli, R.K., and Winn, R.A. (2014). The Soft Agar Colony Formation Assay. *J. Vis. Exp.* 1–6.
- Buenrostro, J., Wu, B., Chang, H., and Greenleaf, W. (2016). ATAC-seq method. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2015, 1–10.
- Butany, J., Nair, V., Naseemuddin, A., Nair, G.M., Catton, C., and Yau, T. (2005). Cardiac tumours: diagnosis and management. *Lancet Oncol.* 6, 219–228.
- Calderwood, D.A. (2004). Integrin activation. *J. Cell Sci.* 117, 657–666.
- Calderwood, D.A., Shattil, S.J., and Ginsberg, M.H. (2000). Integrins and actin filaments: Reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J. Biol. Chem.* 275, 22607–22610.
- Campbell, N.A., and Reece, J.B. (2009). *Biologie*.
- Chen, H.-C., Appeddu, P.A., Isoda, H., and Guan, J.-L. (1996). Phosphorylation of Tyrosine 397 in Focal Adhesion Kinase Is Required for Binding Phosphatidylinositol 3-Kinase. *J. Biol. Chem.* 271, 26329–26334.
- Chen, T.W.-W., Loong, H.H., Srikanthan, A., Zer, A., Barua, R., Butany, J., Cusimano, R.J., Liang, Y.-C., Chang, C.-H., Iakobishvili, Z., et al. (2019). Primary cardiac sarcomas: A multi-national retrospective review. *Cancer Med.* 8, 104–110.
- Ciobanasu, C., Wang, H., Henriot, V., Mathieu, C., Fente, A., Csillag, S., Vigouroux, C., Faivre, B., and Le Clainche, C. (2018). Integrin-bound talin head inhibits actin filament barbed-end elongation. *J. Biol. Chem.* 293, 2586–2596.

- Coindre, J.-M., Terrier, P., Guillou, L., Le Doussal, V., Collin, F., Ranchère, D., Sastre, X., Vilain, M.-O., Bonichon, F., and N'Guyen Bui, B. (2001). Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas. *Cancer* 91, 1914–1926.
- Cormier, J.N., and Pollock, R.E. (2004). Soft Tissue Sarcomas. *CA. Cancer J. Clin.* 54, 94–109.
- Dawkins, J.B.N., Wang, J., Maniati, E., Heward, J.A., Koniali, L., Kocher, H.M., Martin, S.A., Chelala, C., Balkwill, F.R., Fitzgibbon, J., et al. (2016). Reduced Expression of Histone Methyltransferases KMT2C and KMT2D Correlates with Improved Outcome in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancer Res.* 76, 4861–4871.
- Debyser, Z. (2003). Biosafety of Lentiviral Vectors. *Curr. Gene Ther.* 3, 517–525.
- Emsley, J., Knight, C.G., Farndale, R.W., Barnes, M.J., and Liddington, R.C. (2000). Structural basis of collagen recognition by integrin alpha2beta1 [In Process Citation]. *Cell* 101, 47–56.
- Ernst, P., and Vakoc, C.R. (2012). WRAD: Enabler of the SET1-family of H3K4 methyltransferases. *Brief. Funct. Genomics* 11, 217–226.
- Faulstich, H., Bautz, F.A., Deboen, A., Wieland, T., and Wulf, E. (2006). Fluorescent phalloxin, a tool for the visualization of cellular actin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4498–4502.
- Fletcher, C.D.M., Unni, K.K., and Mertens, F. (2002). Pathology and Genetics of Tumours of Soft Tissue and Bone.
- Fontijn, R.D., Volger, O.L., Fledderus, J.O., Reijerkerk, A., de Vries, H.E., and Horrevoets, A.J.G. (2008). SOX-18 controls endothelial-specific claudin-5 gene expression and barrier function. *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 294, H891–H900.
- Ford, D.J., and Dingwall, A.K. (2015). The cancer COMPASS: navigating the functions of MLL complexes in cancer. *Cancer Genet.* 208, 178–191.
- Froimchuk, E., Jang, Y., and Ge, K. (2017). Histone H3 lysine 4 methyltransferase KMT2D. *Gene* 627, 337–342.
- Garcia, J.M., Gonzalez, R., Silva, J.M., Dominguez, G., Vegazo, I.S., Gamallo, C., Provencio, M., España, P., and Bonilla, F. (2000). Mutational status of K- ras and TP53 genes in primary sarcomas of the heart. *Br. J. Cancer* 82, 1183–1185.

- Ge, Y., Ro, J.Y., Kim, D., Kim, C.H., Reardon, M.J., Blackmon, S., Zhai, J., Coffey, D., Benjamin, R.S., and Ayala, A.G. (2011). Clinicopathologic and immunohistochemical characteristics of adult primary cardiac angiosarcomas: Analysis of 10 cases. *Ann. Diagn. Pathol.* *15*, 262–267.
- Gilles, C., Birembaut, P., Clavel, C., Polette, M., and Nawrocki-Raby, B. (2004). Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* *49*, 179–186.
- Gong, H., Liu, M., Klomp, J., Merrill, B.J., and Rehman, J. (2017). Method for Dual Viral Vector Mediated CRISPR-Cas9 Gene Disruption in Primary Human Endothelial Cells. *Nat. Publ. Gr.* 1–9.
- Gottlieb, R., Serang, R., Chi, D., and Menco, H. (2012). Stewart-Treves syndrome. *Radiol. Case Reports* *7*, 693.
- Guo, C., Chang, C.-C., Wortham, M., Chen, L.H., Kernagis, D.N., Qin, X., Cho, Y.-W., Chi, J.-T., Grant, G.A., McLendon, R.E., et al. (2012). Global identification of MLL2-targeted loci reveals MLL2's role in diverse signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 17603–17608.
- Guo, C., Chen, L.H., Huang, Y., Chang, C.-C., Wang, P., Pirozzi, C.J., Qin, X., Bao, X., Greer, P.K., McLendon, R.E., et al. (2013). KMT2D maintains neoplastic cell proliferation and global histone H3 lysine 4 monomethylation. *Oncotarget* *4*.
- Harburger, D.S., and Calderwood, D.A. (2009). Integrin signalling at a glance. *J. Cell Sci.* *122*, 159–163.
- Hayashido, Y., Kitano, H., Sakaue, T., Fujii, T., Suematsu, M., Sakurai, S., and Okamoto, T. (2014). Overexpression of integrin α v facilitates proliferation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via mek/erk signaling pathway that is activated by interaction of integrin α v β 8 with type I collagen. *Int. J. Oncol.* *45*, 1875–1882.
- Hehlgans, S., Haase, M., and Cordes, N. (2007). Signalling via integrins: Implications for cell survival and anticancer strategies. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* *1775*, 163–180.
- Heid, C. a, Stevens, J., Livak, K.J., and Williams, P.M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res.* *6*, 986–994.
- Hirbe, A.C., and Gutmann, D.H. (2014). Neurofibromatosis type 1: a multidisciplinary approach to care. *Lancet Neurol.* *13*, 834–843.
- Huang, S.-C., Zhang, L., Sung, Y.-S., Chen, C.-L., Kao, Y.-C., Agaram, N.P., Singer, S., Tap, W.D., D'Angelo, S., and Antonescu, C.R. (2016). Recurrent CIC Gene Abnormalities in Angiosarcomas. *Am. J. Surg. Pathol.* *40*, 645–655.

- Huttenlocher, A., Ginsberg, M.H., and Horwitz, A.F. (1996). Modulation of cell migration by integrin-mediated cytoskeletal linkages and ligand-binding affinity. *J. Cell Biol.* *134*, 1551–1562.
- Hynes, R.O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* *110*, 673–687.
- Issaeva, I., Zonis, Y., Rozovskaia, T., Orlovsky, K., Croce, C.M., Nakamura, T., Mazo, A., Eisenbach, L., and Canaani, E. (2007). Knockdown of ALR (MLL2) Reveals ALR Target Genes and Leads to Alterations in Cell Adhesion and Growth. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 1889–1903.
- Ivanova, A. V., Goparaju, C.M.V., Ivanov, S. V., Nonaka, D., Cruz, C., Beck, A., Lonardo, F., Wali, A., and Pass, H.I. (2009). Protumorigenic Role of HAPLN1 and Its IgV Domain in Malignant Pleural Mesothelioma. *Clin. Cancer Res.* *15*, 2602–2611.
- Jang, Y., Wang, C., Zhuang, L., Liu, C., and Ge, K. (2017). H3K4 Methyltransferase Activity Is Required for MLL4 Protein Stability. *J. Mol. Biol.* *429*, 2046–2054.
- Janiszewska, M., Primi, M.C., and Izzard, T. (2020). Cell adhesion in cancer: Beyond the migration of single cells. *J. Biol. Chem.* jbc.REV119.007759.
- Jiang, K., Liu, H., Xie, D., and Xiao, Q. (2019). Differentially expressed genes ASPN, COL1A1, FN1, VCAN and MUC5AC are potential prognostic biomarkers for gastric cancer. *Oncol. Lett.* *17*, 3191–3202.
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2012). A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* (80-.). *337*, 816–821.
- Johnsen, J.M., Nickerson, D.A., and Reiner, A.P. (2013). Massively parallel sequencing: the new frontier of hematologic genomics. *Blood* *122*, 3268–3275.
- Kantidakis, T., Saponaro, M., Mitter, R., Horswell, S., Kranz, A., Boeing, S., Aygün, O., Kelly, G.P., Matthews, N., Stewart, A., et al. (2016). Mutation of cancer driver MLL2 results in transcription stress and genome instability. *Genes Dev.* *30*, 408–420.
- Kooi, I.E., Mol, B.M., Massink, M.P.G., Ameziane, N., Meijers-Heijboer, H., Dommering, C.J., van Mil, S.E., de Vries, Y., van der Hout, A.H., Kaspers, G.J.L., et al. (2016). Somatic genomic alterations in retinoblastoma beyond RB1 are rare and limited to copy number changes. *Sci. Rep.* *6*, 25264.
- Kunze, K. (2014). Molekularpathologische Untersuchung primärer kardialer Angiosarkome.

- Kunze, K., Spieker, T., Gamedinger, U., Nau, K., Berger, J., Dreyer, T., Sindermann, J.R., Hoffmeier, A., Gattenlöhner, S., and Bräuninger, A. (2014). A recurrent activating PLCG1 mutation in cardiac angiosarcomas increases apoptosis resistance and invasiveness of endothelial cells. *Cancer Res.* *74*, 6173–6183.
- Lawson, C., Lim, S.T., Uryu, S., Chen, X.L., Calderwood, D.A., and Schlaepfer, D.D. (2012). FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *J. Cell Biol.* *196*, 223–232.
- Leduc, C., Jenkins, S.M., Sukov, W.R., Rustin, J.G., and Maleszewski, J.J. (2017). Cardiac angiosarcoma: histopathologic, immunohistochemical, and cytogenetic analysis of 10 cases. *Hum. Pathol.* *60*, 199–207.
- Lefebvre, V., Dumitriu, B., Penzo-Méndez, A., Han, Y., and Pallavi, B. (2007). Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *39*, 2195–2214.
- Legate, K.R., Wickstrom, S.A., and Fassler, R. (2009). Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev.* *23*, 397–418.
- Lewis, J.J., and Brennan, M.F. (1996). Soft tissue sarcomas. *Curr. Probl. Surg.* *33*, 817–872.
- Lohr, J.G., Stojanov, P., Lawrence, M.S., Auclair, D., Chapuy, B., Sougnez, C., Cruz-Gordillo, P., Knoechel, B., Asmann, Y.W., Slager, S.L., et al. (2012). Discovery and prioritization of somatic mutations in diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) by whole-exome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *109*, 3879–3884.
- Look Hong, N.J., Pandalai, P.K., Hornick, J.L., Shekar, P.S., Harmon, D.C., Chen, Y.L., Butrynski, J.E., Baldini, E.H., and Raut, C.P. (2012). Cardiac angiosarcoma management and outcomes: 20-year single-institution experience. *Ann. Surg. Oncol.* *19*, 2707–2715.
- Ma, H., Wu, Y., Dang, Y., Choi, J.-G., Zhang, J., and Wu, H. (2014). Pol III Promoters to Express Small RNAs: Delineation of Transcription Initiation. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* *3*, e161.
- Mardis, E.R. (2008). The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet.* *24*, 133–141.
- Matsumoto, K., Shionyu, M., Go, M., Shimizu, K., Shinomura, T., Kimata, K., and Watanabe, H. (2003). Distinct Interaction of Versican/Pg-M with Hyaluronan and Link Protein. *J. Biol. Chem.* *278*, 41205–41212.

Morin, R.D., Mendez-Lago, M., Mungall, A.J., Goya, R., Mungall, K.L., Corbett, R.D., Johnson, N.A., Severson, T.M., Chiu, R., Field, M., et al. (2011). Frequent mutation of histone-modifying genes in non-Hodgkin lymphoma. *Nature* 476, 298–303.

Murgia, R.D., and Gross, G.P. (2019). Stewart-Treves Syndrome.

Naba, A., Clauser, K.R., Hoersch, S., Liu, H., Carr, S.A., and Hynes, R.O. (2012). The Matrisome: In Silico Definition and In Vivo Characterization by Proteomics of Normal and Tumor Extracellular Matrices. *Mol. Cell. Proteomics* 11, M111.014647.

Naka, N., Tomita, Y., Nakamshi, H., Araki, N., Hongyo, T., Ochi, T., and Aozasa, K. (1997). Mutations of p53 tumor-suppressor gene in angiosarcoma. *Int. J. Cancer* 71, 952–955.

Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F.H., Verma, I.M., and Trono, D. (1996a). In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. *Science* (80-.). 272, 263–267.

Naldini, L., Blomer, U., Gage, F.H., Trono, D., and Verma, I.M. (1996b). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 11382–11388.

Oh, S.J., Yeom, S.Y., and Kim, K.-H. (2013). Clinical implication of surgical resection for the rare cardiac tumors involving heart and great vessels. *J. Korean Med. Sci.* 28, 717–724.

Paquet, D., Kwart, D., Chen, A., Sproul, A., Jacob, S., Teo, S., Olsen, K.M., Gregg, A., Noggle, S., and Tessier-Lavigne, M. (2016). Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature* 533, 125–129.

Pasqualucci, L., Trifonov, V., Fabbri, G., Ma, J., Rossi, D., Chiarenza, A., Wells, V.A., Grunn, A., Messina, M., Elliot, O., et al. (2011). Analysis of the coding genome of diffuse large B-cell lymphoma. *Nat. Genet.* 43, 830–837.

Patel, S.D., Peterson, A., Bartczak, A., Lee, S., Chojnowski, S., Gajewski, P., and Loukas, M. (2014). Primary cardiac angiosarcoma – a review. *Med. Sci. Monit.* 20, 103–109.

Penel, N., Grosjean, J., Robin, Y.M., Vanseymortier, L., Clisant, S., and Adenis, A. (2008). Frequency of certain established risk factors in soft tissue sarcomas in adults: A prospective descriptive study of 658 cases. *Sarcoma* 2008.

Penel, N., Marréaud, S., Robin, Y.M., and Hohenberger, P. (2011). Angiosarcoma: State of the art and perspectives. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 80, 257–263.

Pennacchioli, E., Tosti, G., Barberis, M., De Pas, T.M., Verrecchia, F., Menicanti, C., Testori, A., and Mazzarol, G. (2012). Sarcoma spreads primarily through the vascular system: are there biomarkers associated with vascular spread? *Clin. Exp. Metastasis* 29, 757–773.

Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* 29, e45.

Prokopchuk, O., Andres, S., Becker, K., Holzapfel, K., Hartmann, D., and Friess, H. (2016). Maffucci syndrome and neoplasms: a case report and review of the literature. *BMC Res. Notes* 9, 126.

Qian, C.-J., Chen, Y.-Y., Zhang, X., Liu, F.-Q., Yue, T.-T., Ye, B., and Yao, J. (2016). Notch4 inhibition reduces migration and invasion and enhances sensitivity to docetaxel by inhibiting Akt/fascin in pancreatic cancer cells. *Oncol. Lett.* 12, 3499–3505.

Rahmani, M., Wong, B.W., Ang, L., Cheung, C.C., Carthy, J.M., Walinski, H., and McManus, B.M. (2006). Versican: signaling to transcriptional control pathways This paper is one of a selection of papers published in this Special Issue, entitled Young Investigator's Forum. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 84, 77–92.

Rao, R.C., and Dou, Y. (2015). Hijacked in cancer: the KMT2 (MLL) family of methyltransferases. *Nat Rev Cancer* 15, 334–346.

Roberts, P.J., and Der, C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26, 3291–3310.

Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., and Wysocka, J. (2007). Methylation of Lysine 4 on Histone H3: Intricacy of Writing and Reading a Single Epigenetic Mark. *Mol. Cell* 25, 15–30.

Schlaepfer, D.D., Mitra, S.K., and Ilic, D. (2004). Control of motile and invasive cell phenotypes by focal adhesion kinase. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1692, 77–102.

Shaheen, N.L., Kataria, E., Antony, J., Galvan, D., Ballou, Y., and Bryan, B.A. (2017). Extracellular matrix composition modulates angiosarcoma cell attachment and proliferation. *Oncoscience* 4.

Shibuya, M. (2013). Vascular endothelial growth factor and its receptor system: Physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases. *J. Biochem.* 153, 13–19.

Shimozono, N., Jinnin, M., Masuzawa, M., Masuzawa, M., Wang, Z., Hirano, A., Tomizawa, Y., Etoh-Kira, T., Kajihara, I., Harada, M., et al. (2015). NUP160-SLC43A3 Is a novel recurrent fusion oncogene in angiosarcoma. *Cancer Res.* 75, 4458–4465.

Siontis, B.L., Zhao, L., Leja, M., McHugh, J.B., Shango, M.M., Baker, L.H., Schuetze, S.M., and Chugh, R. (2019). Primary Cardiac Sarcoma: A Rare, Aggressive Malignancy with a High Propensity for Brain Metastases. *Sarcoma* 2019, 1–6.

Spicer, A.P., Joo, A., and Bowling, R.A. (2003). A Hyaluronan Binding Link Protein Gene Family Whose Members Are Physically Linked Adjacent to Chondroitin Sulfate Proteoglycan Core Protein Genes. *J. Biol. Chem.* 278, 21083–21091.

Steinestel, K., Trautmann, M., Jansen, E., Dirksen, U., Rehkämper, J., Mikesch, J., Gerke, J.S., Orth, M.F., Sannino, G., Arteaga, M., et al. (2019). Focal adhesion kinase confers pro-migratory and antiapoptotic properties and is a potential therapeutic target in Ewing sarcoma. *Mol. Oncol.* 15, 1878-0261.12610.

Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C., and Doudna, J.A. (2014). DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature* 507, 62–67.

Sulzmaier, F.J., Jean, C., and Schlaepfer, D.D. (2014). FAK in cancer: Mechanistic findings and clinical applications. *Nat. Rev. Cancer* 14, 598–610.

Sun, P., Wu, T., Sun, X., Cui, Z., Zhang, H., Xia, Q., and Zhang, D. (2019). KMT2D inhibits the growth and metastasis of bladder Cancer cells by maintaining the tumor suppressor genes. *Biomed. Pharmacother.* 115, 108924.

Swarts, D.C., Mosterd, C., van Passel, M.W.J., and Brouns, S.J.J. (2012). CRISPR Interference Directs Strand Specific Spacer Acquisition. *PLoS One* 7, e35888.

Terns, M.P., and Terns, R.M. (2011). CRISPR-based adaptive immune systems. *Curr. Opin. Microbiol.* 14, 321–327.

Thiemann, F., Cullen, P.M., and Klein, H.-G. (2014). *Molekulare Diagnostik: Grundlagen der Molekularbiologie, Genetik und Analytik.*

Timur, A.A., Driscoll, D.J., and Wang, Q. (2005). Biomedicine and diseases: the Klippel-Trenaunay syndrome, vascular anomalies and vascular morphogenesis. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 1434–1447.

Vahidnezhad, H., Youssefian, L., and Uitto, J. (2016). Klippel-Trenaunay syndrome belongs to the PIK3CA -related overgrowth spectrum (PROS). *Exp. Dermatol.* 25, 17–19.

Wang, G., Wei, Z., Jia, H., Zhao, W., Yang, G., and Zhao, H. (2015). Knockdown of SOX18 inhibits the proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma cells. *Oncol. Rep.* 34, 1121–1128.

- Wang, T., Wei, J.J., Sabatini, D.M., and Lander, E.S. (2014). Genetic Screens in Human Cells Using the CRISPR-Cas9 System. *Science* (80-.). 343, 80–84.
- Weidema, M.E., Versleijen-Jonkers, Y.M.H., Flucke, U.E., Desar, I.M.E., and van der Graaf, W.T.A. (2019). Targeting angiosarcomas of the soft tissues: A challenging effort in a heterogeneous and rare disease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 138, 120–131.
- Williams, C.K., Li, J.L., Murga, M., Harris, A.L., and Tosato, G. (2006). Up-regulation of the Notch ligand Delta-like 4 inhibits VEGF-induced endothelial cell function. *Blood* 107, 931–939.
- Wong, M.L., and Medrano, J.F. (2005). Real-time PCR for mRNA quantitation. *Biotechniques* 39, 75–85.
- Wu, Y., Chen, L., Zheng, P.S., and Yang, B.B. (2002). β 1-integrin-mediated glioma cell adhesion and free radical-induced apoptosis are regulated by binding to a C-terminal domain of PG-M/versican. *J. Biol. Chem.* 277, 12294–12301.
- Wu, Y.J., La Pierre, D.P., Wu, J., Yee, A.J., and Yang, B.B. (2005). The interaction of versican with its binding partners. *Cell Res.* 15, 483–494.
- Xiong, W., Deng, Z., Tang, Y., Deng, Z., and Li, M. (2018). Downregulation of KMT2D suppresses proliferation and induces apoptosis of gastric cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 504, 129–136.
- Xu, Y., Zhang, Q., Zhou, J., Li, Z., Guo, J., Wang, W., and Wang, W. (2019). Down-regulation of SOX18 inhibits laryngeal carcinoma cell proliferation, migration, and invasion through JAK2/STAT3 signaling. *Biosci. Rep.* 39, BSR20182480.
- Yang, L., Wang, L., Yang, Z., Jin, H., Zou, Q., Zhan, Q., Tang, Y., Tao, Y., Lei, L., Jing, Y., et al. (2019). Up-regulation of EMT-related gene VCAN by NPM1 mutant-driven TGF- β /cPML signalling promotes leukemia cell invasion. *J. Cancer* 10, 6570–6583.
- Young, R.J., Brown, N.J., Reed, M.W., Hughes, D., and Woll, P.J. (2010). Angiosarcoma. *Lancet Oncol.* 11, 983–991.
- Zhang, W., and Liu, H.T. (2002). MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Res.* 12, 9–18.
- Zhang, J., Dominguez-Sola, D., Hussein, S., Lee, J.E., Holmes, A.B., Bansal, M., Vlasevska, S., Mo, T., Tang, H., Basso, K., et al. (2015). Disruption of KMT2D perturbs germinal center B cell development and promotes lymphomagenesis. *Nat. Med.* 21, 1190–1198.

Zietz, C., Rössle, M., Haas, C., Sendelhofert, A., Hirschmann, A., Stürzl, M., and Löhrs, U. (1998). MDM-2 oncoprotein overexpression, p53 gene mutation, and VEGF up-regulation in angiosarcomas. *Am. J. Pathol.* *153*, 1425–1433.

Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L., and Trono, D. (1997). Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat. Biotechnol.* *15*, 871–875.

Zufferey, R., Dull, T., Mandel, R.J., Bukovsky, A., Quiroz, D., Naldini, L., and Trono, D. (1998). Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J. Virol.* *72*, 9873–9880.

Danksagung

Diese Danksagung gilt allen, die mich während meiner Promotion begleitet und unterstützt haben.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Bräuninger, der es mir ermöglichte, meine Promotion am Institut für Pathologie zu absolvieren, für die Bereitstellung des interessanten Themas und für die stetige Betreuung und Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Prof. Dr. Dammann danke ich für die Funktion als Erstgutachter und für die Übernahme der externen Betreuung durch den Fachbereich Biologie.

Mein Dank geht auch an Frau Prof. Dr. Trenczek und Herrn Prof. Dr. Menke für die Teilnahme an meiner Disputation als Prüfer.

Besonders danke ich der gesamten Arbeitsgruppe der Molekularpathologie und der Zytogenetik für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die immer erhaltende Hilfe während meiner Arbeit. Aber auch für das stets offene Ohr und den vielen großartigen Momenten mit euch. Danke Kristin für die Einarbeitung und die stetige Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Theresa möchte ich dafür danken, dass sie mir die Bioinformatik nähergebracht hat und mich jederzeit in der Auswertung tatkräftig unterstützt hat.

Ich danke Alex und Uli für die Hilfe bei den Zellfärbungen und die Unterstützung am Mikroskop sowie der immer bereitgehaltenen Hilfe.

Herrn Prof. Dr. Acker und seiner gesamten Arbeitsgruppe danke ich für die Ermöglichung meiner S2 Arbeiten und den bereitgestellten Mitteln. Dabei danke ich besonders Sascha, Nuray, Sabine und Nadja die mich im Labor und bei allen Fragen tatkräftig unterstützt haben.

Außerdem danke ich Tobias für die bioinformatische Auswertung meiner RNA- und ATAC-Seq Daten und Stefan für die Durchführung des RNA-Seq.

Mein herzlichster Dank geht an Tilman, an meine Eltern sowie an Moni und Lorenz und an meine gesamte Familie und Freunde. Tilman du hast mich stets unterstützt, standest mir immer mit Rat und Tat beiseite und hast mich im richtigen Moment mit den richtigen Worten wieder aufgebaut und motiviert. Ich danke dir sowie Moni und Lorenz für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Für die moralische Unterstützung die ich während der gesamten Zeit erfahren durfte danke ich allen, auch den nicht namentlich genannten aber mir nahestehenden Personen. Ihr habt einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet.

DANKE!

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Ich stimme einer evtl. Überprüfung meiner Dissertation durch eine Antiplagiat-Software zu. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Datum

Unterschrift

