

Identifizierung und Charakterisierung von Cofaktoren des Transkriptionsfaktors Tal1

Dem Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)
genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Ing. Biotechnologie (FH) Stephan Kolodziej
aus Langen/Hessen

1. Referent: Prof. Dr. Ralf Galuske

2. Referent: Prof. Dr. Paul Layer

Tag der Einreichung: 2.9.2014

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2014

Darmstadt 2015

D17

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	5
1. Zusammenfassung	8
2. Einleitung	11
2.1 Hämatopoese.....	11
2.2 Regulation der Hämatopoese durch Zytokine	12
2.3 Transkriptionsfaktoren	13
2.4 Transkriptionsfaktor Tal1 (<i>T-cell acute lymphocytic leukemia 1</i>)	15
2.5 Die Funktion von Tal1 bei der Monozyten-Differenzierung	16
2.6 Tal1 in Leukämien	17
2.7 Tal1-Proteinstruktur und interagierende Proteine.....	18
2.8 Posttranslationale Modifikationen von Tal1	20
2.9 Epigenetik	21
2.10 Organisationsstruktur des Chromatin	22
2.11 Modifikation der Histone	24
2.12 Peptidyl-Arginin-Deiminasen (PADIs).....	26
2.13 Peptidyl-Arginin-Deiminase, Typ IV (PADI4).....	27
2.14 PADI4-Proteinstruktur.....	28
2.15 PADI4-Substrate.....	28
2.16 PADI4 Interaktion mit transkriptionellen Cofaktoren	30
2.17 PADI4 katalysierte Histonmodifikation.....	31
2.18 Bedeutung von PADI4 bei Krankheiten.....	32
2.19 PADI4 und Krebs	33
2.20 Zielgene von Tal1	34
2.21 IL6ST/GP130	34
2.22 CCCTC-Bindefaktor (CTCF)	36
2.23 Zielsetzung der Arbeit	39
3. Material und Methoden	40
3.1 RNA/DNA-Methoden.....	40
3.1.1 Standardmethoden und verwendete Kits.....	40
3.1.2 Vektoren.....	40
3.1.3 Quantitative PCR (q-PCR).....	46
3.2 Zellkultur-Methoden	50
3.2.1 Zelllinien	50
3.2.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen	50
3.2.3 Einfrieren und Auftauen von humanen Zelllinien	50
3.2.4 Kultur primärer hämatopoetischer Stammzellen	51
3.2.5 Differenzierung von humanen CD34+-Zellen zu Monozyten.....	51
3.2.6 Differenzierung von humanen CD34+-Zellen zu Megakaryozyten und Erythrozyten	52
3.2.7 Isolation hämatopoietischer Stammzellen aus peripherem Blut.....	53
3.2.8 Koloniebildende Wachstumsversuche mit dem <i>Colony Formation Units Assay</i> (CFU-Assay)	53
3.2.9 Herstellung lentiviraler Partikel	54
3.2.10 Ultrazentrifugation lentiviraler Partikel	54
3.2.11 Transduktion humaner hämatopoetischer Stammzellen (hCD34+)	55
3.2.12 FACS-Analyse (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)	55
3.3 Proteinbiochemische Methoden	56
3.3.1 Gesamtzellextrakte	56

3.3.2	Herstellung von Kernextrakten	56
3.3.3	Immunoblot.....	57
3.3.4	Immunfluoreszenz	58
3.3.5	Antikörper	59
3.3.6	Aufreinigung von Tal1/Cofaktor Komplexen	60
3.3.7	<i>Microarray</i> -Analyse	61
3.3.8	Sortierung GFP-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie-Sortierung	61
3.3.9	<i>GST-Pulldown</i>	62
3.3.10	Chromatin-Immunoprecipitation (ChIP).....	62
3.3.11	ChIP-ReChIP (sequentieller ChIP).....	64
3.3.12	Markierung des Zellproteoms mit stabilen Isotopen in Zellkultur (SILAC)	64
3.3.13	Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	65
3.3.14	Luciferasestudien	65
4.	Ergebnisse	67
4.1	Identifikation neuer Tal1-Cofaktoren	67
4.1.1	Identifizierung neuer Cofaktoren von Tal1 mittels Affinitätsaufreinigung und Massenspektrometrie	67
4.1.2	Verifikation der Interaktion von Tal1 und PADI4	70
4.1.3	Direkte Interaktion zwischen Tal1 und PADI4.....	71
4.1.4	Der C-Terminus von Tal1 interagiert mit dem C-Terminus von PADI4	72
4.1.5	Das Tal1- und PADI4-Protein ist im Nukleus lokalisiert.....	73
4.1.6	Identifizierung von Tal1/PADI4 Zielgenen durch Genexpressionsanalysen.....	74
4.1.7	<i>CTCF</i> und <i>IL6ST</i> sind direkte Tal1- und PADI4-Zielgene.....	78
4.1.8	PADI4 beeinflusst differenziell die Proteinexpression von Zielgenen	83
4.1.9	PADI4 beeinflusst Histon Arginin-Methylierungen von Tal1-Zielgenen.....	85
4.1.10	Die Verwendung eines PADI4-Inhibitors beeinflusst die <i>IL6ST</i> -Expression.....	88
4.1.11	PADI4 ist ein Repressor der Tal1/E47 vermittelten transkriptionellen Aktivierung	91
4.1.12	PADI4 beeinflusst die Proliferation einer Tal1-abhängigen Zelllinie.....	92
4.1.13	Funktion von PADI4 in der Hämatopoese.....	94
4.1.14	Einfluss des Tal1/PADI4 Komplexes auf die hämatopoetische Differenzierung	95
4.1.15	PADI4 beeinflusst die Differenzierung von humanen hämatopoetischen Progenitorzellen (hCD34+)	97
5.	Diskussion	99
5.1	PADI4 ist ein neuer Interaktionspartner von Tal1	99
5.2	Identifikation von Zielgenen des regulatorischen Tal1/PADI4 Komplex.....	101
5.3	PADI4 beeinflusst die Histon-Arginin Methylierung von <i>CTCF</i> und <i>IL6ST</i>	102
5.4	Der PADI4-Inhibitor Chlor-Amidin moduliert die Transkription von Zielgenen	106
5.5	Die Expression von <i>IL6ST</i> während der Differenzierung von Progenitorzellen stimmt mit der PADI4-Rekrutierung an den Promotor und veränderten Histonmodifikationen überein	107
5.6	PADI4 beeinflusst die hämatopoetische Differenzierung von pluripotenten Stammzellen.....	108
5.7	PADI4 beeinflusst das Wachstum von humanen Tumor Zelllinien.....	111
5.8	Einfluss von posttranskriptionellen Modifikationen.....	112
5.9	Modell der Regulation von Tal1 Zielgenen durch den Cofaktor PADI4	112
5.10	Die Funktion von Tal1 und PADI4 in der Hämatopoese und bei Krankheiten.....	114
6.	Literaturverzeichnis	117
7.	Anhang	137
7.1	Abkürzungsverzeichnis	137
7.2	Verwendete Chemikalien	141
7.3	Verwendete Geräte	143

7.4	Danksagung	144
7.5	Lebenslauf.....	145
7.6	Publikationen und Posterpräsentationen	146
7.7	Ehrenwörtliche Erklärung:.....	148

Abb. 2.1:	Das hämatopoetische System. Dargestellt sind schematisch die wichtigsten Differenzierungsschritte innerhalb der Hämatopoese.....	13
Abb. 2.2:	Regulation der Hämatopoese durch Transkriptionsfaktoren (vereinfachte Darstellung)	14
Abb. 2.3:	Einfluss von Tal1 auf die Hämatopoese und Angiogenese.....	16
Abb. 2.4:	Schematische Darstellung der Tal1-Isoformen.	18
Abb. 2.5:	Schematische Darstellung des Tal1 beinhaltenden multifaktoriellen Proteinkomplexes	19
Abb. 2.6:	Schematische Darstellung des Organisationsgrades der Chromatin- und Nukleosomenstruktur	24
Abb. 2.7:	Mechanismus der durch die PAD Familie katalysierten Arginin-Deiminierung.....	26
Abb. 2.8:	Kristallstruktur des PADI4-Proteins.	28
Abb. 2.9:	Schematische Darstellung der antagonistischen Transkriptionsregulation durch eine Protein Arginin Methyltransferase und PADI4.....	32
Abb. 2.10	Durch IL-6/GP130 gesteuerte Signaltransduktion über den <i>classic-</i> und <i>trans-signaling pathway</i>	35
Abb. 2.11:	Schematische Übersicht über die Domänenstruktur von aktiven und inaktiven Genbereichen und denen an der Genregulation beteiligten Elementen, Isolatoren und <i>Enhancer</i>	37
Abb. 3.1:	Vektorkarte von pGEX4T-1	41
Abb. 3.2:	Vektorkarte von pcDNA3-2HA	42
Abb. 3.3:	Vektorkarte von psiRNA-h7SK-GFPzeo.....	43
Abb. 3.4:	SEW-Vektor zur Herstellung lentiviraler Partikel	44
Abb. 3.5:	Vektorkarte des Lego-IT2 Vektor	45
Abb. 3.6:	Vektorkarte von pBIND.....	46
Abb. 4.1:	Schematische Abb. der Affinitätsaufreinigung zur Identifikation neuer Tal1-Cofaktoren.....	67
Abb. 4.2:	Analyse der Affinitätsaufreinigung von Tal1 und potentiellen Cofaktoren.....	68
Abb. 4.3:	PADI4 ist ein Interaktionspartner von Tal1	70
Abb. 4.4:	Interaktion von Tal1 und PADI4 in einem <i>GST-Pulldown</i>	72
Abb. 4.5:	Kartierung der Interaktionsfläche von Tal1 und PADI4	73
Abb. 4.6:	Immunfluoreszenz Analyse der Tal1/PADI4 Interaktion in Hela-Zellen	73
Abb. 4.7:	Herunterregulation von Tal1 und PADI4.	74
Abb. 4.8:	Microarray-Genexpressionsanalyse nach Tal1 und PADI4 <i>knock-down</i>	75
Abb. 4.9:	Bioinformatische Analyse der Microarray-Genexpressionsmessung nach Tal1 und PADI4 <i>knock-down</i>	75
Abb. 4.10:	Verifizierung der veränderten Genexpression nach einem Tal1 und PADI4 <i>knock-down</i>	77
Abb. 4.11:	Verifizierung der veränderten Genexpression nach einem Tal1 und PADI4 <i>knock-down</i>	78
Abb. 4.12:	Identifizierung von <i>CTCF</i> und <i>IL6ST</i> als Zielgene von Tal1 und PADI4.....	80
Abb. 4.13:	Der Transkriptionsfaktor Tal1 und PADI4 binden in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes des <i>CTCF</i> Gens.....	81
Abb. 4.14:	Der Transkriptionsfaktor Tal1 und PADI4 binden in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes des <i>IL6ST</i> Gens	82
Abb. 4.15:	Tal1 und PADI4 interagieren miteinander und binden gemeinsam am <i>IL6ST</i> -Promotor.....	83
Abb. 4.16:	Der <i>knock-down</i> von Tal1 und PADI4 in HEL Zellen verringert die Proteinmenge des Zielgens <i>CTCF</i>	84
Abb. 4.17:	Die Herunterregulation von PADI4 bewirkt eine reduzierte Expression des Transmembran Protein GP130/ <i>IL6ST</i>	85
Abb. 4.18:	Untersuchung der epigenetischen Veränderungen durch ChIP-Analysen nach PADI4 Herunterregulation in HEL Zellen am <i>IL6ST</i> - und <i>CTCF</i> -Promotor	87

Abb. 4.19:	Der PADI4-Inhibitor Cl-Amidin beeinflusst die mRNA Genexpression von IL6ST und CTCF.....	89
Abb. 4.20:	Analyse der epigenetischen Veränderungen des <i>IL6ST</i> - und <i>CTCF</i> -Promotors nach der Behandlung mit der niedermolekularen Verbindung Cl-Amidin.....	90
Abb. 4.21:	PADI4 reprimiert die Tal1/E47 vermittelte Luciferase Aktivierung	91
Abb. 4.22:	Der PADI4 Inhibitor Cl-Amidin beeinflusst das Wachstum von humanen Leukämie Zelllinien.....	93
Abb. 4.23:	Veränderung der IL6ST Expression während der Differenzierung von humanen CD34+ Zellen.....	95
Abb. 4.24:	Untersuchung des epigenetischen Status des <i>IL6ST</i> -Promotors während der Differenzierung von humanen CD34+ Zellen.....	96
Abb. 4.25:	PADI4 beeinflusst die Monozyten Differenzierung von humanen CD34+ Zellen	98
Abb. 5.1:	Modell der Funktion der Tal1/PADI4 Interaktion auf die Zielgene <i>IL6ST</i> und <i>CTCF</i>	113
Abb. 5.2:	Modell des Einflusses einer PADI4-Inhibition mittels der niedermolekularen Substanz Cl-Amidin auf die IL6ST-Expression und dem JAK/STAT-Signalweg.....	115

Tabelle 3.1:	Übersicht verwendeter Kits	40
Tabelle 3.2:	Übersicht der verwendeten Primer für die Klonierung der pGEX4-T1 GST-Konstrukte.....	41
Tabelle. 3.3:	Übersicht der verwendeten Sequenzierprimer für den pGEX4-T1 Vektor	41
Tabelle 3.4:	Übersicht der verwendeten Primer für die Klonierung des pcDNA3-2HA PADI4 Konstrukts	42
Tabelle 3.5:	Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer für pcDNA3-2HA	42
Tabelle 3.6:	Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-Sequenzen für eine Klonierung in den Vektor psiRNA--GFPZeo	43
Tabelle 3.7:	Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer für psiRNA-h7SK-GFPZeo.....	43
Tabelle 3.8:	Übersicht der verwendeten Oligonukleotid Sequenzen für eine Klonierung in den SEW-Vektor	44
Tabelle 3.9:	Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer für psiRNA-h7SK-GFPZeo.....	44
Tabelle 3.9:	Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung in Lego-IT2	45
Tabelle 3.10:	Übersicht des verwendeten Sequenzierungsprimer für Lego-IT2	45
Tabelle 3.11:	q-PCR Programm zur Messung von cDNA	47
Tabelle 3.12:	Übersicht verwendeter Primer zur Messung von cDNA	47
Tabelle 3.13:	q-PCR Programm zur Messung von CHIP-DNA.....	48
Tabelle 3.14:	Übersicht der verwendeten Primer zur Messung von CHIP-DNA	48
Tabelle 3.15:	Übersicht aller verwendeter Zelllinien	50
Tabelle 3.16:	Medium zur Expansion humaner CD34+ Zellen.....	51
Tabelle 3.17:	Medium zur Differenzierung humaner CD34+ Zellen zu Monozyten	52
Tabelle 3.18:	Medium zur Differenzierung humaner CD34+ Zellen zu Megakaryozyten	52
Tabelle 3.19:	Medium zur Differenzierung humaner CD34+ Zellen zu Erythrozyten.....	53
Tabelle 3.20:	Übersicht der verwendeten Primärantikörper	59
Tabelle 3.21:	Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper.....	60
Tabelle 4.1:	PADI4 ist ein neuer Tal1 Interaktionspartner	69

1. Zusammenfassung

Die Bildung von Blutzellen (Hämatopoese) ist ein komplexer biologischer Prozess aus Proliferation und Differenzierung von pluripotenten Stammzellen. Die Steuerung der hämatopoetischen Differenzierung erfolgt unter anderen durch Transkriptionsfaktoren (Barreda and Belosevic, 2001). Hierzu gehört der *basic-helix-loop-helix*-Transkriptionsfaktor Tal1 (*T-cell acute lymphocytic leukemia 1*), der ein essentieller Faktor der frühen und späten Hämatopoese ist (Shivdasani and Orkin 1996; Bloor *et al.*, 2002). Die aberrante Tal1-Expression, bedingt durch eine chromosomale Translokation, kann zur Entstehung von T-Zell-Leukämien beitragen (Brown *et al.*, 1990; Finger *et al.*, 1989; Palomero *et al.*, 2006). Das onkogene Potential von Tal1 kann durch eine zusätzlich veränderte Expression von interagierenden Cofaktoren verstärkt werden (Larson *et al.*, 1996).

Das Tal1-Protein bindet zusammen mit weiteren Cofaktoren an spezifische DNA-Sequenzabschnitte der regulierten Zielgene (Tijssen and Ghevaert 2013; Wilson *et al.*, 2009; Wadman *et al.*, 1997; Goardon *et al.*, 2006). In Abhängigkeit der Interaktion mit aktivierenden oder reprimierenden epigenetischen Cofaktoren kann Tal1 dabei eine Funktion als Repressor bzw. Aktivator auf die Expression von Zielgenen ausüben. Die distinkte Zusammensetzung des Tal1-Multiproteinkomplex und dessen zelltypspezifische Regulationsmechanismen während der hämatopoetischen Differenzierung und bei Leukämien ist zum Teil noch unbekannt. Daher ist ein genaueres Verständnis der hieran beteiligten epigenetischen Cofaktoren und deren dynamische Rekrutierung an Zielgene von großem Interesse.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Peptidyl Arginin Deiminase 4 (PADI4) ein neuer Tal1-Cofaktor ist.

Für die Identifikation neuer Tal1-Cofaktoren wurde eine Affinitätsaufreinigung unter Verwendung der Erythroleukämie Zelllinie K562 durchgeführt. Dabei wurde das Tal1-Protein und dessen interagierende Proteine isoliert und durch eine quantitative Massenspektrometrie mit SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) bestimmt. Hierdurch konnte die Peptidyl-Arginin-Deiminase, Typ IV (PADI4), als neuer Cofaktor des Tal1-Proteins identifiziert werden. Durch nachfolgende Genexpressionanalysen nach einem Tal1 und PADI4 *knock-down* konnten das Transmembran Glykoprotein 130 (GP130, auch *Interleukin 6 signal transducer (IL6ST)*) und das *CCCTC-binding protein (CTCF)* als potentiell coregulierte Zielgene von Tal1 und PADI4

identifiziert werden. In sequentiellen Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) Analysen wurde die simultane Bindung von Tal1 und PADI4 in den proximalen Promotorbereichen von *IL6ST* und *CTCF* festgestellt. Durch einen PADI4 *knock-down* in HEL Zellen konnte gezeigt werden, dass PADI4 am *IL6ST*-Promotor ein Co-Aktivatoren des Tal1-Komplex ist, in dem es die Methylierung von H3R2me2a durch die Protein Arginin Methyltransferase 6 (PRMT6) verhindert. Deswegen verbleibt die aktivierende Modifikation H3K4me3 auf einem hohen Niveau und das *IL6ST*-Gen wird transkribiert. Wenn das PADI4-Protein nicht mehr Bestandteil des Tal1-Multiproteinkomplex ist, kann PRMT6 die repressiv wirkende Histonmodifikation H3R2me2a katalysieren. Hierdurch wird eine Trimethylierung von H3K4 verhindert und es kommt zu einer reduzierten *IL6ST*-Transkription. Am *CTCF*-Promotor beeinflusst PADI4 die aktivierend wirkende Modifikation H3R17me2a. Die Methylierung erfolgt durch die Protein Arginin Methyltransferase 4 (PRMT4), für die eine zunehmende Bindung nach PADI4 *knock-down* am *CTCF*-Promotor festgestellt werden konnte. PADI4 ist ein Repressor der *CTCF*-Expression, indem die H3R17me2a Modifikation auf einem niedrigen Niveau gehalten und eine Methylierung durch das Enzym PRMT4 verhindert wird. Die niedermolekulare Substanz CI-Amidin kann die enzymatische Aktivität von PADI4 inhibieren. Durch eine Behandlung verschiedener Tumorzelllinien mit dem Inhibitor wurde deren Wachstum beeinflusst. Die Applikation von CI-Amidin in HEL-Zellen hatte eine veränderte Genexpression von Tal1-Zielgenen zur Folge, dahingehend dass die Expression von *IL6ST* verringert und von *CTCF* erhöht war. Korrelierend mit den PADI4 *knock-down* Experimenten konnte am *IL6ST*-Promotor eine starke Zunahme von H3R2me2a und gleichzeitig eine Reduzierung von H3K4me3 nach einer Inhibitor Behandlung festgestellt werden. Am *CTCF*-Promotor konnte eine Zunahme der aktivierende Modifikation H3R17me2a und keine Veränderung von H3R2me2a bestimmt werden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die durch das PADI4-Protein katalysierten promotor-spezifischen Histonmodifikationen von Tal1-Zielgenen durch Verwendung einer niedermolekularen Substanz modulierbar sind.

Während der Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen korreliert die *IL6ST*-Expression mit der Rekrutierung des PADI4-Proteins an den Promotor und dessen epigenetisch katalysierten Histonmodifikationen. In zu Megakaryozyten differenzierten Zellen nimmt die Okkupation von Tal1 und PADI4 auf dem *IL6ST*-Promotor ab, während die *IL6ST* mRNA-Expression nahezu unverändert ist. Zusätzlich kommt es zu einer Zunahme der Methylierung von H3R2, die auf eine Co-Aktivatoren Funktion von PADI4 auf die

Genexpression von *IL6ST* während der Megakaryopoese hindeuten. Durch *Colony Formation Assays* (CFA) konnten nach PADI4-Überexpression eine Erhöhung der Monozyten Kolonien und nach PADI4 *knock-down* eine Verringerung ermittelt werden. Nach einem *knock-down* von Tal1 und PADI4 konnten mehrere Gene identifiziert werden, die an der Leukozyten-Differenzierung beteiligt sind. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten daraufhin, dass der neue Tal1 Cofaktor PADI4 durch eine spezifische Regulation der Histon-Arginin-Methylierung von *IL6ST* ein entscheidender Regulator der hämatopoetischen Differenzierungsprozesse von Progenitorzellen ist.

Dabei bietet die beschriebene Feststellung, dass die durch PADI4 katalysierten Promotor spezifischen Histonmodifikationen durch die Verwendung einer niedermolekularen Substanz beeinflussbar sind, einen möglichen Ansatz zur epigenetischen Therapie von *IL6ST* bzw. *CTCF* assoziierten Krebserkrankungen.

2. Einleitung

2.1 Hämatopoese

Die reifen Zellen des Blutes sind hochspezialisiert und haben eine begrenzte Lebensdauer von einigen Tagen bis Wochen. Daher besteht die Notwendigkeit einer ständigen Erneuerung dieser Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen (HSC). Bei diesem Prozess muss ein Gleichgewicht aus Selbsterneuerung der Stammzellen und der Differenzierung zu Vorläuferzellen vorliegen, ohne dass hierbei die Zellzahl der HSCs reduziert wird (Robb 2007; Alenzi *et al.*, 2009).

Während der Embryonalentwicklung läuft die Hämatopoese in mehreren koordinierten und schrittweise angelegten Prozessen ab. Diese als primitive oder embryonale Phase bezeichneten Prozesse finden im Dottersack statt und generieren hauptsächlich Erythrozyten und Makrophagen (D'Andrea 1994; Orkin and Zon 2002; Mikkola and Orkin 2006). Während der Embryogenese findet die definitive Hämatopoese statt, bei der die Stammzellen in den Bereich der Aorta, Gonaden und Mesonephros Region (AGM), der Plazenta und der fetalen Leber migrieren. Im adulten Menschen stellt das Knochenmark den Ort der Hämatopoese dar.

Hämatopoetische Stammzellen werden auf Basis verschiedener Eigenschaften wie z.B. ihrem Differenzierungspotential, der Expression von Oberflächenmarkern und dem Potential zur Proliferation bzw. Apoptose in zwei verschiedene Klassen unterteilt (Cantor and Orkin 2001; Passegué *et al.*, 2003). Während sich Langzeit-repopulierenden Stammzellen (*long-term* HSC, LT-HSC) sich ein Leben lang teilen, haben die als Kurzzeit-repopulierenden Stammzellen (*short-term* HSC, ST-HSC) einen begrenzten Zeitraum bzw. eine begrenzte Fähigkeit zur Teilung (Auffray *et al.*, 2009; Morrison and Weissman 1994). Aus den ST-HSCs entwickeln sich nachfolgend sogenannte multipotente Vorläuferzellen, *multipotent progenitor cells* (MPPs), die nur noch in geringem Maße zur Selbsterneuerung fähig sind (Lioté *et al.*, 1996; Morrison *et al.*, 1997). Durch eine weitergehende Differenzierung dieser MPPs entstehen oligopotente Vorläuferzellen mit einem begrenzten Differenzierungspotential. Zum einen entstehen an dieser Stelle myeloische Vorläuferzellen (*common myeloid progenitors*, CMPs) bzw. lymphoide Vorläuferzellen (*common lymphoid progenitors*, CLP) (Iwasaki and Akashi 2007; Bryder *et al.*, 2006;

Fogg *et al.*, 2006). In der fortlaufenden Differenzierung entstehen aus den CMPs Granulozyten/Macrophagen Vorläuferzellen, die dann terminal zu Monozyten/Makrophagen sowie Megakaryozyten/Plättchen und Erythrozyten ausdifferenzieren. Aus den CLPs entwickeln sich reife B-Lymphozyten, T-Lymphozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen).

2.2 Regulation der Hämatopoese durch Zytokine

Die Proliferation bzw. die Differenzierung der HSCs zu terminal differenzierten Zellen wird unter anderem durch Zytokine und Transkriptionsfaktoren gesteuert. Zytokine stellen ein System von spezifischen extrazellulären Liganden dar, die eine biologische Antwort in diversen Zelltypen stimulieren können. Dies erfolgt durch die Bindung an strukturell und funktionell konservierte Rezeptoren (Dai *et al.*, 2002; Robb 2007). Die Zytokine des hämatopoetischen Systems sind unter anderem die Interleukine (IL1-12, IL-15, IL-21), Kolonie stimulierende Faktoren wie dem *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), Erythropoetin (EPO) und Thrombopoetin (TPO). Für die Wirkungsweise bzw. den Einfluss der Zytokine auf die Hämatopoese existieren zwei Modelle, das instruktive und das stochastische Modell (Dakic *et al.*, 2005; D'Andrea 1994). Bei dem instruktiven Modell übermitteln die Zytokine spezifische Signale an multipotente Vorläuferzellen, die eine Festlegung des Differenzierungspfad und der Differenzierung bewirkt. Bei dem stochastischen Modell haben die Zytokine einen permissiven Einfluss auf den Pfad der Differenzierung. Dies bedeutet, dass ihre Funktion auf die Viabilität und Proliferation der Stammzellen fokussiert ist. Innerhalb des stochastischen Modells werden Transkriptionsfaktoren als Regulatoren der spezifischen Expression von an der Hämatopoese beteiligten Gene angesehen. Durch eine antagonistische Wirkungsweise sorgen die Transkriptionsfaktoren dafür, dass an anderen Differenzierungsprozessen beteiligte Faktoren blockiert und dadurch weitere Prozesse bzw. die Entscheidung zur Differenzierung beschleunigt werden (Reddy *et al.*, 2000; Cantor and Orkin 2001; Barreda and Belosevic 2001). Eine Übersicht der an der Hämatopoese beteiligten Zytokine ist in der Abb 2.1 zusammengefasst.

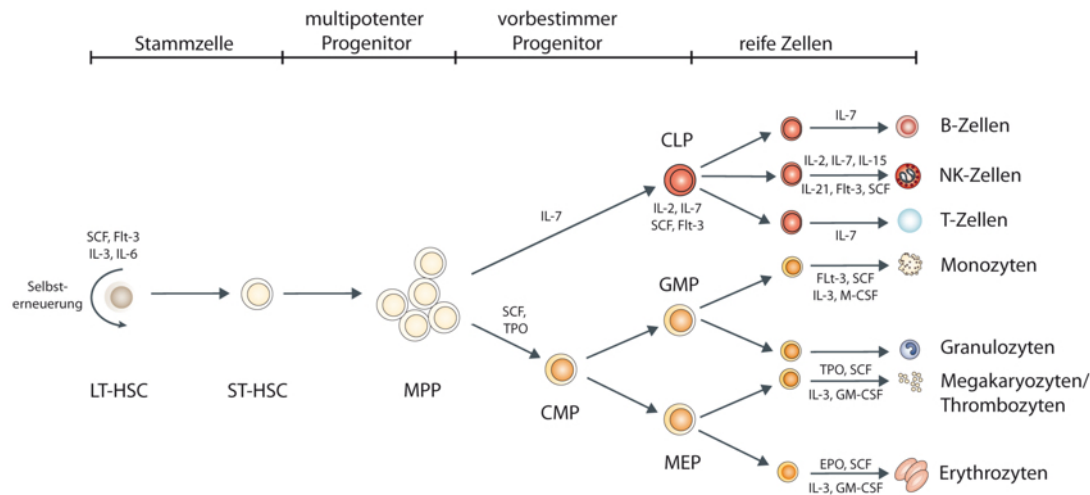


Abb. 2.1: Das hämatopoetische System. Dargestellt sind schematisch die wichtigsten Differenzierungsschritte innerhalb der Hämatopoese. Die zur Selbsterneuerung befähigten hämatopoetischen Stammzellen (LT-HSC) besitzen einen pluripotenten Charakter und differenzieren über Kurzzeit repopulierenden Stammzellen, *short-term hematopoietic stem cells* (ST-HSCs), zu multipotenten Vorläufer-Zellen, *multipotent progenitor* (MPPs). Diese Zellen bilden die Basis für die nachfolgende Differenzierung zu lymphoiden, *common lymphoid progenitor* (CLPs) und myeloiden Zellen, (*common myeloid progenitors*) CMPs. Diese Zellen besitzen dann bereits linienspezifischen Charakter, d.h. nur noch ein eingeschränktes Differenzierungspotential. Aus den CMPs entwickeln sich nachfolgend über *megakaryocyte erythrocyte progenitors*, Megakaryocyten bzw. Erythrozyten und über *granulocyte macrophage progenitor* (GMPs) Monozyten/Macrophagen und Granulozyten. Aus den *common lymphoid progenitor* Zellen (CLPs), entstehen die Bestandteile der Immunsystems: B-Zellen, T-Zellen bzw. NK Zellen. An der Proliferation bzw. Differenzierung der Zellen des hämatopoetischen Systems ist eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren beteiligt. Dazu gehören die Zytokine (IL-3, IL-6, IL-7, IL-15, IL-21), *stem-cell factor* (SCF), *Flt-3 ligand* (Flt-3), *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF), *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF), Erythropoetin (EPO) und Thrombopoetin (TPO). Modifiziert nach (Ceredig *et al.*, 2009; Sharpless and DePinho 2007).

2.3 Transkriptionsfaktoren

Die Hämatopoese unterliegt einem vielschichtigen Regulationsprozess, in dem die Reifung der Stammzellen einen komplexen Prozess aus Zell-Zell oder Zell-extrazellulärer Matrix Interaktionen, Wachstumsfaktoren und intrinsischen Signalen darstellt. Die koordinierte Wirkungsweise dieses Signalkaskadensystems bildet die Basis der Entwicklung von verschiedenen Zelltypen, wobei eine fehlerhafte Regulation beispielsweise zu der Entstehung von Leukämien führen kann (Tsai *et al.*, 1992; Reddy *et al.*, 2000; Barreda and Belosevic 2001). Die Gesamtheit der Signaltransduktionswege findet bei der Steuerung der Genexpression zusammen, einem Prozess der durch Transkriptionsfaktoren gesteuert wird. Diese stellen eine Klasse von Proteinen dar, die spezifisch an DNA-Sequenzen binden können und entweder eine aktivierende oder reprimierende Funktion haben. Der Einfluss auf die Aktivität der Genexpression ist abhängig von der Bindungsaffinität an spezifische Gensequenz Abschnitte, der Protein-Konzentration der Transkriptionsfaktoren innerhalb

der Zelle und der Interaktion mit anderen Cofaktor-Proteinen und Transkriptionsfaktoren (Shivdasani *et al.*, 1995; Tenen *et al.*, 1997; D'Souza *et al.*, 2005; Robb *et al.*, 1995), Burke & Baniahmad, 2000; Porcher *et al.*, 1996, (Porcher *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2000; Robb and Begley 1996; Endoh *et al.*, 2002). Diese konzertierte Wirkungsweise der Transkriptionsfaktoren bestimmt die linienspezifische Genexpression und damit die Differenzierung von Zellen des hämatopoetischen Systems (Visvader *et al.*, 1991; Barreda and Belosevic 2001). Der Status der Zelle bzw. deren Differenzierungsgrad im hämatopoetischen System kann daher durch das Expressionsmuster der beteiligten Transkriptionsfaktoren bestimmt werden. Eine fehlerhafte Regulation der Transkriptionsfaktor-Expression kann weitreichende Konsequenzen haben. Dazu gehören eine veränderte Proliferation, blockierte Differenzierungen und veränderte linienspezifische Entwicklungen (Akashi *et al.*, 2000; Gewirtz and Calabretta 1988; Elefanty *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 1992; Herblot *et al.*, 2000). In der Abb. 2.2 sind einige an der Hämatopoese beteiligten Transkriptionsfaktoren zusammengestellt.

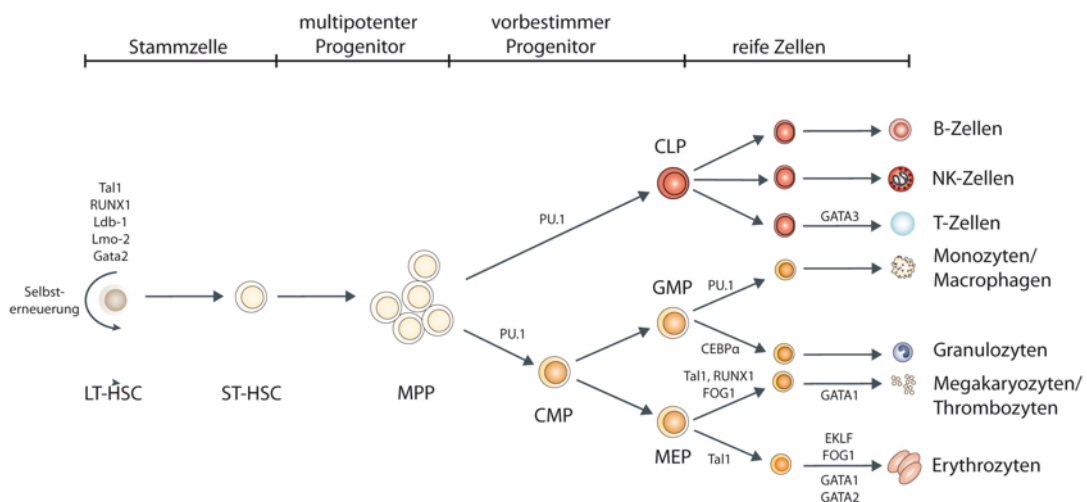


Abb. 2.2: Regulation der Hämatopoese durch Transkriptionsfaktoren (vereinfachte Darstellung). Die Proliferation bzw. die Differenzierung von Stammzellen mit Selbsterneuerungspotential, LT-HSCs, wird durch die kombinatorische Wirkungsweise der Transkriptionsfaktoren Tal1, RUNX1, Ldb1, LMO2 und GATA2 gesteuert. Das Niveau der Proteinexpression des Transkriptionsfaktors PU.1 ist entscheidend für die Entwicklung zu CLPs bzw. CMPs. Die Differenzierung von CLPs zu T-Zellen unterliegt neben anderen Faktoren der Kontrolle von GATA3. GMPs bilden die Vorläuferzellen für Monozyten/Macrophagen und Granulozyten, ein Prozess der durch PU.1 und CEBPα antagonistisch begleitet wird. Die Differenzierung von MEPs zu Megakaryozyten wird durch Tal1, RUNX1, FOG1 und GATA1 gesteuert. Bei Erythrozyten sind Tal1, EKLF, FOG1, GATA1 und GATA2 regulativ beteiligt. Abkürzungen: Tal1, *T-cell acute lymphocytic leukemia 1*, RUNX1, *Runt-related transcription factor 1*, Ldb-1, *LIM domain binding 1*, Lmo-2, *LIM domain only protein 2*, GATA1, *Gata binding protein 1*, GATA2, *GATA binding protein 2*, GATA3, *Gata binding protein 3*, FOG1, *Friend of Gata1*, PU.1 (*Spi1*) *spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene Spi1*, CEBPα *CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha*, EKLF, *Krüppel-like factor 1* (erythroid). Modifiziert nach (Ceredig *et al.*, 2009).

2.4 Transkriptionsfaktor Tal1 (*T-cell acute lymphocytic leukemia 1*)

Durch Expressionsanalysen sowie unter Verwendung von Mausmodellen konnte der Transkriptionsfaktor Tal1 (*T-cell acute lymphocytic leukemia 1*, früher *Scl1*, *stem cell leukemia 1*) als ein essentieller Regulator der frühen und späten Hämatopoese beschrieben werden. Innerhalb der primitiven Phase der Hämatopoese hat Tal1 Einfluss auf die Entstehung von Zellen mit mesodermalen Ursprung zu sogenannten Hemangioblasten. Diese Vorläuferzellen sind im Dottersack lokalisiert und stellen neben den hemogenen Endothelzellen in der Aorta-Gonado-Mesonephros (AGM) Region die Orte der frühen Hämatopoese dar. Diese Prozesse finden am Tag sieben (E7) der Embryogenese statt und bilden die Basis für die Entstehung von primitiven, nukleären Erythrozyten sowie der weiteren Entwicklung von Endothelzellen. Nachfolgend kommt es zu einer Migration der Vorläuferzellen in die fetale Leber (Begley *et al.*, 1989; Shivdasani *et al.*, 1995; Green *et al.*, 1992; D'Souza *et al.*, 2005; Akashi *et al.*, 2000; Robb *et al.*, 1995; Elefanty *et al.*, 1998; Cross *et al.*, 1994). Die Bedeutung von Tal1 auf die embryonale Entwicklung konnte durch die Generierung von Tal1^{-/-} *knock-out* Mausmodellen gezeigt werden. Diese weisen eine embryonale Lethalität am Tag 9,5 (E9.5) auf (Mouthon *et al.*, 1993; Porcher *et al.*, 1996). Durch das Fehlen der primitiven Hämatopoese kommt es zu einer fetalen Anämie. Nach der Transplantation embryonaler Stammzellen von Tal1 *knock-out* Mäusen in die Blastozyste einer Wildtyp-Maus konnte sich kein hämatopoetisches System entwickeln (Sanchez *et al.*, 1999; Porcher *et al.*, 1996; Robb and Begley 1996; Endoh *et al.*, 2002). Neben der Involvierung in die regulativen Prozessen der primitiven Hämatopoese ist Tal1 auch an der Angiogenese beteiligt. Zwar konnte in Tal1 defizienten Mäusen keine Veränderung der Expression von Endothelspezifischen Genen und der Entstehung von Endothelzellen festgestellt werden, allerdings ist die Angiogenese vermindert (Brown *et al.*, 1990; Visvader *et al.*, 1991). Durch die Verwendung einer konditionellen Tal1 *knock-out* Maus, konnte die Funktion in der adulten Hematopoese bestimmt werden. Die Tal1-Deletion in hämatopoetischen Zellen im Knochenmark hatte keinen Einfluss auf die Rekonstitutionsfähigkeit hämatopoetischer Stammzellen oder von frühen Vorläuferzellen im Transplantationsmodell. Allerdings war die Megakaryozyten und Erythrozyten Differenzierung verändert (Hall *et al.*, 2005). Durch Expressionsanalysen der adulten Hämatopoese konnte gezeigt werden, dass Tal1 in den hämatopoetischen Stammzellen und den frühen Vorläuferzellen exprimiert und dann während der weiteren

Differenzierung herunterreguliert wird (Aplan *et al.*, 1997; Akashi *et al.*, 2000; Larson *et al.*, 1996) (Aplan *et al.*, 1990; Elefanty *et al.*, 1998; Herblot *et al.*, 2000). Ausgenommen von dieser Tendenz sind allerdings Vorläuferzellen, in denen Tal1 weiterhin exprimiert wird und die nachfolgend zu Erythrozyten, Megakaryozyten und Mastzellen differenzieren (Aplan *et al.*, 1990; Begley *et al.*, 1989; Bernard *et al.*, 1991; Green *et al.*, 1992; Goldfarb *et al.*, 1992; Akashi *et al.*, 2000; Calkhoven *et al.*, 2003; Elefanty *et al.*, 1998; Cross *et al.*, 1994). Durch die Sequenzanalyse des Tal1 Locus wurden Enhancer-Elemente in der 3'-Region identifiziert, die eine gewebespezifische Expression von Reportergenkonstrukten in transgenen Mäusen im Mesoderm, Endothel und den Orten der embryogenen Hämatopoese steuern (Hsu *et al.*, 1994b; Sanchez *et al.*, 1999).

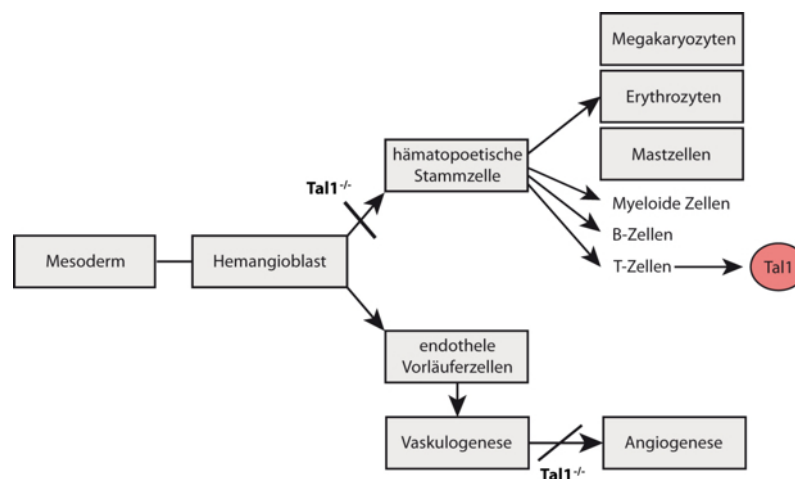


Abb. 2.3: Einfluss von Tal1 auf die Hämatopoese und Angiogenese. Während der Hämatopoese wird der Transkriptionsfaktor Tal1 in hämatopoetischen Stammzellen, sowie Megakaryozyten, Erythrozyten, Mastzellen und Monozyten exprimiert (graue Boxen). Eine fehlgesteuerte, abweichende Expression von Tal1 (rot markiert) in T-Zellen führt zu der Entstehung von T-Zell-Leukämien (T-ALL). Die Prozesse der Vaskulogenese sind in *Tal1* defizienten Mäusen nicht beeinflusst. Allerdings kommt es durch eine fehlende Tal1-Expression zu einer Reprimierung der Angiogenese, modifiziert nach (Barton *et al.*, 1999).

2.5 Die Funktion von Tal1 bei der Monozyten-Differenzierung

Während dem Tal1-Protein eine bedeutende regulative Funktion bei der Megakaryopoese, Erythropoese und Mastzellendifferenzierung zugeordnet werden konnte, war dessen Rolle innerhalb der Monozyten- und Makrophagen-Differenzierung lange nicht bestimmt. Monozyten sind im Blut zirkulierende Leukozyten, die eine entscheidende Funktion bei der Initialen Immunantwort haben. Bei diesen Prozessen kommt es zu einer ersten Reaktion auf das Eindringen von Pathogenen (Tenen *et al.*, 1997; Auffray *et al.*, 2009). Daneben ist die Zellzahl-Expansion von Monozyten zusammen mit Leukozyten an der Entwicklung der

Rheumatischen Arthritis beteiligt (Burke and Baniahmad 2000; Lioté *et al.*, 1996). Monozyten entstehen durch die Differenzierung von Vorläuferzellen, ausgehend von myeloischen Vorläuferzellen (CMP), über granulozytär-monozytärer Vorläuferzellen (GMPs) und den Monozyten/Makrophagen DC (*dendritic cells*) Vorläuferzellen (MDP) (Zhang *et al.*, 2000; Iwasaki and Akashi 2007; Fogg *et al.*, 2006). Bei der Differenzierung der Vorläuferzellen zu den Monozyten kommt es zu einer Vielzahl von linienspezifischen Prozessen, in deren Folge eine anderweitige Differenzierung ausgeschlossen wird. Die Differenzierung wird unter anderem durch den Makrophagen-Kolonie stimulierenden Faktor (M-CSF) beeinflusst, der an den MCF-Rezeptor (M-CSFR) bindet. In M-CSFR *knock-out* Mausmodellen war die Konzentration des Liganden M-CSF erhöht und die Anzahl der Monozyten stark reduziert (Barreda and Belosevic 2001; Dai *et al.*, 2002). Neben einer Regulation durch M-CSF ist der Transkriptionsfaktor PU.1 entscheidend bei der initialen myeloiden Differenzierung von multipotenten Vorläuferzellen (MPPs). Zu einem späteren Zeitpunkt, d.h. bei der Reifung der bipotenten granulozytär-monozytären Vorläuferzellen (GMP), steuert PU.1 die Differenzierung zu Monozyten (Gewirtz and Calabretta 1988; Dakic *et al.*, 2005). Für Tal1 konnte eine Assoziation mit E2A-Proteinen und deren Bindung an E-Box Sequenzmotive in der IL6 induzierten myeloiden Differenzierung beschrieben werden (Voronova and Lee 1994). Durch einen *knock-down* von Tal1 in humanen CD34+ Zellen wurde die Anzahl an myeloiden und erythroiden Zellen reduziert (Brunet de la Grange *et al.*, 2006). Ein Tal1 *knock-out* in murinen myeloischen Vorläuferzellen (CMP) beeinflusste die Proliferation und den Zellzyklus während der Monozyten Differenzierung.(Dey *et al.*, 2010).

2.6 Tal1 in Leukämien

Neben den beschriebenen essentiellen regulatorischen Funktionen innerhalb des hämatopoetischen Systems, ist Tal1 der am häufigsten vorkommende onkogene Transkriptionfaktor in etwa 40-60% aller Fälle von kindlicher akuter lymphoide T-Zell Leukämien (T-ALL). Durch Analysen von T-ALL Patienten konnte eine chromosomale Translokation t(1;14)(q33;11) des Tal1 Gens von seiner normalen Position auf Chromosom 1, in das T-Zell-Rezeptor α/β (TCR α/β) Gen auf Chromosom 14 festgestellt werden. Daneben kann es auch zu einer aktivierenden interstitialen Deletion eines regulatorischen Elements im 5'-Ende des Tal1 Gens kommen (Voronova and Lee 1994; Brown *et al.*, 1990)

Infolge der Translokation bzw. der Deletion kommt es zu einer ektopten Expression von Tal1 in reifen T-Zellen. Dies steht im Gegensatz zu den normalen Prozessen der Hämatopoese, wo die Tal1 Expression von Vorläuferzellen zu reifen T-Zellen herunterreguliert wird. Bei der Entstehung von T-Zell Leukämie hat Tal1 alleine allerdings nur ein geringes onkogenes Potential. Durch die Coexpression der mit Tal1 interagierenden Faktoren LMO1 und LMO2 in transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass hierdurch die Tumorigenese verstärkt wird (Cantor and Orkin 2002; Aplan *et al.*, 1997; Larson *et al.*, 1996).

2.7 Tal1-Proteinstruktur und interagierende Proteine

Der Transkriptionsfaktor Tal1 gehört zu der Familie der gewebespezifischen *basic-helix-loop-helix* Proteine (bHLH) der Klasse B. Das humane Tal1 Gen ist auf dem Chromosom 1 lokalisiert und besitzt eine Länge von 16 kB. Von den acht existierenden Exons enthalten nur drei kodierende Sequenzen. (Weiss and Orkin 1995; Aplan *et al.*, 1990) Durch verschiedene Translationsstartpunkte innerhalb der Gensequenz gibt es drei verschiedene Isoformen. Das Tal1-Protein mit einer Größe von 42 kDa entspricht der Volllänge, bei den 39 kDa und 22 kDa großen Proteinen fehlt ein Teil des N-Terminus. Die verschiedenen Isoformen resultieren aus alternativen Translations-Initiationen an internen ATG Codons der Tal1-Sequenz (Wadman *et al.*, 1997; Aplan *et al.*, 1990; Bernard *et al.*, 1991; Goldfarb *et al.*, 1992; Calkhoven *et al.*, 2003).

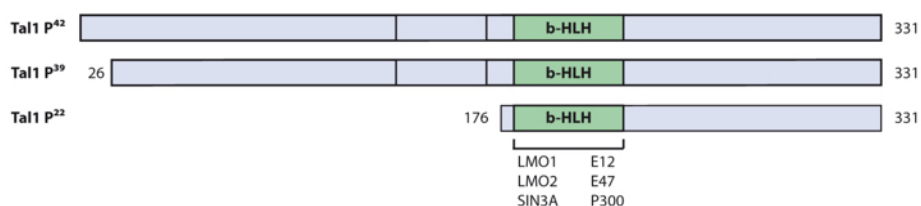


Abb. 2.4: Schematische Darstellung der Tal1-Isoformen. Das *Tal1* Gen kodiert für das Volllänge-Protein Tal1 p42, sowie zwei weitere N-terminale verkürzte Proteine, die als Tal1 p39 und Tal1 p22 bezeichnet werden. Die verkürzten Isoformen entstehen aus alternativen Translations-Initiationen an internen ATG Codons der Tal1-Sequenz. Das Volllänge Protein besteht aus 331 Aminosäuren, während p39 die Aminosäuren 26-331 und p22 176-331 umfasst. Alle Isoformen enthalten die für die DNA-Bindung und die Interaktion mit anderen Proteinen verantwortliche bHLH-Region. Die Transaktivierungsdomäne (AD) ist nur in den Isoformen Tal1 p42 und p39 enthalten. Modifiziert nach (Calkhoven *et al.*, 2003).

Am Amino-terminalen Ende des Tal1-Proteins konnte eine Prolin reiche Transaktivierungsdomäne nachgewiesen werden (Boehm *et al.*, 1991; Hsu *et al.*, 1994b;

Sánchez-García and Rabbitts 1994). Eine Bindung von Tal1 an DNA erfolgt über die als E-Box Motiv bezeichnete Sequenz CANNTG, die sich im basischen Bereich des Proteins befindet. Eine Bindung erfordert die Heterodimerisierung mit anderen Proteinen, über den Bereich der *basic-helix-loop-helix* Region. Hierzu gehören die durch das E2A Gen codierten und als E-Proteine bezeichneten *basic helix-loop-helix* Helix Proteine der Klasse A, E47, E12, HEB und E2-2 (Warren *et al.*, 1994; Hsu *et al.*, 1994b; Yamada *et al.*, 1998). Die Heterodimerisierung mit Tal1 reprimiert die Transaktivierungsaktivität von E47 (Valge-Archer *et al.*, 1994; Voronova and Lee 1994; Wadman *et al.*, 1994; Osada *et al.*, 1995). Durch Promotor und Expressionsanalysen konnte dargestellt werden, dass die Bindung des Tal1/E47 Heterodimers an die E-Box DNA-Sequenzen nicht alleine, sondern vielmehr als ein Teil eines multifaktoriellen Proteinkomplexes erfolgt. Die Zusammensetzung dieses Komplexes ist entscheidend dafür, ob Tal1 als ein Aktivator bzw. als Repressor der Transkription wirkt. Die Funktion von Tal1 auf Zielgene ist somit abhängig von der Interaktion mit Cofaktoren. Während der Erythropoese steuert eine kleine Anzahl von linienspezifischen Transkriptionsfaktoren wie Tal1/E2A, GATA1, LMO2, LDB1 und KLF1 die Differenzierung (Wadman *et al.*, 1997; Cantor and Orkin 2002; Osada *et al.*, 1995). Das Protein GATA DNA Binding Protein 1 (GATA1) bindet dabei an WGATAR Motive in den Promotor bzw. *Enhancer* Bereichen von mehreren Erythrozyten spezifischen Genen, wie z.B. Hämoglobin, *EKLF* und *p4.2* (Larson *et al.*, 1996; Weiss and Orkin 1995; Xu *et al.*, 2003) Die transkriptionelle Regulation erfolgt über eine zweiteilige DNA-Bindung, bestehend aus dem E-Box Sequenz Motiv sowie einer 9 bis 10 bp davon benachbarten GATA1 Bindungsstelle (Silver and Palis 1997; Wadman *et al.*, 1997; Brady *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 1996; Delassus *et al.*, 1999; Love *et al.*, 2014).

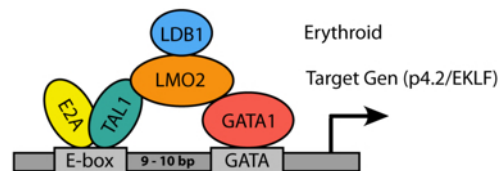


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Tal1 beinhaltenden multifaktoriellen Proteinkomplexes.

Der oligomere Komplex bindet über das Tal1-Protein an das E-Box Sequenzmotiv der DNA und in einem Abstand von 9-10 bp über das GATA1-Protein an ein GATA-Sequenzmotiv. Das LIM-Domänen Protein 2, LMO2, agiert als Adapterprotein, in dem es sowohl mit dem Tal1- als auch mit dem GATA1 Protein interagiert. Der Transkription-Cofaktor LDB1 besitzt keine enzymatische oder DNA-Bindungsfunktionen, allerdings hat das Protein durch die Interaktion mit LMO2 ebenfalls eine Funktion Adapter-Protein. Der Proteinkomplex, bestehend aus Transkriptionsfaktoren und Cofaktoren steuert die Expression von erythroiden Zielgenen, wie z.B. dem *Protein 4.2 (p4.2)* und *erythroid krüppel factor (EKLF)*. Abb. modifiziert nach (Nam and Rabbitts, 2006).

Die weiteren Komponenten dieses oligomeren Proteinkomplexes agieren als Adapter Proteine. Das LIM Domänen Protein 2, LMO2, interagiert dabei mit dem Tal1- und GATA1-Protein. Das LDB1 Protein besitzt keine enzymatische oder DNA-Bindungs Funktion. Durch die Interaktion mit LMO2 besitzt das LDB1-Protein ebenfalls eine Funktion als Adapterprotein. LMO2 ist ein LIM-Domänen Protein (Bohmann 1990; Boehm *et al.*, 1991; Hunter and Karin 1992; Karin 1992), dass essentiell für die primitive und definitive Hämatopoese ist (Cheng *et al.*, 1993; Warren *et al.*, 1994; Yamada *et al.*, 1998). LMO2 besitzt zwar keine DNA-Bindefähigkeit, jedoch konnte in eythroiden Zellen eine direkte Interaktion mit Tal1 (Palamarchuk *et al.*, 2005; Valge-Archer *et al.*, 1994; Wadman *et al.*, 1994; Osada *et al.*, 1995) und dem GATA DNA Bindeprotein GATA1 aufgezeigt werden (Terme *et al.*, 2009; Wadman *et al.*, 1997; Osada *et al.*, 1995). Wie bei Tal1 kommt es in Folge einer chromosomalen Translokation in T-Zellen zu einer ektopen Expression von LMO2, die in Mausmodellen zu einer verstärkten Tumorbildung führt (Prasad and Brandt 1997; Larson *et al.*, 1996). Im menschlichen Organismus konnten die zu der Entstehung von Leukämien beitragenden Faktoren noch nicht bestimmt werden. Die enge Verbindung von Tal1 und LMO2 deutet sich auch innerhalb der normalen Hämatopoese an, wo das Expressionsmuster der beiden Proteine in der frühen und der definitiven Hämatopoese weitgehend übereinstimmt (Strahl and Allis 2000; Silver and Palis 1997; Brady *et al.*, 1995; Dong *et al.*, 1996; Delassus *et al.*, 1999). Der Phänotyp der LMO2 *knock-out* Maus (LMO^{-/-}) zeigt das komplette Fehlen von hämatopoetischen Zellen und einer defekten Dottersack Angiogenese. Diese Effekte sind vergleichbar mit dem Phänotyp des Tal1 *knock-out* Maus Modell Tal1^{-/-} und deuten auf ähnliche Funktionen der beiden Komponenten innerhalb des Komplexes hin.

2.8 Posttranslationale Modifikationen von Tal1

Durch posttranslationalen Modifikationen werden die funktionellen Eigenschaften von Transkriptionsfaktoren entscheidend verändert. Hierzu gehören die Veränderung der DNA-Bindeaktivität, die subzelluläre Lokalisierung und das Transaktivierungspotential (Felsenfeld and Groudine 2003; Bohmann 1990; Hunter and Karin 1992; Karin 1992). Für Tal1 wurden bisher Phosphorylierungen und Acetylierungen beschrieben. Innerhalb des Tal1- Proteins können die Aminosäurereste Serin 122, Threonin 90 und Serin 172 phosphoryliert vorliegen. Die Phosphorylierung des Serin 122 wird durch ERK1 (*extra*

cellular signal related kinase 1) durchgeführt und findet in Erythroleukämie- und T-ALL Zelllinien statt (Law and Jacobsen 2010; Cheng *et al.*, 1993). Neben der durch Translokationen assoziierten Entstehung von T-ALL könnte die differentielle Phosphorylierung des Protoonkoproteins Tal1 als Antwort auf extrazelluläre Signale eine weitere Ursache darstellen. Der Aminosäurerest Threonin 90 wird spezifisch durch die Akt Kinase 1 (*V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*) phosphoryliert, was eine Verringerung der Tal1 gesteuerten Repression des erythroiden Gen 4.2 (*erythrocyte membrane band protein 4.2*) zur Folge hat (Luger *et al.*, 1997b; Palamarchuk *et al.*, 2005). Die durch die Akt Kinase 1 katalysierte Phosphorylierung wird durch TGF- β (*transforming growth factor beta*) induziert. Hierdurch kommt es zu einem Abbau von Tal1, der über den Ubiquitin/Proteasom Pfad verläuft (Wolffe 1999; Terme *et al.*, 2009). Die Phosphorylierung des Serin 172 des Tal1-Proteins wird durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) katalysiert. Durch die Modifizierung wird die DNA-Bindeaktivität des Tal1-Proteins verringert und somit dessen transkriptionelle Steuerung beeinflusst. Zusätzlich kommt es zu einer Beeinflussung der Interaktion mit Cofaktoren des Tal1-Heterodimerkomplexes, wie der Lysin spezifische Demethylase LSD1, was eine Aktivierung in differenzierten Erythrozyten zur Folge hat.

Gegensätzlich zu diesen Effekten der Phosphorylierung bewirkt eine Acetylierung von Tal1 in der *Helix-Loop-Helix* Region eine verstärkte DNA-Bindung. Die Modifikation wird durch p300 (EP300, *E1A binding protein p300*) und dem p300 assoziierten Cofaktor P/CAF (p300/CBP associated factor) *in-vitro* katalysiert. In MEL-Zellen (*murine erythroleukemia cells*) konnte gezeigt werden, dass Tal1 zusammen mit dem SIN3A-Protein interagiert und zusammen mit HDAC1 (histone deacetylase 1) einen Co-Repressor-Komplex von Tal1-Zielgenen bildet. Durch die Interaktion von Tal1 mit p300 entsteht ein Co-Aktivator-Komplex. In Folge der durch P/CAF katalysierten Acetylierung des Tal1-Proteins kommt es zu einer Transkription von Tal1-Zielgenen und Differenzierung von MEL-Zellen (Huang *et al.*, 1999; Huang and Brandt 2000).

2.9 Epigenetik

Der Begriff der Epigenetik wurde durch Conrad Wellington im Jahr 1942 eingeführt und dafür benutzt, um den Prozess der Interaktion der genetischen Information eines Organismus, dem Genotyp, mit der Umwelt zu beschreiben durch den Phänotyp

ausgebildet wird. Zwischenzeitlich wurde diese Definition erweitert und aktuell werden unter dem Begriff der Epigenetik alle vererbaren Chromosomenmodifikationen zusammengefasst, die nicht auf einer Veränderung der DNA-Sequenz eines Organismus beruhen und dadurch die Genexpression beeinflussen. Die epigenetische Information wird durch reversible biochemische Modifikation der DNA (DNA-Methylierungen) und durch kovalente Modifikationen der Histone (Methylierung, Phosphorylierung, Acetylierung, Citrullinierungen und Ubiquitinierung) bestimmt. Durch diese posttranslationalen Veränderungen wird die Struktur des Chromatins definiert. Hierdurch wird beispielsweise bestimmt, ob Transkriptionsfaktoren an Bindestellen von Promotoren binden können, d.h. ob ein Gen aktiv bzw. inaktiv ist (Murrell *et al.*, 2005). Die Epigenetik spielt eine essentielle Rolle bei einer Regulation einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie beispielsweise der Genregulation (Holliday and Pugh 1975), der Zell-Differenzierung (Meissner 2010) oder dem *genomic imprinting* (Surani *et al.*, 1984). Die epigenetischen Informationen können dabei während der Zellteilung von der Mutterzelle an die Tochterzelle weitergegeben werden.

Der Epigenetik kommt eine essentielle Bedeutung bei der Aufrechterhaltung der normalen Zellphysiologie zu und daher können Störungen in den epigenetischen Kontrollmechanismen, beispielsweise durch die Entstehung neuer und fehlerhafter epigenetischer Markierungen (DNA-Methylierung und Histonmodifikationen), zu der Entstehung von Krankheiten wie z.B. Krebs beitragen.

Von den verschiedenen Mechanismen der epigenetischen Regulation soll nachfolgend die Bedeutung der Organisationsstruktur des Chromatins und der Histonmodifikationen näher erläutert werden.

2.10 Organisationsstruktur des Chromatin

In eukaryotischen Zellen ist das genetische Material in einer komplexen Struktur organisiert, die aus DNA und Proteinen besteht und in einem speziellen Kompartiment, dem Nukleus, lokalisiert ist. Diese Struktur bzw. Organisationsform wird als Chromatin bezeichnet. Die Organisationsstruktur kann dabei als eine Serie von mehreren übergeordneten, organisierten Ebenen beschrieben werden (Arents and Moudrianakis 1993; Felsenfeld and Groudine 2003; Luger and Richmond 1998). An deren Basis steht die DNA-Sequenz, die durch Cytosin Methylierung modifiziert wird (Luger *et al.*, 1997b; Law

and Jacobsen 2010). Durch die Windung einer etwa 147 Basenpaare langen DNA-Sequenz um ein Histonoktamer kommt es zur Bildung eines Nukleosoms (Längst and Becker 2004; Luger *et al.*, 1997b). Eine etwa 50 Basenpaare lange Linker DNA-Sequenz verbindet zwei nahegelegene Histon Partikel miteinander. Diese Linker DNA ist mit H1 Histonen assoziiert, die als Linker-Histone bezeichnet werden (Kouzarides 2007; Wolffe 1999). Die vier Histon Hauptklassen H2A, H2B, H3 und H4 bilden ein Histonoktamer. Histone sind kleine (11-14 kDa) , sehr basische Proteine, die aus dem hohen Aminosäuregehalt an Lysin und Arginin resultiert. Die Histone setzen sich aus drei Domänen zusammen, die sehr basischen und unstrukturierten N- und C- terminalen Domänen und die hydrophobe, zentral gelegene, globuläre Domäne die eine α -Helix ausbildet (Cuthbert *et al.*, 2004; Luger *et al.*, 1997a). Diese ist verantwortlich für Histon-Histon Interaktionen. Durch ionische Wechselwirkungen kommt es zu einer Bindung zwischen den Histonen und den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA (Allis *et al.*, 2007; Widom 1989). Die Bindung der DNA an den Kernbereich der Histone ist dabei nicht sequenzspezifisch. Vielmehr basiert diese auf Wasserstoffbrückenbindungen und nicht polaren Wechselwirkungen zwischen der DNA und den Histonen (Nakayama *et al.*, 2001; Arents and Moudrianakis 1993; Rea *et al.*, 2000; Luger and Richmond 1998). Durch eine schlaufenförmige Aufwicklung der Kern-Histone mit dem H1 Histon kommt es zu der Entstehung der sogenannten 30 nm-Faser, die auch als Solenoid bezeichnet wird. Durch eine weitergehende Komplexierung und Schlaufenbildung kondensiert das Chromatin, bis es zu der Entstehung der Chromosomen kommt (Luger *et al.*, 1997b). In Abhängigkeit von dem Kondensationsgrad des Chromatin wird zwischen Hetero- und Euchromatin unterschieden. Stark kondensierte Bereiche werden als Heterochromatin bezeichnet und diese sind weitgehend transkriptionell inaktiv (Heitz, 1928). Das weniger stark verpackte, d.h. dekontensierte Euchromatin umfasst den transkriptionell aktiven Teil des Chromatins. Dieser höhere Organisationsgrad des Chromatin hat einen entscheidenden Einfluss auf zelluläre Prozesse, wie z.B. die Transkription, Replikation, DNA-Reparatur und Rekombination (Luger 2006).

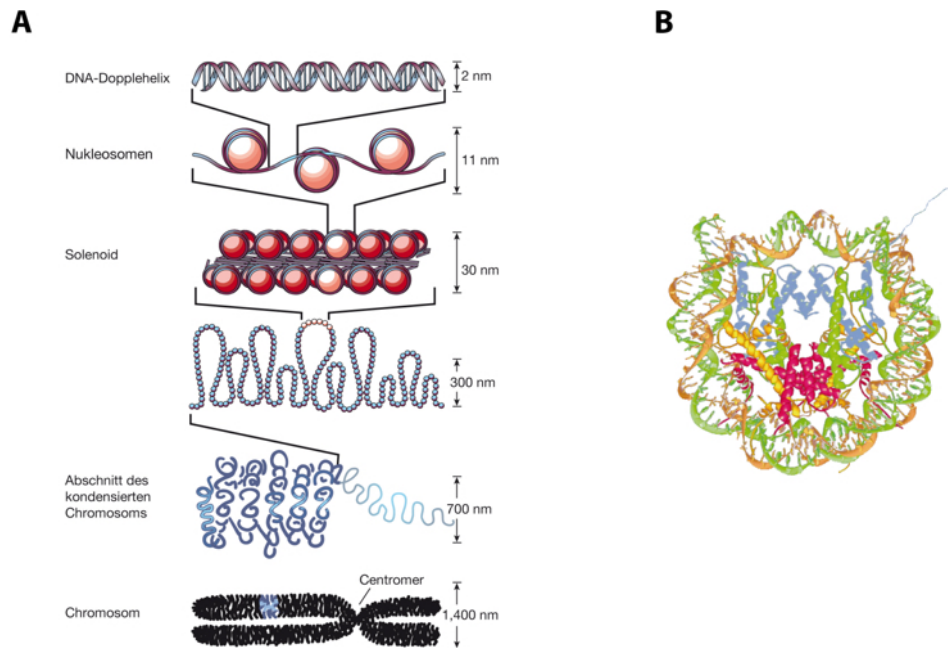


Abb. 2.5: Schematische Darstellung des Organisationsgrades der Chromatin- und Nucleosomenstruktur. (A) Struktureller Aufbau des Chromatin in eukaryotischen Zellen. Die DNA wird um die Histonproteine gewickelt und bildet Nucleosomen, die kettenförmig aneinander gereiht sind. Durch eine weitergehende Kompaktierung kommt es zu der Bildung von Solenoiden (30 nm-Faser). Durch eine weitergehende Schleifenbildung entsteht der höchste Kondensationsgrad, das Chromosom. **(B)** Struktur eines Nucleosoms. Das Nucleosom Grundpartikel besteht aus je zwei Molekülen H2A, H2B, H3 und H4, die zur Bildung eines Oktamers führen und um die eine 147 bp lange α -Helix DNA-Sequenz gewunden ist. Modifiziert nach (Felsenfeld *and* Groudine, 2003).

2.11 Modifikation der Histone

Die Beschreibung posttranslationaler modifizierter Histone erfolgte bereits Mitte der 1960er Jahre. Durch die Untersuchung von Histonen aus Kalbsthymus konnten zunächst methylierte und etwas später ebenso acetylierte Lysine nachgewiesen werden (ALLFREY *et al.*, 1964; MURRAY 1964). Seitdem wurden weitere Modifikationen der Histone wie Methylierung, Biotinylierung, Citrullinierung, Phosphorylierung, Prolin-Isomerisierung, SUMOylierung und ADP-Ribosylierung beschrieben (zusammengefasst in (Kouzarides 2007)). Aus den durch verschiedene Enzymen katalysierten Modifikationen resultiert die Etablierung eines charakteristischen und hochvariablen Muster der posttranslationalen Histonmodifikationen. Diese haben eine selektive Bindung von aktivierend oder reprimierend wirkenden Chromatin-assoziierten Proteinen zur Folge. Durch diesen *histone code* wird der Informationsgehalt der genetischen DNA erhöht (T and Allis 2001). Jede der Histonmodifikationen besitzt eine spezifische Funktionen bei der transkriptionellen

Regulation von Genen. Neben der DNA-Methylierung, sind die Histon Acetylierung und die Methylierung die am besten charakterisiertesten epigenetischen Modifikationen. Der Histon-Acetylierung der Lysine wird mit einer erhöhten Gen Expression in Verbindung gebracht. Aus der Acetylierung resultiert eine Ladungsänderung des Lysin, die eine gelockerte nukleosomale Struktur und damit Zugänglichkeit an zu regulierende Promotoren zur Folge hat.

Die Lysin-Methylierungen konnte sowohl mit einer Gen-Aktivierung bzw. Reprimierung in Verbindung gebracht werden, in Abhängigkeit des modifizierten Aminosäurerest bzw. von dessen Umfang. Die Einflüsse auf die Transkription sind unterschiedlich, je nachdem ob ein Mono-, di-, trimethylierter Status (me1, me2 und me3) vorliegt.

Die Arginin-Seitenreste der Histone können Mono- und Dimethyliert werden, wobei bei einer Dimethylierung zwischen einer asymmetrischen oder symmetrischen Methylierung unterschieden wird. Diese Reaktion wird durch eine Enzymklasse katalysiert, die als Protein Arginin N- Methyltransferase (PRMTs) bezeichnet wird (Kouzarides 2007). Methylierungen können in einem als Deiminierung bezeichneten Prozess zu Citrullin umgewandelt werden. Gesteuert wird diese Reaktion durch die Proteine aus der Familie der Peptidyl-Arginin-Deiminasen (PADs) (Cuthbert *et al.*, 2004). Die N-terminalen Lysin und Arginin-Aminosäurereste der Histone sind dahingehend von besonderer Bedeutung, da sie einer Vielzahl von kovalenten Modifikationen unterliegen, aus denen eine gegenseitige Beeinflussung resultiert. Dabei können sie sich unabhängig voneinander wirken, sich gegenteilig ausschließen oder kooperativ wirken. Bei der Acetylierung der Aminosäurereste K4, K9, K14 und K18 auf dem Histon H3 durch Histon-Acetyltransferasen konnte eine verstärkte Modifikation der anderen Lysine nachgewiesen werden. Die Acetylierung der Lysine ist generell mit einer verstärkten Genexpression verbunden, da diese Modifikation zu einem geöffneten Chromatinstatus führt. Aus dem Entfernen der Acetylierung, durch Enzyme der Familie der Histondeacetylasen (HDAC), resultiert eine kompakte Chromatinstruktur und damit eine verringerte Genexpression. Ein gut untersuchtes Beispiel für eine wechselseitige und sich gegenseitig ausschließende Histonmodifikation ist die Methylierung bzw. Acetylierung des Lysin 9 im Histon 3 (H3K9me und H3K9ac (Allis *et al.*, 2007). Ein erhöhter Anteil an H3K9 Methylierung tritt in allen bisher untersuchten eukaryotischen Systemen auf, ausgenommen von *S.cerevisiae*, und diese Markierung stellt sich der H3K9 Acetylierung gegenüber. Die Methylierung ist mit einer Repression und die Acetylierung mit der Aktivierung der Transkription

verbunden (Nakayama *et al.*, 2001; Rea *et al.*, 2000). Die Acetylierung und Methylierung von H3K9, die Phosphorylierung von H3S10 und die Acetylierung H3K14 sind ein Beispiel für eine sich gegenseitige beeinflussende Histonmodifikation *in cis*, das bedeutet auf dem gleichen Histonstrang. Verschiedene Enzyme sind für die Phosphorylierung des Histon H3S10 verantwortlich, unter anderem aus dem Aurora Kinase B und dem MAP Kinase Pfad (Passegué *et al.*, 2003; Alenzi *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2000; Orkin and Zon 2002; Cheung *et al.*, 2000; Mikkola and Orkin 2006). Die Phosphorylierung von H3S10 fördert die Acetylierung des Aminosäurerest H3K14 durch Gcn5 (Bryder *et al.*, 2006) und blockiert die Acetylierung von H3K9 (Edmondson *et al.*, 2002). Zusätzlich verhindert die Phosphorylierung von H3S10 die Methylierung durch SUV39H1 und umgekehrt wirkt die Dimethylierung von H3K9 antagonistisch auf die Phosphorylierung von H3S10.

2.12 Peptidyl-Arginin-Deiminasen (PADIs)

Die Enzyme der Familie der Peptidyl-Arginin-Deiminasen (PADIs) katalysieren die posttranslationale Modifikation von Peptidyl-Arginin Aminosäure Resten zu einem Citrullin Rest, in einem Prozess der als Citrullinierung bzw. Deiminierung bezeichnet wird (Abb. 2.7).

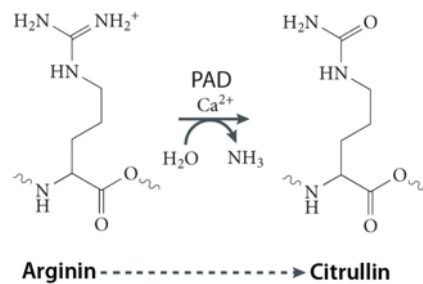


Abb. 2.6: Mechanismus der durch die PAD Familie katalysierten Arginin-Deiminierung. Arginin Deiminasen sind Ca²⁺-abhängige Enzyme, die antagonistisch zu Arginin-Methylierungen von Histonen, einen als Demethyliminierung bezeichneten Prozess katalysieren. Das Produkt der katalysierten Reaktion ist Citrullin. Modifiziert nach (Klose and Zang, 2007).

Citrullin ist eine nicht Standard Aminosäure, da diese nicht während der Translation in Proteine inkorporiert wird. Die Modifikation bzw. die Umwandlung des Arginins zu einem Citrullin verändert die Ladungszustände der Aminosäure. Arginin ist eine relativ basische Aminosäure, die aus der Guanidin Funktionalität in der Seitenkette resultiert, die im physiologischen Zustand leicht protoniert werden kann. Die durch die Peptidyl-

Deiminasen katalysierte Entfernung einer Imino-Gruppe hat eine Ladungsveränderung zur Folge. Die hydrophile Citrullin-Gruppe besitzt eine neutrale Ladung und diese posttranslationale Veränderung hat vielseitige Effekte der modifizierten Proteine zur Folge. Die Umwandlung von Arginin zu Citrullin bewirkt einen Masse Verlust von 1Da pro modifizierten Arginin-Rest. Der Verlust der positiven Ladung hat einen Einfluss auf die allgemeine Ladungsverteilung, den isoelektrischen Punkt, sowie auf die ionischen und Wasserstoffbrückenbindungen der modifizierten Proteine. Dies führt zu veränderten intra- und intermolekularen Wechselwirkungen bis hin zu einem Einfluss auf die Tertiärstruktur des Proteins (Tarcsa *et al.*, 1996; van Venrooij and Pruijn 2000).

Die Familie der Peptidyl-Arginine-Deiminasen besteht aus insgesamt 5 Isoenzymen, deren Aktivität alle von Ca^{2+} abhängig ist. Alle Gene der PADI-Familie sind auf einem einzelnen Gen Cluster des humanen Chromosom 1 lokalisiert (Chavanas *et al.*, 2004; Vossenaar *et al.*, 2003). Die Isoformen besitzen eine hohe Sequenzhomologie, mit einer Sequenzidentität von 50 – 60 % auf Aminosäure-Ebene, allerdings unterscheiden sie sich durch ihr Expressionsmuster in Geweben. PADI1 wird hauptsächlich in der Milz, Thymus und Epidermis exprimiert (Guerrin *et al.*, 2003). Das Enzym PADI2 wird stark im Nervensystem, den Skelettmuskeln, dem Gehirn und hämatopoetischen Zellen exprimiert (Watanabe *et al.*, 1988; Nagata and Senshu 1990; Ishigami *et al.*, 2002). PADI3 ist detektierbar in Haarfollikeln und steuert dort die Funktion des Proteins Trichohyalin (Kanno *et al.*, 2000). PADI4 wird in verschiedenen hämatopoetischen Zellen exprimiert und besitzt als einziges Protein der PADI-Familie ein Kernlokalisierungssignal (Nakashima *et al.*, 2002). PADI6 wird unterem anderem im frühen Embryostadium exprimiert, allerdings konnte noch keine Funktion zugeordnet werden (Wright *et al.*, 2003).

2.13 Peptidyl-Arginin-Deiminase, Typ IV (PADI4)

Das PADI4-Protein wurde erstmalig in HL-60 Zellen identifiziert, wo während der Differenzierung dieser Zellen zu Granulozyten bzw. Monozyten eine Zunahme der enzymatischen PADI4-Aktivität festgestellt wurde (Nakashima *et al.*, 1999). In der Maus und im Menschen wird PADI4 hauptsächlich in hämatopoetischen Geweben, dem Knochenmark und der Milz sowie in Neutrophilen, Eosinophilen und Monozyten im peripheren Blut exprimiert (Nakashima *et al.*, 2002; Vossenaar *et al.*, 2004;

Suzuki *et al.*, 2003).

2.14 PADI4-Proteinstruktur

Durch eine Kristall-Strukturanalyse von PADI4 konnte gezeigt werden, dass das Protein in eine N- und C-terminale Domäne untergliedert werden kann. (Arita *et al.*, 2004) (Abb. 2.8). Die N-terminale Domäne (Met1-Pro300) wird weiter in zwei Immunglobulin-ähnliche Strukturen unterteilt, die als Subdomäne 1 und 2 bezeichnet werden. Die C-terminale Domäne (Asn301-Pro663) bildet eine als α - β Propeller bezeichnete Struktur.

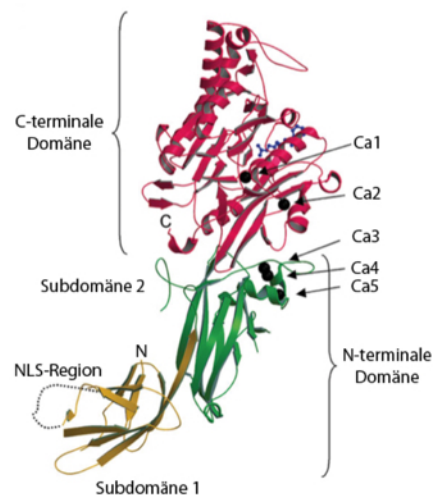


Abb. 2.7: Kristallstruktur des PADI4-Proteins. Repräsentation der monomeren Form des PADI4 Substrat Komplex. Fünf Ca^{2+} Ionen (Ca1-Ca5) sind als schwarze Punkte und das Substrat N-alpha-Benzoyl-L-ethyl ester hydrochlorid (BAEE) als dunkelblaues Gittermodell dargestellt. Die N-terminale Domäne beinhaltet die beiden Subdomänen 1 (gelb) und 2 (grün), sowie das Kernlokalisierungssignal (NLS), gezeigt in Form einer gepunkteten Linie. Die C-terminale Domäne des PADI4-Proteins ist rot dargestellt (Arita *et al.*, 2004).

Die C-terminale katalytische Domäne des PADI4-Proteins ist die am stärksten konservierte Domäne des Moleküls. (Vossenaar *et al.*, 2003). PADI4 besitzt fünf Ca^{2+} -Bindestellen, die als Ca1 – Ca5 bezeichnet werden, wobei die Bindung in kooperativer Weise erfolgt (Arita *et al.*, 2004; Kearney *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2011). Durch die Bindung von Ca^{2+} kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins.

2.15 PADI4-Substrate

Für die enzymatische Aktivität des PADI4-Protein ist es notwendig, dass zwei Monomere

dimerisieren (Arita *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2011). Zu den durch PADI4 citrullinierten Substraten zählen sowohl Histon-Proteine am H3 und H4 Schwanz, als auch Nicht-Histon-Proteine. Zu diesen Nicht Histon-Proteinen gehört das Histon-Chaperon, Nucleophosmin 1 (NPM1), *Inhibitor of Growth* (ING-4), Glykogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3 β) und das humane 40S ribosomale Protein S2 (RPS2). Das NPM1-Protein ist an der Centrosomen Verdoppelung und Regulation der Ribosomenbiogenese beteiligt (Hingorani *et al.*, 2000; Okuda *et al.*, 2000). In Folge einer DNA-Beschädigung kommt es zu einer von PADI4 katalysierten Citrullinierung eines Arginin-Seitenrests von NPM1, woraus eine Translokation des Proteins aus dem Nukleolus in das Nukleoplasma resultiert (Tanikawa *et al.*, 2009). Das Tumorsupressorprotein *Inhibitor of Growth* (ING4) ist ein weiteres Ziel der durch das PADI4-Protein katalysierten Citrullinierung. ING4 bindet über sein Kernlokalisierungssignal an p53 und erhöht hierdurch dessen transkriptionelle Aktivität (Zhang *et al.*, 2005). In Folge einer Citrullinierung des ING4-Proteins im Bereich des Kernlokalisierungssignal wird die Interaktion mit p53 unterbunden und hierdurch die transkriptionelle Aktivität von p53 reduziert (Guo and Fast 2011).

Die Glykogen Synthase Kinase 3 beta (GSK3 β) ist ein Interaktionspartner von PADI4 und Ziel einer spezifischen Citrullinierung von Arginin-Seitenresten am N-Terminus des Proteins. GSK3 β ist hauptsächlich im Cytosol lokalisiert, allerdings wird ein Teil des Proteins in den Nukleus transloziert, wo es unter anderem an der Apoptoseregulation beteiligt ist (Bijur and Jope 2003; Meares and Jope 2007). Nach einer PADI4 katalysierten Citrullinierung von GSK3 β kommt es zu einer Akkumulation bzw. Retention des Proteins im Nukleus. In Folge eines PADI4 *knock-down* in der Brustkrebs-Zelllinie MCF7 konnte eine reduzierte GSK3 β Proteinkonzentration und eine Aktivierung des TGF- β Signalweges festgestellt werden. Zudem war das invasive Potential der Brustkrebs-Zellen erhöht (Stadler *et al.*, 2013).

Die Citrullinierung des humanen ribosomalen Protein S2 (RPS2) durch PADI4 erfolgt in der gleichen Aminosäure-Region einer durch die Protein Arginin Methyltransferase PRMT3 katalysierten Methylierung. Die Methylierung ist essentiell für die Ribosom Biogenese (Swiercz *et al.*, 2005; Bachand *et al.*, 2006) und eine Citrullinierung stellt möglicherweise eine antagonistische Regulierung dieses Prozesses dar (Guo *et al.*, 2011).

2.16 PADI4 Interaktion mit transkriptionellen Cofaktoren

Neben den beschriebenen Einflüssen der durch PADI4 katalysierten Citrullinierungen bewirkt die Interaktion mit Cofaktoren bzw. deren Modifikation einen direkten Einfluss auf die Transkription von Zielgenen. Die Transkription von nukleären Rezeptoren wird durch die Rekrutierung von mehreren Coaktivatoren zu den Promotoren von spezifischen Zielgenen gesteuert. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass ein Komplex bestehend aus dem p160 Coaktivator Protein GRIP1 (Glucocorticoid Rezeptor Protein 1), P300/CBP und der Protein Arginin Methyltransferase 4, PRMT4, synergistisch auf die Aktivierung von Nuklear Rezeptoren wirken (Chen *et al.*, 2000). Durch eine PRMT4 gesteuerte Methylierung der GRIP1 Bindungsdomäne (GBD) in dem Protein P300 wird die molekulare Interaktion von GRIP1 und p300 inhibiert. PADI4 kann diese Methylierung von GBD entfernen bzw. citrullinieren und hierdurch die GRIP1-p300 Interaktion verstärken. Diese Methylierung und Deiminierungen sorgen hierdurch für eine Regulation der Östrogen-Rezeptor vermittelten Transkription (Lee *et al.*, 2005b). Durch die Interaktion mit Histone Deacetylasen, einer Gruppe von Enzymen die mit einer transkriptionellen Repression von Zielgenen assoziiert ist, bildet PADI4 einen Co-Repressor Komplex auf dem Östrogen abhängigen *pS2*-Promotor. Aus der Interaktion von PADI4 mit HDAC2 resultiert ein repressives transkriptionelles Chromatinumfeld. Beide Proteine werden simultan an den *p21*-Promotor rekrutiert und agieren als Co-Repressoren der Genexpression. Nach einer UV vermittelten Beschädigung der DNA dissoziieren beide Faktoren von dem Promotor, woraus eine Zunahme der Histon Arginin-Methylierung und der Lysin-Acetylierung resultiert. Neben der vorrangig beschriebenen PADI4 Funktion als transkriptioneller Co-Repressor konnte durch die Interaktionsanalyse mit dem Protein Elk-1 erstmals eine Wirkung als Co-Aktivator beschrieben werden. PADI4 und Elk-1 binden gemeinsam auf dem *c-fos* Promotor. Nach einer Stimulation durch den epidermalen Wachstumsfaktor EGF (*epidermal growth factor*) kommt es zunächst zu einer Citrullinierung des Elk-1-Protein. Diese katalytische Aktivität von PADI4 befördert die Phosphorylierung von Elk-1, worauf die Acetylierung des Histon H4 verstärkt wird und schließlich zu einer transkriptionellen Aktivierung des *c-fos* Gens führt (Zhang *et al.*, 2011).

2.17 PADI4 katalysierte Histonmodifikation

PADI4 deiminiert die Kernhistone und Nucleosphosmin/B23 in Neutrophilen, in Abhängigkeit von einem Calciueinstrom in die Zellen. (Hagiwara *et al.*, 2002; Nakashima *et al.*, 2002). Die durch PADI4 katalysierten Histonmodifikationen sind auf dem N-terminalen Ende der Histone H2A (R3), H3 (R2, 8, 17, 26) und H4 (R3) lokalisiert (Cuthbert *et al.*, 2004; Hagiwara *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2004). Die Arginine Aminosäurereste dieser PADI4 Histon Deiminierungen sind auch Ziele einer als Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs) bezeichneten Enzym Familie. Von den bisher zehn identifizierten PRMTs konnten acht eine methylierende Funktion zugeordnet werden (Lee *et al.*, 2005a; Bedford 2007). Glycin-Arginin-reiche Sequenzen (GAR-Motive) sind bevorzugte Substrate einiger PRMTs (Najbauer *et al.*, 1993). Die Arginin-Methylierung erfolgt über die Guanido-Gruppe auf drei verschiedene Arten: Monomethylierung (MMA), symetrische Dimethylierung (sDMA) und assymetrische Dimethylierung (aDMA). Einige dieser Modifikationen beinhalten z.B. die aktivierende Modifikation H3R17me2a und H3R26me2a durch PRMT4, sowie die repressive Markierung H3R2me2a durch PRMT6 (Bedford and Richard 2005; Di Lorenzo and Bedford 2011; Guccione *et al.*, 2007). Das PADI4-Protein ist ein Antagonist dieser durch die PRMTs katalysierten Arginin-Methylierungen. Bei der als Demethylinierung bezeichneten Reaktion werden monomethylierte Arginine (MMA) zu Citrullin umgewandelt. PADI4 zeigt keine enzymatische Aktivität bei dimethylierten Argininen (Cuthbert *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Die Aktivität von PADI4 hinsichtlich der Modifikation von monomethylierten Argininen (MMA) wurde in mehreren Studien untersucht. Diese Ergebnisse wurden jedoch nachfolgend in Frage gestellt, da die Ergebnisse auf *in-vitro* Analysen mit synthetischen Peptiden basieren. (Raijmakers *et al.*, 2007; Kearney *et al.*, 2005). Deiminierte Histone können nicht mehr durch PRMTs methyliert werden, wodurch PADI4 indirekt antagonistisch zu einer Arginin-Methylierung agiert. Die Bedeutung der antagonistischen Wirkungsweise von PADI4 und PRMTs konnte für die transkriptionelle Regulation von Östrogen abhängigen Genen beschrieben werden. Steroidhormon-Rezeptoren, wie der Östrogenrezeptor Alpha (ER α), sind eine Klasse von Signal aktivierten, DNA-bindenden Transkriptions-Faktoren. Diese reagieren auf die Bindung von Liganden, wie z.B. Östrogen (Mangelsdorf *et al.*, 1995). Der Östrogen-Signalweg reguliert das *pS2*-Gen durch eine koordinierte Rekrutierung von mehreren Cofaktoren zu dem Promotor (Métivier *et al.*, 2003) (Abb. 2.9).

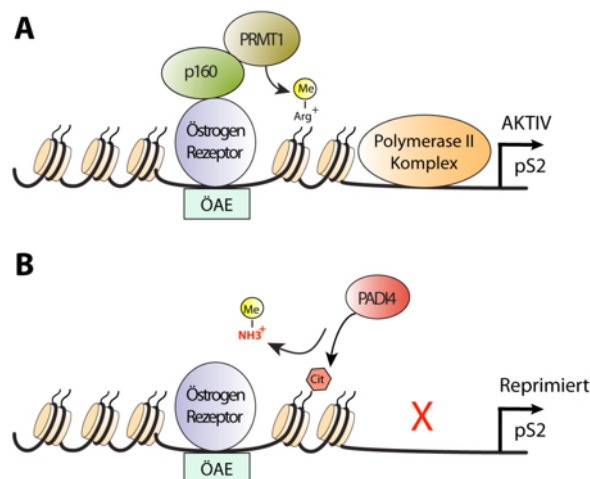


Abb. 2.8: Schematische Darstellung der antagonistischen Transkriptionsregulation durch eine Protein Arginin Methyltransferase und PADI4. (A) Nach einer Rekrutierung durch den Östrogenrezeptor an den *pS2*-Promotor, methyliert PRMT1 den Histon Aminosäurerest H4R3. Hierdurch kommt es zu einer Chromatin-Remodullierung und einer erhöhten Zugänglichkeit des Chromatins. Die basale Transkriptionsmaschinerie, der RNA-Polymerase-II-Komplex, bindet an den Promotor und aktiviert die Transkription. (B) Durch die Rekrutierung von PADI4 an den *pS2*-Promotor kommt es zu einer Katalyse von Methylarginin (MeArg) zu Citrullin (Cit) und der Freisetzung von Methylamin (MeNH₃). Bedingt durch die Citrullinierung wird die Fähigkeit der RNA-Polymerase-II-Komplex an den Promotor zu binden verringert und somit die Transkription reprimiert, ÖRE = Östrogenantwortelement (engl. ERE = *estrogen response element*). Abb. modifiziert nach (Wysocka *et al.*, 2006).

Durch die Rekrutierung von PRMT4 an den *pS2*-Promotor kommt es zu einer Methylierung des Histon H3R17, die mit der Bindung eines aktiven RNA-Polymerase-II-Komplexes und einer aktiven Transkription einhergeht (Bauer *et al.*, 2002). Nach der Bindung des PADI4-Proteins kommt es zu der Citrullinierung von Arginin Methylseitenresten, aus der Konformationsänderungen der Histone resultieren. Die Fähigkeit der RNA-Polymerase-II an den Promotor zu binden wird verringert und es kommt zu einer reprimierten Transkription (Abb. 2.9B) (Wysocka *et al.*, 2006). Neben diesen spezifischen Citrullinierungen von Histonen bestimmter Zielgene konnte dem PADI4-Protein eine Funktion auf globaler Ebene zugeordnet werden. Bedingt durch die Citrullinierung eines einzelnen Arginin-Seitenrestes des Linker-Histon H1 wird die Nukleosomen Bindefähigkeit unterbunden. Nach einer Ablösung des Histon H1 kommt es zu einer globalen Dekondensation des Chromatin (Christophorou *et al.*, 2014).

2.18 Bedeutung von PADI4 bei Krankheiten

Die Proteine der PADI Familie und deren citrullinierten Substrate sind an einer Vielzahl von

pathogenen Prozessen innerhalb menschlichen Krankheiten beteiligt. Durch die PADI katalysierte Citrullinierung wird die Konformation und die Aktivität der modifizierten Proteine verändert, was in einer Veränderung der physiologischen und biochemischen Aktivität resultiert. Die Rheumatische Arthritis, eine Autoimmunkrankheit, ist unter anderem durch die Generierung einer Vielzahl von Autoantikörper gegen citrullinierte Proteine im Blut der Patienten gekennzeichnet. Im Krankheitsverlauf kommt es bedingt durch einen Entzündungsprozess zu einer Wucherung der Gelenkkapsel Innenhaut (Synovialmembran) und nachfolgend zu einer Destruktion von Knorpeln und Knochen. Durch eine genomweite Analyse von Einzelnukleotid-Polymorphismen konnte eine genetische Assoziation des Haplotyps des PADI4 Gens zur Rheumatischen Arthritis aufgezeigt werden (Suzuki *et al.*, 2003). Die genaue Funktion des PADI4-Protein innerhalb der Krankheit muss jedoch noch weitergehend untersucht werden.

Die Mitglieder der PADI Familie sind mit weiteren Krankheiten assoziiert, wie bei der Multiplen Sklerose. Bei dieser Autoimmunerkrankung kommt es zu einer Demyelinisierung des Zentralen Nervensystems in Folge multifaktorieller Ursachen. Die Beschädigung bzw. die Verringerung der Myelin-Scheiden wurde einer abnormalen Deiminierung des Myelin Basische Protein (MBP) zugeordnet (Moscarello *et al.*, 2007; Wood *et al.*, 1996). Erhöhte Expressionsniveaus von PADI2 und PADI4 wurden in Gehirnextrakten von Multiple Sklerose-Patienten festgestellt und könnten eine Ursache der Hypercitrullinierung sein (Wood *et al.*, 2008; Mastronardi *et al.*, 2006). Des Weiteren konnte eine Citrullinierung des Histon H3 innerhalb der weißen Substanz des Gehirns von MS-Patienten detektiert werden. Die Überexpression des Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) bewirkt dabei die Translokation des PADI4-Proteins in den Nukleus. Transgene Mäuse die TNF- α überexprimieren zeigen ein erhöhtes Niveau an citrullinierten Histonen und einen höheren Anteil an nukleären PADI4 im zentralen Nervensystem bevor es zu einer Demyelinisierung kommt (Mastronardi *et al.*, 2006). Allerdings ist es noch unklar, inwieweit die abnormale Citrullinierung ein pathogener Faktor oder ein begleitendes Phänomen der Multiplen Sklerose ist.

2.19 PADI4 und Krebs

Neben der Bedeutung bei der Rheumatischen Arthritis und der Multiplen Sklerose konnte dem PADI4-Protein auch eine Verbindung zu der Tumorigenese aufgezeigt werden. Durch Gewebeanalyse von Tumorpatienten konnte eine erhöhte PADI4-Expression und eine

erhöhte Citrullinierung festgestellt werden, die allerdings nicht gutartige Tumoren und Nicht-Tumor Geweben umfasste (Chang and Han 2006). Das erhöhte Expressionsniveau korreliert mit einem erhöhten PADI4-Gehalt im Serum und citrullinierten Antithrombin-Anteil bei Patienten mit verschiedenen malignen Erkrankungen. Durch die Citrullinierung von Antithrombin nimmt die Möglichkeit ab, die Aktivität von Thrombin zu inhibieren (Chang *et al.*, 2005). Der Anteil von citrullinierten Antithrombin korreliert mit dem Vorkommen von Tumormarkern und nimmt nach einer Tumorentfernung deutlich ab (Chang *et al.*, 2009). Diese Ergebnisse sind ein Hinweis darauf, dass PADI4 eine Ursache für die erhöhte Blutgerinnung in Krebspatienten darstellt, ausgelöst durch die Citrullinierung von Antithrombin.

Durch die Feststellung, nachdem PADI4 ein Co-Repressor des Tumorsupressorproteins p53 ist und die Transkription von p53 assoziierten Zielgenen steuert, haben dazu beigetragen das dem Protein eine potentielle Bedeutung bei der Tumorigenese zugeordnet wird. Dieser mögliche Zusammenhang wird durch Ergebnisse verstärkt, wonach die Expression des PADI4-Proteins direkt durch p53 gesteuert wird, was auf eine negative *feedback loop* Regulation hindeutet (Tanikawa *et al.*, 2009).

2.20 Zielgene von Tal1

Für den Transkriptionsfaktor Tal1 existieren eine große Anzahl an identifizierten Zielgenen, die im Zusammenhang der hämatopoetischen Entwicklung (*c-kit*), der erythroiden Differenzierung (*GYPA* und *p4.2*) oder der Beeinflussung der Proliferation der T-ALL Zelllinie Jurkat (*NKX3.1*) stehen. In der vorliegenden Arbeit konnte das Verständnis der biologischen Funktion von Tal1 in der Hämatopoese durch eine Identifikation weiterer Zielgene erweitert werden. Hierzu gehören das Zytokin Signaltransduktor-Protein *IL6ST*, sowie der Transkriptionsfaktor *CTCF* und daher werden die Funktionen der beiden Gene nachfolgend erläutert.

2.21 IL6ST/GP130

Interleukine sind hormonähnliche Signalmoleküle die z.B. die Proliferation oder Differenzierung der hämatopoetischen Zellen reguliert. Die Moleküle entwickeln Ihre

biologische Funktion durch die Bindung an spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche, die daraufhin aktiviert werden und das Signal intrazellulär weiterleiten. Viele Zytokine zeichnen sich durch Ihre Redundanz und Pleiotropie aus. Zum einen bedeutet dies, dass verschiedene Zytokine die gleichen Effekte in einer Zelle hervorrufen können. Daneben kann ein Zytokin verschiedene Wirkungen auf unterschiedliche Zellen haben.

Das ubiquitär exprimierte Transmembranprotein GP130/IL6ST ist eine Signaltransduktionskomponente des Rezeptor Komplexes der IL-6 Zytokin Superfamilie. Zu diesen Zytokinen gehören unter anderem IL-6, IL-11, IL-27, *leukemia inhibitory factor* (LIF) und der *ciliary neurotrophic factor* (CNTF). GP130/IL6ST kann über zwei Signalwege aktiviert werden, den *classic-* oder auch *canonical-*(Abb. 2.10A) und den *transactivation pathway* (Abb. 2.10B).

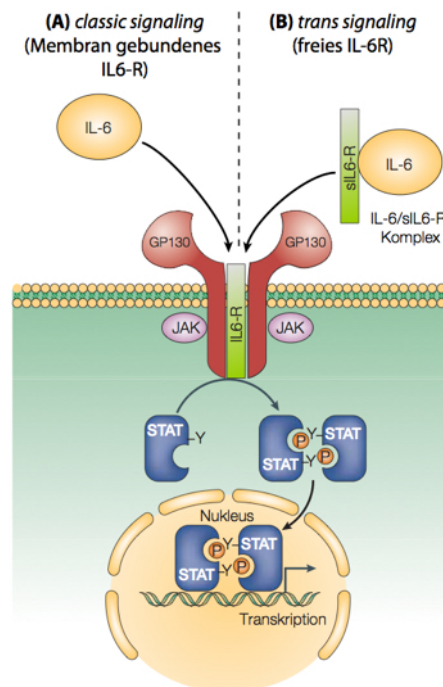


Abb. 2.9 Durch IL-6/GP130 gesteuerte Signaltransduktion über den *classic-* und *trans signaling pathway*. (A) Beim *classic signaling pathway* bindet in der Zelle gelöstes IL-6 Zytokin an den membrangebundenen IL-6R Rezeptor. (B) Der *trans-signaling pathway* basiert auf der Bindung von IL-6 Zytokin an in der Zelle vorkommenden, gelösten IL-6-R (sIL-6R) Rezeptor, der nachfolgend das GP130 Protein bindet und für eine Signaltransduktion sorgt. Der Transkriptionsfaktor STAT wird phosphoryliert, woraus eine Dimerisierung des Proteins und eine Translokation in den Kern resultiert. Dort kommt es zu einer transkriptionellen Regulation von STAT-Zielgenen. Abb. modifiziert nach (Shuai & Liu, 2003).

Zu einer Aktivierung des an anti-inflammatorischen Prozessen beteiligten *classic Pathway* kommt es, wenn IL-6 an den nicht signaltransduzierenden IL6 α -Rezeptor (IL6R) bindet, welches nachfolgend mit GP130/IL6ST dimerisiert. Bei pro-inflammatorischen Prozessen ist der *transactivation Pathway* oder auch das *trans-signaling pathway* involviert (Abb. 2.10B)

(Rose-John and Heinrich 1994; Peters *et al.*, 1998). Die Signaltransduktion wird durch in der Zelle löslich vorliegenden sIL6R vermittelt (sIL-6R, soluble IL-6R). sIL-6R kann auf zwei Wegen gebildet werden, durch alternatives *splicing* und *ectodomain shedding*. Durch alternatives *splicing* entsteht ein mRNA Transkript, dem die Transmembran Domäne fehlt (Lust *et al.*, 1992; Horiuchi *et al.*, 1994). Bei der proteolytische Spaltung von Membran gebundenen IL6R durch die Metalloproteinasen ADAM10 und ADAM17 (*ectodomain shedding*) wird gelöstes IL-6R freigesetzt (Matthews *et al.*, 2003; Althoff *et al.*, 2000). Durch Bindung von IL-6 Zytokin entsteht ein IL-6/sIL-6R Komplex und dieser kann an ein GP130/IL6-ST Transmembran Protein binden und dessen Dimerisierung einleiten.

Durch das *trans-signaling* wird eine Zytokin Signaltransduktion in Zellen ermöglicht, in denen kein Membran gebundenes IL-6R Protein exprimiert wird. Dieser IL6 Signalweg ist hauptsächlich bei Prozessen aktiv, die z.B. inflammatorischen Erkrankungen zugeordnet werden (Rose-John *et al.*, 2006). Sowohl bei dem *classical*- als auch *trans-signaling* kommt es nach der Dimerisierung von GP130/IL6ST zu einer Initialisierung der intrazellulären Signalkaskade (Taga and Kishimoto 1997; Rose-John 2001). Zunächst erfolgt eine Aktivierung von Rezeptor assoziierten Kinasen (JAK1, JAK2 und Tyk2) innerhalb der Zelle. Hierdurch werden die intrazellulären Tyrosin Aminosäurereste des GP130/IL6ST Rezeptors phosphoryliert, die eine Bindestelle für STAT Faktoren mit passender SH2 darstellen. Hauptsächlich sind dies die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3, die durch die Bindung ebenfalls phosphoryliert werden, anschließend dimerisieren und in den Kern translokalisieren. Hier kommt es dann zu einer transkriptionellen Regulation verschiedener Zielgene, die unter anderen an der Proliferationskontrolle, Differenzierungsprozessen, Inflammation und Apoptose beteiligt sind (Mui 1999). Die Aktivierung der STAT-Proteine ist ein streng regulierter Signaltransduktionsprozess, dessen Deregulation der Krebsentstehung zugeordnet wird. In humanen Krebszelllinien und Primärtumoren konnte vor allem konstitutiv aktives STAT3 und STAT5 gefunden werden (Garcia and Jove 1998; Catlett-Falcone *et al.*, 1999; Bowman *et al.*, 2000).

2.22 CCCTC-Bindefaktor (CTCF)

Die Organisationsstruktur des Genoms höherer Eukaryoten, die sich aus inaktiven (Heterochromatin) und aktiven Genbereichen (Euchromatin) zusammensetzt, wurde

bereits einleitend beschrieben. Neben der Chromatinstruktur scheint die räumliche Anordnung der DNA im Zellkern die Funktionalität des Genoms zu beeinflussen (Fraser and Bickmore 2007; Lanctôt *et al.*, 2007). Die Chromosomen sind in einem bestimmten Bereich des Zellkern lokalisiert und unterliegen dynamischen Prozessen der Kondensierung und Dekondensierung. Zusätzlich mit einem bestehenden komplexen Netzwerk aus intra- und interchromosomalen Kontakten ergibt sich eine Zelltypspezifische Genregulation. Diese Komplexität der Chromatin-Interaktionen erfordert Mediatoren, die eine korrekte räumliche und temporäre Genexpression gewährleisten. Hierfür ist unter anderem das multifunktionale Zink-Finger Protein CCCTC-Binddefaktor (CTCF) verantwortlich (Phillips and Corces 2009). Das CTCF-Protein besitzt dabei unterschiedliche Eigenschaften. Hierzu gehört die Funktion als Isolatoren-bindender Faktor (Abb. 2.11).

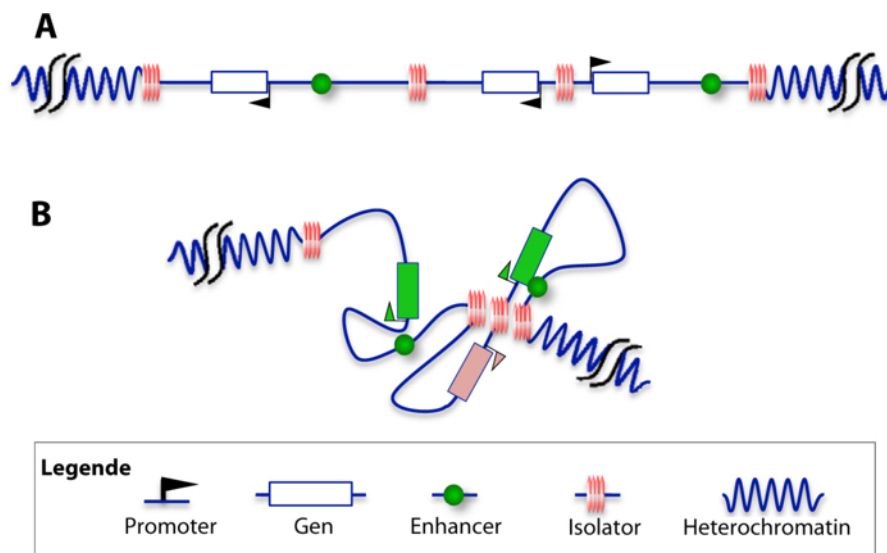


Abb. 2.10: Schematische Übersicht über die Domänenstruktur von aktiven und inaktiven Genbereichen und den an der Genregulation beteiligten Elementen, Isolatoren und Enhancer. (A) Aktive Domänen sind von Heterochromatin Bereichen flankiert. An deren Domänen Grenzen befinden sich Isolator Proteine, wo Sie Interaktionen mit anderen Isolatoren vermitteln können. Die in den aktiven Genen lokalisierten Isolatoren können Enhancer Funktionen blockieren. **(B)** Die Isolatoren organisieren die räumliche Chromatin Anordnung, durch die Interaktion mit anderen Isolatoren oder mit anderen genomischen Strukturen. In Abhängigkeit der hieraus resultierenden Strukturen können Enhancer-Promotor Interaktionen gestört sein, was zu einer Geninaktivität führt (Rot markierte Gene). Umgekehrt kann die Enhancer-Promotor Interaktion gefördert werden, woraus eine Genexpression Aktivierung resultiert (Grün markierte Gene). Modifiziert nach (Herold *et al.*, 2012).

Als Isolatoren werden DNA-Elemente bezeichnet, die eine fehlerhafte Interaktion zweier benachbarter Genregionen verhindert. In Abhängigkeit von der Isolatoren Funktionalität werden diese als Enhancer (aktivierende DNA-Elemente) blockierend oder als chromosomale Barrieren klassifiziert. Enhancer blockierenden Isolatoren unterbinden eine Interaktion der Enhancer mit den Promotoren und verhindern hierdurch eine fehlerhafte transkriptionelle Aktivierung. Durch die Barriere Funktion werden das flankierte Gen und

regulatorische Regionen von den Einflüssen benachbarten Heterochromatin oder repressiv wirksamen Elementen geschützt. Hierdurch werden sogenannte Positionseffekte, d.h. einer veränderten Gen-Expression in Abhängigkeit des Insertionsortes im Chromatin verhindert (Gerasimova and Corces 1996; Bell *et al.*, 1999; 2004). Das CTCF-Protein kann als Isolator über eine Interaktion mit anderen intra- oder intrachromosomalen Isolatoren, sowie mit anderen genomischen Strukturen wie z.B. den Locus Kontroll-Regionen, die Genexpression steuern. In Abhängigkeit der aus der Interaktionen resultierenden Chromatinstrukturen, kann es zu einer Geninaktivität oder Aktivität kommen (Abb. 2.11B). Weitere Funktionen des CTCF Proteins sind die Beteiligung an der genomischen Prägung (*genetic imprinting*). Damit wird die Abhängigkeit der Genexpression beschrieben, je nachdem von welchem Elternteil das Allel stammt. Für den *Insulin-like-growth factor 2 (Igf2)* und die H19 Gene konnte eine solche Steuerung durch eine *Imprinting Control Region (ICR)* gezeigt werden. Das CTCF Protein bindet an mehreren unmethylierten Stellen der ICR und blockiert hierdurch die Aktivität von *Enhancern* (Hark *et al.*, 2000). CTCF wurde aber auch mit malignen Erkrankungen assoziiert, verursacht durch Mutationen in dessen Genlocus. Zudem konnte gezeigt werden, dass der durch CTCF gesteuerte regulative Chromatin Status entscheidend für die Genexpression von Tumorsuppressorgenen ist (Dávalos-Salas *et al.*, 2011; Witcher and Emerson 2009; Butcher *et al.*, 2004). Für den Tal1 Locus konnten durch ChIP-Sequenzierungen (ChIP-Seq) inter- und intrachromosomale Chromatin Schleifen in hämatopoetischen und leukämischen Zellen detektiert werden, die eine Expressionskontrolle von Tal1 bewirken (Patel *et al.*, 2013). Für erythroide Zellen konnte gezeigt werden, dass CTCF auf dem Tal1-Locus weit entfernte *Enhancer* zu Promotor Interaktionen fördert, wohingegen diese in humanen T-Zell Leukämie Zellen verhindert werden (Zhou *et al.*, 2013). Zusätzlich vermittelt der T-Zell spezifische Transkriptionsfaktor *c-maf* eine interchromosomale Interaktion des Tal1 Promotors mit einem T-Zell spezifischen regulatorischen Element (Patel *et al.*, 2013). Durch diese Chromatin Konformationen kommt es zu einer fehlerhaften Tal1 Expression in T-Zellen.

2.23 Zielsetzung der Arbeit

Der Transkriptionsfaktor Tal1 (*T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1*) ist ein essentieller Regulator der Hämatopoese. (Visvader *et al.*, 1998; Robb *et al.*, 1995; Porcher *et al.*, 1999; Shivdasani *et al.*, 1995). Die durch chromosomale Translokationen hervorgerufene ektope Expression von Tal1 in T-Zellen bedingt die Entstehung von akuter T-Zell Leukämien in Menschen (Brown *et al.*, 1990; Finger *et al.*, 1989; Palomero *et al.*, 2006). Durch eine gleichzeitige Veränderung von mit Tal1 interagierenden Cofaktoren wie z.B. dem LMO2 Protein kann das onkogene Potential von Tal1 verstärkt werden (Larson *et al.*, 1996). Der Transkriptionsfaktor Tal1 bindet zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren und epigenetischen Cofaktoren an spezifische genregulatorische DNA-Sequenzen von Zielgenen und hat die Funktion eines Aktivators bzw. Repressors (Tijssen *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2009; Wadman *et al.*, 1997; Goardon *et al.*, 2006; Schuh *et al.*, 2005; Huang *et al.*, 1999).

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung eines neuen epigenetischen Cofaktors von Tal1 mittels einer Affinitätsaufreinigung. Die Charakterisierung der biologischen Funktionen des Cofaktors während der hämatopoetischen Differenzierung und bei Leukämien könnte einen Therapieansatz von Tal1-assoziierten Krebserkrankungen darstellen. Ein wesentlicher Aspekt bestand in der Verifikation der Interaktion durch verschiedene experimentelle Studien. Nach einer *knock-down* von Tal1 und dem Cofaktor sollte eine Genexpressionsanalyse zur Bestimmung gemeinsam regulierter Zielgene verwendet werden. Die Rekrutierung des Tal1/Cofaktor-Komplex an die Promotoren von Zielgenen während der hämatopoetischen Differenzierung sollte untersucht werden. Zusätzliche Untersuchungen der durch den Cofaktor katalysierten Histonmodifikationen und Expressionsanalysen der Zielgene während der Differenzierung von hämatopoetischen Vorläuferzellen sollten ein genaueres Verständnis der spezifischen Tal1-Regulation bieten. Durch eine Veränderung der enzymatischen Funktion des aufgereinigten Cofaktors durch niedermolekulare Substanzen sollte der Einfluss auf die Histonmodifikationen der Zielgene und auf das Tal1-abhängige Wachstum von Krebszelllinien bestimmt werden.

3. Material und Methoden

3.1 RNA/DNA-Methoden

3.1.1 Standardmethoden und verwendete Kits

Für die Durchführung molekularbiologischer Standardmethoden wie die Anzucht von Bakterien, Aufreinigung von Plasmid-DNA, Polymerasenkettenreaktion, Modifikation von DNA und Gelelektrophorese wurden, wenn nicht anders angegeben, gemäß den Protokollen von (Sambrock *et al.*, 1989) durchgeführt. Die Aufreinigung von PCR Produkten, Isolierung von Plasmid DNA aus Bakterien, Isolierung von RNA aus eukaryotischen Zellen und das Umschreiben von RNA in cDNA erfolgte unter Verwendung der in Tabelle 3.1 angegebenen *Kits* nach den Angaben des Herstellers.

Tabelle 3.1: Übersicht verwendeter Kits

Bezeichnung des Kits	Anwendung	Hersteller
ChIP DNA Clean & Concentrator	Aufreinigung von ChIP-DNA	Zymo Research, Freiburg
GeneJET™ Plasmid Miniprep	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus 1,5 ml Bakterienkulturen	Fisher Scientific, Schwerte
GeneJET™ PCR Purification Kit	Aufreinigung von PCR-Produkten	Fisher Scientific, Schwerte
GeneJET™ Gel Extraction Kit	Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	Fisher Scientific, Schwerte
GeneJET® Genomic DNA Purification Kit	Aufreinigung von genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
PureLink™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit	Aufreinigung von Plasmid-DNA aus 50 ml Bakterienkulturen	LifeTechnologies, Darmstadt
RNeasy® Mini Kit	Aufreinigung von RNA aus eukaryotischen Zellen	Qiagen, Hilden

3.1.2 Vektoren

pGEX4T.1 Vektor

Der Vektor pGEX4T.1 (GE Healthcare Life Sciences, Uppsala) ist ein Expression-Vektor-

System für *E.Coli*, das einen TAC-Promotor beinhaltet. Vor der multiplen Klonierungsstelle befindet sich die codierende Sequenz für die Glutathion-Transferase, einem 26 kDa großen Protein, wodurch bei der Expression ein N-terminales GST-Fusionsprotein entsteht. Durch die Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) kann die Expression induziert werden.

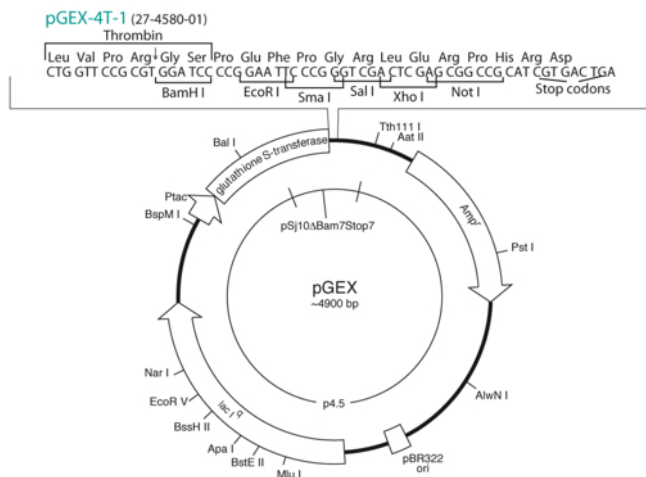


Abb. 3.1: Vektorkarte von pGEX4T-1

Quelle : GE Healthcare Life Sciences, Uppsala)

Der Vektor wird für die Expression von Fusionsproteinen mit der Glutathion-S-Transferase (GST) steht unter der Kontrolle eines chemisch induzierbaren tac-Promoter. Die Multiple-Cloning Site verfügt über eine Thrombin-Erkennungssequenz

Die Klonierung der Tal1 und PADI4 Nukleotidsequenzen erfolgte unter Verwendung der Restriktionsenzyme *BamHI* bzw. *EcoRI* und *XhoI* in den Vektor pGEX4-T1.

Tabelle 3.2: Übersicht der verwendeten Primer für die Klonierung der pGEX4-T1 GST Konstrukte

NAME	ENZYME	NUKLEOTIDSEQUENZ 5'→3'	Tm {°C}
PADI4 N-Term fwd	<i>BamHI</i>	GAGAGGATCCATGGCCCAGGGGACATTG	68,0
PADI4 N-Term rev	<i>XhoI</i>	ATAGAATTCTCAGGGGGTCATGATCCA	63,4
PADI4 C-Term fwd	<i>BamHI</i>	GAGATGGATCCATGGCCCAGGGGACATTG	68,0
PADI4 C-Term rev	<i>XhoI</i>	ATAGAATTCTCAGGGGGTCATGATCCA	63,4
Tal1 1-176 fwd	<i>BamHI</i>	ATATGGATCCATGACCGAGCGGCCGCCG	67,2
Tal1 1-176 rev	<i>XhoI</i>	TATACTCGAGTCACTCATAGGGGGAAGGTCT	63,0
Tal1 176-331 fwd	<i>BamHI</i>	ATATGGATCCGAATGGAGATTACTGATGGTCCC	63,0
Tal1 176-331 rev	<i>XhoI</i>	TATCTCGAGTCAACCGAGGGCCGGCTCCATCGGC	71,9

Tabelle. 3.3: Übersicht der verwendeten Sequenzierprimer für den pGEX4-T1 Vektor

Name	NUKLEOTIDSEQUENZ 5'→3'	GC-Gehalt {%	Tm {°C}
pGEX4T-1 fwd	TATAGCATGGCCTTTGCAGG	50,0	57,3
pGEX4T-1 rev	CGGGAGCTGCATGTGTC	64,7	57,6

Expressionsvektor pcDNA3-2HA

Der Vektor pcDNA3 besitzt den Promoter des humanen Cytomegalievirus (CMV) und zwei Reisisenzkassetten. Vor die multiple Klonierungsstelle (MCS) wurde eine Sequenz zur Expression eines 2HA-Fusionsproteins eingefügt. Für eine Aufzucht in Bakterien ist auf dem Vektor ein Ampicillin Resistenzgen beinhaltet (Abb. 3.2). Zur cDNA Amplifikation von humanen PADI4 wurde der freundlicherweise durch Yanming Wang (Penn State Universität, USA) zur Verfügung gestellte Expressionsvektor PADI4 pSG5-HA verwendet.

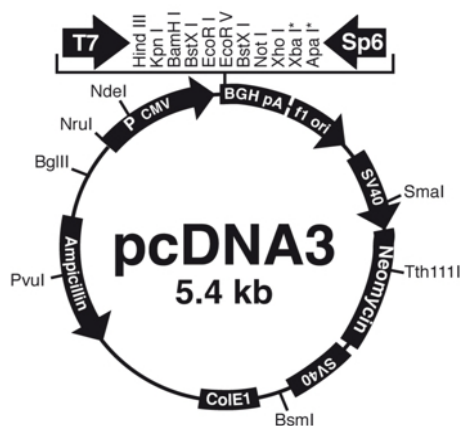


Abb. 3.2: Vektorkarte von pcDNA3-2HA

Quelle: LifeTechnologies (Darmstadt) modifiziert

Der Vektor wird als Expressionskonstrukt in Säugetierzellen verwendet. Am N-Terminus wurde die codierende Sequenz für das HA-Protein eingefügt, wodurch am N-Terminus ein HA Fusionsprotein entsteht, dass z.B. im Western-Blot detektiert werden kann.

Tabelle 3.4: Übersicht der verwendeten Primer für die Klonierung des pcDNA3-2HA PADI4 Konstrukts

NAME	Enzym	NUKLEOTIDSEQUENZ 5'→3'	TM {°C}
hPADI4 fwd	<i>BamHI</i>	ATAGGATCCATGGCCCAGGGGACAT	61,0
hPADI4 rev	<i>XhoI</i>	TATCTCGAGTCAGGGCACCATGTTCCA	61,3

Tabelle 3.5: Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer für pcDNA3-2HA

NAME	NUKLEOTIDSEQUENZ 5'→3'	GC-GEHALT {%}	TM {°C}
T7 fwd	CGAAATTAATACGACTCACTATAG	50,0	55,9
sp6 rev	GCATTTAGGTGACACTATAG	64,7	53,2

Knock-down Vektor psiRNA-h7SK-GFPZeo

Für knockdown Experimente in Säugetierzellen wurden der Vektor psiRNA-h7SK-GFPZeo Vektor der Firma Invivogen (Toulouse, Frankreich) verwendet. Der humane Promoter 7SK

RNA-Polymerase III steuert die Expression der *short-hairpin*-RNA (shRNA). Für eine Selektion in Bakterien und in Säugetierzellen besitzt der Vektor eine GFP-Zeoizin Resistenzkassette. Die spezifischen knockdown Sequenzen wurden unter Verwendung des siRNA Wizard™ Software der Firma Invivogen (San Diego) generiert. Nach einem Oligo-*Annealing* der komplementären Sequenzen wurden diese über eine BbsI-Schnittstelle in den Vektor psiRNA-h7SKFPZzeo kloniert. Die shRNA-Sequenzen enthielten als *Loop*-Sequenz „TCAAGAG“. Als Kontrolle diente eine gegen das β-Galactosidase Gen gerichtete shRNA Sequenz.

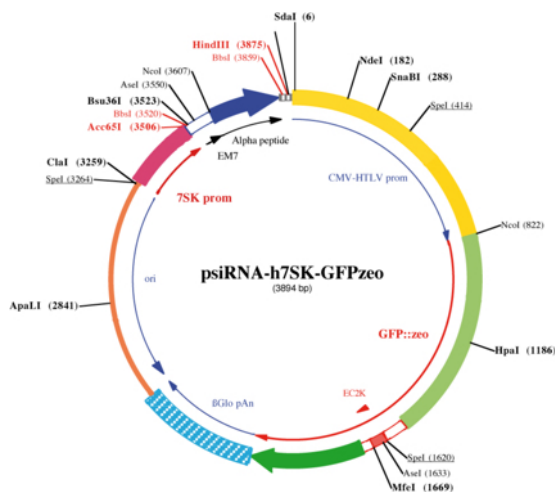


Abb 3.4: Vektorkarte von psiRNA-h7SK-GFPzeo

Quelle: Invivogen (San Diego)

Der psiRNA-Vektor wird für die Herunterregulation von Ziel-mRNA durch die Expression von shRNA Sequenzen verwendet. Die Expression steht unter der Kontrolle eines RNA-Polymerase III-Promotors.

Tabelle 3.6: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid-Sequenzen für eine Klonierung in den Vektor psiRNA-h7SK-GFPZzeo

NAME	NUKLEOTIDSEQUENZ 5' → 3'
shLacZ (Kontrolle)	ACCTC GACAAGAACTAAGCAAGAAT CAAGAGATTCTTGCTTAGTTTCTTGCTT
shPADI4 C5	ACCTC GCGAAGACCTGCAGGACATT CAAGAG ATGTCCTGCAGGCTTCGCTT
shPADI4 C6	ACCTC GCCAACCAGAGCTGTGAAAGAT CAAGAG ATCTTTCACAGCTCTGGTTGGCTT
shTal1	ACCTC GACAAGAAGCTCAGCAAGAAT CAAGAGATTCTTGCTGAGCTTCTTGCTT

Tabelle 3.7: Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer für psiRNA-h7SK-GFPZzeo

NAME	NUKLEOTIDSEQUENZ 5' → 3'	Tm {°C}	Tm für Seq. {°C}
OL559	CGATAAGTAACTTGACCTAAGTG	50,0	57,3
OI408	GCGTTACTATGGGAACATAC	64,7	57,6

SEW-Vektor

Für eine lentiviral vermittelte Transduktion von shRNA Sequenzen wurde der shRNA Vektor verwendet ((Demaison *et al.*, 2002)). Der Vektor besitzt eine Ampicillin-Resistenz für Bakterien, allerdings fehlt ein Selektionsmarker für tierische Säugetierzellen. Die shRNA Sequenzen aus dem Vektor psiRNA-h7SK-GFPZzeo wurden inklusive dem Promoter und der GFP-Zeo-Kassette in den SEW-Vektor kloniert (Abb. 3.3).

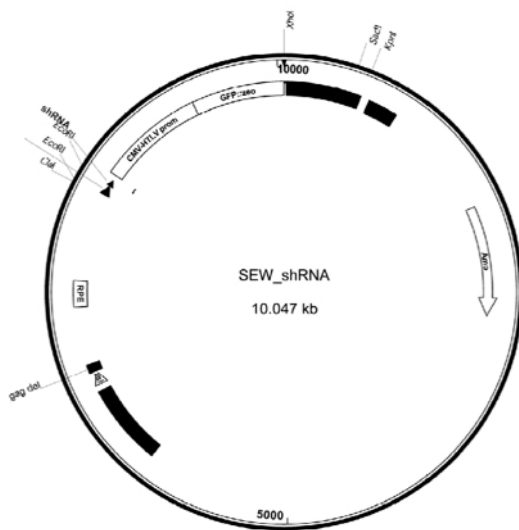


Abb. 3.3: SEW-Vektor zur Herstellung lentiviraler Partikel. Quelle: Demaison C *et al.*, 1998 modifiziert

Der SEW-Vektor wird zu lentiviralen Transduktion von HEL Zellen und primären Monozyten verwendet. Der Ursprungsvektor wurde so modifiziert, dass er neben der shRNA unter der Kontrolle des RNA-Polymerase III-Promotor ebenfalls einen GFP- Zeozin-Kassette trägt, so dass eine Selektion mittels Antibiotika oder Durchflusszytometrie möglich ist.

Tabelle 3.8: Übersicht der verwendeten Oligonukleotid Sequenzen für eine Klonierung in den SEW-Vektor

NAME	ENZYM	NUKLEOTIDSEQUENZ 5'→3'	Tm {°C}
WPRE	fwd	TATACTCGAGCGATAATCAACCTCTGGATTACAA	65,9
	rev	TATAGGTACCATCAGGCGGGGAGGCGGCCAAA	74,5
psiRNA	fwd	TATAGAATTTCGTGCTGCAGTATTTAGCATGCCCC	68,3
	rev	TATACTCGAGGCTTTAGTCCTGTTCCCTCAGCTAC	69,5

Tabelle 3.9: Übersicht der verwendeten Sequenzierungsprimer für psiRNA-h7SK-GFPZzeo

NAME	ENZYM	NUKLEOTIDSEQUENZ 5'→3'	Tm {°C}	Tm für Seq. {°C}
SEWfor	fwd	ATTACAGGGACAGCAGAGATC	57,9	53
SEWrev	fwd	GATCTACAGCTGCCTTGTAAG	57,9	53

Lego-IT2 Vektor

Der Vektor Lego-IT2 (Riecken, Hamburg) wurde für die Überexpression in tierischen Säugetierzellen mittels lentiviraler Transduktion verwendet (Abb. 3.4). Die Expression eines Transgens wird über einen SFFV-Promotor gesteuert. Als Reporter wird ein rot fluoreszierendes Protein, das tandem-dimer Tomato (tdTomato), verwendet. Zur Selektion in Bakterien ist der Vektor mit einer Ampicillin Resistenz ausgestattet.

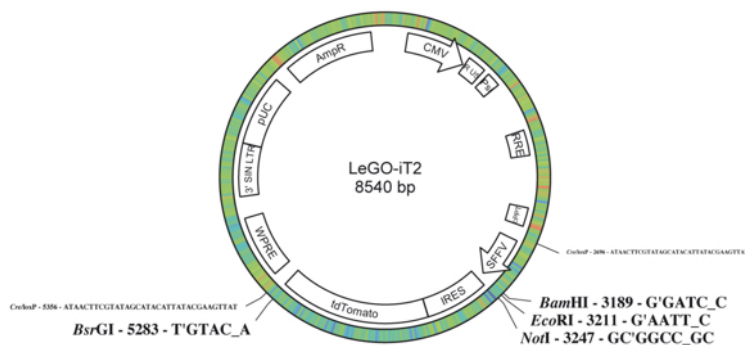


Abb. 3.4: Vektorkarte des Lego-IT2 Vektor

Quelle: C. Rieken, Hamburg

Der Lego-IT2-Vektor wurde für eine Überexpression nach lentivirale Transduktion verwendet. Die Expression wird von einem SFFV-Promotor kontrolliert. Die Selektion mittels Durchflusszytometrie ist aufgrund von tdTomato möglich

Tabelle 3.3: Übersicht der verwendeten Primer zur Klonierung in Lego-IT2

GEN	Enzym	NUKLEOTIDSEQUENZ (5' → 3')	TM {°C}
PADI4 WT	fwd	BamHI TATAGGATCCATGGCCCAGGGGACATT	66,5
	rev	EcoRI TATAGAATTCTCAGGGCACCATGTTCCA	63,2

Tabelle 3.4: Übersicht des verwendeten Sequenzierungsprimer für Lego-IT2

NAME	NUKLEOTIDSEQUENZ (5' → 3')	TM {°C}	TM FÜR SEQ. {°C}
Seq	ATTACAGGGACAGCAGAGATC	57,9	53

Zur Herstellung von lentiviralen Partikeln in HEK293T-Zellen wurden die Verpackungsvektoren pCMVdelat8_91 und pMDG2 verwendet (Dr. Manuel Grez, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt am Main).

Luciferase-Vektor pBIND

Der pBIND Vektor enthält eine aus der Hefe stammende GAL4 DNA Binde Domäne (GAL4-DBD) und exprimiert eine *renilla reniformis luciferase* unter Kontrolle eines SV40 Promotors. Die Tal1 codierende DNA Sequenz wurde in die *multiple cloning site* kloniert. Durch die Expression entsteht ein Tal1 Fusionsprotein mit einer GAL4-DNA bindenden Domäne. Zudem wurde der Vektor pG5luc als Reporter eingesetzt, der fünf GAL4-Bindedomänen oberhalb eines minimalen Promotors, der die Expression der *firefly* Luciferase-Expression steuert.

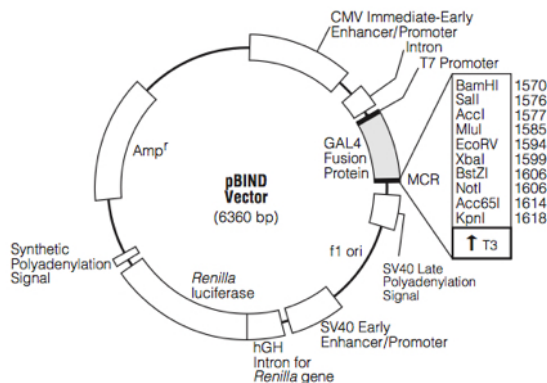


Abbildung 3.5: Vektorkarte von pBIND
(Quelle: Promega, Mannheim).

Der Reporter gen Vektor pBIND wurde für Luciferase Aktivitätsstudien verwendet. Das Tal1 Protein wurde in die *multiple cloning site* kloniert. Bei der Expression in eukaryotischen Zellen entsteht ein Tal1 Fusions Protein, dass eine aus der Hefe entstammende Gal4 DNA Bindedomäne beinhaltet.

3.1.3 Quantitative PCR (q-PCR)

Zur Analyse der mRNA Expression wurde die RNA aus Säugetierzellen unter Verwendung des *RNeasy Mini Kits* von Qiagen (Hilden) isoliert. Für eine Synthese von cDNA mittels reverser Transkription aus RNA wurde das *Omniscript RT Kit* von Qiagen (Hilden) verwendet. Als Primer für die cDNA Synthese dienen *Hexanukleotid Random Primer* von Carl-Roth (Karlsruhe). Die q-PCR Messungen erfolgten in einem LightCycler 480 System (Roche, Mannheim). Für eine Doppelbestimmung wurden 24 µl H₂O, 0,5 µl *forward*-Primer (10 pmol/ µl), 0,5 µl *reverse*-Primer (10 pmol/ µl) und 25 µl *SYBR GREEN Master-Mix* der Firma Eurogentec (Köln) gemischt und 48 µl dieses Ansatzes mit 2 µl cDNA Probe versetzt. Bei der Doppelbestimmung wurden jeweils 24 µl des PCR-Ansatzes in eine 96-well RT-PCR-Platte pipettiert (4titude, Berlin)

Tabelle 3.5: q-PCR Programm zur Messung von cDNA

PROGRAMMSCHRITT	TEMPERATUR [°C]	DAUER	ZYKLEN
1. Aktivierung der Polymerase	95	15 min	1x
2. Denaturierung	95	30 sec	} 50x
3. Primer-Anlagerung	57	30 sec	
4. DNA-Synthese	72	30 sec	
5. Messung	78	1 sec	1x
6. Schmelzkurve	57-95	Messung alle 5°C	1x

Die Berechnung der mRNA-Expression erfolgte unter Anwendung der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode (Livak and Schmittgen 2001). Für die Normalisierung der Expression wurde die Expression der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) verwendet. Die mRNA-Expression der Kontrollzellen diente als Bezugspunkt und wurde bei der Berechnung auf den Wert 1 festgesetzt. Hierzu wurde im Bezug die relative mRNA-Expression der zu analysierenden Gene berechnet.

Tabelle 3.6: Übersicht verwendeter Primer zur Messung von cDNA

Name	Nukleotid Sequenz 5' → 3'
hCEBPE Fwd hCEBPE Rev	TGCCAGCCGAGGCAGCTACA GTGGCCAAAGGGCCTTGAGAA
hCITED2 Fwd hCITED2 Rev	GACATCGCGACAGCGAAGCG CTGCCATTTCAGTCCTTCCG TT
hCTCF Fwd hCTCF Rev	CCACGGAGAGGCAGGGAAATG CCCATCCGTCTGGTTCTGGGGT
hFGFR1OP2 Fwd hFGFR1OP2 Rev	GCAGCACTCCAAGATTGACATGGT TCCAAGTGCCTTCTCTCCAGTCCA
hGAPDH Fwd hGAPDH Rev	TCTTTTGCCTCGCCAGCCGAGC TGACCAGGCGCCAATACGACC
hGYPA Fwd hYGPA Rev	CCCTCCAGAAGAGGAAACCGGAGA GGCACGTCTGTGTCAGGTGAGG
hIL6ST Fwd hIL6ST Rev	ACTGGAGTGAAGAAGCAAGTGGGA AGGAGGCAATGTCTTCCACACGA
hKRAS Fwd hKRAS Rev	ACAGGCTCAGGACTTAGCAAGAAGT AGAAGGCATCATCAACACCCTGTCT
hMED20 Fwd hMED20 Rev	GGGGCATCTCTGTGGAGGTGGAG CAAACACTGCGGGAGCCCCCT

hPADI4 Fwd hPADI4 Rev	GGCCACACGGGGCAAACCTGT GTGTCCGGGAAAGCGAGGGC
hPIK3CB Fwd hPIK3CB Rev	TCCACCAGAGCATGAACCATCCA TGAAAGCTAAACACGTCCTGGCAGT
hSTIL Fwd hSTIL Rev	AGCCACTTTCTGTATCCAACAGCTC CTGGCACCCCTGTTGGTCC
hTal1 Fwd hTal1 Rev	TCGGCAGCGGGTCTTTTGGG CCATCGCTCCCGGTGTTGG
hTNFa Fwd hTNFa Rev	ACTGGAGCTGCCCTCAGCTT ACTGGAGCTGCCCTCAGCTT
hVEGFA Fwd hVEGFA Rev	GGAGCGTGTACGTTGGTGCCC AGCAAGGCCACAGGGATGGG

Bei einer Quantifizierung von Chromatin-Immunpräzipitations-DNA (ChIP) wurde 2 µl des Chromatins pro Doppelbestimmung verwendet. Die q-PCR Messung erfolgte im LightCycler 480 (Roche, Mannheim). Aus den gemessenen *Crossing-Point* Werten (CP) wurden die Anreicherung der Immunpräzipitierten Proben, bezogen auf den *Input*, mit folgender Formel berechnet: $100 \times 2^{(Ct_{100\% \text{ Input}} - Ct_{\text{ChIP-IP}})}$.

Tabelle 3.7: q-PCR Programm zur Messung von ChIP-DNA

PROGRAMMSCHRITT	TEMPERATUR [°C]	DAUER	ZYKLEN
1. Aktivierung der Polymerase	95	15 min	1x
2. Denaturierung	95	30 sec	} 50x
3. Primer-Anlagerung	60	30 sec	
4. DNA-Synthese	72	30 sec	
5. Messung	78	1 sec	1x
6. Schmelzkurve	57-95	Messung alle 5°C	1x

Tabelle 3.8: Übersicht der verwendeten Primer zur Messung von ChIP-DNA

Name	Nukleotid Sequenz 5' → 3'
hCTCF A Fwd hCTCF A Rev	AAGCCAGGGGTCGTAAACTG CTGACCGTTCCGTTGTGAGA
hCTCF B Fwd hCTCF B Rev	GCCGCTGAGCAAGGACAGCCCTTC AGGCCCGACCCGCCCTCCGAATGT
hCTCF <i>Downstream</i> Fwd hCTCF <i>Downstream</i> Rev	GCCGCTGAGCAAGGACAGCCCTTC AGGCCCGACCCGCCCTCCGAATGT

hCEBPE RT-Fwd	ACCACAGCAGCCCTCCGAGT
hCEBPE RT-Rev	TGGTGTGGGGAGATCTGCGTGT
hGPA Fwd	CAGGCGCTTAACAACCTGCATCA
hGPA Rev	CATACATCCTGAGATCATGAGCTG
hIL6-ST A Fwd	TCTCCGTCCTGTTGCTCTG
hIL6-ST A Rev	TCTCCGTCCTGTTGCTCTG
hIL6-ST B Fwd	CCAGCAGTTCAAGACCAGCC
hIL6-ST B Rev	CAAATTCCTGGGCTCTAGCG
hIL6-ST C Fwd	AAACGGGGAGGTACAAACCG
hIL6-ST C Rev	TAAACGAGCCTTGCCACAGT
hIL6-ST D Fwd	GATCTAGTCTGGGAGAGGCGA
hIL6-ST D Rev	ACTCCGAGGGGTAGCGATTC
hIL6-ST E Fwd	CAGCCTGGAAATCCCCACAT
hIL6-ST E Rev	GGCTGCGATAATCGAGGTGA
hIL6-ST F Fwd	TCCACATCTCACTGTATCCCA
hIL6-ST F Rev	GACCCTTGCTTCCTGCACTA
hIL6-ST G Fwd	TGTGTATGACTGCCAGCTTCA
hIL6-ST G Rev	TGGCACACAGCTAAACTGATGA
hTNF Fwd	CTGTGGGGAGAACAAAAGGA
hTNF Rev	CCCTCCAGACCCTGACTTTT

3.2 Zellkultur-Methoden

3.2.1 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 3.9 zusammengefasst.

Tabelle 3.9: Übersicht aller verwendeter Zelllinien

Bezeichnung	Zelltyp / Medium
HEK293T	humane Nierenkarzinom Zelllinie, menschliche embryonale Nierenzellen, RPMI-1640 Medium (Gibco, Karlsruhe)
HEL	humane chronische myeloische Leukämie Zellen, RPMI-1640 Medium (Gibco, Karlsruhe)
K562	humane Leukämiezelllinie, myeloische Blutzellen; RPMI-1640 Medium (Gibco, Karlsruhe)
K562 BirA Ligase	humane Leukämiezelllinie, myeloische Blutzellen, exprimiert nach retroviraler Transduktion und Selektion stabil eine Biotin-Ligase (Lausen <i>et al.</i> , 2010), RPMI-1640 Medium (Gibco, Karlsruhe)
K562 BirA Tal1	humane Leukämiezelllinie, myeloische Blutzellen, exprimiert nach retroviraler transduktion und Selektion stabil eine Biotin-Ligase und N-terminal Biotin getaggttes Tal1-Protein (Lausen <i>et al.</i> , 2010) RPMI-1640 Medium (Gibco, Karlsruhe)
CD34	Humane Stammzellen isoliert aus dem peripheren Blut von Spendern, Isolation und Kultivierung beschrieben in 3.2.4 bzw. 0

3.2.2 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Die Kultivierung der in Tabelle 3.9 beschriebenen Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei einer Temperatur von 37°C, 95 % relativer Luftfeuchtigkeit und 5 % CO₂. Das Medium wurde mit 10 % fetalem Kälberserum (PAA, Pasching), 1 % Penicillin/Streptomycin (PAA, Pasching), sowie 2 mM L-Glutamin (PAA, Pasching) supplementiert. Die Isolation und Kultivierung von humanen CD34 Zellen ist in 3.2.4 beschrieben.

3.2.3 Einfrieren und Auftauen von humanen Zelllinien

Die Zellen wurden bei etwa 80% Konfluenz trypsinisiert und pelletiert. Die Resuspension von 1 x 10⁶ Zellen erfolgte in 1 ml fetalem Kälberserum mit 10 % DMSO. Diese wurden in

Einfrierröhrchen in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox langsam auf – 80°C abgekühlt. Nachfolgend wurde die Zellen bei -80°C bzw. bei – 196°C in flüssigen Stickstoff gelagert. Zum Auftauen wurden die Zellen schnell bei 37°C aufgetaut und in das entsprechende Medium überführt. Nach Zentrifugation wurden die pelletierten Zellen in Medium resuspendiert und in ein Kulturgefäß überführt. Nach spätestens 24 Stunden wurde das Medium ausgetauscht.

3.2.4 Kultur primärer hämatopoetischer Stammzellen

Die isolierten CD34+ Zellen wurden in Serum freiem Medium (Stemcell Technologies, Grenoble) in einer Zellzahl von 500 000 Zellen/ml Medium expandiert. Das Medium wurde durch die Zugabe von Zytokinen wie folgt komplettiert (Mahajan *et al.*, 2009).

Tabelle 3.10: Medium zur Expansion humaner CD34+ Zellen

Bezeichnung Zytokin	Konzentration
Rekombinantes humanes <i>stem cell factor</i> (SCF) Protein	100 (ng/μl)
Rekombinantes humanes <i>Flt3-ligand</i> (SCF) Protein	100 (ng/μl)
Humanes Interleukin-3 (IL-3)	20 (ng/μl)
Humanes Interleukin-6 (IL-6)	20 (ng/μl)

3.2.5 Differenzierung von humanen CD34+-Zellen zu Monozyten

Für eine Differenzierung von humanen CD34+ Zellen in Richtung Monozyten wurden die Zellen zunächst für die Entfernung sämtlicher Zytokine aus dem Expansionsmedium zweimal mit PBS gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen für 7 Tage in IMDM Medium kultiviert, komplettiert durch die in der Tabelle 3.18 angegebenen Zytokine (Stec *et al.*, 2007). Der Status der Differenzierung wurde durch eine FACS Analyse (siehe Abschnitt 3.2.12) verifiziert. Für die Charakterisierung der Monozyten wurden dabei die folgenden Antikörper verwendet. anti-human CD34 Pacific Blue (Klon:581, Biolegend), anti-human CD14-APC (Miltenyi Biotec, Mönchengladbach), anti-human CD16-APC (Miltenyi Biotec, Mönchengladbach).

Tabelle 3.11: Medium zur Differenzierung humaner CD34+ Zellen zu Monozyten

Bezeichnung	Konzentration bzw. Volumenprozent
Fetales Kälberserum (FKS)	20 %
Rekombinantes humanes <i>Stem Cell Factor</i> (SCF) Protein	25 (ng/ μ l)
Rekombinantes humanes <i>Flt3-ligand</i> (Flt-3) Protein	30 (ng/ μ l)
Humanes Interleukin-3 (IL-3)	30 (ng/ μ l)
Rekombinanter humaner <i>macrophage-colony stimulating factor</i> (M-CSF)	30 (ng/ μ l)

3.2.6 Differenzierung von humanen CD34+-Zellen zu Megakaryozyten und Erythrozyten

Für eine Differenzierung von humanen CD34+ Zellen in Richtung Megakaryozyten und Erythrozyten wurden die Zellen zunächst für die Entfernung sämtlicher Zytokine aus dem Expansionsmedium zweimal mit PBS gewaschen. Für eine Megakaryozyten und Erythrozyten Differenzierung wurde Serum freies Medium mit den folgenden Zusätzen bzw. Zytokinen versetzt. (Mahajan *et al.*, 2009) Die Differenzierung von hCD34+ Zellen zu Megakaryozyten erfolgte in einem Zeitraum von 4 Tage bzw. 7 Tage bei der erythrozytären Differenzierung nach Zugabe der Medien zur Differenzierung. Wie bei der monozytären Differenzierung von hCD34+ Zellen wurde der Differenzierungsfortschritt durch eine FACS Analyse untersucht. Dabei wurden die folgenden Antikörper verwendet:

Tabelle 3.12: Medium zur Differenzierung humaner CD34+ Zellen zu Megakaryozyten

Bezeichnung	Konzentration bzw. Molarität
Rekombinantes humanes <i>stem cell factor</i> (SCF) Protein	1 (ng/ μ l)
Dexamethason	2 μ M
Estradiol	0,2 μ M
Humanes Interleukin-3 (IL-9)	13,5 (ng/ μ l)

Tabelle 3.13: Medium zur Differenzierung humaner CD34+ Zellen zu Erythrozyten

Bezeichnung	Konzentration
Rekombinantes humanes <i>Stem Cell Factor</i> (SCF) Protein	20 (ng/ μ l)
Rekombinantes Thrombopoietin (TPO) Protein	30 (ng/ μ l)
Humanes Interleukin-3 (IL-6)	5 (ng/ μ l)
Humanes Interleukin-3 (IL-9)	13,5 (ng/ μ l)
Rekombinantes Erythroprotein alpha	1 U/ml

3.2.7 Isolation hämatopoietischer Stammzellen aus peripherem Blut

Für die Isolation von humanen hämatopoietischen Stammzellen wurden apheretisch isolierte Zellen verwendet, die freundlicherweise durch den Blutspendedienst Frankfurt, Arbeitsgruppe Halvard Bönig, zur Verfügung gestellt wurden. Zunächst wurden die peripheren mononukleären Zellen (PBMC) mittels Dichtegradienten-Zentrifugation (Ficoll-Hypaque) isoliert (Jaatinen and Laine 2007). Die Lymphozyten und Monozyten sammeln sich dabei entsprechend ihrer spezifischen Dichte in der Interphase an. Die humanen CD34+ Zellen wurden anschließend durch eine positive Selektion unter Verwendung einer magnetischen Zellseparation nach Angaben des Herstellers isoliert (CD34 Microbead Kit, Miltenyi, Mönchengladbach). Die isolierten Stammzellen wurden in CryoStor CS10 Medium (Stem Cell Technologies, Grenoble) resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.2.8 Koloniebildende Wachstumsversuche mit dem *Colony Formation Units Assay* (CFU-Assay)

Für die Untersuchung des Einflusses von PADI4 auf die Differenzierung von humanen CD34+ Zellen wurden *Colony Formation Units Assays* (CFU-Assay) durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen nach einer Kultivierung von 3 Tagen in Expansionsmedium mit PADI4 knock-down bzw. Überexpressionskonstrukten lentiviral transduziert. Die GFP- (PADI4 knock-down) bzw. *tomato-red*-positiven Zellen (PADI4-Überexpression) wurden am FACSAria (BD, Heidelberg) sortiert. Dies erfolgte durch Tefik Merovci (AG Dr. Manuel Grez,

Georg-Speyer-Haus, Frankfurt). Die so vorbereiteten Zellen wurden mit dem Expansionsmedium für einen weiteren Tag kultiviert und dann für den Methylcellulose Assay verwendet. Von den CD34⁺-Zellen wurden 3×10^4 Zellen in 300 μ l IMDM Medium (2 % FKS, 10 % Penicillin/Streptomycin) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 3 ml zähflüssigen Methylcellulose Medium StemMACS HSC-CFU *complete with Epo* durch vortexen resuspendiert. Jeweils 1,4 ml des Mediums wurde auf eine 35 mm große Schale aufgeteilt. Die Methylcellulose sind die Zytokine, *stem cell factor* (SCF), *granulocyte-macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF), *granulocyte-colony stimulating factor* (G-CSF), IL-3, IL-6 und Erythropoetin (Epo) zugesetzt. Durch diese Zytokin Zusammensetzung werden die CD34⁺ Stammzellen zur Proliferation und Differenzierung angeregt. Durch die Viskosität des Mediums können die Zellen sich aber nicht frei in der Schale verteilen und bilden abgegrenzte Kolonien. Die Auswertung erfolgt nach 14 Tagen durch eine mikroskopische Analyse, wobei eine Klassifizierung der Kolonien nach der Größe und Morphologie erfolgt.

3.2.9 Herstellung lentiviraler Partikel

Die genetische Manipulation humaner CD34⁺ Stammzellen erfolgte unter Verwendung lentiviraler Transduktion von *Knockdown*-Vektoren (SEW) bzw. Überexpressions-Vektoren (Lego-IT2). Für die Herstellung von lentiviralen Partikeln wurden HEK293T Zellen in einer Zelldichte von $1,4 \times 10^7$ Zellen in eine T175 Zellkulturflasche ausgesät und 24 Stunden später transfiziert. Hierbei wurden 10,1 μ g *Envelope*-Plasmid 8pMDG2-VSV-G), 18,7 μ g Core-packaging Plasmid (pCMVdelta8_91) und 28,8 μ g des SEW bzw. IT2 Vektors mit 144 μ l Transfektionsreagenz Polyethylimin (PEI) in 430 μ l serumfreiem DMEM (Gibco, Darmstadt) gemischt, für 20 Minuten inkubiert und zu den Zellen gegeben. Nach vier Stunden wurde das Medium gewechselt. Nachfolgend wurde das Medium in einem Zeitraum von 24 – 96 Stunden gesammelt und bei 4°C bis zu einer Ultrazentrifugation der lentiviralen Partikel gelagert.

3.2.10 Ultrazentrifugation lentiviraler Partikel

Die lentivirale Transduktionseffizienz konnte gesteigert werden, wenn die Viruspartikel durch eine Ultrazentrifugation aufkonzentriert wurden. Zur Pelletierung eventuell

vorhandener Zellreste wurden die Virusüberstände bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde unter Verwendung eines 22 µm Filter steril filtriert und in ein Zentrifugationsröhrchen überführt (BD # 326823, Heidelberg). Die Überstände wurden mit einer 20%-igen Saccharose-Lösung unterschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte in einer BD L8-60M Zentrifuge mit Rotoreinsatz SW-Ti 32 (BD, Heidelberg) bei 25000 rpm, für 2 Stunden bei 4°C. Der zentrifugierte Überstand wurde vorsichtig abgegossen. Die Viruspartikel wurden in sterilem PBS/0,1% resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

20 % Saccharose-Lösung:	200 g D(+)-Saccharose in 1 L H ₂ O, steril filtriert (Carl-Roth #9097, Karlsruhe)
1 x PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄
PBS/0,1 % BSA:	1 g BSA in 1 L PBS, steril filtriert (PAA, Pasching)

3.2.11 Transduktion humaner hämatopoetischer Stammzellen (hCD34+)

Für eine Transduktion hämatopoetischer Stammzellen (hCD34+), wurden die isolierten Zellen mit einer Zelldichte von 5×10^6 CD34+ Zellen/Well in eine 24-well Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde 200 µl des konzentrierten Virusüberstandes zusammen mit 10 µl Protaminsulfat auf die Zellen pipettiert. Die Platte wurde mit 2000 rpm bei 30°C, für 60 Minuten zentrifugiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen durch eine Zentrifugation bei 1200 rpm, für 5 Minuten pelletiert. Die Zellen wurden in Serum freiem Medium zur Expansion hämatopoetischer Stammzellen (Stem Span SFEM, Stem Cell Technologies, Frankreich), komplettiert mit Zytokinen, resuspendiert und weiter kultiviert.

3.2.12 FACS-Analyse (*fluorescence activated cell sorting*)

Für eine Untersuchung der Expression von Membranmolekülen von humanen CD34 Zellen wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Dies erfolgte unter Verwendung eines FACSCanto und wurde unter Benutzung der FACSDiva Software (BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg) durchgeführt. Für eine Analyse des Stammzellen Charakters von CD34 Zellen wurde ein Pacific Blue anti-humanes CD34 Antikörper (Klon:581, Biolegend, Fell) verwendet. Die Monozyten-Differenzierung wurde durch Verwendung folgender Antikörper analysiert: CD14-APC Human (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach) und CD16-

APC Human (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach). Für eine Färbung der Zellen mit dem spezifischen Antikörpern wurden 5×10^5 Zellen für 20 Minuten bei RT im Dunkeln angefärbt. Zur Blockierung unspezifischer Bindungen an FC-Rezeptoren, wurden die Proben mit TruStain FcX™ (Biolegend, Fell) vor der Antikörper-Färbung inkubiert. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen und nach einer finalen Zentrifugation wurde das Zell-Pellet in 200 μ l FACS-Puffer aufgenommen und mittel FACS-Canto analysiert.

FACS-Puffer: 2% FKS (PAA,Pasching) in PBS

1xPBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 Gesamtzellextrakte

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurden Zellen geerntet, pelletiert und anschließend mit kaltem PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen mit dem vierfachen Volumen des Pellets mit Lysepuffer resuspendiert. Die Zellen wurden für 30 – 60 min auf Eis inkubiert und nachfolgend bei 13 000 rpm, 4°C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde direkt verwendet bzw. bei -80°C dauerhaft gelagert.

1xPBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄

Lyse-Puffer: 50 mM Tris/HCl pH 7,4; 0,5 % Triton-X-100; 50 mM NaCl

3.3.2 Herstellung von Kernextrakten

Zur Herstellung von Kernextrakten wurde das Protokoll von Schreiber *et al.*, 1989 modifiziert. Für die Isolierung der Kernfraktion wurden die Zellen geerntet und mit eiskaltem PBS gewaschen. Alle folgenden Schritte erfolgten auf Eis und unter Verwendung vorgekühlter Puffer. Durch eine Zentrifugation bei 1500 rpm, für 5 Minuten bei 4°C wurden die Zellen pelletiert. Diese wurden durch Zugabe von 4 Volumenanteilen an Puffer

A, bezogen auf die Größe des Zellpelletts, lysiert. Nach einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurde 20 % NP-40 hinzugegeben und für weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 13000 rpm, 5 Minuten, 4°C zentrifugiert. Im Zellpellett wurden hierdurch die Zellkerne angereichert und der Überstand entsprach der Zytoplasmafraktion. Die Zellkernfraktion wurde mit 1 Volumenanteil an Puffer C in Bezug auf die ursprüngliche Größe des Zellpellets versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat für 13000 rpm, 30 Minuten bei 4° zentrifugiert und der resultierende Überstand direkt verwendet oder bei -80°C gelagert.

1xPBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄
Puffer A:	10 mM Tris pH 7,5; 0,1 mM EDTA pH 8; 0,1m M EGTA pH 8; 10 mM KCl
Puffer C:	20 mM Tris pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8; 1 mM EGTA pH 8; 0,4 M NaCl; 20 % Glycerin
20% NP-40:	2 ml NP-40 in 10 ml H ₂ O (Carl-Roth, Karlsruhe)

3.3.3 Immunoblot

Die Detektion von Proteinen erfolgte durch die Verwendung eines Immunoblot. Unter denaturierenden Bedingungen wurden die Proteine mit einer SDS-Page (*Sodium-dodecylsulfate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) aufgetrennt und nachfolgend auf eine PVDF-Membran (Carl-Roth, Karlsruhe) transferiert. Die Membran wurde durch Inkubation mit einer Magermilchlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Die zur Detektion bestimmten spezifischen Antikörper wurden in Magermilchlösung verdünnt (Tabelle 3.14) und die PVDF-Membran damit inkubiert. Als Ladekontrolle wurde bei Gesamtzellextrakten Tubulin und bei Kernextrakten LaminB1 verwendet.

4x Protein-Ladepuffer:	500 mM Tris pH 6,8; 4 % SDS; 30 % Glycerol; 40 mM DTT; etwas Bromphenolblau
10x SDS-Laufpuffer:	250 mM Tris, 1,92 M Glycin, 0,1% SDS
10x Transfer-Puffer:	0,25 M Tris, 1,92 mM Glycin,
1x Transfer-Puffer:	100 ml 10x Transfer-Puffer, 200 ml Methanol in 1 L H ₂ O
Magermilchlösung:	5 % Magermilchpulver in PBS + 0,1 % Tween 20

3.3.4 Immunfluoreszenz

Vorbereitend für eine Immunfluoreszenz Analyse wurden HeLa-Zellen auf runden Deckgläschen in einer 24-Well-Platte mit einer Zelldichte von 10000 Zellen pro Well ausgesät.

Die Deckgläschen wurden vor der Aussaat zunächst in 10 % Essigsäure gewaschen, mit H₂O gespült, anschliessend mit 70 % Ethanol desinfiziert und unter der Sterilbank getrocknet. Nach 24 Stunden wurden die Zellen für eine Färbung verwendet. Die Zellen wurden vorsichtig dreimal mit PBS gewaschen und zur Fixierung auf den Deckgläschen 10 min mit Roti®-Histofix (Carl-Roth, Karlsruhe) behandelt. Nach einem erneuten dreimaligen Waschen der Zellen mit PBS erfolgte zur Permeabilisierung der Zellmembran eine fünfminütige Inkubation in PBS/0,1% Triton-X-100, gefolgt von einem zweimaligen Waschen mit PBS. Zur Blockierung unspezifischer Bindestellen wurden die Deckgläschen für eine Stunde in PBS/1% BSA inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper in PBS/1 % BSA verdünnt (Tabelle 3.14) und über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer gelagert. Am darauffolgenden Tag wurde dreimal für 5 min mit PBS gewaschen. Es folgte die Zugabe des sekundären Antikörpers, der in PBS/1% BSA verdünnt war (Tabelle 3.15). Nach 3 Stunden Inkubation erfolgte ein zweimaliges Waschen mit PBS, für jeweils 5 min. Die Zellkerne wurden mittels DAPI (4',6-diamidino-2-Phenylindol; Sigma-Aldrich, München) angefärbt. Hierzu wurde eine Gebrauchslösung von 1:5000 in PBS hergestellt, auf die Zellen pipettiert und 2 min im Dunkeln inkubiert. Nachfolgend wurden die Zellen zweimal 5 min mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden vorsichtig getrocknet, in Eindeckmedium *Pro Long Gold antifade* (LifeTechnologies, Darmstadt) gelegt und im Dunkeln getrocknet. Am folgenden Tag erfolgte die mikroskopische Auswertung anhand des Fluoreszenzmikroskops Nikon TE300 und der Software *NISelement AR 2.30*.

1xPBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄
PBS/1 % BSA:	1 g BSA (PAA, Pasching) in 100 ml PBS
DAPI:	5 mg/ml in H ₂ O (Sigma-Aldrich, München)

3.3.5 Antikörper

Tabelle 3.14: Übersicht der verwendeten Primärantikörper

Name	Spezies	Verwendung	Beschreibung	Hersteller
anti-Flag	Kaninchen	1 : 5000 im WB	Monoklonaler Antikörper gegen das Flag Peptid DYKDDDDK	Sigma Aldrich, (7425)
anti-HA	Kaninchen	1 : 1000 im WB	Monoklonaler Antikörper gegen das HA Peptid YPYDVPDYA	Covance, (MMS-101P)
anti-CTCF	Kaninchen	1 : 500 im WB	Polyklonaler Antikörper der gegen eine Peptidsequenz im Bereich 650 – 700 des humanen CTCF-Proteins gerichtet ist	Abcam, (ab70303)
anti-Tal1	Kaninchen	1: 200 im WB	Polyklonaler Antikörper gegen eine interne Region des humanen Tal1-Proteins	Abcam, (ab75739)
anti-Tal1	Kaninchen	1: 200 im WB	Polyklonaler Antikörper gegen eine interne Region des humanen Tal1-Proteins	Abcam, (ab75739)
anti-PADI4	Kaninchen	1 : 200 im WB	Polyklonaler Antikörper der gegen eine Peptidsequenz im Bereich 1 – 100 des humanen PADI4-Proteins gerichtet ist	Abcam, (ab38772)
anti-PRMT4	Kaninchen	3 µg / IP	Polyklonaler Antikörper der gegen eine Peptidsequenz im Bereich 595 - 608 des humanen PRMT4 -Proteins gerichtet ist	Millipore, (09-818)
anti-H3	Kaninchen	3 µg / IP	Polyklonaler Antikörper der gegen den C-Terminus des humanen Histon-H3 gerichtet ist	Abcam, (ab1791)
anti-H3R2me2as	Kaninchen	3 µg / IP	Polyklonaler Antikörper, der gegen ein Peptid des Histons H3 um das dimethylierte, asymmetrische Arginin 2 gerichtet ist	Millipore (07-585)
anti-H3R17me2as	Kaninchen	3 µg / IP	Polyklonaler Antikörper, der gegen ein Peptid des Histons H3 um das dimethylierte, asymmetrische Arginin 17 gerichtet ist	Millipore (ab8284)
anti-H3K9Ac	Kaninchen	3 µg / IP	Polyklonaler Antikörper, der gegen ein Peptid des Histons H3 um das acetylierte Lysin 9 gerichtet ist	Abcam (ab10812)
anti-H4R3me2as	Kaninchen	3 µg / IP	Polyklonaler Antikörper, der gegen ein Peptid des Histons H4 um das dimethylierte, asymmetrische Arginin 3 gerichtet ist	Active Motif (39705)
RNA-Pol II CTD 4H8	Maus	3 µg / IP	Monoklonaler Antikörper, der gegen das Peptid YSPTSPS der RNA Polymerase II gerichtet ist	RNA-Pol II CTD 4H8

Tabelle 3.15: Übersicht der verwendeten Sekundärantikörper

Name	Spezies	Verwendung	Beschreibung	Hersteller
anti- <i>mouse</i> IgG-HRP	Ziege	1 : 10000 im WB	Anti-Maus IgG mit HRP gekoppelt gerichtet ist	Santa Cruz (sc-2005), 200 µg/ 0,5 ml
anti- <i>rabbit</i> IgG-HRP	Ziege	1 : 10000 im WB	Anti-Kaninchen IgG mit HRP gekoppelt	Santa Cruz (sc-2004), 200 µg/ 0,5 ml
anti- <i>goat</i> IgG-HRP	Esel	1 : 10000 im WB	Anti-Ziege IgG mit HRP gekoppelt gerichtet ist	Santa Cruz (sc-2020), 200 µg/ 0,5 ml
anti- <i>rabbit</i> FITC	Affe	1:200 in IF	Anti-Kaninchen mit FITC gekoppelt	Santa Cruz (sc-2090), 200 µg/ 0,5 ml
anti- <i>rabbit</i> FITC	Affe	1:200 in IF	Anti-Kaninchen mit PE gekoppelt	Santa Cruz (sc-3745), 200 µg/ 0,5 ml

3.3.6 Aufreinigung von Tal1/Cofaktor Komplexen

Für eine Affinitätsaufreinigung von Tal1-Cofaktoren wurden Zellextrakte der Zelllinien K562 BirA und K562 BirA-Tal1 verwendet (Lausen *et al.*, 2010). Nach einer retrovirale Transduktion und Selektion exprimierte die Zelllinie K562 BirA eine Biotin-Ligase. Die K562 BirA-Tal1 Zelllinie exprimierte zusätzlich zu der Biotin-Ligase N-terminal Biotin *getaggt*es Tal1-Protein. Durch die Co-Expression der Biotin-Ligase kommt es zu einer Biotinylierung des Tal1 Biotin-*Tags*, die eine Affinitätsaufreinigung von Tal1 mittels Streptavidin-*Beads* ermöglichte.

Die Zellen wurden wie in 3.3.12 beschrieben in SILAC Medium kultiviert, damit nachfolgend der Affinitätsaufreinigung eine quantitative massenspektrometrische Analyse potentieller Tal1 Interaktionspartner erfolgen konnte.

Für eine Aufreinigung wurden Kernextrakte von $2 \cdot 10^8$ Zellen wie in 3.3.2 beschrieben hergestellt. Des Weiteren wurden magnetische M-280 Streptavidin *Beads* vorbereitet, die mit 75 ng/µl DNA aus Lachssperma (Appllichem, Darmstadt) für 30 Minuten bei 4°C und mit Roti-Block (Carl-Roth, Karlsruhe) für 45 Minuten in Puffer C (Abschnitt 3.3.2) blockiert wurden. Das Kernlysate der K562 BirA Zellen wurde auf 4 Low-Retention Mikrozentrifugengefäße verteilt und jeweils 20µl der M-280 Streptavidin *Beads* hinzugegeben. Diese Ansätze wurden unter ständiger Rotation auf dem Drehrad über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die Zentrifugengefäße zur

Separation für 2 Minuten in ein magnetisches *Rack* gestellt und der Überstand abgenommen. Die magnetischen *Beads* wurden mit RIPA-Puffer resuspendiert und unter Rotation für 10 Minuten auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Dieser Schritt wurde 4 mal wiederholt. Anschließend wurde der Waschpuffer durch die magnetische Separation verworfen und die *Beads* in 27µl NuPAGE LDS *Sample Buffer* und 3µl NuPAGE *Sample Reducing Agent* resuspendiert. Die Proben wurden für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht und der Überstand unter Verwendung des magnetischen *Racks* in ein neues Gefäß überführt. Die Affinitätsaufreinigung der zuvor mit unmarkierten, „leichten“ SILAC Medium kultivierten K562 BirA Zellen wurden mit der Aufreinigung der mit markierten „schweren“ SILAC Medium (Arg-10, Lys-8) kultivierten K562 BirA Tal1 Zellen im gleichen Verhältnis vereint. Das bedeutet, dass 30µl der Probe der K562 BirA Zellen Aufreinigung zu 30µl der K562 BirA Tal1 Probe gegeben wurde. Diese Probe wurde freundlicherweise durch Dr. Thomas Oellerich, (AG Serve, Uniklinik Frankfurt am Main) quantitativ massenspektrometrisch analysiert.

3.3.7 Microarray-Analyse

Für eine Identifizierung von neuen Zielgenen die durch Tal1 und PADI4 koreguliert werden, erfolgte eine Untersuchung des Expressionsprofils der Erythroleukämie Zelllinie HEL, im Transkriptomanalyselabor Göttingen. Zu diesem Zweck wurden die Zellen lentiviral mit einem *knock-down* von Tal1- und zwei verschiedenen PADI4-Konstrukten transduziert. Für die Messung wurde ein *Agilent-Human-Array* verwendet.

3.3.8 Sortierung GFP-positiver Zellen mittels Durchflusszytometrie-Sortierung

Für eine Anreicherung GFP-positiver Zellen wurden drei Tage nach einer lentiviralen Transduktion die Zellen geerntet und durch Zentrifugation bei 1200 rpm für 5 Minuten pelletiert. Das Pellet wurde in 2000 µl PBS/2 % BSA aufgenommen und unter Verwendung eines Röhrchens mit integriertem Zellsieb (BD #352235, Heidelberg) filtriert. Die Sortierung erfolgte am FACSAria™ (BD, Heidelberg) und wurde freundlicherweise von Tefik Merovci durchgeführt (AG Dr. Manuel Grez, Georg-Speyer-Haus, Frankfurt). Für eine nachfolgende RNA Isolierung wurden die anhand des GFP-Signals sortierten Zellen durch eine

Zentrifugation bei 1500 rpm, für 5 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde anschließend in neuem Medium aufgenommen und die Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurden aus den Zellen die RNA isoliert.

1xPBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,7 mM KH₂PO₄

PBS/ 2 % FCS: 0,2 ml FKS (PAA, Pasching) in 10 ml PBS

3.3.9 GST-Pulldown

Für eine GST-Pulldown Analyse wurden verschiedene Tal1 und PADI4 GST-Fusionsproteine in *E.coli* BL21-Bakterien exprimiert und nach einer Lyse mit anti-GST Agarose-Beads (Sigma Aldrich #G4510, München) aufgereinigt. Der potentielle Interaktionspartner wurde mittels des TNT Quick coupled transcription/ translation system (Promega #L4610, Madison) nach Angaben des Herstellers *in-vitro* translatiert und dabei mit ³⁵S-Methionin (Hartmann Diagnostics, Hannover) radioaktiv markiert. Bei der Durchführung des GST-pulldown wurden gleiche Mengen des GST-Fusionsproteins mit dem radioaktiv markierten Interaktionspartner gemischt und nachfolgend mit Lyse-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 300 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden unter ständiger Rotation bei 4°C für 4 Stunden intubiert. Anschließend wurden die Agarose-Beads durch Zentrifugation bei 1500 rpm bei 4°C für 5 Minuten pelletiert und der Überstand abgenommen. Die Beads wurden dreimal mit Lyse-Puffer gewaschen und in 20 µl Proteinladepuffer aufgenommen. Die Proben wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel unter Vakuum bei 65°C für 2 Stunden getrocknet. Die Detektion der möglichen Interaktion erfolgte durch eine Autoradiographie.

Lyse-Puffer: 50 mM Tris pH 7,4; 100 mM NaCl; 0,1 % Triton-X-100; 1 mM EDTA; 10 % Glycerin;

4x Protein-Ladepuffer: 500 mM Tris pH 6,8; 4 % SDS; 30 % Glycerol; 40 mM DTT; etwas Bromphenolblau

3.3.10 Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunopräzipitation diente der Analyse von Protein-DNA Interaktion und dazugehörig der Promotor Okkupation. Hierzu wurden 1x10⁷ undifferenzierte oder differenzierte humane CD34- oder HEL-Zellen in 10 ml RPMI-Medium resuspendiert. Durch

die Zugabe von 0,75 % (v/v) Formaldehyd für 15 Minuten bei Raumtemperatur wurden die DNA-Protein Komplexe miteinander verknüpft. Dieser Prozess wurde durch die Zugabe von 0,125 M Glycin für 5 Minuten bei Raumtemperatur gestoppt. Die Zellen wurden anschließend zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Nach einer abschließenden Zentrifugation für 5 Minuten bei 4°C wurde das Pellet in 1200 µl CHIP-Lyse Puffer resuspendiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Das Lysat wurde mit dem Ultraschallgerät *Bioruptor* (Diagenode, Liège) sonifiziert, wodurch DNA-Fragmente in einer Größe von 1000 bis 200 Basenpaare entstanden. Durch eine Zentrifugation bei 13000 rpm, 5 Minuten bei 4°C wurden Zelltrümmer pelletiert. Das Chromatin wurde entweder sofort verwendet oder für weitere Experimente bei -80°C gelagert.

In Vorbereitung zu einer Chromatin-Immunoprecipitation wurden Protein G-*Beads* (New England Biolabs, Ipswich) mit 75 ng/µl DNA aus Lachssperma (Applichem, Darmstadt) für 30 Minuten bei 4°C und mit Roti-Block (Carl-Roth, Karlsruhe) für 45 Minuten blockiert. Die so vorbereiteten *Beads* wurden anschließend in RIPA Puffer ohne Zusätze aufgenommen. Für eine CHIP-Analyse wurden zu 25 µg Chromatin, 450 µl RIPA-Puffer pipettiert. Des Weiteren wurden die Proben mit 20 µl und 3 – 5 µg Antikörper versetzt und unter ständiger Rotation bei 4°C über Nacht inkubiert. Für eine *Input* Kontrolle wurde eine weitere Probe mit der gleichen Chromatin Konzentration aufgehoben.

Am nächsten Tag wurden die magnetischen Protein-G *Beads* unter Verwendung eines magnetischen *Racks* zweimal mit Waschpuffer I und zweimal mit dem Waschpuffer II für jeweils 10 Minuten bei 4°C unter Rotation gewaschen. Die Elution der Protein-DNA Komplexe von den *Beads* erfolgte durch eine Resuspension in 120 µl Elutionspuffer bei 30°C für 15 Minuten. Der Überstand wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt. In den weiteren Schritten wurde die *Input*-Kontrolle mitgeführt. Alle Proben wurden mit Elutionspuffer ad 120 µl aufgefüllt und 5 µl Proteinase K (Applichem, Darmstadt) zugegeben. Durch eine anschließende Inkubation der Proben bei 65°C für 4 Stunden im Schüttelinkubator wurden die Proteine abgebaut. Hieraus resultierte eine Auflösung der zuvor verknüpften Protein-DNA-Komplexe. Das Chromatin wurde mittels eines Kits aufgereinigt (Zymo-Research, Irvine, USA) und das Chromatin mit einem Volumen von 40 µl von der Säule eluiert. Die so präparierte CHIP-DNA wurde mittels q-PCR Messung analysiert.

1 x PBS:	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,7 mM KH ₂ PO ₄
FA-Lysepuffer:	50 mM HEPES-KOH pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8,0; 1 % Triton-X-100, 1 % Natrium-Deoxycholat; 0,4 % SDS
RIPA-Puffer:	50 mM Tris-HCl pH 8; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA pH 8,0; 1 % NP-40; 0,5 % Natrium-Deoxycholat
Waschpuffer I:	0,1 % SDS; 1 % Triton-X-100; 2 mM EDTA pH 8; 150 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8
Waschpuffer II:	0,1 % SDS; 1 % Triton-X-100; 2 mM EDTA pH 8; 500 mM NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 8
Elutionspuffer:	1 % SDS; 100 mM NaHCO ₃
SSD:	1 µg/µl in H ₂ O (Sigma Aldrich, München)

3.3.11 ChIP-ReChIP (sequentieller ChIP)

Eine sequentiellen ChIP-Analyse bietet die Möglichkeit, die *in-vivo* Kollokalisierung von zwei interagierenden Proteinen oder deren engen Kontakt auf einem Chromatinfragment durch die Durchführung zweier, unabhängiger Immunopräzipitationen unter Verwendung spezifischer Antikörper nachzuweisen. Zu diesem Zweck wurde ein verändertes und erweitertes Vorgehen gemäß dem ChIP-Protokoll (siehe Abschnitt 3.3.9) durchgeführt. Nach Abschluss der Waschschriffe der ersten Immunopräzipitation wurden die Protein/DNA Komplexe durch die Zugabe von 50 µl DTT 10 mM, unter ständigem vortexen bei 30°C eluiert. Das Eluat wurde 1:10 in FA-Lysepuffer verdünnt und bei der nachfolgenden Immunopräzipitation die *Beads* zusammen mit dem zweiten spezifischen Antikörper bzw. IgG als Kontrolle zugegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Nachfolgend wurde das ChIP-Protokoll verwendet und eine Input-Probe mitgeführt.

3.3.12 Markierung des Zellproteoms mit stabilen Isotopen in Zellkultur (SILAC)

Für eine massenspektrometrische Markierung von Aminosäuren mittels der SILAC Methode wurden die Zelllinien K562 BirA Ligase und K562 BirA-Tal1 verwendet. Hierbei wurde die Zelllinien die K562 BirA Zellen in „leichtem“ und die K562 BirA-Tal1 Zellen in „schwerem“ RPMI SILAC Medium (komplettiert durch 10 % hitzeinaktivierten fetalem Kälberserum (Sigma), 2mM Glutamin (PAA, Pasching) und 1% Penicillin/Streptomycin (PAA, Pasching) kultiviert. Dem „leichten“ Medium wurde unmarkiertes 84 mg/l L-Arginin und 146 mg/l L-Lysin (Sigma) bzw. dem „schweren“ Medium die markierten Analoge ¹³C₆, ¹⁵N₄-L

Arginin (Arg-10) und $^{13}\text{C}_6$, $^{15}\text{N}_2$ -L-Lysin (Lys-8) in gleicher Konzentration zugesetzt. Zur Gewährleistung einer vollständigen Isotopen Markierung des Proteoms wurden die Zellen für mindestens 9 Passagen in SILAC Medium kultiviert (Ong and Mann 2006).

3.3.13 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Bei einer Transfektion werden exogene Nukleinsäuren in eukaryotischen Zellen unter Verwendung von kationischen Lipiden und ungeladenen Helferlipiden eingebracht. Die Transfektion von HEK293T-Zellen erfolgte mit dem Transfektionsreagenz Metafecten (Biontex, München) nach Angaben des Herstellers.

Für die Interaktionsstudien mittels Immunopräzipitation wurden HEK293T-Zellen in einer Zelldichte von 4×10^5 /Well in eine 6-Well Platte ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden für die Tal1/PADI4 Interaktionsstudien 2 μg Tal1-Flag und 2 μg PADI4-2HA mit 4 μl Metafecten transfiziert. Der Transfektionsansatz wurde für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die Zellen gegeben.

3.3.14 Luciferasestudien

Das pBIND Tal1-Plasmid wurde zusammen mit dem Reporter pG5luc in HEK293 Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden wurde die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und durch die Verwendung von 90 μl Luci-Lysepuffer lysiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden 10 μl des Lysats in eine 96-Well Platte pipettiert. Im einem Luminometer (Microumat LB96P, Berthold Technologies, Bad Wildbad) wurde das emittierte Licht, welches bei der durch die Luciferase katalysierten Oxidation des Luciferins freigesetzt wurde, bei einer Wellenlänge von 562 nm gemessen. Als Basalwert der gesamten Messung diente der Luciferase-Lyse Puffer.

Luciferase-Lyse-Puffer: 50 mM Tris pH 7,4; 1 % Triton X-100; 50 mM NaCl

Luciferase-Puffer: 21,625 mM Glycylglycin; 1 mM ATP (Carl-Roth #CN22.1, Karlsruhe);
10 mM MgSO_4 ; 0,075 mM Luciferin (Carl-Roth #CN24.3, Karlsruhe)

Durch die Cotransfektion einer β -Galactosidase konnte die Transfektionseffizienz der

verschiedenen Proben mit einbezogen werden. Für die Messung der β -Galaktosidase Aktivität wurden 10 μ l des Lysats in eine 96-Well Platte pipettiert und 100 μ l β -Galactosidase Lösung zugegeben. Die β -Galaktosidase katalysiert die Hydrolyse von *o*-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid (ONPG) zu Galaktose und *ortho*-Nitrophenol. Die Umsetzung von *ortho*-Nitrophenol resultiert in einer Gelbfärbung, die mit dem Gerät SpectraMax 340 (Molecular Devices, Sunnyvale) mit dem Programm *SPF SoftMaxPro* bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen wurde

β -Galaktosidase-Lösung:	11,1 mM $MgCl_2$; 50 mM β -Mercaptoethanol; 3,25 mM ONPG; 74,4 mM Natrium-Phosphat pH 7,5
Na-Phosphat-Lösung (0,1 M):	82 mM $Na_2HPO_4 \times 2H_2O$; 18 mM $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$
ONPG:	13,28 mM in 0,1 M Natrium-Phosphat-Lösung

4. Ergebnisse

4.1 Identifikation neuer Tal1-Cofaktoren

4.1.1 Identifizierung neuer Cofaktoren von Tal1 mittels Affinitätsaufreinigung und Massenspektrometrie

Zur Identifizierung neuer Cofaktoren des Transkriptionsfaktors Tal1 wurde eine Affinitätsaufreinigung durchgeführt. Hierfür wurde die Erythroleukämie-Zelllinie K562 verwendet, die nach einer retroviralen Insertion N-terminal BirA *getaggt*es Tal1-Protein sowie eine Biotin Ligase (BirA) stabil exprimierte. Durch die Biotin Ligase (BirA) wurde Tal1 biotinyliert und konnte durch die Verwendung von Streptavidin-*Beads* affinitätsaufgereinigt werden (Abb. 4.1A). Als Kontrolle wurde eine Zelllinie verwendet, die nur die Biotin Ligase (BirA) exprimierte (Abb. 4.1B).

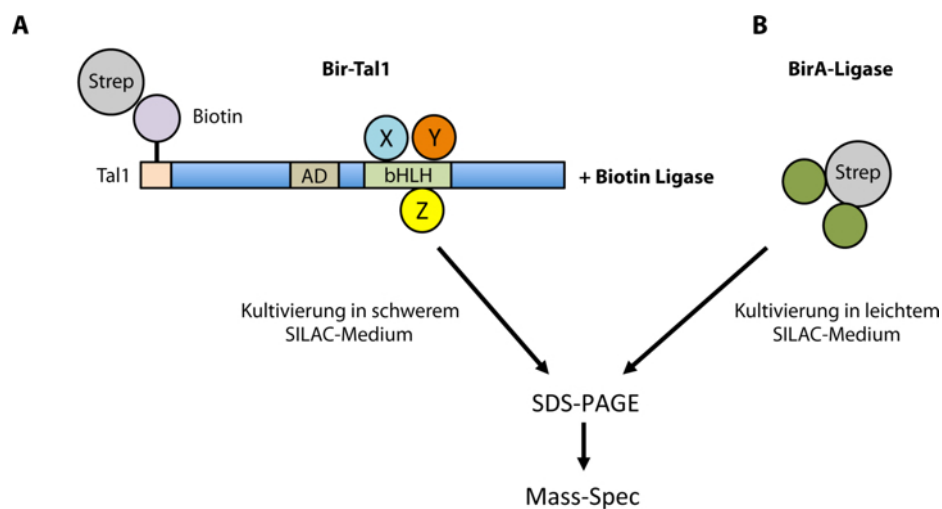


Abb. 4.1: Schematische Abb. der Affinitätsaufreinigung zur Identifikation neuer Tal1-Cofaktoren. (A) Das Tal1-Protein wird stabil in der Zelllinie K562 exprimiert und besitzt N-terminal einen BirA-*tag*. Durch die Co-Expression einer Biotin-Ligase wird das Tal1-Protein biotinyliert. Dies ermöglicht eine Affinitätsaufreinigung des Tal1-Proteins und der gebundenen Cofaktoren (bezeichnet als X, Y, Z) mit Streptavidin-*Beads*. **(B)** Als Kontrolle wurde eine K562-Zelllinie mitgeführt, die stabil nur die Biotin-Ligase exprimiert. Die Kultivierung der K562 BirA-Tal1 Zelllinie erfolgte für eine spätere quantitative massenspektrometrische Analyse in schwerem SILAC-Medium und bei der Kontroll-Zelllinie in leichtem SILAC-Medium. Die Affinitätsaufreinigungen der in schweren und leichtem SILAC-Medium kultivierten Zellen wurden vereint und mittels SDS-PAGE Analyse aufgetrennt. Die durch eine Coomassie-Färbung visualisierte Banden wurden ausgeschnitten und mittels quantitativer Massenspektrometrie analysiert.

Für eine quantitative massenspektrometrische Analyse wurden die verwendeten Zellen zuvor in SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) Medium kultiviert. Die

Tal1 überexprimierende Zellen K562 BirA-Tal1 wurden mit „schweren“ Aminosäuren (Lys +8, Arg +10) und die BirA Kontrollzellen in Medium mit „leichten“ Aminosäuren (Lys 0, Arg 0) kultiviert, bis diese inkorporiert waren. Hierdurch kommt es zu einem Einbau von Aminosäuren, die nicht radioaktive Isotope tragen, in das Proteom der Zellen. Dies ermöglicht es, die relative Abundanz eines Proteins zwischen zwei verschiedenen Proben zu bestimmen (Ong *et al.*, 2002). Durch die Inkorporation der Isotope kann in einer anschließenden massenspektrometrischen Messung ein Massenunterschied einer „schweren“ (BirA-Tal1) zu einer unmarkierten, leichten Probe (BirA-Ligase) festgestellt werden. Durch die Verwendung geeigneter Bedingungen während der Kernextrakt-Herstellung sowie bei der Affinitätsaufreinigung, d.h. durch die Auswahl geeigneter Pufferbedingungen und der Anzahl von Waschschritten, sollten zum einen die Interaktionen der im Tal1-Komplex assoziierten Cofaktoren stabilisiert und zugleich unspezifisch gebundene Proteine ausgeschlossen werden. Zunächst wurden aus Kernextrakten der Zelllinie K562 biotinyliertes Tal1 mit Streptavidin-*Beads* aufgereinigt. Mittels SDS-PAGE Analyse wurde Tal1 und die assoziierten Cofaktoren des Komplexes aufgetrennt. Die aufgereinigten Proteine wurden mit kolloidalem Coomassie-Farbstoff angefärbt. Hierdurch konnten die differentiellen Banden, der biotinylierten Tal1 Aufreinigung im Vergleich zu der Kontroll-Zelllinie visualisiert werden (Abb 4.2A).

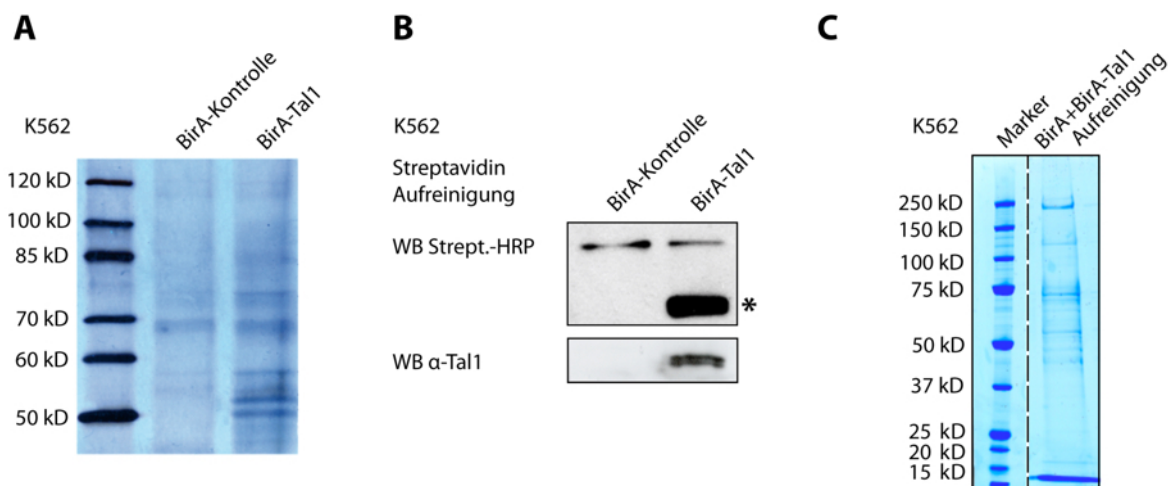


Abb. 4.2: Analyse der Affinitätsaufreinigung von Tal1 und potentiellen Cofaktoren. (A) Die Aufreinigung von Zellextrakten einer K562 Zelllinie, die stabil biotinyliertes Tal1 überexprimierte, wurde durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und durch eine Coomassiefärbung mit einer Kontroll-Zelllinie verglichen. Hierbei konnten mehrere Proteinbanden visualisiert werden, die in der BirA-Tal1 Probe, aber nicht in der Kontrollprobe vorhanden waren. (B) Durch eine Western-Blot Analyse der Affinitätsaufreinigung konnte die Tal1-Überexpression und dessen Biotinylierung in der BirA-Tal1 Zelllinie nachgewiesen werden. Die durch eine Streptavidin *Horseradish-Peroxidase* nachgewiesene Biotinylierung des Tal1-Protein ist markiert (*). (C) Für eine quantitative Massenspektrometrie mit SILAC wurden die Proben der BirA-Kontrolle und BirA-Tal1 im Verhältnis 1:1 vereint. Nach einer Auftrennung mittels 1D SDS-PAGE erfolgte eine Coomassie-Färbung. Aus dem Gel wurden 23 Proteinbanden für die nachfolgende Massenspektrometrie ausgeschnitten.

Es konnten mehrere Protein Banden detektiert werden, die in der Probe der BirA-Tal1 Affinitäts-Aufreinigung, aber nicht in der als BirA-Kontrolle bezeichneten Probe bestimmt werden konnte. Zusätzlich wurde in einem weiteren Schritt die Tal1-Expression nach einer Affinitätsaufreinigung mit einer Western-Blot Analyse untersucht. Unter Verwendung eines Tal1-Antikörpers konnte die Überexpression von Tal1 gegenüber der Kontrolle nachgewiesen werden (Abb. 4.2B). Unter Verwendung eines Streptavidin-Antikörpers konnte die Biotinylierung von Tal1 nachgewiesen werden. Nachfolgend wurde die Affinitätsaufreinigung wiederholt, um Tal1 und dessen interagierende Cofaktoren mit einer SILAC Massenspektrometrie zu identifizieren. Durch die Kultivierung der K562 BirA-Tal1 Zellen in dem „schweren“ SILAC Medium (Lys +8, Arg +10) wurden Aminosäuren inkorporiert, die sich durch eine Massendifferenz von 8 bzw. 10 Da von der Kontrolle unterscheiden, die in „leichtem“ SILAC Medium (Lys 0, Arg 0) kultiviert wurden. Für eine quantitative Bestimmung neuer Cofaktoren von Tal1 wurden die Affinitätsaufreinigung der Kontrolle (leichte Peptide) mit denen der Tal1 Probe im Verhältnis 1:1 gemischt. Nach einer 1D SDS-PAGE Auftrennung und Coomassie-Färbung wurden 23 Proteinbanden aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektrometrisch analysiert. Auf Basis der Intensitäten der Peptidpaare konnten die relativen Proteinabundanzen mittels des SILAC-Verhältnisses bestimmt werden. Ab einem SILAC Verhältnis von > 5 kann von einer signifikanten Interaktion zweier Proteine ausgegangen werden. Die Tabelle 4.1 gibt die Ergebnisse der SILAC-Messung wieder.

Protein	Peptide	Verhältnis H/L normalisiert	Sequenzabdeckung (%)
PADI4	4	6,74	16,7
TAL1	16	17,92	57,1
E47	16	19,73	32,4
LDB1	14	16,46	44
LMO2	9	19,98	38,3
ETO2/MTG16	26	49,46	41,7
TCF4	28	22,91	56,7
TCF12	12	21,90	20,2
CBFA2T3	26	20,69	47,3
CBFA2T2/MTGR1	13	10,72	28,7

Tabelle 4.1: PADI4 ist ein neuer Tal1 Interaktionspartner. Durch eine SILAC-basierte Massenspektrometrie konnte PADI4 (Peptidyl-Arginin-Deiminase Typ IV) als neuer Tal1-Interaktionspartner identifiziert werden. Neben Tal1 konnten durch die Analyse auch die bereits beschriebenen Cofaktoren E47, LDB1 und LMO2 ermittelt werden. Angegeben ist die Anzahl der identifizierten Peptide und deren Sequenzabdeckung in Prozent. Das SILAC-Verhältnis H/L ist ein Maß für die Wahrscheinlichkeit einer Interaktion von Tal1 mit einem identifizierten Protein.

Diese gibt die Anzahl der identifizierten Peptide, das normalisierte SILAC-Verhältnis und die Sequenz-Abdeckung der Peptide in Prozent wieder. Als neuer Interaktionspartner von Tal1 konnte die Peptidyl-Arginin-Deiminase Typ IV (PADI4) identifiziert werden. Neben Tal1 konnten weitere, bereits publizierte Cofaktoren bestimmt werden, wie z.B. E47, LDB1 und LMO2. In den folgenden Experimenten sollte die Tal1/PADI4 Interaktion zunächst biochemisch charakterisiert werden.

4.1.2 Verifikation der Interaktion von Tal1 und PADI4

Die Ergebnisse der Massenspektrometrie, die auf eine Interaktion von Tal1 mit PADI4 hindeuteten, sollten durch eine Co-Immunopräzipitation untersucht bzw. verifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden HEK293T Zellen mit einem Flag-*getaggten* Tal1 und HA-*getaggten* PADI4-Expressionsvektor transient transfiziert. Von diesen Zellen wurden Proteinlysate hergestellt und das *getaggte* Tal1-Protein unter Verwendung von anti-Flag Agarose *Beads* präzipitiert. Nach einer SDS Gelelektrophorese und anschließender Western-Blot Analyse konnte das mit dem Tal1-Protein Co-Immunopräzipitierte PADI4-Protein mittels eines HA-Antikörpers erfolgreich nachgewiesen werden (Abb. 4.3A).

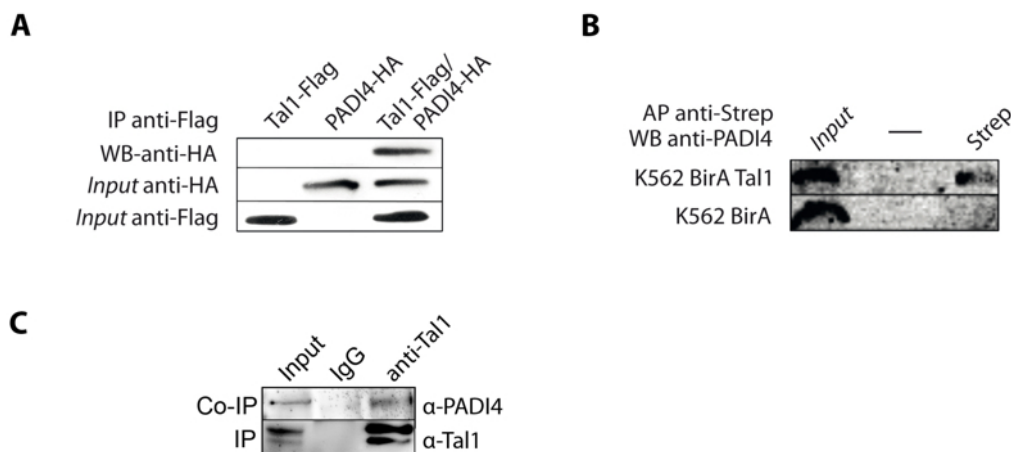


Abb. 4.3: PADI4 ist ein Interaktionspartner von Tal1. (A) HEK293T Zellen wurden mit Expressionskonstrukten von Tal1 und PADI4 transient transfiziert und nachfolgend wurden hiervon Zell-Lysate hergestellt. Das Flag-Tal1 Fusionsprotein wurde unter Verwendung von anti-Flag Agarose *Beads* aus den Lysaten präzipitiert. Der Nachweis der Interaktion von Tal1-Flag und PADI4-HA erfolgte unter Verwendung eines HA-Antikörpers. Tal1 wurde unter Verwendung eines Flag Antikörpers detektiert. (B) Überexprimiertes Tal1 Protein interagiert mit endogenem PADI4 Protein in K562 Zellen. Die Tal1 überexprimierende Zelllinie K562 BirA Tal1 wurde zur Verifizierung der Interaktion von Tal1 und PADI4 verwendet. Von 2×10^8 K562 Zellen wurden Kernextrakte hergestellt und Tal1 unter Verwendung von Streptavidin *Beads* aufgereinigt. Für einen Nachweis einer Interaktion von überexprimiertem Tal1 mit endogenem PADI4 erfolgte unter Verwendung eines spezifischen PADI4 Antikörpers. (C) Tal1 interagiert mit PADI4 endogen in HEL-Zellen. Nach Herstellung von Kernextrakten aus 2×10^7 HEL Zellen wurden die Proben für die Kontrolle mit IgG bzw. für eine Co-Immunopräzipitation von Tal1 und PADI4 mit Tal1 Antikörper versetzt. Der Nachweis der endogenen Interaktion bzw. der Co-Immunopräzipitation von Tal1 und PADI4 erfolgte unter Anwendung eines PADI4 Antikörpers. Die erfolgreiche Immunpräzipitation des Tal1 Proteins wurde durch Verwendung eines Tal1 Antikörper bestätigt.

Die durch die Massenspektrometrie aufgezeigte Interaktion von Tal1 und PADI4 konnte somit in einer transienten Interaktionsanalyse in HEK293T Zellen bestätigt werden. Weitergehend wurde eine Streptavidin Affinitätsaufreinigung unter Verwendung der K562 BirA-Tal1 und K562 BirA Zellen wiederholt. Nach einer SDS-PAGE und Western-Blot Analyse konnte mit einem spezifischen Antikörper das PADI4-Protein in der affinitätsaufgereinigten K562-BirA Tal1-Probe detektiert werden (Abb. 4.3B). Somit konnte gezeigt werden, daß endogen exprimiertes PADI4-Protein mit biotinylierten Tal1-Protein in K562-Zellen interagiert. Die Interaktion des Tal1- und PADI4 Protein wurde auch unter endogenen Bedingungen, unter Verwendung der Erythroleukämie-Zelllinie HEL untersucht. Zu diesem Zweck wurden Kernextrakte hergestellt und Tal1 durch Verwendung eines spezifischen Antikörpers immunopräzipitiert. Das an Tal1 gebundene und Co-immunopräzipitierte PADI4-Protein konnte nach einer SDS-Gelelektrophorese und Western-Blot Analyse als neuer Cofaktor von Tal1 nachgewiesen werden (Abb. 4.3C). Dieser Versuch wurde freundlicherweise durch Dr. Jörn Lausen durchgeführt.

4.1.3 Direkte Interaktion zwischen Tal1 und PADI4

Die Interaktion von Tal1 und PADI4 konnte sowohl im transienten, als auch im endogenen Zellsystem verifiziert werden. Um diese Interaktion weitergehend zu untersuchen, d.h. um festzustellen, ob eine direkte Protein-Protein-Interaktion vorliegt, wurden *GST-pulldown* Experimente durchgeführt. Hierzu wurde Tal1 bzw. PADI4 als GST-Fusionsprotein in *E.coli* BL21 exprimiert und mit *GST-Beads* aus den Lysaten aufgereinigt. Als Kontrolle wurde nur GST-Protein exprimiert und an *GST-Beads* gekoppelt, um eine unspezifische Interaktion auszuschließen, die über das GST-Protein vermittelt wird. Die zu untersuchenden Interaktionspartner wurden *in-vitro* translatiert und radioaktiv markiertes ³⁵S-Methionin in die Proteine inkorporiert. Das an *GST-Beads* gebundene Tal1-GST Protein wurde mit dem markierten PADI4-S³⁵-Protein inkubiert und die *Beads* anschließend gewaschen. Die Proben wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt und über eine Autoradiographie detektiert. Die gesamte Interaktionsanalyse wurde zusätzlich *vice-versa* durch Verwendung von PADI4-GST und Tal1-S³⁵-Protein durchgeführt. Durch die beiden Versuchsansätze konnte eine Interaktion von PADI4-S³⁵ und GST-Tal1 (Abb. 4.4A) sowie umgekehrt von Tal1-S³⁵ mit GST-PADI4 nachgewiesen werden (Abb 4.4B).

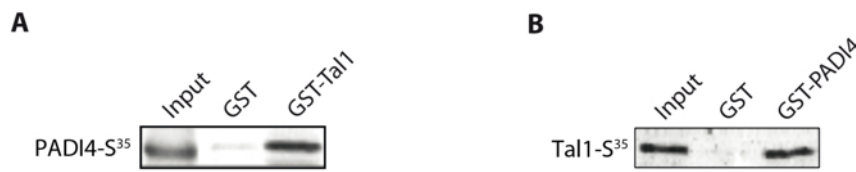


Abb. 4.4: Interaktion von Tal1 und PADI4 in einem GST-Pulldown. (A) In *E.coli* BL21 exprimiertes GST-Tal1 Protein wurde mit *in-vitro* translatiertem und radioaktiv markiertem PADI4-S³⁵-Protein inkubiert. Die Interaktion wurde durch SDS-PAGE und einer Autoradiographie Analyse nachgewiesen. Die Autoradiographie nach Auftrennung zeigt die Interaktion von PADI4-S³⁵-Protein mit GST-Tal1. Dieser Versuch wurde freundlicherweise durch Olga Lausen durchgeführt. **(B)** Durch einen GST-Pulldown von Tal1-S³⁵- und GST-PADI4 Protein konnte eine Interaktion der beiden Proteine aufgezeigt werden.

4.1.4 Der C-Terminus von Tal1 interagiert mit dem C-Terminus von PADI4

Für eine Eingrenzung der Interaktionsflächen von Tal1 und PADI4 wurden weitergehende GST-pulldown Experimente durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden N- und C-terminale Konstrukte von PADI4 in *E.coli* BL21 als GST-Fusionsprotein exprimiert, sowie N- und C-terminale Konstrukte von *in-vitro* translatiertem und radioaktiv markiertem Tal1-S³⁵-Protein (Aminosäuren 1-176, 176-331) hergestellt. *In-vitro* translatiertes C- und N-terminales Tal1-S³⁵-Protein wurde in GST-pulldown Experimenten mit N- und C-terminalen GST-PADI4 Proteinen inkubiert. Nach einer SDS-PAGE Auftrennung wurde die Interaktion durch eine Autoradiographie nachgewiesen. Durch einen GST-pulldown von *in-vitro* translatierten N-terminalen Tal1-S³⁵-Protein konnte keine Interaktion mit dem N- und C-terminalen Teil von PADI4 nachgewiesen werden (Abb. 4.5A). Dem C-terminalen Tal1-S³⁵-Protein konnte keine Interaktion mit dem N-Terminus von GST-PADI4 zugeordnet werden. Nach einem GST-pulldown von C-terminalen Tal1-S³⁵-Protein (176-331), mit C-terminalen GST-PADI4 konnte eine Interaktion nachgewiesen und somit die Interaktionsfläche der beiden Proteine auf diesen Bereich eingegrenzt werden. Eine schematische Darstellung der Interaktion des Tal1- und PADI4-Protein, der jeweils über den C-Terminus erfolgt, ist in der Abb. 4.5B dargestellt.

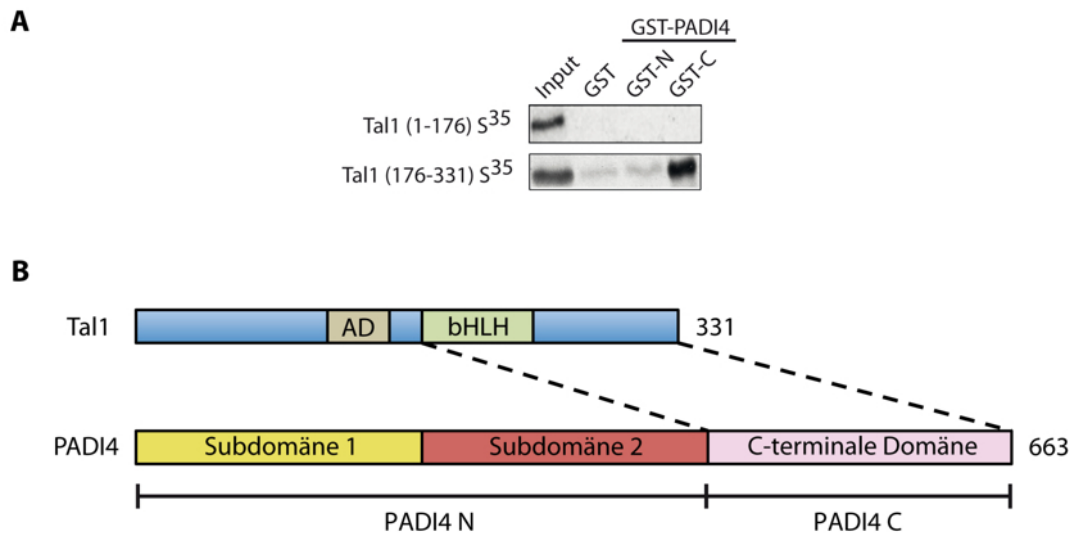


Abb. 4.5: Kartierung der Interaktionsfläche von Tal1 und PADI4. (A) Der C-terminale Aminosäurebereich 176-331 von Tal1 interagiert mit dem C-Terminus von PADI4. *In-vitro* translatiertes und radioaktiv markiertes Tal1-Protein wurde in einem GST-pulldown Experiment mit in *E.coli* exprimierten Konstrukten des N- und C-Terminus von PADI4 inkubiert. Die Autoradiographie nach Auftrennung zeigt die Interaktion des C-Terminales Bereichs von Tal1 mit dem C-Terminales Bereich von PADI4. (B) Schematische Darstellung der Ergebnisse zur Kartierung der Interaktionsflächen von Tal1 und PADI4. Die Bereiche der Proteininteraktion zwischen Tal1 und PADI4 sind durch gestrichelte Linien dargestellt.

4.1.5 Das Tal1- und PADI4-Protein ist im Nukleus lokalisiert

Durch Immunfluoreszenz-Analysen wurde die Lokalisation der Interaktionspartner Tal1 und PADI4 in der Zelle untersucht werden. Hierfür wurden Tal1- und PADI4-Expressionsplasmide in Hela-Zellen transfiziert und eine Immunfluoreszenz-Färbung durchgeführt. Durch eine Überlappung der Analysen konnte eine Co-Lokalisation von Tal1 und PADI4 im Nukleus von Hela-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 4.6).

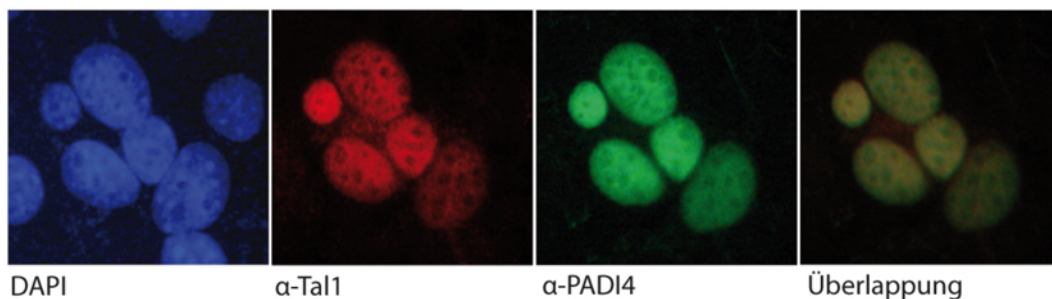


Abb. 4.6: Immunfluoreszenz Analyse der Tal1/PADI4 Interaktion in Hela-Zellen. Nach Transfektion der Expressionskonstrukte von Tal1 und PADI4 in Hela Zellen wurden diese auf Glasplättchen ausgesät und eine Immunfluoreszenz Färbung durchgeführt. Die DNA wurde durch die Verwendung von DAPI angefärbt. Die Detektion von Tal1 erfolgte unter Verwendung von einem Phycoerythrin (PE) gekoppelten AK, bei PADI4 war dieser an Fluorescein Isothiocyanate FITC gekoppelt. Durch eine Überlappung der Analysen konnte die Co-Lokalisation von Tal1 und PADI4 nachgewiesen werden.

4.1.6 Identifizierung von Tal1/PADI4 Zielgenen durch Genexpressionsanalysen

Für eine weitergehende Untersuchung der biologischen Funktion der Tal1/PADI4 Interaktion sollten gemeinsam regulierte Zielgene identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurde eine *Microarray*-Expressionsanalyse nach Tal1 und PADI4 *knock-down* in der Erythroleukämie-Zelllinie HEL durchgeführt. Zunächst sollte eine Herunterregulation der mRNA Expression von Tal1 und PADI4 durch eine q-PCR Messung verifiziert werden. Hierdurch konnte eine Herunterregulation der Tal1 mRNA Expression um etwa 70 Prozent (Abb 4.7A) und für die beiden verwendeten shPADI4 Konstrukte eine Reduzierung um jeweils etwa 80 Prozent gegenüber der Kontrolle festgestellt werden (Abb 4.7B).

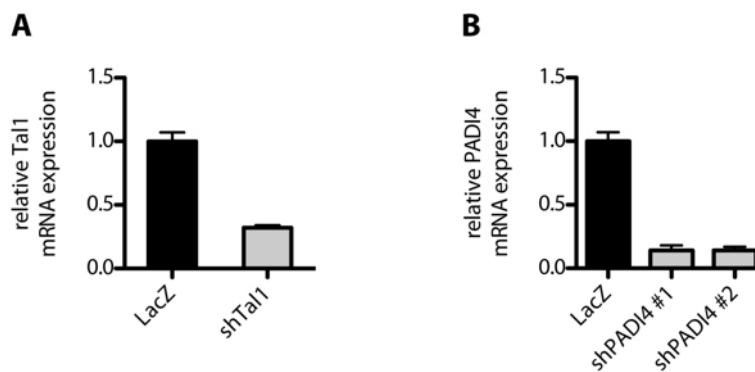


Abb. 4.7: Herunterregulation von Tal1 und PADI4. HEL-Zellen wurden mit shRNA gegen Tal1 und PADI4 transduziert und die Herunterregulation durch eine q-PCR Messung untersucht. **(A)** Die Verwendung einer Tal1 shRNA hatte eine Reduktion von etwa 70% der Tal1 mRNA, bezogen auf eine mitgeführte Kontrolle, zur Folge. **(B)** Die mRNA Expression von PADI4 konnte unter Verwendung zweier verschiedener shRNA Sequenzen um jeweils etwa 80% gegenüber der Kontrolle verringert werden.

Die so vorbereiteten Zellen wurden gerntet, die RNA isoliert und durch das Transkriptomanalyselabor Göttingen durch Verwendung eines *Agilent Array* analysiert. Durch den *knock-down* von Tal1 wurden insgesamt 1203 Gene in ihrer Expression verändert. Hiervon waren 520 Gene in ihrer Expression hochreguliert und 683 Gene herunterreguliert (Abb. 4.8A). Die *Microarray*-Analyse des PADI4 *knock-down* ergab eine Regulation von insgesamt 702 Genen. Hiervon wurden 262 Gene heraufreguliert und 440 Gene herunterreguliert (Abb. 4.8B).

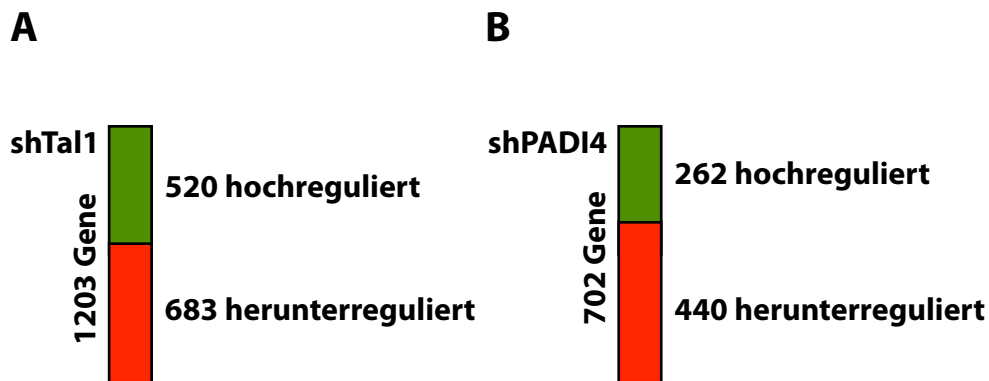


Abb. 4.8: Microarray-Genexpressionsanalyse nach Tal1 und PADI4 knock-down. (A) Durch einen *knock-down* von Tal1 in HEL Zellen konnte eine Genexpressions-Veränderung von 1203 Genen ermittelt werden. Hiervon wurden 520 Gene hoch- und 683 Gene herunterreguliert. (B) Der *knock-down* von PADI4 resultierte in einer Expressionsänderung von 702 Genen, wovon 262 hochreguliert und 440 herunterreguliert waren.

Die beiden Datensätze der Genexpressionsanalyse des shTal1 und shPADI4 *knock-down* wurden bioinformatisch unter Verwendung des Programms BioVenn untersucht (Hulsen *et al.*, 2008). Hierbei können biologische Datensätze vergleichend analysiert und deren gemeinsame Elemente graphisch, in Form von Venn-Diagrammen, dargestellt werden. Es ergab sich eine Überlappung von insgesamt 414 Genen, die differentiell reguliert in beiden Datensätzen vorlagen (Abb. 4.9A).

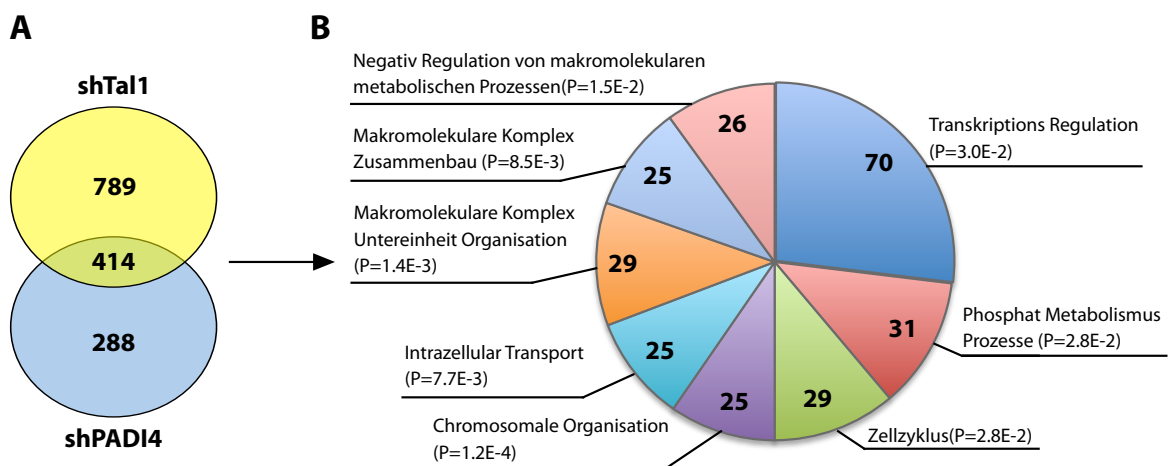


Abb. 4.9: Bioinformatische Analyse der Microarray-Genexpressionsmessung nach Tal1 und PADI4 knock-down. (A) Durch eine vergleichende Analyse der veränderten Genexpression nach Tal1 und PADI4 *knock-down* wurden 414 Gene identifiziert, die einer möglichen Koregulation unterliegen. Weitergehend wurden diese 414 Gene mit publizierten ChIP-Sequenzierungsdaten verglichen. (B) Die regulierten Gene des *Microarrays* wurden unter Verwendung der Software *DAVID Bioinformatics Resources 6.7* (Huang *et al.*, 2009) kategorisiert. Hiervon konnten die meisten Gene unter anderen den Prozessen der Transkriptions Regulation, Phosphat Metabolismus Prozessen und Zellzyklus zugeordnet werden.

Für eine weitergehende Einordnung der biologischen Funktion der identifizierten Gene wurde diese durch eine *Gene Ontology* Anreicherungsanalyse untersucht. Durch die Verwendung der Software DAVID Bioinformatics Resources 6.7 (Huang *et al.*, 2009) wurden die durch Tal1 und PADI4 koregulierten Gene kategorisiert, d.h. diese wurden sogenannten GO-Termini (gene ontology) zugeordnet (Abb. 4.9B). Die GO-Termini umfassen drei Bereiche der biomedizinischen Ontologie, die in die Bereiche „Biologischer Prozess“, „Molekulare Funktion“ und „Zelluläre Komponente“ unterteilt sind. Den größten Anteil der Genontologie Klassifizierung repräsentierten 70 Gene, die an der Transkriptionsregulation beteiligt sind. Die weiteren Bereiche umfassten eine meist ähnliche Anzahl an kategorisierten Genen, zu denen 31 dem Phosphat-Metabolismus zugeordnet wurden, 29 entstammten dem Bereich Zellzyklus, 25 der Chromosomen Organisation, 25 dem Intrazellulären Transport, 29 der Makromolekularen Komplex Organisation, 25 dem Makromolekularen Komplex Zusammenbau und 26 Genen der negativen Regulation von makromolekularen und metabolischen Prozessen.

Die durch eine *Microarray*-Analyse identifizierten 414 Gene nach Tal1 und PADI4 *knock-down* wurden nachfolgend mit bereits publizierten Daten einer genomweiten Tal1 ChIP-Sequenzierung in hämatopoetischen Vorläuferzellen verglichen (Wilson *et al.*, 2010). Durch diese Analysen wurden 162 Gene identifiziert, die somit eine differentielle *Microarray*-Genexpression nach Tal1 und PADI4 *knock-down* aufwiesen und für die durch ChIP-Sequenzierungen eine Bindung des Tal1-Proteins im Bereich ihrer Promotoren bestimmt werden konnte.

Die Ergebnisse der *Microarray*-Analyse wurden in einem unabhängigen Kontrollexperiment, d.h. durch eine quantitative RT-PCR-Analyse unter Verwendung genspezifischer Primer, verifiziert. Dabei wurde von den 162 potentiellen Tal1/PADI4-Zielgenen eine Gruppe von Genen ausgewählt, die eine Hochregulation der mRNA-Expression nach Tal1 und PADI4 *knock-down* zeigten. Hierzu zählten z.B. *IL6ST*, *CEBPε*, *KRAS*, *STIL* und *VEGFα*. In einer weiteren Gruppe wurden Gene analysiert, deren mRNA Expression nach Tal1 und PADI4 *knock-down* herunterreguliert wurden. Diese Gene sind *CTCF*, *CITED2*, *FGFR1OP2*, *MED20*, *TNFα* und *PIK3CB*. Das bereits in der Literatur beschriebene Tal1-Zielgen *GYP A* (Lahlil *et al.*, 2004) gehörte zu insgesamt 3 Genen der Genexpressionsanalyse, die eine inverse Regulation aufwiesen. Das bedeutet, daß nach Tal1 *knock-down* die *GYP A* mRNA-Expression herunter- und nach PADI4 *knock-down* hochreguliert war. Die Ergebnisse der q-PCR Verifizierungen für die in der *Microarray*-

Genexpressionanalyse herunterregulierten Gene sind in (Abb 4.10) zusammengefasst. Für die Gene *IL6ST*, *CEBPε* und *VEGFA* konnten die Expressionsverminderung nach einem *knock-down* von Tal1 und PADI4 durch die q-PCR Messungen bestätigt werden (Abb. 4.10A + B + C). Für das Onkogen *KRAS* waren die Ergebnisse der *Microarray*-Messungen nicht verifizierbar, d.h. abweichend hiervon kam es nach shTal1 und shPADI4 zu einer Erhöhung der Expression (Abb. 4.10D).

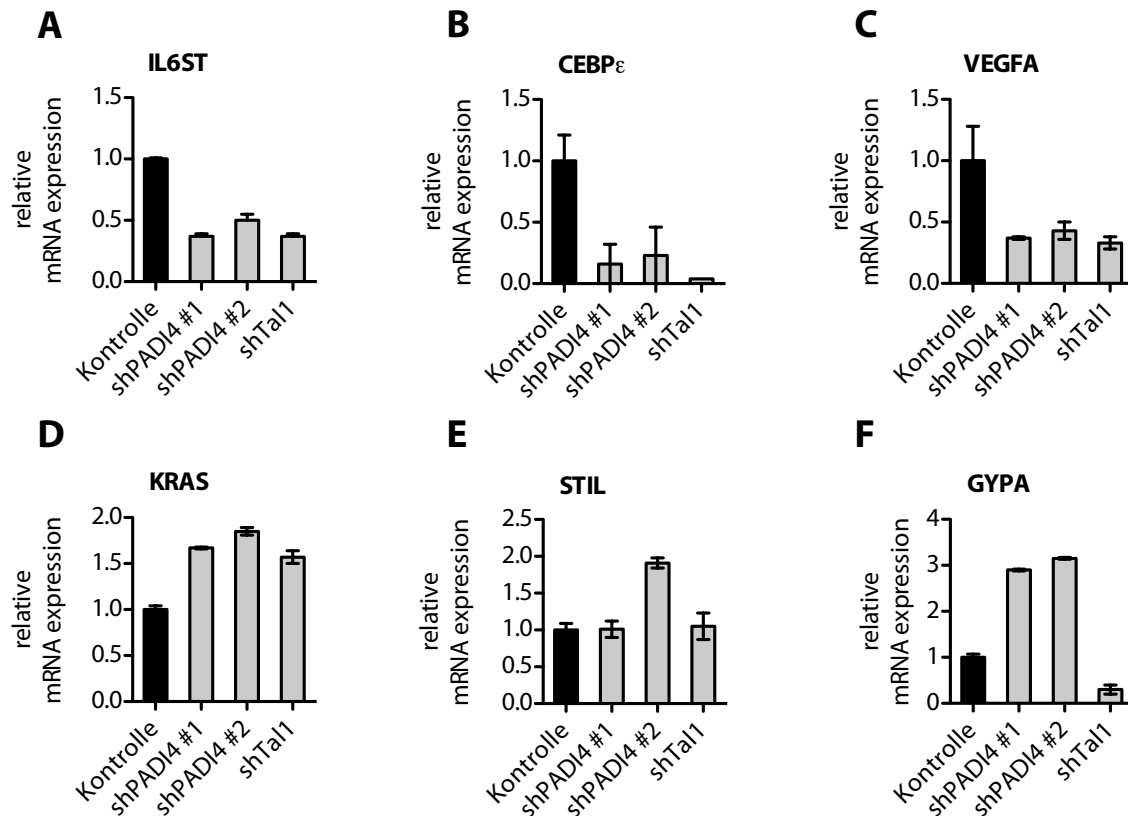


Abb. 4.10: Verifizierung der veränderten Genexpression nach einem Tal1 und PADI4 *knock-down*. Die Gene der *Microarray*-Messung, die nach Tal1 und PADI4 *knock-down* in HEL Zellen herunterreguliert waren, wurden mittels einer q-PCR Messung reanalysiert. **(A) + (B) + (C)** Für die Gene *IL6ST*, *CEBPα* und *VEGFA* konnten die Daten der *Microarray*-Messung verifiziert werden, d.h. die Expression war in den shTal1 und shPADI4 Zellen verringert. **(D)** Für das Gen *KRAS* konnte abweichend eine Hochregulation der Expression nach Tal1 und PADI4 *knock-down* nachgewiesen werden. **(E)** Das Gen *STIL* wurde nach lentiviralen Transduktion einer shRNA Sequenz gegen PADI4 hochreguliert. Eine weitere PADI4 shRNA Sequenz zeigte ebenso wie eine Tal1 shRNA Sequenz keine Effekte auf die mRNA-Expression von *STIL*. **(F)** Hingegen konnte übereinstimmend mit den *Microarray*-Daten bei dem *GYPA* Gen eine inverse Regulation nach Tal1 und PADI4 *knock-down* gemessen werden. Während nach PADI4 *knock-down* die *GYPA* Expression hochreguliert wurde, konnte nach Tal1 *knock-down* eine Herabregulation der Expression bestimmt werden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von mindestens vier Messungen dar.

Diese Feststellung ist ebenfalls gültig für die Analysen des *STIL* Gens, die nicht wie im *Microarray* ermittelt, eine reduzierte Expression für shTal1 und shPADI4 aufwiesen. Die inverse Regulation der Expression des *GYPA* Gens durch Tal1 und PADI4 konnte hingegen

bestätigt werden, d.h. nach PADI4 *knock-down* war diese erhöht bzw. nach shTal1 verringert (Abb 4.10F).

In der Gruppe der hochregulierten Gene konnten für die Gene *CTCF*, *TNF α* , *FGFR1OP2* und *MED20* die *Microarray* Daten durch q-PCR Messungen bestätigt werden (Abb 4.11A+ B + C + D). Bei den Genen *CITED2* und *PIK3CB* konnte in den shPADI4 HEL-Zellen eine Hochregulation detektiert werden. In den HEL shTal1-Zellen zeigte sich jedoch eine leicht verminderte Expression bei *CITED2* (Abb. 4.11E) und keine mRNA Expressionsveränderung bei dem Gen *PIK3CB* (Abb 4.11F).

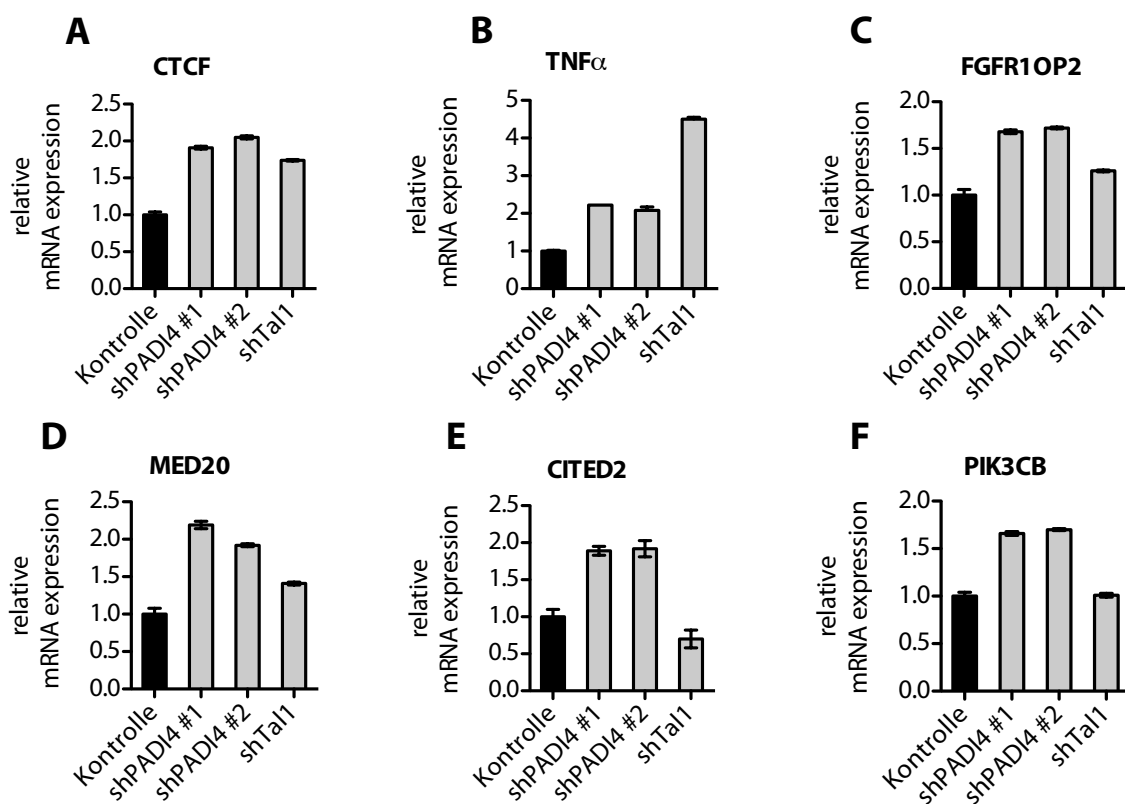


Abb. 4.11: Verifizierung der veränderten Genexpression nach einem Tal1 und PADI4 *knock-down*. Die Gene der *Microarray*-Messung, die nach Tal1 und PADI4 *knock-down* in HEL Zellen hochreguliert waren, wurden mittels einer q-PCR Messung reanalysiert. (A) + (B) + (C) + (D) Hierdurch konnten für die Gene *CTCF*, *TNF α* , *FGFR1OP2* und *MED20* die Ergebnisse der Genexpressionsmessung bestätigt werden, nach denen deren mRNA-Expression nach Tal1- und PADI4-*knock-down* hochreguliert wurde. (E) + (F) Für die Gene *CITED2* und *PIK3CB* konnte eine erhöhte mRNA-Expression nach Transduktion mit shPADI4 gefunden werden. Bei den shTal1 Zellen konnte für das *CITED2* Gen eine leicht verminderte bzw. für *PIK3CB* keine veränderte Expression nachgewiesen werden. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von mindestens vier Messungen dar.

4.1.7 *CTCF* und *IL6ST* sind direkte Tal1- und PADI4-Zielgene

Aufgrund der *Microarray* Analyse und den q-PCR Genexpressionsmessungen konnten die

Gene *CTCF*, *FGF10P2*, *TNF α* , *CEBP ϵ* , *IL6ST* und *VEGF α* als potentiell von Tal1 und PADI4 regulierte Gene bestimmt werden.

Für eine Analyse der Effekte der Tal1/PADI4 Interaktion auf die transkriptionelle Regulation dieser Zielgene wurden deren Promotorenbereiche auf potentielle Tal1-Bindestellen untersucht. Hierzu wurden zum einen der *UCSC Genome Browser* (Kent *et al.*, 2002) verwendet, der die Visualisierung bereits publizierter ChIP-Sequenzierungsdaten bietet. Zusätzlich wurden die Promotorregionen der Gene durch Verwendung der Software TESS (*transcription element search system*; Schug J, 2008) analysiert. Dabei wurden die Promotorsequenzen nach Tal1-Bindestellen untersucht. Die Sequenzen der *UCSC Genome Browser* und TESS-Analyse der potentiellen Tal1-Bindestellen im Promotorbereich wurden dazu verwendet um flankierende PCR-Primer zu generieren. Die Untersuchung der Bindung von Tal1 und des Cofaktors PADI4 an die Promotorbereiche der Zielgene *CTCF*, *IL6ST*, *TNF α* und *CEBP ϵ* erfolgte durch eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP). Für die Herstellung der ChIP-Lysate wurden HEL Zellen (HEL: *human erythroleukemia*) verwendet und die Proteine/DNA-Komplexe durch Zugabe von Formaldehyd verbunden. Die Zellen wurden lysiert und das Chromatin durch ein Ultraschallbad fragmentiert. Zur Anreicherung von Protein/DNA-Komplexe wurden spezifische Antikörper verwendet, die an magnetische *Beads* gekoppelt wurden. Nach einem Verdau der Proteine durch die Proteinase K wurde die DNA isoliert und in einer q-PCR Analyse unter Verwendung der zuvor generierten Primer amplifiziert. Die Promotoren der Gene *CTCF*, *GYPA*, *IL6ST*, *TNF α* und *CEBP ϵ* wurden dabei auf eine Bindung des Tal1- und PADI4-Protein untersucht. Hierdurch konnte gezeigt werden, daß Tal1 und PADI4 in dem Promotorbereich der Zielgene *CTCF*, *GYPA* und *IL6ST* bindet (Abb. 4.12 A, B, C). Für den Promotor-Sequenzbereich von *CEBP ϵ* konnte eine Bindung des Tal1-Proteins, aber keine Bindung von PADI4 detektiert werden (Abb. 4.12D). In dem Promotorbereich des Gen *TNF α* bindet zwar das PADI4-Protein, eine Okkupation durch Tal1 konnte nicht festgestellt werden (Abb. 4.12E).

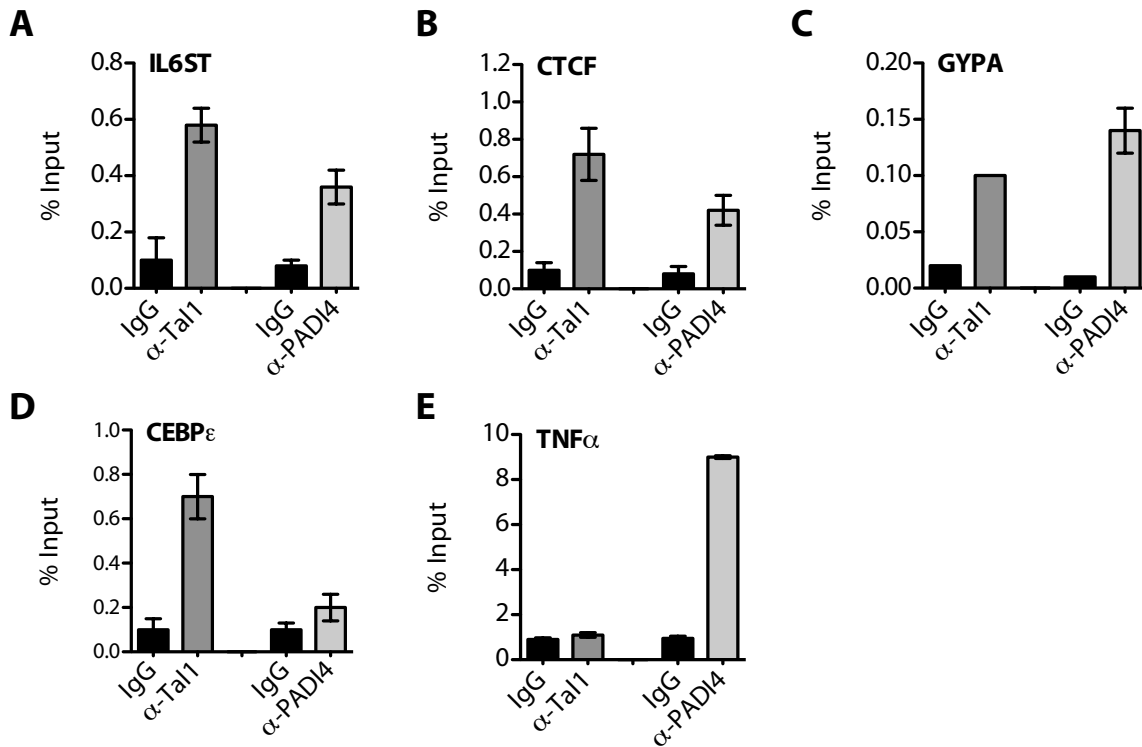


Abb. 4.12: Identifizierung von CTCF und IL6ST als Zielgene von Tal1 und PADI4. (A) + (B) + (C) Durch Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) Experimente und unter Verwendung von spezifischen Tal1 und PADI4 Antikörpern konnte im Promotorbereich von der Gene *IL6ST*, *CTCF* und *GYPA* eine Bindung von Tal1 und PADI4 festgestellt werden. (D) Im Promotorbereich von *CEBPε* konnte eine Bindung von Tal1, jedoch nicht von PADI4 nachgewiesen werden. (E) Für den Promotorbereich von *TNFα* konnte keine Okkupation des Transkriptionsfaktors Tal1 ermittelt werden. Demgegenüber bindet das PADI4-Protein im Promotorbereich von *TNFα*. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von mindestens vier Messungen dar.

Der Promotorbereich von *CTCF* und *IL6ST* wurde dahingehend genauer untersucht, inwieweit Tal1 und PADI4 in zusätzlichen, d.h. weiteren regulativen Bereichen binden und hierüber eine mögliche transkriptionelle Regulation der Genexpression ausüben. Daher wurden weitere Genabschnitte, die sich *upstream* bzw. *downstream* zum Transkriptionsstart befinden, für die weiteren Analysen ausgewählt. Die entsprechenden flankierenden *Primer* wurden erneut nach dem Vorkommen von E-Box Sequenzen (CANNTG), sowie durch die Analyse von bereits publizierten ChIP-Sequenzierungsdaten der Promotorbereiche von *CTCF* und *IL6ST* ausgewählt. Die Sequenzabschnitt-Position der verwendeten ChIP-Primer für den *CTCF*-Promotor können der Abb. 4.13A und für *IL6ST* der Abb. 4.14A entnommen werden. Für den *CTCF* Promotobereich zeigte sich eine erhöhte Anreicherung bzw. Okkupation von Tal1 und PADI4 in unmittelbarer Nähe des Transkriptionsstarts (Abb. 4.13 A + B, Primer B).

Für den hiervon *upstream* gelegenen Bereich des *CTCF*-Promotors konnte hingegen eine

hierzu verringerte Okkupation von Tal1 und PADI4 detektiert werden (Abb. 4.13 A + B, Primer B).

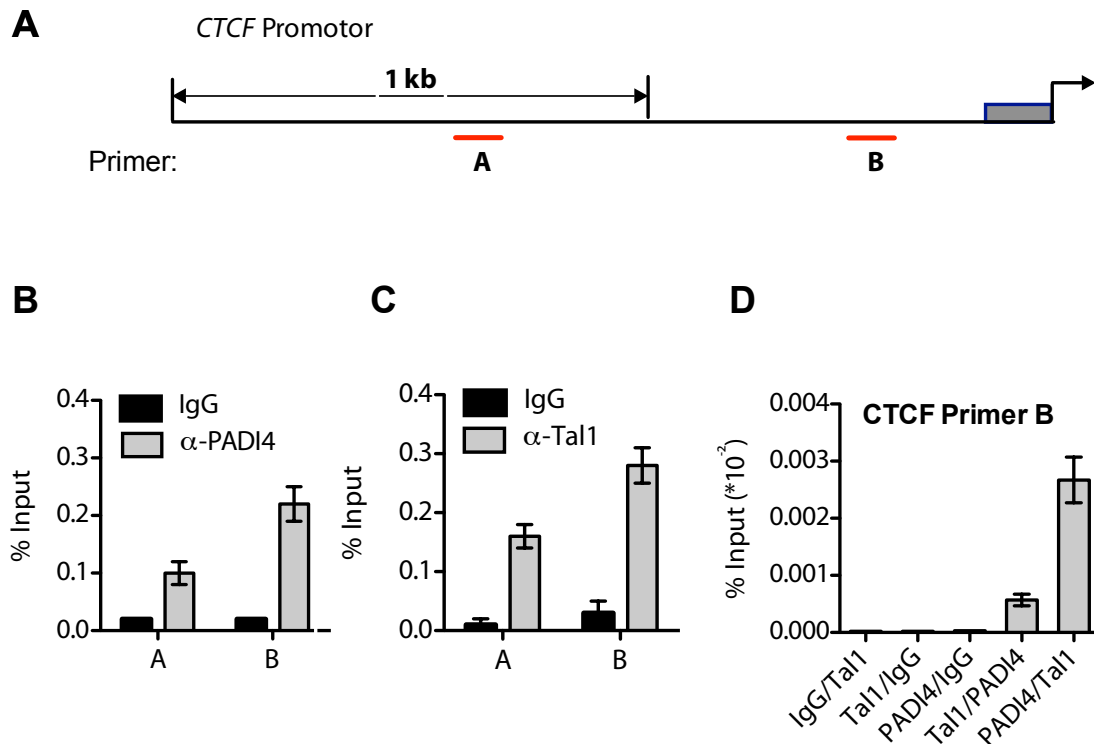


Abb. 4.13: Der Transkriptionsfaktor Tal1 und PADI4 binden in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes des CTCF Gens. (A) Schematische Darstellung des humanen CTCF-Promotorbereichs. Die Sequenz des CTCF Promotorbereichs wurde mit dem Programm TESS (*transcription element search system*, (Schug, 2008)) einer Analyse für potentielle Tal1 Bindungsstellen unterzogen. Hierbei wurden zwei Primerpaare ausgewählt, die *upstream* des Transkriptionsstartpunktes des CTCF Gens lokalisiert und als ChIP-Primer A und B bezeichnet sind. (B) + (C) Tal1 und PADI4 binden vermehrt in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes des CTCF Gens (Primer B), während hierauf bezogen die Bindung in *upstream* gelegenen Promotorbereichen geringer ist (Primer A). (D) Mittels eines sequentiellen ChIP-Experiments (ChIP-Re-ChIP), konnte eine simultane Bindung von Tal1 und PADI4 im proximalen CTCF-Promotorbereich detektiert werden. Diese Versuche wurde freundlicherweise durch Dr. Jörn Lausen durchgeführt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von mindestens vier Messungen dar.

Zusätzlich wurde für *CTCF* die gleichzeitige Bindung von Tal1 und PADI4 an den Promotorbereich unter Anwendung eines sequentiellen ChIP-Experiments (ChIP-Re-ChIP) untersucht. Für eine Quantifizierung mittels q-PCR Messung wurde der zum *CTCF*-Transkriptionsstartpunkt nahe gelegene *Primer B* verwendet. Dabei konnte eine gleichzeitige Bindung von Tal1 und PADI4 an den *CTCF*-Promotor festgestellt werden (Abb. 4.13D).

Für den *IL6ST*-Promotorbereich wurden bedingt durch eine erhöhte Anzahl von potentiellen Tal1-Bindestellen insgesamt sieben Primerpaare verwendet (Abb. 4.14 Primer

A – G).

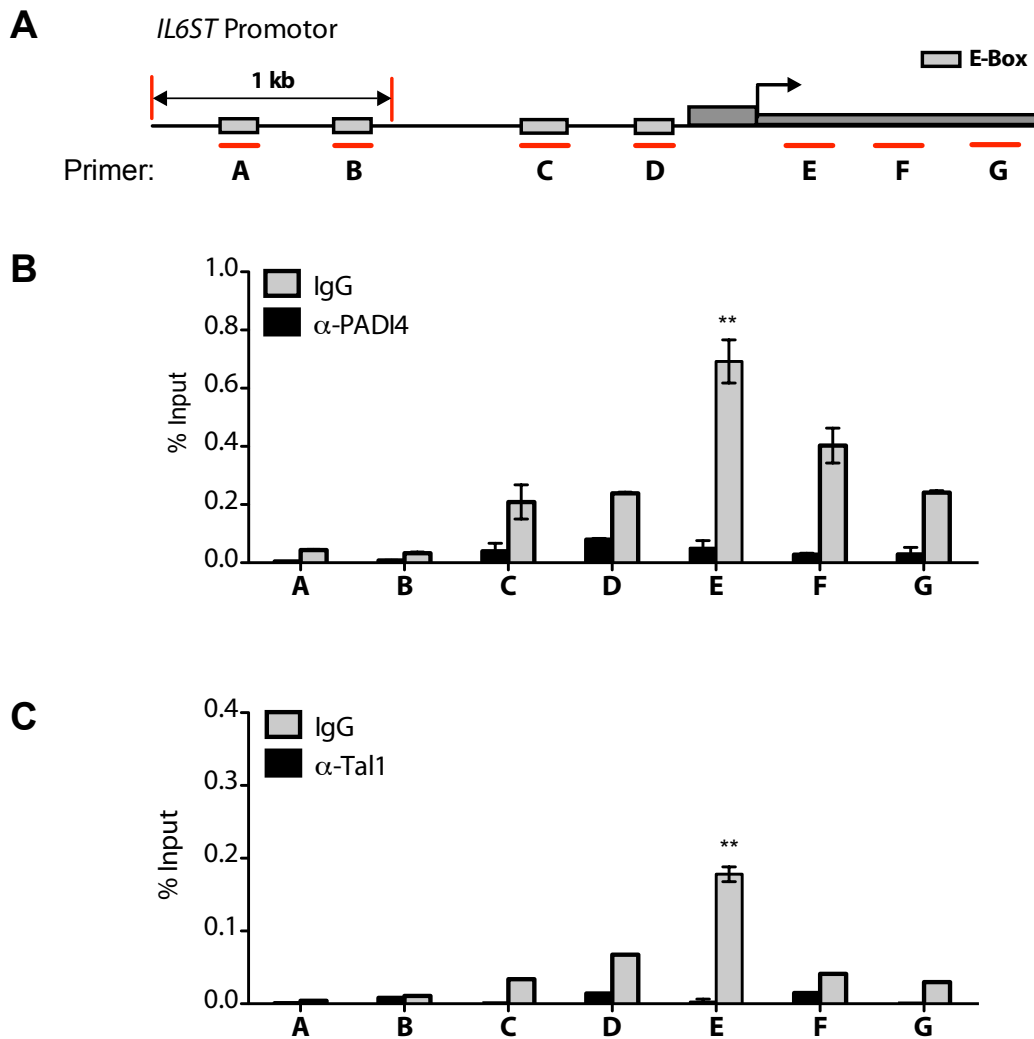


Abb. 4.14: Der Transkriptionsfaktor Tal1 und PADI4 binden in der Nähe des Transkriptionsstartpunktes des *IL6ST* Gens. (A) Schematische Darstellung des humanen *IL6ST*-Promotorbereichs. Die Sequenz des *IL6ST*-Promotorbereichs wurde mit dem Programm TESS (*transcription element search system*, (Schug, 2008)) einer Analyse für mögliche Tal1 Bindungsstellen untersucht. Diese als E-Box (CANNTG) bezeichneten Sequenzen wurden durch die Auswahl von flankierenden Chromatin-Immunopräzipitations (ChIP) Primer untersucht. Hierbei wurden Primerpaare ausgewählt, die *upstream* bzw. *downstream* des Transkriptionsstartpunktes des *IL6ST*-Gens lokalisiert sind. Die Sequenzbereiche der E-Box-Sequenzen sind durch graue Boxen dargestellt, die Position der verwendeten ChIP-Primer durch einen roten Strich. (B) PADI4 bindet vermehrt in dem Bereich eines nicht-codierenden Exons des *IL6ST*-Gens (Primer E). (C) Der Transkriptionsfaktor bindet ebenfalls vermehrt in dem Bereich des nicht-codierenden Exons des *IL6ST*-Gens. Die hiervon *upstream* (Primer A – D) und *downstream* gelegenen Sequenzabschnitte (Primer F – G) des *IL6ST*-Promotorbereichs weisen eine hierzu verringerte Bindung von Tal1 und PADI4 auf. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von mindestens vier Messungen dar. Diese Versuche wurden freundlicherweise durch Dr. Jörn Lausen durchgeführt. Signifikanz: gepaarter t-Test, ** für $p < 0,01$.

Durch die ChIP-Analysen des *IL6ST*-Promotors konnte die höchste Bindung von Tal1 und PADI4 in einem Bereich des ersten nicht codierenden Exons von *IL6ST* festgestellt werden. Dies stimmt mit der Analyse muriner ChIP-Sequenzierungsdaten überein, in denen eine

Bindung von Tal1 in diesem Sequenzbereich bestimmt wurde. Die Bindung von Tal1 und PADI4 ist von diesem Sequenzabschnitt ausgehend *up-* und *downstream* jeweils abnehmend.

Neben dem erfolgten Nachweis der Okkupation von Tal1 und PADI4 an den *IL6ST*-Promotor sollte zusätzlich deren gleichzeitige Bindung unter Anwendung eines sequentiellen ChIP-Experiments (ChIP-Re-ChIP) untersucht werden. Für eine quantitative Bestimmung mittels RT-PCR Messung wurden zwei ChIP-Primerpaare verwendet, in deren Sequenzbereich wie zuvor beschrieben die stärkste Bindung (Primer E) bzw. die geringste Bindung (Primer A) von Tal1 und PADI4 festgestellt wurde. Der *upstream* gelegene *IL6ST*-Promotorbereich wies keine simultane Bindung von Tal1 und PADI4 auf (Abb. 4.15A). Dementgegen konnte durch die sequentielle ChIP-Analyse in dem Bereich des ersten nicht-codierenden Exons von *IL6ST* eine gleichzeitige Bindung von Tal1 und PADI4 detektiert werden (Abb. 4.15B).

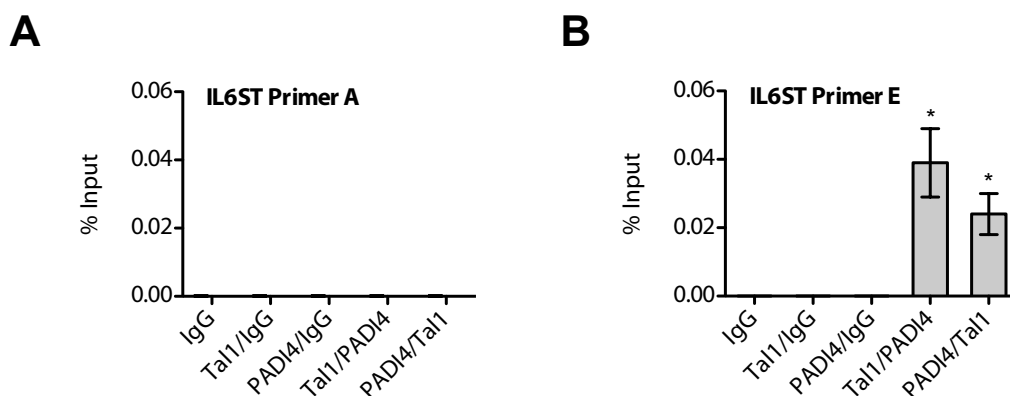


Abb. 4.15: Tal1 und PADI4 interagieren miteinander und binden gemeinsam am IL6ST-Promotor. (A) Eine sequentielle ChIP-Analyse ergab keine simultane Bindung von Tal1 und PADI4 in dem *upstream* lokalisierten Sequenzbereich des *IL6ST*-Promotor (Primer-A). **(B)** Für den Sequenzbereich des ersten nicht codierenden Exons des *IL6ST* Gens (Primer-E) konnte eine simultane Bindung der miteinander interagierenden Proteine Tal1 und PADI4 detektiert werden. Dieses Ergebnis konnte sowohl durch die Verwendung von Tal1 als Antikörper im ersten ChIP, gefolgt von einem PADI4 Antikörper (Tal1/PADI4), als auch umgekehrt bestätigt werden (PADI4/Tal1). Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von mindestens vier Messungen dar. Diese Versuche wurde freundlicherweise durch Dr. Jörn Lausen durchgeführt. Signifikanz: gepaarter t-Test, * für $p < 0,05$.

4.1.8 PADI4 beeinflusst differenziell die Proteinexpression von Zielgenen

Durch Genexpressionsanalysen und ChIP-Experimente wurden die Gene *CTCF* und *IL6ST* als direkte Zielgene von Tal1 und PADI4 identifiziert. Nachfolgend wurde der Einfluss eines

Tal1 und PADI4 *knock-down* auf die Proteinexpression von *CTCF* und *IL6ST* untersucht. Durch eine Western-Blot Analyse von HEL shTal1 und shPADI4 Zellen konnte eine Reduzierung von Tal1- und PADI4 auf Proteinebene bestätigt werden (Abb. 4.16). Zusätzlich konnte durch die Verwendung eines spezifischen *CTCF*-Antikörpers übereinstimmend mit den mRNA Genexpressionsanalysen eine Zunahme des *CTCF*-Proteins nach einem Tal1- und PADI4 *knock-down* detektiert werden.

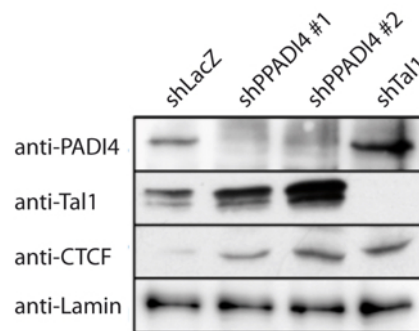


Abb. 4.16: Der *knock-down* von Tal1 und PADI4 in HEL Zellen verringert die Proteinmenge des Zielgens *CTCF*. Unter Verwendung von Tal1 und PADI4 shRNA- Konstrukten wurden HEL Zellen lentiviral transduziert. Durch eine Western-Blot Analyse und unter Verwendung spezifischer Antikörper konnte gezeigt werden, daß eine Reduzierung von Tal1 und PADI4 in den Zellen eine Zunahme des *CTCF* Proteins bewirkt.

Für die Untersuchung des Einflusses eines PADI4 *knock-down* auf die Proteinexpression des Transmembran-Glykoprotein GP130/IL6ST wurde eine FACS-Analyse durchgeführt. Zunächst wurde eine Probe von HEL shLacZ Zellen gemessen, die nicht mit einem Antikörper angefärbt wurde. Durch diese Kontrolle sollten unspezifische Effekte wie eine Auto-Fluoreszenz oder unspezifische Hintergrundfärbung der Zellen bestimmt werden. Eine FACS-Messung dieser Kontrollprobe ergab 0,8% positive Zellen im APC-Kanal und war somit vernachlässigbar (Abb. 4.17A). Durch eine Messung der mit shLacZ transduzierten HEL-Zellen konnte ein GP130/IL6ST-APC Expressionsniveau von 24 Prozent bestimmt werden (Abb. 4.17B). Demgegenüber konnte nach einer Herunterregulation von PADI4 eine Reduzierung der GP130/IL6ST-APC Expression auf 13 Prozent detektiert werden (Abb. 4.17C). Die Verringerung der Proteinkonzentration des GP130/IL6ST Protein stimmt somit mit den Ergebnissen der mRNA-Expressionsanalysen aus den *Microarray* und q-PCR Untersuchungen überein.

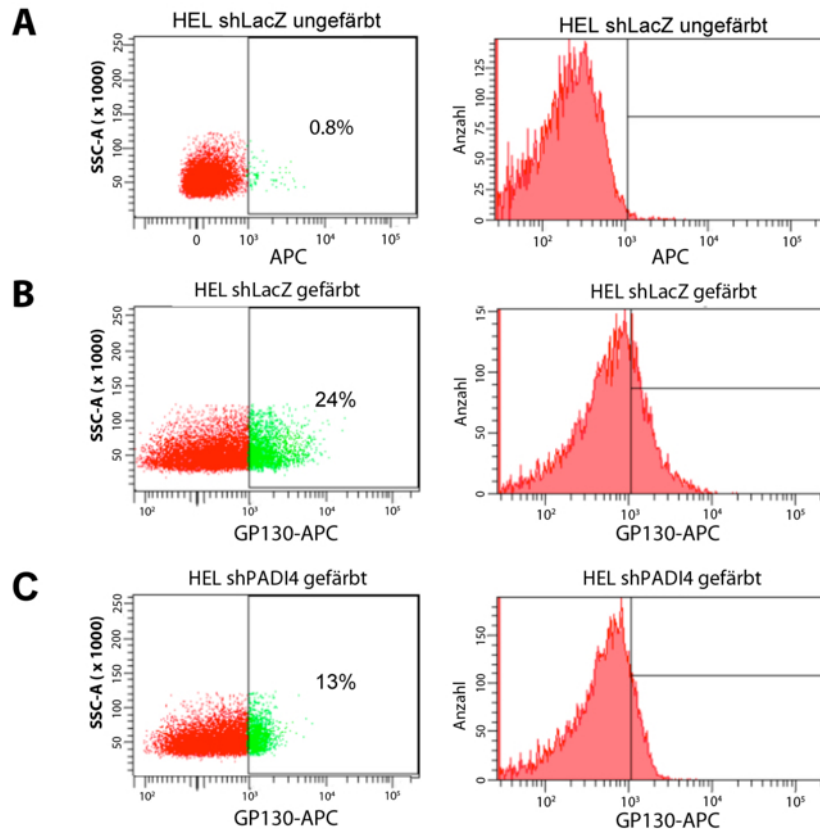


Abb. 4.17: Die Herunterregulation von PADI4 bewirkt eine reduzierte Expression des Transmembranprotein GP130/IL6ST. Nach lentiviraler Transduktion einer spezifischen PADI4-shRNA wurde durch eine FACS-Analyse die Proteinexpression des Transmembranproteins GP130/IL6ST analysiert. **(A)** Als Kontrolle wurden ungefärbte HEL shLacZ Zellen verwendet. **(B)** Die Analyse der mit GP130-APC Antikörper gefärbten HEL shLacZ Zellen ergab ein Expressions-Niveau von 24 Prozent. **(C)** Die Expression von GP130/IL6ST war in den HEL shPADI4 auf 13 Prozent reduziert.

4.1.9 PADI4 beeinflusst Histon Arginin-Methylierungen von Tal1-Zielgenen

PADI4 katalysiert die Umwandlung von positiv geladenen Argininen und Methylargininen Aminosäureresten zu Citrullin an den terminalen Enden der Histone. Eine Bindung des PADI4-Proteins an Promotorbereiche konnte unter anderem bei Untersuchungen der Regulation des *p53*- und dem Östrogen-abhängigen *pS2*-Gen festgestellt werden (Li *et al.*, 2008; Denis *et al.*, 2009). Aus der PADI4 Rekrutierung resultierte eine Citrullinierung des N-Terminus des Histon H3, worauf eine Arginin-Methylierung verhindert wird. Am Östrogen-abhängigen *pS2*-Promotor interagiert PADI4 mit der Histon Deacetylase 1 (HDAC1) und generiert einen transkriptionell repressiven Chromatinstatus. Durch die PADI4 katalysierte Citrullinierung des zur ETS Onkogen Familie gehörenden Protein *Elk-1* kommt es zu einer Aktivierung der *c-fos* Genexpression (Zhang *et al.*, 2011). Das PADI4-Protein hat daher in

Abhängigkeit des zellulären Kontext und der Zielgene als Co-Aktivator oder Co-Repressor einen Einfluss auf die transkriptionelle Regulation. Die veränderte Expression der gemeinsamen Zielgene *IL6ST* und *CTCF* nach Tal1 und PADI4 *knock-down* und die simultane Bindung des Komplex in der Nähe des Transkriptionsstartpunkts der Promotoren deuten auf eine transkriptionelle Steuerung hin. Wie bereits einleitend beschrieben, wirkt die PADI4 katalysierte Citrullinierung von Histonen antagonistisch zu den durch die Protein Arginin Methyltransferasen katalysierten Methylierungen. Aus diesem Grund sollte die funktionelle Bedeutung des PADI4-Proteins auf den Histon-Arginin Methylierungsstatus der Promotoren *IL6ST* und *CTCF* genauer untersucht werden. Die möglichen Veränderungen der Histonmodifikationen wurde nach einem *knock-down* von PADI4, im Vergleich zu einer Kontrolle, durch Chromatin-Immunopräzipitationen (ChIP) analysiert. Hierdurch konnte festgestellt werden, daß die Bindung des Transkriptionsfaktors Tal1 nicht signifikant reduziert wurde (Abb 4.18A). Die Bindung von PADI4 an den Promotor von *IL6ST* und *CTCF* war hingegen nach einem *knock-down* von PADI4 stark reduziert (Abb. 4.18B). PADI4 ist ein Antagonist der durch PRMT4 katalysierten Methylierung der aktiven Histonmodifikation H3R17me2a. Diese konnte am *IL6ST*-Promotor der Kontrollzellen detektiert werden und nahm nach *knock-down* von PADI4 zu (Abb. 4.18C). Am *CTCF*-Promotor war in den sh-Kontroll-Zellen keine H3R17me2a Methylierung feststellbar, allerdings nahm diese nach Herunterregulation der PADI4-Expression stark zu. ChIP-Analysen der Okkupation von PRMT4 an dem *IL6ST*- und *CTCF*-Promotor ergaben eine Zunahme nach PADI4 *knock-down* (Abb. 4.18D). Für die repressiv wirkende Histonmodifikation H3R2me2a konnte durch die ChIP-Analyse eine starke Zunahme nach PADI4 Herunterregulation am *IL6ST*-Promotor ermittelt werden (Abb. 4.18E). Eine Modifikation von H3R2me2a konnte am *CTCF*-Promotor weder in den Kontrollzellen, noch in den shPADI4 Zellen detektiert werden. Die Modifikation von H3R2me2a wird durch PRMT6 umgesetzt, deren verstärkte Okkupation am *IL6ST*-Promotor gefunden werden konnte, jedoch nicht am *CTCF*-Promotor. Für die durch PRMT6 katalysierte Methylierung von H3R2me2a wurde bereits in der Literatur beschrieben, daß diese eine Trimethylierung von H3K4 inhibiert (Hyllus *et al.*, 2007). Für den *IL6ST*-Promoter konnte eine verstärkte Bindung von PRMT6 (Abb. 4.18F), zusammen mit einer Abnahme von H3K4me3 gemessen werden (Abb. 4.18G). Am *CTCF*-Promoter war die Bindung von PRMT6 und die Histonmodifikation H3K4me3 in den shPADI4 Zellen nahezu unverändert, wobei dies als statistisch nicht signifikant bestimmt wurde. (Abb. 4.18F+G).

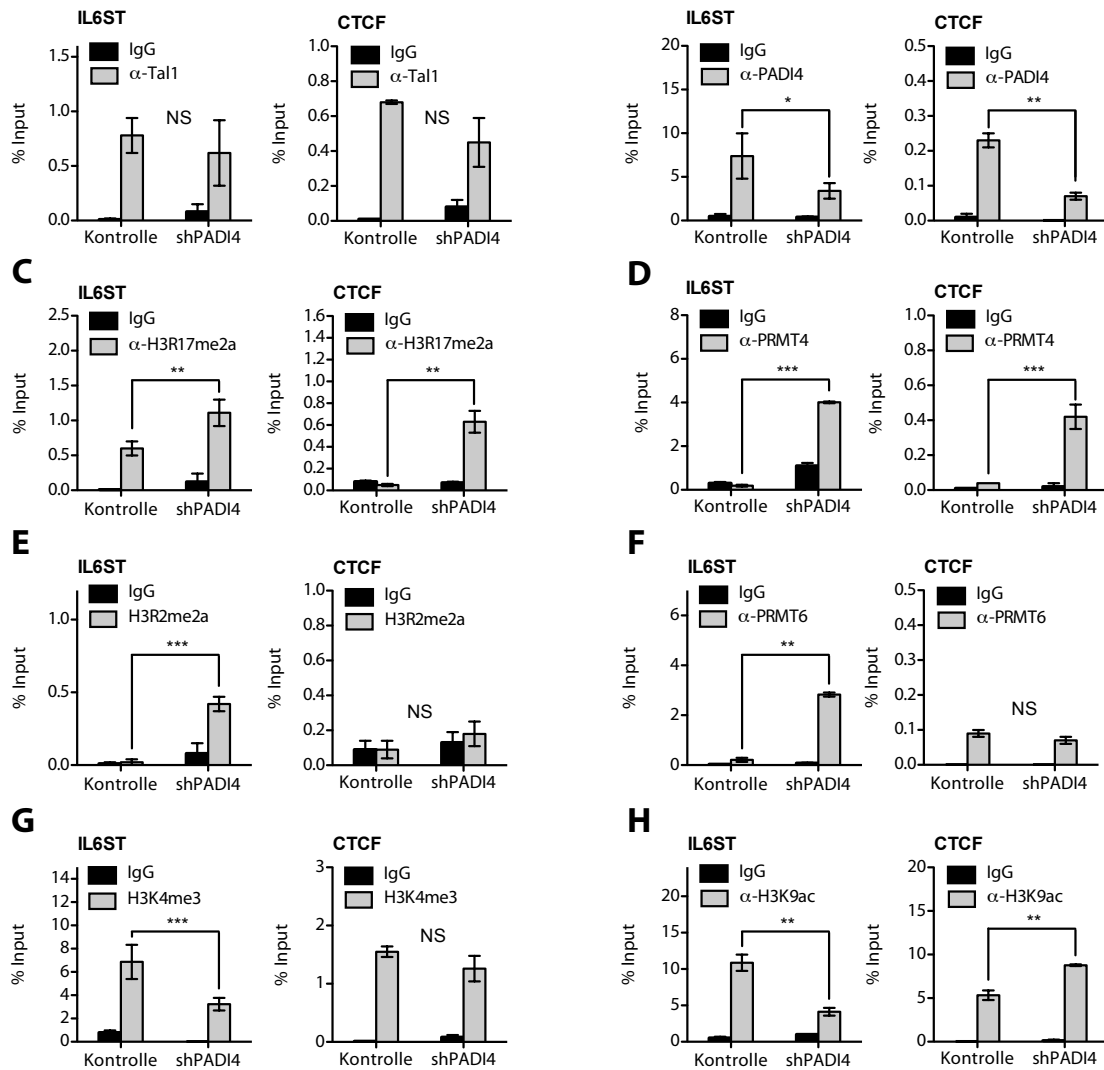


Abb. 4.18: Untersuchung der epigenetischen Veränderungen durch ChIP-Analysen nach PADI4 Herunterregulation in HEL Zellen am *IL6ST* und *CTCF*-Promotor. (A) In Folge eines *knock-down* von PADI4 kommt es zu einer leicht verringerten Bindung des Transkriptionsfaktor Tal1 an den *IL6ST*- und *CTCF*-Promoter. Diese Abnahme wurde als statistisch nicht signifikant bestimmt. **(B)** Die Bindung des PADI4-Protein an den *IL6ST*- und *CTCF*-Promotor ist nach der shPADI4 vermittelten Herunterregulation stark reduziert. **(C)** Die transkriptionell aktivierende Histonmodifikation H3R17me2a zeigt eine erhöhte Anreicherung nach einer Herunterregulation von PADI4 im Bereich der Promotoren von *IL6ST* und *CTCF*. **(D)** Die enzymatische Modifikation von H3R17me2a wird durch die Protein Arginin Methyltransferase 4 (PRMT4) katalysiert, die auf dem Promotorbereich von *IL6ST* und *CTCF* vermehrt nachweisbar ist. **(E)** Der Status der Histonmodifikation H3R2me2a ist nach PADI4 *knock-down* am *CTCF*-Promotor unverändert, wohingegen diese verstärkt im Bereich des *IL6ST*-Promotors ist. **(F)** Die Protein Arginin Methyltransferase 6 (PRMT6) katalysiert diese Modifikation und ist nach PADI4 Herunterregulation im Bereich des *IL6ST*-Promotors stark angereichert. Die Okkupation von PRMT6 am *CTCF*-Promotor ist unverändert. **(G) + (H)** Die positiv auf die Transkription wirkenden Histonmarkierungen H3K4me3 und H3K9ac sind bei *IL6ST* nach PADI4 Herunterregulation abnehmend. Am *CTCF*-Promotor ist der Methylierungsstatus von H3K4me3 nahezu unverändert, während die Acetylierung von H3K9ac zunimmt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von mindestens vier Messungen dar. Signifikanz: gepaarter t-Test * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$, NS für nicht signifikant.

Weitergehend wurden die Effekte einer PADI4 Herunterregulation auf die aktivierende

Histonmodifikation H3K9ac analysiert. Die Zunahme der Modifikation H3K9Ac auf dem *CTCF*-Promotor stimmt mit einer erhöhten Genexpression überein, genauso wie die Abnahme von H3K9c auf *IL6ST* mit einer verringerten Expression korreliert (Abb. 4.18H). Durch die vorliegenden Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die transkriptionelle Regulation der Gene *IL6ST* und *CTCF* durch die koordinierte Bindung eines aus Tal1 und PADI4 bestehenden Komplex erfolgt. Am *CTCF*-Promotor erfolgt eine PADI4 abhängige Steuerung über die Modulation der Histonmodifikation H3R17me2a, in dem die durch PRMT4 umgesetzte Methylierung antagonistisch beeinflusst wird. Das PADI4-Protein wirkt somit als Co-Repressor des Tal1-Multiproteinkomplex. Dagegen ist am *IL6ST*-Promotor die repressive Histonmarkierung H3R2me2a ein Ziel der PADI4 gesteuerten Regulation, bei der eine durch PRMT6 katalysierte Methylierung beeinflusst wird und PADI4 als Co-Aktivator der Genexpression agiert.

4.1.10 Die Verwendung eines PADI4-Inhibitors beeinflusst die *IL6ST*-Expression

Durch Tumorpatienten-Analysen und genetische Studien konnten PADI4 und der Protein Arginin Citrullinierung verschiedenen Krankheiten zugeordnet werden, wie beispielsweise Tumorerkrankungen und Autoimmunkrankheiten. Die Verwendung des PADI Inhibitors, Cl-Amidin, bietet einen möglichen therapeutischen Ansatz. Dieser ist strukturell ähnlich zu dem PADI4 Substrat Peptidylarginin und inhibiert PADI4 durch die kovalente Modifikation eines Cystein Restes (Cys645), der an der aktiven Seite des Enzyms lokalisiert ist (Luo *et al.*, 2006). Für das *p53* Gen und damit assoziierte Gene wie *p21* konnte PADI4 zusammen mit der Histon Deacetylase HDAC2 eine koordinierte Reprimierung der Transkription nachgewiesen werden. Durch eine Applikation von Cl-Amidin wurden spezifisch Histonmodifikationen, d.h. Methylierungen und Citrullinierungen, von *p53* und dessen Zielgenen verändert (Li *et al.*, 2010; Slack *et al.*, 2011a). Zusätzlich zeigten mit Cl-Amidin behandelte Zygoten eine reduzierte Citrullinierung und Acetylierung am Histon H3 und H4. Ausgehend von den vorangegangenen Genexpressionsanalysen wurde der Einfluss des Inhibitors auf die mRNA-Expression von *IL6ST* und *CTCF* untersucht. Zu diesem Zweck wurden HEL Zellen für 24 und 48 Stunden mit Cl-Amidin behandelt. Während 24 Stunden nach Zugabe des PADI4-Inhibitors keine Veränderung der *IL6ST*- und *CTCF*-Expression festgestellt werden konnte, war nach 48 Stunden eine Reduzierung der *IL6ST*-Expression

um etwa 70 Prozent gegenüber der Kontrolle bestimmbar (Abb 4.19B). Für CTCF konnte nach 48 Stunden eine Verdoppelung der mRNA-Expression ermittelt werden. Die verringerte *IL6ST*- bzw. eine erhöhte CTCF-Expression nach Cl-Amidin Behandlung korrelierte somit mit den vorangegangenen von *PADI4* und *Tal1 knock-down* Experimenten.

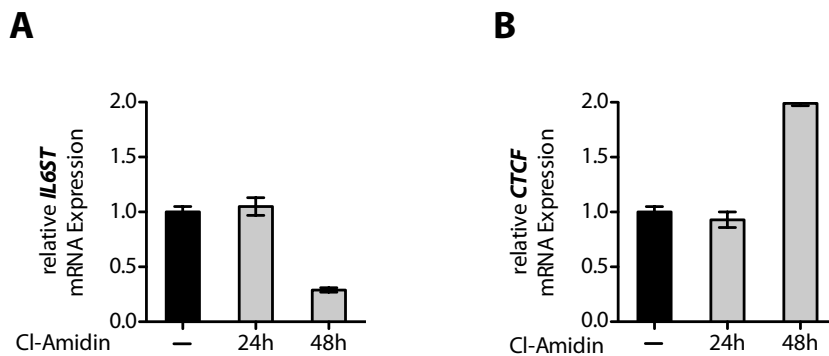


Abb. 4.19: Der *PADI4*-Inhibitor Cl-Amidin beeinflusst die mRNA Genexpression von *IL6ST* und *CTCF*. HEL-Zellen wurden für 24h und 48h mit Cl-Amidin behandelt und die Expression durch eine q-PCR Messung analysiert. **(A)** Die *IL6ST* mRNA-Expression ist nach einer 48-stündiger Inkubation mit dem Inhibitor Cl-Amidin um etwa 70 Prozent gegenüber der Kontrolle verringert. **(B)** Die mRNA-Expression von *CTCF* ist bezogen auf die DMSO-Kontrolle um das doppelte erhöht. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von mindestens vier Messungen dar.

Die Genexpression der Gene *IL6ST* und *CTCF* ist durch die Verwendung der niedermolekularen Verbindung Cl-Amidin modulierbar. Ausgehend hiervon sollte in weitergehenden Experimenten die aus einer Cl-Amidin Behandlung resultierenden epigenetischen Veränderungen am *IL6ST*- und *CTCF*-Promotor untersucht werden. Diese Ergebnisse könnten weitergehend eine erste Bewertung der Relevanz von Cl-Amidin als epigenetisch wirksame Verbindung bei *IL6ST*- und *CTCF*- assoziierten Erkrankungen bieten.

Die Einflüsse einer Cl-Amidin Behandlung auf den *IL6ST*- und *CTCF*-Promotor wurden unter Anwendung von ChIP-Experimenten untersucht. Die Bindung von *Tal1* an den *IL6ST*- und *CTCF*-Promotor nahm in den mit Cl-Amidin behandelten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen ab (Abb. 4.20A). Die Okkupation des *PADI4*-Proteins an den beiden Promotoren war leicht reduziert (Abb. 4.20B). Aus der Behandlung von HEL-Zellen mit Cl-Amidin resultierte für die reprimierend auf die Genexpression wirkende Modifikation H3R2me2a eine starke Zunahme am *IL6ST*-Promotor und keine Veränderung am *CTCF*-Promotor (Abb. 4.20C). Die gegensätzlich zu H3R2me2a agierende Modifikation H3K4me3 war nach Cl-Amidin Behandlung an den beiden Promotoren stark reduziert (Abb. 4.20D).

Die aktivierende Histonmodifikation H3R17me2a konnte für den *IL6ST*-Promotor als unverändert und am *CTCF*-Promotor als stark zunehmend bestimmt werden (Abb. 4.20E).

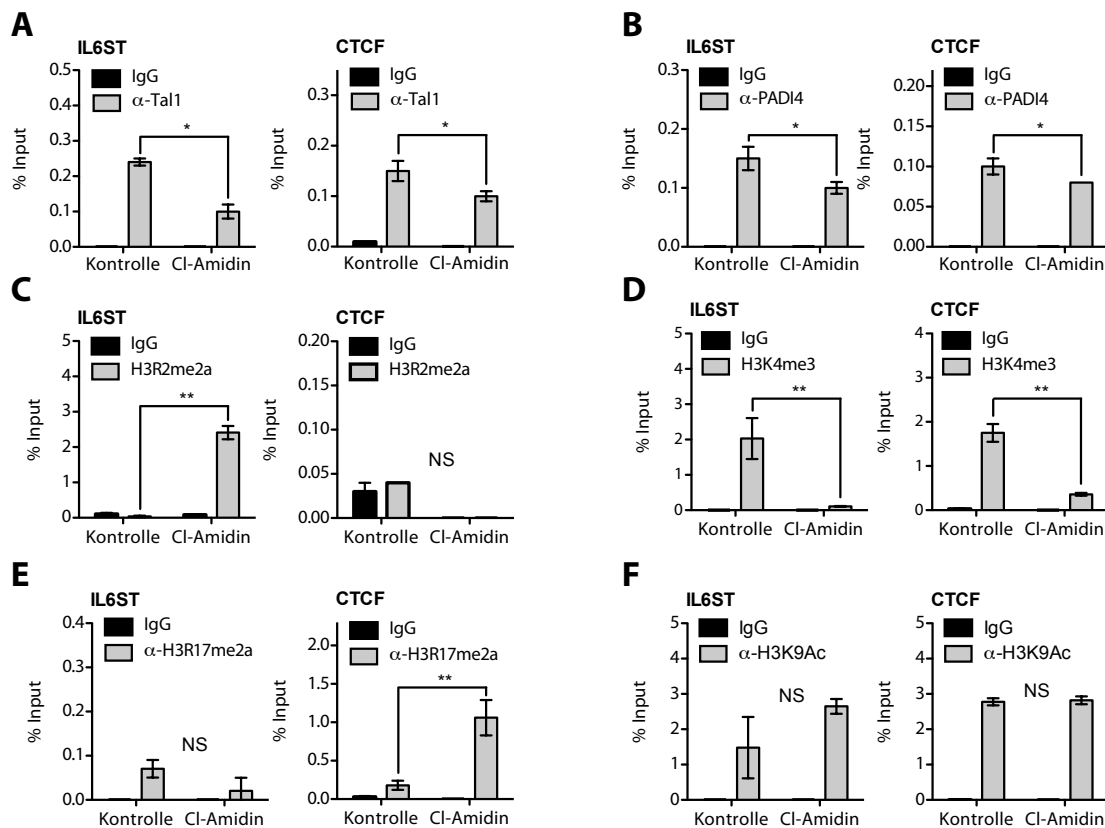


Abb. 4.20: Analyse der epigenetischen Veränderungen des *IL6ST*- und *CTCF*-Promotors nach der Behandlung mit der niedermolekularen Verbindung Cl-Amidin. (A) + (B) Durch die Behandlung der Erythroleukämie-Zelllinie HEL mit dem PADI4 Inhibitor Cl-Amidin kommt es zu einer verringerten Bindung von Tal1 und PADI4 auf dem *IL6ST*- und *CTCF*-Promotor, die durch eine ChIP-Analyse bestimmt wurde. (C) Die repressiv auf die Expression wirkende Histonmodifikation H3R2me2a nimmt nach Behandlung der HEL-Zellen mit Cl-Amidin auf dem *IL6ST*-Promotor stark zu. Auf dem *CTCF*-Promotor konnte keine statistisch signifikante Veränderung festgestellt werden. (D) Die aktivierende Histonmodifikation H3R17me2a ist auf dem *IL6ST*-Promotor unverändert und auf dem *CTCF*-Promotor erhöht detektierbar. (E) Die aktivierende Histonmodifikation H3K4me3 ist auf den beiden Promotorenabschnitten abnehmend. (F) Die ebenfalls aktivierend agierende Modifikation H3K9ac nimmt auf *IL6ST*- zu und ist auf dem *CTCF*-Promotor unverändert. Diese Ergebnisse waren jedoch nicht statistisch signifikant. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von mindestens vier Messungen dar. Signifikanz: gepaarter t-Test * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$, NS für nicht signifikant.

Die aktivierende Histonmodifikation H3K9ac konnte für *IL6ST* als leicht erhöht und am *CTCF*-Promotor als unverändert bestimmt werden, wobei die Ergebnisse statistisch nicht signifikant waren (Abb. 4.20F). Durch ChIP-Analysen des *IL6ST*- und *CTCF*-Promotor nach Behandlung von HEL-Zellen mit dem PADI4-Inhibitor Cl-Amidin konnte somit eine selektive, d.h. genspezifische Veränderung von Histonmodifikationen festgestellt werden. Diese korrelierte mit den shPADI4 Ergebnisse, bei denen eine PADI4 abhängigen Beeinflussung der repressiven Modifikation H3R2me2a am *IL6ST*-Promotor und der

aktivierenden Modifikation H3R17me2a am *CTCF*-Promotor bestimmt werden konnte.

4.1.11 PADI4 ist ein Repressor der Tal1/E47 vermittelten transkriptionellen Aktivierung

Neben der Beeinflussung des epigenetischen Status am *IL6ST*- und *CTCF*-Promoter wurde die Tal1 und PADI4 abhängige transkriptionelle Steuerung der Transkription in einem weniger spezifischen *in-vitro* Umfeld untersucht. Zu diesem Zweck wurde Tal1 als DBD-Fusionsprotein in HEK293T Zellen exprimiert, das eine GAL4-DNA Bindedomäne enthält. Das Fusionsprotein kann an eine GAL-Bindesequenz eines eines co-transfizierten GAL4-TK-luc Luciferase Reporter-gen-Konstrukts binden. Die hieraus aktivierte Expression der *Firefly*-Luciferase kann als Lumineszenz gemessen werden. Durch die Coexpression des Tal1 Cofaktors E47 konnte in vorangegangenen Experimenten gezeigt werden, daß es zu einer Transaktivierung kommt, die luminometrisch gemessen werden konnte. Nachfolgend wurde der Einfluss von PADI4 auf diesen Heterodimer Komplex und die transkriptionelle Steuerung untersucht (Abb. 4.21).

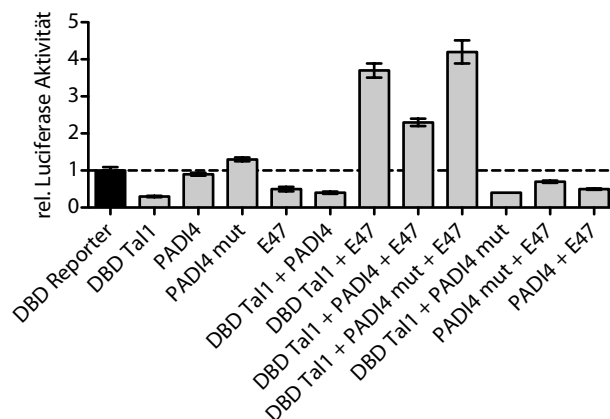


Abb. 4.21: PADI4 reprimiert die Tal1/E47 vermittelte Luciferase Aktivierung. Tal1 wurde als DBD-Fusionsprotein in HEK293T Zellen exprimiert, das eine GAL4-DNA-Bindedomäne enthält. Dieses Fusionsprotein kann an ein co-transfiziertes Gal4-TK-luc Konstrukt binden, das eine GAL-Bindesequenz stromaufwärts des Thymidinkinase (TK) Promotors des Luciferase Reporter-Gens beinhaltet. Hierdurch kommt es zu einer Expression der *Firefly*-Luciferase, deren Lumineszenz bestimmt werden kann. Nach der Einzel-Transfektion von DBD-Tal1, E47, PADI4 und dessen Mutante konnte keine Aktivierung der Luciferaseaktivität festgestellt werden. Hingegen sorgte die Co-Transfektion von DBD-Tal1 und E47 für eine Aktivierung des Luciferase Reporter Gens. Durch eine zusätzlich Expression von PADI4 wurde die Tal1 und E47 vermittelte Luciferase-Aktivierung reprimiert. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung von mindestens vier Messungen dar.

Die Expression von Tal1, E47, PADI4 und einer enzymatisch inaktiven Mutante von PADI4 alleine zeigte keine Effekte, wohingegen die Co-Transfektion von Tal1 und E47 zusammen eine starke Aktivierung der Luciferase bewirkten. Durch eine zusätzliche Expression von PADI4 zu diesem Tal1/E47 Komplex konnte eine Repression der Luciferase-Aktivität detektiert werden. Als Kontrollansatz diente die Expression einer katalytisch inaktiven Mutante von PADI4, bei der keine Repression bestimmbar war. Die Luciferase-Aktivität der Co-Transfektion der PADI4 Mutante war vergleichbar mit der von Tal1/E47 alleine. Somit ist eine PADI4-katalysierte Citrullinierung möglicherweise relevant für die transkriptionelle Aktivität des Tal1/E47-Komplex.

4.1.12 PADI4 beeinflusst die Proliferation einer Tal1-abhängigen Zelllinie

Durch Expressions- und Immunfluoreszenz-Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß das PADI4-Protein in einer Vielzahl von malignen Tumorerkrankungen überexprimiert wird (Chang *et al.*, 2009). Die Funktion von PADI4 als transkriptioneller Co-Repressor von p53, vergleichbar mit der Funktion von Histon Deactylasen HDAC, hat dazu geführt, dass das Enzym als Ziel von epigenetischen Krebstherapien in Betracht gezogen wird. Die Applikation des PADI4 Inhibitors Chlor-Amidin (Cl-Amidin) (Slack *et al.*, 2011a) in Osteosarkom-Zellen bewirkte beispielsweise Verringerung der Proliferation und induzierte unter anderem eine Veränderung der p21-Proteinkonzentration (Li *et al.*, 2008).

Die bisher beschriebenen Daten zeigten eine enge funktionelle Verbindung von Tal1/PADI4 bei der Regulation von an den hämatopoetischen Differenzierungsprozessen beteiligten Gen *IL6ST*. Durch die Behandlung von Tal1-exprimierenden Zelllinien mit Cl-Amidin sollte untersucht werden, ob hieraus eine Veränderung der Proliferation resultiert. Bei den Versuchen wurde auch die T-Zelllinie Jurkat verwendet, für die eine Wachstumsabhängigkeit von Tal1 nachgewiesen werden konnte. Nach einem shRNA vermittelten knock-down von Tal1 weisen die Zellen ein vermindertes Zellwachstum auf (Palomero *et al.*, 2006; Kusy *et al.*, 2010). Nach einer Behandlung der Zellen mit 60 µM Cl-Amidin, für 4 Tage, konnte eine leichte Verringerung der Proliferation bei HEL und K562 Zellen festgestellt werden (Abb. 4.22A). Bei der Zelllinie Jurkat war die relative Zellzahl um etwa 40 Prozent und bei der Zelllinie U937 um etwa 60 Prozent gegenüber der entsprechenden Kontrolle verringert. Eine Erhöhung der Cl-Amidin Konzentration auf

100 μM resultierte auch in K562 und HEL-Zellen in einer Verringerung der Proliferation um etwa 20 Prozent gegenüber der Kontrolle und um etwa 80 Prozent gegenüber der Tal1-abhängigen T-Zelllinie Jurkat. Das Wachstum der Lymphom-Zelllinie U937 war mehr als 90 Prozent reduziert. (Abb. 4.22B). Durch eine Verlängerung der Cl-Amidin Behandlung auf 9 Tage wurde die relative Zellzahl der HEL-Zellen um etwa die Hälfte gegenüber der Kontrolle verringert (Abb. 4.22C).

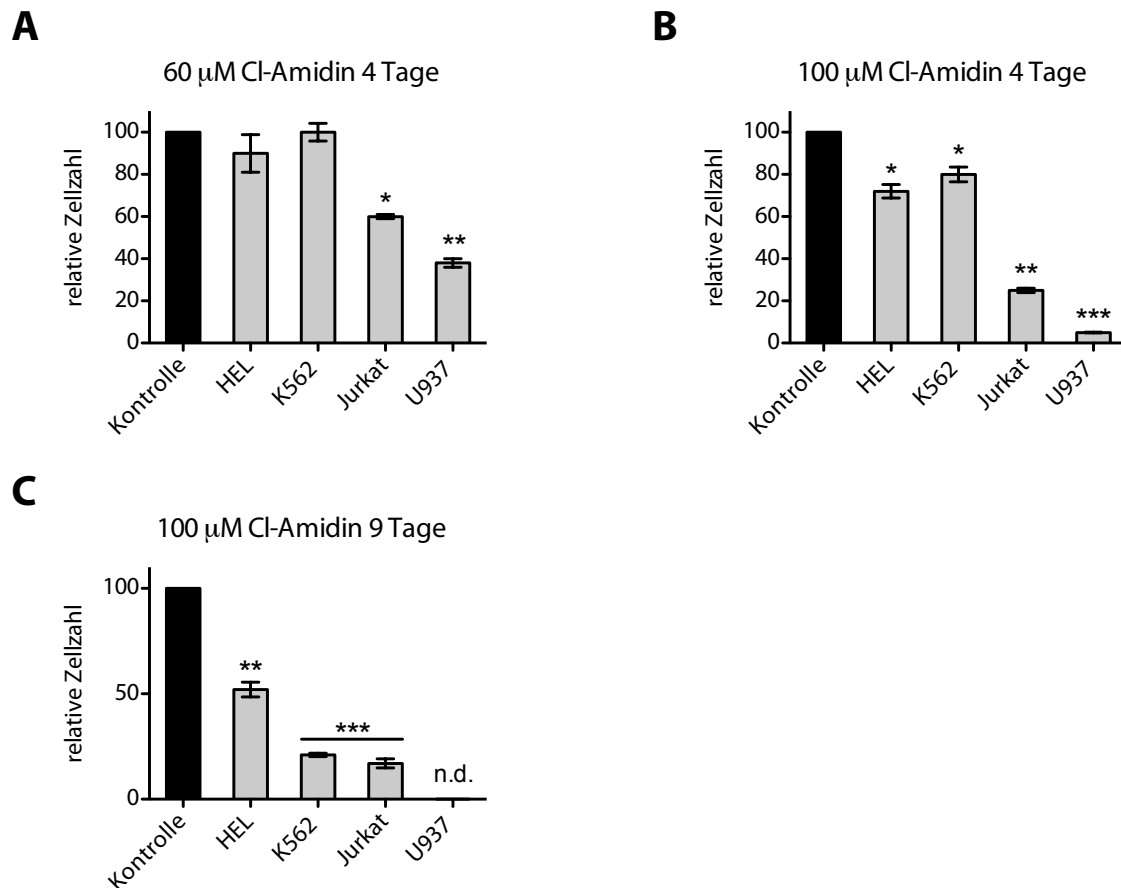


Abb. 4.22 Der PADI4 Inhibitor Cl-Amidin beeinflusst das Wachstum von humanen Leukämie Zelllinien.

(A) Die Erythroleukämie-Zelllinien HEL und K562, die T-Zell Zelllinie Jurkat und die Lymphom-Zelllinie U937 wurden mit 60 μM Amidin für 4 Tage behandelt. Die Zellzahl von Jurkat und U937 war gegenüber der DMSO-Kontrolle verringert. (B) HEL, K562, Jurkat und U937 Zellen wurden mit 100 μM Cl-Amidin für 4 Tage behandelt. Die Zellzahl von HEL und K562 waren hierdurch gegenüber der Kontrolle leicht verringert, während eine starke Reduktion der Proliferation bei Jurkat und U937 festgestellt wurde. (C) HEL, K562, Jurkat und U937 Zellen wurden mit 100 μM Cl-Amidin 9 Tage behandelt. Die Zellzahl von HEL Zellen wurde um die Hälfte, bezogen auf die DMSO Kontrolle, reduziert. Das Zellwachstum von K562 und Jurkat war um etwa 80%, gegenüber der Kontrolle, reduziert. Bei der Zelllinie U937 konnten keine lebenden, proliferierenden Zellen nach einer Inkubation für 9 Tage mit Cl-Amidin bestimmt werden. Signifikanz: gepaarter t-Test * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$, *** für $p < 0,001$, NS für nicht signifikant, n.d. für nicht bestimmbar.

Bei K562 und Jurkat-Zellen konnte eine Verringerung um jeweils etwa 80 Prozent bestimmt werden. Nach einer Behandlung von U937-Zellen mit dem PADI4 Inhibitor konnten keine lebenden, proliferierenden Zellen gezählt werden.

4.1.13 Funktion von PADI4 in der Hämatopoese

Der Einfluss von Tal1 auf die Prozesse bzw. die Entwicklung der hämatopoetischen Differenzierung wurde vorangehend erläutert. Die beiden in dieser Arbeit identifizierten neuen Tal1-Zielgene *CTCF* und *IL6ST* sind zentrale Regulatoren der Hämatopoese. Der Transkriptionsfaktor *CTCF* beeinflusst den Organisationsgrad von Chromatin und ist deswegen ein zentraler Regulator der Genexpression. Für die Hämatopoese konnte gezeigt werden, dass *CTCF* essentielle Funktionen bei den Entscheidungen der Differenzierung von Vorläuferzellen zu megakaryozytären und erythrozytären Zellen besitzt (Torrano *et al.*, 2005; Tanimoto *et al.*, 2003; Farrell *et al.*, 2002). Durch Untersuchungen der myeloiden Differenzierung konnte gezeigt werden, dass *CTCF* die assoziierten Gene transkriptionell steuert und die Rate der CMP-Differenzierung beeinflusst (Ouboussad *et al.*, 2013). Das ubiquitär exprimierte Protein *IL6ST* ist ein wichtiger Bestandteil der Signaltransduktion der Zytokin Signalwege. Die essentielle Stellung der *IL6ST* Signalsteuerung in der Hämatopoese konnte durch Untersuchungen von homozygoten *IL6ST knock-out* Mäusen gezeigt werden. Diese wiesen eine um fast 90 Prozent verringerte Anzahl an pluripotenten Stammzellen auf (Yoshida *et al.*, 1996). Zudem konnte eine Veränderung der hämatopoetischen Differenzierungsprozesse festgestellt werden, da *GP130/IL6ST knock-out* Mäuse eine verringerte Megakaryozyten Zellzahl aufwiesen (Nakashima *et al.*, 1AD).

Die transkriptionelle Steuerung der *IL6ST*-Expression durch den Tal1/PADI4-Komplex während der hämatopoetischen Differenzierung sollte durch eine Expressionsanalyse von humanen CD34+ Vorläuferzellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Zellen *in-vitro* zu Erythrozyten, Megakaryozyten und Monozyten differenziert und der Status der *IL6ST* mRNA Expression durch eine q-PCR Analyse analysiert. Hierdurch zeigte sich, daß die *IL6ST* Genexpression in Monozyten und Erythrozyten, bezogen auf die hämatopoetischen Stamzellen (hCD34+), zunimmt (Abb. 4.23).

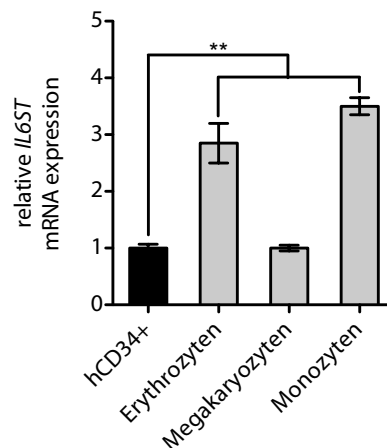


Abb. 4.23: Veränderung der *IL6ST* Expression während der Differenzierung von humanen CD34+ Zellen. Aus peripherem Blut isolierte humane CD34+ Zellen wurden zu Erythrozyten, Megakaryozyten und Monozyten differenziert. Die mRNA Expression wurde durch eine q-PCR Messung analysiert. Die *IL6ST* mRNA Expression nimmt nach der Differenzierung zu Erythrozyten und Monozyten zu. Die zu Megakaryozyten differenzierten Zellen zeigen keine Expressionsveränderung, bezogen auf die hCD34+ Zellen. Signifikanz: gepaarter t-Test ** für $p < 0,01$.

In den zu Megakaryozyten differenzierten Zellen konnte keine Expressionsveränderung, bezogen auf undifferenzierte Progenitorzellen (hCD34+), festgestellt werden.

4.1.14 Einfluss des Tal1/PADI4 Komplexes auf die hämatopoetische Differenzierung

Die transkriptionellen Regulationsmechanismen durch den Tal1/PADI4 Komplexes in den Differenzierungsprozessen der Hämatopoese sollte durch die Verwendung von pluripotenten Progenitorzellen untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden humane CD34+ Zellen *in-vitro* zu Erythrozyten, Megakaryozyten und Monozyten differenziert und die Dynamik der transkriptionellen Regulation des *IL6ST* Gens durch CHIP-Experimente bestimmt. In Erythrozyten konnte bezogen auf die hCD34+ Zellen eine leicht verringerte Bindung des Transkriptionsfaktors Tal1 an den *IL6ST*-Promotor detektiert werden (Abb. 4.24A). Die relative Tal1 Bindung war in Megakaryozyten weiter reduziert, d.h. um etwa 25 Prozent und um etwa 50 Prozent in Monozyten. Die relative Bindung von PADI4 an den *IL6ST*-Promoter war in zu Erythrozyten differenzierten Zellen gegenüber CD34+ Zellen stark erhöht und in Megakaryozyten um etwa 50 Prozent verringert (Abb. 4.24B). Für Monozyten konnte durch CHIP-Experimente eine gegenüber den Wildtyp Zellen verdoppelte relative Anreicherung des PADI4-Proteins detektiert werden.

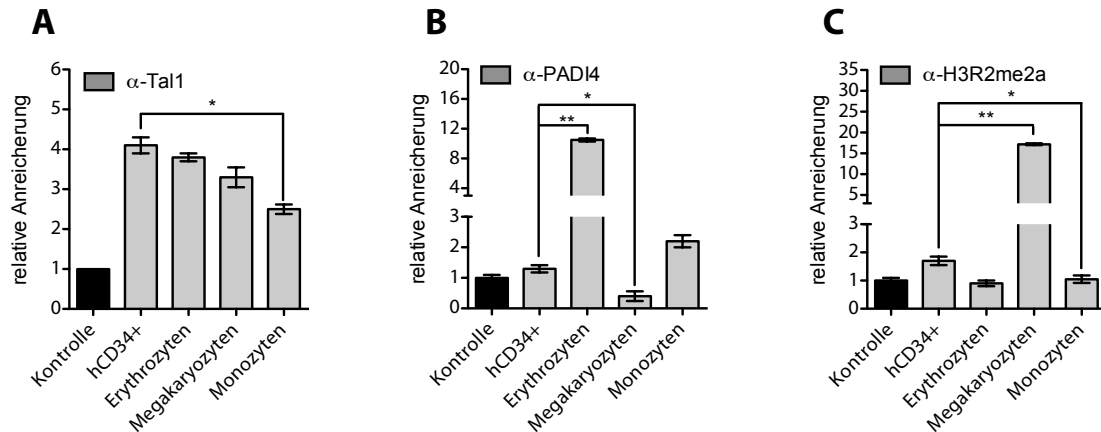


Abb. 4.24: Untersuchung des epigenetischen Status des *IL6ST*-Promotors während der Differenzierung von humanen CD34+ Zellen. (A) Während der Differenzierung in Richtung Erythrozyten, Megakaryozyten und Monozyten ist die Belegung des *IL6ST*-Promotors durch Tal1 nahezu unverändert. (B) Hingegen ist die Bindung von PADI4 an den *IL6ST*-Promotor stark erhöht bei erythroid differenzierten Zellen und reduziert in Megakaryozyten. In Monozyten ist die Bindung von PADI4 an den *IL6ST*-Promotor leicht erhöht. (C) Die repressive Histonmodifikation H3R2me2a nimmt bei einer Megakaryozyten-Differenzierung stark zu und ist unverändert bei Erythrozyten und Monozyten. Signifikanz: gepaarter t-Test * für $p < 0,05$; ** für $p < 0,01$.

Vorangehend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß PADI4 die durch PRMT6 katalysierte Histonmodifikation H3R2me2a negativ beeinflusst und dadurch eine antagonistische Funktion aufweist. Die Relevanz dieser spezifisch durch PADI4-katalysierten Histonmodifikation am *IL6ST*-Promotor sollte daher in den verschiedenen Differenzierungsstadien der Hämatopoese, d.h. in Erythrozyten, Megakaryozyten und Monozyten weiter untersucht werden. In Erythrozyten und Monozyten war die Histonmodifikation H3R2me2a im Vergleich zu den humanen CD34+ Zellen leicht reduziert (Abb. 4.24C). In Megakaryozyten konnte eine starke Zunahme der Modifikation H3R2me2a durch CHIP-Analysen festgestellt werden.

Das Expressionsniveau des *IL6ST*-Proteins während der Differenzierung von hämatopoetischen Progenitorzellen zu Megakaryozyten, Erythrozyten und Monozyten korreliert somit mit der Bindung des PADI4-Proteins an den *IL6ST*-Promotor. Die geringe Bindung von PADI4 an den Promotor während der megakaryozytären Differenzierung geht einher mit einer starken Zunahme der repressiven Histonmodifikation H3R2me2a. Dies deutet auf eine Coaktivator Funktion des PADI4-Proteins während der hämatopoetischen Differenzierung hin.

4.1.15 PADI4 beeinflusst die Differenzierung von humanen hämatopoetischen Progenitorzellen (hCD34+)

Der Transkriptionsfaktor Tal1 ist ein entscheidender Faktor der Differenzierungsprozesse in der frühen und der definitven Hämatopoese (Bloor *et al.*, 2002; Shivdasani and Orkin 1996). Durch eine Analyse von PADI4 *knock-out* Mäusen konnte gezeigt werden, daß die Anzahl der Multipotenten Vorläufer-Zellen gegenüber Wildtyp-Mäusen erhöht ist (Nakashima *et al.*, 2013). Aus den Ergebnissen dieser Arbeit, die eine hohe Anzahl an coregulierten Genen der Tal1/PADI4 Interaktion und eine spezifische Regulation der an der hämatopoetischen Kontrollprozessen involvierten Gene *IL6ST* und *CTCF* beschreibt, entwickelte sich die Fragestellung einer möglichen regulativen Funktion auf die Differenzierung von humanen Progenitorzellen (hCD34+).

Für eine Untersuchung des Einflusses von PADI4 auf die Differenzierung wurde der *Colony Formation Assay* (CFA) angewandt. Bei diesem *in-vitro* Experiment wird das Differenzierungsverhalten von hämatopoetischen Progenitorzellen untersucht. Die pluripotenten Stammzellen können in semi-soliden Medium unter Zugabe von Zytokinen proliferieren und differenzieren. Die hierbei entstehenden Zellkolonien können ausgezählt und entsprechend ihrer charakteristischen Morphologie zugeordnet werden. Die Bedeutung von PADI4 auf diese Prozesse wurde durch einen shRNA vermittelten *knock-down* bzw. einer Überexpression des PADI4-Protein in humanen CD34+ Progenitorzellen untersucht.

Durch diese Untersuchungen konnte eine Veränderung auf die Differenzierung hämatopoetischer Zellen nach einem *knock-down* von PADI4 festgestellt werden. Dies bedeutet, daß bei diesen Zellen eine erhöhte Monozytenkolonie Anzahl, bezogen zu mit einer Kontroll shRNA transduzierten Zellen, bestimmt werden konnte (Abb. 4.25A).

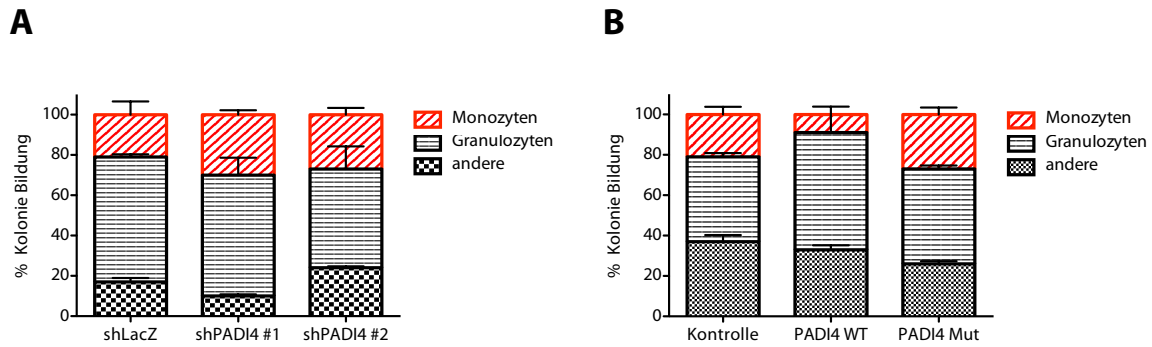


Abb. 4.25: PADI4 beeinflusst die Monozyten Differenzierung von humanen CD34+ Zellen. (A) Ein *knock-down* von PADI4 in humanen CD34+ Zellen erhöht die Zahl der Monozyten-Kolonien im Methylzellulose-Assay (CFU-Assay). **(B)** Eine Überexpression von PADI4 verringerte die Anzahl der Monozytenkolonien im Vergleich zu der Kontrolle. Eine enzymatisch inaktive Mutante von PADI4 hatte keinen inhibierenden Einfluss auf die Anzahl der Monozytenkolonien. Humane CD34+ Zellen wurden für 3 Tage expandiert und lentiviral transduziert. Die GFP-positiven Zellen wurden mit einem Zellsorter selektiert und die Zellen nachfolgend in Methylzellulose-Medium ausplattiert. Nach 2 Wochen wurde die Anzahl der Kolonien bestimmt und nach Monozyten und Granulozyten unterschieden. Andere Kolonieformen wurden zusammengefasst.

Eine PADI4-Überexpression in hämatopoetischen Progenitorzellen resultierte in einer verminderten Monozyten-Anzahl, bezogen auf die Kontrollzellen. Zellen, die eine enzymatisch inaktive Doppelmutante von PADI4 überexprimierten, zeigten keine Veränderung in der Anzahl der Monozytenkolonien und in den Charakteristika der weiteren bestimmten Kolonieformen. Das bedeutet, daß die phänotypischen Kolonieformen der PADI4-Mutante denen der Kontrolle entsprachen (Abb. 4.25B).

Somit konnte in dieser Arbeit ein Einfluss von PADI4 auf die Monozytopoese von Progenitorzellen und die zuvor beschriebene Korrelation aus IL6ST-Expression und Bindung des PADI4-Proteins an den Promotor gefunden werden. Diese Ergebnisse deuten auf eine umfangreiche Funktion des neuen Tal1 Cofaktors PADI4 auf die hämatopoetischen Differenzierungsprozesse von Progenitorzellen hin. Dabei öffnet die Relevanz des Tal1-Proteins bei der Entstehung von Leukämien einen möglichen pharmakologischen Ansatz, durch eine selektive Inhibition des PADI4-Proteins.

5. Diskussion

Der Transkriptionsfaktor Tal1 ist ein essentieller Regulator bei der Entwicklung von hämatopoetischen Stammzellen im Embryo. Die Bedeutung bei der Regulation der Hämatopoese zeigt sich bei Tal1 defizienten Mäusen, die kein Blutzellsystem entwickeln und vaskuläre Defekte aufzeigen (Visvader *et al.*, 2013). Durch eine funktionelle Veränderung kann Tal1 als ein Onkoprotein wirken, wenn es durch chromosomale Translokationen zu einer ektopten Expression des Proteins kommt. Eine solche Deregulation der Tal1-Aktivität ist mit der Entstehung von akuten T-Zell-Leukämien im Menschen assoziiert.

Das Tal1-Protein interagiert mit anderen Transkriptionsfaktoren, epigenetischen Regulatoren und Cofaktoren. Dieser Komplex bindet an spezifische DNA-Sequenzen von Zielgenen und steuert deren Transkription. Für den Tal1-Komplex konnten bereits interagierende Cofaktoren identifiziert werden, allerdings ist die distinkte Zusammensetzung des multifaktoriellen Komplex innerhalb der hämatopoetischen Differenzierungsprozesse, sowie bei der Entstehung von Leukämien, weitgehend unbekannt. Daneben sind die genauen Mechanismen der Restrukturierung des Chromatins durch Histonmodifikationen von großem Interesse, die auch entscheidend für die Steuerung der Differenzierung von Stammzellen sind (Spivakov and Fisher 2007). Diese steuern die Genexpression Zellspezifisch, indem sie die Bindung der DNA an die Histonproteine verändern bzw. Rekrutierung von Chromatin remodellierenden Faktoren beeinflussen.

5.1 PADI4 ist eine neuer Interaktionspartner von Tal1

Durch eine Streptavidin-Affinitätsaufreinigung mit anschließender SILAC Massenspektrometrie-Analyse konnte das Tal1-Protein und weitere, bereits beschriebene Cofaktoren E47, HEB, LSD1, LMO2, ETO2 und LDB1 identifiziert werden (Schuh *et al.*, 2005; Wadman *et al.*, 1994; Cai *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 1991; 1994a; Valge-Archer *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die verwendeten experimentellen Bedingungen dazu geeignet waren, den Tal1-Multiproteinkomplex

selektiv aufzureinigen. Als potentieller neuer Cofaktor des Transkriptionsfaktors Tal1 konnte die Peptidylargin Deiminase Typ 4 (PADI4) bestimmt werden.

Unter Verwendung von in *E.coli* exprimiertem Tal1-GST-Protein konnte eine Interaktion mit *in-vitro* translatiertem PADI4 und *vice-versa* aufgezeigt werden. Unter Verwendung von trunkierten GST- und *in-vitro* Proteinen wurde die Interaktion auf den C-Terminus des Tal1-Proteins mit dem C-Terminus des PADI4 Proteins eingegrenzt.

Bei den bereits in der Literatur beschriebenen Interaktionen des Tal1-Proteins mit Cofaktoren wurde die *in-vitro* Interaktionsfähigkeit und deren spezifischen Interaktionsflächen unter Verwendung von GST-*pulldown Assays* untersucht. Für das Co-Repressor Protein mSin3A konnte durch Kartierungsexperimente der Bereich der Tal1 *basic-helix-loop-helix* Region als Interaktionsfläche bestimmt werden. Eine weitere regulatorische Komponente des Tal1-Heterodimerkomplexes ist der p300/CBP assoziierte Faktor (P/CAF). Das Protein ist für eine post-translationale Acetylierung von Tal1 in erythroiden Zellen verantwortlich, wodurch die transkriptionelle Aktivität von Tal1 gesteuert wird (Huang *et al.*, 2000). Die Interaktion der beiden Proteine Tal1 und PCAF konnte durch *in-vitro* GST-*pulldown* Experimente ebenfalls auf die bHLH Domäne von Tal1 eingegrenzt werden. Bei der Analyse der kürzlich als Co-Repressor von Tal1 identifizierten Lysin (K)-spezifischen Demethylase 1A (LSD1) konnte durch GST-*pulldown* Kartierungsexperimente der proximale Bereich der Tal1 bHLH-Domäne als Interaktionsfläche bestimmt werden (Hu *et al.*, 2009).

Durch Mutationsanalysen und Co-Immunopräzipitationen der Aktivierungs- und der *basic-helix-loop-helix* Domäne des Tal1-Proteins konnte eine Abhängigkeit der Dimerisierung des Tal1/E47 Komplexes auf die Rekrutierung der Cofaktoren ETO2, p300, PCAF und mSin3A beschrieben werden (Huang and Brandt 2000; Huang *et al.*, 1999; Goardon *et al.*, 2006). Der in der *basic-helix-loop-helix* gelegene Aminosäurerest Y235 des Tal1-Proteins konnte als zentrale Interaktionsstelle mit den Cofaktoren des Multiproteinkomplexes beschrieben werden (Omari *et al.*, 2013). Für den Tal1 Cofaktor LSD1 wurde eine hiervon abweichende und unabhängige Interaktion bestimmt. Ausgehend von diesen Erkenntnissen könnten weitere GST-*pulldown* Experimente zur Untersuchung der Interaktionsfläche von Tal1 und PADI4 auf den *basic-helix-loop-helix* (bHLH) Domänenbereich des Tal1-Proteins ausgerichtet werden. Hierdurch könnte bestimmt werden, inwieweit der Tal1-Aminosäurerest Y235A eine Interaktionsstelle mit

dem PADI4-Protein ist, bzw. ob eine hiervon unabhängige und wie für den Cofaktor LSD1 beschriebene Interaktion vorliegt.

5.2 Identifikation von Zielgenen des regulatorischen Tal1/PADI4 Komplex

Durch eine Genexpressionsanalyse nach Tal1 und PADI4 *knock-down* und Datenabgleich mit bereits beschriebenen Tal1 Zielgenen, konnten 166 potentielle Zielgene identifiziert werden, die einer direkten Regulation durch Tal1 und PADI4 unterliegen. Die große Anzahl gemeinsamer Zielgene deutet auf eine enge regulative Funktion der Tal1/PADI4 Interaktion bei der Genregulation hin.

Zu den insgesamt drei Genen, die nach Tal1 und PADI4 *knock-down* in ihrer Expression invers vorlagen, gehörte das erythroide zellspezifische Gen *Glycophorin A (GYPA)*. Das entsprechende Glycophorin A Transmembranprotein ist ein Bestandteil von erythrozytären Membranproteinen, die das MNS-Blutgruppensystem bilden. Es wurde bereits beschrieben, dass Tal1 im Komplex mit E47, LMO2, Ldb1, GATA-1 und Sp1 an den *GYPA* Promotor bindet und dessen Expression steuert (Lahlil *et al.*, 2004). Durch q-PCR Messungen der mRNA-Expression (siehe Abb. 4.10F) nach Tal1 *knock-down* konnte in dieser Arbeit bestätigt werden, dass eine Tal1 abhängige Regulation von *GYPA* in HEL-Zellen vorliegt. Das Ergebnis einer erhöhten *GYPA* mRNA Expression nach PADI4 *knock-down* (Abb. 4.10F) deutet auf eine Co-Repressor Funktion des PADI4-Proteins hin. Eine direkte Co-Regulation durch Tal1 und PADI4 müsste allerdings weitergehend untersucht werden, z.B. initial durch eine sequentielle CHIP (Re-CHIP) Analyse oder durch auf Luciferase Experimenten basierte Promotor-Analysen.

Als weitere, potentielle gemeinsame funktionelle Zielgene von Tal1 und PADI4 wurden *CTCF* und *IL6ST* identifiziert. Wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben, konnte nach PADI4 *knock-down* eine Herabregulation der *IL6ST*- und eine Hochregulation der *CTCF*-Genexpression festgestellt werden. Das CTCF-Protein ist ein zentraler Transkriptionsfaktor für die Steuerung der Genexpression in Zellen. Zusätzlich hat es eine Funktion in genetischen Insulatorelementen, beim Imprinting und bei der X-Chromosom Inaktivierung (zusammengefasst in Phillips and Corces 2009). Das Transmembranprotein Gp130/IL6ST ist an der Signaltransduktion von Zytokinen, wie beispielsweise IL6 beteiligt.

5.3 PADI4 beeinflusst die Histon-Arginin Methylierung von CTCF und IL6ST

Durch ChIP-Analysen konnte für das Tal1-Protein und den Cofaktor PADI4 eine vermehrte Bindung an den proximalen Promotorbereich von *CTCF* und *IL6ST*, im Vergleich zu hiervon stromaufwärts bzw. abwärts gelegenen Sequenzabschnitten gezeigt werden. Dieses Ergebnis stimmt mit bereits veröffentlichten genomweiten ChIP-Sequenzierungsanalysen überein, bei denen die Tal1- und PADI4-Bindung proximal zum Transkriptionsstartpunkt von potentiell regulierten Genen lokalisiert war (Zhang *et al.*, 2011; Kassouf *et al.*, 2010; Sanda *et al.*, 2012). Durch eine sequentielle ChIP-Analyse (Re-ChIP) konnte eine simultane Bindung von Tal1 und PADI4 am *IL6ST*- und *CTCF*-Promotor aufgezeigt werden.

Die Bindung des Tal1- und PADI4-Proteins an den *IL6ST*- und *CTCF*-Promotor wurde weitergehend nach einem PADI4 *knock-down* durch ChIP-Experimente untersucht. Hierbei konnte erwartungsgemäß eine verminderte PADI4-Bindung an den *IL6ST*- und *CTCF*-Promotor ermittelt werden. Die Okkupation durch das Tal1-Protein war demgegenüber nur leicht verringert.

Das PADI4-Protein kann monomethylierte Histon-Arginine citrullinieren und hat dabei eine antagonistische Funktion zu der durch Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs) katalysierten Methylierung (Cuthbert *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2004). Die Histon-Deiminierung des Histon H3R17 durch PADI4 verhindert eine Methylierung durch PRMT4, was einen repressiven Einfluss auf diese Transkription von Zielgenen hat (Denis *et al.*, 2009; Nakashima *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2010). Durch ChIP-Analysen nach PADI4 *knock-down* konnte am *CTCF*-Promotor eine verminderte Methylierung des H3R17 festgestellt werden. Gleichzeitig war die Bindung von PRMT4 erhöht. Dies deutet auf eine Co-Repressor Funktion von PADI4 am *CTCF*-Promotor hin, in dem die Histon-Modifikation H3R17me2a durch PRMT4 verhindert wird. Diese Funktion PADI4-Proteins stimmt somit mit der bereits beschriebenen transkriptionellen Regulation weiterer Zielgene überein. Bei der vom Östrogen-Rezeptor abhängigen Regulation des *pS2* Gen schließt eine Citrullinierung des Histon H3R17 eine Methylierung aus, woraus eine transkriptionelle Repression resultiert (Denis *et al.*, 2009). Bei der Regulation des *p21* Gen ist das PADI4-Protein Bestandteil eines Co-Repressor Komplexes. Nach einer Beschädigung der DNA kommt es zu einer Dissoziation von PADI4, einer verminderten Citrullinierung des Histon H3 und Zunahme von H3R17me2a, einem Histonmodifikationsstatus der eine transkriptionelle Aktivierung

bedingt (Li *et al.*, 2010; 2008). Bei der Regulation des *p52* und *p21* Gen konnte eine Protein-Protein Interaktion mit Histon-Deacetylasen (HDAC) festgestellt werden (Li *et al.*, 2010; Denis *et al.*, 2009). Das PADI4-Protein und HDACs sind für die Aufrechterhaltung eines repressiven Histon-Status von Zielgenen verantwortlich. Die Histondeacetylase 1 (HDAC1) ist zudem Teil des Tal1-Multiproteinkomplexes, der an der Regulation von Tal1-Zielgenen beteiligt ist (Hu *et al.*, 2009). Daher wäre eine weitergehende Analyse der Beteiligung von HDAC1 an der Tal1/PADI4 gesteuerten Repression des *CTCF*-Promotors interessant.

Um einen vollständigen Überblick der Histonmodifikationen am *CTCF*-Promotor zu erhalten, ist es erforderlich weitere ChIP-Analysen durchzuführen. Beispielsweise könnte für die Modifikation H3K18ac untersucht werden, die durch die CBP/P300-Acetylase katalysiert wird. Bei der Östrogen-abhängigen Steuerung des *p52* Gen konnte eine gesteigerte Affinität von PRMT4 für eine Bindung an das Histon H3R17 nachgewiesen werden, wenn das Histon H3K18 zuvor acetyliert wurde (Daujat *et al.*, 2002). Daneben wäre eine Untersuchung weiterer repressiver Modifikationen wünschenswert, zu denen unter anderem die Modifikationen H3K9me3 und H3K27me3 gehören (Barski *et al.*, 2007). Diese sind verstärkt in Heterochromatin Bereichen lokalisiert, in denen die DNA nicht zugänglich für die Bindung von Transkriptionsfaktoren ist (zusammengefasst in Hirabayashi and Gotoh 2010).

Die Feststellung, dass es zu einer transkriptionellen Regulation des *CTCF* Gens durch den Tal1/PADI4 Komplex kommt, bietet weitergehende potentielle Ansatzpunkte für das Verständnis bei der hämatopoetischen Prozesse und dem Verständnis der Entstehung von T-Zell Leukämien (T-ALL). Die Tal1 Expression wird durch eine Vielzahl von *cis*-agierenden regulatorischen Elementen gesteuert, unter anderem durch das *CTCF*-Protein, dass die dreidimensionale Chromatinstruktur des 88 kb umfassenden Tal1 Regulon organisiert. Durch Analyse dieser Chromatinstrukturen konnte gezeigt werden, dass es zu einer spezifischen Interaktion bzw. Schleifenbildung von Tal1-Expression-regulierenden Sequenzen kommt, die sich in den verschiedenen hämatopoetischen Differenzierungsschritten und in T-Zell Leukämiezellen unterscheiden (Zhou *et al.*, 2013). Die in dieser Arbeit beschriebene aktivierende Steuerung des *CTCF* Gens durch den Tal1/PADI4-Komplex könnte Basis einer *feedback loop* Regulation der Tal1-Expression sein. Die Regulation durch *Feedback*-Schleifen können unterschiedliche Effekte auf die Genexpression haben. Wenn sich die Zellen sich in einem Zustand befinden, in denen die

beiden Gene ein normales Expressionsniveau aufweisen, stabilisieren sie sich gegenseitig. Durch äußere Einflüsse oder durch eine induzierte Hoch- bzw. Herunterregulierung eines der beteiligten Gene kann dieses zu einer Deregulation führen, die durch die *Feedback*-Schleifen zusätzlich verstärkt werden. Für den Transkriptionsfaktor Tal1 sind solche Regulationsmechanismen bereits beschrieben worden. Zusammen mit der Rezeptor Kinase *Kit* reguliert Tal1 die Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen. *Kit* ist ein Ziel der transkriptionellen Aktivierung durch Tal1 (Lécuyer *et al.*, 2002; Kroschel *et al.*, 1998) und bildet einen positiven *feedback loop* in hämatopoetischen Vorläuferzellen. Nach einer Liganden-Aktivierung des *Kit*-Rezeptor kommt es zu einer Hochregulation von Tal1, die in einer erhöhten *Kit* Transkription resultiert (Lacombe *et al.*, 2013). In der T-Zellleukämie Zelllinie Jurkat konnte eine Co-Regulation zwischen Tal1-Protein und dem viralen Onkoprotein Tax-1 aufgezeigt werden. Die Expression des Tal1- und Tax-1 Protein bilden die Grundlage eines positiven *feedback loop* und könnten z.B. ein Mediator der T-Zell Transformation von Lymphozyten sein (Terme *et al.*, 2008). Das Vorliegen eines möglichen *feedback loop* Mechanismus der Transkriptionsfaktoren Tal1 und CTCF und dessen mögliche Deregulation könnten daher eine Ursache für die Entstehung von T-Zellleukämien sein.

Die Untersuchungen des epigenetischen Status des *IL6ST*-Promotors durch ChIP-Analysen ergaben eine spezifische Regulation durch PADI4. Nach einem PADI4 *knock-down* nahm die repressiv auf die Transkription wirkende Modifikation H3R2me2a stark zu. Dies stimmt mit den zuvor ermittelten Expressionsanalysen von *IL6ST* nach einem PADI4 *knock-down* überein, die eine verringerte *IL6ST* mRNA Expression aufzeigten. Neben der starken Zunahme von H3R2me2a konnte eine Abnahme von H3K4me3 detektiert werden. Zusätzlich wurde nach dem *knock-down* von PADI4 eine Zunahme der Okkupation der Protein Arginin Methyltransferase 6 (PRMT6) detektiert, die H3R2 methyliert. Diese Ergebnisse korrelieren mit anderen Veröffentlichungen, in denen die Methylierung von H3R2me2a PRMT6 zugeordnet wurden und sich in einem generell wirksamen Mechanismus mit der Trimethylierung von H3K4me3 gegenseitig ausschließt (Guccione *et al.*, 2007). Ein ähnlicher Regulationsmechanismus der PRMT6 katalysierten Methylierung von H3R2 konnte durch eine vorangegangene Arbeit in der Arbeitsgruppe Lausen bereits beschrieben werden. In Progenitorzellen besetzt ein Multiproteinkomplex, bestehend unter anderen aus dem Transkriptionsfaktor RUNX1 (*Runt-related-transcription factor 1*)

und PRMT6 die Promotoren von RUNX1 Zielgenen. Aus der durch PRMT6 katalysierten Modifikation H3R2me2a resultiert ein repressiver Chromatinstatus, der eine H3K4me3 durch den WDR5/MLL Komplex ausschließt. Während einer megakaryozytären Differenzierung verlässt PRMT6 den Komplex und es kommt zu H3R2me2a, sowie der Zunahme von H3K4me3 und H3K9Ac (Herglotz *et al.*, 2012).

Eine Funktion des PADI4-Proteins als Repressor der H3R2me2a Methylierung wurde *in-vivo* noch nicht beschrieben. Bisherige Analysen waren auf eine *in-vitro* Citrullinierung eines H3R2 Monomethyl Peptids durch PADI4 beschränkt (Cuthbert *et al.*, 2004). Untersuchungen der PADI4 katalysierten Histonmodifikationen beschreiben aktuell meist den Status der Histonmodifikation H3R17, wie die reprimierende Regulation des Histon H3R17me2 des *p52* Gen oder von Apoptose-assoziierten Genen wie *p21* oder *Gadd45* (Denis *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2006). Bei der Regulation des *c-myc* Gens in murinen hämatopoetischen Stammzellen (Nakashima *et al.*, 2013) bildet PADI4 zusammen mit HDAC1 einen Repressorkomplex, der die Methylierung von H3R17 verhindert.

Die Spezifität der PADI4 katalysierten Regulation der Arginin Methylierung von H3R2me2a des *IL6ST*-Promotor war dahingehend unerwartet, da das Enzym mehrere Arginine auf dem Histon H3 (R2, R8, R17 und R26 und H4R3 (Cuthbert *et al.*, 2004) und auch Nicht-Histon Substrate deiminiert (Lee *et al.*, 2005b; Hagiwara *et al.*, 2002). Dabei bindet PADI4 nicht an definierte Aminosäure Sequenzen, sondern vielmehr scheinen unstrukturierte Sequenzen erforderlich zu sein, die die Ziel Arginine umgeben. Für ein weitergehendes Verständnis der katalytischen Aktivität von PADI4 auf dem *IL6ST*- und *CTCF*-Promotor und um in der ChIP-Analyse Antikörper bedingte Effekte wie eine sterischen Verhinderung der Epitop-Zugänglichkeit ausschließen zu können, wäre eine Massenspektrometrische Analyse der Histone H3 und H4 nach PADI4 *knock-down* vielversprechend. Durch einen solche Untersuchung konnte PADI4 bereits eine Citrullinierung des Arg54 des Linker Histon H1 zugeordnet werden, wodurch die Bindung an nukleosomale DNA beeinflusst wurde (Christophorou *et al.*, 2014).

Die Funktion des PADI4-Proteins als Coaktivator der *IL6ST*-Transkription, basierend auf der antagonistischen Wirkungsweise einer Citrullinierung zu der PRMT6 katalysierten Methylierung der Histonmodifikation H3R2me2a, erfordert weitergehende Untersuchungen. Dies könnte zum einen durch die Verwendung eines H3R2cit Antikörper in ChIP-Analysen erfolgen, der während der Erstellung dieser Arbeit nicht zur Verfügung stand und daher generiert werden müsste. Hierdurch könnte eine Beurteilung darüber

erfolgen, wonach die PADI4 katalysierte Deiminierung von Argininen als ein irreversibler Prozess angesehen wird. Die Existenz eines Enzyms die diesen Prozess umkehren könnte, einer sogenannten Aminotransferase, steht noch aus und könnte das Verständnis der Histon-modifizierenden Regulation durch PADI4 erweitern (Cuthbert *et al.*, 2004). Zum anderen könnte die Bindung des ASH2/WDR5/MLL-Methyltransferase Komplexes an den *IL6ST*-Promotor untersucht werden, der die Modifikation H3K4me3 katalysiert und damit eine H3R2me2a ausschließt (Guccione *et al.*, 2007).

5.4 Der PADI4-Inhibitor Chlor-Amidin moduliert die Transkription von Zielgenen

Durch Untersuchungen von verschiedenen Tumorentitäten wie z.B. von Blut-, Lungen- und Ovarialkarzinomen (Chang *et al.*, 2009) konnte eine Überexpression des PADI4-Proteins festgestellt werden. Durch die Verwendung des PADI4-Inhibitors Cl-Amidin konnte bereits ein Einfluss auf die transkriptionelle Regulation von Apoptose assoziierten Genen gefunden werden (Li *et al.*, 2010).

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach einer Behandlung der Erythroleukämie-Zelllinie HEL mit Cl-Amidin die mRNA-Expression der Tal1/PADI4 Zielgene *IL6ST* und *CTCF* verändert wurde. Diese Feststellung korrelierte mit den Ergebnissen der *Microarray*-Genexpressionsanalysen. Die Untersuchung der pharmakologischen Inhibition der PADI4-Aktivität durch ChIP-Experimente ergab eine Zunahme von H3R2me2a und eine Abnahme von H3K4me3 am *IL6ST*-Promotor. Abweichend von den *knock-down* Experimenten konnte bei der PADI4-Inhibierung durch Cl-Amidin keine Zunahme der Modifikation H3R17me2a ermittelt werden. Dies könnte auf einen Einfluss des PADI4-Proteins auf die strukturelle Zusammensetzung und einer hieraus resultierenden veränderten Funktionsweise des Tal1-Multiproteinkomplexes hindeuten. Die Folgen einer veränderten Konformation des Tal1-Komplexes wurden durch Untersuchungen des Adapterproteins LMO2 beschrieben. Das Protein verstärkt durch die Einbringung neuer H-Brückenbindungen die Bindung des Tal1/E47 Heterodimer. Die hieraus folgende veränderte strukturelle Konformation hat eine verminderte Rekrutierung und Bindung des Tal1/E47 Komplex zur Folge (Omari *et al.*, 2013).

Eine durch die PADI4-Inhibition bedingte veränderte Komposition des Tal1-Multiproteinkomplexes, könnte die Bindung bzw. die Rekrutierung von PRMT4 an den

Komplex beeinflussen. Die Methylierung von H3R17 am *IL6ST*-Promotor findet daher nicht bzw. vermindert statt. Alternativ hierzuführen eine Inhibition durch Cl-Amidin zu einer Konformationsänderung des PADI4-Proteins. Hieraus könnte eine reduzierte Katalyse von H3R17me2a durch das zum Tal1-Multproteinkomplex gehörenden PRMT4-Protein resultieren.

5.5 Die Expression von IL6ST während der Differenzierung von Progenitorzellen stimmt mit der PADI4-Rekrutierung an den Promotor und veränderten Histonmodifikationen überein

Durch eine Kombination von PADI4-Expressionsanalysen während der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen und gleichzeitiger ChIP-Analysen des *IL6ST*-Promotors konnte in dieser Arbeit eine PADI4-abhängige, dynamische transkriptionelle Steuerung von *IL6ST* festgestellt werden. Eine erhöhte Expression von *IL6ST* korreliert mit der verminderten Bindung von PADI4 an den Promotor und dem zunehmenden Vorkommen der repressiven Histonmodifikation H3R2me2a. In zu Megakaryozyten differenzierten Zellen konnte keine Änderung der *IL6ST*-Expression bestimmt werden. Gleichzeitig war die Bindung von PADI4 an den Promotor vermindert und die Histonmodifikation H3R2me2a erhöht.

Das PADI4-Protein hat somit die Funktion eines epigenetischen Coaktivators, der die linienspezifische Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen durch Beeinflussung der H3R2me2a Modifikation des *IL6ST*-Promotors steuert. Dabei ist die transkriptionelle Aktivierung des *IL6ST*-Promotors abhängig von der PADI4-Expression. Diese Beschreibung der Relevanz einer selektiven PADI4-Expression ist vergleichbar mit anderen publizierten Analysen der PADI4 Funktion (Christophorou *et al.*, 2014; Nakashima *et al.*, 2013). Hierzu gehört der Einfluss von PADI4 auf die Pluripotenz und Proliferation von Stammzellen. In pluripotenten Stammzellen, sowie während der Reprogrammierung von murinen Stammzellen war die PADI4-Expression und dessen Aktivität zunehmend. PADI4 bindet in prä-induzierbaren pluripotenten Stammzellen (prä-IPS) an regulative Sequenzen von Stammzellgenen wie z.B. *Nanog* und *Tcl1* und aktiviert deren Expression. Nach einer PADI4-katalysierten Citrullinierung eines Arginin-Seitenrestes des Linker-Histon H1 konnte eine verminderte Bindung an die regulatorischen Regionen von *Nanog* und *Tcl1*

festgestellt werden. Hieraus resultiert eine globale Dekondensation des Chromatin und ein veränderter Expressionsstatus (Christophorou *et al.*, 2014).

Das PADI4-Protein beeinflusst als transkriptioneller Coregulator neben der Reprogrammierungs-Fähigkeit hämatopoetischer Stammzellen auch deren Proliferation. Durch eine PADI4 katalysierte Citrullinierung des *c-myc* Promotors wird dessen Genexpression reprimiert (Nakashima *et al.*, 2013). Die *c-myc* gesteuerte Proliferation in verschiedenen hämatopoetischen Vorläuferzellen ist abhängig von der PADI4-Expression, wobei diese Effekte in MPPs am stärksten waren. Das *c-myc* Protein besitzt eine bedeutende Funktion bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts hämatopoetischer Stammzellen zur Selbsterneuerungsfähigkeit bzw. deren Differenzierung. Für *c-myc* defiziente LT-HSCs konnte gezeigt werden, dass diese zwar weiterhin ein Selbsterneuerungspotential besitzen, jedoch ist deren weitergehende Differenzierung gestört. Hierdurch kommt es zu einer Akkumulation der Stammzellen im Knochenmark (Wilson *et al.*, 2004).

Ausgehend von den beschriebenen Funktionen des PADI4-Proteins, die einen Einfluss auf die Pluripotenz und Proliferation hämatopoetischer Stammzellen umfassen, stellt sich die mögliche Funktion eines Tal1/PADI4 Komplexes innerhalb dieser Prozesse. Das Tal1-Protein ist an der Differenzierungssteuerung hämatopoetischer Stammzellen beteiligt. Die in dieser Arbeit dargestellten *Microarray* Daten nach einem Tal1 und PADI4 *knock-down* ergaben eine große Anzahl gemeinsam regulierter Zielgene. Durch einen Tal1 und PADI4 *knock-down* in LT-HSCs könnte geklärt werden, ob eine gemeinsame Regulation von Zielgenen durch den Tal1/PADI4 in der frühen Hämatopoese stattfindet oder ob eine gegenteilige Steuerung von Selbsterneuerung und Differenzierung vorliegt.

5.6 PADI4 beeinflusst die hämatopoetische Differenzierung von pluripotenten Stammzellen

Die Bedeutung von PADI4 auf die hämatopoetische Differenzierung von pluripotenten Stammzellen wurde unter Anwendung von *Colony-Formation-Assays* nähergehend untersucht. Hierbei konnte nach einer PADI4-Überexpression eine verringerte Monozyten-Kolonienanzahl bestimmt werden und invers hierzu, war diese nach einem PADI4 *knock-down* erhöht. Die PADI4-abhängige Steuerung der Monozytendifferenzierung könnte aus zwei verschiedenen Regulationsmechanismen resultieren. Zum einen könnte diese in der

zuvor beschriebenen transkriptionellen Regulation von *IL6ST* durch PADI4 begründet liegen. Daneben könnte die bereits beschriebene posttranslationale Citrullinierung des an der myeloiden Differenzierung beteiligten CEBP α -Proteins durch PADI4 für die veränderte monozytäre Differenzierung verantwortlich sein.

In Folge der PADI4 gesteuerten transkriptionellen Aktivierung des *IL6ST*-Promotors könnten vom JAK/STAT3 stromabwärts gelegene und an der Leukozytendifferenzierung beteiligte Gene beeinflusst sein. Diesen möglichen funktionellen Zusammenhang deuten Untersuchungen von konditionellen und induzierbaren GP130^{-/-} Mäusen an, die eine Zunahme der zirkulierenden Leukozyten im peripheren Blut aufwiesen (Betz *et al.*, 1998).

Durch eine Genontologie-Klassifizierung der in dieser Arbeit durchgeführten *Microarray*-Analyse nach Tal1 und PADI4 *knock-down* in HEL-Zellen konnte eine große Anzahl an koregulierten Gene bestimmt werden, die mit der Leukozytendifferenzierung assoziiert sind. Hierzu gehörte unter anderem auch das *CCAAT/Enhancer Binding Protein* (CEBP), epsilon, dass ein direktes Zielgen von CEBP α ist (D'Alo 2003). Die vier Isoformen des CEBP ϵ -Proteins beeinflussen die linienspezifische Differenzierung von myeloiden Progenitorzellen (Bedi *et al.*, 2009).

Die linienspezifischen Differenzierungsentscheidungen von myeloiden Vorläuferzellen (cMPs) werden durch die Transkriptionsfaktoren PU.1 und CEBP α reguliert. Der Transkriptionsfaktor CEBP α wird innerhalb des Hämatopoetischen Systems überwiegend in myeloiden/monozytischen Zellen exprimiert (Radomska *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 1992). Die PU.1 Expression wird während der Hämatopoese dynamisch reguliert, da diese für die korrekten linienspezifischen Differenzierungsentscheidungen essentiell ist (Back *et al.*, 2005, Nutt *et al.*, 2005). Dabei ist die PU.1 Expression in GMPs stark erhöht und steuert hierdurch die Neutrophile- und Monozytendifferenzierung. Die Bedeutung von CEBP α und PU.1 an der myeloiden Differenzierung wurde durch Mausmodelle untersucht. CEBP α *knock-out* Mausmodelle weisen eine selektive Blockade der neutrophilen und eosinophilen Granulozyten-Differenzierung auf. In Mausmodellen mit einem konditionellen PU.1 *knock-out* in Granulozyten-Monozyten-Vorläuferzellen (GMPs) kommt es zu einer Blockade der terminalen Myelomonozytären Differenzierung (Iwasaki, 2005). Die Mechanismen der myeloiden Differenzierungsentscheidungen zu Granulozyten und Monozyten und die distinkte Funktion der beteiligten Faktoren CEBP α und PU.1 an dieser Regulation sind allerdings noch nicht vollständig beschrieben. Vermutlich ist unter anderem das Verhältnis

der PU.1- und CEBP α Proteinexpression zueinander für die weitere Differenzierung von GMPs zu Granulozyten bzw. Monozyten entscheidend (Mak *et al.*, 2011). Daneben konnte gezeigt werden, dass CEBP α die PU.1 Transkription steuert und somit dessen Aktivität auf myeloide Zielgene beeinflusst (Radomska *et al.*, 1998; Reddy *et al.*, 2002; Tenen *et al.*, 2003). Der Einfluss des PADI4-Proteins auf die myeloide Differenzierung wurde bereits durch eine Interaktionsanalyse mit CEBP α beschrieben. Durch eine Citrullinierung mehrerer Arginin-Seitenreste wird die DNA-Bindfunktion und Interaktionsfähigkeit von CEBP α mit anderen Proteinen beeinflusst (Liu 2014). In Reporter-gen-Experimenten reprimierte PADI4 die CEBP α vermittelte Transkription. Aus einem CEBP α *knock-down* in humanen hCD34+ Stammzellen und einem anschließenden *Colony Formation Assay* resultierte eine erhöhte Monozyten- und verringerte Granulozyten-Kolonieanzahl. Eine Genexpressionsanalyse von murinen Knochenmarkzellen nach CEBP α *knock-down* ergab eine verminderte Genexpression von CEBP ϵ , einem transkriptionellen Regulator der Granulopoese (Ma *et al.*, 2014). Die in dieser Arbeit bestimmten Erhöhung der Monozyten-Koloniezahl nach PADI4 *knock-down* bzw. deren Verringerung nach PADI4 Überexpression in einem *Colony Formation Assay* könnte somit aus der PADI4 katalysierten Citrullinierung des CEBP α -Proteins resultieren. Durch die hieraus folgende Repression der transkriptionellen Aktivität von CEBP α kommt es, wie für die PADI4-Überexpression in hCD34+ Zellen und nachfolgendem *Colony Formation Assay* gezeigt, zu einer verringerten Monozytendifferenzierung. Weitergehende Untersuchungen könnten dahingehend ausgerichtet sein, die Relevanz der durch PADI4 gesteuerten Repression von CEBP α auf linienspezifische Differenzierungsentscheidungen von myeloiden Vorläuferzellen zu untersuchen. Die Funktion des PADI4-Proteins während der myeloiden Differenzierung könnte durch einen PADI4 *knock-down* in GMP-Vorläuferzellen und eine *Microarray*-Genexpressionsanalyse zur Identifikation von transkriptionellen Zielgenen weitergehend untersucht werden. Durch diese Analysen könnte bestimmt werden, welche Relevanz PADI4 auf die Funktion von CEBP α bei der transkriptionellen Regulation dessen Zielgene bei der myeloid-monozytären Differenzierung hat. Daneben könnte in Folge einer Citrullinierung von CEBP α dessen Proteinstabilität verändert sein. Durch Analysen der Interaktion von PADI4 mit der DNA (Cytosin-5)-Methyltransferase (DNMT3A) konnte gezeigt werden, dass eine Citrullinierung die Proteinstabilität von DNMT3A verändert (Deplus *et al.*, 2014). Aus einer Beeinflussung des Gleichgewichts des für die

linienspezifische Differenzierung relevanten Expressionsniveaus von PU.1 und CEBP α , könnte eine veränderte Monozytendifferenzierung resultieren.

Um ein detaillierteres Verständnis der PADI4 Funktion in bestimmten hämatopoetischen Differenzierungsstadien zu erhalten, müssten zelltyp-spezifische *knock-out* Mäuse generiert werden. Beispielsweise könnten durch einen PADI4 konditionellen myeloiden *knock-out* die beobachteten Einflüsse auf die Monozytendifferenzierung weitergehend untersucht werden.

5.7 PADI4 beeinflusst das Wachstum von humanen Tumor Zelllinien

Die enzymatische Aktivität des PADI4-Proteins kann durch die Verwendung der niedermolekularen Verbindung Cl-Amidin inhibiert werden (Li *et al.*, 2008). Hierdurch kommt es zu einer Aktivierung der Genexpression des p53 Zielgen *p21*, die eine reduzierte Proliferation zur Folge hat. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von PADI4 in den Tal1 exprimierenden Krebszelllinien K562, HEL, U937 und in humanen CD34+ Zellen ein reduziertes Zellwachstum bedingt. Den größten feststellbaren Einfluss auf die Proliferation ergab sich bei der Behandlung der T-Zell Leukämie Zelllinie Jurkat. Für diese Zellen wurde bereits eine Abhängigkeit von der Tal1-Expression beschrieben, dahingehend, dass es nach einem shRNA vermittelten *knock-down* von Tal1 zu einer Wachstumsinhibierung kommt (Palomero *et al.*, 2006; Palii *et al.*, 2011). Als Tal1-Zielgen in Jurkat-Zellen wurde das *NKX3.1* Gen beschrieben, ein Tumorsuppressor Gen, das wichtig für die Erhaltung von Stammzellen in der Prostata ist (Kusy *et al.*, 2010). Die Transkription wird durch einen Komplex aus Tal1, LMO1, LDB1 und GATA3 gesteuert. Eine Aktivierung der *NKX3.1* Transkription erfolgt durch die Repression der Bindung des Protein HP1 α (Heterochromatin 1 α). Die Proliferation von Jurkat-Zellen ist abhängig von der *NKX3.1*-Expression und diese kann teilweise die Tal1 abhängigen Einflüsse kompensieren. Aus der Beobachtung einer starken Wachstumsinhibierung von Jurkat-Zellen nach Behandlung mit Cl-Amidin ergeben sich mehrere Fragestellungen. Zunächst könnte untersucht werden, ob PADI4 ein Teil des Tal1-Multiproteinkomplexes in Jurkat-Zellen ist und reprimierenden bzw. aktivierenden Einfluss auf die *NKX3.1* Transkription hat. Die Funktion von PADI4 könnte in einer Beeinflussung der Bindung des HP1 α -Proteins an den *NKX3.1*-Promotor liegen. Bei der Regulation von Genen die mit der Immunantwort

assoziiert sind, wie beispielsweise dem Tumornekrosefaktor α (TNF α) wird die Fähigkeit zur Bindung des HP1 α -Proteins an H3K9me3 durch die Citrullinierung von H3R8 verringert (Sharma *et al.*, 2012). Die Transkription von NKX3.1 könnte einer ähnlichen Regulation unterliegen, woraus die beschriebenen Effekte nach Behandlung mit Cl-Amidin resultieren.

5.8 Einfluss von posttranskriptionellen Modifikationen

Für das Tal1- und PADI4-Protein wurden posttranslationale Modifikationen beschrieben, die einen Einfluss auf die transkriptionelle Steuerung von Zielgenen haben. Eine durch eine Protein Kinase A (PKA) katalysierte Phosphorylierung von Tal1 reguliert die Interaktion mit der Lysin spezifischen Demethylase 1 (LSD1) und ermöglicht hierdurch die Demethylierung von H3K4 (Hu *et al.*, 2009). Eine Untersuchung einer möglichen Citrullinierung des Tal1-Proteins und einem hieraus resultierenden Einfluss auf die Bindung des Tal1-Multiproteinkomplexes an Zielgene bzw. deren Steuerung bietet weitere interessante Ansätze. Die Interaktion von PADI4 mit anderen Proteinen wie z.B. der Histon-Deacetylase 1 (HDAC1) und der Protein Arginine Methyltransferase 1 (PRMT1) wird durch die Autodeiminierung des Proteins beeinflusst (Slack *et al.*, 2011b). Die Beobachtung, dass das PADI4-Protein in Luciferase Experimenten eine Tal1/E47 Aktivierung reprimiert, könnte aus einer Citrullinierung des Tal1- bzw. E47-Proteins resultieren. Eine posttranslationale Modifikation könnte Einfluss auf die Interaktionsfähigkeit der beiden Proteine bzw. auf deren Bindungsfähigkeit haben, was eine verminderte Luciferase-Aktivität bedingt. Die mögliche Funktion des PADI4-Protein als transkriptioneller Repressor des Tal1 gesteuerten Transkription wurde durch die Verwendung einer enzymatisch inaktive PADI4-Mutante deutlich, die keinen Einfluss auf die Luciferase-Aktivität hatte. Für eine weitergehende Spezifizierung dieser Einschätzung müsste der *IL6ST*- bzw. *CTCF*-Promotor als Reporter gen verwendet werden.

5.9 Modell der Regulation von Tal1 Zielgenen durch den Cofaktor PADI4

In der vorliegenden Arbeit konnte PADI4 als neuer Interaktionspartner des Transkriptionsfaktors Tal1 identifiziert und unter Anwendung mehrerer Interaktionsstudien verifiziert werden. Durch einen *knock-down* von Tal1 und PADI4

konnten 414 gemeinsam regulierte potentielle Zielgene gefunden werden, zu denen die Gene *CTCF* und *IL6ST* gehörten. Durch Chromatin-Immunopräzipitationen konnte die simultane Bindung von Tal1 und PADI4 in den proximalen Promotorbereichen von *CTCF* und *IL6ST* aufgezeigt werden. Dabei rekrutiert das Tal1-Protein das Histon modifizierende Enzym PADI4 an den Promotor, dass Zielgen spezifische Funktionen aufweist. Am *IL6ST*-Promotor wird durch die PADI4-Bindung H3R2me2a durch PRMT6 verhindert. Unter anderem resultierend aus dem Vorkommen der aktivierend wirkenden Modifikation H3K4me3 kommt es zu der Transkription von *IL6ST*. Durch eine Dissoziation von PADI4 von dem Tal1-Multiproteinkomplex kommt es zu einer durch PRMT6-katalysierten H3R2me2a, einer Abnahme von H3K4me3 und daraus folgend einer verminderten Transkription. PADI4 hat am *IL6ST*-Promotor somit die Funktion einer Co-Aktivators (Abb. 5.1A).

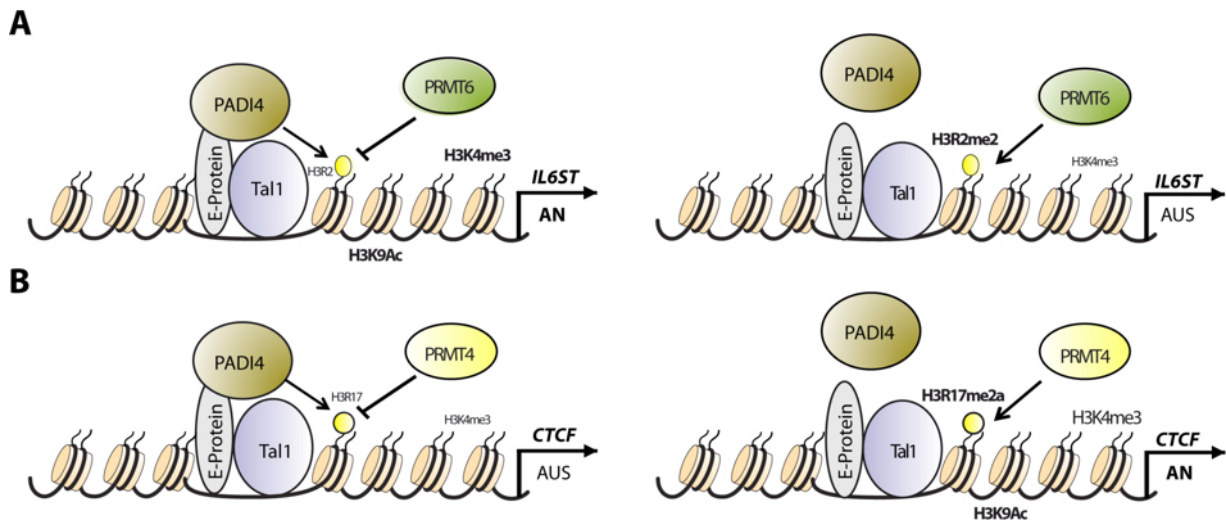


Abb. 5.1: Modell der Funktion der Tal1/PADI4 Interaktion auf die Zielgene *IL6ST* und *CTCF*. (A) Das PADI4-Protein wird an den Tal1-Komplex des *IL6ST*-Promotors rekrutiert und verhindert eine durch PRMT6 katalysierte Modifikation von H3R2me2a. Daraus resultiert eine H3K4me3 und die Transkription des *IL6ST* Gen. Nach einer Dissoziation des PADI4-Proteins vom Tal1-Interaktom katalysiert PRMT6 die Modifikation H3R2me2a. Die hieraus resultierende Abnahme von H3K4me3 bedingt einen repressiven Chromatinstatus des *IL6ST*-Promotors und somit eine verminderte Transkription. (B) Tal1 rekrutiert PADI4 an den *CTCF*-Promotor und verhindert eine durch PRMT4 katalysierte H3R17me2a. Daraus folgt ein niedriges Expressionsniveau des *CTCF* Gen. Wenn PADI4 nicht mehr mit dem Tal1-Protein interagiert und den Komplex verlässt, wird die antagonistische Funktion zu PRMT4 aufgehoben. Es kommt zu einer Methylierung von H3R17 durch PRMT4 und nachfolgend zu einer Zunahme von H3K4me3 und der Expression von *CTCF*.

Am *CTCF*-Promotor ist PADI4 ein transkriptioneller Co-Repressor. Durch eine Rekrutierung von PADI4 durch Tal1, wird eine Methylierung von H3R17 durch PRMT4 verhindert. Wenn das PADI4-Protein den Tal1-Komplex verlässt, wird die antagonistische Funktion zu PRMT4 aufgehoben. Hieraus folgt die Histonmodifikation H3R17me2a, eine Zunahme von H3K4me3 und eine gesteigerte *CTCF*-Expression.

5.10 Die Funktion von Tal1 und PADI4 in der Hämatopoese und bei Krankheiten

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Daten bieten weitgehende Implikationen für ein Verständnis der Regulationsmechanismen der Hämatopoese und der Rolle von PADI4 bei Krankheiten. Die Beobachtung, dass PADI4 ein Co-Aktivatoren bzw. Co-Repressor der Transkriptionsregulation von *IL6ST* und *CTCF* ist und dass diese durch den epigenetisch aktiven Inhibitor Cl-Amidin modulierbar ist, stellt dabei eine potentielle Möglichkeit für die Verwendung in zukünftigen klinischen Ansätzen dar. Für eine Modulation der IL6ST Aktivität werden aktuell monoklonaler IL6ST Antikörper verwendet, die nach Bindung an den Rezeptor die Signaltransduktions-Prozesse beeinflussen (Gu *et al.*, 1996; Saito *et al.*, 1993). Alternativ hierzu wäre eine Regulation der *IL6ST*-Transkription durch die Verwendung einer niedermolekularen Verbindung wie Cl-Amidin interessant, um beispielsweise den JAK/STAT-Signalweg zu beeinflussen. Dieser Signalweg ist an der Weiterleitung externer chemischer Signale, beispielsweise in Form der Interleukine, beteiligt. Nach der Bindung an einen Oberflächenrezeptor kommt es zu einer Phosphorylierung des JAK-Proteins, was wiederum die Phosphorylierung des STAT-Proteins ermöglicht. Nachfolgend kommt es zu einer Translokation in den Nukleus und der Transkriptionssteuerung verschiedener Zielgene. Der JAK/STAT-Signalweg ist an einer Vielzahl regulatorischer Prozesse des Immunsystems beteiligt. In Folge einer fehlerhaften Regulation und einer daraus resultierenden konstitutiven Aktivierung, insbesondere dem STAT3-Protein, kann es zu einer fehlerhaften Immunantwort und der Entstehung von Krebs kommen. Die Inhibition von STAT3 umfasst bereits eine Vielzahl von direkten Inhibitionsansätzen, als auch der stromaufwärts gelegenen Signalprozesse, allerdings ist die *in-vivo* Effizienz aktuell als gering zu bewerten (zusammengefasst in (Yu *et al.*, 2009). Ausgehend hiervon könnten die Ergebnisse dieser Arbeit, die eine epigenetische Regulation des IL6ST-Rezeptorproteins durch Applikation des PADI4-Inhibitors Cl-Amidin beschrieben, einen möglichen Ansatz zur Behandlung STAT3 assoziierter Krankheiten bieten. (Abb. 5.2).

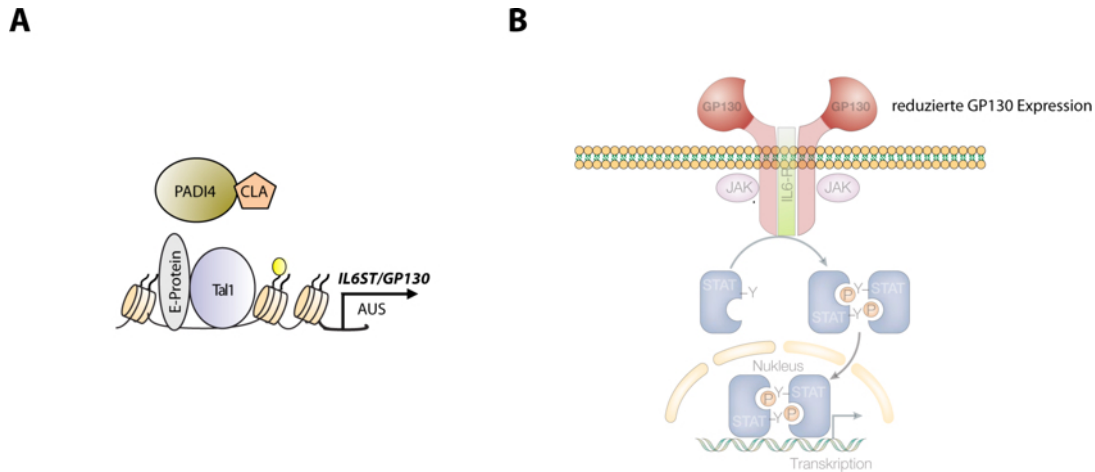


Abb. 5.2: Modell des Einflusses einer PADI4-Inhibition mittels der niedermolekularen Substanz Cl-Amidin auf die *IL6ST*-Expression und dem JAK/STAT-Signalweg. (A) Durch eine Cl-Amidin Applikation (CLA) wird die Funktion des PADI4-Proteins als Coaktivator der *IL6ST*-Transkription inhibiert. Hieraus resultiert eine Methylierung von H3R2me2 durch PRMT6 und eine verminderte *IL6ST*-Transkription. **(B)** Aus der reduzierten Expression des *IL6ST*-Rezeptors folgt eine verminderte Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs und reduzierten Transkription von STAT3-Zielgenen. Die aberrante Expression bzw. Aktivierung von STAT3 ist mit einer Vielzahl von Tumorerkrankungen assoziiert. Modifiziert nach (Shuai and Liu 2003).

Durch Untersuchungen von Patienten mit einer rheumatischen Arthritis konnte gezeigt werden, dass diese eine erhöhte PADI4-Expression aufweisen. Die Entstehung der Krankheit wurde mit dem Vorhandensein von Autoantikörpern gegen citrullinierte Proteine in Verbindung gebracht (Huang *et al.*, 1999; Suzuki *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2000; Schuh *et al.*, 2005; Goardon *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2009). Das Zytokin IL6 und das durch den Tal1/PADI4 regulierte Signaltransduktion Protein IL6ST sind Bestandteile der Regulation der Immunantwort (Schuh *et al.*, 2005; Kopf *et al.*, 1994; Wadman *et al.*, 1994; Houssiau *et al.*, 1988; Cai *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 1991; 1994a; Valge-Archer *et al.*, 1994; Hu *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012). Die Tal1/PADI4 gesteuerte transkriptionelle Regulation bzw. eine mögliche Deregulation der *IL6ST*-Genexpression könnte eine weitere Erklärung für die Entstehung rheumatischer Arthritis sein.

Das CTCF-Protein ist an der Regulation der Megakaryozyten- und Erythrozyten-Differenzierung beteiligt und moduliert die Expression von Regulatoren der Zellzyklus Kontrolle, Seneszenz und Proliferation (Torrano *et al.*, 2005; Ouboussad *et al.*, 2013; Heath *et al.*, 2008). Durch Analysen von Brustkrebszellen gezeigt werden, dass eine Überexpression von CTCF eine anti-apoptotische Funktion hat (Docquier *et al.*, 2005). Das fehlerhafte epigenetischen *Silencing* des Tumorsuppressors Gen $P16^{INK4}$ in Brustkrebszelllinien ist verbunden mit einer verminderten CTCF Bindung und veränderter

Insulator-Funktion (Witcher and Emerson 2009). Die an der transkriptionellen Kontrolle von CTCF beteiligten Faktoren sind noch weitgehend unbekannt. Die Feststellung, dass CTCF die Tal1-Expression in der T-Zell Leukämie Zelllinie Jurkat steuert und der Tal1/PADI4 Heterodimerkomplex ein transkriptioneller Regulator der CTCF Expression ist, bietet einen Ausgangspunkt für die Untersuchungen der Relevanz einer möglichen *feedback loop* Regulation bei der Entstehung von T-Zellleukämien.

Hieraus verdeutlicht sich die essentielle Bedeutung eines weitergehenden und genaueren Verständnis der biologischen Funktion des PADI4-Proteins innerhalb der Hämatopoese, sowie den Prozessen von Krebserkrankungen und Rheumatischer Arthritis. Die Verwendung des PADI4-Inhibitors Cl-Amidin könnte dabei als epigenetisch wirksamer therapeutischer Ansatz dienen, vergleichbar mit bereits in klinischen Studien verwendeten Histon Deacetylasen Inhibitoren.

6. Literaturverzeichnis

- Akashi K, Traver D, Miyamoto T, Weissman IL. 2000. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**: 193–197.
- Alenzi FQ, Alenazi BQ, Ahmad SY, Salem ML, Al-Jabri AA, Wyse RKH. 2009. The haemopoietic stem cell: between apoptosis and self renewal. *Yale J Biol Med* **82**: 7–18.
- ALLFREY VG, FAULKNER R, MIRSKY AE. 1964. ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc Natl Acad Sci USA* **51**: 786–794.
- Allis CD, Berger SL, Cote J, Dent S, Jenuwien T, Kouzarides T, Pillus L, Reinberg D, Shi Y, Shiekhattar R, *et al.*, 2007. New nomenclature for chromatin-modifying enzymes. *Cell* **131**: 633–636.
- Althoff K, Reddy P, Voltz N, Rose-John S, Müllberg J. 2000. Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins. *Eur J Biochem* **267**: 2624–2631.
- Aplan PD, Begley CG, Bertness V, Nussmeier M, Ezquerra A, Coligan J, Kirsch IR. 1990. The SCL gene is formed from a transcriptionally complex locus. *Mol Cell Biol* **10**: 6426–6435.
- Aplan PD, Jones CA, Chervinsky DS, Zhao X, Ellsworth M, Wu C, McGuire EA, Gross KW. 1997. An scl gene product lacking the transactivation domain induces bony abnormalities and cooperates with LMO1 to generate T-cell malignancies in transgenic mice. *EMBO J* **16**: 2408–2419.
- Arents G, Moudrianakis EN. 1993. Topography of the histone octamer surface: repeating structural motifs utilized in the docking of nucleosomal DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 10489–10493.
- Arita K, Hashimoto H, Shimizu T, Nakashima K, Yamada M, Sato M. 2004. Structural basis for Ca²⁺-induced activation of human PAD4. *Nat Struct Mol Biol* **11**: 777–783.
- Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. 2009. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol* **27**: 669–692.
- Bachand F, Lackner DH, Bähler J, Silver PA. 2006. Autoregulation of ribosome biosynthesis by a translational response in fission yeast. *Mol Cell Biol* **26**: 1731–1742.
- Back J, Allman D, Chan S, Kastner P. 2005. Visualizing PU.1 activity during hematopoiesis. *Exp Hematol* **33**: 395–402.
- Barreda DR, Belosevic M. 2001. Transcriptional regulation of hemopoiesis. *Dev Comp Immunol* **25**: 763–789.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh T-Y, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. 2007. High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**: 823–837.

- Barton LM, Gottgens B, Green AR. 1999. The stem cell leukaemia (SCL) gene: a critical regulator of haemopoietic and vascular development. *Int J Biochem Cell Biol* **31**: 1193–1207.
- Bauer U-M, Daujat S, Nielsen SJ, Nightingale K, Kouzarides T. 2002. Methylation at arginine 17 of histone H3 is linked to gene activation. *EMBO Rep* **3**: 39–44.
- Bedford MT. 2007. Arginine methylation at a glance. *J Cell Sci* **120**: 4243–4246.
- Bedford MT, Richard S. 2005. Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol Cell* **18**: 263–272.
- Begley CG, Aplan PD, Denning SM, Haynes BF, Waldmann TA, Kirsch IR. 1989. The gene SCL is expressed during early hematopoiesis and encodes a differentiation-related DNA-binding motif. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 10128–10132.
- Bell AC, West AG, Felsenfeld G. 1999. The Protein CTCF Is Required for the Enhancer Blocking Activity of Vertebrate Insulators. *Cell* **98**: 387–396.
- Bernard O, Lecointe N, Jonveaux P, Souyri M, Mauchauffé M, Berger R, Larsen CJ, Mathieu-Mahul D. 1991. Two site-specific deletions and t(1;14) translocation restricted to human T-cell acute leukemias disrupt the 5' part of the tal-1 gene. *Oncogene* **6**: 1477–1488.
- Betz UA, Bloch W, van den Broek M, Yoshida K, Taga T, Kishimoto T, Addicks K, Rajewsky K, Müller W. 1998. Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic, and pulmonary defects. *J Exp Med* **188**: 1955–1965.
- Bijur GN, Jope RS. 2003. Glycogen synthase kinase-3 beta is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuroreport* **14**: 2415–2419.
- Bloor AJC, Sanchez M-J, Green AR, Göttgens B. 2002. The role of the stem cell leukemia (SCL) gene in hematopoietic and endothelial lineage specification. *J Hematother Stem Cell Res* **11**: 195–206.
- Boehm T, Feroni L, Kaneko Y, Perutz MF, Rabbitts TH. 1991. The rhombotin family of cysteine-rich LIM-domain oncogenes: distinct members are involved in T-cell translocations to human chromosomes 11p15 and 11p13. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 4367–4371.
- Bohmann D. 1990. Transcription factor phosphorylation: a link between signal transduction and the regulation of gene expression. *Cancer Cells* **2**: 337–344.
- Bowman T, Garcia R, Turkson J, Jove R. 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene* **19**: 2474–2488.
- Brady G, Billia F, Knox J, Hoang T, Kirsch IR, Voura EB, Hawley RG, Cumming R, Buchwald M, Siminovitch K. 1995. Analysis of gene expression in a complex differentiation hierarchy by global amplification of cDNA from single cells. *Curr Biol* **5**: 909–922.

- Brown L, Cheng JT, Chen Q, Siciliano MJ, Crist W, Buchanan G, Baer R. 1990. Site-specific recombination of the tal-1 gene is a common occurrence in human T cell leukemia. *EMBO J* **9**: 3343–3351.
- Brunet de la Grange P, Armstrong F, Duval V, Rouyez M-C, Goardon N, Romeo P-H, Pflumio F. 2006. Low SCL/TAL1 expression reveals its major role in adult hematopoietic myeloid progenitors and stem cells. *Blood* **108**: 2998–3004.
- Bryder D, Rossi DJ, Weissman IL. 2006. Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am J Pathol* **169**: 338–346.
- Burke LJ, Baniahmad A. 2000. Co-repressors 2000. *FASEB J* **14**: 1876–1888.
- Butcher DT, Mancini-DiNardo DN, Archer TK, Rodenhiser DI. 2004. DNA binding sites for putative methylation boundaries in the unmethylated region of the BRCA1 promoter. *Int J Cancer* **111**: 669–678.
- Cai Y, Xu Z, Xie J, Ham A-JL, Koury MJ, Hiebert SW, Brandt SJ. 2009. Eto2/MTG16 and MTGR1 are heteromeric corepressors of the TAL1/SCL transcription factor in murine erythroid progenitors. *Biochem Biophys Res Commun* **390**: 295–301.
- Calkhoven CF, Muller C, Martin R, Krosi G, Pietsch H, Hoang T, Leutz A. 2003. Translational control of SCL-isoform expression in hematopoietic lineage choice. *Genes Dev* **17**: 959–964.
- Cantor AB, Orkin SH. 2001. Hematopoietic development: a balancing act. *Curr Opin Genet Dev* **11**: 513–519.
- Cantor AB, Orkin SH. 2002. Transcriptional regulation of erythropoiesis: an affair involving multiple partners. *Oncogene* **21**: 3368–3376.
- Catlett-Falcone R, Dalton WS, Jove R. 1999. STAT proteins as novel targets for cancer therapy. *Current Opinion in Oncology* **11**: 490.
- Ceredig R, Rolink AG, Brown G. 2009. Models of haematopoiesis: seeing the wood for the trees. *Nat Rev Immunol* **9**: 293–300.
- Chang X, Han J. 2006. Expression of peptidylarginine deiminase type 4 (PAD4) in various tumors. *Mol Carcinog* **45**: 183–196.
- Chang X, Han J, Pang L, Zhao Y, Yang Y, Shen Z. 2009. Increased PADI4 expression in blood and tissues of patients with malignant tumors. *BMC Cancer* **9**: 40.
- Chang X, Yamada R, Sawada T, Suzuki A, Kochi Y, Yamamoto K. 2005. The inhibition of antithrombin by peptidylarginine deiminase 4 may contribute to pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* **44**: 293–298.
- Chavanas S, Méchin M-C, Takahara H, Kawada A, Nachat R, Serre G, Simon M. 2004. Comparative analysis of the mouse and human peptidylarginine deiminase gene clusters reveals highly conserved non-coding segments and a new human gene, PADI6. *Gene* **330**: 19–27.

- Chen D, Huang SM, Stallcup MR. 2000. Synergistic, p160 coactivator-dependent enhancement of estrogen receptor function by CARM1 and p300. *J Biol Chem* **275**: 40810–40816.
- Cheng JT, Cobb MH, Baer R. 1993. Phosphorylation of the TAL1 oncoprotein by the extracellular-signal-regulated protein kinase ERK1. *Mol Cell Biol* **13**: 801–808.
- Cheung P, Tanner KG, Cheung WL, Sassone-Corsi P, Denu JM, Allis CD. 2000. Synergistic coupling of histone H3 phosphorylation and acetylation in response to epidermal growth factor stimulation. *Mol Cell* **5**: 905–915.
- Christophorou MA, Castelo-Branco G, Halley-Stott RP, Oliveira CS, Loos R, Radziskeuskaya A, Mowen KA, Bertone P, Silva JCR, Zernicka-Goetz M, *et al.*, 2014. Citrullination regulates pluripotency and histone H1 binding to chromatin. *Nature*.
- Cross MA, Heyworth CM, Murrell AM, Bockamp EO, Dexter TM, Green AR. 1994. Expression of lineage restricted transcription factors precedes lineage specific differentiation in a multipotent haemopoietic progenitor cell line. *Oncogene* **9**: 3013–3016.
- Cuthbert GL, Daujat S, Snowden AW, Erdjument-Bromage H, Hagiwara T, Yamada M, Schneider R, Gregory PD, Tempst P, Bannister AJ, *et al.*, 2004. Histone deimination antagonizes arginine methylation. *Cell* **118**: 545–553.
- D'Alo F. 2003. The amino terminal and E2F interaction domains are critical for C/EBP-mediated induction of granulopoietic development of hematopoietic cells. *Blood* **102**: 3163–3171.
- D'Andrea AD. 1994. Hematopoietic growth factors and the regulation of differentiative decisions. *Curr Opin Cell Biol* **6**: 804–808.
- D'Souza SL, Elefanty AG, Keller G. 2005. SCL/Tal-1 is essential for hematopoietic commitment of the hemangioblast but not for its development. *Blood* **105**: 3862–3870.
- Dai X-M, Ryan GR, Hapel AJ, Dominguez MG, Russell RG, Kapp S, Sylvestre V, Stanley ER. 2002. Targeted disruption of the mouse colony-stimulating factor 1 receptor gene results in osteopetrosis, mononuclear phagocyte deficiency, increased primitive progenitor cell frequencies, and reproductive defects. *Blood* **99**: 111–120.
- Dakic A, Metcalf D, Di Rago L, Mifsud S, Wu L, Nutt SL. 2005. PU.1 regulates the commitment of adult hematopoietic progenitors and restricts granulopoiesis. *J Exp Med* **201**: 1487–1502.
- Daujat S, Bauer U-M, Shah V, Turner B, Berger S, Kouzarides T. 2002. Crosstalk between CARM1 methylation and CBP acetylation on histone H3. *Curr Biol* **12**: 2090–2097.
- Dávalos-Salas M, Furlan-Magaril M, González-Buendía E, Valdes-Quezada C, Ayala-Ortega E, Recillas-Targa F. 2011. Gain of DNA methylation is enhanced in the absence of CTCF at the human retinoblastoma gene promoter. *BMC Cancer* **11**: 232.

- Delassus S, Titley I, Enver T. 1999. Functional and molecular analysis of hematopoietic progenitors derived from the aorta-gonad-mesonephros region of the mouse embryo. *Blood* **94**: 1495–1503.
- Demaison C, Parsley K, Brouns G, Scherr M, Battmer K, Kinnon C, Grez M, Thrasher AJ. 2002. High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency [correction of imunodeficiency] virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* **13**: 803–813.
- Denis H, Deplus R, Putmans P, Yamada M, Métivier R, Fuks F. 2009. Functional connection between deimination and deacetylation of histones. *Mol Cell Biol* **29**: 4982–4993.
- Deplus R, Denis H, Putmans P, Calonne E, Fourrez M, Yamamoto K, Suzuki A, Fuks F. 2014. Citrullination of DNMT3A by PADI4 regulates its stability and controls DNA methylation. gku522.
- Dey S, Curtis DJ, Jane SM, Brandt SJ. 2010. The TAL1/SCL transcription factor regulates cell cycle progression and proliferation in differentiating murine bone marrow monocyte precursors. *Mol Cell Biol* **30**: 2181–2192.
- Di Lorenzo A, Bedford MT. 2011. Histone arginine methylation. *FEBS Lett* **585**: 2024–2031.
- Docquier F, Farrar D, D'Arcy V, Chernukhin I, Robinson AF, Loukinov D, Vatolin S, Pack S, Mackay A, Harris RA, *et al.*, 2005. Heightened expression of CTCF in breast cancer cells is associated with resistance to apoptosis. *Cancer Research* **65**: 5112–5122.
- Dong WF, Billia F, Atkins HL, Iscove NN, Minden MD. 1996. Expression of rhombotin 2 in normal and leukaemic haemopoietic cells. *Br J Haematol* **93**: 280–286.
- Edmondson DG, Davie JK, Zhou J, Mirnikjoo B, Tatchell K, Dent SYR. 2002. Site-specific loss of acetylation upon phosphorylation of histone H3. *J Biol Chem* **277**: 29496–29502.
- Elefanty AG, Begley CG, Metcalf D, Barnett L, Köntgen F, Robb L. 1998. Characterization of hematopoietic progenitor cells that express the transcription factor SCL, using a lacZ “knock-in” strategy. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 11897–11902.
- Endoh M, Ogawa M, Orkin S, Nishikawa S-I. 2002. SCL/tal-1-dependent process determines a competence to select the definitive hematopoietic lineage prior to endothelial differentiation. *EMBO J* **21**: 6700–6708.
- Farrell CM, West AG, Felsenfeld G. 2002. Conserved CTCF insulator elements flank the mouse and human beta-globin loci. *Mol Cell Biol* **22**: 3820–3831.
- Felsenfeld G, Groudine M. 2003. Controlling the double helix. *Nature* **421**: 448–453.
- Finger LR, Kagan J, Christopher G, Kurtzberg J, Hershfield MS, Nowell PC, Croce CM. 1989. Involvement of the TCL5 gene on human chromosome 1 in T-cell leukemia and melanoma. **86**: 5039–5043.

- Fogg DK, Sibon C, Miled C, Jung S, Aucouturier P, Littman DR, Cumano A, Geissmann F. 2006. A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* **311**: 83–87.
- Fraser P, Bickmore W. 2007. Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. *Nature* **447**: 413–417.
- Garcia R, Jove R. 1998. Activation of STAT Transcription Factors in Oncogenic Tyrosine Kinase Signaling. *J Biomed Sci* **5**: 79–85.
- Gerasimova TI, Corces VG. 1996. Boundary and insulator elements in chromosomes. *Curr Opin Genet Dev* **6**: 185–192.
- Gewirtz AM, Calabretta B. 1988. A c-myb antisense oligodeoxynucleotide inhibits normal human hematopoiesis in vitro. *Science* **242**: 1303–1306.
- Goardon N, Lambert JA, Rodriguez P, Nissaire P, Herblot S, Thibault P, Dumenil D, Strouboulis J, Romeo P-H, Hoang T. 2006. ETO2 coordinates cellular proliferation and differentiation during erythropoiesis. *EMBO J* **25**: 357–366.
- Goldfarb AN, Goueli S, Mickelson D, Greenberg JM. 1992. T-cell acute lymphoblastic leukemia--the associated gene SCL/tal codes for a 42-Kd nuclear phosphoprotein. *Blood* **80**: 2858–2866.
- Green AR, Lints T, Visvader J, Harvey R, Begley CG. 1992. SCL is coexpressed with GATA-1 in hemopoietic cells but is also expressed in developing brain. *Oncogene* **7**: 653–660.
- Gu ZJ, Wijdenes J, Zhang XG, Hallet MM, Clement C, Klein B. 1996. Anti-gp130 transducer monoclonal antibodies specifically inhibiting ciliary neurotrophic factor, interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor or oncostatin M. *J Immunol Methods* **190**: 21–27.
- Guccione E, Bassi C, Casadio F, Martinato F, Cesaroni M, Schuchlantz H, Lüscher B, Amati B. 2007. Methylation of histone H3R2 by PRMT6 and H3K4 by an MLL complex are mutually exclusive. *Nature* **449**: 933–937.
- Guerrin M, Ishigami A, Méchin M-C, Nachat R, Valmary S, Sebbag M, Simon M, Senshu T, Serre G. 2003. cDNA cloning, gene organization and expression analysis of human peptidylarginine deiminase type I. *Biochem J* **370**: 167–174.
- Guo Q, Bedford MT, Fast W. 2011. Discovery of peptidylarginine deiminase-4 substrates by protein array: antagonistic citrullination and methylation of human ribosomal protein S2. *Mol Biosyst* **7**: 2286–2295.
- Guo Q, Fast W. 2011. Citrullination of inhibitor of growth 4 (ING4) by peptidylarginine deminase 4 (PAD4) disrupts the interaction between ING4 and p53. *J Biol Chem* **286**: 17069–17078.
- Hagiwara T, Hidaka Y, Yamada M. 2005. Deimination of histone H2A and H4 at arginine 3 in HL-60 granulocytes. *Biochemistry* **44**: 5827–5834.

- Hagiwara T, Nakashima K, Hirano H, Senshu T, Yamada M. 2002. Deimination of arginine residues in nucleophosmin/B23 and histones in HL-60 granulocytes. *Biochem Biophys Res Commun* **290**: 979–983.
- Hall MA, Slater NJ, Begley CG, Salmon JM, Van Stekelenburg LJ, McCormack MP, Jane SM, Curtis DJ. 2005. Functional but abnormal adult erythropoiesis in the absence of the stem cell leukemia gene. *Mol Cell Biol* **25**: 6355–6362.
- Hark AT, Schoenherr CJ, Katz DJ, Ingram RS, Levorse JM, Tilghman SM. 2000. CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* **405**: 486–489.
- Heath H, Ribeiro de Almeida C, Sleutels F, Dingjan G, van de Nobelen S, Jonkers I, Ling K-W, Gribnau J, Renkawitz R, Grosveld F, *et al.*, 2008. CTCF regulates cell cycle progression of alphabeta T cells in the thymus. *EMBO J* **27**: 2839–2850.
- Herblot S, Steff AM, Hugo P, Aplan PD, Hoang T. 2000. SCL and LMO1 alter thymocyte differentiation: inhibition of E2A-HEB function and pre-T alpha chain expression. *Nat Immunol* **1**: 138–144.
- Herglotz J, Kuvardina ON, Kolodziej S, Kumar A, Hussong H, Grez M, Lausen J. 2012. Histone arginine methylation keeps RUNX1 target genes in an intermediate state. 1–11.
- Herold M, Bartkuhn M, Renkawitz R. 2012. CTCF: insights into insulator function during development. *Development* **139**: 1045–1057.
- Hingorani K, Szebeni A, Olson MO. 2000. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem* **275**: 24451–24457.
- Hirabayashi Y, Gotoh Y. 2010. Epigenetic control of neural precursor cell fate during development. 1–12.
- Holliday R, Pugh JE. 1975. DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**: 226–232.
- Horiuchi S, Koyanagi Y, Zhou Y, Miyamoto H, Tanaka Y, Waki M, Matsumoto A, Yamamoto M, Yamamoto N. 1994. Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. *Eur J Immunol* **24**: 1945–1948.
- Houssiau FA, Devogelaer JP, Van Damme J, de Deuxchaisnes CN, Van Snick J. 1988. Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. *Arthritis Rheum* **31**: 784–788.
- Hsu HL, Cheng JT, Chen Q, Baer R. 1991. Enhancer-binding activity of the tal-1 oncoprotein in association with the E47/E12 helix-loop-helix proteins. *Mol Cell Biol* **11**: 3037–3042.
- Hsu HL, Wadman I, Baer R. 1994a. Formation of in vivo complexes between the TAL1 and E2A polypeptides of leukemic T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 3181–3185.

- Hsu HL, Wadman I, Tsan JT, Baer R. 1994b. Positive and negative transcriptional control by the TAL1 helix-loop-helix protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5947–5951.
- Hsu JY, Sun ZW, Li X, Reuben M, Tatchell K, Bishop DK, Grushcow JM, Brame CJ, Caldwell JA, Hunt DF, *et al.*, 2000. Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by Ipl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes. *Cell* **102**: 279–291.
- Hu X, Li X, Valverde K, Fu X, Noguchi C, Qiu Y, Huang S. 2009. LSD1-mediated epigenetic modification is required for TAL1 function and hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 10141–10146.
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. 2009. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* **37**: 1–13.
- Huang S, Brandt SJ. 2000. mSin3A regulates murine erythroleukemia cell differentiation through association with the TAL1 (or SCL) transcription factor. *Mol Cell Biol* **20**: 2248–2259.
- Huang S, Qiu Y, Shi Y, Xu Z, Brandt SJ. 2000. P/CAF-mediated acetylation regulates the function of the basic helix-loop-helix transcription factor TAL1/SCL. *EMBO J* **19**: 6792–6803.
- Huang S, Qiu Y, Stein RW, Brandt SJ. 1999. p300 functions as a transcriptional coactivator for the TAL1/SCL oncoprotein. *Oncogene* **18**: 4958–4967.
- Hulsen T, de Vlieg J, Alkema W. 2008. BioVenn - a web application for the comparison and visualization of biological lists using area-proportional Venn diagrams. *BMC Genomics* **9**: 488.
- Hunter T, Karin M. 1992. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* **70**: 375–387.
- Hyllus D, Stein C, Schnabel K, Schiltz E, Imhof A, Dou Y, Hsieh J, Bauer U-M. 2007. PRMT6-mediated methylation of R2 in histone H3 antagonizes H3 K4 trimethylation. *Genes Dev* **21**: 3369–3380.
- Ishigami A, Ohsawa T, Asaga H, Akiyama K, Kuramoto M, Maruyama N. 2002. Human peptidylarginine deiminase type II: molecular cloning, gene organization, and expression in human skin. *Arch Biochem Biophys* **407**: 25–31.
- Iwasaki H, Akashi K. 2007. Myeloid lineage commitment from the hematopoietic stem cell. *Immunity* **26**: 726–740.
- Jaatinen T, Laine J. 2007. Isolation of mononuclear cells from human cord blood by Ficoll-Paque density gradient. *Curr Protoc Stem Cell Biol* **Chapter 2**: Unit 2A.1.
- Kanno T, Kawada A, Yamanouchi J, Yosida-Noro C, Yoshiki A, Shiraiwa M, Kusakabe M, Manabe M, Tezuka T, Takahara H. 2000. Human peptidylarginine deiminase type III: molecular cloning and nucleotide sequence of the cDNA, properties of the recombinant enzyme, and immunohistochemical localization in human skin. *J Invest Dermatol* **115**: 813–823.

- Karin M. 1992. Signal transduction from cell surface to nucleus in development and disease. *FASEB J* **6**: 2581–2590.
- Kassouf MT, Hughes JR, Taylor S, McGowan SJ, Soneji S, Green AL, Vyas P, Porcher C. 2010. Genome-wide identification of TAL1's functional targets: insights into its mechanisms of action in primary erythroid cells. *Genome Res* **20**: 1064–1083.
- Kearney PL, Bhatia M, Jones NG, Yuan L, Glascock MC, Catchings KL, Yamada M, Thompson PR. 2005. Kinetic characterization of protein arginine deiminase 4: a transcriptional corepressor implicated in the onset and progression of rheumatoid arthritis. *Biochemistry* **44**: 10570–10582.
- Klose RJ, Zhang Y. 2007. Regulation of histone methylation by demethylination and demethylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 307–318.
- Kopf M, Baumann H, Freer G, Freudenberg M, Lamers M, Kishimoto T, Zinkernagel R, Bluethmann H, Köhler G. 1994. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature* **368**: 339–342.
- Kouzarides T. 2007. Chromatin modifications and their function. *Cell* **128**: 693–705.
- Krosi G, He G, Lefrancois M, Charron F, Roméo PH, Jolicoeur P, Kirsch IR, Nemer M, Hoang T. 1998. Transcription factor SCL is required for c-kit expression and c-Kit function in hemopoietic cells. *J Exp Med* **188**: 439–450.
- Kusy S, Gerby B, Goardon N, Gault N, Ferri F, Gérard D, Armstrong F, Ballerini P, Cayuela J-M, Baruchel A, *et al.*, 2010. NKX3.1 is a direct TAL1 target gene that mediates proliferation of TAL1-expressing human T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* **207**: 2141–2156.
- Lacombe J, Krosi G, Tremblay M, Gerby B, Martin R, Aplan PD, Lemieux S, Hoang T. 2013. Genetic interaction between Kit and Scl. *Blood* **122**: 1150–1161.
- Lahlil R, Lécuyer E, Herblot S, Hoang T. 2004. SCL assembles a multifactorial complex that determines glycophorin A expression. *Mol Cell Biol* **24**: 1439–1452.
- Lanctôt C, Cheutin T, Cremer M, Cavalli G, Cremer T. 2007. Dynamic genome architecture in the nuclear space: regulation of gene expression in three dimensions. *Nat Rev Genet* **8**: 104–115.
- Larson RC, Lavenir I, Larson TA, Baer R, Warren AJ, Wadman I, Nottage K, Rabbitts TH. 1996. Protein dimerization between Lmo2 (Rbtn2) and Tal1 alters thymocyte development and potentiates T cell tumorigenesis in transgenic mice. *EMBO J* **15**: 1021–1027.
- Lausen J, Pless O, Leonard F, Kuvardina ON, Koch B, Leutz A. 2010. Targets of the Tal1 transcription factor in erythrocytes: E2 ubiquitin conjugase regulation by Tal1. *J Biol Chem* **285**: 5338–5346.
- Law JA, Jacobsen SE. 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* **11**: 204–220.

- Längst G, Becker PB. 2004. Nucleosome remodeling: one mechanism, many phenomena? *Biochim Biophys Acta* **1677**: 58–63.
- Lee DY, Teyssier C, Strahl BD, Stallcup MR. 2005a. Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr Rev* **26**: 147–170.
- Lee Y-H, Coonrod SA, Kraus WL, Jelinek MA, Stallcup MR. 2005b. Regulation of coactivator complex assembly and function by protein arginine methylation and demethylination. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 3611–3616.
- Lécuyer E, Herblot S, Saint-Denis M, Martin R, Begley CG, Porcher C, Orkin SH, Hoang T. 2002. The SCL complex regulates c-kit expression in hematopoietic cells through functional interaction with Sp1. *Blood* **100**: 2430–2440.
- Li P, Wang D, Yao H, Doret P, Hao G, Shen Q, Qiu H, Zhang X, Wang Y, Chen G. 2010. Coordination of PAD4 and HDAC2 in the regulation of p53-target gene expression. *Oncogene* **29**: 3153–3162.
- Li P, Yao H, Zhang Z, Li M, Luo Y, Thompson PR, Gilmour DS, Wang Y. 2008. Regulation of p53 target gene expression by peptidylarginine deiminase 4. *Mol Cell Biol* **28**: 4745–4758.
- Li Y, Deng C, Hu X, Patel B, Fu X, Qiu Y, Brand M, Zhao K, Huang S. 2012. Dynamic interaction between TAL1 oncoprotein and LSD1 regulates TAL1 function in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene* **31**: 5007–5018.
- Lioté F, Boval-Boizard B, Weill D, Kuntz D, Wautier JL. 1996. Blood monocyte activation in rheumatoid arthritis: increased monocyte adhesiveness, integrin expression, and cytokine release. *Clin Exp Immunol* **106**: 13–19.
- Liu G-Y, Liao Y-F, Chang W-H, Liu C-C, Hsieh M-C, Hsu P-C, Tsay GJ, Hung H-C. 2006. Overexpression of peptidylarginine deiminase IV features in apoptosis of haematopoietic cells. *Apoptosis* **11**: 183–196.
- Liu Q. 2014. *Post-Translational Modification on Arginine and Function of CCAAT/Enhancer Binding Protein α* .
- Liu Y-L, Chiang Y-H, Liu G-Y, Hung H-C. 2011. Functional role of dimerization of human peptidylarginine deiminase 4 (PAD4). *PLoS ONE* **6**: e21314.
- Liu Q. 2014. *Post-Translational Modification on Arginine and Function of CCAAT/Enhancer Binding Protein α* , Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin
- Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**: 402–408.
- Love PE, Warzecha C, Li L. 2014. Ldb1 complexes: the new master regulators of erythroid gene transcription. *Trends Genet* **30**: 1–9.

- Luger K. 2006. Dynamic nucleosomes. *Chromosome Res* **14**: 5–16.
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. 1997a. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251–260.
- Luger K, Rechsteiner TJ, Flaus AJ, Waye MM, Richmond TJ. 1997b. Characterization of nucleosome core particles containing histone proteins made in bacteria. *J Mol Biol* **272**: 301–311.
- Luger K, Richmond TJ. 1998. The histone tails of the nucleosome. *Curr Opin Genet Dev* **8**: 140–146.
- Luo Y, Arita K, Bhatia M, Knuckley B, Lee Y-H, Stallcup MR, Sato M, Thompson PR. 2006. Inhibitors and inactivators of protein arginine deiminase 4: functional and structural characterization. *Biochemistry* **45**: 11727–11736.
- Lust JA, Donovan KA, Kline MP, Greipp PR, Kyle RA, Maihle NJ. 1992. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine* **4**: 96–100.
- Mahajan MC, Karmakar S, Newburger PE, Krause DS, Weissman SM. 2009. Dynamics of alpha-globin locus chromatin structure and gene expression during erythroid differentiation of human CD34(+) cells in culture. *Exp Hematol* **37**: 1143–1156.e3.
- Mak KS, Funnell APW, Pearson RCM, Crossley M. 2011. PU.1 and Haematopoietic Cell Fate: Dosage Matters. *International Journal of Cell Biology* **2011**: 1–6.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, *et al.*, 1995. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* **83**: 835–839.
- Mastrorardi FG, Wood DD, Mei J, Raijmakers R, Tseveleki V, Dosch H-M, Probert L, Casaccia-Bonnel P, Moscarello MA. 2006. Increased citrullination of histone H3 in multiple sclerosis brain and animal models of demyelination: a role for tumor necrosis factor-induced peptidylarginine deiminase 4 translocation. *J Neurosci* **26**: 11387–11396.
- Matthews V, Schuster B, Schütze S, Bussmeyer I, Ludwig A, Hundhausen C, Sadowski T, Saftig P, Hartmann D, Kallen K-J, *et al.*, 2003. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *J Biol Chem* **278**: 38829–38839.
- Meares GP, Jope RS. 2007. Resolution of the nuclear localization mechanism of glycogen synthase kinase-3: functional effects in apoptosis. *J Biol Chem* **282**: 16989–17001.
- Meissner A. 2010. Epigenetic modifications in pluripotent and differentiated cells. *Nat Biotechnol* **28**: 1079–1088.
- Métivier R, Penot G, Hübner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F. 2003. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell* **115**: 751–763.

- Mikkola HKA, Orkin SH. 2006. The journey of developing hematopoietic stem cells. *Development* **133**: 3733–3744.
- Morrison SJ, Wandycz AM, Hemmati HD, Wright DE, Weissman IL. 1997. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. *Development* **124**: 1929–1939.
- Morrison SJ, Weissman IL. 1994. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity* **1**: 661–673.
- Moscarello MA, Mastronardi FG, Wood DD. 2007. The role of citrullinated proteins suggests a novel mechanism in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurochem Res* **32**: 251–256.
- Mouthon MA, Bernard O, Mitjavila MT, Roméo PH, Vainchenker W, Mathieu-Mahul D. 1993. Expression of tal-1 and GATA-binding proteins during human hematopoiesis. *Blood* **81**: 647–655.
- Mui ALF. 1999. The role of STATs in proliferation, differentiation, and apoptosis. *Cell Mol Life Sci* **55**: 1547–1558.
- MURRAY K. 1964. THE OCCURRENCE OF EPSILON-N-METHYL LYSINE IN HISTONES. *Biochemistry* **3**: 10–15.
- Murrell A, Rakyan VK, Beck S. 2005. From genome to epigenome. *Hum Mol Genet* **14 Spec No 1**: R3–R10.
- Nagata S, Senshu T. 1990. Peptidylarginine deiminase in rat and mouse hemopoietic cells. *Experientia* **46**: 72–74.
- Najbauer J, Johnson BA, Young AL, Aswad DW. 1993. Peptides with sequences similar to glycine, arginine-rich motifs in proteins interacting with RNA are efficiently recognized by methyltransferase(s) modifying arginine in numerous proteins. *Journal of Biological Chemistry* **268**: 10501–10509.
- Nakashima K, Arai S, Suzuki A, Nariai Y, Urano T, Nakayama M, Ohara O, Yamamura K-I, Yamamoto K, Miyazaki T. 2013. PAD4 regulates proliferation of multipotent haematopoietic cells by controlling c-myc expression. *Nat Commun* **4**: 1836.
- Nakashima K, Arai S, Suzuki A, Nariai Y, Urano T, Nakayama M, Ohara O, Yamamura K-I, Yamamoto K, Miyazaki T. 1AD. PAD4 regulates proliferation of multipotent haematopoietic cells by controlling c-myc expression. *Nat Commun* **4**: 1836–8.
- Nakashima K, Hagiwara T, Ishigami A, Nagata S, Asaga H, Kuramoto M, Senshu T, Yamada M. 1999. Molecular characterization of peptidylarginine deiminase in HL-60 cells induced by retinoic acid and 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3). *J Biol Chem* **274**: 27786–27792.
- Nakashima K, Hagiwara T, Yamada M. 2002. Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *J Biol Chem* **277**: 49562–49568.

- Nakayama J, Rice JC, Strahl BD, Allis CD, Grewal SI. 2001. Role of histone H3 lysine 9 methylation in epigenetic control of heterochromatin assembly. *Science* **292**: 110–113.
- Nam C-H, Rabbitts TH. 2006. The role of LMO2 in development and in T cell leukemia after chromosomal translocation or retroviral insertion. *Mol Ther* **13**: 15–25.
- Nutt SL. 2005. Dynamic regulation of PU.1 expression in multipotent hematopoietic progenitors. *J Exp Med* **201**: 221–231.
- Okuda M, Horn HF, Tarapore P, Tokuyama Y, Smulian AG, Chan PK, Knudsen ES, Hofmann IA, Snyder JD, Bove KE, *et al.*, 2000. Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication. *Cell* **103**: 127–140.
- Omari El K, Hoosdally SJ, Tuladhar K, Karia D, Hall-Ponsel e E, Platonova O, Vyas P, Patient R, Porcher C, Mancini EJ. 2013. Structural basis for LMO2-driven recruitment of the SCL:E47bHLH heterodimer to hematopoietic-specific transcriptional targets. *Cell Rep* **4**: 135–147.
- Ong S-E, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen DB, Steen H, Pandey A, Mann M. 2002. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* **1**: 376–386.
- Ong S-E, Mann M. 2006. A practical recipe for stable isotope labeling by amino acids in cell culture (SILAC). *Nat Protoc* **1**: 2650–2660.
- Orkin SH, Zon LI. 2002. Hematopoiesis and stem cells: plasticity versus developmental heterogeneity. *Nat Immunol* **3**: 323–328.
- Osada H, Grutz G, Axelson H, Forster A, Rabbitts TH. 1995. Association of erythroid transcription factors: complexes involving the LIM protein RBTN2 and the zinc-finger protein GATA1. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9585–9589.
- Ouboussad L, Kreuz S, Lefevre PF. 2013. CTCF depletion alters chromatin structure and transcription of myeloid-specific factors. *J Mol Cell Biol* **5**: 308–322.
- Palamarchuk A, Efanov A, Maximov V, Aqeilan RI, Croce CM, Pekarsky Y. 2005. Akt phosphorylates Tal1 oncoprotein and inhibits its repressor activity. *Cancer Research* **65**: 4515–4519.
- Palii CG, Perez-Iratxeta C, Yao Z, Cao Y, Dai F, Davison J, Atkins H, Allan D, Dilworth FJ, Gentleman R, *et al.*, 2011. Differential genomic targeting of the transcription factor TAL1 in alternate haematopoietic lineages. *EMBO J* **30**: 494–509.
- Palomero T, Odom DT, O'Neil J, Ferrando AA, Margolin A, Neuberg DS, Winter SS, Larson RS, Li W, Liu XS, *et al.*, 2006. Transcriptional regulatory networks downstream of TAL1/SCL in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* **108**: 986–992.
- Passegu e E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. 2003. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA* **100 Suppl 1**: 11842–11849.

- Patel B, Kang Y, Cui K, Litt M, Riberio MSJ, Deng C, Salz T, Casada S, Fu X, Qiu Y, *et al.*, 2013. Aberrant TAL1 activation is mediated by an interchromosomal interaction in human T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*.
- Peters M, Müller AM, Rose-John S. 1998. Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis. *Blood* **92**: 3495–3504.
- Phillips JE, Corces VG. 2009. CTCF: master weaver of the genome. *Cell* **137**: 1194–1211.
- Porcher C, Liao EC, Fujiwara Y, Zon LI, Orkin SH. 1999. Specification of hematopoietic and vascular development by the bHLH transcription factor SCL without direct DNA binding. *Development* **126**: 4603–4615.
- Porcher C, Swat W, Rockwell K, Fujiwara Y, Alt FW, Orkin SH. 1996. The T cell leukemia oncoprotein SCL/tal-1 is essential for development of all hematopoietic lineages. *Cell* **86**: 47–57.
- Prasad KS, Brandt SJ. 1997. Target-dependent effect of phosphorylation on the DNA binding activity of the TAL1/SCL oncoprotein. *J Biol Chem* **272**: 11457–11462.
- Radomska HS, Huettner CS, Zhang P, Cheng T, Scadden DT, Tenen DG. 1998. CCAAT/enhancer binding protein alpha is a regulatory switch sufficient for induction of granulocytic development from bipotential myeloid progenitors. *Mol Cell Biol* **18**: 4301–4314.
- Raijmakers R, Zendman AJW, Egberts WV, Vossenaar ER, Raats J, Soede-Huijbregts C, Rutjes FPJT, van Veelen PA, Drijfhout JW, Pruijn GJM. 2007. Methylation of arginine residues interferes with citrullination by peptidylarginine deiminases in vitro. *J Mol Biol* **367**: 1118–1129.
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, *et al.*, 2000. Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593–599.
- Reddy EP, Korapati A, Chaturvedi P, Rane S. 2000. IL-3 signaling and the role of Src kinases, JAKs and STATs: a covert liaison unveiled. *Oncogene* **19**: 2532–2547.
- Robb L. 2007. Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* **26**: 6715–6723.
- Robb L, Begley CG. 1996. The helix-loop-helix gene SCL: implicated in T-cell acute lymphoblastic leukaemia and in normal haematopoietic development. *Int J Biochem Cell Biol* **28**: 609–618.
- Robb L, Lyons I, Li R, Hartley L, Köntgen F, Harvey RP, Metcalf D, Begley CG. 1995. Absence of yolk sac hematopoiesis from mice with a targeted disruption of the scl gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7075–7079.
- Rose-John S. 2001. Coordination of interleukin-6 biology by membrane bound and soluble receptors. *Adv Exp Med Biol* **495**: 145–151.

- Rose-John S, Heinrich PC. 1994. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* **300 (Pt 2)**: 281–290.
- Rose-John S, Scheller J, Elson G, Jones SA. 2006. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* **80**: 227–236.
- Saito T, Taga T, Miki D, Futatsugi K, Yawata H, Kishimoto T, Yasukawa K. 1993. Preparation of monoclonal antibodies against the IL-6 signal transducer, gp130, that can inhibit IL-6-mediated functions. *J Immunol Methods* **163**: 217–223.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis. 1989. 1.
- Sanchez M, Gottgens B, Sinclair AM, Stanley M, Begley CG, Hunter S, Green AR. 1999. An SCL 3' enhancer targets developing endothelium together with embryonic and adult haematopoietic progenitors. *Development* **126**: 3891–3904.
- Sanda T, Lawton LN, Barrasa MI, Fan ZP, Kohlhammer H, Gutierrez A, Ma W, Tatarek J, Ahn Y, Kelliher MA, *et al.*, 2012. Core transcriptional regulatory circuit controlled by the TAL1 complex in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell* **22**: 209–221.
- Sánchez-García I, Rabbitts TH. 1994. Transcriptional activation by TAL1 and FUS-CHOP proteins expressed in acute malignancies as a result of chromosomal abnormalities. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 7869–7873.
- Schug J. 2008. Using TESS to predict transcription factor binding sites in DNA sequence. *Curr Protoc Bioinformatics* **Chapter 2**: Unit 2.6.
- Schuh AH, Tipping AJ, Clark AJ, Hamlett I, Guyot B, Iborra FJ, Rodriguez P, Strouboulis J, Enver T, Vyas P, *et al.*, 2005. ETO-2 associates with SCL in erythroid cells and megakaryocytes and provides repressor functions in erythropoiesis. *Mol Cell Biol* **25**: 10235–10250.
- Scott LM, Civin CI, Rorth P, Friedman AD. 1992. A novel temporal expression pattern of three C/EBP family members in differentiating myelomonocytic cells. *Blood* **80**: 1725–1735.
- Sharma P, Azebi S, England P, Christensen T, Møller-Larsen A, Petersen T, Batsché E, Muchardt C. 2012. Citrullination of histone H3 interferes with HP1-mediated transcriptional repression. *PLoS Genet* **8**: e1002934.
- Sharpless NE, DePinho RA. 2007. How stem cells age and why this makes us grow old. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 703–713.
- Shivdasani RA, Mayer EL, Orkin SH. 1995. Absence of blood formation in mice lacking the T-cell leukaemia oncoprotein tal-1/SCL. *Nature* **373**: 432–434.
- Shivdasani RA, Orkin SH. 1996. The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* **87**: 4025–4039.

- Shuai K, Liu B. 2003. Regulation of JAK–STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* **3**: 900–911.
- Silver L, Palis J. 1997. Initiation of Murine Embryonic Erythropoiesis: A Spatial Analysis. *Blood* **89**: 1154–1164.
- Slack JL, Causey CP, Thompson PR. 2011a. Protein arginine deiminase 4: a target for an epigenetic cancer therapy. *Cell Mol Life Sci* **68**: 709–720.
- Slack JL, Jones LE, Bhatia MM, Thompson PR. 2011b. Autodeimination of protein arginine deiminase 4 alters protein-protein interactions but not activity. *Biochemistry* **50**: 3997–4010.
- Spivakov M, Fisher AG. 2007. Epigenetic signatures of stem-cell identity. **8**: 263–271.
- Stadler SC, Vincent CT, Fedorov VD, Patsialou A, Cherrington BD, Wakshlag JJ, Mohanan S, Zee BM, Zhang X, Garcia BA, *et al.*, 2013. Dysregulation of PAD4-mediated citrullination of nuclear GSK3 β activates TGF- β signaling and induces epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **110**: 11851–11856.
- Stec M, Weglarczyk K, Baran J, Zuba E, Mytar B, Pryjma J, Zembala M. 2007. Expansion and differentiation of CD14+CD16(-) and CD14+ +CD16+ human monocyte subsets from cord blood CD34+ hematopoietic progenitors. *J Leukoc Biol* **82**: 594–602.
- Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**: 41–45.
- Surani MA, Barton SC, Norris ML. 1984. Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* **308**: 548–550.
- Suzuki A, Yamada R, Chang X, Tokuhira S, Sawada T, Suzuki M, Nagasaki M, Nakayama-Hamada M, Kawaida R, Ono M, *et al.*, 2003. Functional haplotypes of PADI4, encoding citrullinating enzyme peptidylarginine deiminase 4, are associated with rheumatoid arthritis. *Nat Genet* **34**: 395–402.
- Swiercz R, Person MD, Bedford MT. 2005. Ribosomal protein S2 is a substrate for mammalian PRMT3 (protein arginine methyltransferase 3). *Biochem J* **386**: 85–91.
- T J, Allis CD. 2001. Translating the histone code. *Science* **293**: 1074–1080.
- Taga T, Kishimoto T. 1997. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol* **15**: 797–819.
- Tanikawa C, Ueda K, Nakagawa H, Yoshida N, Nakamura Y, Matsuda K. 2009. Regulation of protein Citrullination through p53/PADI4 network in DNA damage response. *Cancer Research* **69**: 8761–8769.
- Tanimoto K, Sugiura A, Omori A, Felsenfeld G, Engel JD, Fukamizu A. 2003. Human beta-globin locus control region HS5 contains CTCF- and developmental stage-dependent enhancer-blocking activity in erythroid cells. *Mol Cell Biol* **23**: 8946–8952.

- Tarcsa E, Marekov LN, Mei G, Melino G, Lee SC, Steinert PM. 1996. Protein unfolding by peptidylarginine deiminase. Substrate specificity and structural relationships of the natural substrates trichohyalin and filaggrin. *J Biol Chem* **271**: 30709–30716.
- Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE. 1997. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood* **90**: 489–519.
- Terme J-M, Lhermitte L, Asnafi V, Jalinot P. 2009. TGF-beta induces degradation of TAL1/SCL by the ubiquitin-proteasome pathway through AKT-mediated phosphorylation. *Blood* **113**: 6695–6698.
- Terme J-M, Wencker M, Favre-Bonvin A, Bex F, Gazzolo L, Duc Dodon M, Jalinot P. 2008. Cross talk between expression of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax transactivator and the oncogenic bHLH transcription factor TAL1. *J Virol* **82**: 7913–7922.
- Tijssen MR, Cvejic A, Joshi A, Hannah RL, Ferreira R, Forrai A, Bellissimo DC, Oram SH, Smethurst PA, Wilson NK, *et al.*, 2011. Genome-wide analysis of simultaneous GATA1/2, RUNX1, FLI1, and SCL binding in megakaryocytes identifies hematopoietic regulators. *Dev Cell* **20**: 597–609.
- Tijssen MR, Ghevaert C. 2013. Transcription factors in late megakaryopoiesis and related platelet disorders. *J Thromb Haemost.*
- Torrano V, Chernukhin I, Docquier F, D'Arcy V, León J, Klenova E, Delgado MD. 2005. CTCF regulates growth and erythroid differentiation of human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* **280**: 28152–28161.
- Tsai S, Bartelmez S, Heyman R, Damm K, Evans R, Collins SJ. 1992. A mutated retinoic acid receptor-alpha exhibiting dominant-negative activity alters the lineage development of a multipotent hematopoietic cell line. *Genes Dev* **6**: 2258–2269.
- Valge-Archer VE, Osada H, Warren AJ, Forster A, Li J, Baer R, Rabbitts TH. 1994. The LIM protein RBTN2 and the basic helix-loop-helix protein TAL1 are present in a complex in erythroid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 8617–8621.
- van Venrooij WJ, Pruijn GJ. 2000. Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* **2**: 249–251.
- Visvader J, Begley CG, Adams JM. 1991. Differential expression of the LYL, SCL and E2A helix-loop-helix genes within the hemopoietic system. *Oncogene* **6**: 187–194.
- Visvader JE, Fujiwara Y, Orkin SH. 2013. Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. 1–7.
- Visvader JE, Fujiwara Y, Orkin SH. 1998. Unsuspected role for the T-cell leukemia protein SCL/tal-1 in vascular development. **12**: 473–479.
- Voronova AF, Lee F. 1994. The E2A and tal-1 helix-loop-helix proteins associate in vivo and are modulated by Id proteins during interleukin 6-induced myeloid differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 5952–5956.

- Vossenaar ER, Radstake TRD, van der Heijden A, van Mansum MAM, Dieteren C, de Rooij D-J, Barrera P, Zendman AJW, van Venrooij WJ. 2004. Expression and activity of citrullinating peptidylarginine deiminase enzymes in monocytes and macrophages. *Ann Rheum Dis* **63**: 373–381.
- Vossenaar ER, Zendman AJW, van Venrooij WJ, Pruijn GJM. 2003. PAD, a growing family of citrullinating enzymes: genes, features and involvement in disease. *Bioessays* **25**: 1106–1118.
- Wadman I, Li J, Bash RO, Forster A, Osada H, Rabbitts TH, Baer R. 1994. Specific in vivo association between the bHLH and LIM proteins implicated in human T cell leukemia. *EMBO J* **13**: 4831–4839.
- Wadman IA, Osada H, Grütz GG, Agulnick AD, Westphal H, Forster A, Rabbitts TH. 1997. The LIM-only protein Lmo2 is a bridging molecule assembling an erythroid, DNA-binding complex which includes the TAL1, E47, GATA-1 and Ldb1/NLI proteins. *EMBO J* **16**: 3145–3157.
- Wang Y, Wysocka J, Sayegh J, Lee Y-H, Perlin JR, Leonelli L, Sonbuchner LS, McDonald CH, Cook RG, Dou Y, *et al.*, 2004. Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylination. *Science* **306**: 279–283.
- Warren AJ, Colledge WH, Carlton MB, Evans MJ, Smith AJ, Rabbitts TH. 1994. The oncogenic cysteine-rich LIM domain protein rbtn2 is essential for erythroid development. *Cell* **78**: 45–57.
- Watanabe K, Akiyama K, Hikichi K, Ohtsuka R, Okuyama A, Senshu T. 1988. Combined biochemical and immunochemical comparison of peptidylarginine deiminases present in various tissues. *Biochim Biophys Acta* **966**: 375–383.
- Weiss MJ, Orkin SH. 1995. Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 9623–9627.
- Widom J. 1989. Toward a unified model of chromatin folding. *Annu Rev Biophys Biophys Chem* **18**: 365–395.
- Wilson A, Murphy MJ, Oskarsson T, Kaloulis K, Bettess MD, Oser GM, Pasche A-C, Knabenhans C, Macdonald HR, Trumpp A. 2004. c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev* **18**: 2747–2763.
- Wilson NK, Foster SD, Wang X, Knezevic K, Schütte J, Kaimakis P, Chilarska PM, Kinston S, Ouwehand WH, Dzierzak E, *et al.*, 2010. Combinatorial transcriptional control in blood stem/progenitor cells: genome-wide analysis of ten major transcriptional regulators. *Cell Stem Cell* **7**: 532–544.
- Wilson NK, Miranda-Saavedra D, Kinston S, Bonadies N, Foster SD, Calero-Nieto F, Dawson MA, Donaldson IJ, Dumon S, Frampton J, *et al.*, 2009. The transcriptional program controlled by the stem cell leukemia gene Scl/Tal1 during early embryonic hematopoietic development. *Blood* **113**: 5456–5465.

- Witcher M, Emerson BM. 2009. Epigenetic silencing of the p16(INK4a) tumor suppressor is associated with loss of CTCF binding and a chromatin boundary. *Mol Cell* **34**: 271–284.
- Wolffe AP. 1999. *Chromatin*. Academic Press
[http://books.google.de/books?id=cY2WLTwo0EIC&pg=PA147&dq=Chromatin+Structure+and+Function+\(1998+inauthor:wolffe\)&hl=&cd=1&source=gbs_api](http://books.google.de/books?id=cY2WLTwo0EIC&pg=PA147&dq=Chromatin+Structure+and+Function+(1998+inauthor:wolffe)&hl=&cd=1&source=gbs_api).
- Wood DD, Ackerley CA, Brand BVD, Zhang L, Rajmakers R, Mastronardi FG, Moscarello MA. 2008. Myelin localization of peptidylarginine deiminases 2 and 4: comparison of PAD2 and PAD4 activities. *Lab Invest* **88**: 354–364.
- Wood DD, Bilbao JM, O'Connors P, Moscarello MA. 1996. Acute multiple sclerosis (Marburg type) is associated with developmentally immature myelin basic protein. *Ann Neurol* **40**: 18–24.
- Wright PW, Bolling LC, Calvert ME, Sarmiento OF, Berkeley EV, Shea MC, Hao Z, Jayes FC, Bush LA, Shetty J, et al., 2003. ePAD, an oocyte and early embryo-abundant peptidylarginine deiminase-like protein that localizes to egg cytoplasmic sheets. *Dev Biol* **256**: 73–88.
- Wysocka J, Allis CD, Coonrod S. 2006. Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Front Biosci* **11**: 344–355.
- Xu Z, Huang S, Chang L-S, Agulnick AD, Brandt SJ. 2003. Identification of a TAL1 target gene reveals a positive role for the LIM domain-binding protein Ldb1 in erythroid gene expression and differentiation. *Mol Cell Biol* **23**: 7585–7599.
- Yamada Y, Warren AJ, Dobson C, Forster A, Pannell R, Rabbitts TH. 1998. The T cell leukemia LIM protein Lmo2 is necessary for adult mouse hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 3890–3895.
- Yoshida K, Taga T, Saito M, Suematsu S, Kumanogoh A, Tanaka T, Fujiwara H, Hirata M, Yamagami T, Nakahata T, et al., 1996. Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 407–411.
- Yu H, Pardoll D, Jove R. 2009. STATs in cancer inflammation and immunity: a leading role for STAT3. *Nat Rev Cancer* **9**: 798–809.
- Zhang P, Zhang X, Iwama A, Yu C, Smith KA, Mueller BU, Narravula S, Torbett BE, Orkin SH, Tenen DG. 2000. PU.1 inhibits GATA-1 function and erythroid differentiation by blocking GATA-1 DNA binding. *Blood* **96**: 2641–2648.
- Zhang X, Gamble MJ, Stadler S, Cherrington BD, Causey CP, Thompson PR, Roberson MS, Kraus WL, Coonrod SA. 2011. Genome-wide analysis reveals PADI4 cooperates with Elk-1 to activate c-Fos expression in breast cancer cells. *PLoS Genet* **7**: e1002112.
- Zhang X, Wang K-S, Wang Z-Q, Xu L-S, Wang Q-W, Chen F, Wei D-Z, Han Z-G. 2005. Nuclear localization signal of ING4 plays a key role in its binding to p53. *Biochem Biophys Res Commun* **331**: 1032–1038.

- Zhou Y, Kurukuti S, Saffrey P, Vukovic M, Michie AM, Strogantsev R, West AG, Vetrie D. 2013. Chromatin looping defines expression of TAL1, its flanking genes and regulation in T-ALL. *Blood*.
2004. Chromatin boundaries and chromatin domains. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **69**: 245–250.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

α	anti
% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar
A	Adenin
Abb.	Abb.
ac	Acetylierung
AMP	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-triphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serumalbumin
Bsp., z.B.	(zum) Beispiel
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
CAM	Chloramphenicol
CLP	Lymphoide Vorläuferzelle (<i>common lymphoid progenitor</i>)
CMP	myeloische Vorläuferzelle (<i>common myeloid progenitor</i>)
d	Tag
Da	Dalton
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's modified medium</i>
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EPO	Erythropoietin
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
fwd	<i>foward</i>
G	Guanin
g	Gramm
G-CSF	<i>granulocyte colony-stimulating factor</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GST	Glutathion S-Transferase
h	Stunde
H1	Histon 1
H2	Histon 2
H3	Histon 3
H3K4	Lysin 4 des Histons 3
H3K9	Lysin 9 des Histons 3
H3K27	Lysin 27 des Histons 3
H3R2	Arginin 2 des Histons 3
H3R8	Arginin 8 des Histon 3
H3R17	Arginin 17 des Histon 3
H3R26	Arginin 26 des Histon 3
H3 (2+8+17)	Citrullinierung der Histonreste 2, 8 und 17 des Histon 3
H4	Histon 4
HDAC	Histone-Deacetylase
HRP	Meerrettich-Peroxidase, eng. <i>horseradish peroxidase</i>
HSC	Hämatopoietische Stammzelle (<i>hematopoietic stemcell</i>)
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k	Kilo
kDa	Kilodalton
l	Liter
LacZ	β -Galaktosidase

LT-HSC	Langzeitrepopulierende hämatopoietische Stammzelle
M	molar (Mol pro Liter)
M-CSF	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
me	Methylierung
me2	Dimethylierung
me2a	Asymetrische Dimethylierung
me3	Trimethylierung
min	Minuten
MEP	megakaryozytäre/erythroide Vorläuferzelle
MW	Molekulargewicht
P	Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR, q-PCR	(quantitative) Polymerase-Kettenreaktion, eng. <i>polymerase chain reaction</i>
PEI	Polyethylenimin
PRMT	Protein Arginin Methyltransferase
PTM	Posttranslationale Modifikation
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA-Pol. II	RNA-Polymerase II
RNA-Pol. II, pS2	RNA-Polymerase II, phosphoryliert am Serin 2
rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
s	Sekunde
SCF	Stammzellfaktor
Scl	<i>stem cell leukemia protein</i> , auch Tal1
sDMA	symmetrische Dimethylierung
SDS	Natriumdodecylsulfat
ST-HSC	Kurzzeitrepopulierende hämatopoietische Stammzelle
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tal1	<i>T-cell acute lymphocytic leukemia protein 1</i> , auch <i>Scl</i>
TM	Schmelztemperatur

TPO	Thrombopoetin
u.a.	unter anderem
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-galactopyranosid
WT	Wildtyp

7.2 Verwendete Chemikalien

Tabelle 7.1: Übersicht der verwendeten Chemikalien und der Hersteller

Chemikalie	Hersteller	Ort
Ampicillin (AMP)	Carl Roth	Karlsruhe
Adenosintriphosphat (ATP)	Carl Roth	Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma Aldrich	München
Bovines Serumalbumin (BSA)	PAA-Laboratories	Pasching
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich	München
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth	Karlsruhe
Essigsäure, 100 %	Carl Roth	Karlsruhe
Ethanol, 100 %	Carl Roth	Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth	Karlsruhe
Ethylenglycoltetraessigsäure (EGTA)	Carl Roth	Karlsruhe
Formaldehyd	Carl Roth	Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA-Laboratories	Pasching
G418	AppliChem	Darmstadt
Kanamycin	Carl Roth	Karlsruhe
L-Glutamin	PAA-Laboratories	Pasching
Glycerin	Carl Roth	Karlsruhe
Glycin	Carl Roth	Karlsruhe
Glycogen	Carl Roth	Karlsruhe
Glycylglycin (Gly Gly)	Carl Roth	Karlsruhe
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES)	Carl Roth	Karlsruhe
Isopropanol	Carl Roth	Karlsruhe
Kaliumchlorid	Carl Roth	Karlsruhe
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Carl Roth	Karlsruhe
Luciferin	Carl Roth	Karlsruhe
Magermilchpulver	Carl Roth	Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Carl Roth	Karlsruhe
Metafectene	Biontex	München
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Carl Roth	Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth	Karlsruhe
Natrium-Deoxycholat	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃)	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth	Karlsruhe
Di-Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O)	Carl Roth	Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat NaH ₂ PO ₄ x 2 H ₂ O	Carl Roth	Karlsruhe
Nonidet P-40 (NP-40)	Carl Roth	Karlsruhe
o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranosid (ONPG)	Sigma Aldrich	München
Penicillin/Streptomycin	PAA-Laboratories	Pasching
Protaminsulfat	Sigma Aldrich	München
Protease-Inhibitor-Mix	Applichem	Darmstadt
Proteinase K	Applichem	Darmstadt

Chemikalie	Hersteller	Ort
RNase A	LifeTechnologie	Darmstadt
Roti®-Block	Carl Roth	Karlsruhe
Roti®-Histofix	Carl Roth	Karlsruhe
Salzsäure (HCl)	Carl Roth	Karlsruhe
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth	Karlsruhe
Triton X-100	Carl Roth	Karlsruhe
Tween-20	Carl Roth	Karlsruhe
Zeozin	Invivogen	Cyla, Frankreich

7.3 Verwendete Geräte

Tabelle 7.2: Übersicht der verwendeten Geräte und Hersteller

Gerät	Bezeichnung	Hersteller	Ort
Autoklav	HST 4-5-6 E	Zirbus Technology	Bad Grund
Bakterienbrutschrank	Kelvitron	Haraeus Holding	Hanau
DNA Thermal Cycler	Thermal Cycler 480	Perkin Elmer Cetus	Tuttlingen
Elektrophoresekammer DNA	PerfectBlue Gelsystem S	PeqLab Biotechnologie	Erlangen
Elektrophoresekammer Protein	Elektrophoresesystem	PeqLab Biotechnologie	Erlangen
Entwicklermaschine	OptimaxTQ	MS Laborgeräte	Diehlheim
Durchflusszytometrie-Gerät	FACSAria, FACSScan	BD Biosciences	Erembodege
Falkon-Zentrifuge	Universal 320R	Andreas Hettich	Tuttlingen
Gefrierschrank -80°C	Hettich Freezer	Andreas Hettich	Tuttlingen
Geldokumentation DNA	Gel Doc 2000	Bio-Rad Laboratories	München
Heizbad	1002	Gesellschaft für Labortechnik	Burgwedel
Kühlzentrifuge	CT15RE	Hitachi HighTechnologies	Mannheim
Luminometer	Microlumat LB96P	Berthold Technologies	Bad Wildbad
Magnetrührer	Ikamag RCT	Ika	Staufen
Mikroskop-Zellkultur	Diavert	Leitz	Wetzlar
NanoDrop	New Drop 1000 Spectromax	Biotechnologie	Erlangen
PCR-Thermocycler	Primus 96	PeqLab Biotechnologie	Erlangen
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf	Hamburg
Rollmixer	R137	PSI Medizintechnik	Laudenbach
Schüttelinkubator	TH15	Edmund Bühler	Hechingen
SemiDry-Blotter	PerfectBlue SemiDry Web S	PeqLab Biotechnologie	Erlangen
Sonifizierer	Bioruptor	Diagenode	Liège
Spektrometer	SpektraMax 340	MWG Biotech	Ebersberg
Sterilbank	CleanAir	BioFlow Technik	Meckenheim
Stromgeber	Consort	Labortechnik Fröbel	Wasserburg
Vortexer	Vibrofix VF1	Janke & Kunkel Labortechnik	Staufen i. Br.
Tank-Blotter	PerfectBlue Web S	PeqLab Biotechnologie	Erlangen
Thermoblock	TDB-120	Kisker-Biotech	Steinfurt
Waage	EMB 600-2	Kern & Sohn	Balingen
Wasserbad	Polystat CC3	P.Huber Kältemaschinenbau	Offenburg
Zählkammer	Glasstic Glide	Hycor Biomedical Inc.	Kassel
Zellkulturbrutschrank	Cellstar	Nunc	Wiesbaden

7.4 Danksagung

Ein besonderer Dank geht an Dr. Jörn Lausen für die Überlassung dieses interessanten Themas und die Möglichkeit meine Promotionsarbeit in seiner Gruppe durchzuführen. Zudem möchte ich mich für die Diskussionen bedanken, dass er jederzeit für mich Zeit hatte und mich mit hilfreichen Anregungen und Ideen immer ein Stück voran gebracht hat.

Für Ihr großes Engagement, dass es mir ermöglicht hat um an der TU-Darmstadt promovieren zu dürfen und für Ihre Bereitschaft meine Arbeit zu begutachten, möchte ich bei Herrn Prof. Ralf Galuske und Herrn Prof. Paul Layer bedanken.

Bei meiner gesamten Arbeitsgruppe bedanke ich mich für die Unterstützung während meiner Promotionsarbeit, die netten gemeinsamen Stunden und die zahlreichen Diskussionen. Besonders bedanken möchte ich mich bei Dr. Nadine Hoffmann für die inspirierenden Diskussionen und vor allem für Ihren Humor, der mir vieles leichter gemacht hat. Bei Nicole Sahner möchte ich mich ebenso für die zahlreichenden Diskussionen und Anregungen zu meinem Projekt bedanken und ein besonderes Dankeschön gilt für Ihre umfangreiche Mithilfe bei der Revision meiner Publikation. Olga Lausen und Stefanie Herkt gebührt auch ein großer Dank für die inspirierenden Diskussionen und ihren Humor.

Bei Herrn Prof. Halvard Bönig und Frau Christiane Hümmer möchte ich mich für die Bereitstellung der humanen CD34-Zellen bedanken. Herrn Dr. Ole Pless möchte ich für die Bereitstellung der Zelllinie danken, ohne die die initiale Idee zu dieser Arbeit bzw. die entsprechenden Experimente nicht so einfach realisierbar gewesen wären.

Ein ganz großes herzliches Dankeschön gilt vor allem an meine Mutter, die mich zu jederzeit unterstützt und aufgemuntert hat. Zudem ermöglichte Sie mir durch manche finanzielle Unterstützung, die durch die üppige Bezahlung entstandene Engpässe zu kompensieren.

Ein Dank geht an meinen Körper, der die gesamte Phase trotz vielfältiger grippaler Infekte und völligster Überarbeitung durchgehalten hat. Verabschieden möchte ich mich von meinem Haupthaar, daß sich in dieser Zeit komischerweise entschieden hat von mir zu gehen.

7.5 Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Stephan Kolodziej
Geburtsdatum: 2.2.1976
Geburtsort: Langen/Hessen
Staatsangehörigkeit: Deutsch

Akademische Ausbildung:

Seit 09/2008 Promotion im Bereich Stammzellbiologie des Georg-Speyer- Hauses in der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Lausen

10/2006 - 07/2007 Diplomarbeit, Charité Campus Mitte – Universitätsmedizin Berlin, AG Lage, Institut für Pathologie – Labor für experimentelle Pathologie
Thema: Adenoviraler Transfer einer katalytischen *multitarget* RNA-Expressionskassette zur Aufhebung des *Multidrug*-Resistenz Phänotyps

10/2002 – 08/2007 Biotechnologie Studium, Hochschule Darmstadt
Abschluss zum Dipl.-Ing. (FH)

Schulischer Werdegang

09/1996 - 09/1997 Zivildienst am Asklepios Klinikum, Langen/Hessen

1991 - 1996 Gymnasium mit Abitur, Weibelfeldschule in Dreieich

7.6 Publikationen und Posterpräsentationen

Publikationen

Histone deacetylase inhibitors sensitize glioblastoma cells to TRAIL-induced apoptosis by *c-myc*-mediated downregulation of *c-FLIP*, A Bangert, S Cristofanon, I Eckhardt, B A Abhari, **S Kolodziej**, S Häcker, S H K Vellanki, J Lausen, K-M Debatin, S Fulda, *Oncogene* 01/2012; DOI:10.1038/onc.2011.614

PADI4 acts as a coactivator of Tal1 by counteracting repressive histone arginine methylation, **S. Kolodziej**, O.N. Kuvardina, T. Oellerich, J. Herglotz, I. Backert, N. Kohrs, El Buscato, S.K. Wittmann, G. Salinas-Riester, H. Bonig, M. Karas, H. Serve, E. Proschak, J. Lausen, *Nat Commun.* 2014 May 29;5:3995. doi: 10.1038/ncomms4995

The T-Cell Oncogene Tal2 Is a Target of PU.1 and Upregulated during Osteo-clastogenesis, Courtial N, Mücke C, Herkt S, **Kolodziej S**, Hussong H, Lausen J. *PLoS ONE* 01/2013; 8(9):e76637. DOI:10.1371/journal.pone.0076637

Histone arginine methylation keeps RUNX1 target genes in an intermediate state, J Herglotz, O N Kuvardina, **S Kolodziej**, A Kumar, H Hussong, M Grez, J Lausen, *Oncogene* (07/2012; DOI:10.1038/onc.2012.274

Vortrag:

Epigenetic mechanisms of PADI4 in hematopoiesis and evaluation as a therapeutical target, 4th UCT Science Day (2012) , Frankfurt am Main, Deutschland

Poster:

The peptidyl arginine deiminase IV (PADI4) is part of a gene regulatory complex on Tal1 target genes during megakaryopoiesis, Stephan Kolodziej, Ingo Backert, Olga Bölling, Julia Herglotz, Michael Karas, Eugen Proschak, Reinhard Henschler, and Jörn Lausen

Poster:

Herglotz J, **Kolodziej S**, Kuvardina ON, Courtial N, Forne I, Imhof A, Kowentz-Leutz E, Leutz A, Lausen J (2010) The hematopoietic transcription factor Tal1 functionally interacts with protein arginine methyltransferases. 9thEMBL Conference Transcription and Chromatin, Heidelberg, Deutschland (Posterpräsentation)

7.7 Ehrenwörtliche Erklärung:

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit entsprechend den Regeln guter wissenschaftlicher Praxis selbstständig und ohne unzulässige Hilfe Dritter angefertigt habe.

Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sowie sämtliche von Anderen direkt oder indirekt übernommenen Daten, Techniken und Materialien sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher bei keiner anderen Hochschule zu Prüfungszwecken eingereicht.

Darmstadt, den

.....