

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Transkriptionelle Regulation des Schlaganfall-Risikogens  
*HDAC9* durch den E2F3/Rb1-Komplex

Caroline Hedwig Prell-Schicker

aus

Erlangen, Deutschland

2014

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn PD. Dr. Christof Haffner betreut und von Herrn Prof. Dr. Klaus Förstemann von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

## Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München,

Dissertation eingereicht am	14.11.2014
1. Gutachter	Prof. Dr. Klaus Förstemann
2. Gutachter	PD Dr. Christof Haffner
Mündliche Prüfung am	15.01.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>Zusammenfassung</b>	<b>V</b>
<b>Summary</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Atherosklerose und Schlaganfall . . . . .	1
1.2 Ein neuer Risikolokus für atherosklerotischen Schlaganfall in der Chromosomenregion 7p21.1 . . . . .	4
1.3 Histondeacetylasen (HDACs) . . . . .	7
1.3.1 Die HDAC-Subfamilien . . . . .	9
1.3.2 HDAC9 . . . . .	10
1.4 Identifizierung von E2F3/4-Rb1-Komplexen als Allel-spezifische Bindepartner . . . . .	11
1.5 Ziel der Arbeit . . . . .	15
<b>2 Ergebnisse</b>	<b>16</b>
2.1 Die rs2107595-Allele zeigen differentielle <i>Enhancer</i> -Aktivitäten im Luziferase-Assay . . . . .	16
2.2 <i>HDAC9</i> als mögliches Kandidatengen . . . . .	18
2.2.1 Die HDAC9-Spiegel sind in Blutzellen von Risikoallelträgern erhöht . . . . .	18
2.2.2 Expressionsanalyse von HDAC9 in Lymphoblastoid-Zelllinien	19
2.2.3 Expressionsanalyse von HDAC9 und FOXP3 in isolierten regulatorischen T-Zellen . . . . .	20
2.2.3.1 Isolierung und Genotypisierung . . . . .	20
2.2.3.2 Expressionsanalyse von HDAC9 und FOXP3 . . . . .	23
2.3 Der E2F3/Rb1-Komplex bindet präferentiell an das häufige rs2107595-Allel . . . . .	24

2.4	In humanen Zelllinien wird die HDAC9-Transkription durch E2F/Rb-Komplexe reguliert . . . . .	26
2.4.1	Genotypisierung von HeLa- und HEK293T-Zellen . . . . .	26
2.4.2	Die endogene HDAC9-Expression ist E2F3a- und Rb1-abhängig . . . . .	27
2.4.3	Ein E2F3/E2F4- <i>Knockdown</i> führt zur Allel-spezifischen Reduktion der HDAC9-Expression . . . . .	32
2.4.4	<i>Knockdown</i> von Rb-Proteinen führt zur Allel-spezifischen Erhöhung der HDAC9-Expression . . . . .	36
2.5	Die HDAC9-Transkription ist Zellzyklus-abhängig . . . . .	41
2.5.1	Zellzyklussynchronisation und HDAC9-Expressionsanalyse in HeLa-Zellen . . . . .	41
2.5.2	Zellzyklussynchronisation und Expressionsanalyse von HDAC9 und FOXP3 in Jurkat-Zellen . . . . .	45
2.6	Analyse des humanen <i>HDAC9</i> -Promotors . . . . .	48
2.6.1	Identifizierung von HDAC9-Transkripten mittels 5'RACE . . . . .	48
2.6.2	Transkriptionelle Aktivität von <i>HDAC9</i> -Promotorfragmenten . . . . .	53
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
3.1	Die rs2107595-Region besitzt genregulatorische Eigenschaften . . . . .	58
3.2	<i>HDAC9</i> ist das wahrscheinliche Risikogen . . . . .	58
3.3	HDAC9 wird durch E2F/Rb-Komplexe Zellzyklus-abhängig reguliert . . . . .	60
3.4	Schlussfolgerung . . . . .	64
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>66</b>
4.1	Equipment . . . . .	66
4.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	69
4.3	Reagenziensets (Kits) . . . . .	71
4.4	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	72
4.5	Molekulargenetische Methoden . . . . .	75
4.5.1	Oligonukleotide . . . . .	75
4.5.2	<i>TaqMan</i> Sonden . . . . .	77
4.5.3	siRNA . . . . .	77
4.5.4	Plasmide . . . . .	78
4.5.5	DNA-Isolation . . . . .	80
4.5.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) . . . . .	80

4.5.7	5' <i>Rapid Amplification of complementary DNA ends</i> (5'RACE)-PCR . . . . .	82
4.5.8	Agarosegel-Elektrophorese . . . . .	82
4.5.9	Extraktion von DNA aus Agarosegelen . . . . .	82
4.5.10	Verdau mit Restriktionsenzymen . . . . .	83
4.5.11	Ligation . . . . .	84
4.5.12	Transformation kompetenter Bakterien . . . . .	84
4.5.13	Plasmid-Isolation aus Bakterien . . . . .	84
4.5.14	RNA-Isolation . . . . .	85
4.5.15	cDNA-Synthese . . . . .	85
4.5.16	quantitative <i>Real-Time</i> PCR (q-PCR) . . . . .	85
	4.5.16.1 Gen-Expressionsanalyse . . . . .	85
	4.5.16.2 Genotypisierung . . . . .	87
4.6	Zellkultur . . . . .	88
	4.6.1 Zelllinien und Kultivierung . . . . .	88
	4.6.2 Kryokonservierung von Zellen . . . . .	89
	4.6.3 Auftauen von Zellen . . . . .	89
	4.6.4 Bestimmung der Zellzahl . . . . .	90
	4.6.5 Mycoplasmentest . . . . .	90
	4.6.6 Transfektion . . . . .	90
	4.6.7 Zellzyklus-Synchronisierung . . . . .	91
4.7	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	92
	4.7.1 Antikörper . . . . .	92
	4.7.2 Protein-Extraktion . . . . .	94
	4.7.3 DNA- <i>Pulldown</i> von Proteinen . . . . .	94
	4.7.4 Proteinbestimmung mittels BCA- <i>assay</i> . . . . .	95
	4.7.5 SDS-PAGE . . . . .	95
	4.7.6 Western Blot . . . . .	97
4.8	Separation von regulatorischen T-Zellen aus humanen Blutproben . .	97
4.9	Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie . . . . .	100
	4.9.1 Reinheitskontrolle der separierten regulatorischen T-Zellen .	100
	4.9.2 Überprüfung der Zellzyklus-Synchronisation . . . . .	101
4.10	Luziferase Reporter Assay . . . . .	101
4.11	Statistik . . . . .	102

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>103</b>
------------------------------	------------

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>108</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>109</b>
<b>Danksagung</b>	<b>121</b>

# Zusammenfassung

In westlichen Industrieländern stellt Schlaganfall eine der häufigsten Todesursachen dar und ist hauptursächlich für körperliche Behinderung. In einem hohen Maße kann Schlaganfall auf genetische Faktoren zurückgeführt werden, weshalb kürzlich eine genomweite Assoziationsstudie (GWAS) in der METASTROKE-Kohorte für ischämischen Schlaganfall durchgeführt wurde. Hierbei konnte die Chromosomenregion 7p21.1 als bisher stärkster Risikolokus für atherosklerotischen Schlaganfall identifiziert werden. Diese Region umfasst das Ende des *HDAC9*-Gens und den benachbarten intergenischen Bereich stromaufwärts der Gene *TWIST1* und *FERD3L*. Der Haupt-SNP rs2107595 kolokalisiert mit einem DNase I-hypersensitiven Bereich sowie Histonmodifikations-*Hotspots* und könnte somit genregulatorische Konsequenzen besitzen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Genexpressionsstudien in humanen Blutzellen ergaben eine Dosis-abhängige Korrelation der *HDAC9* mRNA-Spiegel mit dem rs2107595-Risikoallel. *HDAC9* gehört zur Familie der Histondeacetylasen, die v.a. bei der Transkription eine wichtige Rolle spielen. Das rs2107595-Risikoallel verändert ein bioinformatisch vorhergesagtes Bindemotiv für E2F-Transkriptionsfaktoren, das beim häufigen Allel intakt ist. Untersuchungen der transkriptionellen Kapazität dieser Bindungsstelle zeigten eine erhöhte Aktivität des häufigen Allels im Vergleich zum Risikoallel. Zur Identifizierung dafür verantwortlicher DNA-interagierender Proteine wurde in Kollaboration mit dem Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried eine proteomweite Analyse von SNPs (PWAS) durchgeführt. Hierbei wurden die Proteine E2F3, E2F4, TFDP1 und Rb1 mit präferentieller Bindung an das häufige rs2107595-Allel identifiziert. E2F/TFDP/Rb-Komplexe sind ein zentraler Bestandteil des G<sub>1</sub>/S-Übergangs im Zellzyklus und regulieren somit die Zellproliferation. In *gain*- und *loss-of-function*-Experimenten von E2F3, E2F4 und der Rb-Proteinfamilie in humanen Zelllinien mit verschiedenen Genotypen für rs2107595 konnte eine unterschiedliche Regulation der *HDAC9*-Expression beobachtet werden. Nach Zellzyklus-Synchronisation konnten erhöhte *HDAC9*-Spiegel im Zeitraum der aktiven Phase von E2F3 gezeigt werden, was den Befund einer Regulation durch den

E2F3/TFDP1/Rb1-Komplex stützt.

Ein erhöhtes Risiko für Schlaganfall könnte also durch eine Risikoallel-vermittelte Störung dieses genregulatorischen Mechanismus entstehen.



# Summary

Stroke is one of the major causes of death and physical disability in developed countries and can be attributed to a considerable extent to genetic factors. In a recent genome-wide association study (GWAS) in the METASTROKE cohort for ischemic stroke, the chromosome 7p21.1 region comprising the tail end of the *HDAC9* gene and the adjacent intergenic region upstream of the *TWIST1* and *FERD3L* genes was identified as the so far strongest risk locus for large vessel stroke. The lead SNP rs2107595 co-localizes with a DNase I hypersensitivity cluster and histone modification hotspots indicating an involvement in gene regulatory mechanisms.

Gene expression studies in human blood cells performed in this thesis revealed a dosage-dependent correlation of the rs2107595 risk allele with HDAC9 mRNA levels. HDAC9 is a member of the family of histone deacetylases which play an important role during transcription. The rs2107595 risk allele disrupts a bioinformatically predicted binding site for E2F transcription factors, which is intact when the common allele is present. Analyses of the transcriptional capacity of this binding site showed elevated activity for the common allele compared to the risk allele. To identify the responsible DNA-interacting proteins, a proteome-wide analysis of SNPs (PWAS) was performed in collaboration with the Max-Planck-Institute for Biochemistry, Martinsried. The proteins E2F3, E2F4, TFDP1 and Rb1 were identified as preferential interactors of the common allele. E2F/TFDP/Rb complexes are central components of the G<sub>1</sub>/S-boundary in the cell cycle and regulate its progression. We applied gain- and loss-of-function approaches for E2F3, E2F4 and the Rb protein family members in human cell lines with different rs2107595 genotypes and showed a differential regulation of HDAC9 expression. Upon cell cycle synchronization we observed increased HDAC9 levels correlating with the active phase of E2F3, supporting the finding of a regulation through the E2F3/TFDP1/Rb1 complex.

Increased stroke susceptibility might arise from a risk allele-mediated interruption of this gene-regulatory mechanism.

# 1 Einleitung

In westlichen Industrieländern stellt Schlaganfall die dritthäufigste Todesursache dar und ist hauptursächlich für dauerhafte, körperliche Behinderung. [16] Schlaganfall ist vor allem eine Erkrankung des Alters und wird in den nächsten Jahren aufgrund des demographischen Wandels zu einer steigenden Anzahl an Betroffenen führen. [20] Neben dem Alter gelten Bluthochdruck, Übergewicht, Diabetes und Rauchen als weitere Risikofaktoren, insgesamt können dadurch aber nur 60 % des Erkrankungsrisikos erklärt werden. Das Restrisiko wird größtenteils auf bisher unbekannte, genetische Faktoren zurückgeführt. [16, 20]

Ursächlich für die durch einen Schlaganfall hervorgerufenen, neurologischen Schädigungen ist eine Hypoxie (Sauerstoff-Mangelversorgung) von Neuronen, die durch eine plötzliche Minderdurchblutung von Hirnarealen (ischämischer Schlaganfall) oder durch eine akute Hirnblutung (hämorrhagischer Schlaganfall) ausgelöst wird. Ca. 80 % aller Schlaganfälle erfolgen aufgrund einer Ischämie und lassen sich anhand ihrer Ursache in drei Untergruppen unterteilen: (1) Okklusion großer Arterien bedingt durch Atherosklerose (*large vessel disease, LVD*), (2) Verschluss kleiner Hirnarterien (*small vessel disease, SVD*), und (3) Kardioembolie (CE), bei welcher ein Thrombus aus dem Herzen einen distalen Gefäßverschluss verursacht. [20, 30]

## 1.1 Atherosklerose und Schlaganfall

Atherosklerose gilt als Hauptursache für Schlaganfall und Erkrankungen der Herzkranzgefäße. Sie stellt eine Erkrankung mittlerer und großer Arterien dar und wird durch Hyperlipidämie/-cholesterinämie, aber auch durch Bluthochdruck ausgelöst. Charakteristisches Merkmal ist die Bildung atherosklerotischer Plaques, einer Ansammlung von Lipiden, Bindegewebe, Kalzium und Immunzellen, die eine chronische, langsam fortschreitende Verengung (Stenose) der Gefäße und in Folge dessen eine Ischämie des umliegenden Gewebes nach sich ziehen kann. Häufiger allerdings

kommt es zur Instabilisierung und Ruptur von Plaques sowie zur Bildung eines Thrombus, der entweder im Bereich des Plaques oder als Embolus an einer distalen Stelle einen akuten Gefäßverschluss verursacht. Als Folge kann ein Schlaganfall oder Herzinfarkt auftreten. [23, 27]

Ein Merkmal der Atherosklerose ist eine massive Veränderung der Gefäßwand (Abb. 1.1). Ausgangspunkt für die Entstehung atherosklerotischer Plaques ist in erster Linie die Akkumulation von *low density* Lipoproteinen (LDL) innerhalb der Intima, der innersten Schicht von Gefäßwänden, und ihrer anschließenden Oxidation zu oxLDL (Abb. 1.1 B). Dieses wirkt immunogen und führt zu einer Aktivierung von Entzündungsprozessen, welche die Produktion von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen durch Endothelzellen als auch die Rekrutierung sowie Einwanderung von Monozyten in die Gefäßwand beinhalten. [47, 79] Eingewanderte Monozyten differenzieren zu Makrophagen, die oxLDL aufnehmen und sich in sog. Schaumzellen entwickeln, deren Akkumulation für atherosklerotische Läsionen charakteristisch ist. Des Weiteren wandern glatte Gefäßmuskelzellen der Tunica Media in die Tunica Intima und beginnen aufgrund von Wachstumsfaktoren zu proliferieren, wodurch es zur vermehrten Bildung von Bindegewebe und zur Entstehung einer fibrösen Kappe des Plaques kommt. (Abb. 1.1 C). [23, 49] Aktivierte Makrophagen sezernieren im weiteren Verlauf Metalloproteasen, welche durch Degradation extrazellulärer Matrixproteine der fibrösen Kappe eine Ruptur des Plaques auslösen können (Abb. 1.1 D). [47, 73] Parallel dazu erfolgt eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems, die zur Rekrutierung aktivierter  $CD4^+$  als auch  $CD8^+$  T-Lymphozyten und somit zur Verstärkung der Immunantwort führt. [34, 48, 69]

Atherosklerose kann somit als eine komplexe Autoimmunerkrankung betrachtet werden. [69]

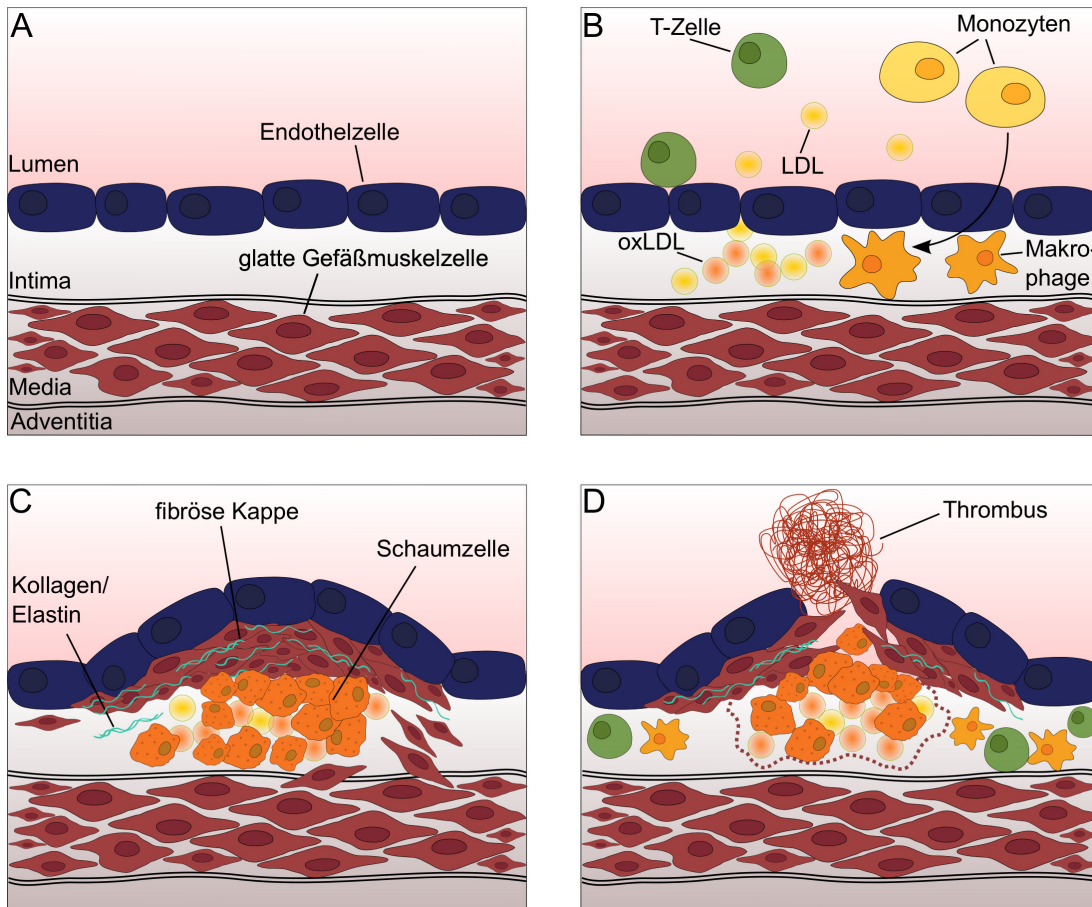


Abbildung 1.1: Entstehung der Atherosklerose.

Schematisch dargestellt sind die Stadien der Atherogenese. A) Die Gefäßwand einer Arterie ist aus drei Schichten aufgebaut: der die Endothelzellen enthaltenden Tunica Intima, der aus glatten Gefäßmuskelzellen und extrazellulärer Matrix bestehenden Tunica Media sowie der vorwiegend aus Bindegewebe bestehenden Tunica Adventitia. B) Im anfänglichen Stadium der Atherosklerose kommt es zur Aufnahme von *low density* Lipoproteinen (LDL) aus dem Blut in die Tunica Intima, wo es in oxidiertes LDL (oxLDL) umgewandelt wird und immunogen wirkt. Durch die anschließenden Entzündungsprozesse werden Endothelzellen zur Produktion von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen veranlasst, was zur Rekrutierung von Monozyten und T-Zellen aus dem Blut führt. In die Zellwand eingewanderte Monozyten differenzieren zu Makrophagen und nehmen oxLDL auf. C) Mit oxLDL beladene Makrophagen entwickeln sich zu Schaumzellen und akkumulieren. Glatte Gefäßmuskelzellen beginnen in die Tunica Intima einzuwandern und aufgrund von Wachstumsfaktoren zu proliferieren. Hierdurch kommt es zur vermehrten Bildung von Bindegewebe (Kollagen, Elastin) und zur Entstehung einer fibrösen Kappe des Plaques. D) Rekrutierte T-Lymphozyten führen zur Verstärkung der Immunantwort und aktivierte Makrophagen sezernieren Metalloproteasen, welche die Bindegewebsmoleküle der fibrösen Kappe abbauen. Als Folge dessen kommt es zur Ruptur des Plaques und zur Bildung eines Thrombus.

Modifiziert nach [49].

## 1.2 Ein neuer Risikolokus für atherosklerotischen Schlaganfall in der Chromosomenregion 7p21.1

Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass genetische Faktoren eine große Rolle bei der Atherosklerose spielen. [27, 51] Trotz der Fortschritte im Verständnis atherogener Vorgänge sind die zugrundeliegenden molekularen Mechanismen noch nicht ausreichend erforscht. Dementsprechend limitiert sind die momentan zur Verfügung stehenden Behandlungsmöglichkeiten, speziell im Hinblick auf die immunologische Komponente der Atherosklerose. Die Entwicklung molekularer Hochdurchsatz-Genotypisierungsmethoden hat die Durchführung sog. genomweiter Assoziationsstudien (GWAS) möglich gemacht, mit deren Hilfe krankheitsrelevante, genetische Varianten in großen Patientenkollektiven identifiziert werden können. [101] Bei diesen Varianten handelt es sich in der Regel um Einzelnukleotid-Polymorphismen (*single nucleotide polymorphisms*, *SNP*), einem Austausch eines einzigen Nukleotids. SNPs treten ca. alle 100–300 Basenpaare im menschlichen Genom auf und machen ungefähr 90 % aller bekannten Sequenzvarianten aus. Sie stellen damit die häufigste Form genetischer Variation dar, haben jedoch größtenteils keine funktionellen Konsequenzen. [13] Manche SNPs jedoch führen zu einer Erhöhung von Erkrankungsrisiken, indem sie z.B. in kodierenden Genbereichen zu Aminosäureaustauschen und somit zu strukturellen Veränderungen führen, die Fehlfaltungen oder Fehlfunktionen nach sich ziehen. In nicht-kodierenden Bereichen können sich SNPs durch die Modifikation regulatorischer Elemente wie Promotoren, *Enhancer* oder *Silencer* auf die Genexpression auswirken. Beispiele dafür findet man z.B. bei Asthma, altersbedingter Makuladegeneration und Diabetes, aber auch bei Hypercholesterinämie und Myokardinfarkt. [13, 83]

Zur Identifizierung genetischer Risikofaktoren für ischämischen Schlaganfall wurde unter maßgeblicher Beteiligung von Wissenschaftlern unseres Instituts eine konsortial organisierte genomweite Assoziationsstudie (GWAS) des *International Stroke Genetics Consortiums* und des *Wellcome Trust Case Control Consortiums 2* durchgeführt. In einer Gruppe von 3 548 Betroffenen und 5 972 Kontrollfällen europäischer Abstammung wurden 495 851 autosomale SNPs auf Assoziation mit atherosklerotischem Schlaganfall (*large vessel disease*, LVD), *small vessel disease* (SVD) und Kardioembolie (CE) untersucht. Für LVD, nicht jedoch für SVD oder CE zeigte sich eine signifikante Assoziation mit der Chromosomenregion 7p21.1. [6]

Dieser Befund wurde in der METASTROKE-Kohorte mit 12 384 Patienten und 62 004

Kontrollfällen repliziert. [63] Hierbei erwies sich der SNP rs2107595 mit einem p-Wert von  $2,02 \times 10^{-12}$  und einer *odds ratio* (OR) von 1,39 als Haupt-SNP, so dass die 7p21.1-Region den bislang stärksten bekannten Risikolokus für atherosklerotischen Schlaganfall darstellt. [63] Sie überlappt mit dem hinteren Ende des *HDAC9*-Gens und umfasst zudem den intergenischen Bereich zwischen *HDAC9* und den nachfolgenden Genen *TWIST1* und *FERD3L* (Abb. 1.2).

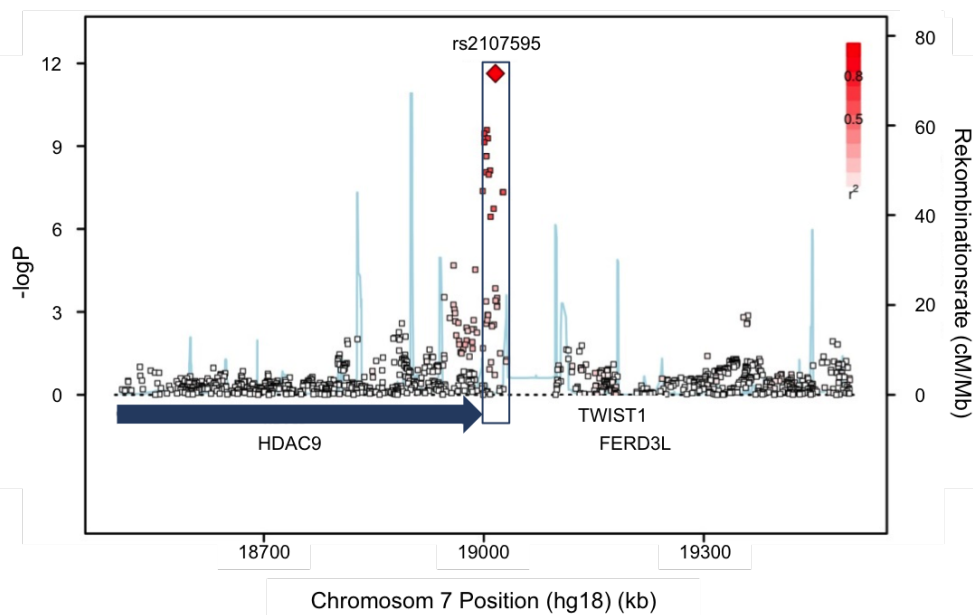


Abbildung 1.2: Lokalisation signifikanter Risiko-SNPs für atherosklerotischen Schlaganfall innerhalb der 7p21.1-Region.

Dargestellt sind die  $-\log P$ -Werte (linke Ordinate) der in der METASTROKE-Kohorte untersuchten SNPs in der 7p21.1-Region. Die Farbskala veranschaulicht die  $r^2$ -Werte im Vergleich zum Haupt-SNP rs2107595 und damit den Grad der Kopplung. Auf der Abszisse ist die Position auf Chromosom 7 in Kilobasen (Kb) angegeben (hg18: humane Genomversion 18). Der rs2107595-SNP ist im intergenischen Bereich am 3'-Ende des *HDAC9*-Gens und 5' zu *TWIST1* und *FERD3L* lokalisiert. In hellblau gezeigt sind die Kopplungsgruppen auf Basis der Rekombinationsraten in Zentimorgan (cM) pro Megabase (Mb) (rechte Ordinate).

Die Gene *TWIST1* und *FERD3L* kodieren für Transkriptionsfaktoren der *Helix-Loop-Helix*-Familie. Beide scheinen eine Rolle während der Embryonalentwicklung von Säugern zu spielen. Während für *FERD3L* und dessen kodierenden Faktor Nato3 bislang eine Beteiligung an der frühen Entwicklung des Mittelhirns gezeigt wurde [70], konnte für *TWIST1* eine Aktivität in der mesodermalen Spezifizierung und Differenzierung nachgewiesen werden. [60, 75] *TWIST1 knockout* Mäuse sterben bereits em-

bryonal aufgrund von Defekten des Neuralrohrs oder des Schädels. Beim Menschen führen heterozygote *loss-of-function* Mutationen zum Saethre-Chotzen-Syndrom, einer autosomal dominanten Erkrankung, die mit Schädel- und Extremitätenanomalien einhergeht. [75] Eine vaskuläre Pathologie ist bei diesen Patienten nicht bekannt. Dagegen ist HDAC9 ein Mitglied der Genfamilie der Histondeacetylasen, die die Entfernung von Acetylresten bei Histon- und Nichthistonproteinen katalysieren, ein sowohl in embryonalen als auch adulten Geweben gut untersuchter Vorgang. [85] HDACs spielen zum Teil wichtige Rollen bei der Kontrolle von Entzündungsprozessen und für HDAC9 ist eine essentielle Funktion bei der adaptiven Immunantwort postuliert worden (siehe Kapitel 1.3). [77]

Keiner der mit atherosklerotischem Schlaganfall assoziierten SNPs befindet sich innerhalb der für TWIST1, FERD3L oder HDAC9-kodierenden Sequenzen, so dass mögliche molekulare Ursachen für das erhöhte Erkrankungsrisiko nicht unmittelbar zu erkennen sind. Eine Möglichkeit wäre die Modifikation nicht-kodierender RNA-Gene mit genregulatorischer Funktion. [22] Es ist bereits bekannt, dass solche RNA-Moleküle, wie z.B. mikro-RNAs, in die Genexpression eingreifen können und eine Rolle in der Entwicklung als auch bei Erkrankungen spielen. [58] Eine weitere, naheliegende Möglichkeit ist jedoch die Beeinflussung genregulatorischer Elemente im Genom. Um Transkription zu ermöglichen, muss die Chromatinstruktur reorganisiert und für Transkriptionsfaktoren zugänglich gemacht werden, was u.a. durch Modifikationen an Histonproteinen erreicht wird. [7] Insbesondere die Methylierung des Lysinrestes 4 und die Acetylierung des Lysinrestes 27 am Histon 3 spielen dabei eine wichtige Rolle. [57, 71, 86] Diese Modifikationen treten daher, zusammen mit DNase I-Hypersensitivität, bevorzugt in Bereichen transkriptioneller Aktivität auf. Wir haben daher die größtenteils im Rahmen des ENCODE-Projektes (UCSC *Genome browser*, <http://genome.ucsc.edu>) bestimmten Histonmodifikationsmuster verschiedener Zelllinien analysiert. [78] Der Haupt-SNP rs2107595 befindet sich tatsächlich im Bereich eines Histonmodifikations-*Hotspots* und könnte somit genregulatorische Konsequenzen besitzen (Abbildung 1.3). [38, 71, 90]

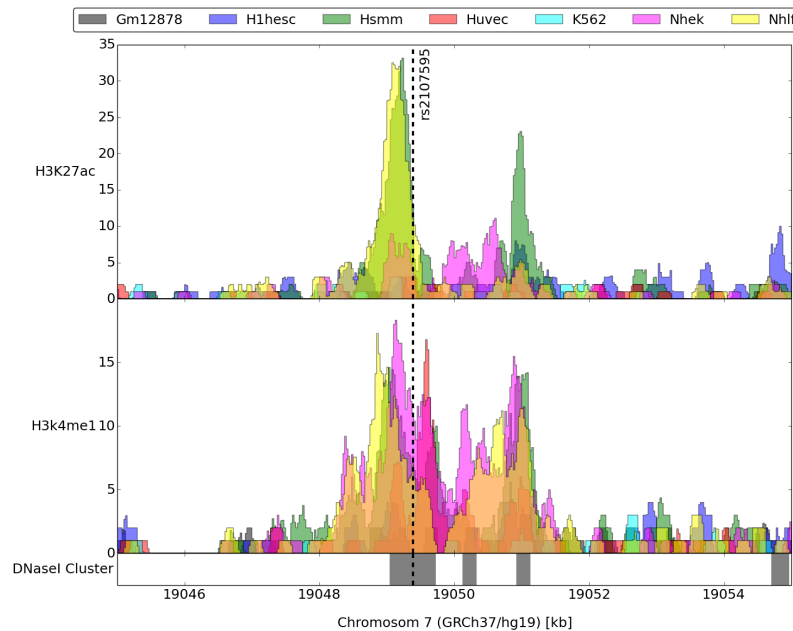


Abbildung 1.3: Kolokalisation des SNPs rs2107595 mit Histonmodifikations-*Hotspots* und einem DNase I Hypersensitivitäts-Cluster.

Gezeigt sind die dem UCSC *Genome browser* (<http://genome.ucsc.edu>) entnommenen Daten sieben verschiedener Zelllinien (durch unterschiedliche Farben gekennzeichnet) zu den Histonmodifikationen H3K27ac und H3K4me1 sowie den DNase I Hypersensitivitäts-Clustern im Chromosomenbereich 7p21.1 (dargestellt auf der x-Achse). Der Haupt-Risiko-SNP 2107595 kolokalisiert mit beiden Histonmodifikationsmustern als auch mit einem Bereich für DNase I-Hypersensitivität.

Aufgrund der Nähe des 7p21.1-Lokus zum *HDAC9*-Gen sowie dessen Funktion bei entzündlichen Prozessen wurde es als vielversprechendstes der drei in der Risikoregion lokalisierten Kandidatengene betrachtet.

### 1.3 Histondeacetylasen (HDACs)

Eukaryotische DNA liegt die meiste Zeit in Form von kondensiertem Chromatin vor und ist für Transkriptionsfaktoren unzugänglich. [68, 81] Verantwortlich dafür sind im Wesentlichen elektrostatische Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenen DNA-Rückgrat und positiv geladenen Histonproteinen. Die Regulation dieser Wechselwirkungen durch posttranslationale Modifikationen wie z.B. Acetylierung von Histonen stellt einen wichtigen Mechanismus zur Transkriptionskontrolle dar. [4, 32] Die Acetylierung und Deacetylierung von Lysinresten ist ein hochdynamischer Pro-



zess, der von zwei gegensätzlich arbeitenden Proteinfamilien, den Histonacetyltransferasen (HATs) sowie den Histondeacetylasen (HDACs), kontrolliert wird (Abb. 1.4) und auch bei Nicht-Histonproteinen Anwendung findet. [4, 55] Dadurch können neben der Transkription zahlreiche weitere, zelluläre Prozesse reguliert werden.

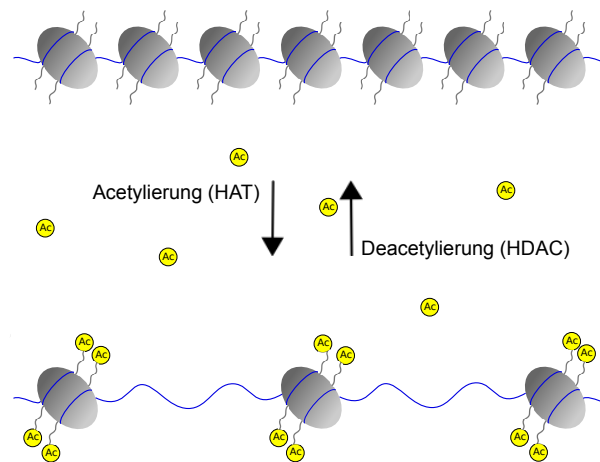


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der Funktionsweise von HATs und HDACs.

Histonacetyltransferasen (HATs) übertragen positiv geladene Acetylgruppen auf Histonschwänze, was zu einer Dekondensation der Chromatinstruktur führt und einen Zugang zur DNA für Transkriptionsfaktoren ermöglicht. Histondeacetylasen (HDACs) entfernen diese Acetylgruppen und bewirken eine Chromatinkondensation, die keine Bindung an die DNA erlaubt.

Die Balance zwischen Acetylierung und Deacetylierung durch HATs und HDACs stellt einen Schlüsselmechanismus der Genregulation dar und spielt eine entscheidende Rolle in embryonalen als auch adulten Prozessen und Krankheitsbildern. HDACs sind in die unterschiedlichsten Prozesse wie Proliferation, Zellzyklusregulierung und Apoptose involviert. Ihre Deregulierung ist bei mehreren Erkrankungen, wie z.B. Magen-, Prostata-, Brust-, oder Gebärmutterhalskrebs, gezeigt worden. [77]

In den letzten Jahrzehnten wurde zunehmend deutlich, dass bei komplexen Erkrankungen Acetylierung und Deacetylierung eine wichtige Rolle spielen. Beide Prozesse sind reversibel, wodurch sie ein interessantes Ziel pharmakologischer Therapeutika darstellen. So finden eine Reihe von HDAC-Inhibitoren (HDACi) klinische Anwendung, z.B. Valproat in der Behandlung bipolarer Störungen sowie Epilepsien, oder Vorinostat als Therapeutikum bei kutanen T-Zell-Lymphomen. Alle bisher bekannten HDACi weisen eine geringe Spezifität auf, so dass es momentan noch nicht möglich ist, einzelne HDACs spezifisch zu hemmen. [25] Es konnte gezeigt werden, dass HATs und HDACs in der transkriptionellen Regulation vaskulärer Erkrankungsgene eine

Rolle spielen, welche an der Bildung extrazellulärer Matrix, Entzündungsreaktionen und Proliferation beteiligt sind und somit möglicherweise in die Entstehung von Atherosklerose involviert sind. [74] Polymorphismen, die die HDAC-Expression regulieren, könnten somit das Erkrankungsrisiko für atherosklerotischen Schlaganfall beeinflussen. [74]

### 1.3.1 Die HDAC-Subfamilien

Die Familie der HDACs besteht aus 18 Mitgliedern, die aufgrund ihrer Expressionsmuster und Eigenschaften in vier Klassen unterteilt werden (Tabelle 1.1). [85] HDAC9 gehört zur Klasse IIa, dessen Mitglieder gewebsspezifisch exprimiert werden. Sie besitzen alle eine konservierte Bindungsstelle für 14-3-3 Exportproteine, was einen Transport zwischen Nukleus und Cytoplasma ermöglicht, als auch eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor *Myocyte Enhancer Factor 2* (MEF2). [31] MEF2 hat eine große Relevanz in der transkriptionellen Regulation der Myogenese. Durch Bindung von HDACs an MEF2 wird die Transkription entscheidender Gene reprimiert, wodurch Klasse IIa HDACs eine Hauptrolle in der Entwicklung von Myozyten zuteil wird. [85, 97]

Tabelle 1.1: Klasseneinteilung der Histondeacetylasen.

Klasse III stellt die Gruppe der Sirtuine dar und wird nicht zu den klassischen Histondeacetylasen gezählt, weshalb sie hier nicht aufgeführt wird.

Klasse	HDAC	Expression	Eigenschaften
Klasse I	1, 2, 3, 8	ubiquitär, v.a. im Nukleus	hohe Deacetylaseaktivität
Klasse IIa	4, 5, 7, 9	Gehirn, Herz, Skelettmuskel	konservierte Bindungsstelle für 14-3-3 Exportproteine, Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor <i>Myocyte Enhancer Factor 2</i> (MEF2)
Klasse IIb	6, 10	Zytoplasma	Interagiert v.a. mit Zytoskelettproteinen, Transmembranproteinen, Chaperonen
Klasse IV	11	Gehirn, Herz, Nieren, Hoden	weitestgehend unbekannt

### 1.3.2 HDAC9

HDAC9 zeigt vor allem im Herzen, Gehirn und Skelettmuskel ein starkes Expressionsmuster. Zusätzlich zu atherosklerotischem Schlaganfall konnte die *HDAC9*-Region mit koronarer Herzkrankheit (*Coronary artery disease*, CAD) sowie Myokardinfarkt assoziiert werden, Erkrankungen, die durch Atherosklerose vermittelt werden und auch gegenseitig als Risikofaktor füreinander gelten. [15, 17].

2013 konnte gezeigt werden, dass humane atherosklerotische Plaques in verschiedenen Arterien (Aorta, Carotis, Femoralarterie) eine erhöhte Expression von HDAC9 aufweisen und zudem der Risiko-SNP rs2107595 mit einer erhöhten Intima-Media-Dicke sowie dem Vorhandensein von Plaques in der Carotis assoziiert werden kann. [56] Zudem wurde berichtet, dass eine HDAC9-Defizienz die Anzahl an regulatorischen T-Zellen ( $T_{\text{regs}}$ ) in Mäusen erhöht [76, 95], Effektor-T-Zellen aber erniedrigt [104], was aufgrund ihrer Rolle in der Atherosklerose (siehe Kapitel 1.1) einen protektiven Mechanismus vermuten lassen kann.  $T_{\text{regs}}$  sind in den letzten Jahren als wichtige Komponente von Entzündungsprozessen erkannt worden. [53, 69] Sie werden im Thymus gebildet oder in der Peripherie induziert [93], patrouillieren im Gewebe und sind für die Aufrechterhaltung von Immuntoleranz und Immunhomöostase zuständig, indem sie die Aktivität antigenstimulierender T-Zellen kontrollieren und supprimieren. Verschiedene Studien legen den Schluss nahe, dass bei Atherosklerose ein Ungleichgewicht zwischen Effektor-T-Zellen und regulatorischen T-Zellen vorliegt. [53, 69] Dies konnte durch Untersuchungen anhand verschiedener Mausmodelle mit verminderter  $T_{\text{reg}}$ -Anzahl bestätigt werden, in welchen eine beschleunigte Plaquebildung nachgewiesen werden konnte. [1, 53]

Zudem konnte eine Beteiligung von HDAC9 an weiteren inflammatorischen Prozessen gezeigt werden, so z.B. bei Colitis, die mit einer lokal erhöhten HDAC9-Expression assoziiert ist. In einer Studie mit einem Maus-Colitis-Modell konnte eine HDAC9-Defizienz mit einer Funktionalitätssteigerung von  $T_{\text{regs}}$  und einem Rückgang der Colitis assoziiert werden. [107]

Aufgrund dieser Arbeiten ist eine Beteiligung von HDAC9 an atherogenen Entzündungsprozessen denkbar.

## 1.4 Identifizierung von E2F3/4-Rb1-Komplexen als Allel-spezifische Bindepartner

Wie unter 1.2 beschrieben sind die in der GWAS als signifikant identifizierten Polymorphismen inklusive des Haupt-SNPs rs2107595 ausnahmslos außerhalb kodierender Sequenzen lokalisiert, was auf einen Effekt auf genregulatorische Prozesse hindeutet. Um dafür experimentelle Evidenz zu erhalten, wurde in Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Matthias Mann am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried nach Allel-spezifischen Bindungsproteinen für die fünf signifikantesten SNPs aus der 7p21.1-Region gesucht. Dazu wurde PWAS (*Proteome wide analysis of SNPs*) verwendet, eine proteomische Hochdurchsatz-Methode zur Identifikation von DNA-Protein-Interaktionen. [10] Sie basiert auf der *in vitro*-Interaktion synthetischer Oligonukleotide mit Faktoren aus Kernextrakten, die aus mit Hilfe der SILAC (*Stable isotope labelling of amino acids in culture*)-Technik metabolisch markierten Zelllinien gewonnen werden (Abb. 1.5). [54, 61] Für den Haupt-SNP rs2107595 konnten dabei vier Faktoren (E2F3, E2F4, TFDP1 sowie Rb1) mit präferentieller Bindung an das häufige Allel identifiziert werden. E2F/TFDP1/Rb-Komplexe sind ein zentraler Bestandteil des G<sub>1</sub>/S-Kontrollpunkts im Zellzyklus und regulieren somit die Zellproliferation. Die Identifikation Allel-spezifischer Bindepartner untermauerte die Hypothese, dass rs2107595 Auswirkungen auf die Genregulation haben könnte.

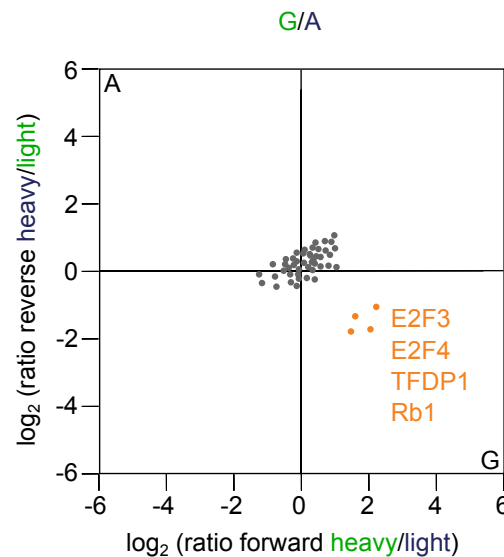


Abbildung 1.5: Identifizierung Allel-spezifischer Bindepartner der rs2107595-Allele mittels PWAS.

Kulturen der humanen HeLa-Zelllinie wurden mittels SILAC markiert, das die Kultivierung entweder in normalem Zellkulturmedium oder in Medium mit Deuterium-haltigem Lysin (2H4-Lysin) beinhaltet. Alle neu synthetisierten Proteine werden dadurch metabolisch markiert, wodurch deren Peptide eine um vier Da höhere molekulare Masse aufweisen. Dies führt zu einer definierten Massenverschiebung tryptischer Peptide im Vergleich zur unmarkierten Version. Kernextrakte markierter (*heavy*) oder unmarkierter (*light*) Zellen wurden mit biotinylierten Oligonukleotiden inkubiert, die entweder das häufige oder das Risikoallel enthalten. Nach Streptavidin-vermitteltem *Pulldown* der Oligonukleotide wurden gebundene Proteine mit Hilfe massenspektrometrischer Bestimmung tryptischer Peptide identifiziert. Im *Forward*-Experiment wurden markierte Extrakte mit dem häufigen Allel, im *Reverse*-Experiment mit dem Risikoallel-Oligonukleotid inkubiert, so dass sich für jedes identifizierte Protein zwei Quotienten (*heavy/light ratios*) ergeben, die doppelt-logarithmisch dargestellt werden. Um den Nullpunkt gelegene Proteine besitzen Quotienten von ca. 1 und haben gleichermaßen effizient an beide Oligonukleotide gebunden. Dagegen haben Proteine mit einem abweichenden Verhältnis präferentiell an eines der beiden Oligonukleotide gebunden. Für das häufige Allel 'G' von rs2107595 konnten die Bindepartner E2F3, E2F4, TFDP1 und Rb1 identifiziert werden.

E2F3 und E2F4 gehören zur Familie der E2F-Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle im Zellzyklus und bei der Initiierung der DNA-Replikation spielen. [9, 66] Der Zellzyklus ist ein hoch regulierter Prozess und wird sowohl durch positive als auch negative Wachstumssignale während der G<sub>1</sub>-Phase gesteuert. Am G<sub>1</sub>/S-Kontrollpunkt wird entschieden, ob die Zelle in die Phase der DNA-Synthese eintritt oder die weitere Proliferation gestoppt wird und in G<sub>0</sub> arretiert. [92, 96] E2F-Proteine bilden zusammen mit einem Dimerisierungspartner aus der *differentiation-regulated transcrip-*

*tion factor-1 polypeptide*-Familie, TFDP1-3, Heterodimere, die an definierte DNA-Motive binden, die Expression von S-Phase-Genen aktivieren und den Eintritt in die S-Phase fördern (Abb. 1.6). [12] Die Aktivität dieser Transkriptionsfaktor-Komplexe wird durch die Rb-Proteinfamilie reguliert, welcher Rb1, Rb11 und Rb12 angehören. Rb-Proteine können an E2F/TFDP-Komplexe binden und deren Aktivität inhibieren. Dies ist der Fall bei ungünstigen Wachstumsbedingungen, unter denen eine weitere Zellteilung nicht sinnvoll wäre. Bei Aktivierung der Zelle durch Mitogene kommt es zu einer Phosphorylierung der Rb-Proteine durch Zyklin-abhängige-Kinasen (CDK) und ihrer Freisetzung aus dem Komplex. Die Aktivierung von S-Phase-Genen und Einleitung der DNA-Replikation ist die Folge. [8, 64, 66, 82]

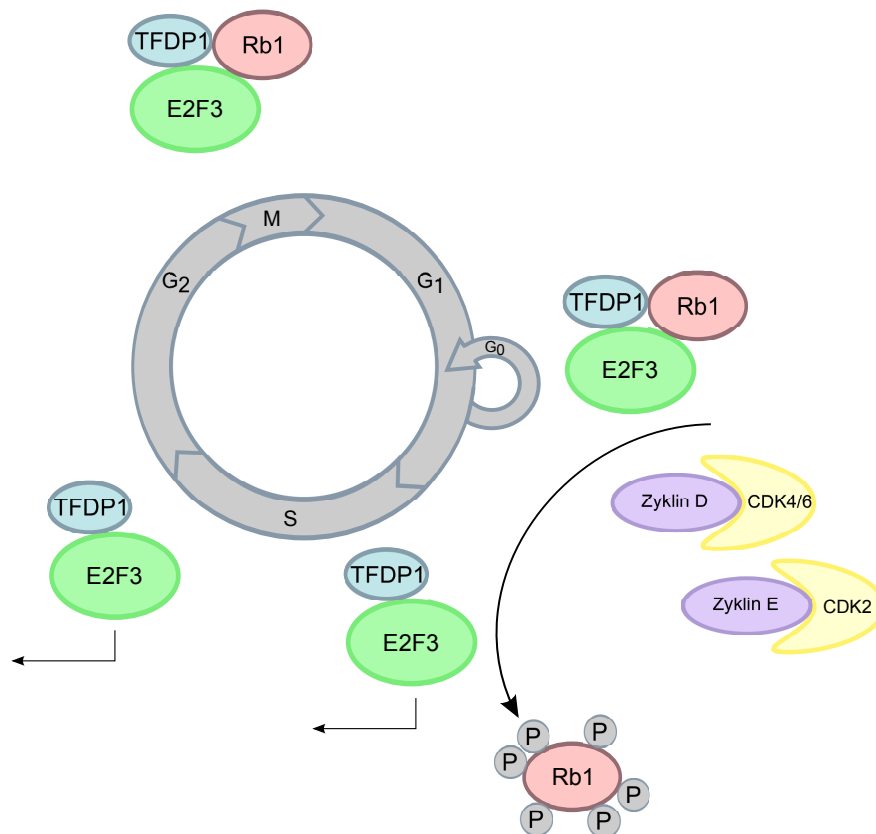


Abbildung 1.6: Der E2F3/Rb1-Komplex im Zellzyklus-Verlauf

Am G<sub>1</sub>/S-Übergang wird Rb1 durch Zyklin/CDK-Komplexe hyperphosphoryliert, was eine Auflösung des Komplexes mit E2F3/TFDP1 bewirkt, so dass dessen aktivierende Funktion als Transkriptionsfaktor nicht weiter gehemmt wird. Dadurch wird eine positive Regulation des Zellzyklus möglich, indem benötigte S-Phase-Gene wie Zyklin E oder DNA-Polymerase transkribiert werden können. Gegen Ende von G<sub>2</sub> wird Rb1 durch Typ I Protein-Phosphatasen dephosphoryliert, wodurch eine erneute Komplexbildung mit E2F3 ermöglicht und die aktivierende Funktion der E2Fs inhibiert wird. [14, 28, 35, 98]

Die Identifikation Allel-spezifischer Interaktionspartner am Haupt-SNP rs2107595 wird gestützt durch bioinformatische Analysen mit Hilfe der TRANSFAC-Datenbank [102], die zur Identifikation eines E2F3-Bindemotivs in der Sequenz des häufigen, nicht aber des Risikoallels von rs2107595 führten. (Abb. 1.7). Die Konsensussequenzen der E2F-Transkriptionsfaktoren sind sich sehr ähnlich und so ist es wahrscheinlich, dass die in PWAS identifizierten E2F3- und E2F4-Proteine dieses Bindemotiv nutzen. [106] Zusammen mit den PWAS-Daten deutete dies auf eine Interaktion von E2F3/4 und der rs2107595-Sequenz hin, die durch das Risikoallel verhindert wird.

GGGACAAAAACAT <b>TTTCCC</b> GCAAAAAAGAATGTACAAGCACA	häufiges Allel
<b>TTTCCCGC</b>	E2F3-Bindungsstelle
GGGACAAAAACAT <b>TTTCCC</b> ACAAAAAAGAATGTACAAGCACA	Risikoallel

Abbildung 1.7: rs2107595 liegt innerhalb einer E2F3-Bindungsstelle  
Mit Hilfe der TRANSFAC *Software* konnte eine E2F3-Bindungsstelle (TTTCCCGC) vorhergesagt werden, die durch den Basenaustausch zum Risikoallel 'A' zerstört oder stark verändert wurde und nicht mehr identifiziert werden konnte.

Mit Hilfe des PWAS-Ansatzes konnten auch bei einigen weiteren SNPs der 7p21.1-Region Allel-spezifische Bindepartner identifiziert werden. Jedoch wurde bei keinem anderen SNP ein vollständiger Transkriptionskomplex gefunden. Auch die bioinformatische Bestätigung der Bindung war in keinem anderen Fall möglich. Daher fokussiert diese Arbeit auf die Interaktion des rs2107595-SNPs mit E2F/Rb-Komplexen. Eine Beteiligung weiterer SNPs in der Risikoregion bzw. anderer Interaktionspartner an der Regulation von *HDAC9* kann aber nicht ausgeschlossen werden.

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die Assoziation des 7p21.1-Lokus mit atherosklerotischem Schlaganfall beruht auf Einzelpolymorphismen (SNPs), die ausnahmslos außerhalb kodierender Bereiche lokalisiert sind. Einige dieser Polymorphismen, darunter der Haupt-SNP rs2107595, liegen zudem in Regionen mit verstärkter Histonmodifikations-Aktivität sowie erhöhter DNase I-Hypersensitivität, beides Marker für genregulatorische Prozesse. Weiterhin konnten für rs2107595 *in vitro* Allel-spezifische Unterschiede bei der Interaktion mit Transkriptionsfaktoren aus der E2F-Familie beobachtet werden. Zusammen deutete dies darauf hin, dass das erhöhte Erkrankungsrisiko des 7p21.1-Lokus durch transkriptionelle Prozesse vermittelt werden könnte. Zu Beginn dieser Arbeit bestanden daher folgende Fragestellungen:

1. Ist der rs2107595-SNP an transkriptionellen Regulationsprozessen beteiligt?
2. Welches Gen könnte durch diese genregulatorischen Prozesse kontrolliert werden? Aufgrund seiner räumlichen Nähe zum 7p21.1-Lokus sowie seiner beschriebenen Funktion bei Immunprozessen erschien *HDAC9* der vielversprechendste Kandidat zu sein.

Aus diesen Fragestellungen ergaben sich folgende Zielsetzungen:

- Zunächst sollte in humanen Zelllinien der Einfluss der beiden rs2107595-Allele auf die Transkription eines Reportergens untersucht und damit eine mögliche regulatorische Funktion nachgewiesen werden.
- Weiterhin sollten Schritte zur Identifizierung eines Zielgens unternommen werden, das einer möglichen, durch die Risikoregion vermittelten transkriptionellen Regulation unterliegen könnte. Dazu sollten Expressionsstudien in Zellen humaner Spender durchgeführt werden.
- Schließlich sollte der initiale Befund einer Allel-spezifischen Interaktion zwischen dem Haupt-SNP rs2107595 und dem E2F3/4-Rb1-Transkriptionskomplex bestätigt und mögliche funktionelle Konsequenzen auf transkriptionelle Prozesse untersucht werden.



## 2 Ergebnisse

### 2.1 Die rs2107595-Allele zeigen differentielle *Enhancer*-Aktivitäten im Luziferase-Assay

Um mögliche differentielle Effekte der rs2107595-Allele auf Transkriptionsprozesse experimentell zu untersuchen, wurde ein Luziferase-Reporterassay etabliert. Hierfür verwendeten wir ein Reporterkonstrukt, in dem die Transkription des Luziferasegens durch eine Minimalvariante des murinen HSP68-Promotors reguliert wird. Auf der 5'-Seite dieses Promotors wurden 40 Nukleotide lange, genomische Sequenzen mit dem häufigen und dem Risikoallel eingefügt, um ihren Einfluss auf die basale Transkriptionsaktivität zu untersuchen (Abb. 2.1).



Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der im Luziferase-Assay verwendeten Reporterkonstrukte.

Der Luziferase-Reportervektor enthält zur Steuerung der Basisaktivität einen Minimalpromotor (mHSP68) sowie das *Photinus pyralis* Luziferasegen (Luc). Die regulatorischen Elemente (grau) stellen 40 *Bp* lange Sequenzen mit der rs2107595-Region dar, die entweder das häufige oder das Risikoallel enthalten. Die Transkription der Luziferase wird durch das jeweilige regulatorische Element und den Minimalpromotor reguliert.

Als Zellsystem wurden die zwei humanen Zelllinien HeLa und HEK293T gewählt, die gut charakterisiert sind und sehr häufig für Reporter-Experimente verwendet werden. [45, 59] Die beiden rs2107595-Reporter-Gen-Vektoren sowie der Ausgangsvektor als Kontrolle wurden in parallelen Ansätzen in beide Zelllinien transient transfiziert und nach 24 *h* Proteinlysate hergestellt. Die quantitative Bestimmung der gebildeten Luziferasemenge erfolgt über ihre enzymatische Aktivität, die nach Zugabe

des Substrats Luziferin anhand der Menge des emittierten Lichts in einem Lumino-  
meter gemessen wird. Die Lichtintensität verhält sich dabei proportional zur Menge  
an exprimiertem Enzym und lässt Rückschlüsse auf die transkriptionelle Aktivität des  
regulatorischen Elements im verwendeten Reportervektor zu. Abbildung 2.2 zeigt die  
Luziferase-Aktivitäten der rs2107595-Konstrukte relativ zur Aktivität des Kontroll-  
vektors (Kon). In HeLa-Zellen zeigte sich zwar sowohl für das häufige als auch für das  
Risikoallel eine signifikant verstärkte Aktivität, die des häufigen Allels (G) war jedoch  
um 21 % gegenüber dem Risikoallel (A) erhöht. Auch in HEK293T-Zellen zeigte das  
häufige Allel eine signifikante Erhöhung, während für das Risikoallel nur eine Tendenz  
zu beobachten war, die keine Signifikanz erreichte. Dies deutete auf eine zwar geringe,  
aber messbare Verstärkung der transkriptionellen Aktivität des häufigen Allels hin.

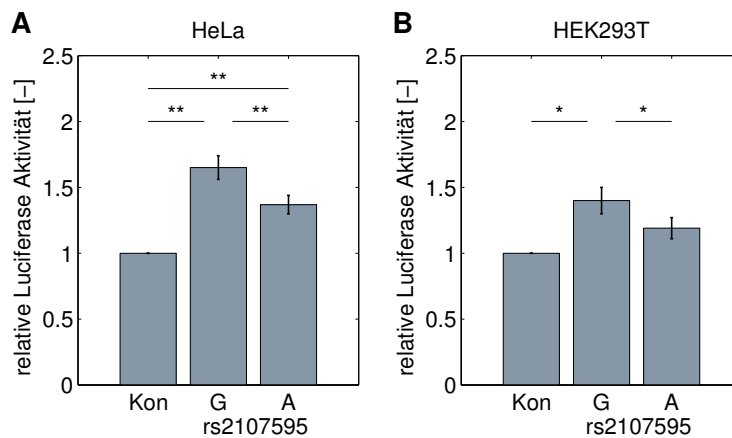


Abbildung 2.2: Das häufige rs2107595-Allel wirkt als stärkerer *Enhancer* als das Risikoallel. Die relative Luziferase-Aktivität ist für das häufige (G) als auch für das Risikoallel (A) im Vergleich zur Kontrolle (Kon) in HeLa-Zellen signifikant erhöht. Ebenso in HEK293T-Zellen zeigten beide Allele eine erhöhte regulatorische Aktivität, die für das häufige Allel Signifikanz erreichte. In beiden Zelllinien wirkte das häufige rs2107595-Allel signifikant als stärkerer *Enhancer* im Vergleich zum Risikoallel, in HeLa-Zellen betrug die Steigerung 21 %, in HEK293T-Zellen 17 %. n=7–10

## 2.2 *HDAC9* als mögliches Kandidatengen

Als nächstes wandten wir uns der Frage zu, welches der in der 7p21.1-Region liegenden Gene möglicherweise durch das rs2107595-Risikoallel beeinflusst wird. Dazu wurden mRNA-Expressionsanalysen zunächst in humanen Blutzellen und anschließend in Lymphoblastoid-Zelllinien und isolierten regulatorischen T-Zellen durchgeführt.

### 2.2.1 Die *HDAC9*-Spiegel sind in Blutzellen von Risikoallelträgern erhöht

Aus den Blutzellen gesunder Spender wurden sowohl DNA als auch RNA isoliert. Anhand der DNA wurden alle Proben bezüglich des rs2107595-SNPs durch Sequenzierung genotypisiert. Unter den 77 Spendern wurden 51 homozygote Träger des häufigen Allels, 22 heterozygote Träger und 4 homozygote Träger des Risikoallels identifiziert und für *real-time*PCR-Analysen herangezogen. Die Auswertung erfolgte über eine Normalisierung auf das *housekeeping*-Gen RPLP0, das ein ribosomales Protein kodiert, und relativ zu einer Kalibrator-Probe, welche für alle Analysen herangezogen wurde und als Referenz diente. Die TWIST1 und FERD3L mRNA-Spiegel waren generell sehr niedrig und lagen in einigen Proben unter der Detektionsgrenze, so dass diese Proben für die Auswertung nicht herangezogen werden konnten. Für keines der beiden Gene konnten signifikante Expressionsunterschiede im Hinblick auf die rs2107595-Allele festgestellt werden (Abb. 2.3 B, C). Im Gegensatz dazu war *HDAC9* in allen Proben gut detektierbar und es zeigte sich eine Dosis-abhängige Expression (Abb. 2.3 A). In homozygoten Trägern des häufigen Allels (GG) wurde die niedrigste Expression detektiert, in homozygoten Trägern des Risikoallels (AA) dagegen war sie um das Vierfache erhöht. Heterozygote Träger (GA) wiesen einen zweifach erhöhten Wert auf.

Es konnte also eine signifikante, Allel-abhängige Expressionsänderung der *HDAC9*-Spiegel festgestellt werden, was auf einen genregulatorischen Einfluss des Risikoallels hindeutete. Darüber hinaus stellte dieses Resultat einen weiteren, wichtigen Hinweis auf *HDAC9* als betroffenes Risikogen im 7p21.1-Lokus dar.

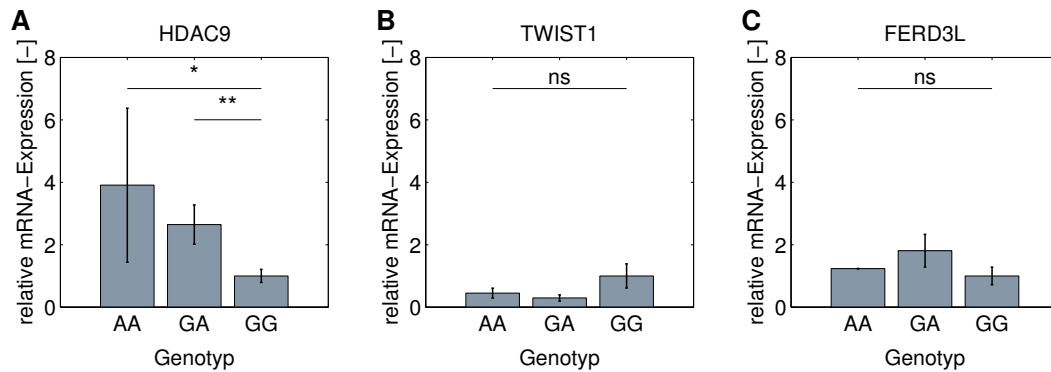


Abbildung 2.3: Relative mRNA-Expression von HDAC9, TWIST1 und FERD3L bezogen auf den Genotyp von rs2107595 in humanen Blutzellen.

A) HDAC9-Spiegel sind in homozygoten und heterozygoten Risikoallelträgern Dosisabhängig und signifikant erhöht (AA n=4, GA n=22, GG n=51). B, C) Für TWIST1 (AA n=4, GA n=3, GG n=22) und FERD3L (AA n=1, GA n=3, GG n=23) konnte keine Korrelation mit dem Allelstatus festgestellt werden.

### 2.2.2 Expressionsanalyse von HDAC9 in Lymphoblastoid-Zelllinien

Bei Lymphoblastoid-Zelllinien (LCL) handelt es sich um B-Zelllinien, die aus B-Lymphozyten individueller Spender durch eine Epstein-Barr-Virus-Behandlung immortalisiert werden. [87] Sie besitzen den Vorteil eines unbegrenzten Wachstums und werden daher häufig für Untersuchungen biochemischer Prozesse in Abhängigkeit eines definierten Genotyps verwendet. [19, 59, 91] Durch eine Kollaboration mit dem Max-Planck-Institut für Psychiatrie München erhielten wir Zugang zu einer großen Sammlung an LCL gesunder Kontrollen, deren rs2107595-Allelstatus bekannt war. Insgesamt standen 20 Linien zur Verfügung, je 10 mit homozygotem Genotyp für das häufige und das Risikoallel. Nach dessen Verifikation mit Hilfe des SNP-Genotypisierungs-TaqMan-Assays wurden die HDAC9 mRNA-Spiegel, die in LCL gut nachweisbar sind, durch *real-time* PCR bestimmt. Zur Auswertung wurden die Rohdaten auf das *housekeeping*-Gen RPLP0 normiert und relativ zu homozygoten Trägern des häufigen Allels dargestellt. Es zeigte sich bezogen auf den Genotyp kein Unterschied in der HDAC9-Expression (Abb. 2.4). Dies deutete darauf hin, dass sich die in Blutzellen beobachtete differenzielle HDAC9-Expression nicht in B-Zellen, sondern in einem anderen Blutzelltyp ereignet.

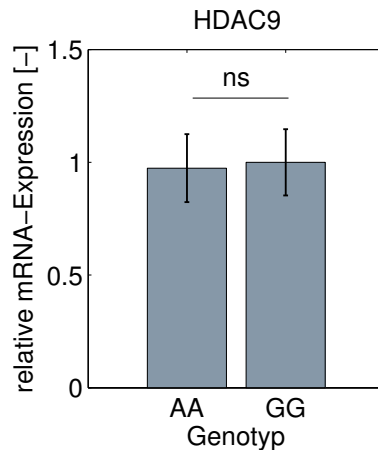


Abbildung 2.4: Relative mRNA-Expression von HDAC9 bezogen auf den Genotyp von rs2107595 in humanen Lymphoblastoid-Zelllinien (LCL).

Bei LCLs handelt es sich um immortalisierte B-Lymphozyten. Es ließ sich kein Allel-spezifischer Unterschied in der Expression von HDAC9 detektieren. AA n=10, GG n=10

### 2.2.3 Expressionsanalyse von HDAC9 und FOXP3 in isolierten regulatorischen T-Zellen

Für HDAC9 ist eine wichtige Rolle in regulatorischen T-Zellen ( $T_{\text{regs}}$ ) nachgewiesen worden, einem speziellen T-Zelltyp mit anti-inflammatorischen Eigenschaften und entscheidender Bedeutung bei der Atherosklerose (siehe Kapitel 1.3.2).  $T_{\text{regs}}$  sind zum einen gekennzeichnet durch die Oberflächenmarker CD4 und CD25, zum anderen wird der Transkriptionsfaktor FOXP3 als spezifischer Marker angesehen. Um einen möglichen Einfluss des rs2107595-Risikoallels auf die HDAC9- und FOXP3-Expression zu untersuchen, wurden  $T_{\text{regs}}$  aus Blutproben gesunder Spender isoliert.

#### 2.2.3.1 Isolierung und Genotypisierung

Als Ausgangsmaterial wurden ca. 50 ml frisch abgenommenes Vollblut gesunder Spender der Abteilung für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie des Klinikums Großhadern verwendet. Aus allen Proben wurde DNA isoliert und mit Hilfe des Genotypisierungs-TaqMan-Assays der jeweilige rs2107595-Allelstatus bestimmt.

Zur  $T_{\text{reg}}$ -Isolation wurden zunächst mittels Dichtegradienten-Zentrifugation die mononukleären Zellen des peripheren Bluts (PBMC) von Granulozyten und Erythrozyten abgetrennt und erschienen als sog. Interphase zwischen dem Blutplasma und

dem Separationsmedium (Ficoll). Zur Isolation von  $T_{\text{regs}}$  aus der PBMC-Fraktion wurden zunächst  $CD4^{-}$ -Zellen durch einen Mix aus monoklonalen Antikörpern depletiert. Dieser Mix besteht aus einer Vielzahl an Antikörpern gegen Oberflächenmarker, unter anderem CD8, CD14, CD15, CD19, CD56, wodurch zytotoxische T-Zellen, Monozyten, Granulozyten, B-Zellen und natürliche Killerzellen entfernt werden. Die dadurch erhaltene Fraktion an  $CD4^{+}$  Zellen wurde in einem zweiten Separationsschritt mit einem CD25-Antikörper behandelt, wodurch regulatorische T-Zellen gezielt angereichert wurden.

Zur Analyse mittels Durchflusszytometrie erfolgte die Anfärbung der Proben mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern CD45-VioBlue, CD4-FITC, CD25-PE sowie der CD25-Isotyp-Kontrolle IgG2b-PE (Maus). In Abbildung 2.5 ist das Ergebnis einer repräsentativen Messung dargestellt. Es wurde auf die  $CD45^{+}$  Leukozyten-Population gated (2.5 B, links) und auf die Oberflächenmarker CD4 und CD25 analysiert. Die erhaltene Zellpopulation repräsentiert regulatorische T-Zellen, die mit einer Reinheit von 93,3 % detektiert wurde (2.5 B, rechts). Um eine positive CD25-Färbung vom Hintergrundsignal des Antikörpers abzugrenzen, wurde im Vorfeld die  $CD45^{+}$  Zellpopulation (2.5 A, links) mit der CD25-Isotyp-Kontrolle sowie CD4 analysiert (2.5 A, rechts). Anhand dieser Negativkontrolle wurde eine Intensitätsgrenze festgelegt, die überschritten werden muss, um als positive Färbung zu gelten.

Insgesamt 56 Proben konnten mit einer durchschnittlichen Reinheit an regulatorischen T-Zellen von 91 % gewonnen werden.

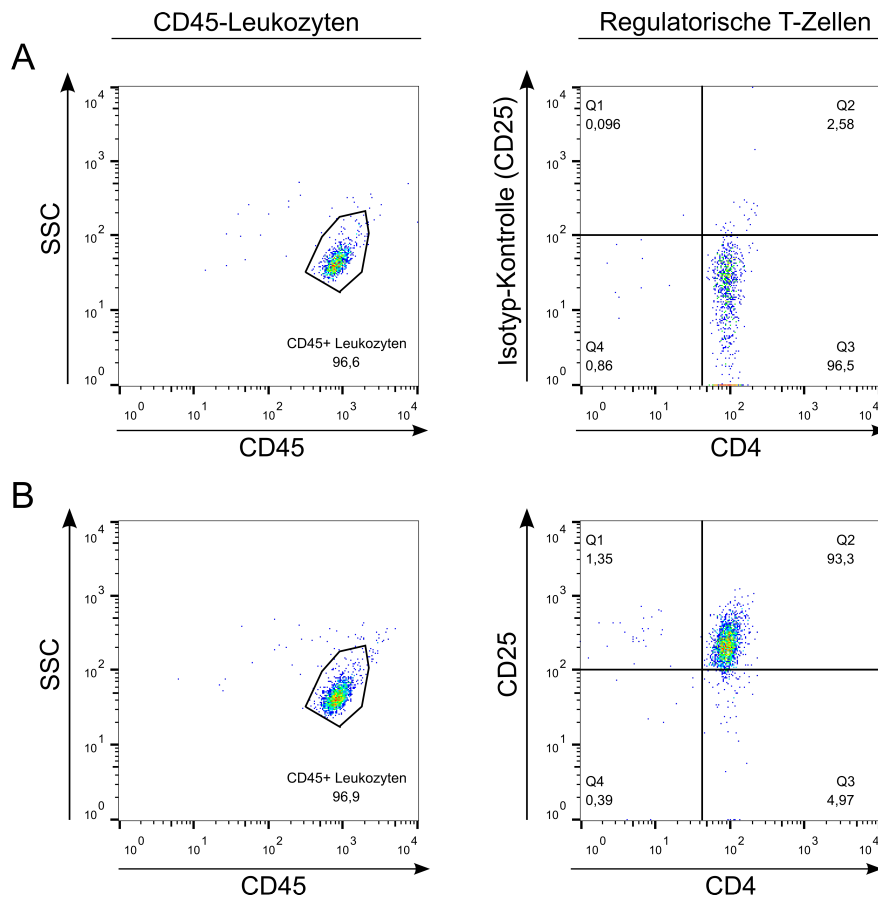


Abbildung 2.5: Durchflusszytometrische Analyse zur Überprüfung der Reinheit isolierter, regulatorischer T-Zellen.

Exemplarisch dargestellt für eine von 56 Proben. A) zeigt die Analyse auf  $CD45^+$  gatede Leukozyten (links), welche auf positive Färbung für CD4 und die Isotyp-Kontrolle des CD25-Antikörpers untersucht wurden (rechts). Dies diente der Ermittlung des Hintergrundsignals des CD25-Antikörpers und einer Festlegung der Intensitätsgrenze, die überschritten werden muss, um als positive Färbung zu gelten. B)  $CD45^+$  Leukozyten (links), welche positiv für beide Oberflächenmarker CD4 und CD25 sind, stellen regulatorische T-Zellen mit einer Reinheit von 93,3 % dar (rechts).

$T_{regs}$  stellen nur ca. 0,2 %–1 % der PBMCs dar und die Anzahl ist stark spenderspezifisch. Bei einer Aufreinigung mittels Säulen muss zudem auch mit Verlusten gerechnet werden. Daher konnten aus durchschnittlich  $7-9 \times 10^7$  PBMCs nur zwischen  $5 \times 10^4$  bis  $3 \times 10^5$   $T_{regs}$  isoliert werden.

Unter den gesammelten Proben befanden sich aufgrund der niedrigen Risikoallel-Frequenz nur zwei homozygote sowie elf heterozygote Träger des Risikoallels und 43 homozygote Träger des häufigen Allels.

### 2.2.3.2 Expressionsanalyse von HDAC9 und FOXP3

Die isolierten und genotypisierten Proben regulatorischer T-Zellen wurden für die Expressionsanalyse von HDAC9 sowie FOXP3 verwendet, das eine Schlüsselrolle in der Entwicklung und Funktionalität von T<sub>reg</sub>- einnimmt. Aus den gewonnenen T<sub>regs</sub> konnte eine RNA-Konzentration von max. 10 ng/μl isoliert werden. Für die Auswertung wurden die HDAC9 und FOXP3 mRNA-Spiegel auf das *housekeeping*-Gen RPLP0 normiert (Abb. 2.6). Aufgrund zu geringer Expressionsspiegel konnten für die HDAC9-Analyse nur 31 der 43 Proben mit dem homozygot häufigen Allel verwendet werden. Die Analyse der Expression von HDAC9 und FOXP3 ergab in Bezug auf den rs2107595-Genotyp jeweils keinen signifikanten Unterschied. Für FOXP3 zeigte sich in homozygoten Risikoallelträgern zwar eine Tendenz in Richtung erhöhter Spiegel, die jedoch keine Signifikanz erreichte. In heterozygoten sowie homozygoten Trägern des häufigen Allels waren sich keine Unterschiede in der Expression von FOXP3 feststellbar.

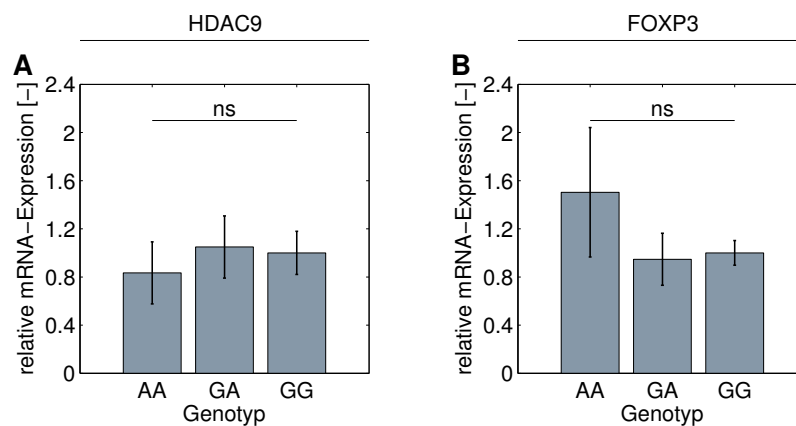


Abbildung 2.6: Relative mRNA-Expression von HDAC9 und FOXP3 bezogen auf den rs2107595-Genotyp in humanen, regulatorischen T-Zellen.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der mRNA-Expression von HDAC9 und FOXP3. HDAC9 zeigte bezogen auf die rs2107595-Genotypen eine gleichmäßige Expression. FOXP3 ist in homozygoten Risikoallelträgern tendenziell erhöht. In heterozygoten und homozygoten Trägern des häufigen Allel ergaben sich keine Unterschiede. AA n=2, GA n=11, GG n=31–43



### 2.3 Der E2F3/Rb1-Komplex bindet präferentiell an das häufige rs2107595-Allel

Die im Vorfeld durchgeführte Proteom-weite Assoziationsstudie von SNPs (PWAS), die eine massenspektrometrische Identifizierung von DNA-Bindepartnern ermöglicht, hatte eine Allel-spezifische Interaktion des häufigen rs2107595-Allels mit einem Transkriptionsfaktor-Komplex bestehend aus E2F3, TFDPI und Rb1 ergeben. Zur proteinbiochemischen Verifizierung dieses Befundes wurde der DNA-Pulldown mit nukleären Extrakten aus HeLa(-S3)-Zellen erneut durchgeführt und E2F3 im Western Blot mittels eines spezifischen Antikörpers analysiert. Im Fall des häufigen Allels war eine präferentielle Bindung zweier Banden mit einem Molekulargewicht von ca. 60 *kDa* und ca. 45 *kDa* nachweisbar (Abb. 2.7), welche die beiden E2F3-Isoformen E2F3a und E2F3b repräsentieren. Eine in beiden Proben auftretende, unspezifische Bande bei ca. 120 *kDa* diente als Ladekontrolle und demonstriert gleichmäßig aufgetragene Proteinmengen.

Die in der PWAS identifizierte Allel-spezifische Interaktion mit E2F3 konnte somit bestätigt werden. Darüber hinaus ließ die Western Blot-Analyse jedoch zwei weitere Schlussfolgerungen zu: erstens scheinen beide E2F3-Isoformen mit vergleichbarer Affinität an das häufige Allel zu binden, was aufgrund einer limitierten Anzahl an identifizierten Peptiden in der Massenspektrometrie nicht nachweisbar war. Zweitens ist auch am Risikoallel eine schwache Bindung zu erkennen, was auf die Existenz einer Restaffinität hindeutet.

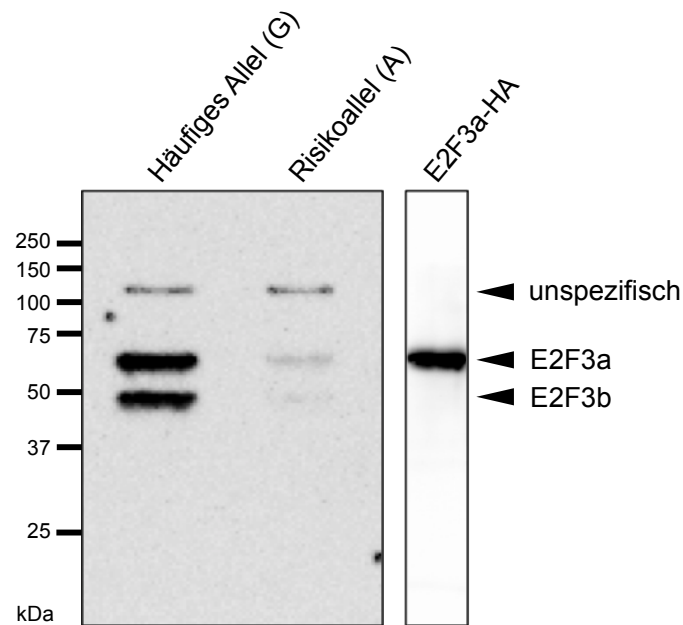


Abbildung 2.7: Präferentielle Bindung von E2F3 im Western Blot an das häufige rs2107595-Allel.

Synthetische, mit Desthiobiotin markierte Oligonukleotide, welche entweder das häufige oder das Risikoallel des rs2107595 SNPs enthielten, wurden mit Streptavidin-Sepharose *Beads* und anschließend mit nukleären Extrakten aus HeLa-Zellen inkubiert. Nach einem DNA-*Pulldown* erfolgte die Elution der Oligonukleotid-Protein-Komplexe durch Biotin-Zugabe und die Analyse der an die DNA gebundenen Proteine im Western Blot. Zur Detektion wurde ein gegen den C-Terminus gerichteter E2F3-Antikörper verwendet. Während beide Isoformen stark an das häufige Allel gebunden waren, zeigte sich eine deutlich reduzierte Bindungsaffinität an das Risikoallel. Eine in beiden Proben auftretende, unspezifische Bande diente als Ladekontrolle. In HeLa-Zellen überexprimiertes, HA-markiertes E2F3a wurde als Positivkontrolle verwendet und mit einem monoklonalen HA-Antikörper detektiert.

## 2.4 In humanen Zelllinien wird die HDAC9-Transkription durch E2F/Rb-Komplexe reguliert

Die bisher erhobenen Daten deuteten darauf hin, dass das häufige rs2107595-Allel transkriptionelle Effekte vermittelt und die Expression des *HDAC9*-Gens über einen E2F3-vermittelten Mechanismus regulieren könnte. Zur experimentellen Bestätigung dieser Hypothese sollte die endogene HDAC9-Expression in humanen Zelllinien in Abhängigkeit vom rs2107595-Allelstatus analysiert werden. Es wurden daher zunächst verschiedene humane Zelllinien auf ihren rs2107595-Genotyp hin durch DNA-Sequenzierung untersucht.

### 2.4.1 Genotypisierung von HeLa- und HEK293T-Zellen

Das Ergebnis der Genotypisierung von HeLa(-S3)- und HEK293T-Zellen im Hinblick auf ihren rs2107595-Allelstatus ist in Abbildung 2.8 dargestellt. HeLa(-S3)-Zellen (im weiteren Verlauf als HeLa-Zellen bezeichnet) sind homozygot für das häufige Allel mit der intakten E2F3-Bindungsstelle, HEK293T-Zellen dagegen sind homozygot für das Risikoallel mit stark verringerter Bindungsaffinität (siehe Abb. 2.7). HeLa- und HEK293T-Zellen sind gut proliferierende und kultivierbare Zelllinien. HeLa-Zellen entstammen dem Gebärmutterhalskrebs von Henrietta Lacks und wurden somit durch Infektion mit dem humanen Papillomavirus (HPV) transformiert, während HEK293T-Zellen eine humane, embryonale Nierenzelllinie darstellen, die durch Infektion mit dem Adenovirus immortalisiert wurde und zudem noch das SV40 *Large* T-Antigen exprimiert. [21, 29] Diese DNA-Tumerviren teilen sich ähnliche Mechanismen der Zelltransformation und zielen auf die Aktivierung des Zellzyklus und damit einer unregulierten Zellproliferation ab. [62] HeLa- und HEK293T-Zellen sind also auf sehr ähnliche Weise transformiert worden und wurden daher im weiteren Verlauf dieser Arbeit als experimentelles Modell herangezogen.

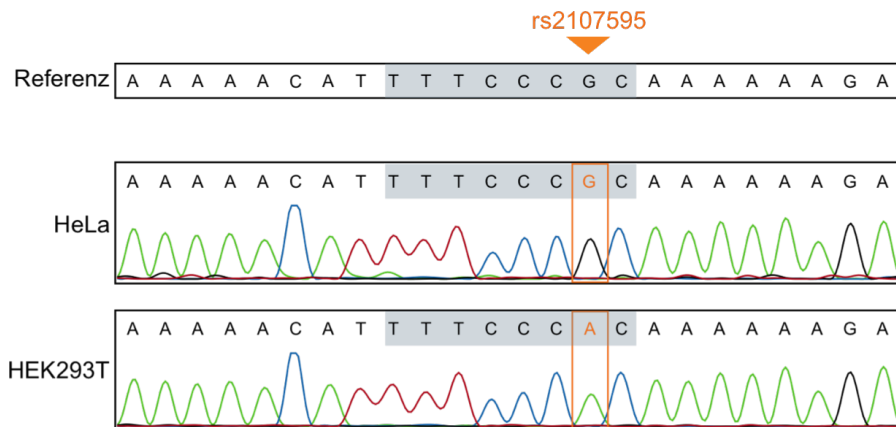


Abbildung 2.8: rs2107595-Allelstatus von HeLa(-S3)- und HEK293T-Zellen.

Die Referenzsequenz enthält das häufige Allel mit intakter E2F3-Bindungsstelle (grau hinterlegt). Sequenzchromatogramme zeigten an der SNP-Position jeweils ein Einzelsignal und somit Homozygotie an. HeLa(-S3)-Zellen besitzen demnach das häufige rs2107595-Allel, HEK293T-Zellen das Risikoallel mit zerstörter E2F3-Bindungsstelle.

## 2.4.2 Die endogene HDAC9-Expression ist E2F3a- und Rb1-abhängig

Um das endogene Expressionsverhalten von HDAC9 im Zusammenhang mit dem E2F3/Rb1-Komplex zu untersuchen, wurden zunächst Überexpressionsversuche durchgeführt. Hierzu wurden mit einem C-terminalen HA-Tag versehenes E2F3a sowie Rb1 in HeLa- und HEK293T-Zellen sowohl einzeln als auch in Kombination transfiziert. Als Kontrolle diente der Expressionsvektor ohne Insert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen geerntet und RNA sowie Proteine isoliert.

Das Ausmaß der jeweiligen Überexpression wurde durch quantitative *real-time* PCR (Abb. 2.9) mittels spezifischer Rb1 und E2F3-Primer, welche beide Isoformen amplifizieren, sowie im Western Blot (Abb. 2.11) überprüft. Auf mRNA-Ebene konnte in der Einzel- und Doppeltransfektion eine massive Expressionserhöhung sowohl von E2F3a als auch von Rb1 in beiden Zelllinien gezeigt werden.

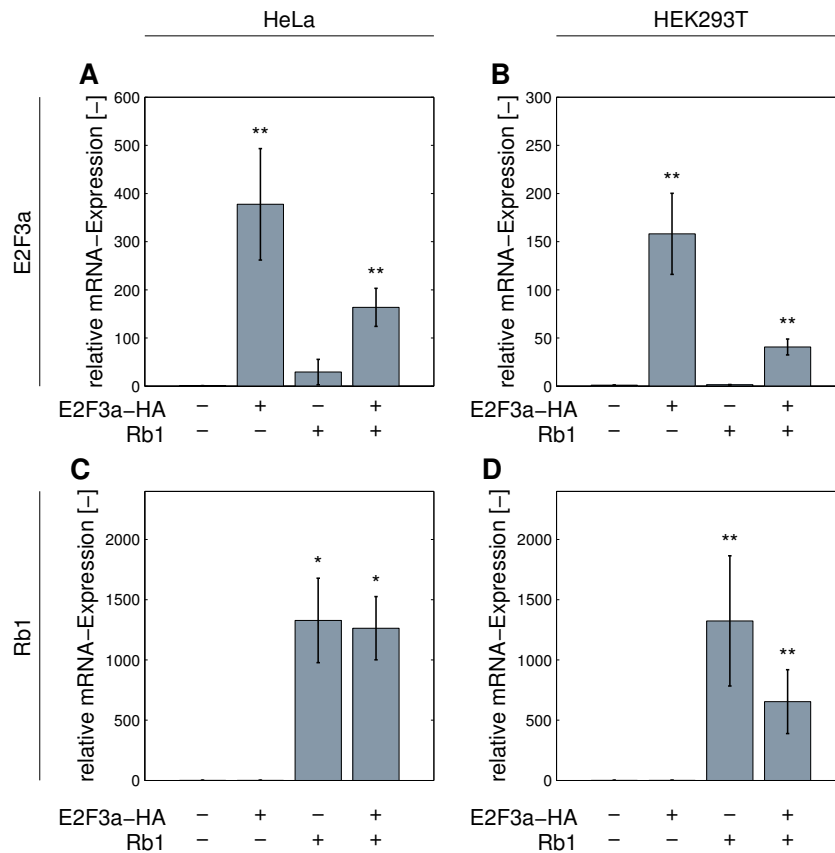


Abbildung 2.9: mRNA-Spiegel von E2F3a und Rb1 nach Überexpression in HeLa- und HEK293T-Zellen.

A, B) E2F3a ist in beiden Zelllinien in der Einzel- als auch in der Doppeltransfektion mit Rb1 signifikant erhöht. C, D) zeigt analog die Expression von Rb1 in HeLa- und HEK293T-Zellen. Rb1 ist in der Einzel- und Doppeltransfektion mit E2F3a signifikant erhöht. n=8

In denselben RNA-Proben wurden anschließend die HDAC9 mRNA-Spiegel bestimmt. Sowohl in HeLa- als auch in HEK293T-Zellen hatte die Überexpression von E2F3a und Rb1 einen deutlichen Effekt auf die HDAC9-Expression (Abbildung 2.10). In HeLa-Zellen zeigte sich eine signifikante Steigerung um etwa das 6-fache im Vergleich zur Kontrolle, in HEK293T-Zellen war eine 4-fache Steigerung nachweisbar. Im Gegensatz dazu hatte die Transfektion von Rb1 in beiden Linien eine Reduktion der HDAC9-Spiegel zur Folge. Nach gleichzeitiger Überexpression von E2F3a und Rb1 kam es in beiden Linien zu einer Verdopplung der HDAC9-Spiegel im Vergleich zur Kontrolle.

Die endogene HDAC9-Expression wurde also in beiden Zelllinien durch E2F3a bzw. Rb1 reguliert und die beobachteten quantitativen Unterschiede könnten auf den un-

terschiedlichen rs2107595-Genotyp zurückzuführen sein. Die in HEK293T-Zellen beobachteten Effekte könnten aufgrund des E2F3a-Überangebots hervorgerufen worden sein, wodurch möglicherweise trotz zerstörter E2F3-Bindungsstelle auch eine Bindung an das Risikoallel erfolgte.

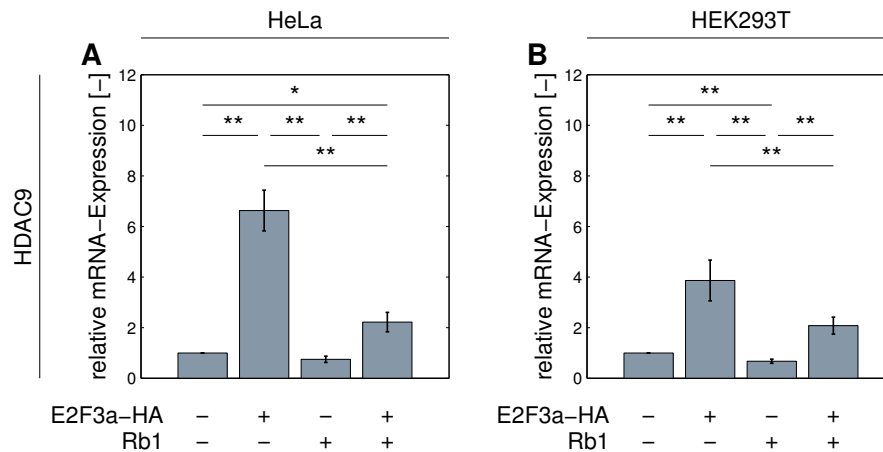


Abbildung 2.10: HDAC9-Spiegel nach Überexpression von E2F3a und Rb1 in HeLa- und HEK293T-Zellen.

Die Überexpression von E2F3a bewirkte eine signifikante Erhöhung der HDAC9-Expression um das 6-fache in A) HeLa- und um das 4-fache in B) HEK293T-Zellen. Rb1 hatte in beiden Zelllinien eine Reduktion von HDAC9 zur Folge, welche sich in HEK293T-Zellen als signifikant erwies. Eine gemeinsame Überexpression von E2F3a und Rb1 resultierte in einer 2-fachen Erhöhung von HDAC9 verglichen mit der Kontrolle. n=8

Die Effekte von E2F3a und Rb1 auf die HDAC9-Spiegel zeigten sich auch auf Proteinebene (Abb. 2.11). Im Western Blot wurde transfiziertes HA-getagtes E2F3a mit Hilfe eines monoklonalen anti-HA-Antikörpers, Rb1 durch einen polyklonalen anti-Rb1-Antikörper detektiert. Als Ladekontrolle diente die Detektion von Aktin, welches keine starken Unterschiede zeigte. HDAC9 kommt in mehreren Isoformen vor ([www.uniprot.org/uniprot/Q9UKVO](http://www.uniprot.org/uniprot/Q9UKVO)) und konnte mittels eines gegen ein C-terminales Epitop gerichteten Antikörpers sowohl in HeLa- als auch in HEK293T-Zellen als ca. 150 kDa große Bande detektiert werden, was sehr wahrscheinlich dem 1069 Aminosäuren kodierenden Transkript entspricht. Der Unterschied zum berechneten Molekulargewicht ergibt sich vermutlich durch posttranslationale Modifikationen. [72] In HeLa-Zellen zeigte sich eine leichte Erhöhung von HDAC9 sowohl in der E2F3a-Einzeltransfektion als auch in der Kombination mit Rb1. Dies spiegelt im Wesentlichen die auf mRNA-Ebene beobachteten Effekte wieder. Die quantitativen Unterschiede waren jedoch nicht so stark ausgeprägt, was daran liegen könnte, dass die Translati-

on von mRNA in Protein eine längere Zeitspanne in Anspruch nimmt. In HEK293T-Zellen ist eine starke HDAC9-Erhöhung in der E2F3a-transfizierten Probe detektierbar, nicht jedoch in der Doppeltransfektion, wie sie auf mRNA-Ebene zu beobachten ist. Möglicherweise wird die HDAC9-Expression auch auf translationaler Ebene reguliert.

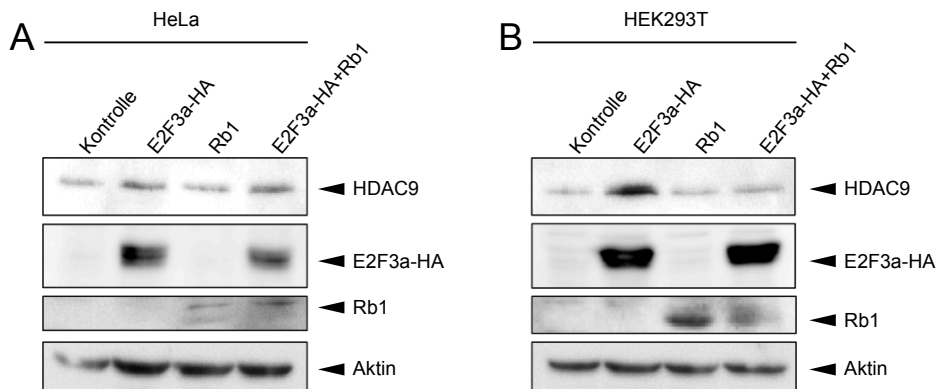


Abbildung 2.11: Überexpression von E2F3a sowie Rb1 und resultierende HDAC9-Expression auf Proteinebene in HeLa- und HEK293T-Zellen.

Überexprimiertes E2F3a-HA wurde als ca. 60 *kDa*-Bande detektiert. Bei dem verwendeten Rb1-Konstrukt handelte es sich um eine verkürzte Rb1-Variante, die auf Höhe von ca. 60 *kDa* detektierbar war. HDAC9 war als ca. 150 *kDa*-Bande nachweisbar, was wahrscheinlich dem 1069 Aminosäuren langen Transkript entspricht. In HeLa-Zellen war in der E2F3a-Einzel- als auch Doppeltransfektion mit Rb1 eine leichte Erhöhung von HDAC9 zu beobachten. In HEK293T-Zellen konnte nach der E2F3a-Einzeltransfektion eine Erhöhung von HDAC9 beobachtet werden, während im Einzelansatz von Rb1 sowie in der Doppeltransfektion kein Unterschied feststellbar war. Aktin (ca. 43 *kDa*) diente als Ladekontrolle.

Zur Überprüfung, ob die transkriptionelle Regulation von HDAC9 durch E2F3a und Rb1 innerhalb der HDAC-Familie spezifisch ist, wurden HDAC4 und 7 analysiert, welche ebenfalls der Klasse IIa angehören. Wie HDAC9 werden auch HDAC4 und 7 v.a. im Herzen, Gehirn und Muskelzellen exprimiert und weisen eine ähnliche Primärstruktur auf. [32, 85, 105] Nach Überexpression von E2F3a und Rb1 wurden die mRNA-Spiegel von HDAC4 und HDAC7 untersucht (Abb. 2.12). Für HDAC4 zeigten sich weder in HeLa- noch in HEK293T-Zellen signifikante Unterschiede (Abb. 2.12 A, B). Die Expression von HDAC7 zeigte in HeLa-Zellen eine geringfügige Reduktion in der Doppeltransfektion von E2F3a und Rb1 verglichen mit der Kontrolle, ansonsten aber keine signifikanten Unterschiede. (Abb. 2.12 C). In HEK293T-Zellen konnten keine Expressionsunterschiede von HDAC7 nachgewiesen werden (Abb. 2.12 D). E2F3a und Rb1 scheinen somit einen spezifischen Effekt auf HDAC9 auszuüben.

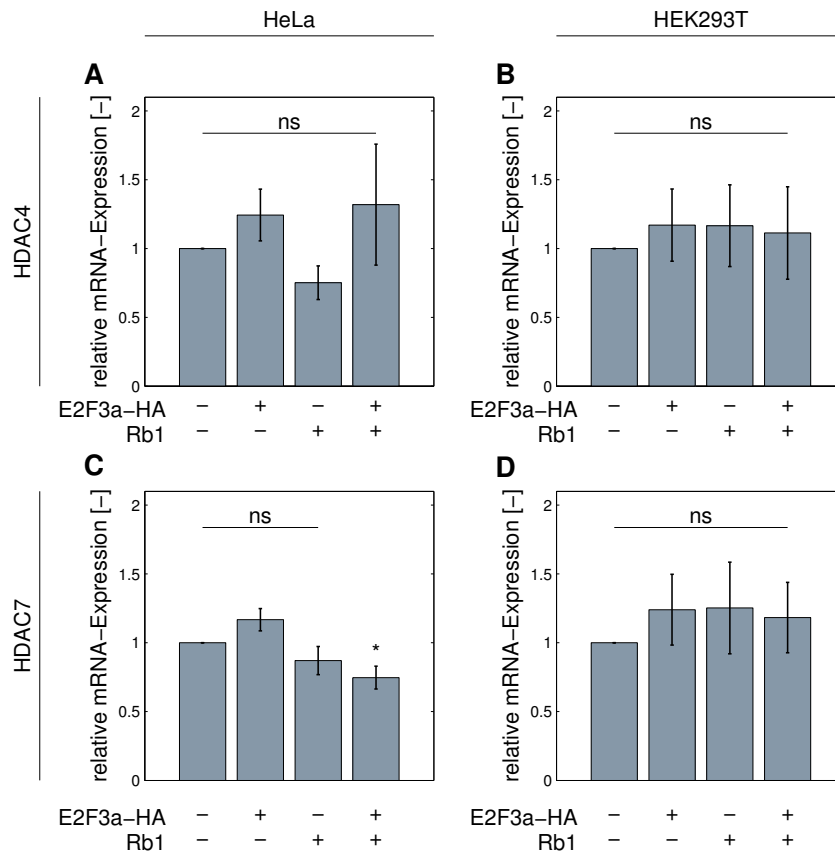


Abbildung 2.12: mRNA-Spiegel von HDAC4 und HDAC7 nach Überexpression von E2F3a und Rb1 in HeLa- und HEK293T-Zellen.

A, B) Für HDAC4 zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in HeLa- und HEK293T-Zellen. C, D) Auch für HDAC7 ergaben sich mit Ausnahme einer geringfügigen Reduktion nach der E2F3a/Rb1-Doppeltransfektion in HeLa-Zellen keine signifikanten Veränderungen. n=8



### 2.4.3 Ein E2F3/E2F4-Knockdown führt zur Allel-spezifischen Reduktion der HDAC9-Expression

In den beschriebenen Überexpressions-Experimenten zeigten sich zwar sowohl in HeLa-Zellen (häufiges Allel) als auch in HEK293T-Zellen (Risikoallel) ein Effekt auf HDAC9, allerdings wurden Unterschiede in der Effektstärke beobachtet, die durchaus auf dem unterschiedlichen rs2107595-Allelstatus beruhen könnten. Um den Einfluss von endogenem E2F3 und Rb1 zu untersuchen, wurde die Methode der RNA-Interferenz (RNAi) verwendet, mit deren Hilfe die Expression von Genen gezielt reduziert werden kann. [39] Neben E2F3 und Rb1 wurden weitere Zielproteine analysiert: E2F4, da es in der PWAS ebenfalls als Allel-spezifischer Bindungspartner identifiziert worden war und als transkriptioneller Aktivator ähnliche Funktionen wie E2F3 übernehmen kann [46]; Rb1 und Rb12, zwei Rb1-Homologe, die teilweise redundante Funktionen zu Rb1 besitzen. RNA-Interferenz basiert auf der Verwendung von *small interfering* RNAs (siRNAs), welche die Degradation von mRNAs aufgrund ihrer komplementären Sequenz fördern und in den sog. *RNA-induced silencing complex* (RISC) eingebaut werden. [42] Innerhalb dieses Komplexes wird dann die Ziel-mRNA gespalten und somit die Expression des entsprechenden Gens reduziert. [41]

Um möglichst effiziente *Knockdowns* zu erzielen wurden *Pools* bestehend aus je vier siRNAs verwendet, die entweder gegen E2F3 oder E2F4 gerichtet sind. Die einzelnen siRNAs des verwendeten E2F3-*Pools* sind homolog zu Sequenzen des C-Terminus und erfassen somit beide Isoformen a und b. Es wurden sowohl in HeLa- als auch in HEK293T-Zellen Einzeltransfektionen der siRNA-Pools für E2F3 (siE2F3) und E2F4 (siE2F4) sowie eine Doppeltransfektion durchgeführt, siehe Abbildung 2.13. Als Negativkontrolle wurde ein sog. *non-targeting Pool* aus siRNAs (siKontrolle) verwendet, welche keine Homologie zu humanen Gensequenzen aufweisen und zu keinerlei *Knockdowns* führen.

Im Fall von E2F3 konnte die Expression sowohl in HeLa- als auch in HEK293T-Zellen durchschnittlich um 50–60 % gesenkt werden (Abb. 2.13). Bei E2F4 wurden Werte zwischen 50 % und 70 % erreicht. Vermutlich durch die hohe Sequenzhomologie zwischen E2F3 und E2F4 bedingt, wurden bei den Einzeltransfektionen auch *Knockdown*-Effekte auf das jeweilige andere Gen beobachtet.

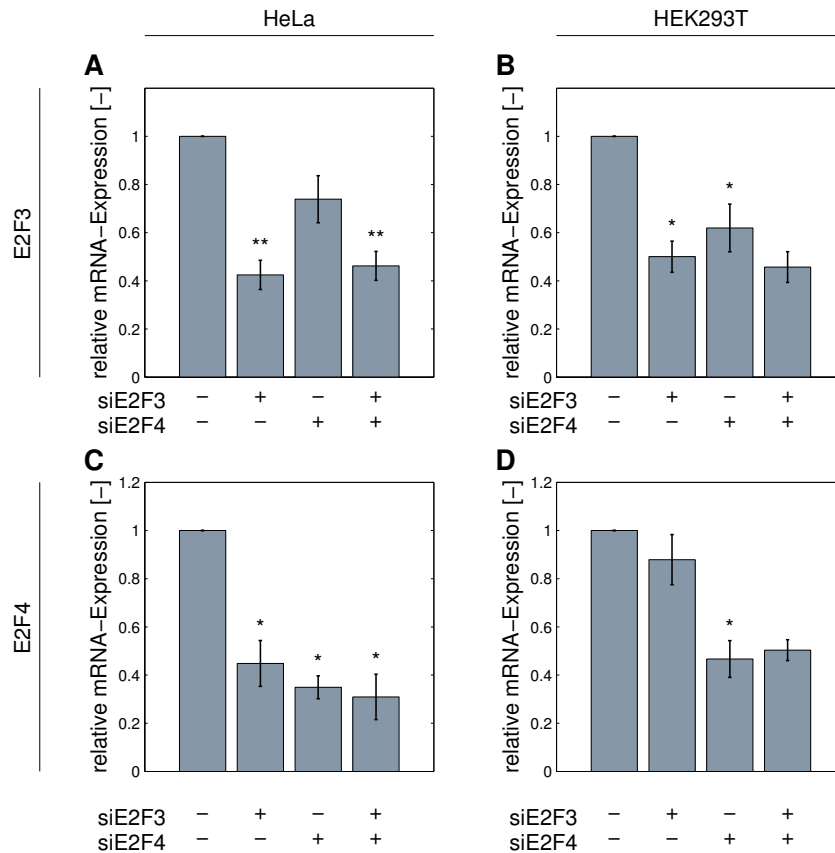


Abbildung 2.13: Effizienz der E2F3- und E2F4-Knockdowns in HeLa- und HEK293T-Zellen. A) Die Behandlung mit siE2F3 führte in HeLa-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der E2F3-Expression um 50–60 % im Einzel- und Doppelansatz. B) In HEK293T-Zellen konnte im siE2F3-Einzelansatz eine signifikante Reduktion von E2F3 um ca. 50 % beobachtet werden, welche ähnlich stark im Doppelansatz auftrat, jedoch keine Signifikanz erreichte. Wahrscheinlich aufgrund von Sequenzhomologien reduzierte sich auch die Expression von E2F3 nach siE2F4-Behandlung um ca. 20 % bzw. 40 % . C) Die Expression von E2F4 wurde in HeLa-Zellen signifikant durch siE2F4 als auch siE2F3 um 50–70 % verringert, während in D) HEK293T-Zellen E2F4 durch siE2F4 im Einzelansatz signifikant um ca. 55 % reduziert wurde, im Doppelansatz um ca. 50 % und das Signifikanzniveau nicht ganz erreicht wurde. n=6–8

Bei der Analyse der HDAC9-Expression wurde in HeLa-Zellen mit intakter E2F3-Bindungsstelle sowohl nach E2F3- als auch E2F4-Knockdown eine Verringerung um 40–50 % beobachtet (Abb. 2.14). Dies deutete darauf hin, dass auch E2F4 in die Regulation von HDAC9 involviert ist. In HEK293T-Zellen dagegen zeigten sich in keinem Fall signifikante Veränderungen in der HDAC9-Expression. Dieses Ergebnis stimmte mit dem Fehlen eines E2F3-Bindungsmotivs überein.

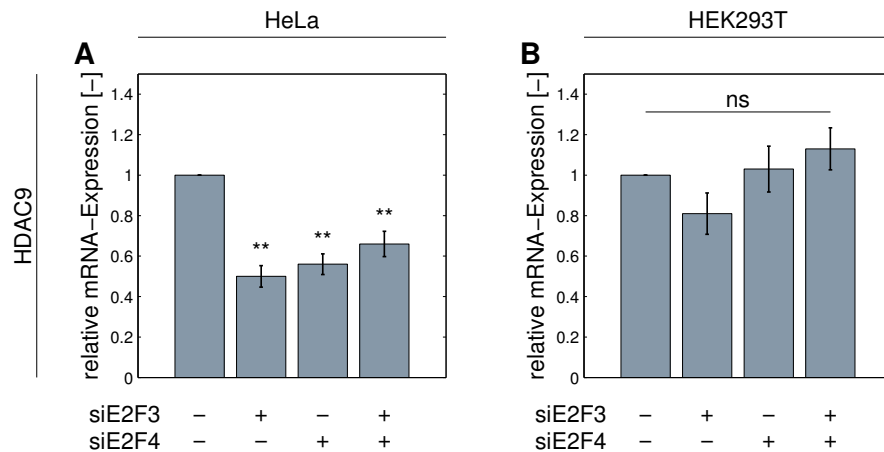


Abbildung 2.14: HDAC9-Expression nach *Knockdowns* von E2F3 sowie E2F4 auf mRNA-Ebene in HeLa- und HEK293T-Zellen.

A) In HeLa-Zellen bewirkten die *Knockdowns* von E2F3 und E2F4 eine signifikante Reduktion der HDAC9-Expression. B) In HEK293T-Zellen waren keinen signifikanten Effekte auf die Transkription von HDAC9 nachweisbar. n=6–8

Die auf mRNA-Ebene beobachtete Reduktion konnte auch auf Proteinebene im Wesentlichen gezeigt werden (Abb. 2.15). Sowohl die durch die *Knockdowns* verringerten E2F3- und E2F4-Spiegel als auch die Veränderungen der HDAC9-Spiegel wurden im Western Blot reproduziert.

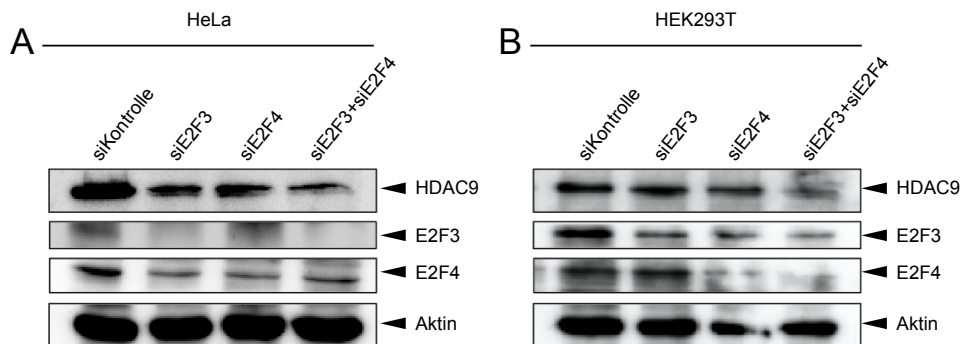


Abbildung 2.15: *Knockdowns* von E2F3 sowie E2F4 und resultierende HDAC9-Expression auf Proteinebene in HeLa- und HEK293T-Zellen.

Die Behandlung von HeLa- und HEK293T-Zellen mit siE2F3 und siE2F4 bewirkte deren Expressionerniedrigung auch auf Proteinebene (E2F3 ca. 45 kDa, E2F4 ca. 60 kDa). Zur Detektion auf einer Membran wurde sich auf E2F3b und E2F4 beschränkt. In HeLa-Zellen resultierte dies in einer verringerten HDAC9-Expression (ca. 150 kDa), während in HEK293T-Zellen kein Unterschied feststellbar war. Aktin (ca. 43 kDa) diente jeweils als Ladekontrolle.

Wie bei den Überexpressions-Experimenten (siehe Kapitel 2.4.2) wurde auch hier die Spezifität der Effekte innerhalb der HDAC-Familie überprüft und die mRNA-Spiegel von HDAC4 und HDAC7 analysiert. Auch wenn sich nach Einzeltransfektion von siE2F3 in HeLa-Zellen sowie in der Doppeltransfektion von siE2F3 und siE2F4 in HEK293T-Zellen eine Tendenz zu erhöhter HDAC4-Expression zeigte, konnten in keinem Fall signifikante Unterschiede festgestellt werden (Abb. 2.16). Dies bestätigte, dass eine E2F/Rb-abhängige Regulation nur spezifisch bei HDAC9 zu beobachten ist.

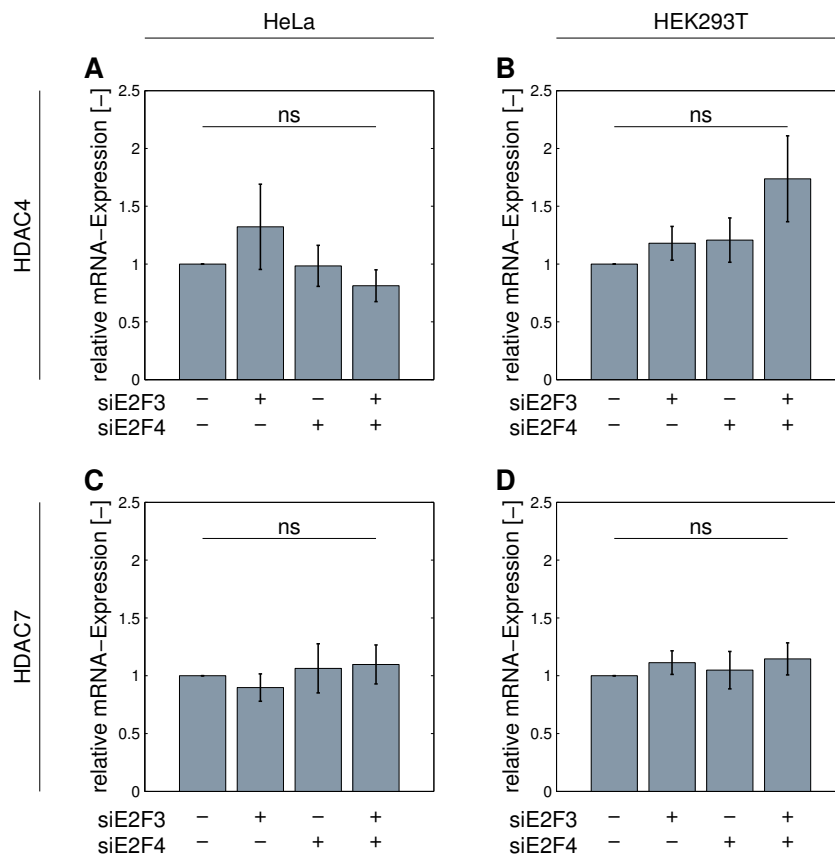


Abbildung 2.16: HDAC4- und HDAC7 Expression nach *Knockdowns* von E2F3 sowie E2F4 auf mRNA-Ebene in HeLa- und HEK293T-Zellen.

Eine Tendenz zu erhöhten HDAC4-Spiegeln wurde nach Einzeltransfektion von siE2F3 in HeLa-Zellen (A) sowie in der Doppeltransfektion von siE2F3 und siE2F4 in HEK293T-Zellen (B) beobachtet. In keinem der experimentellen Ansätze zeigten sich jedoch nach E2F3- und E2F4-*Knockdowns* signifikante Unterschiede in der Expression von HDAC4 (A, B) oder HDAC7 (C, D). Eine Tendenz zu erhöhten HDAC4-Spiegeln wurde nach Einzeltransfektion von siE2F3 in HeLa-Zellen (A) sowie in der Doppeltransfektion von siE2F3 und siE2F4 in HEK293T-Zellen (B) beobachtet. n=6–8

#### **2.4.4 *Knockdown* von Rb-Proteinen führt zur Allel-spezifischen Erhöhung der HDAC9-Expression**

Zur weiteren Untersuchung der Rolle von E2F/Rb-Komplexen bei der Regulation von HDAC9 wurden siRNA-basierte *Knockdowns* von Rb1 und den beiden weiteren Mitgliedern der Rb-Proteinfamilie, Rbl1 und Rbl2, durchgeführt. Wie in Kapitel 2.4.3 beschrieben, wurden Zielgen-spezifische *Pools* aus je vier verschiedenen siRNAs einzeln und in Kombination in HeLa- und HEK293T-Zellen transfiziert. Für Rb1 konnte in beiden Zelllinien eine Reduktion der Expression um ca. 80 % erzielt werden (Abb. 2.17 A, B). Bei Rbl1 wurde in HeLa-Zellen eine Reduktion von 40–60 % erreicht, in HEK293T-Zellen betrug der Rückgang allerdings nur ca. 20–30 % und erreichte keine Signifikanz (Abb. 2.17 C, D). Für Rbl2 lag die Effizienz in HeLa- als auch in HEK293T-Zellen bei 60–70 % (Abb. 2.17 E, F).

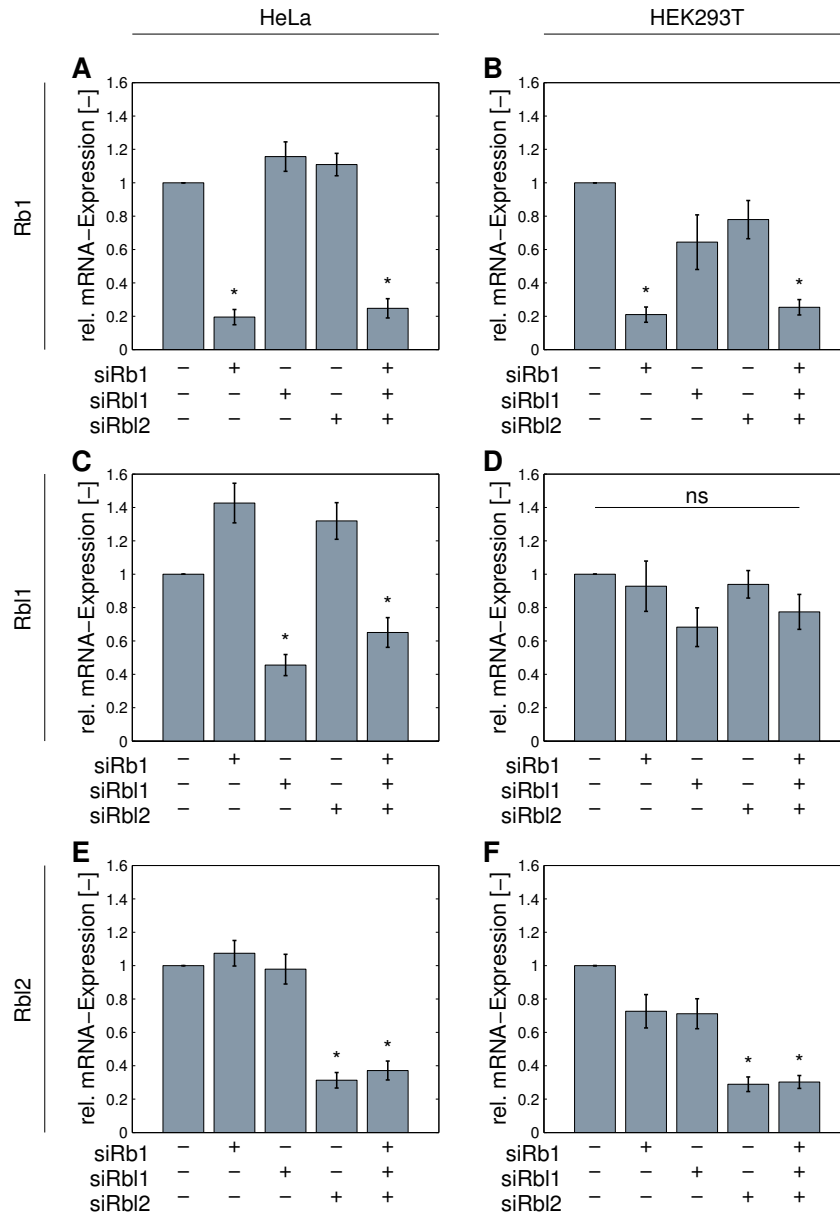


Abbildung 2.17: *Knockdowns* von Rb1, Rbl1 und Rbl2 auf mRNA-Ebene in HeLa- und HEK293T-Zellen.

A, B) Rb1 konnte in HeLa- und HEK293T-Zellen um 80 % reduziert werden. C) In HeLa-Zellen erniedrigte sich die Expression von Rbl1 um 40–60 %, in D) HEK293T-Zellen um 20 %. E, F) Der mRNA-Spiegel von Rbl2 reduzierte sich in HeLa- und HEK293T-Zellen um 60 % bzw. 70 %. n=6–7

Die *Knockdowns* der Mitglieder der Rb-Proteinfamilie konnten auch auf Proteinebene nachgewiesen werden (Abb. 2.18), wobei auffiel, dass die Rb-Proteine in HEK293T-Zellen stärker als in HeLa-Zellen exprimiert sind und einfacher zu detektieren waren. Obwohl die Rbl1-Spiegel in HEK293T-Zellen auf mRNA-Ebene nur um 20 % verringert waren, konnte eine Reduktion im Western Blot beobachtet werden. Rbl2 ist in HeLa-Zellen nur schwer detektierbar, aber auch hier ist dessen Erniedrigung auf Proteinebene ersichtlich, dagegen ist in HEK293T-Zellen der *Knockdown* deutlich zu erkennen.

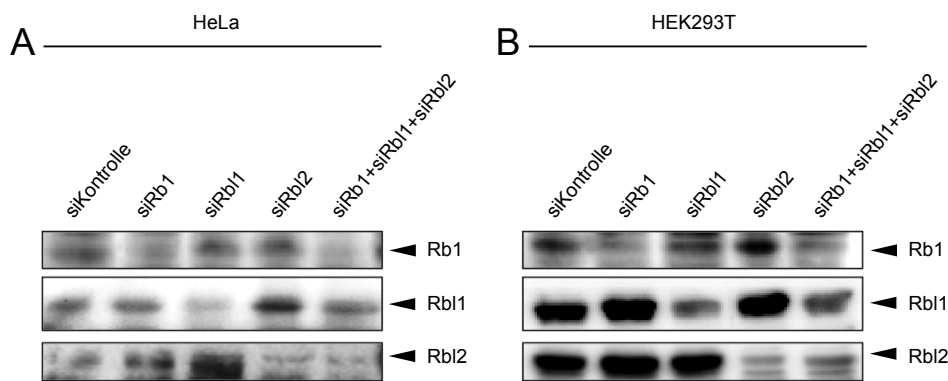


Abbildung 2.18: *Knockdowns* von Rb1, Rbl1 und Rbl2 auf Proteinebene in HeLa-Zellen und HEK293T-Zellen.

Es konnte eine Reduktion von Rb1 (ca. 107 *kDa*) sowie Rbl1 (ca. 121 *kDa*) nach jeweiliger Einzel- sowie Dreifach-siRNA-Behandlung in HeLa- und HEK293T-Zellen beobachtet werden. Der Rbl2-*Knockdown* (ca. 130 *kDa*) ist in HeLa-Zellen schwer detektierbar, eine Reduktion im Einzel- und Dreifachansatz aber erkennbar. In HEK293T-Zellen zeigte sich eine deutliche Reduktion von Rbl2.

Im Gegensatz zu den E2F3/4*Knockdowns* führte die Reduktion der Rb1- sowie Rbl1-Expression in HeLa-Zellen zu einer signifikanten Expressionserhöhung von HDAC9 um ca. 50 % (Abb. 2.19 A). Im Fall von Rbl2 wurde eine Tendenz in die selbe Richtung beobachtet, die jedoch keine Signifikanz erreichte. In der Regulation von HDAC9 scheint Rbl2 somit eine untergeordnete Rolle zu spielen. Im Dreifachansatz konnte jedoch eine Steigerung der HDAC9-Spiegel um etwa 100 % gemessen werden, was auf einen synergischen Effekt zweier oder mehrerer Rb-Proteine hindeutet.

Die beobachteten gegenläufigen Effekte von E2F- und Rb-Proteinen auf die HDAC9-Expression in den *Knockdown*-Experimenten in HeLa-Zellen unterstützen die Hypothese einer Regulation durch E2F/Rb-Komplexe. Durch die Reduktion von Rb1 und Rbl1 werden dem Komplex die hemmenden Faktoren entzogen, so dass sich die aktivierenden Effekte von E2F3 und vermutlich auch E2F4 verstärken. Rb1 komplexiert

vor allem mit E2F3, aber auch mit E2F4, wohingegen Rb1 bevorzugt mit E2F4 eine Bindung eingeht. [18, 52]

In HEK293T-Zellen dagegen führten die *Knockdowns* von Rb1, Rb11 und Rb12 zu keinen signifikanten Veränderungen der HDAC9-Expression (Abb. 2.19 B). Allerdings war im Fall von Rb11 die Effizienz des *Knockdowns* niedriger, so dass hier keine definitive Aussage über mögliche Effekte gemacht werden kann.

Dennoch lässt sich schlussfolgern, dass wie bei den E2F3/4-*Knockdowns* Effekte nur in HeLa-Zellen zu beobachten waren.

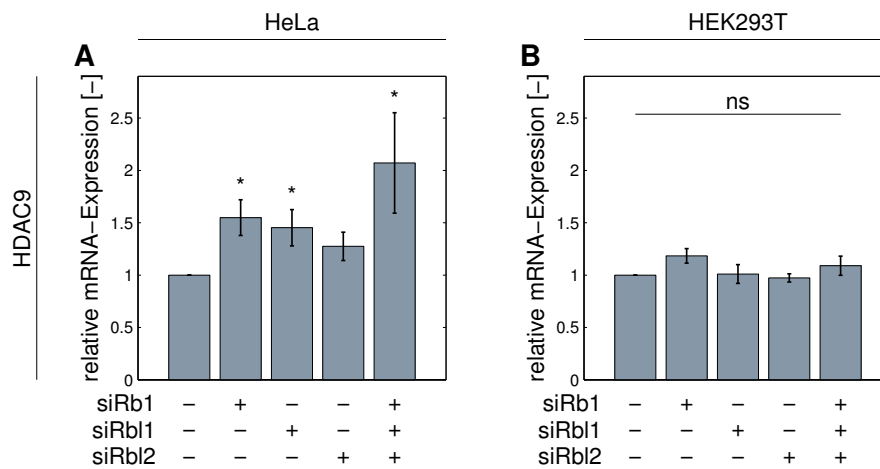


Abbildung 2.19: HDAC9-Expression nach *Knockdowns* von Rb1, Rb11 und Rb12 auf mRNA-Ebene in HeLa- und HEK293T-Zellen.

A) Die Reduktion von Rb1 und Rb11 bewirkte in HeLa-Zellen eine Expressionserhöhung von HDAC9 um 50 %, während eine Reduktion von Rb12 keine Auswirkungen hatte. Eine Reduktion der drei Rb-Poteine in Kombination hatte eine Verdopplung der HDAC9-Spiegel zur Folge. B) In HEK293T-Zellen hatten die *Knockdowns* der Rb-Proteine keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von HDAC9. n=6–7

Um auch hier die Spezifität der Regulation von HDAC9 zu überprüfen, wurde die Expression von HDAC4 sowie HDAC7 analysiert (Abb. 2.20). Für HDAC4 konnte weder in HeLa- noch in HEK293T-Zellen ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Abb. 2.20 A, B). Auch die Expression von HDAC7 blieb in beiden Zelllinien von den *Knockdowns* der Rb-Proteinfamilie unbeeinflusst (Abb. 2.20 C, D).

Die Regulation von HDAC9 durch E2F/Rb-Komplexe scheint somit kein genereller Effekt für Klasse IIa HDACs zu sein.



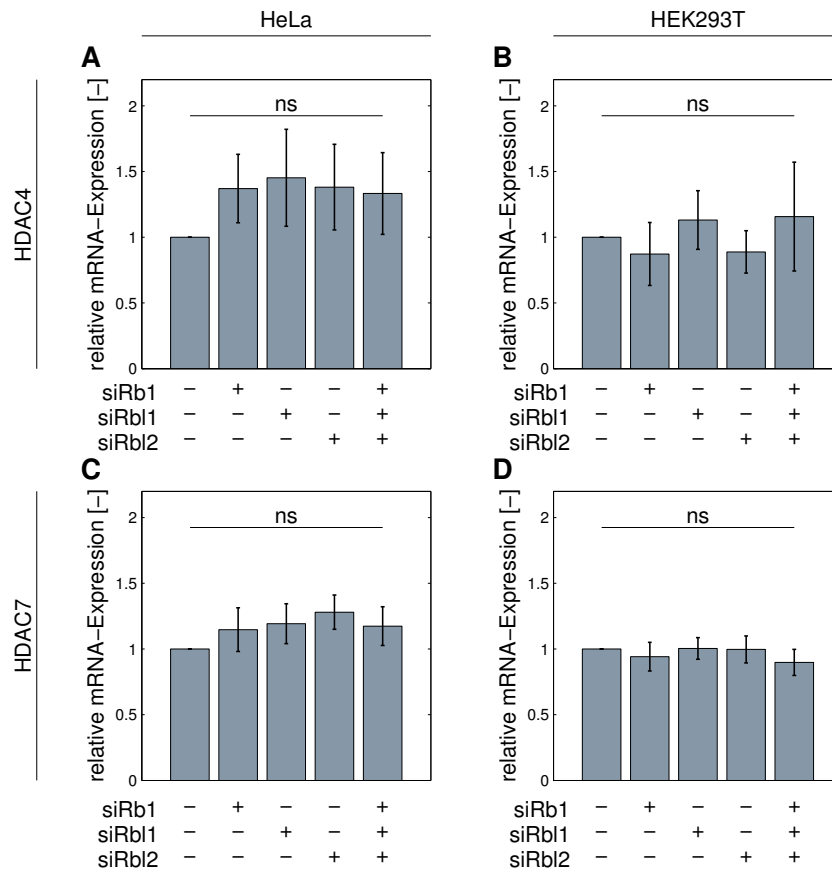


Abbildung 2.20: HDAC4- und HDAC7 Expression nach *Knockdowns* von Rb1, Rbl1 und Rbl2 auf mRNA-Ebene in HeLa- und HEK293T-Zellen

Die Reduktion von Rb1, Rbl1 und Rbl2 hatte keine Auswirkung auf die Expression von HDAC4 (A, B) und HDAC7 (C, D) in HeLa- und HEK293T-Zellen. n=6–7

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die RNA-Interferenz-Experimente weitere Hinweise für eine Beeinflussung der HDAC9-Transkription durch E2F/Rb-Komplexe ergeben haben, die durch die E2F-Bindestelle innerhalb der rs2107595-Region vermittelt werden könnte.

## 2.5 Die HDAC9-Transkription ist Zellzyklus-abhängig

E2F/Rb-Komplexe üben ihre Funktion Zellzyklus-abhängig aus, was auf dem Phosphorylierungszustand der Rb-Proteine basiert. An Rb-Proteine gebundene E2F-Transkriptionsfaktoren sind weitestgehend transkriptionell inaktiv, was während der G<sub>1</sub>-, G<sub>2</sub>- und M-Phasen der Fall ist. Am Übergang von G<sub>1</sub>- zur S-Phase werden Rb-Proteine durch CDK/Cyclin-Komplexe phosphoryliert und dissoziieren von den E2F-Proteinen ab. Dadurch wird deren Aktivierung und die Transkription von S-Phase-Genen ermöglicht. E2F-regulierte Zielgene sollten daher Zellzyklus-abhängigen Schwankungen unterliegen. Um dies für HDAC9 zu untersuchen, wurden zunächst HeLa-Zellen verwendet, welche homozygot für das häufige Allel des Risiko-SNPs sind (Abb. 2.8). Eine Zellzyklus-abhängige Regulation von Genen lässt sich nur in synchronisierten Zellen untersuchen. Daher wurden die Zellen mit Hydroxyharnstoff (HU) behandelt, der durch eine Inhibition der Ribonukleotidreduktase zu einem Mangel an Desoxyribonukleotiden und zu einer Blockierung der DNA-Synthese führt. HU-behandelte Zellen werden in ihrem Zellzyklusverlauf somit am G<sub>1</sub>/S-Übergang arretiert und damit synchronisiert. Diese Arretierung ist reversibel und nach Entfernung des HU erhält man eine Zellpopulation, die sich zumindest während der anschließenden Zellzyklusphasen synchron verhält. [44] Die Effizienz der Synchronisation wurde mit Hilfe von Propidiumiodid, einem fluoreszierenden Farbstoff, der in doppelsträngige DNA interkaliert, und Durchflusszytometrie ermittelt. Die Intensität seiner Fluoreszenz lässt Rückschlüsse auf den DNA-Gehalt der Zelle zu. So haben Zellen in der G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>-Phase einen einfachen DNA-Gehalt (1n), während sich der DNA-Gehalt nach der S-Phase verdoppelt hat (2n).

### 2.5.1 Zellzyklussynchronisation und HDAC9-Expressionsanalyse in HeLa-Zellen

In Abbildung 2.21 sind die Ergebnisse der Propidiumiodid-Färbung eines repräsentativen Experiments mit HeLa-Zellen dargestellt. In unbehandelten Zellen sind zwei Fluoreszenzpeaks erkennbar, die G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase repräsentieren. Im dazwischen liegenden Bereich befinden sich Zellen in der S-Phase (Abb. 2.21 B). Diese Kontrolle diente der Normalisierung der Fluoreszenzpeaks für alle HU-behandelten Proben. Behandelte Zellen zum Zeitpunkt Null (HU+0h) zeigten eine deutliche Verschiebung der Phasen in Richtung G<sub>1</sub>, in welcher sich der Großteil der Zellen befindet (53,8 %),

und somit eine Blockierung am  $G_1/S$ -Übergang (Abb. 2.21 C). Nach drei und sechs Stunden (HU+3h bzw. 6h) befindet sich die Mehrheit der Zellen in der S-Phase (68,1 bzw. 51 %) (Abb. 2.21 D, E), während nach acht bzw. zehn Stunden  $G_2$ -Phase-Zellen überwiegen (64,8 bzw. 59,2 %) (Abb. 2.21 F, G). Im weiteren Verlauf ist zu beobachten, dass sich nach 16 Stunden ein erheblicher Anteil an Zellen bereits wieder in der S-Phase (44,6 %) bzw.  $G_2$ -Phase (42,3 %) befindet (Abb. 2.21 H), was darauf hindeutete, dass  $G_1$  bereits durchlaufen wurde und die Zellen weiter im Zellzyklus fortfahren. Während sich nach 18 Stunden die Mehrheit der Zellen noch in der  $G_2$ -Phase (Abb. 2.21 I) befindet, ist bereits nach 21 bzw. 24 Stunden keine Synchronisation mehr erkennbar (Abb. 2.21 J, K).

## 2 Ergebnisse

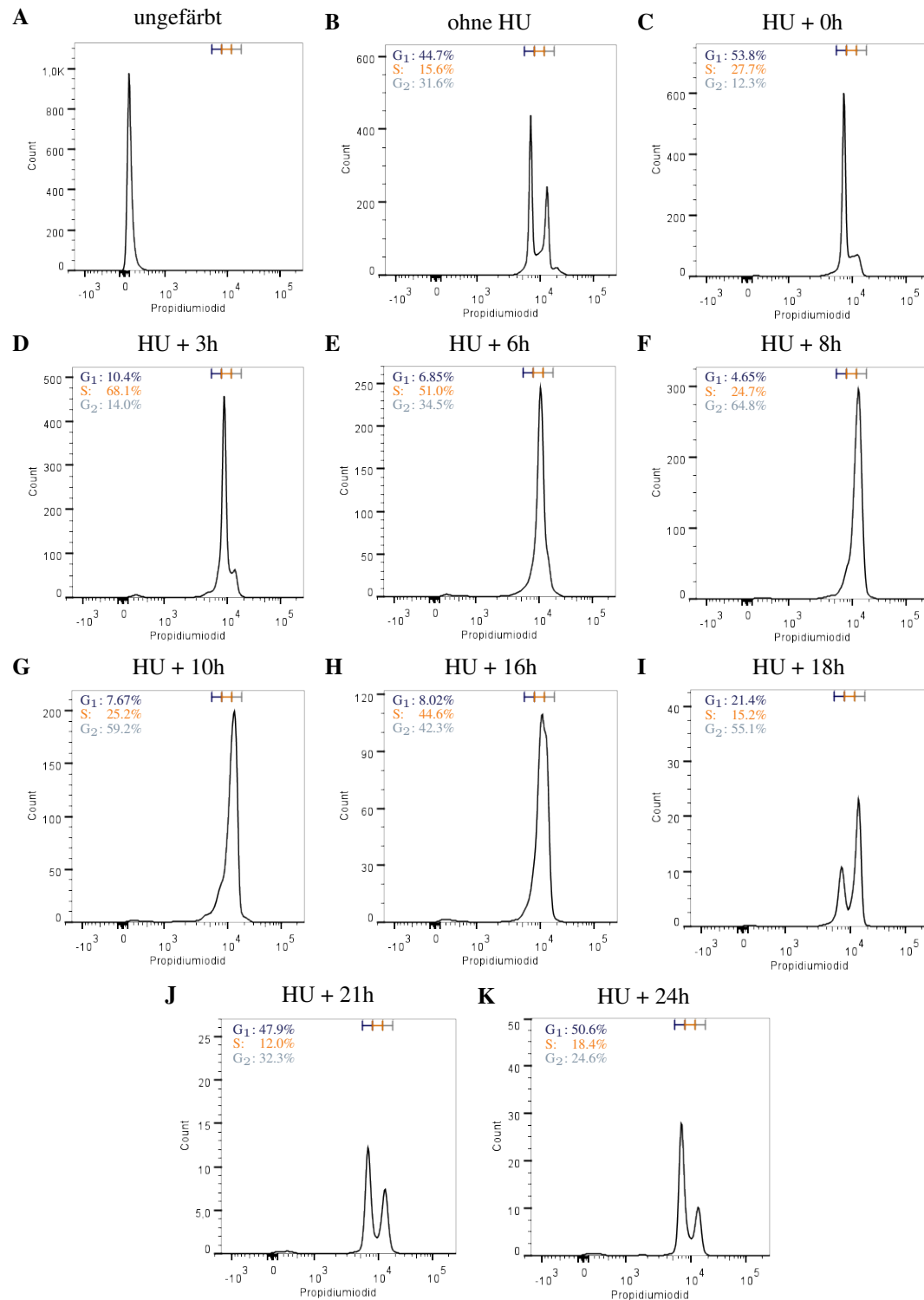


Abbildung 2.21: Zellzyklusphasen synchronisierter HeLa-Zellen. In unbehandelten Kontrollzellen sind zwei Peaks für G<sub>1</sub>- und G<sub>2</sub>-Phase-Zellen zu erkennen, Zellen in der S-Phase befinden sich dazwischen (B). C) In HU-behandelten Zellen zum Zeitpunkt Null (HU+0h) zeigte sich eine Arretierung in G<sub>1</sub>. D, E) Nach 3 und 6 h sind die Mehrheit der Zellen in S, nach 8 bzw. 10 hs in G<sub>2</sub> (F, G). H) Nach 16 h befinden sich die meisten Zellen wieder in S/G<sub>2</sub>, was auf eine bereits durchlaufene G<sub>1</sub>-Phase hindeutet. I) Nach 18 h ist ein Großteil der Zellen noch in G<sub>2</sub>. Nach 21 bzw. 24 h ist keine Synchronisation mehr vorhanden (J, K). n=6–7

In Abbildung 2.22 ist die Analyse der HDAC9 mRNA-Expression in den einzelnen Zellzyklusphasen nach Synchronisierung dargestellt. Im Vergleich zu nicht-synchronisierten HeLa-Zellen zum Zeitpunkt Null (ohne HU) wurde eine signifikante Verdopplung der HDAC9-Expression in G<sub>1</sub>/S-arretierten Zellen (HU+0h) erreicht, die sich beim Fortschreiten des Zellzyklus weiter erhöhte. Nach drei bzw. sechs Stunden (HU+3h bzw. 6h) war die Expression von HDAC9 in S-Phase-Zellen um das Vierfache im Vergleich zur Kontrolle erhöht, bevor sie in G<sub>2</sub>-Zellen nach acht bzw. zehn Stunden wieder absank. Nach 16 Stunden (erheblicher Teil der Zellen wieder in der S-Phase) war erneut eine erhöhte HDAC9-Expression detektierbar. Somit ließ sich eine Oszillation der HDAC9-Expression beobachten, die mit den Aktivierungsphasen von E2F3 bzw. E2F4 gut korreliert.

Dieser Befund untermauerte die Hypothese einer E2F- und somit Zellzyklus-abhängigen Regulation der HDAC9-Expression.

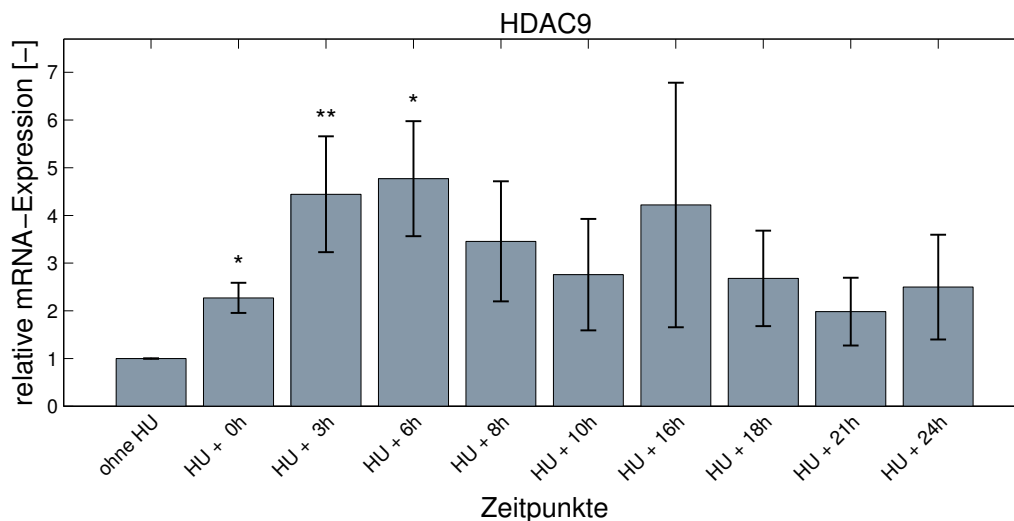


Abbildung 2.22: HDAC9 mRNA-Expression nach Zellzyklus-Synchronisierung in HeLa-Zellen.

Es zeigte sich eine Verdopplung der HDAC9-Expression nach Synchronisierung am G<sub>1</sub>/S-Übergang (HU+0h) im Vergleich zu nicht-synchronisierten Zellen (ohne HU). Nach Aufhebung der Zellzyklus-Blockierung erhöhte sich die Expression von HDAC9 während der S-Phase (HU+3h bzw. 6h) weiter auf das 4,5–5-fache des Ausgangswerts und sank in G<sub>2</sub> (HU+8h bzw. 10h) wieder ab. In HU+16h befand sich ein Großteil der Zellen wieder in der S- bzw. G<sub>2</sub>-Phase und G<sub>1</sub> war bereits durchlaufen. Zu diesem Zeitpunkt war HDAC9 jedoch erneut erhöht und zeigte sich somit oszillierend mit den Zellzyklusphasen. Zwei weitere Stunden später (HU+18h) hatte die HDAC9-Expression wieder den Ausgangswert (HU+0h) erreicht. Die Werte der späteren Zeitpunkte waren aufgrund der nicht mehr vorhandenen Synchronisation nicht mehr relevant. n=6–7

### 2.5.2 Zellzyklussynchronisation und Expressionsanalyse von HDAC9 und FOXP3 in Jurkat-Zellen

Neben HeLa-Zellen wurde die humane T-Zelllinie Jurkat verwendet, um eine HDAC9-Regulation in einem Immunzelltyp zu bestätigen. Jurkat-Zellen weisen einen heterozygoten Allelstatus für den rs2107595-SNP auf (Abb. 2.23).

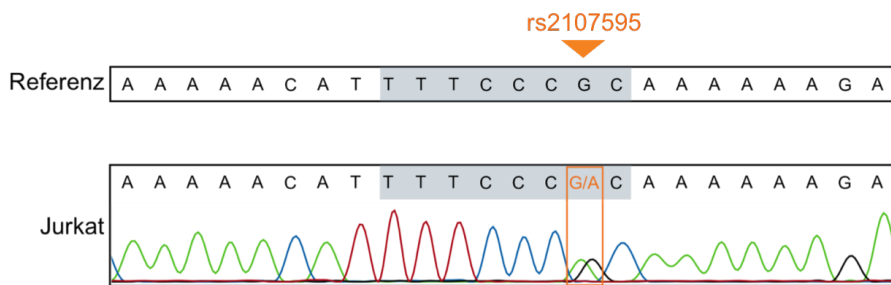


Abbildung 2.23: Genotypisierung humaner Jurkat-Zellen auf den Allelstatus des rs2107595 SNPs.

Die Referenzsequenz zeigt die intakte E2F3-Bindungsstelle (grau hinterlegt). Im Sequenzchromatogramm von Jurkat-Zellen treten zwei Peaks an der Stelle des SNPs auf und zeigen Heterozygotie für das häufige Allel als auch das Risikoallel.

Jurkat-Zellen wurden wie in Kapitel 2.5.1 ebenfalls mit HU behandelt und die Synchronisation mittel Propidiumiodid-Färbung und Durchflusszytometrie untersucht. Zur Untersuchung einer Zellzyklus-abhängigen HDAC9-Expression in einem Immunzelltyp wurden Jurkat-Zellen, eine humane T-Zelllinie, mit Hilfe einer HU-Behandlung synchronisiert. Die Zellzyklusphasen wurden wie unter Kapitel 2.5.1 beschrieben durch Propidiumiodidfärbung mittels Durchflusszytometrie unsynchronisierter Zellen definiert (Abb. 2.24 B). Zum Zeitpunkt Null befanden sich behandelte Zellen zu weniger als 10 % in der G<sub>1</sub>-Phase und bereits zu 32 % in der S-Phase (HU+0h, Abb. 2.24 C). Der HU-vermittelte Zellzyklusarrest findet in Jurkat-Zellen somit nicht exakt am G<sub>1</sub>/S-Übergang, sondern zu einem etwas späteren Zeitpunkt statt. Folgerichtig befanden sich nach drei Stunden die Mehrheit der Zellen bereits in G<sub>2</sub> (Abb. 2.24 D). Im weiteren Verlauf war kein klar synchronisierter Zyklusfortschritt erkennbar, dagegen nahm ein Peak zu, welcher ungefärbte Zellen zeigt und möglicherweise absterbende Zellen repräsentiert. Jurkat-Zellen reagieren offensichtlich stark empfindlich auf die Behandlung mit HU und eine Arretierung ist nicht lang genug anhaltend, um einen Zellzyklus synchron zu durchlaufen.

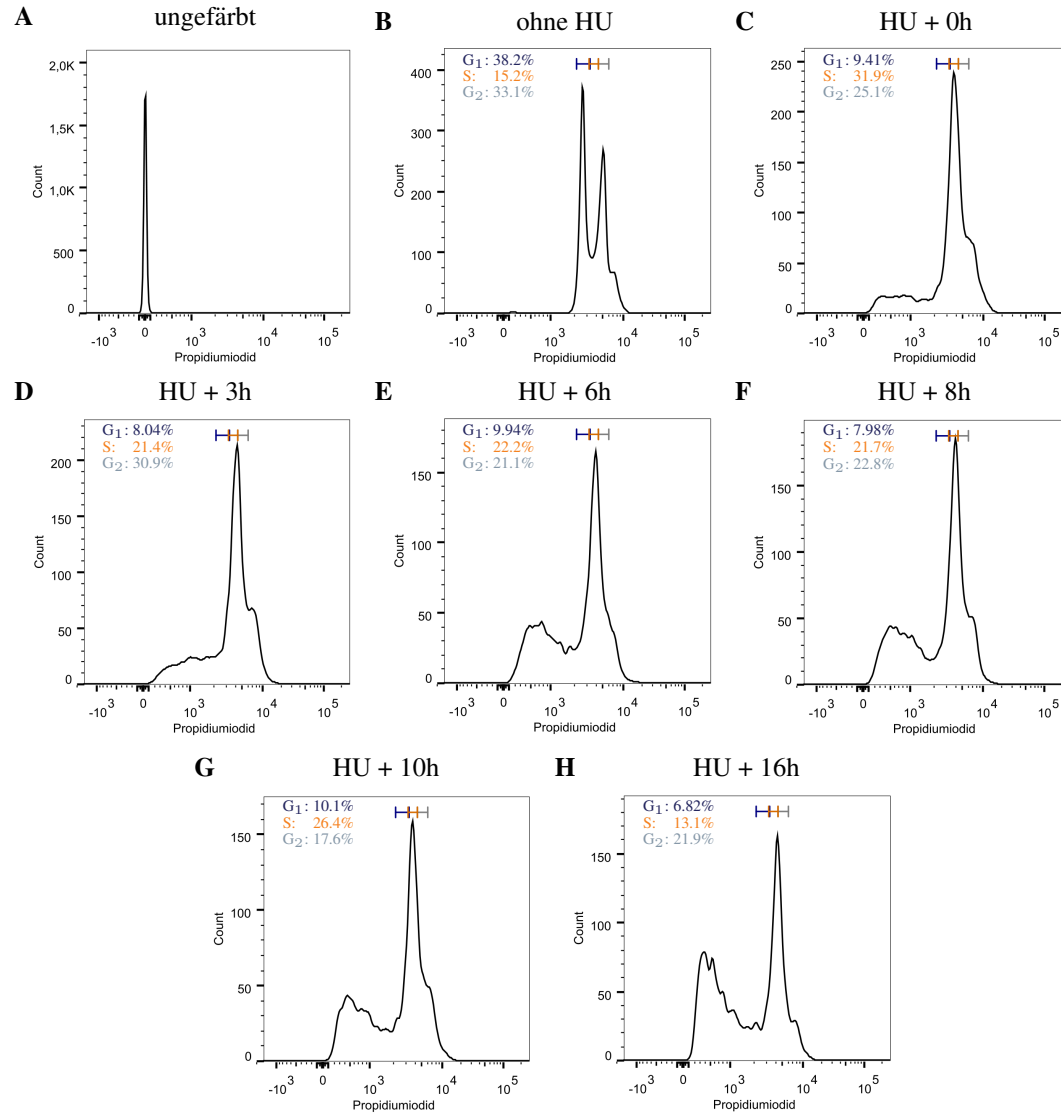


Abbildung 2.24: Zellzyklusphasen synchronisierter Jurkat-Zellen.

B) zeigt unbehandelte Zellen und alle drei Phasen des Zellzyklus. Eine Synchronisierung des Zellzyklus erfolgte mit Hilfe von Hydroxyharnstoff und eine Aufhebung der Blockierung zum Zeitpunkt Null. C) In Jurkat-Zellen zeigten sich zum Zeitpunkt HU+0h weniger als 10 % in der G<sub>1</sub>-Phase und bereits 32 % in S. D) Nach 3 h war ein Großteil der Zellen bereits in G<sub>2</sub>. Im weiteren Verlauf konnte kein Durchlaufen des Zellzyklus beobachtet werden. Stattdessen nahm ein Peak zu, welcher ungefärbte Zellen repräsentiert. n=6–7

Da dennoch ein gewisser Synchronisationseffekt zu beobachten war, haben wir die HDAC9 mRNA-Spiegel in den verschiedenen Phasen bestimmt (Abb. 2.25). Zum Zeitpunkt HU+0h wurde, ähnlich wie in HeLa-Zellen, eine fast 2-fache Erhöhung detektiert. Im weiteren Verlauf der Synchronisation waren allerdings weder ein zusätzlicher Anstieg der HDAC9-Expression noch Oszillationen zu beobachten, was sich auf das Fehlen einer effizienten Synchronisation zurückführen lässt. Trotz dieses Mangels deuten diese Resultate auf eine Erhöhung der HDAC9-Expression während der S-Phase hin und lassen eine Zellzyklus-abhängige Regulation vermuten.

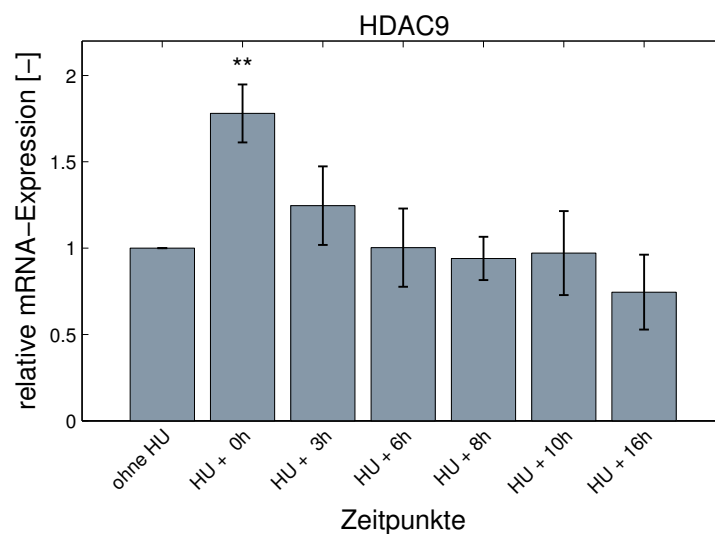


Abbildung 2.25: HDAC9-Expression nach Zellzyklus-Synchronisierung in Jurkat-Zellen. Zum Zeitpunkt der Synchronisierung in der S-Phase (HU+0h) kam es zu einer signifikanten Verdopplung der Expression von HDAC9 im Vergleich zu nicht-synchronisierten Zellen (ohne HU). Nach Aufheben der Blockierung (ab HU+3h) kam es im weiteren Verlauf zu einem Absinken der HDAC9-Expression. n=6–7

HDAC9 ist an der Regulation der FOXP3-Expression beteiligt, einem für die Entwicklung und Funktion regulatorischer T-Zellen essentiellen Transkriptionsfaktor. HDAC9 inhibiert die FOXP3-Transkription und wirkt so der  $T_{reg}$ -Entwicklung entgegen. [5, 76, 95] Wir haben daher die FOXP3 mRNA-Spiegel in synchronisierten Jurkat-Zellen analysiert.

Zum Zeitpunkt Null waren die FOXP3-Spiegel im Vergleich zu unsynchronisierten Zellen um fast das 8-fache erhöht (Abb. 2.26). Diese Erhöhung hatte auch zu späteren Zeitpunkten Bestand und ging, anders als HDAC9, nicht wieder zurück. Auch wenn FOXP3 in der S-Phase offensichtlich benötigt wird, konnte somit keine direkte Relation zur HDAC9-Expression hergestellt werden.



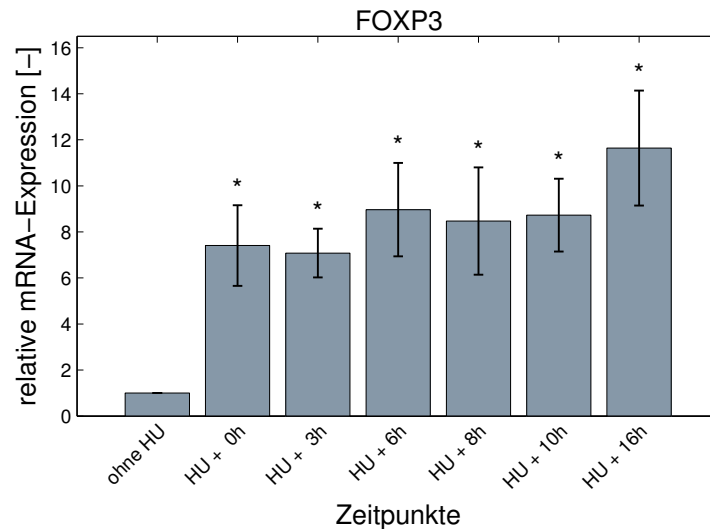


Abbildung 2.26: FOXP3-Expression nach Zellzyklus-Synchronisierung in Jurkat-Zellen. Zum Zeitpunkt HU+0h, an dem Jurkat-Zellen in der S-Phase synchronisiert sind, zeigte sich eine 8-fache Erhöhung von FOXP3 im Vergleich zu nicht-synchronisierten Zellen. Im weiteren Verlauf nach Synchronisation kam es zu keiner Absenkung und direkten Relation der Expression von FOXP3 zu HDAC9. n=6–7

## 2.6 Analyse des humanen *HDAC9*-Promotors

Die bisherigen Ergebnisse legten eine transkriptionelle Regulation von HDAC9 durch E2F/Rb-Komplexe unter Beteiligung einer E2F3-Bindungsstelle im Bereich des häufigen rs2107595-Allels nahe. Um zu analysieren, welche Rolle der *HDAC9*-Promotor dabei spielt, wurden dessen transkriptionelle Eigenschaften näher untersucht.

### 2.6.1 Identifizierung von *HDAC9*-Transkripten mittels 5'RACE

Über den humanen *HDAC9*-Promotor gibt es bisher keinerlei experimentelle Daten. HDAC9 liegt in einer Vielzahl von Isoformen vor, die vorwiegend durch alternatives Spleißen entstehen. Der Transkriptionsstartpunkt der überwiegenden Mehrzahl der Transkripte befindet sich am Anfang eines 63 *Bp* langen Exons (siehe Abb. 2.29). [72] Die Analyse von Transkript-Datenbanken zeigte jedoch, dass es einige Isoformen gibt, die durch die Verwendung alternativer stromaufwärts gelegener Promotoren entstehen. Um den in HeLa- und HEK293T primär aktiven Promotor zu identifizieren, wurden mittels 5' *Rapid amplification of cDNA ends* (RACE) die Transkriptionsstart-

punkte der exprimierten Transkripte bestimmt. Bei dieser Methode wird RNA genspezifisch in cDNA umgeschrieben und eine Adaptor-Sequenz an das 5'-Ende ligiert. Mit Hilfe einer Kombination aus weiteren genspezifischen Primern sowie einem Adaptorspezifischen Primer lassen sich die 5'-Enden aller Transkripte mittels PCR amplifizieren und mit Hilfe von Sequenzierung identifizieren.

Sowohl in HeLa- als auch in HEK293T-Zellen konnten mehrere Transkripte amplifiziert und im Agarosegel detektiert werden (Abb. 2.27). In HeLa-Zellen waren einzelne Banden bei ca. 150 *Bp*, 260 *Bp* und 400 *Bp* zu erkennen, in HEK293T-Zellen dagegen war eine Anzahl undefinierter Banden zwischen 150-380 *Bp* detektierbar.

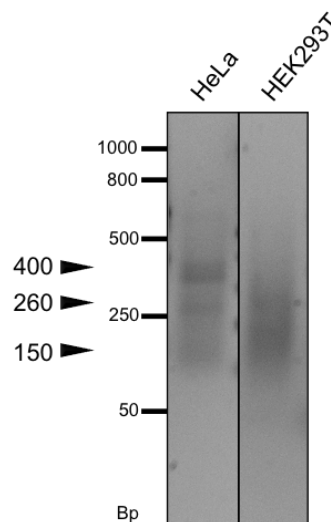


Abbildung 2.27: 5'RACE-Transkripte aus HeLa- und HEK293T-Zellen im Agarosegel. In HeLa-Zellen konnten Banden mit ca. 150 *Bp*, 260 *Bp* und 400 *Bp* amplifiziert werden. In HEK293T-Zellen waren undefinierte Banden zwischen 150-380 *Bp* zu beobachten.

Zur Identifizierung dieser Transkripte wurden die 5'RACE-PCR-Proben beider Zelllinien sequenziert und es ergab sich ein identisches Sequenzierergebnis (Abb. 2.28). Nach Abgleich mit Datenbanken konnten in der Sequenz drei Exons mit den Längen 121 *Bp*, 63 *Bp* und einem Teil eines 242 *Bp* langen Exons identifiziert werden (in grau hinterlegt), in welchem die reversen, genspezifischen Primer zur Durchführung der 5'RACE gelegen sind (Lage der Primer siehe Abb. 2.29). Die Summe dieser Exons entspricht in etwa dem größten, im Agarosegel detektierten Fragment, das wir als Transkript A bezeichnen und dessen Transkriptionsstartpunkt in Abbildung 2.28 dargestellt ist. Da sich im Agarosegel aber auch Banden zeigten, die auf kürzere Transkripte hin-

deuteten, haben wir das Sequenzchromatogramm eingehender untersucht und konnten an einer Position eine abrupte Veränderung der Peakamplituden feststellen. Diese Position entspricht dem 5'-Ende der Mehrzahl der bekannten HDAC9-Transkripte und wird als Transkript B bezeichnet. Somit scheinen sowohl in HeLa- als auch in HEK293T-Zellen mindestens zwei alternative *HDAC9*-Promotoren aktiv zu sein.

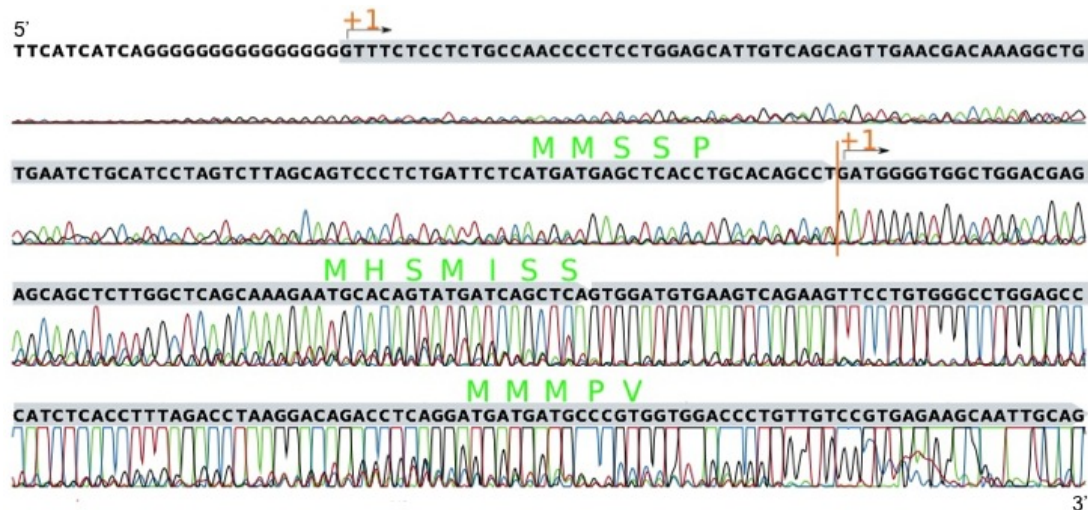


Abbildung 2.28: Sequenzchromatogramm der mittels 5'RACE ermittelten HDAC9-Transkripte in HeLa- und HEK293T-Zellen.

Gezeigt ist das Sequenzchromatogramm der HEK293T-Zellen, welches identisch mit dem der HeLa-Zellen ist. Es konnten drei Exons mit den Längen 121 *Bp*, 63 *Bp* und einem Teil eines 242 *Bp* langen Exons identifiziert werden (grau hinterlegt), was dem größten Transkript entspricht, das im Agarosegel detektiert wurde. Der Transkriptionsstart am 5'-Ende (markiert mit +1) konnte somit im ersten identifizierten Exon mit dem Translationsstart „MMSSP“ festgelegt werden (Transkript A). Eine genauere Betrachtung des Chromatogramms zeigte eine Veränderung der Peakamplituden zwischen den ersten beiden Exons (gekennzeichnet mittels orangenen Strich), was vermuten ließ, dass ein zusätzliches Transkript mit einem weiteren Transkriptionsstartpunkt (+1) im zweiten Exon und einem Translationsstartpunkt mit den Aminosäuren „MHSMISS“ vorlag (Transkript B).

In Abbildung 2.29 ist dieses Resultat schematisch veranschaulicht. Dargestellt wurde der 5'-Teil des *HDAC9*-Gens mit den drei aus Transkript-Datenbanken abgeleiteten Translationsstartpunkten. Elf von 17 im UCSC *Genome Browser* aufgeführten Transkripten beginnen mit dem 63 *Bp*-Exon mit dem Translationsstart „MHSMISS“, was dem identifizierten Transkript B entspricht. Das Transkript A enthält ein weiteres Exon am 5'-Ende mit dem Translationsstart „MMSSP“. Beide Transkripte A und B konnten in HeLa- und HEK293T-Zellen identifiziert werden.

Die Befunde der 5'RACE deuteten auf die Existenz zweier HDAC9-Transkripte so-

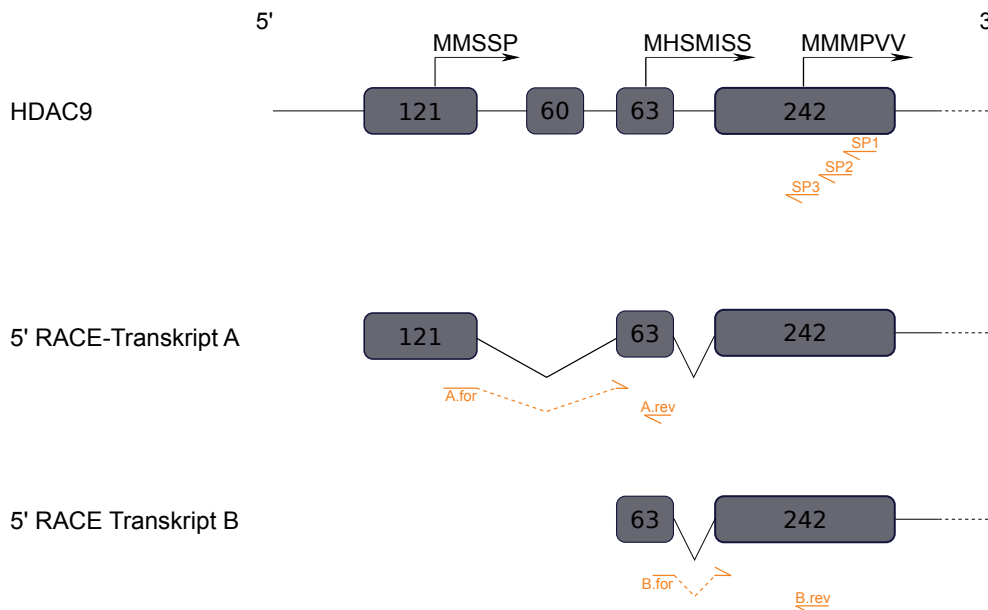


Abbildung 2.29: Schematische Darstellung der mittels 5'RACE-identifizierten HDAC9-Transkripte in HeLa- und HEK293T-Zellen.

HDAC9 liegt in einer Vielzahl von Isoformen vor. Für die 5'RACE verwendete genspezifischen Primer SP1, SP2 und SP3 befanden sich im 242 *Bp* langen Exon 3' zum Translationsstart „MMMPVV“. Die Sequenzierung der 5'RACE-PCR-Produkte ergab Transkript A und lieferte Hinweise auf ein weiteres, kürzeres Transkript B. Transkript A beinhaltet am 5'-Ende ein Exon mit dem Translationsstartpunkt „MMSSP“. Transkript B beginnt die Translation mit „MHSMISS“ und entspricht den meisten HDAC9-Isoformen (11 von 17 Transkripten, UCSC *Genome Browser*). Zur weiteren Analyse der Quantität dieser Transkripte wurden intronüberspannende Primer designt (A.for + A.rev; B.for + B.rev)

wohl in HeLa- als auch HEK293T-Zellen hin. Um dies zu bestätigen und die Quantität beider Transkripte zu ermitteln wurden intronüberspannende *real-time* PCR-Primer für Transkript A (A.for und A.rev) und B (B.for und B.rev) entworfen (siehe Abb. 2.29). Abbildung 2.30 zeigt eine Zusammenfassung der Ergebnisse mehrerer PCR-Läufe. In beiden Zelllinien wird das Transkript B deutlich stärker exprimiert als Transkript A, in HeLa-Zellen um ca. den Faktor 7, in HEK293T-Zellen um ca. 3. Auch wenn mögliche Unterschiede in der Amplifikationseffizienz der Primerpaare nicht auszuschließen sind, folgten wir aus diesen Ergebnissen, dass Transkript B das Haupt-Transkript darstellt.

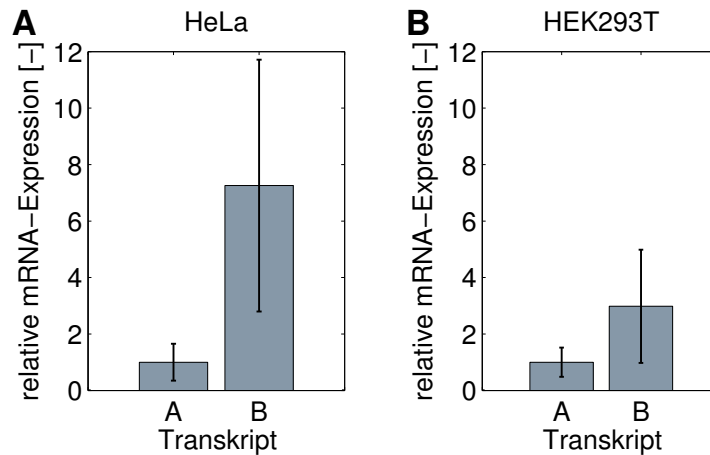


Abbildung 2.30: Expression der identifizierten HDAC9-Transkripte in HeLa- und HEK293T-Zellen.

Die mittels 5'RACE ermittelten Transkripte von HDAC9 wurden quantitativ unter Verwendung von intronüberspannenden Primern analysiert. A) Sowohl in HeLa-Zellen als auch in B) HEK293T-Zellen zeigte sich eine deutlich stärkere Expression von Transkript B im Vergleich zu Transkript A. Normiert wurde jeweils auf das *housekeeping*-Gen  $\beta$ Aktin.  $n=3$ .

Es stellte sich nun die Frage, ob die beiden identifizierten Transkripte durch den E2F3/Rb1-Komplex reguliert werden. Aus diesem Grund wurde die Expression der Transkripte A und B nach Überexpression von E2F3a und Rb1 in HeLa- und HEK293T-Zellen analysiert (Abb. 2.31). Es zeigte sich deutlich, dass in beiden Zelllinien die Expression beider Transkripte durch E2F3a und Rb1 reguliert wird. In HeLa-Zellen ist für Transkript A ein etwas stärkerer Anstieg nach Überexpression mit E2F3a zu beobachten als für Transkript B und eine deutliche Reduktion beider Transkripte durch transfiziertes Rb1. Eine Ko-Transfektion von E2F3a und Rb1 hatte keinen deutlichen Effekt. In HEK293T-Zellen waren beide Transkripte gleichermaßen durch den E2F3a/Rb1-Komplex regulierbar und es konnte eine deutliche Expressionserhöhung nach Überexpression von E2F3a und eine Reduktion durch Rb1 detektiert werden. Ko-Transfektion von E2F3a und Rb1 resultierte in einer moderaten Erhöhung der HDAC9-Transkription. Dies machte deutlich, dass beide HDAC9-Transkripte durch den E2F3/Rb1-Komplex reguliert werden.

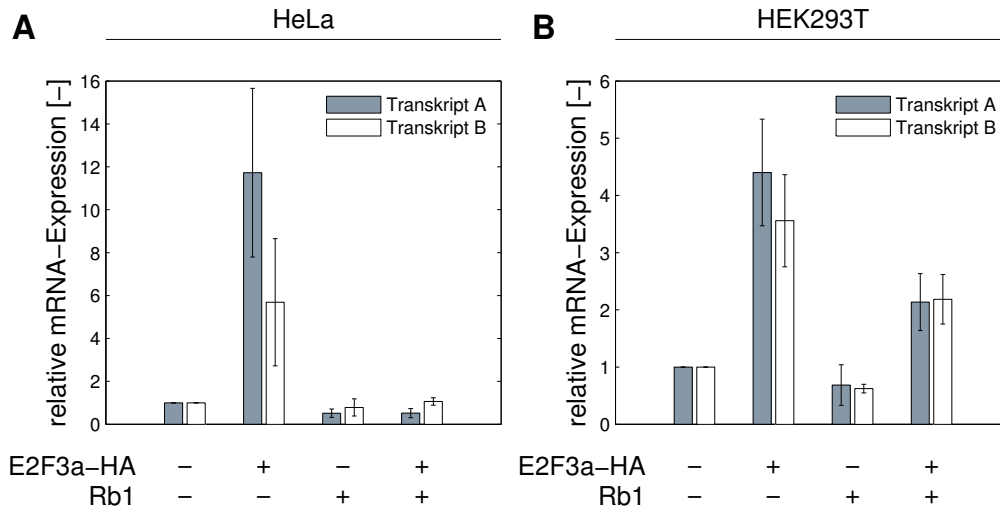


Abbildung 2.31: Regulation der identifizierten HDAC9-Transkripte durch den E2F3/Rb-Komplex in HeLa- und HEK293T-Zellen.

Die Expression beider mittels 5'RACE identifizierten HDAC9-Transkripte A und B wurden durch überexprimiertes E2F3a und Rb1 reguliert. In HeLa-Zellen konnte eine Erhöhung beider Transkripte nach E2F3a-Transfektion beobachtet werden, die für Transkript A etwas stärker als für Transkript B ausfiel. Überexprimiertes Rb1 resultierte in einer Reduktion. Eine Ko-Transfektion von E2F3a und Rb1 bewirkte hier keine erneute Expressionssteigerung. In HEK293T-Zellen konnte ebenfalls für beide Transkripte eine Regulation durch den E2F3/Rb1-Komplex beobachtet werden. n=3

## 2.6.2 Transkriptionelle Aktivität von *HDAC9*-Promotorfragmenten

Anhand der 5' RACE konnte der Transkriptionsstart der Mehrzahl der HDAC9-Transkripte in HeLa- und HEK293T-Zellen bestimmt werden (Transkript B) und lieferte Hinweise auf die zugehörige Promotorregion. Diese stimmt weitestgehend mit einer Region aus dem murinen *HDAC9*-Gen überein, für die bereits Promotoreigenschaften nachgewiesen wurden. [31] Das entsprechende Fragment (921 *Bp*) haben wir in ein Luziferase-Reporterplasmid (pGL3 Basic) kloniert und als vollständiges Promotorkonstrukt in Luziferase-Reporterassays verwendet. Im Unterschied zu den früher beschriebenen Konstrukten beinhaltet dieses Plasmid keinen Minimalpromotor zur Steuerung des Luziferasegens. Sowohl in HeLa- als auch in HEK293T-Zellen konnte in diesem Konstrukt eine E2F3- und Rb1-abhängige Regulation der Reporteraktivität beobachtet werden (siehe 2.33). Daher wurde die 921 *Bp*-Region mit Hilfe der TRANSFAC-Software auf E2F3-Bindungsstellen analysiert und zwei E2F3-Motive

identifiziert. Um den Einfluss dieser potentiellen Bindungsstellen auf die Reporteraktivität zu untersuchen wurden Deletionskonstrukte generiert, die unterschiedliche Bereiche des Promotors enthalten (Abb. 2.32).

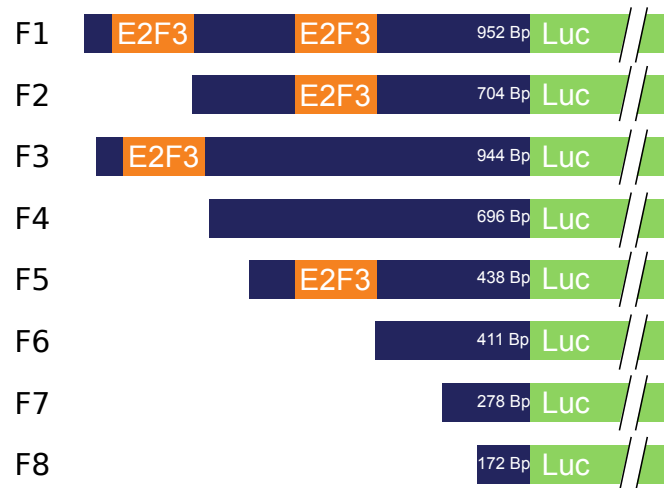


Abbildung 2.32: Verwendete Luziferase-Reporterkonstrukte für die *HDAC9*-Promotorregion. Die weiteren Konstrukte wurden durch Deletion (F2, F5-8) oder Mutagenese (F3, F4) hergestellt. Die E2F3-Bindestellen wurden durch den TRANSFAC-Algorithmus vorhergesagt.

Die Analyse der Aktivität der verschiedenen Promotorfragmente wurde mit Hilfe des Luziferase-Reporter Assays (siehe Kapitel 2.1) untersucht. Als Negativkontrolle diente der leere Luziferase-Reportervektor (pGL3 *Basic*), auf dessen Aktivität jeweils normiert wurde, als Positivkontrolle wurde das Plasmid pKL12-164 verwendet, welches einen Teil des murinen p68 Promotors mit drei E2F-Bindungsstellen beinhaltet [26]. Abbildung 2.33 zeigt die relative Luziferaseaktivität nach Ko-Transfektion mit den Expressionsplasmiden E2F3a und Rb1. Betrachtet man die Basisaktivität der Reporterkonstrukte (graue Balken) nach Transfektion mit einem leeren Expressionsvektor zeigte sich für die Konstrukte F1–F4 eine ca. 3–5-fach erhöhte Luziferaseaktivität im Vergleich zum leeren pGL3 *Basic* Reportervektor. Für die Konstrukte F5–F8 konnte im Vergleich eine ca. 6–8-fache Erhöhung beobachtet werden. Dies bedeutet, dass alle Konstrukte transkriptionell aktiv sind, während F5–F8 eine noch etwas stärkere Aktivität zeigen. Verglichen mit der jeweiligen Basisaktivität bewirkte ko-transfiziertes E2F3a-HA in der Positivkontrolle pKL12-164 eine ca. 8-fache Erhöhung der Luziferaseaktivität, in den Konstrukten F1-F8 eine ca. 2–3-fache Steigerung (schwarze Balken). Transfiziertes Rb1 reduziert die Aktivität in der Positivkontrolle um ca. 50 % im Vergleich zur Basisaktivität und in den Konstrukten F1-F8 um ca. 10–30 % (weiße Balken). Im verwendeten Luziferasevektor pGL3 *Basic* konnte eine geringe Akti-

vitätssteigerung durch E2F3a und eine Reduktion nach transfiziertem Rb1 beobachtet werden. Dies ist auf mögliche E2F-Bindungsstellen im Vektorrückgrat zurückzuführen. Insgesamt deuteten diese Resultate auf die Beteiligung des E2F3/Rb1-Komplexes an der transkriptionellen Regulation von *HDAC9* im Promotorbereich unseres Transkripts B hin. Die Effekte in den Promotorkonstrukten waren allerdings schwächer als in der Positivkontrolle pKL12-164, wobei die Basisaktivität im Vergleich höher war. Möglicherweise liegen den E2F3-Bindungsstellen im murinen p68-Promotor effektivere Konsensussequenzen zugrunde. Allerdings ließ sich in den *HDAC9*-Promotorkonstrukten keine klare Relation zu den vorhergesagten E2F3-Bindungsstellen nachweisen. Die kürzeren Promotorfragmente ohne die entsprechende Motive zeigten sogar eine höhere Aktivität. Möglich wäre, dass sich weitere E2F3-Bindungsmotive innerhalb der kürzeren Fragmente befinden, die mit dem TRANSFAC-Algorithmus nicht erfasst werden. Alternativ könnten andere Transkriptionsfaktoren die beobachteten Effekte vermitteln.



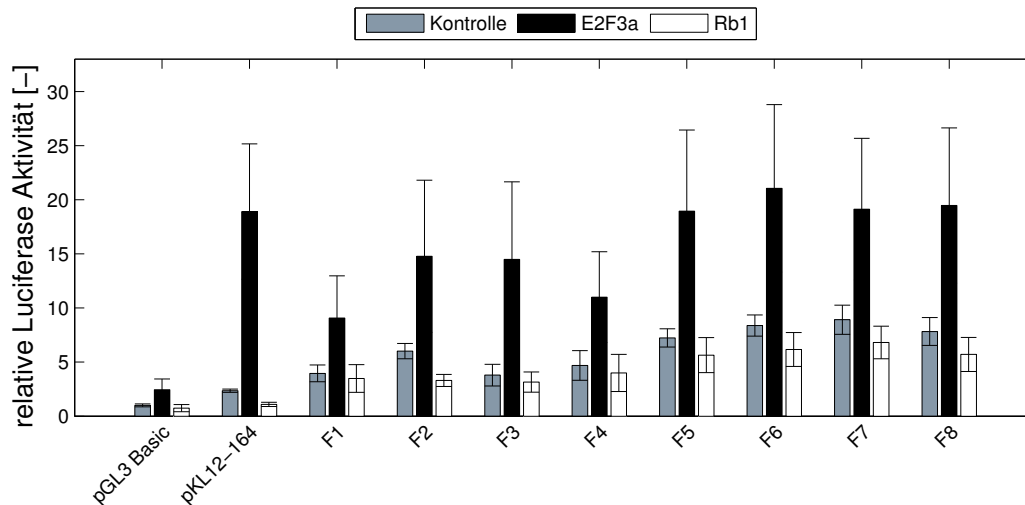


Abbildung 2.33: Relative Luziferaseaktivität der *HDAC9*-Promotorfragmente.

Der leere Luziferase Vektor pGL3 zeigte eine niedrige Basisaktivität (grau), welche durch E2F3a-HA (schwarz) etwas gesteigert und durch Rb1 (weiß) leicht gesenkt werden konnte. Als Positivkontrolle wurde ein Promotorfragment des murinen, E2F3-regulierten p68-Gens verwendet (pKL12-164), dessen basale Luziferaseaktivität dem ca. 3-fachen Wert des leeren Reportervektors entsprach und die Aktivität durch E2F3a-HA um das 8-fache erhöht und durch Rb1 um 50 % reduziert werden konnte. Die Konstrukte F1–F8 zeigten im Vergleich zu pGL3 *Basic* eine erhöhte Basisaktivität, F1–F4 um ca. das 3–5-Fache, F5–F8 um das ca. 6–8-Fache. Die Zugabe von E2F3a-Ha bewirkte in den Konstrukten F1–F8 eine ca. 2–3-fach verstärkte Aktivität gegenüber ihrer Basisaktivität, während ko-transfiziertes Rb1 die Luziferaseaktivitäten in allen F1-F8 Konstrukten um 10–30 % reduzierte. n=4

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass das untersuchte *HDAC9*-Promotorfragment transkriptionelle Aktivität aufweist, die durch Erhöhung der E2F3/Rb1-Spiegel moduliert werden kann. Die dafür verantwortlichen E2F3-Bindungsstellen konnten jedoch bisher nicht lokalisiert werden. Weitere Studien sind nötig, um die Mechanismen der Regulation des *HDAC9*-Promotors durch E2F/Rb-Komplexe aufzuklären.

### 3 Diskussion

Der Einzelnukleotid-Polymorphismus rs2107595 wurde in einer genomweiten Assoziationsstudie (GWAS) für atherosklerotischen Schlaganfall als aussichtsreichster SNP identifiziert. Er befindet sich in der Chromosomenregion 7p21.1, die den bislang stärksten Risikolokus für diese Erkrankung darstellt. [63] Seine Lage im intergenischen Bereich und Kolo-kalisation mit einem DNase I-Hypersensitivitäts-Cluster sowie den Histonmodifikationsmarkern H3K27Ac und H3K4Me1 deuteten auf einen Effekt auf genregulatorischer Ebene hin. Es ist bereits bekannt, dass regulatorische Elemente wie z.B. transkriptionelle *Enhancer* größtenteils in nicht-kodierenden Bereichen der DNA positioniert sind und etliche Kilobasen *up*- oder *downstream* ihres Zielgens liegen können. [3, 71, 99] Zudem scheint es so, dass besonders krankheitsassoziierte SNPs in *Enhancer*-Elementen liegen. [89]

Es stellte sich die Frage, ob rs2107595 die Transkription von Genen reguliert und es mögliche Allel-spezifische Unterschiede gibt. Um zu untersuchen, ob es im Bereich des rs2107595-SNPs zu Allel-spezifischer Bindung von nukleären Proteinen kommt, wurde in Kooperation mit dem Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried) eine proteomweite SNP-Analyse (PWAS) durchgeführt, bei der synthetische Oligonukleotide, die entweder das häufige oder das Risikoallel enthalten, mit SILAC-markierten, nukleären Extrakten inkubiert und nach einem anschließenden DNA-*Pulldown* massenspektrometrisch vermessen wurden. [10] Hierbei konnten die Faktoren E2F3, E2F4, TFDP1 sowie Rb1 als Allel-spezifische Bindepartner für das häufige, nicht aber für das Risikoallel identifiziert werden. Dies stellte einen weiteren Hinweis auf eine genregulatorische Funktion der rs2107595-Region dar.

In der vorliegenden Arbeit sollte diese Hypothese durch umfassende Untersuchungen bestätigt werden. Weiterhin sollte aus den drei in der Nähe der 7p21.1-Risikoregion lokalisierten Genen ein möglicher Kandidatengen identifiziert und schließlich die Rolle von E2F/Rb-Komplexen bei der transkriptionellen Regulation dieses Zielgens im Detail untersucht werden.

### 3.1 Die rs2107595-Region besitzt genregulatorische Eigenschaften

Eine mögliche transkriptionsmodulierende Aktivität der rs2107595-Region wurde im Luziferase-Assay unter Verwendung eines Reportervektors mit Minimalpromotor zur Steuerung der Basisexpression des Luziferasegens untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass sowohl das häufige als auch das Risikoallel einen transkriptionsaktivierenden Effekt ausüben. Zusätzlich wurde aber auch deutlich, dass dieser Effekt beim häufigen Allel stärker ausgeprägt ist. Dies ließ vermuten, dass eine Reduktion der regulatorischen Aktivität dem erhöhten Erkrankungsrisiko zugrunde liegen könnte. Eine verminderte Aktivität kann demnach Expressionsunterschiede des Zielgens als Folge haben. [100] Ein SNP mit einer solchen Aktivität ist im kardiovaskulären Bereich bereits beschrieben worden. Der in der Chromosomenregion 1p13 lokalisierte SNP rs12740374, welcher mit erhöhten LDL-Spiegeln im Plasma als auch mit Myokardinfarkt assoziiert wurde, verstärkt die Expression von Sortilin1, einem Transporterprotein, das an der LDL-Sekretion aus der Leber beteiligt ist. Auch dieser SNP liegt im intergenischen, nicht-kodierenden Bereich und durch das Risikoallel wird eine neue Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor C/EBP geschaffen, welcher die SORT1-Transkription erhöht. [65]

Dies verdeutlicht, dass bereits minimale Veränderungen in regulatorischen DNA-Bereichen phänotypische Konsequenzen besitzen können. Die Ergebnisse unseres Reporterassays legten den Schluss nahe, dass auch der rs2107595-SNP über einen transkriptionellen Mechanismus zur differentiellen Expression von Zielgenen und zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko führen könnte.

### 3.2 *HDAC9* ist das wahrscheinliche Risikogen

Angeichts der reduzierten, transkriptionellen Aktivität des rs2107595-Risiko-SNPs stellte sich die Frage, ob und welches Gen davon betroffen sein könnte. Aufgrund der räumlichen Nähe zum Risikolokus wurden die drei umliegenden Gene *HDAC9*, *TWIST1* und *FERD3L* in Betracht gezogen und ihre Expressionsspiegel in humanen Blutzellen untersucht. Für *HDAC9* konnte hierbei eine Dosis-abhängige Expressionserhöhung in homozygoten und heterozygoten Risikoallelträgern gezeigt werden, während sich für die Gene *TWIST1* und *FERD3L*, die sich 100 *Kb downstream* des

SNPs befinden, keine signifikanten Unterschiede feststellen ließen. [2] Dies deutete darauf hin, dass die rs2107595-Risikovariante ein erhöhtes Erkrankungsrisiko durch Steigerung der HDAC9-Spiegel vermittelt.

Eine weitere, ursächliche Möglichkeit könnte die Beteiligung von Genen für nicht-kodierende RNAs sowie mikro-RNAs sein. Die dadurch kodierten RNA-Moleküle können Auswirkungen auf die Genexpression haben und somit an Erkrankungen beteiligt sein. [22, 58] Das Fehlen solcher Gene in unmittelbarer Nachbarschaft des rs2107595-SNPs sprach jedoch gegen diese Möglichkeit, so dass wir uns im weiteren Verlauf der Arbeit auf *HDAC9* als Zielgen fokussierten.

Als nächstes wurde versucht, den für den genregulatorischen Effekt verantwortlichen Zelltyp zu identifizieren, indem Lymphoblastoid-Zelllinien (LCL), immortalisierte B-Zellen, untersucht wurden. Hierbei konnten jedoch keine Allel-spezifischen Unterschiede in der HDAC9-Expression festgestellt werden. Dies lässt vermuten, dass die in Blutzellen beobachteten Effekte sich nicht auf B-Zellen zurückführen lassen. Regulatorische T-Zellen ( $T_{\text{regs}}$ ) spielen eine kritische Rolle bei der Atherogenese und die Expression von FOXP3, eines Transkriptionsfaktors mit Schlüsselfunktion in Entwicklung und Funktionalität von  $T_{\text{regs}}$ , wird durch HDAC9 reguliert. [24, 43, 103]. Aus diesen Gründen stellten  $T_{\text{regs}}$  einen vielversprechenden Ziel-Zelltyp dar und die Expression von HDAC9 und FOXP3 wurde in isolierten  $T_{\text{regs}}$  gesunder Spender bestimmt. Es ergaben sich jedoch weder für HDAC9 noch für FOXP3 Allel-spezifische Expressionsunterschiede. Weitere Untersuchungen, z.B. in anderen T-Zell-Typen, müssen durchgeführt werden, um den für den HDAC9-Effekt verantwortlichen Zelltyp zu identifizieren.

Im Verlauf dieser Arbeit sind sowohl durch eigene Studien als auch die anderer Forschungsgruppen weitere Erkenntnisse zur Rolle von HDAC9 bei der Atherogenese gewonnen worden. Es konnte gezeigt werden, dass HDAC9 in entzündliche Mechanismen involviert ist und auch in einigen für Atherosklerose relevanten Zelltypen, wie Immunzellen, Gefäßendothelzellen als auch vaskulären glatten Gefäßmuskelzellen exprimiert ist. [40, 56, 85] HDAC9 spielt auch im Zusammenhang mit der Regulation durch mikro-RNAs eine wichtige Rolle. Die Expression des anti-angiogenen mikro-RNA-Clusters miR17-92 in Endothelzellen kann durch Histondeacetylasen, insbesondere durch HDAC9, reprimiert werden, die somit eine proangiogene Wirkung besitzen. [40, 84] Die Neubildung von Blutgefäßen stellt gerade in fortgeschrittenen, atherosklerotischen Plaques ein wichtiges Merkmal dar und trägt dazu bei, die Plaquestabilität zu reduzieren. [88]

Die 7p21.1-Risikoregion für atherosklerotischen Schlaganfall wurde inzwischen auch

mit der koronaren Herzerkrankung assoziiert [15], deren Hauptursache ebenfalls Atherosklerose ist. [33] 2013 konnte gezeigt werden, dass die rs2107595-Risikovariante mit der Intima-Media-Dicke (IMT) sowie dem Vorhandensein atherosklerotischer Plaques in der Karotis assoziiert ist. [56] Zudem konnten in Plaquematerial der Karotis, Aorta als auch der Femoralarterie aus der *Tampere Vascular Study* im Vergleich zu Kontrollproben der inneren Brustbeinarterie erhöhte HDAC9 mRNA-Spiegel gemessen werden. [56]

Hinweise auf den beteiligten Zelltyp ergab eine 2014 erschienene Studie am atherosklerotischen LDLR-*Knockout*-Mausmodell, in dem eine Defizienz von HDAC9 einen Rückgang der Plaquebildung bewirkte. Zudem wurde deutlich, dass eine Depletion von HDAC9 in Knochenmarkszellen eine Abschwächung der Atherogenese zur Folge hatte. [11] Als ursächlich ist hierbei ein vermehrtes Ausscheiden von Cholesterin aus alternativ aktivierten Makrophagen (M2 Typ) beschrieben, welche sich dadurch weniger stark zu Schaumzellen entwickeln. [11, 23] Dies lässt vermuten, dass HDAC9 eine wichtige Rolle in der Funktion von Makrophagen spielt und diese, wie auch Monozyten, einen möglichen Ziel-Zelltyp darstellen und auf Allel-spezifische HDAC9-Expressionsänderungen näher untersucht werden sollten.

In unserer eigenen Forschungsgruppe wurde durch Sepide Azghandi eine Studie mit HDAC9-defizienten Mäusen durchgeführt, welche mit ApoE-*Knockout*-Mäusen gekreuzt wurden, einem weit verbreiteten Atherosklerosemodell. Es konnte gezeigt werden, dass eine HDAC9-Defizienz zu einer Reduktion der Plaquegröße als auch einer Verringerung an fortgeschrittenen, atherosklerotischen Läsionen führt. [2]

All diese Resultate bestärkten unsere Hypothese, dass HDAC9 eine proatherogene Wirkung besitzt und das Zielgen darstellt, dessen Expression durch den rs2107595-Risiko-SNP gesteigert wird. [2] Somit könnte HDAC9 die selektive Inhibierung der HDAC9-Aktivität einen therapeutischen Ansatz darstellen. Es wurden bereits einige HDAC-Klasse IIa-Inhibitoren entwickelt, deren *in vivo* Wirkungen allerdings noch nicht ausreichend getestet wurden. [50]

### **3.3 HDAC9 wird durch E2F/Rb-Komplexe Zellzyklus-abhängig reguliert**

Mit Hilfe der PWAS-Studie war es möglich, die Proteine E2F3 sowie E2F4, TFDP1 und Rb1 als Allel-spezifische Interaktoren für das häufige rs2107595-Allel zu iden-

tifizieren. Interessanterweise handelt es sich bei diesen Faktoren um Mitglieder der E2F/Rb-Proteinkomplexe, die eine essentielle Rolle bei der transkriptionellen Kontrolle von S-Phase-Genen während des Zellzyklus spielen. [37, 67] Im Western Blot konnte die präferentielle Interaktion beider Isoformen des DNA-bindenden Faktors E2F3 (E2F3a und E2F3b) an das häufige rs2107595-Allel dargestellt werden. Die deutlich reduzierte Bindung an das Risikoallel ist durch eine stark verringerte, aber nicht völlig fehlende Affinität aufgrund der zerstörten E2F3-Bindungsstelle erklärbar. Die Bindung von E2F4 sowie des Kofaktors Rb1 konnte im Western Blot nicht gezeigt werden. Rb1 selbst kann DNA nicht direkt binden, sondern wird durch E2F-Faktoren rekrutiert. Die im *Pulldown* gebundene Menge lag möglicherweise unter der Western Blot-Nachweisgrenze. E2F4 enthält im Gegensatz zu E2F3 zwei nukleäre Exportsignale, wodurch es in den verwendeten nukleären Extrakten möglicherweise nur in sehr geringer Menge vorkommt und Western Blot als Nachweismethode vermutlich nicht sensitiv genug ist. [80, 96]

Zur näheren Untersuchung einer Regulation von *HDAC9*, des mutmaßlichen Zielgens der 7p21.1-Risikoregion (siehe Kapitel 3.2), durch E2F3/4 und Rb1 in Abhängigkeit des Genotyps wurden humane Zelllinien auf ihren rs2107595-Allelstatus genotypisiert und dabei HeLa-Zellen als homozygot für das häufige Allel und HEK293T-Zellen als homozygot für das Risikoallel identifiziert. Somit lag in HeLa-Zellen auf beiden Allelen eine intakte E2F3-Bindungsstelle vor, in HEK293T-Zellen eine zerstörte. Nachdem in beiden Zelllinien eine *HDAC9*-Expression detektierbar war, hatten wir zwei etablierte, gut manipulierbare Zellsysteme zur Verfügung, in denen mögliche E2F/Rb-Effekte untersucht werden konnten. Bei E2F-Proteinen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren, die im Heterodimer mit TFDP-Faktoren aktiv sind und durch Bindung an Mitglieder der Rb-Proteine inhibiert werden. [37, 96] In *gain of function* und *loss of function* Experimenten von E2F3 und E2F4 als auch der Rb-Proteinfamilie konnte nachgewiesen werden, dass *HDAC9* in HeLa-Zellen durch Komplexe dieser Faktoren transkriptionell reguliert wird, während dieser Effekt in HEK293T-Zellen attenuiert ist. Unter Überexpressionsbedingungen konnten jedoch Allel-spezifische Unterschiede nicht klar dargestellt werden, da es auch in HEK293T-Zellen zu einer Expressionssteigerung von *HDAC9* kam. Dies ist durch die Restaffinität des Risikoallels erklärbar (siehe Abb. 2.7), die bei hohen E2F3-Konzentration für einen transkriptionellen Effekt ausreicht. Um das Problem zu hoher Expressionsspiegel zu umgehen, wurden siRNA-basierte *Knockdowns* der Transkriptionsfaktoren E2F3 sowie E2F4 als auch der drei Mitglieder der Rb-Proteinfamilie (Rb1, Rbl1 und Rbl2) durchgeführt. Dabei wurde

deutlich, dass in HeLa-Zellen eine positive Regulation von HDAC9 durch E2F3 und E2F4 vermittelt wird, was nach deren *Knockdowns* in einer HDAC9-Reduktion resultiert. Nach Reduktion von Rb1, Rb11 und insbesondere aller drei Mitglieder der Proteinfamilie war eine deutliche Erhöhung des HDAC9-Spiegels zu beobachten. Im Gegensatz dazu waren in HEK293T-Zellen weder nach den E2F3/4- noch nach den Rb-*Knockdowns* deutliche Effekte in den HDAC9-Spiegeln festzustellen. Diese Daten stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Reporterassays und der DNA-Protein-Interaktionsexperimente und unterstützen die Hypothese, dass eine Regulation der HDAC9-Transkription unter Beteiligung der rs2107595-SNP-Region erfolgt. Die Regulation durch E2F/Rb-Komplexe scheint ein HDAC9-spezifischer Effekt zu sein, da keine Veränderungen in der Expression anderer Klasse IIa HDACs (HDAC4 und HDAC7) detektiert werden konnte.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass *HDAC9* ein Zielgen des E2F3/4-Rb-Komplexes ist und eine Regulation möglicherweise Allel-spezifisch durch den rs2107595-Risiko-SNP vermittelt wird. Zum Ausschluss möglicher Zelltyp-basierender Unterschiede ist es zukünftig nötig, diese Experimente in Zellen desselben Typs durchzuführen, welche sich nur durch das rs2107595-Allel unterscheiden und durch Genomeditierung generiert werden können. Präliminäre Daten unserer Forschungsgruppe in genomeditierten Jurkat-Zellen, welche durch die klassische Methode der homologen Rekombination hergestellt wurden, ergaben eine HDAC9-Expressionserhöhung in homozygoten Risikoallel-Zellen im Vergleich zu Zellen mit dem homozygot häufigen Allel. Sie stehen im Einklang mit den erhobenen HDAC9-Expressionsergebnissen in humanen Blutzellen und untermauern die Hypothese, dass der rs2107595-SNP transkriptionelle Effekte vermittelt. Die kürzliche Entwicklung effizienter Editierungstechnologien wie z.B. CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) /Cas9 (*CRISPR-associated*) eröffnet die Möglichkeit, derartige Analysen in verschiedenen Zelltypen durchzuführen. [100]

E2F-Transkriptionskomplexe fördern die Expression von S-Phase-Genen und sind daher nur am G<sub>1</sub>/S-Übergang und während der S-Phase aktiv. [36, 52, 94] E2F-regulierte Gene sollten daher einer ähnlichen Zellzyklusabhängigkeit unterliegen. Um dies für HDAC9 zu untersuchen wurden HeLa- und Jurkat-Zellen mit Hilfe einer Hydroxymethylharnstoff-Behandlung (HU) am G<sub>1</sub>/S-Übergang arretiert und die so synchronisierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten nach Aufhebung des Arrestes auf HDAC9-mRNA-Spiegel analysiert. Die humane Jurkat-T-Zelllinie stellt einen Immunzelltyp dar und wurde aufgrund der Beteiligung des Immunsystems an der Atherogenese aus-

gewählt. Am G<sub>1</sub>/S-Übergang bzw. in der S-Phase konnte sowohl in HeLa- als auch in Jurkat-Zellen eine deutliche Erhöhung der HDAC9-Expression gemessen werden. In HeLa- Zellen wurde im weiteren Verlauf des Zellzyklus für HDAC9 ein oszillierendes Expressionsverhalten beobachtet, das dem E2F-Aktivitätszyklus entsprach. In Jurkat-Zellen konnten keine Oszillationen festgestellt werden, was vermutlich an der unvollständigen Synchronisation bzw. der Toxizität von HU lag. Für FOXP3, einem wichtigen HDAC9-Zielgen in T<sub>reg</sub>, wurden ebenfalls keine oszillierenden Expressionsspiegel gemessen, eine eindeutige Relation zur den HDAC9-Spiegeln ergab sich jedoch nicht.

Insgesamt deuten besonders die Daten aus HeLa-Zellen darauf hin, dass die Transkription von HDAC9 durch den E2F/Rb-Komplex Zellzyklus-abhängig gesteuert wird. HDAC9 könnte somit an Zellproliferations- und Zelldifferenzierungsprozessen während der Atherogenese beteiligt sein.

Aufgrund der beschriebenen Effekte kam die Frage auf, ob die E2F/Rb-vermittelte Regulation ausschließlich von der rs2107595-Region ausgeht, oder ob möglicherweise auch der *HDAC9*-Promotorbereich beteiligt ist. HDAC9 liegt, bedingt durch alternative Spleißprozesse, in vielen Isoformen vor [72], bzw. kann durch alternative Promotoren unterschiedlich transkribiert werden. Um die in HeLa- und HEK293T-Zellen aktiven Promotorbereiche zu identifizieren, wurden mittels 5'RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) die Startpunkte der jeweiligen HDAC9-Transkripte bestimmt. Es konnten zwei Transkripte mit unterschiedlichen 5'-Enden detektiert werden, wovon eines in beiden Zelllinien deutlich stärker exprimiert ist. Dieses Transkript entspricht dem 5'-Ende der meisten HDAC9-Transkripte und ist zusätzlich mit dem Histonmarker H3K4Me3 gekennzeichnet, welcher oft in Promotorbereichen zu finden ist (UCSC *Genome Browser*). Zudem entspricht das identifizierte HDAC9-Transkript einem in Mauszellen beschriebenen Transkript. Der entsprechende Promotor des murinen *HDAC9*-Gens ist in einer früheren Studie untersucht worden. [31] Wir haben daher das dazu analoge Fragment aus dem humanen Genom für unserer Analysen verwendet. In diesem Fragment konnten mit der *Software* TRANSFAC zur Vorhersage von Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen zwei E2F3-Motive identifiziert werden. Zur Analyse ihrer Aktivität im Luziferase-Reporterassay wurden verschiedene Deletionskonstrukte generiert, die entweder beide, nur eine der beiden oder keine der Bindungsstellen beinhalteten. Es zeigte sich, dass dieser Bereich tatsächlich Promotoraktivität besitzt, die durch E2F3 und Rb1 regulierbar ist. Eine Zuordnung der Regulierbarkeit zu einer der Bindungsmotive war allerdings nicht möglich, da auch in



den Deletionskonstrukten ohne putative E2F3-Bindungsstellen eine deutliche Aktivitätsregulation nachweisbar war. Dies könnte auf weitere Bindungsmotive in diesem Bereich zurückzuführen sein, die durch den TRANSFAC-Algorithmus nicht erkannt werden. Durch Matthias Prestel in unserer Arbeitsgruppe konnte mittels ChIP-Analyse aber eine *in vivo* Bindung des E2F3-Proteins im Promotorbereich gezeigt werden, was die Ergebnisse einer Regulation durch den E2F/Rb-Komplex am *HDAC9*-Promotor untermauert. Eine Bindung an die rs2107595-Region konnte bisher allerdings nicht eindeutig nachgewiesen werden. Möglicherweise ist hierfür die Konservierung von genomischen *long-range*-Interaktionen notwendig, die bei der ChIP-Methodik nicht gegeben ist. Zur zukünftigen Identifizierung solcher Interaktionen im 7p21.1-Lokus wäre die *Chromatin-conformation capture* (3C)-Methode geeignet.

### 3.4 Schlussfolgerung

Aufgrund der in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse ist nicht nur *HDAC9* als mutmaßliches Risikogen im 7p21.1-Lokus identifiziert worden, es kann auch ein molekularer Mechanismus vorgeschlagen werden, der zum erhöhten Erkrankungsrisiko für Atherosklerose führen könnte. E2F3/TFDP1 wirkt als transkriptioneller Aktivator, während es komplexiert mit Rb1 als Repressor fungiert. Aufgrund der E2F3-Bindungsstelle im Bereich des häufigen Allels des rs2107595-SNPs ist es diesem Komplex möglich, zu binden und die Transkription von *HDAC9* zu reprimieren (Abb. 3.1). Durch das Risikoallel wird dieses Bindungsmotiv zerstört, was eine deutliche Reduktion der E2F3-Affinität zur Folge hat. Das daraus resultierende Fehlen repressiver E2F3/Rb1-Komplexe am Risikoallel führt zu einer Expressionserhöhung von *HDAC9*, die Dosis-abhängig in humanen Blutzellen beobachtet werden konnte. Dabei wiesen homozygote Risikoallelträger einen 2–4-fach erhöhten *HDAC9*-Spiegel im Vergleich zu homozygoten Trägern des häufigen Allels auf.

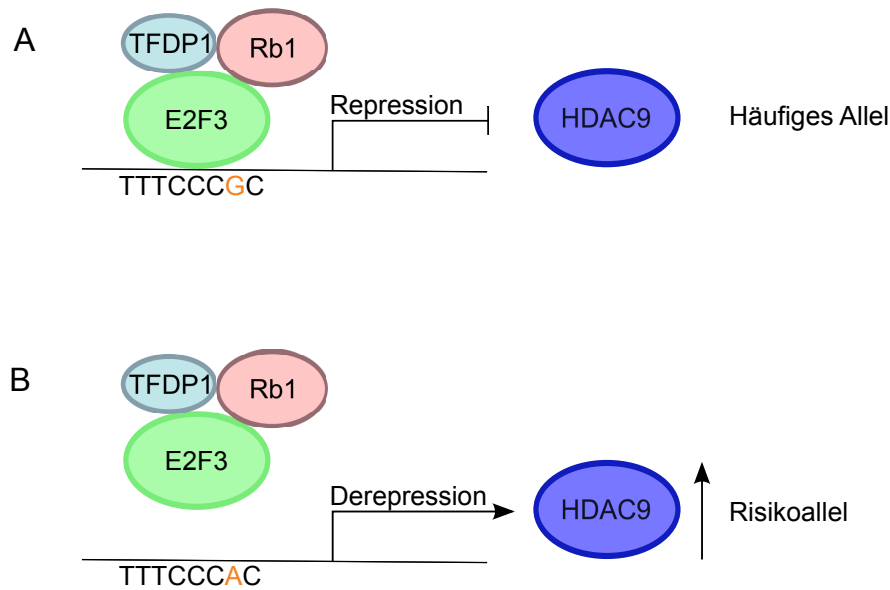


Abbildung 3.1: Hypothese zur Regulation von HDAC9 durch den E2F3/Rb1-Komplex am rs2107595 SNP.

A) Komplektiert mit Rb1 agiert E2F3 als transkriptioneller Repressor. E2F3 ist in der Lage, an das häufige Allel des rs2107595-SNPs (G) mit intakter E2F3-Bindungsstelle zu binden und als Repressor-Komplex auf die Transkription von HDAC9 zu wirken. Dies resultiert in einer verringerten Transkription und damit Expression von HDAC9. B) Durch das Risikoallel (A) wird die E2F3-Bindungsstelle zerstört und der E2F3/Rb1-Komplex ist nicht mehr, oder nur verringert, in der Lage, daran zu binden. Dies hat eine Derepression von HDAC9 und eine Erhöhung seiner Expression zur Folge.

In genomweiten Assoziationsstudien werden meist eine Vielzahl an krankheitsassoziierten SNPs identifiziert, deren ursächliche Rolle unklar ist. Nach wie vor ist es eine große Herausforderung, mit diesen Daten und deren funktioneller Bedeutung umzugehen, sowie krankheitsursächliche Varianten zu bestimmen und von genetischer Variabilität zu unterscheiden. [71] Durch diese Arbeit wird die große Bedeutung des PWAS-Ansatzes deutlich, mit dessen Hilfe es zukünftig schneller möglich sein wird, krankheitsrelevante Pathomechanismen zu entschlüsseln. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig ein möglicher molekularer Mechanismus zur Wirkweise des 7p21.1-Risikolokus bei atherosklerotischem Schlaganfall beschrieben werden. Es sind jedoch weitere Untersuchungen notwendig, um die auf Genomebene ablaufenden Vorgänge im Detail zu verstehen.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Equipment

Tabelle 4.1: Equipment

Bezeichnung	Hersteller
Absorptions-Plattenreader, Multican RC	Thermo Labsystems
Agarose-Gelkammer, klein und groß	peqLab
Analysenwaage, ALC-3100.2	Acculab sartorius group
Brutschrank, <i>Function Line</i>	Heraeus
Brutschränke, HeraCell	Heraeus
Elektrophorese-Netzgerät, Power Pac 200	BioRad
Elektrophorese-Netzgerät, Power Pac 300	peqLab
Elektrophorese-Netzgerät, Power Pac HC	BioRad
FACS	BD
Flüssigstickstoff-Tank, Cryoplus 2	Thermo Scientific
Geldoc-System, Fusion FX7	Wilber-Lourmat
Heizblock	peqLab
Heizblock, Bibby	Stuart Scientific
Heizblock mit Schüttelfunktion, Thriller	peqLab
Kühlthermomixer, MKR23 für 2 Blöcke	HLC by Ditabis
Lumineszenz-Fluoreszenz-Plattenreader, GloMax	Promega
Magnet-Heiz-Rührer, RH <i>basic 2</i>	IKA

Bezeichnung	Hersteller
Magnet-Heiz-Rührer, RCT <i>basic safety control</i>	IKA
Magnet-Rührer, KMO 2 <i>basic</i>	IKA
Mikrowelle	Siemens
Minizentrifuge	Roth
Minizentrifuge, biopcv-2400	Grant
Mikroliterzentrifuge, 5415D	Eppendorf
Mikroliterzentrifuge, 5415R	Eppendorf
Mikroliterzentrifuge, 5417R	Eppendorf
Mikroliterzentrifuge, <i>Perfect Spin 24</i>	peqLab
PC-Etikettiersystem mit Scanner, ELS 631	etisoft
PCR-Maschine, PTC-200	MJ Research
PCR-Maschine, peqStar 2x	Peqlab
pH-Meter, Lab 850	Schott Instruments
Pipettierhelfer, Accu jet pro	Brand
Pipettierhelfer, Accu jet	Brand
Pipettierhelfer/-hilfe	Hirschmann Laborgeräte
Pipettierhelfer/-hilfe, <i>pipet boy</i>	Integra
Präzisionswaage, ALC-80.4	Acculab sartorius group
Reinstwassersystem Milli-Q (Q-POD)	Millipore
<i>Real-time</i> PCR-System, Stratagene Mx3005 P	Agilent Technologies
Schüttelinkubator, Certomat BS-1	Sartorius
Schüttler, rotierend	Edmund Bühler
Schüttler, rotierend, MS3 basic	IKA
SDS PAGE Laufkammern, Mini-PROTEAN 3 Cell	Biorad
Semi Dry Kammern, Trans-Blot SD Cell	Biorad
Sicherheitswerkbank, HeraSafe KS18	Heraeus

Bezeichnung	Hersteller
Spektrophotometer, Nanodrop ND-1000	peqLab
Stereo-Mikroskop, Hund Wilovert S	Hund Wetzlar
<i>Thermo Shaker</i>	Universal Labortechnik
Thermoschüttler, biosan TS-100	peqLab
Ultraschall-Reinigungsgerät, Elmasonics S 10 H	Elma
Ultraschallbad, Sonorex	Bandelin
Universalzentrifuge, Megafuge 16R	Thermo Scientific
Universalzentrifuge, Heraeus Megafuge 16R	Thermo Scientific
Überkopfschüttler, Reax 2	Heidolph
Überkopfschüttler, Rotator 2-1175	NeoLab
Vakuumsystem, BVC 21	Vacuubrand
Vakuumsystem, BVC control	Vacuubrand
Vortexer, Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG
Vortexer, Vortex Genie 2	Scientific Industries
Vortexer, Bio Vortex V1	peqLab
Vortexer, lab dancer	VWR
Vortexer, Vortex 4 <i>basic</i>	IKA
Vortexer, MS3	IKA
Wasserbad, 1005	GFC
Wipp-Schüttler, ST5 CAT	neoLab
Wipp-Schüttler, Rocking Shaker	neoLab
-80°C-Gefrierschrank, Hera Freeze Basic	Thermo Scientific
-80°C-Gefrierschrank, Hera Freeze Top	Thermo Scientific

## 4.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4.2: Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
<i>Cell culture flasks 25 cm<sup>2</sup></i>	Sigma
<i>Tissue culture flasks T80</i>	Nunc
Petrischale 94 x 16 mm ohne Nocken	Greiner Bio
6 well Zellkulturplatten	Omnilab
12 well Zellkulturplatten	Costar
24 well Zellkulturplatten	BD Falcon
48 well Zellkulturplatten	Corning
Microplatte, 96 well, PS, V-Boden, glasklar	Greiner Bio-one
96 well Microplates PS, F-Boden	Greiner Bio-one
96 well PCR plates 0.2 ml	peqlab
96 well Mikrotiterplatten, weiß	peqlab
96 well Microplate, tissue-culture treated, flat-bottom with lid	Becton Dickinson Labware Europe
Clear 96-well Microtest Plate	BD Biosciences
15 ml Zentrifugenröhrchen	VWR
50 ml Falcons	BD Falcon
Safelock Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf
PAXgene Blood RNA Tube	PreAnalytiX GmbH
Nalgene Kryoröhrchen 1.2 ml	Nalgene
Kryoröhrchen 1,8 ml, rund	Nunc
MACS Separation Columns (25 LS, 25 MS)	Miltenyi
Mx3000P/Mx3005P Optical Strip Caps	Agilent Technologies
8er Flat Cap Strips	Peqlab

Bezeichnung	Hersteller
<i>PCR tubes flat cap 0,2 ml</i>	Peqlab
<i>Tube Strips with flat cap strips 0,2 ml</i>	Peqlab
<i>qPCR Cap stripes (flat)</i>	Peqlab
Millex-GV, 0,22 $\mu\text{m}$ , PVDF, 33 mm	Millipore
<i>Cell Scraper</i>	VWR
<i>Cell Scraper 25 cm Handle/1,8 cm</i>	BD Biosciences
Plattierungsspatel	Sarstedt
Pasteurpipetten	Omnilab
<i>Sterile disposable pipettes (1 ml, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)</i>	Sarstedt
Biosphere Filtertips, <i>extralong</i> (200 $\mu\text{l}$ )	Sarstedt
<i>SafeGuard</i> Filtertips (0,1 – 10 $\mu\text{l}$ , 20 $\mu\text{l}$ , 200 $\mu\text{l}$ , 1000 $\mu\text{l}$ )	Peqlab
Multiflex <i>Round</i> Tips Pipettenspitzen	Peqlab
TipOne (0,1 – 10 $\mu\text{l}$ , 1 – 200 $\mu\text{l}$ , 100 – 1000 $\mu\text{l}$ ) Rack	Starlab
10 $\mu\text{l}$ XL Graduated Tip 10x 96Tips Refill	StarLab
Leucosep 50 ml Röhrchen	Greiner Bio-one
<i>Counting slides Dual chamber</i>	Biorad
<i>Whatman Thick Blot Paper</i>	Biorad

### 4.3 Reagenziensets (Kits)

Tabelle 4.3: Reagenziensets (Kits)

Bezeichnung	Hersteller
CD <sup>4</sup> +CD <sup>25</sup> + <i>Regulatory T cell Isolation Kit</i> , human	Miltenyi
Dual-Luziferase Reporter Assay System	Promega
<i>PAXgene Blood RNA Kit</i>	PreAnalytiX GmbH
<i>GeneJET Gel Extraction Kit</i>	Fermentas
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel
Venor GeM OneStep, <i>Mycoplasma Detection Kit for endpoint PCR</i>	Minerva Biolabs
<i>MycoAlert PLUS Mycoplasma Detection Kit</i>	Lonza
<i>MycoAlert Assay Control Set</i>	Lonza
Omniscript RT Kit	Qiagen
FlexiGene DNA Kit	Qiagen
<i>RNeasy Mini Kit</i>	Qiagen
<i>RNeasy Micro Kit</i>	Qiagen
<i>RNase-free DNase Set</i>	Qiagen
<i>High Pure PCR Product Purification Kit</i>	Roche
5' RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0	Invitrogen
Pierce BCA Protein assay	Thermo Scientific



## 4.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 4.4: Chemikalien und Reagenzien

Bezeichnung	Hersteller
Acrylamid (Ultra Pure Proto Gel 30 %)	National diagnostics
Agarose peqGOLD Universal	Peqlab
Albumin <i>from bovin serum</i> (BSA) 96 %	Sigma
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicilin	Sigma
Biotin	Sigma
Borsäure	Roth
Brilliant II SYBR Green QPCR Master Mix	Agilent Technologies
Bromphenolblau	Sigma
<i>complete EDTA-free Protease inhibitor</i>	Roche
Desoxycholat	Sigma
DL-Dithiothreitol	Sigma
DMEM + GlutaMAX I	Invitrogen
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma
DNA Polymerisationsmix, 20 mM/dNTP, 500 $\mu$ l	GE Healthcare
EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Roth
Ethanol 70 %	Apotheke hausintern
Ethanol 70 % vergällt	Roth
Ethanol absolut, <i>for analysis</i>	Merck
Ficoll-Paque Plus	BD
Glycin	Sigma
Hefeextrakt	Roth
Hydroxyurea	Sigma

Bezeichnung	Hersteller
Immobilon Western Chemiluminescent HRP <i>Substrate</i> 500 ml	Millipore
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
Lipofectamine2000 <i>Transfection Reagent</i>	Invitrogen
Mager-Milchpulver	Sigma
Magnesiumchlorid hexahydrat	Merck
2-Mercaptoethanol	Sigma
Methanol zur Analyse	Merck
Methanol 99 % zur Synthese	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat-dihydrat	Roth
Natriumdodecylsulfat	Sigma
Nonidet P40 Substitute	Fluka
<i>Orange G</i>	Sigma
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Pepton aus Casein	Serva
peqGold 50 bp DNA-Leiter (50-1000 <i>bp</i> , 50 $\mu$ g)	Peqlab
peqGold 50 bp DNA-Leiter (100-10 000 <i>bp</i> , 50 $\mu$ g)	Peqlab
Pfu DNA Polymerase (nativ), 100 <i>u</i>	Stratagene
<i>Ponceau S Solution</i>	Sigma
<i>Precision Plus Protein All Blue Standards</i>	Biorad
2-Propanol, zur Analyse	Merck
<i>Quick Start Bovine Serum Albumin Standard</i>	BioRad
RNase AWAY <i>ready-to-use</i>	Roth
RNase A (100 <i>mg/ml</i> )	Qiagen
RPMI 1640	Gibco Invitrogen

Bezeichnung	Hersteller
Propidiumiodid	Sigma
Salzsäure 37 %, zur Analyse	Merck
<i>Sheared Salmon Sperm DNA</i>	Ambion
Streptavidin Sepharose <i>High Performance</i>	GE Healthcare
SYBR Safe DNA <i>Gel Stain</i>	Invitrogen
Taq DNA Polymerase (rekombinant, 5 u/ $\mu$ l)	Fermentas
TaqMan Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems
TaqMan Universal Master Mix II, no UNG	Applied Biosystems
TEMED	Roth
1-Thioglycerol	Sigma
TRITON X-100	Sigma
Trizma base	Sigma
Trypanblau	Sigma
0,05 % Trypsin-EDTA	Gibco Invitrogen
Tween20	Merck
Xylene Cyanole	ICN

## 4.5 Molekulargenetische Methoden

### 4.5.1 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 4.5 aufgeführt.

Tabelle 4.5: Oligonukleotide

Name	<i>Forward</i> -Sequenz 5'-3'	<i>Reverse</i> -Sequenz 5'-3'
rs2107595-1	ACA TGC GTC TTC TCC TTA T	GTT TTT CTT GGA TTC TGT TCT G
rs2107595	AAG AGA AGG GAA TAG TAG TG	CAT CCA GGA ACT CAT CAA A
humanes $\beta$ Actin	AGA GCT ACG AGC TGC CTG AC	CGT GGA TGC CAC AGG ACT
murines E2F3	AAT ATC CCC AAG CCC ACT TC	TGG TCC TCA GTC TGC TGT AAA A
humanes E2F3	ATA TCC CTA AAC CCG CTT CC	TGG TCC TCA GTC TGC TGT AAG A
humanes E2F4	TGC AGA TGC TTT GCT GGA	CTG CCC ATT GAG ACC CTC T
humanes Rb1	GGA TCA GAT GAA GCA GAT GGA	CAT TCG TGT TCG AGT AGA AGT CA
humanes Rbl1	TTG GCG AAT CAG GAC CAT A	TGC GGG GAA ATA TAA ATG GA
humanes Rbl2	ACT TCA GCA ACA GTC CTT CAA A	TCC AAA AGA ATT CCT CTC TTT TTA GT
humanes HDAC4	GTG GTA GAG CTG GTC TTC AAG G	GAC CAC AGC AAA GCC ATT
humanes HDAC7	CAC CTG CCT CAC TGT CAG C	CGA GTC ATA GAT CAG CCC TGT
rs210ma	CTG GGA CAA AAA CAT TTT CCC GCA AAA AAG AAT GTA CAA GCA GAG CT	CTG CTT GTA CAT TCT TTT TTG CGG GAA AAT GTT TTT GTC CCA GGT AC
rs210mi	CTG GGA CAA AAA CAT TTT CCC ACA AAA AAG AAT GTA CAA GCA GAG CT	CTG CTT GTA CAT TCT TTT TTG TGG GAA AAT GTT TTT GTC CCA GGT AC
HDAC9 prom F1	TCT TGC CTT CCT TTC TTT GGA	CTC GTT AAG CTT AGC CCC CTT TCA AAC CTA AAA
pGL3 del E2F Nr1 (F3)	CTC GGC CAT GCT TGA CCT ATT AGG CCG ACC AT	ATG GTC GGC CTA ATA GGT CAA GCA TGG CCG AG
pGL3 del E2F Nr2 (F4)	TAT TTC CCA CCT GCT TGT AGA TAA CCT AAA CTC CAG AGA G	CTC TCT GGA GTT TAG GTT ATC TAC AAG CAG GTG GGA AAT A

## 4 Material und Methoden

Name	<i>Forward-Sequenz 5'-3'</i>	<i>Reverse-Sequenz 5'-3'</i>
HDAC9 prom F5	TTA TCC CGG GTC CTA TTT CCC ACC TGC TT	CTC GTT AAG CTT AGC CCC CTT TCA AAC CTA AAA
HDAC9 prom F6	TTA TCC CGG GAA CCT AAA CTC CAG AGA GC	CTC GTT AAG CTT AGC CCC CTT TCA AAC CTA AAA
HDAC9 prom F7	TTA TCC CGG GGT TGA TCC TCT GCT GCT T	CTC GTT AAG CTT AGC CCC CTT TCA AAC CTA AAA
HDAC9 prom F8	TTA TCC CGG GAG TGA CTG GAA TAT GCT GC	CTC GTT AAG CTT AGC CCC CTT TCA AAC CTA AAA
HDAC9 Exon3	AGC CCA TCT CAC CTT TAG AC	CAA GTT CTC ATG CTG TTT CT
5' RACE SP1		AGC TGA GCC TGG TGC T
5' RACE SP2		CCT GGT GCT GCC GTG T
5' RACE SP3		GCT GCC GTG TCA AGT TCT
Transkript A	CTC ACC TGC ACA GCC TGA T	CAT ACT GTG CAT TCT TTG CTG AG
Transkript B	AGC TCA GTG GAT GTG AAG	TCT GGA TTT GTT GCT GCT

### 4.5.2 *TaqMan* Sonden

Alle verwendeten *TaqMan* Sonden wurden von Applied Biosystems bezogen (Tabelle 4.6).

Tabelle 4.6: *TaqMan* Sonden

<i>Gen/ target</i>	<i>Assay ID</i>
humanes HDAC9	Hs00206843_m1
humanes HDAC9	Hs01081565_m1
humanes FOXP3	Hs01085831_g1
humanes TWIST1	Hs00361186_m1
humanes FERD3L	Hs00541737_s1
humanes RPLP0	4326314E
humanes HPRT	4326321E
SNP rs2107595 <i>Location</i> Chr.7: 19049388	C__16120554_10

### 4.5.3 siRNA

Alle siRNAs sind von Dharmacon Thermo *Scientific* bezogen (Tabelle 4.7).

Tabelle 4.7: siRNAs

<i>Name</i>	<i>Assay ID</i>
ON-TARGETplus <i>Non-targeting Pool</i>	D-001810-10-05
ON-TARGETplus SMARTpool, Human RB1 (5925)	L-003296-00-0005
ON-TARGETplus SMARTpool, Human RBL1 (5933)	L-003298-00-0005
ON-TARGETplus SMARTpool, Human RBL2 (5934)	L-003299-00-0005
ON-TARGETplus SMARTpool, Human E2F3 (1871)	L-003261-00-0005
ON-TARGETplus SMARTpool, Human E2F4 (1874)	L-003262-00-0005

#### 4.5.4 Plasmide

In Tabelle 4.8 sind alle verwendeten DNA-Konstrukte aufgeführt. Details über DNA-Konstrukte, die während dieser Arbeit selbst generiert wurden, zeigt Tabelle 4.9.

Tabelle 4.8: Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
pRC-HA-E2F3a	Expressionsvektor, murines E2F3a, HA-Tag	Joseph R. Nevins, PhD [26]
pCMV-Rb1 (379-928)	Expressionsvektor, humanes Rb1 (verkürzt)	Prof. Dr. Alexander Brehm
pcDNA3.1	Expressionsvektor, Leervektor	PD Dr. Christof Haffner
pRL Renilla	<i>Renilla</i> Luziferase-Kontrollreportervektor	PD Dr. Christof Haffner
pRL Renilla del prom	<i>Renilla</i> Luziferase-Kontrollreportervektor, verkürzter Promotor	PD Dr. Christof Haffner
pKL12 (-164)	<i>Firefly</i> Luziferase-Reportervektor, 5'-Region des murinen p68 Gens (-164 bis +97)	Joseph R. Nevins, PhD [26]
pGL3-mHSP68 Promotor	<i>Firefly</i> Luziferase-Reportervektor, mHSP68 Minimalpromotor	Prof. Dr. Matthias Mann
pGL3-mHSP68 Promotor + rs2107595 CC	<i>Firefly</i> Luziferase-Reportervektor, <i>common allele</i>	Tabelle 4.9
pGL3-mHSP68 Promotor + rs2107595 TT	<i>Firefly</i> Luziferase-Reportervektor, <i>risk allele</i>	Tabelle 4.9
pGL3-F1	<i>Firefly</i> Luziferase-Reportervektor, HDAC9 Promotor 952 Bp	Tabelle 4.9

Name	Beschreibung	Referenz
pGL3-F2	<i>Firefly</i> Luziferase-Reportervektor, HDAC9 Promotor 650 <i>Bp</i>	Tabelle 4.9
pGL3-F3	<i>Firefly</i> Luziferase-Reportervektor, HDAC9 Promotor 913 <i>Bp</i>	Tabelle 4.9
pGL3-F4	<i>Firefly</i> Luziferase-Reportervektor, HDAC9 Promotor 642 <i>Bp</i>	Tabelle 4.9
pGL3-F5	<i>Firefly</i> Luziferase-Reportervektor, HDAC9 Promotor 430 <i>Bp</i>	Tabelle 4.9
pGL3-F6	<i>Firefly</i> Luziferase-Reportervektor, HDAC9 Promotor 400 <i>Bp</i>	Tabelle 4.9
pGL3-F7	<i>Firefly</i> Luziferase-Reportervektor, HDAC9 Promotor 270 <i>Bp</i>	Tabelle 4.9
pGL3-F8	<i>Firefly</i> Luziferase-Reportervektor, HDAC9 Promotor 160 <i>Bp</i>	Tabelle 4.9



Tabelle 4.9: Klonierungsdetails über selbst generierte Plasmide

Name	Klonierungs- <i>Primer/</i> <i>template</i> -DNA	Restriktionsenzyme
pGL3-mHSP68 Promotor + rs2107595 CC	rs210ma	SacI/ KpnI
pGL3-mHSP68 Promotor + rs2107595 TT	rs210mi	SacI/ KpnI
pGL3-F1	HDAC9 prom F1	HindIII
pGL3-F2	pGL3-F1 als <i>template</i>	SmaI/ NdeI/ Klenow
pGL3-F3	pGL3 del E2F Nr1 (F3)	Deletions-PCR, DpnI
pGL3-F4	pGL3 del E2F Nr2 (F4)	Deletions-PCR, DpnI
pGL3-F5	HDAC9 prom F5	XmaI/ XhoI
pGL3-F6	HDAC9 prom F6	XmaI/ XhoI
pGL3-F7	HDAC9 prom F7	XmaI/ XhoI
pGL3-F8	HDAC9 prom F8	XmaI/ XhoI

#### 4.5.5 DNA-Isolation

Zur Isolation von DNA aus kultivierten Zellen bzw. aus Blutzellen humaner Proben wurde das *FlexiGene* DNA Kit der Firma Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die pelletierte DNA wurde in 100 – 200  $\mu$ l Resuspensionspuffer gelöst.

#### 4.5.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Zusammensetzung einer typischen Polymerase-Kettenreaktion ist in Tabelle 4.10 dargestellt.

Tabelle 4.10: Ansatz einer Polymerase-Kettenreaktion

Bestandteil	Menge
Reaktionspuffer (10X)	5 $\mu$ l
dNTP-Mix (10 mM)	1 $\mu$ l
<i>Primer forward</i> (10 mM)	1 $\mu$ l
<i>Primer reverse</i> (10 mM)	1 $\mu$ l
DNA <i>template</i>	30–100 ng
Taq Polymerase (5 U/ $\mu$ l, Qiagen)	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	ad 50 $\mu$ l

Um die Präzision der DNA-Amplifikation zu verbessern, kann dem Ansatz noch eine Polymerase mit *proof reading* Funktion zugegeben werden. Hierfür wurde die native Pfu DNA Polymerase der Firma *Stratagene* verwendet. Um eine Effizienzerhöhung zu erreichen wurde dem Ansatz MgCl<sub>2</sub> oder *Q-Solution* (Qiagen) zugesetzt.

Tabelle 4.11 zeigt ein typisches PCR-Programm.

Tabelle 4.11: PCR-Programm

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	4 min	1
95°C	45 sec	30
56–60°C	45 sec	
72°C	90 sec	
72°C	10 min	1
4°C	$\infty$	

### 4.5.7 5' *Rapid Amplification of complementary DNA ends* (5'RACE)-PCR

Zur Bestimmung der Transkriptionsstartpunkte von HDAC9-Transkripten in HeLa- und HEK293T-Zellen wurde das 5' *RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends* Kit, Version 2.0 (Invitrogen) nach Herstellerangaben unter Verwendung der Primer SP1, SP2 und SP3 (siehe Tabelle 4.5.1) eingesetzt. Anders als im Protokoll beschrieben wurde für die Aufreinigung der erhaltenen cDNA mit Hilfe der beigefügten S.N.A.P. Säulen mit 20  $\mu$ l statt 50  $\mu$ l eluiert und für das TdT-Tailing 16,5  $\mu$ l der cDNA statt 10  $\mu$ l cDNA und 6,5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O eingesetzt. Die *Annealing*-Temperatur betrug 64°C. PCR-Produkte wurden auf Agarosegelen überprüft und mittels Sequenzierung analysiert.

### 4.5.8 Agarosegel-Elektrophorese

#### Agarosegele

0,8–2 % Agarose in TBE-Puffer, SYBR *Safe DNA Gel Stain* 1:10 000 Endkonzentration

#### DNA Ladepuffer (6X)

60% Glycerol, 10 mM Tris-HCL (pH 7,6), 60 mM EDTA, 25 mg Xylene Cyanol, 25mg *Orange G*, in 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

#### TBE Puffer (1X)

89 mM Tris Base, 89 mM Borsäure, 2 mM EDTA, in 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

Abhängig von der erwarteten Größe der aufzutrennenden DNA wurden Agarosegel-Konzentrationen zwischen 0,8–2 % (w/v) gewählt. Für die Gelelektrophorese wurden kleine (30 ml Gel) und große (100 ml Gel) Agarose-Gelkammern der Firma Peqlab verwendet und an 80 bzw. 100 V angeschlossen. Als Größenstandards wurden PeqGold 50 bp–1000 bp bzw. PeqGold 100 bp–10 000 bp verwendet.

### 4.5.9 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Zur Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde das *GeneJET Gel Extraction* Kit der Firma Fermentas verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

### 4.5.10 Verdau mit Restriktionsenzymen

#### Restriktionsenzyme

**DpnI** (20 000 U/ml), **HindIII** (100 000 U/ml), **KpnI** (10 000 U/ml), **NdeI** (20 000 U/ml), **SacI** (20 000 U/ml), **SmaI** (20 000 U/ml), **XhoI** (20 000 U/ml), **XmaI** (10 000 U/ml), **Antarctic Phosphatase** (5000 U/ml) (New England BioLabs NEB), **DNA Polymerase I Large Fragment (Klenow Fragment)** (5 U/ $\mu$ l), (Metabion)

#### Reaktionspuffer

**NEBuffer1–4**, **CutSmart<sup>TM</sup>**, **NEBuffer für Antarctic Phosphatase** (NEB), **DNA Polymerase I (Klenow) Buffer** (Metabion)

Die Reaktionsenzyme wurden in dem vom Hersteller angegebenen Reaktionspuffer verwendet. Einige Enzyme benötigen die Zugabe von BSA (Bovines Serum Albumin), um ihre vollständige Aktivität zu erreichen. Die Inkubationsdauer beträgt 1 h bei 37°C. In Tabelle 4.12 ist ein typischer präparativer Reaktionsansatz aufgeführt.

Tabelle 4.12: präparativer Reaktionsansatz

Bestandteil	Menge
DNA	1–5 $\mu$ g
Reaktionspuffer (10X)	2 $\mu$ l
BSA (10X)	2 $\mu$ l
Restriktionsenzym	10-fach Überschuss zu DNA-Menge
H <sub>2</sub> O	ad 20 $\mu$ l

Für einen analytischen Reaktionsansatz wurde in der Regel 50–500 ng DNA eingesetzt.

Um die Religation von geschnittener Plasmid-DNA zu verhindern, wurde 1  $\mu$ l *Antarctic Phosphatase* und eine entsprechende Menge an *NEBuffer for Antarctic Phosphatase* (10X) zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Zur Inaktivierung des Enzyms schloss sich ein 5-minütiger Schritt bei 65°C an.

### 4.5.11 Ligation

Für die Ligation wurde Plasmid-DNA und *Insert*-DNA im Verhältnis 1:3 eingesetzt, mit 1  $\mu\text{l}$  T4 DNA Ligase (1 U/ $\mu\text{l}$ ) sowie 2  $\mu\text{l}$  T4 Puffer (10X) versetzt und auf 20  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Reaktion erfolgte für 1 h bei RT.

### 4.5.12 Transformation kompetenter Bakterien

#### LB (*losogeny broth* Medium)

Hefeextrakt 5 g/l, Pepton 10 g/l, NaCl 5 g/l, pH 7 (autoklaviert)

#### LB Medium-AMP

LB Medium, 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Ampicillin

#### LB Agar

LB Medium, Zugabe von 1,5 % Agar-Agar (autoklaviert), nach Abkühlung auf 50°C Zugabe von Ampicillin in einer Endkonzentration von 100  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

2  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes bzw. Plasmid-DNA wurden zu 30  $\mu\text{l}$  chemisch kompetenten E.coli DH5 $\alpha$  Bakterien gegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 90 sec bei 42°C und eine weitere Inkubationsphase auf Eis für 30 min, bevor 300  $\mu\text{l}$  LB Medium zugegeben wurden. Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Davon wurden 50–100  $\mu\text{l}$  auf LB Agar-Platten mit Ampicillin-Resistenz ausplattiert und über Nacht bei 37°C stehen gelassen. Einzelne Kolonien wurden am nächsten Tag gepickt und für eine Plasmid-Isolation, siehe Kapitel 4.5.13, in LB Medium-AMP aufgenommen und über Nacht bei 37°C sowie 225 rpm kultiviert.

### 4.5.13 Plasmid-Isolation aus Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid-DNA wurden die Kits *NucleoSpin Plasmid* und *NucleoBond Xtra Midi* von Macherey-Nagel verwendet. Hierfür wurden einzelne, transformierte Bakterienkolonien in 4 ml LB Medium-AMP aufgenommen und kultiviert. Für eine Plasmid-Isolation im größeren Maßstab wurden 100 ml LB Medium-AMP eingesetzt. Die Durchführung der Isolation erfolgt nach Herstellerangaben. Die Konzentra-

tion der isolierten DNA wird photometrisch mit Hilfe des Nanodrop gemessen und zur Sequenzierung zu GATC Biotech gesendet.

#### 4.5.14 RNA-Isolation

Zur Isolierung von RNA aus kultivierten Zellen wird das *RNeasy Mini* Kit der Firma Qiagen laut Herstellerangaben genutzt. Um eine Kontamination mit genomischer DNA zu verhindern, wird eine Behandlung der Proben mit DNase durchgeführt. Hierfür wird das *RNase-free DNase Set* von Qiagen nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Isolierte RNA wird in 30–50  $\mu\text{l}$  RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$  eluiert und die Konzentration photometrisch mit Hilfe des Nanodrop gemessen.

Zur Gewinnung von RNA aus separierten, regulatorischen T-Zellen, siehe hierzu Kapitel 4.8, wurde das *RNeasy Micro* Kit und das *RNase-free DNase Set* von Qiagen verwendet. Die Durchführungen erfolgten nach Herstellerangaben.

Zur RNA-Isolation aus humanen Gesamt-Blutzellen wurde das *PAXgene Blood* RNA Kit von PreAnalytiX GmbH nach Herstellerangaben verwendet.

#### 4.5.15 cDNA-Synthese

Zur Synthese von cDNA aus gewonnener RNA wurde das *Omniscript* RT Kit von Qiagen nach Herstellerangaben verwendet. Für die Reaktion wurden 60 ng – 1  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA sowie Oligo dT(15) *Primer* eingesetzt. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert.

#### 4.5.16 quantitative *Real-Time* PCR (q-PCR)

##### 4.5.16.1 Gen-Expressionsanalyse

Zur Analyse mittels quantitativer *Real-Time* PCR (q-PCR) wurde die cDNA 1:9 vorverdünnt, wohingegen cDNA, welche aus RNA der regulatorischen T-Zellen bzw. der Gesamt-Blutzellen gewonnen wurde, 1:3 vorverdünnt eingesetzt wurde. Die Reaktionen wurden immer in Duplikaten oder Triplikaten pipettiert und gemessen. Für die Expressionsanalyse bestimmter Gene wurden TaqMan Sonden eingesetzt, siehe Tabelle 4.6, für alle weiteren Analysen wurde mit SYBR Green und genspezifischen, intron-überspannenden *Primern* gearbeitet, siehe Tabelle 4.5. Tabelle 4.13 zeigt den q-PCR

Ansatz mit SYBR Green, Tabelle 4.14 den verwendeten Ansatz für TaqMan Sonden. Die Auswertung erfolgte nach der komparativen  $\Delta\Delta\text{CT}$  Methode.

Tabelle 4.13: Ansatz einer quantitativen *Real-Time* PCR mit SYBR Green

Bestandteil	Menge
Brilliant II SYBR Green Master Mix (2X, Agilent)	12,5 $\mu\text{l}$
<i>Primer forward</i> (10 mM)	0,5 $\mu\text{l}$
<i>Primer reverse</i> (10 mM)	0,5 $\mu\text{l}$
cDNA <i>template</i>	5 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	6,5 $\mu\text{l}$

Tabelle 4.14: Ansatz einer quantitativen *Real-Time* PCR mit TaqMan Sonden

Bestandteil	Menge
TaqMan <i>Gene Expression</i> Master Mix ( <i>Applied Biosystems</i> )	10 $\mu\text{l}$
TaqMan Sonde <i>target</i> Gen (FAM)	1 $\mu\text{l}$
TaqMan Sonde <i>housekeeping</i> Gen (VIC)	1 $\mu\text{l}$
cDNA <i>template</i>	4 $\mu\text{l}$
H <sub>2</sub> O	4 $\mu\text{l}$

In Tabelle 4.15 ist ein typisches q-PCR-Programm gezeigt, welches sowohl für SYBR Green- als auch für TaqMan Sonden-Ansätze verwendet wurde. Im Fall von SYBR Green ist am Ende des Programms noch eine Schmelzkurvenanalyse angefügt worden, bei der die Temperatur kontinuierlich von 55°C auf 98°C erhöht wurde.

Tabelle 4.15: quantitative *Real-Time* PCR-Programm zur Gen-Expressionsanalyse

Temperatur	Zeit	Zyklen
55°C	2 min	1
95°C	10 min	1
95°C	15 sec	40
60°C	1 min	

#### 4.5.16.2 Genotypisierung

##### TE Puffer

10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 8

Zur Genotypisierung der rs2107595 Allele mittels Sequenzierung wurde eine Standard-PCR durchgeführt (siehe Tabelle 4.10 und 4.11) unter Verwendung der Primer rs2107595 und der Sequenzierungsprimer rs2107595-1 (siehe Tab. 4.5.1). Zur Genotypisierung der zu untersuchenden Risikovariante wurde ein spezifischer TaqMan Sonden-Mix (SNP rs2107595 Location Chr.7: 19049388, C\_16120554\_10, *Applied Biosystems*) verwendet, bei der das häufige Allel mit dem Fluoreszenzfarbstoff FAM markiert ist, das seltene Risikoallel mit VIC. Dieser Mix wurde mit TE Puffer von einer 40-fachen Konzentration auf eine 20-fache Arbeitslösung verdünnt. Der verwendete Reaktionsansatz ist in Tabelle 4.16 gezeigt, das q-PCR-Programm in Tabelle 4.17.

Tabelle 4.16: Ansatz einer quantitativen *Real-Time* PCR zur Genotypisierung mit TaqMan Sonden

Bestandteil	Menge
TaqMan Universal Master Mix, no UNG ( <i>Applied Biosystems</i> )	12,5 µl
TaqMan Sonden-Mix (20X)	1,25 µl
DNA template (30 ng)	11,25 µl



Tabelle 4.17: quantitative *Real-Time* PCR-Programm zur Genotypisierung

Temperatur	Zeit	Zyklen
95°C	10 min	1
95°C	15 sec	40
60°C	1 min	

## 4.6 Zellkultur

### 4.6.1 Zelllinien und Kultivierung

#### Penicillin/Streptavidin (Invitrogen)

10 000 *Units/ml* Penicillin, 10 000  $\mu\text{g/ml}$  Streptavidin

#### Trypsin-EDTA (Invitrogen)

0,05 % Trypsin-EDTA

#### PBS

154 *mM* NaCl, 9,5 *mM* Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,7 *mM* KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 in 1 L H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

#### Standard Medien (Invitrogen)

**DMEM - GlutaMAX<sup>TM</sup>I** (*Dulbeccos's Modified Eagle Medium* + 4,5 g/l D-Glucose + Pyruvat) versetzt mit 10 % fetalem Rinderserum (FBS; Invitrogen) und 5 ml Penicillin/Streptavidin Lösung

**RPMI 1640 Medium** (+ L-Glutamin + 25 *mM* HEPES) versetzt mit 10 % fetalem Rinderserum (FBS; Invitrogen) und 5 ml Penicillin/Streptavidin Lösung

Alle in Tabelle 4.18 verwendeten Zelllinien wurden in den entsprechenden Standardmedien bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Bei einer Konfluenz von 80 – 90 % werden die Zellen passagiert. Hierzu wurden adhärenzte Zellen (HeLa, HEK293T) mit sterilem PBS gewaschen, trypsiniert und bei 400 *g* für 5 *min* zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und eine entsprechende Menge in eine neue Zellkulturflasche überführt. Suspensionszellen (Jurkat, LCL) wurden in ein Reaktionsgefäß überführt, bei 400 *g* für 5 *min* zentrifugiert, mit PBS gewaschen und

nach erneuter Zentrifugation im Standardmedium resuspendiert und eine entsprechende Menge in eine neue Zellkulturflasche überführt.

Tabelle 4.18: Zelllinien

Zelllinie	Ursprungsgewebe	Medium
HeLa(-S3)	humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms von Henrietta Lacks	DMEM - GlutaMAX <sup>TM</sup> I
HEK293T	Variante humaner embryonaler Nierenzellen (Expression des SV40 <i>large</i> T-Antigens)	DMEM - GlutaMAX <sup>TM</sup> I
Jurkat	humane T-Zell-Leukämiezellen	RPMI 1640
LCL	humane B-Lymphozyten	RPMI 1640

## 4.6.2 Kryokonservierung von Zellen

### Einfriermedium

FBS versetzt mit 10 % DMSO

Adhärente Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80 – 90 % mit PBS gewaschen, trypsinisiert und bei 400 *g* für 5 *min* zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Zellpellet mit Einfriermedium resuspendiert und auf Kryoreaktionsgefäße verteilt. Suspensionszellen wurden nach gleichem Protokoll ohne Trypsinieren behandelt. Die Kryoröhrchen wurden über Nacht bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in einer speziellen, mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox aufbewahrt, um ein langsames Herunterkühlen der Zellen zu ermöglichen. Anschließend wurden die Kryogefäße bei  $-170^{\circ}\text{C}$  in Flüssigstickstoff gelagert.

## 4.6.3 Auftauen von Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden im Wasserbad bei  $37^{\circ}\text{C}$  aufgetaut, in Standardmedium aufgenommen und 5 *min* bei 400 *g* zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und nach erneutem Zentrifugationsschritt im entsprechenden Standardmedium resuspendiert, bevor sie in eine entsprechende Zellkulturflasche überführt wurden.

#### 4.6.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte entweder mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer oder mit dem automatischen Zellzähler (TC20<sup>TM</sup> *Automated Cell Counter*) von Biorad. Für die Auszählung der Zellen mittels Neubauer-Zählkammer wurden 10  $\mu$ l der Zellsuspension auf diesen speziellen Objektträger gegeben, welcher ein definiertes Raster aus vier Großquadraten, die wiederum aus 16 Kleinquadraten bestehen, enthält. Der Mittelwert an gezählten Zellen wurde mit  $10^4$ , dem Volumen der Zählkammer, multipliziert. Dieser Wert entspricht der Zellzahl pro Milliliter Medium. Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen kann die zu zählende Zellsuspension mit Trypan-Blau 1:1 vermischt werden.

Zur Bestimmung der Zellzahl mit Hilfe des automatischen Zellzählers wurden ebenfalls 10  $\mu$ l der Zellsuspension auf spezielle Objektträger (*Counting slides*) von Biorad gegeben und mittels Zellzähler ausgezählt. Dieser liefert die bereits errechnete Zellzahl pro Milliliter Medium und bietet dem Benutzer zusätzliche Möglichkeiten, z.B. nach Zellgröße, zu unterscheiden. Auch hier kann zur Lebend-Tot-Unterscheidung die Zellsuspension 1:1 mit Trypan-Blau gemischt werden.

#### 4.6.5 Mycoplasmentest

Alle verwendeten Zelllinien wurden nach dem Auftauen und während der Kultivierung in regelmäßigen Abständen auf Mycoplasmen getestet. Hierzu wurden die Kits Venor GeM *OneStep Mycoplasma Detection Kit for endpoint PCR* bzw. das *MycoAlert PLUS Mycoplasma Detection Kit* zusammen mit dem *MycoAlert Assay Control Set* verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

#### 4.6.6 Transfektion

Die Zellen wurden 24 h vor Transfektion in Standardmedium ohne Antibiotikum in entsprechende Zellkulturplatten oder -flaschen ausgesät. Für eine Transfektion von Plasmiden wurden Zellen bis zu einer Konfluenz von 90 – 95 %, für eine Transfektion von siRNA bis zu einer Konfluenz von 30 – 50 % verwendet. Als Transfektionsreagenz wurde Lipofectamine2000 zusammen mit Plasmid-DNA (siehe Tabelle 4.8) bzw. siRNA (siehe Tabelle 4.7) und dem Minimalmedium OPTI-MEM I + GlutaMAX I, wie in Tabellen 4.19 und 4.20 beschrieben, eingesetzt. Zunächst wurden separat Plasmid-DNA bzw. siRNA und Lipofectamine2000 mit OPTI-MEM vermischt und 5 min bei

RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze vereint und weitere 20 *min* bei RT inkubiert, bevor sie vorsichtig zu den Zellen gegeben wurden.

Tabelle 4.19: Transfektionsansätze für Plasmid-DNA

Zellkulturgefäß	Gesamtvolumen im Kulturgefäß	Plasmid-DNA Mix	Lipofectamine2000 Mix
24 <i>well</i> Platte	500 $\mu$ l	200-300 <i>ng</i> DNA + 50 $\mu$ l OPTI-MEM	2 $\mu$ l Lipof. + 50 $\mu$ l OPTI-MEM
6 <i>well</i> Platte	2 <i>ml</i>	2 $\mu$ g DNA + 250 $\mu$ l OPTI-MEM	5 $\mu$ l Lipof. + 50 $\mu$ l OPTI-MEM
T25 Flasche	7 <i>ml</i>	8 $\mu$ g DNA + 500 $\mu$ l OPTI-MEM	10 $\mu$ l Lipof. + 50 $\mu$ l OPTI-MEM

Tabelle 4.20: Transfektionsansätze für siRNA

Zellkulturgefäß	Gesamtvolumen im Kulturgefäß	siRNA Mix	Lipofectamine2000 Mix
24 <i>well</i> Platte	500 $\mu$ l	20 <i>pmol</i> siRNA +50 $\mu$ l OPTI-MEM	1 $\mu$ l Lipof. + 50 $\mu$ l OPTI-MEM
6 <i>well</i> Platte	2 <i>ml</i>	100 <i>pmol</i> siRNA + 250 $\mu$ l OPTI-MEM	5 $\mu$ l Lipof. + 50 $\mu$ l OPTI-MEM
T25 Flasche	7 <i>ml</i>	200 <i>pmol</i> siRNA + 500 $\mu$ l OPTI-MEM	10 $\mu$ l Lipof. + 50 $\mu$ l OPTI-MEM

#### 4.6.7 Zellzyklus-Synchronisierung

Die Zellen wurden 24 *h* vor Synchronisierung in eine T80 Zellkulturflasche pro Zeitpunkt ausgesät. Es wurde eine entsprechende Zellzahl gewählt, so dass die Zellen bis zum Ende des Versuchs nicht konfluent werden. Zur Synchronisierung des Zellzyklus wurde Hydroxyharnstoff (HU) verwendet, welches die Zellen an der Grenze der G<sub>1</sub>- zur S-Phase arretiert. HU blockiert die Ribonukleotidreduktase, wodurch keine

weiteren dNTPs für die DNA-Synthese gebildet werden können. Zur Synchronisierung wurde HU in einer Endkonzentration von  $5\text{ mM}$  direkt ins Medium gegeben. Für die Synchronisierung von HeLa-Zellen wurde 24 h nach Zugabe von HU, von Jurkat-Zellen nach 48 h, das Medium durch frisches Standardmedium ohne HU ersetzt, um die Blockierung der Ribonukleotidreduktase wieder aufzuheben und ein Fortlaufen des Zellzyklus in die S-Phase zu ermöglichen. Es wurden folgende Zeitpunkte nach Synchronisierung zur Analyse gewählt: *Baseline* -HU (Kontrolle), *Baseline* +HU, 3 h, 6 h, 8 h, 10 h, 16 h, 18 h, 21 h, 24 h. Zu den jeweiligen Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet und das gewonnene Zellpellet halbiert. Die eine Hälfte wurde zur Isolation von RNA verwendet und in  $350\text{ }\mu\text{l}$  RLT+  $\beta$ -Mercaptoethanol bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert. Die zweite Hälfte wurde zur Kontrolle der Zellzyklusphasen mittels Propidiumiodid-Färbung und anschließender Analyse mittels Durchflusszytometrie verwendet, siehe Kapitel 4.9. Zur Fixierung wurden  $500\text{ }\mu\text{l}$  eiskalter 70 %-iger Ethanol zum Zellpellet zugegeben und die Proben bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 4.7 Proteinbiochemische Methoden

### 4.7.1 Antikörper

In den Tabellen 4.21 und 4.22 sind alle für *Western blotting* eingesetzten Primär- und Sekundär-Antikörper aufgelistet. Sekundärantikörper sind mit *horse raddish* Peroxidase (HRP) gekoppelt. Alle Antikörper wurden in 1xTBST und 4 % Milchpulver eingesetzt.

Tabelle 4.21: Primär-Antikörper

Antikörper	Typ	Konzentration	Hersteller
Anti-Actin	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Sigma Aldrich
Anti-Tubulin, Klon 2-28-33	Maus, monoklonal	1:1000	Sigma Aldrich
Anti-HA 11 (Klon 16B12)	Maus, monoklonal	1:1000	Covance
Anti-HDAC9 (39793)	Kaninchen, polyklonal	1:250/1:500	active motif
Anti-E2F3 (C-18), sc-878	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Santa Cruz
Anti-E2F4 (A-20), sc-1082	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Santa Cruz
Anti-Rb1 (C-15), sc-50	Kaninchen, polyklonal	1:1000/1:4000	Santa Cruz
Anti-Rb11 (C-18), sc-318	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Santa Cruz
Anti-Rb12 (C-20), sc-317	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Santa Cruz

Tabelle 4.22: Sekundär-Antikörper

Antikörper	Typ	Konzentration	Hersteller
Anti-Maus	Ziege, polyklonal	1:10 000	Dako
Anti-Kaninchen	Ziege, polyklonal	1:10 000	Dako

### 4.7.2 Protein-Extraktion

#### **PBS**

154 mM NaCl, 9,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4 in 1 L H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

#### **Complete EDTA-free Proteasen-Inhibitor (25X)**

1 Tablette/2 ml H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

#### **RIPA Lysispuffer**

50 mM Tris-HCl pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % NP-40, 0,5 % Desoxycholat, 0,1 % SDS, versetzt mit 40 µl Complete Proteasen-Inhibitor (25X) auf 1 ml RIPA Lysispuffer

Zur Extraktion von Proteinen aus kultivierten Zellen wurden diese mit einem Zellschaber mechanisch vom Boden des Zellkulturgefäßes gelöst und für 5 min bei 400 g pelletiert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet auf Eis gelagert und zur Zelllyse mit 80–100 µl RIPA Puffer versetzt, 30 min inkubiert und währenddessen alle 10 min gevortext. Nach der Zelllyse wurde für 30 min bei *full speed* und 4°C zentrifugiert. Im Überstand befinden sich die Proteine, welche für eine Konzentrationsbestimmung mittels BCA-assay zur Verfügung stehen und anschließend bei -80°C gelagert werden.

### 4.7.3 DNA-Pulldown von Proteinen

#### **Proteinbinding Puffer**

150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 8, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 % NP-40

#### **Biotin Elutionspuffer**

40 ml Proteinbinding Puffer, 160 mg Biotin (pH 8), 40 µl DTT (1 M), 800 µl Complete Proteasen-Inhibitor (50X)

Zur Verifizierung der allelspezifischen Bindepartner der rs2107595 Variante wurde ein DNA-Pulldown durchgeführt. Hierzu wurden Oligonukleotide verwendet, welche entweder das häufige oder das seltene Allel beinhalten. Zur Steigerung des Signals wurden diese konkatemerisiert, d.h. die Sequenzabfolge der Oligonukleotide wird mehrfach hintereinander gesetzt. Diese Oligonukleotide wurden mit nukleären Extrakten aus HeLa-Zellen inkubiert (hergestellt von Manuel Lehm), so dass Proteine dieser Zell-

kernextrakte an die DNA binden können. Anschließend wurde ein *Pulldown* der DNA durchgeführt und die daran gebundenen Proteine mittels Antikörper im Western Blot analysiert.

Zunächst wurden 30  $\mu\text{l}$  Sepharose *beads* mit 170  $\mu\text{l}$  *Proteinbinding* Puffer versetzt und zwei weitere Male mit gleichem Puffer gewaschen. 20  $\mu\text{l}$  der Oligonukleotide wurden hinzugegeben, mit *Proteinbinding* Puffer auf 200  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und für 20 *min* und 600 *rpm* bei RT inkubiert. Währenddessen wurden 225  $\mu\text{g}$  nukleäre Extrakte auf Eis aufgetaut und auf 400  $\mu\text{l}$  mit *Proteinbinding* Puffer aufgefüllt. Hierzu wurden 4  $\mu\text{l}$  *Sheared Salmon Sperm DNA* (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ), 20  $\mu\text{l}$  *Complete* Proteasen-Inhibitor (50X) sowie 0,5  $\mu\text{l}$  DTT (1 M) zugegeben und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C unter Rotieren inkubiert.

Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  der Kernextrakte zu den Oligonukleotiden gegeben und für 1 h und 600 *rpm* bei 4°C inkubiert. Dieser Schritt wird nach Zentrifugation wiederholt und danach das Pellet vier mal mit 200  $\mu\text{l}$  *Proteinbinding* Puffer gewaschen. Zum Lösen der Protein-DNA-Komplexe wurden 40  $\mu\text{l}$  Biotin Elutionspuffer zugegeben und für 1 h und 900 *rpm* bei 34°C inkubiert. Der Überstand nach Zentrifugation für 1 *min* bei 400 g wurde mit NuPAGE LDS (4X) Puffer sowie 1 mM DTT versetzt und für 5 *min* bei 95°C aufgeköcht. Gelagert werden die Proben bei -80°C.

### 4.7.4 Proteinbestimmung mittels BCA-assay

Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde ein BCA-assay mit Hilfe des Pierce BCA Protein assays (Thermo Scientific) laut Protokoll durchgeführt und eine Eichgerade von 0–2  $\text{mg}/\text{ml}$  des Standardproteins BSA (2  $\text{mg}/\text{ml}$ , Biorad) erstellt. Die zu messenden Proben wurden 1:3 oder 1:10 verdünnt und in Duplikaten analysiert. Nach Zugabe der *working reaction* wurden die Proben für 30 *min* bei 37°C inkubiert und anschließend bei 562 nm vermessen.

### 4.7.5 SDS-PAGE

#### **Lower Tris Puffer (4X)**

1,5 M Tris Base, 0,4 % SDS, in 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> pH 8,8

#### **Upper Tris Puffer (4X)**

0,5 M Tris Base, 0,4 % SDS, in 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> pH 6,8



**Running Puffer (10X)**

0,25 M Tris Base, 1,92 M Glycin, 1 % SDS, in 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

**Lämmli Puffer (5X)**

375 mM Tris Base, 30 % (v/v) Glycerin, 6 % (w/v) SDS, 5 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol oder 500 mM DTT, 0,03 % (w/v) Bromphenolblau, in 50 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>, pH 6,8

**Ammoniumpersulfat (10 %)**

1 g Ammoniumpersulfat (APS), 10 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

Für alle Sodium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen (SDS-PAGE) wurde das Mini-Gel System PROTEAN 3 *cell* von Biorad verwendet und unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt. Hierzu wurde ein 4 %-iges Sammel- und ein 10 %-iges Trenngel gegossen, deren Zusammensetzungen in Tabelle 4.23 aufgeführt sind. Als Proteinstandard wurden 3–5  $\mu$ l des *Precision Plus Protein All Blue Standard* von Biorad eingesetzt. Zur Denaturierung wurden die Proben mit 5X Lämmli Puffer versetzt und anschließend für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Bis die Proben das Trenngel erreichen wurde die Elektrophorese bei 80 V durchgeführt, anschließend auf 120 V erhöht.

Tabelle 4.23: Zusammensetzungen der Gele für SDS-PAGE

	Sammelgel (4 %)	Trenngel (10 %)
H <sub>2</sub> O <sub>dest</sub>	1,47 ml	2,94 ml
Lower Tris Puffer	—	1,5 ml
Upper Tris Puffer	0,51 ml	—
Acrylamid (30 %)	0,28 ml	2 ml
TEMED	2,25 $\mu$ l	5 $\mu$ l
10 %APS	22,5 $\mu$ l	50 $\mu$ l

### 4.7.6 Western Blot

#### **Blotting Puffer (1X)**

25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 20 % Methanol, in 5 L H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

#### **TBST (10X)**

100 mM Tris Base, 1,5 M NaCl, 0,05 % Tween20, in 1 L H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>

Zum Nachweis der Proteine wurden diese vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF Membran (Immobilon-P Millipore) mit Hilfe des *Semi-Dry Transfer Cell System* von Biorad transferiert. Die PVDF Membran wurde zunächst mit Methanol benässt und anschließend zusammen mit dem Whatman-Papier einige Minuten in *Blotting Puffer* getränkt. Der Proteintransfer wurde bei konstant eingestellten 125 mA für eine Membran, bei 250 mA für zwei Membranen, 25 V und 50 W für 60–90 min durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit Ponceau-S Lösung (Sigma) gefärbt und teils mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> wieder entfärbt, um den Proteintransfer und eine gleichmäßige Ladung der Proteinproben zu überprüfen.

Zum Blocken der unspezifischen Bindungen wurde 4 % Milchpulver (Sigma) in 1X TBST gelöst und die Membran für 1 h bei RT darin geschwenkt. Die Inkubation mit Primärantikörpern (siehe Tabelle 4.21) erfolgte bei 4°C unter Schwenken über Nacht. Anschließend wurde drei mal für 5 min mit 1X TBST gewaschen und für 1 h bei RT mit HRP-gekoppelten Sekundärantikörpern (siehe Tabelle 4.22) inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten mit 1X TBST für je 5 min folgte die Detektion der Proteine mit Hilfe von ECL (Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate, Millipore). Die Chemilumineszenz der Signale wurde mit dem Geldoc-System *Fusion FX7* der Firma Vilbert-Lourmat aufgenommen.

## 4.8 Separation von regulatorischen T-Zellen aus humanen Blutproben

#### **PBS**

154 mM NaCl, 9,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 in 1 L H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

#### **MACS Puffer A**

PBS (pH 7,2), 2 mM EDTA, 2–8°C

**MACS Puffer B**

MACS Puffer A, 0,5 % BSA , 2–8°C

Zur Separation von humanen, regulatorischen T-Zellen wurde das *Magnetic Cell Separation* (MACS) System der Firma Miltenyi Biotech verwendet. Dies beruht auf der Sortierung von Zellen aufgrund ihrer Oberflächenmarker mit Hilfe von magnetischen *beads*, welche an spezifische Antikörper gekoppelt sind und an entsprechende Marker binden. Säulen zur Auftrennung wurden in magnetischen Ständervorrichtungen gehalten, wodurch Zellpopulationen, an die entsprechende Antikörper gebunden haben, aufgrund der gekoppelten *beads* in den Säulen hängen bleiben. Dies ermöglicht entweder eine positive oder negative Depletion bestimmter Zellen.

Als Ausgangsmaterial dienten 50 *ml* frisch abgenommenes Vollblut gesunder Spender der Abteilung für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie des Klinikums Großhadern. Zur Abtrennung von Leukozyten mittels Dichtegradienten-Zentrifugation wurden Leucosep Röhrchen der Firma greiner *bio-one* verwendet, welche eine poröse Trennscheibe aus Polyethylen enthalten. Diese Trennung erleichtert das Überschieben des Probenmaterials und verhindert ein Durchmischen mit dem Separationsmedium. Die Leucosep Röhrchen wurden mit 16 *ml* Ficoll-Paque befüllt und für 30 *sec* bei 1000 *g* zentrifugiert. Das Vollblut wurde 1:1 mit MACS Puffer A vorsichtig gemischt und zu je 25 *ml* für die Auftrennung nach Dichte der Zellen auf die vorbereiteten Leucosep Röhrchen verteilt. Diese wurden vor Zentrifugation für 10 *min* bei 100 *g* ohne Bremse mit MACS Puffer A auf 50 *ml* gefüllt. Nach der Zentrifugation erhält man abgetrennte mononukleäre Zellen des peripheren Bluts (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*, PBMCs) als Interphase in Mitten der Plasmaschicht und der des Separationsmediums (Ficoll-Schicht), unter welcher sich die Granulozyten und Erythrozyten befinden. Diese Interphase wurde vorsichtig abgesaugt und in ein neues 50 *ml* Röhrchen überführt, mit MACS Puffer A aufgefüllt und bei 300 *g* für 10 *min* zentrifugiert. Zur weiteren Entfernung von Thrombozyten wurde das Zellpellet in 50 *ml* MACS Puffer A resuspendiert und bei 200 *g* für 10–15 *min* zentrifugiert. Dieser Schritt wurde wiederholt, bevor das Pellet in einem angepassten Volumen mit MACS Puffer A resuspendiert wurde. Die Zellzahl wird mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe Kapitel 4.6.4).

Die Zellen wurden erneut für 10 *min* bei 300 *g* zentrifugiert und bis zu einer Zellzahl von  $10^7$  in 90  $\mu$ l MACS Puffer B resuspendiert. Liegt die Zellzahl darüber, müssen alle weiteren Volumina entsprechend angepasst und hochgerechnet werden. Weitere im

Protokoll angegebene Volumina entsprechen einer Zellzahl von  $10^7$  PBMCs.

Zunächst wurden  $CD4^-$  Zellen abgereichert, indem  $CD4^-$  Zellen indirekt mit einem  $CD4^+$  T-Zell Biotin-Antikörper Mix und magnetischen *beads* markiert wurden. Hierzu wurden dem Zellgemisch  $10\ \mu l$  des  $CD4^+$  T-Zell Biotin-Antikörper Mixes zugegeben und für 10 min bei  $2-8^\circ C$  inkubiert. Anschließend wurden  $20\ \mu l$  der Anti-Biotin *MicroBeads* zugesetzt und für 15 min bei  $2-8^\circ C$  inkubiert. Nach Zugaben von 1–2 ml MACS Puffer B wurden die Zellen für 10 min bei 300 g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde bis zu einer Zellzahl von  $10^8$  in  $500\ \mu l$  MACS Puffer B resuspendiert. Die LD-Säule wurde in der entsprechenden magnetischen Halterung platziert und mit 2 ml MACS Puffer B gespült. Anschließend wurde die Zellsuspension auf die Säule gegeben und zweimal mit 1 ml MACS Puffer B nachgespült. Der Durchfluss enthält die  $CD4^+$  Zellfraktion.

Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 300 g wurde das Pellet bis zu einer Zellzahl von  $10^7$  in  $90\ \mu l$  MACS Puffer B resuspendiert. Auch hier müssen bei einer höheren Zellzahl alle Volumina angepasst werden. Zur positiven Selektion von  $CD4^+CD25^+$  Zellen wurden  $10\ \mu l$  *CD25 MicroBeads* zugegeben und für 25 min bei  $2-8^\circ C$  inkubiert. Anschließend wurde mit 1–2 ml MACS Puffer B gewaschen und erneut für 10 min bei 300 g zentrifugiert. Das Pellet wurde bis zu einer Zellzahl von  $10^8$  in  $500\ \mu l$  MACS Puffer B resuspendiert. Zur magnetischen Separation wurde die MS-Säule in der magnetischen Halterung platziert und durch Spülen mit  $500\ \mu l$  MACS Puffer B vorbereitet. Die Zellsuspension wurde auf die Säule gegeben und dreimal mit je  $500\ \mu l$  MACS Puffer B gewaschen. Der Durchfluss enthält  $CD4^+CD25^-$  Zellen. Zur Aufreinigung der  $CD4^+CD25^+$  Zellen wurde die MS-Säule aus der Magnethalterung entfernt und, um eine höhere Reinheit zu erhalten, über eine zweite mit MACS Puffer B vorbereitete MS-Säule, welche sich in der magnetischen Halterung befindet, platziert. Zur Elution der Zellen wurde mit einem Spritzenkolben 1 ml MACS Puffer B durch die erste auf die zweite MS-Säule gedrückt. Das Vorgehen zur magnetischen Separation mit der MS-Säule wurde wiederholt und das Eluat in einem Reaktionsgefäß aufgefangen.

Die Zellzahl der  $CD4^+CD25^+$  Zellen wurde mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt (siehe Kapitel 4.6.4). Die Reinheit der separierten  $CD4^+CD25^+$  Zellfraktion wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (siehe Kapitel 4.9).

## 4.9 Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie

### 4.9.1 Reinheitskontrolle der separierten regulationistischen T-Zellen

Die Reinheit der separierten  $CD4^+CD25^+$  Zellfraktion (siehe Kapitel 4.8) wurde mittels Durchflusszytometrie und fluoreszenzmarkierten Antikörpern, siehe Tabelle 4.24, kontrolliert. Hierzu wurden je  $10^5$  PBMCs und  $CD4^+CD25^+$  Zellen in  $55\ \mu\text{l}$  MACS Puffer B mit je  $5\ \mu\text{l}$  der Antikörperlösung versetzt. Der Ansatz wurde für  $10\ \text{min}$  bei  $2-8^\circ\text{C}$  inkubiert und anschließend mit  $1\ \text{ml}$  MACS Puffer B gewaschen. Nach Zentrifugation bei  $400\ g$  für  $10\ \text{min}$  wurde das Zellpellet in  $700\ \mu\text{l}$  MACS Puffer B resuspendiert und analysiert. Zur Überprüfung des Hintergrundsignals durch unspezifische Bindungen des CD25-PE Antikörpers wurde IgG2b-PE als Isotypkontrolle verwendet.

Tabelle 4.24: Antikörper für Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie; angegebene Verdünnung der Antikörper bis zu einer Zellzahl von  $10^7/100\ \mu\text{l}$

Antikörper	Typ	Fluoreszenzfarbstoff	Verdünnung	Hersteller
CD45	human	VioBlue	1:11	Miltenyi Biotech
CD4	human	FITC	1:11	Miltenyi Biotech
CD25	human	PE	1:11	Miltenyi Biotech
IgG2b	murin	PE	1:11	Miltenyi Biotech

### 4.9.2 Überprüfung der Zellzyklus-Synchronisation

#### PBS

154 mM NaCl, 9,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,7 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2 in 1 L H<sub>2</sub>O<sub>bidest</sub>

#### Färbe-Puffer

50 µg/ml PI, 100 µg/ml RNase, 0,1 % Triton X-100, in 500 µl PBS

Zur Überprüfung der Zellzyklusphasen nach Synchronisierung, siehe Kapitel 4.6.7, wurden die Zellen mit Propidiumiodid (PI) gefärbt. PI ist ein fluoreszierender Farbstoff, der stöchiometrisch in doppelsträngiger DNA interkaliert und so ermöglicht, den DNA-Gehalt von Zellen zu messen. Aufgrund dieser stöchiometrischen Bindung ist es anschließend möglich, die Zellen anhand der detektierten Fluoreszenzsignale ihres Zellzyklusstadiums zuzuordnen.

Die in 70 %-igen Ethanol fixierten, bei 4°C gelagerten Zellen wurden mit PBS auf ein Volumen von 5 ml aufgefüllt und für 5 min bei 850 g zentrifugiert. Nach einem weiteren Waschschritt mit PBS und Zentrifugation wurde das Zellpellet in 500 µl Färbe-Puffer resuspendiert. Der Ansatz wurde für 40 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 3 ml PBS gewaschen. Nach erneutem Zentrifugationsschritt bei 850 g für 5 min wurde das Pellet in 500 µl PBS gelöst und kann mittels Durchflusszytometrie analysiert werden.

Die Messung erfolgte mit der zugehörigen Software der Firma BD, die Auswertung mit Hilfe von FlowJo V10.

## 4.10 Luziferase Reporter Assay

Zur Analyse der regulatorischen Aktivität des zu untersuchenden Risikoallels rs2107595 als auch der HDAC9-Promotorregion wurde ein Luziferase Reporter Assay durchgeführt, welcher auf der Messung von Biolumineszenz basiert. Hierbei steuern die zu untersuchenden regulatorischen Elemente die Expression eines Luziferasegens (*Firefly* Luziferasegen des Glühwürmchens *Photinus pyralis*), das, transkribiert in das Enzym Luziferase, zugegebens Substrat umsetzt. Bei dieser enzymatischen Reaktion entsteht Licht, welches mit Hilfe des Luminometers *Glomax-Multi Detection System* (Promega) gemessen wurde. Die gemessene Lichtstärke korreliert mit der Aktivität der regulatorischen Elemente, die untersucht werden sollen, und lassen somit

Rückschlüsse auf deren Aktivität zu.

Hierzu wurde das *Dual Luciferase Reporter Assay System* der Firma Promega verwendet, bei dem gleichzeitig innerhalb eines Systems zwei Reporterenzyme exprimiert und gemessen werden. Dies ermöglicht die Normierung des zu untersuchenden Reportervektors auf einen internen Kontrollreportervektor (*Renilla* Luziferasegen der Korallenart *Renilla reniformis*), dessen Expression als *baseline* dient.

Es wurden HeLa- bzw. HEK293T-Zellen nach dem Transfektionsprotokoll von Plasmiden im 24 *well* Format transfiziert (siehe Kapitel 4.6.6). Eingesetzt wurden 200 *ng* der *Firefly* Luziferase-Reportervektoren, 10 *ng* des *Renilla* Luziferase-Kontrollreportervektors und 50 *ng* der Expressionsvektoren. Alle verwendeten Konstrukte sind in Tabelle 4.8 aufgeführt.

Die Durchführung der Zelllyse und der Messung der Luziferase-Aktivitäten erfolgte nach Herstellerangaben, wohingegen die im Protokoll angegeben Volumina um 50 % reduziert wurden. Gemessen wurde immer in Duplikaten und die *Firefly* Luziferase-Aktivität wurde auf die der *Renilla* Luziferase normiert.

## 4.11 Statistik

Für statistische Berechnungen wurde das Programm Sigma Plot 12.5 unter Verwendung des *Mann Whitney Rank Sum*- bzw. des *Wilcoxon Signed Rank* Tests verwendet. Erzeugte Daten wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Werte ab einem p-Wert von 0,05 % gelten als signifikant.

$$^*p \leq 0.05$$

$$^{**}p \leq 0.01$$

$$^{***}p \leq 0.001$$

# Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
ApoE	Apolipoprotein E
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celcius
CAD	<i>Coronary artery disease</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent Kinase</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus (eines Proteins)
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
FACS	<i>Fluorescent Activated Cell Sorting</i>
FBS	<i>fetal bovine serum</i>



## Abkürzungsverzeichnis

FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Gramm
h	Stunde
HAT	Histonacetylase
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	HDAC-Inhibitor
HEK	<i>human embryonic kidney</i> -Zellen
HeLa	Henrietta Lacks (Gebärmutterhalskrebszellen)
HPV	humanes Papillomavirus
HRP	<i>Horse radish peroxydase</i>
HU	Hydroxyharnstoff ( <i>hydroxyurea</i> )
IgG	Immunoglobulin, Klasse G
k	Kilo
kb	Kilobasenpaare
Da	Dalton
l	Liter
LDL	<i>low density</i> Lipoprotein
LVD	<i>large vessel disease</i>
m	Milli
$\mu$	Mikro
M	Molar (mol/l)
MEF2	<i>Myocyte Enhancer Factor 2</i>
min	Minute
mRNA	messenger RNA
n	nano
oxLDL	oxidiertes <i>low density</i> Lipoprotein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese

## Abkürzungsverzeichnis

PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
p	pico
q-PCR	quantitative <i>Real Time</i> PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sek	Sekunde
siRNA	small interfering RNA
SNP	Einzelnukeotid-Polymorphismus ( <i>single nucleotide polymorphism</i> )
SVD	<i>small vessel disease</i>
TE	Tris-EDTA
T <sub>regs</sub>	regulatorische T-Zellen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit ( <i>Units</i> )
V	Volt

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Entstehung der Atherosklerose . . . . .	3
1.2	Lokalisation signifikanter Risiko-SNPs für atherosklerotischen Schlaganfall innerhalb der 7p21.1-Region . . . . .	5
1.3	Kolokalisation des SNPs rs2107595 mit Histonmodifikations- <i>Hotspots</i> und einem DNase I Hypersensitivitäts-Cluster . . . . .	7
1.4	Schematische Darstellung der Funktionsweise von Histonacetylasen und Histondeacetylasen . . . . .	8
1.5	Identifizierung Allel-spezifischer Bindepartner der rs2107595-Allele mittels PWAS . . . . .	12
1.6	Der E2F3/Rb1-Komplex im Zellzyklus-Verlauf . . . . .	13
1.7	rs2107595 liegt innerhalb einer E2F3-Bindungsstelle . . . . .	14
2.1	Schematische Darstellung der im Luziferase-Assay verwendeten Reporterkonstrukte . . . . .	16
2.2	Das häufige rs2107595-Allel wirkt als stärkerer <i>Enhancer</i> als das Risikoallel . . . . .	17
2.3	Relative mRNA-Expression von HDAC9, TWIST1 und FERD3L bezogen auf den Genotyp von rs2107595 in humanen Blutzellen . . . . .	19
2.4	Relative mRNA-Expression von HDAC9 bezogen auf den Genotyp von rs2107595 in humanen Lymphoblastoid-Zelllinien . . . . .	20
2.5	Durchflusszytometrische Analyse zur Überprüfung der Reinheit isolierter, regulatorischer T-Zellen . . . . .	22
2.6	Relative mRNA-Expression von HDAC9 und FOXP3 bezogen auf den rs2107595-Genotyp in humanen, regulatorischen T-Zellen . . . . .	23
2.7	Präferentielle Bindung von E2F3 im Western Blot an das häufige rs2107595-Allel, . . . . .	25
2.8	rs2107595-Allelstatus von HeLa(-S3)- und HEL293T-Zellen . . . . .	27
2.9	mRNA-Spiegel von E2F3a und Rb1 nach Überexpression . . . . .	28

2.10	HDAC9-Spiegel nach Überexpression von E2F3a und Rb . . . . .	29
2.11	Überexpression von E2F3a sowie Rb1 und resultierende HDAC9- Expression auf Proteinebene . . . . .	30
2.12	mRNA-Spiegel von HDAC4 und HDAC7 nach Überexpression von E2F3a und Rb1 in HeLa- und HEK293T-Zellen . . . . .	31
2.13	Effizienz der E2F3- und E2F4- <i>Knockdowns</i> in HeLa- und HEK293T- Zellen . . . . .	33
2.14	HDAC9-Expression nach <i>Knockdowns</i> von E2F3 sowie E2F4 auf mRNA-Ebene in HeLa- und HEK293T-Zellen . . . . .	34
2.15	<i>Knockdowns</i> von E2F3 sowie E2F4 und resultierende HDAC9- Expression auf Proteinebene . . . . .	34
2.16	HDAC4- und HDAC7 Expression nach <i>Knockdowns</i> von E2F3 sowie E2F4 auf mRNA-Ebene . . . . .	35
2.17	<i>Knockdowns</i> von Rb1, Rb11 und Rb12 auf mRNA-Ebene . . . . .	37
2.18	<i>Knockdowns</i> von Rb1, Rb11 und Rb12 auf Proteinebene . . . . .	38
2.19	HDAC9-Expression nach <i>Knockdowns</i> von Rb1, Rb11 und Rb12 auf mRNA-Ebene . . . . .	39
2.20	HDAC4- und HDAC7 Expression nach <i>Knockdowns</i> von Rb1, Rb11 und Rb12 auf mRNA-Ebene . . . . .	40
2.21	Zellzyklusphasen synchronisierter HeLa-Zellen . . . . .	43
2.22	HDAC9 mRNA-Expression nach Zellzyklus-Synchronisierung in HeLa-Zellen . . . . .	44
2.23	Genotypisierung humaner Jurkat-Zellen auf den Allelstatus des rs2107595 SNPs . . . . .	45
2.24	Zellzyklusphasen synchronisierter Jurkat-Zellen . . . . .	46
2.25	HDAC9-Expression nach Zellzyklus-Synchronisierung in Jurkat-Zellen . . . . .	47
2.26	FOXP3-Expression nach Zellzyklus-Synchronisierung in Jurkat-Zellen . . . . .	48
2.27	5'RACE-Transkripte aus HeLa- und HEK293T-Zellen im Agarosegel	49
2.28	Sequenzchromatogramm der mittels 5'RACE ermittelten HDAC9- Transkripte in HeLa- und HEK293T-Zellen . . . . .	50
2.29	Schematische Darstellung der mittels 5'RACE-identifizierten HDAC9- Transkripte in HeLa- und HEK293T-Zellen . . . . .	51
2.30	Expression der identifizierten HDAC9-Transkripte in HeLa- und HEK293T-Zellen . . . . .	52

2.31	Regulation der identifizierten HDAC9-Transkripte durch den E2F3/Rb-Komplex in HeLa- und HEK293T-Zellen . . . . .	53
2.32	Verwendete Luziferase-Reporterkonstrukte für die <i>HDAC9</i> -Promotorregion . . . . .	54
2.33	Relative Luziferaseaktivität der <i>HDAC9</i> -Promotorfragmente . . . . .	56
3.1	Hypothese zur Regulation von HDAC9 durch den E2F3/Rb1-Komplex am rs2107595 SNP . . . . .	65

# Tabellenverzeichnis

1.1	Klasseneinteilung der Histondeacetylasen . . . . .	9
4.1	Equipment . . . . .	66
4.2	Verbrauchsmaterialien . . . . .	69
4.3	Reagenziensets (Kits) . . . . .	71
4.4	Chemikalien und Reagenzien . . . . .	72
4.5	Oligonukleotide . . . . .	75
4.6	<i>TaqMan</i> Sonden . . . . .	77
4.7	siRNAs . . . . .	77
4.8	Plasmide . . . . .	78
4.9	Klonierungsdetails über selbst generierte Plasmide . . . . .	80
4.10	PCR-Ansatz . . . . .	81
4.11	PCR-Programm . . . . .	81
4.12	Restriktionsverdau . . . . .	83
4.13	quantitative <i>Real-Time</i> PCR, SYBR Green . . . . .	86
4.14	quantitative <i>Real-Time</i> PCR, <i>TaqMan</i> Sonden . . . . .	86
4.15	quantitative <i>Real-Time</i> PCR-Programm zur Gen-Expressionsanalyse .	87
4.16	quantitative <i>Real-Time</i> PCR, Genotypisierung der Risikovariante mit <i>TaqMan</i> Sonden . . . . .	87
4.17	quantitative <i>Real-Time</i> PCR-Programm zur Genotypisierung . . . . .	88
4.18	Zelllinien . . . . .	89
4.19	Transfektionsansätze für Plasmid-DNA . . . . .	91
4.20	Transfektionsansätze für siRNA . . . . .	91
4.21	Primär-Antikörper . . . . .	93
4.22	Sekundär-Antikörper . . . . .	93
4.23	Zusammensetzungen der Gele für SDS-PAGE . . . . .	96
4.24	Antikörper für Fluoreszenzaktivierte Durchflusszytometrie . . . . .	100

# Literaturverzeichnis

- [1] AIT-OUFELLA, H., B. L. SALOMON, S. POTTEAUX, A.-K. L. ROBERTSON, P. GOURDY, J. ZOLL, R. MERVAL, B. ESPOSITO, J. L. COHEN, S. FISSON, R. A. FLAVELL, G. K. HANSSON, D. KLATZMANN, A. TEDGUI und Z. MALLAT: *Natural regulatory T cells control the development of atherosclerosis in mice*. Nature Medicine, 12(2):178–180, Feb. 2006.
- [2] AZGHANDI, S., C. PRELL, S. W. VAN DER LAAN, M. SCHNEIDER, R. MALIK, K. BERER, N. GERDES, G. PASTERKAMP, C. WEBER, C. HAFFNER und M. DICHGANS: *Deficiency of the stroke relevant HDAC9 gene attenuates atherosclerosis in accord with allele-specific effects at 7p21.1*. Stroke, DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.007213, 2014.
- [3] BABU, M. M., S. C. JANGA, I. DE SANTIAGO und A. POMBO: *Eukaryotic gene regulation in three dimensions and its impact on genome evolution*. Current Opinion in Genetics & Development, S. 1–12, Nov. 2008.
- [4] BANNISTER, A. J. und T. KOUZARIDES: *Regulation of chromatin by histone modifications*. Nature Publishing Group, 21(3):381–395, Feb. 2011.
- [5] BEIER, U. H., T. AKIMOVA, Y. LIU, L. WANG und W. W. HANCOCK: *Histone/protein deacetylases control Foxp3 expression and the heat shock response of T-regulatory cells*. Current Opinion in Immunology, 23(5):670–678, Okt. 2011.
- [6] BELLENGUEZ, C., S. BEVAN, A. GSCHWENDTNER, C. C. A. SPENCER, A. I. BURGESS, M. PIRINEN, C. A. JACKSON, M. TRAYLOR, A. STRANGE und E. A. SU, ZHAN: *Genome-wide association study identifies a variant in HDAC9 associated with large vessel ischemic stroke*. Nature Publishing Group, 44(3):328–333, Feb. 2012.
- [7] BERGER, S. L.: *The complex language of chromatin regulation during transcription*. Nature, 447(7143):407–412, 2007.
- [8] BLAIS, A. und B. D. DYNLACHT: *E2F-associated chromatin modifiers and cell cycle control*. Current Opinion in Cell Biology, 19(6):658–662, Dez. 2007.

- [9] BREHM, A., E. MISKA, J. REID, A. BANNISTER und T. KOUZARIDES: *The cell cycle-regulating transcription factors E2F-RB.*. British journal of cancer, 80 Suppl 1:38–41, Juli 1999.
- [10] BUTTER, F., L. DAVISON, T. VITURAWONG, M. SCHEIBE, M. VERMEULEN, J. A. TODD und M. MANN: *Proteome-Wide Analysis of Disease-Associated SNPs That Show Allele-Specific Transcription Factor Binding.* PLoS Genetics, 8(9):e1002982, Sep. 2012.
- [11] CAO, Q., S. RONG, J. J. REPA, R. S. CLAIR, J. S. PARKS und N. MISHRA: *Histone Deacetylase 9 Represses Cholesterol Efflux and Generation of Alternatively Activated Macrophages in Atherosclerosis Development.*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, Juli 2014.
- [12] CHEN, H.-Z., S.-Y. TSAI und G. LEONE: *Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control.*. Nature reviews. Cancer, 9(11):785–797, Nov. 2009.
- [13] CHORLEY, B., X. WANG, M. CAMPBELL, G. PITTMAN, M. NOUREDDINE und D. BELL: *Discovery and verification of functional single nucleotide polymorphisms in regulatory genomic regions: Current and developing technologies.* Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 659(1-2):147–157, Juli 2008.
- [14] COBRINIK, D.: *Pocket proteins and cell cycle control.* Oncogene, 24(17):2796–2809, Apr. 2005.
- [15] DELOUKAS, P., S. KANONI, C. WILLENBORG, M. FARRALL, T. L. ASSIMES, J. R. THOMPSON, E. INGELSSON, D. SALEHEEN, J. ERDMANN und E. A. GOLDSTEIN: *Large-scale association analysis identifies new risk loci for coronary artery disease.* Nature Genetics, 45(1):25–33, Dez. 2012.
- [16] DICHGANS, M.: *Genetics of ischaemic stroke.* The Lancet Neurology, 6(2):149–161, 2007.
- [17] DICHGANS, M., R. MALIK, I. R. KONIG, J. ROSAND, R. CLARKE, S. GRE-TARSDOTTIR, G. THORLEIFSSON, B. D. MITCHELL, T. L. ASSIMES und E. A. LEVI, C: *Shared Genetic Susceptibility to Ischemic Stroke and Coronary Artery Disease: A Genome-Wide Analysis of Common Variants.* Stroke, 45(1):24–36, Dez. 2013.



- [18] DIMOVA, D. K. und N. J. DYSON: *The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces*. *Oncogene*, 24(17):2810–2826, Apr. 2005.
- [19] DIXON, A. L., L. LIANG, M. F. MOFFATT, W. CHEN, S. HEATH, K. C. C. WONG, J. TAYLOR, E. BURNETT, I. GUT, M. FARRALL, G. M. LATHROP, G. R. ABECASIS und W. O. C. COOKSON: *A genome-wide association study of global gene expression*. *Nature Genetics*, 39(10):1202–1207, Sep. 2007.
- [20] DONNAN, G. A., M. FISHER, M. MACLEOD und S. M. DAVIS: *Stroke*. *The Lancet*, 371(9624):1612–1623, Mai 2008.
- [21] DUBRIDGE, R. B., P. TANG, H. C. HSIA, P.-M. LEONG, J. H. MILLER und M. P. CALOS: *Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system..* *Molecular and Cellular Biology*, 7(1):379–387, 1987.
- [22] EDDY, S. R.: *Non-coding RNA genes and the modern RNA world..* *Nature Reviews Genetics*, 2(12):919–929, Dez. 2001.
- [23] FALK, E.: *Pathogenesis of Atherosclerosis*. *Journal of the American College of Cardiology*, 47(8):C7–C12, Apr. 2006.
- [24] FALKENBERG, K. J. und R. W. JOHNSTONE: *Histone deacetylases and their inhibitors in cancer, neurological diseases and immune disorders*. *Nature Publishing Group*, 13(9):673–691, Aug. 2014.
- [25] FISCHER, A., F. SANANBENESI, A. MUNGENAST und L.-H. TSAI: *Targeting the correct HDAC(s) to treat cognitive disorders*. *Trends in Pharmacological Sciences*, 31(12):605–617, Dez. 2010.
- [26] GIANGRANDE, P. H., T. C. HALLSTROM, C. TUNYAPLIN, K. CALAME und J. R. NEVINS: *Identification of E-Box Factor TFE3 as a Functional Partner for the E2F3 Transcription Factor*. *Molecular and Cellular Biology*, 23(11):3707–3720, Juni 2003.
- [27] GLASS, C. K. und J. L. WITZTUM: *Atherosclerosis. the road ahead..* *Cell*, 104(4):503–516, Feb. 2001.
- [28] GOODRICH, D. W.: *The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule*. *Oncogene*, 25(38):5233–5243, Aug. 2006.
- [29] GRAHAM, F. L., J. SMILEY, W. C. RUSSELL und R. NAIRN: *Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5..* *The Journal of general virology*, 36(1):59–74, Juli 1977.

- [30] GULCHER, J. R., S. GRETARSDOTTIR, A. HELGADOTTIR und K. STEFANSSON: *Genes contributing to risk for common forms of stroke*. Trends in Molecular Medicine, 11(5):217–224, Mai 2005.
- [31] HABERLAND, M., M. A. ARNOLD, J. MCANALLY, D. PHAN, Y. KIM und E. N. OLSON: *Regulation of HDAC9 Gene Expression by MEF2 Establishes a Negative-Feedback Loop in the Transcriptional Circuitry of Muscle Differentiation*. Molecular and Cellular Biology, 27(2):518–525, Dez. 2006.
- [32] HABERLAND, M., R. L. MONTGOMERY und E. N. OLSON: *The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy*. Nature Reviews Genetics, 10(1):32–42, Jan. 2009.
- [33] HANSSON, G. K.: *Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease*. The New England journal of medicine, 352(16):1685–1695, Apr. 2005.
- [34] HANSSON, G. K. und A. HERMANSSON: *The immune system in atherosclerosis*. Nature Immunology, 12(3):204–212, März 2011.
- [35] HARBOUR, J. W.: *The Rb/E2F pathway: expanding roles and emerging paradigms*. Genes & Development, 14(19):2393–2409, Okt. 2000.
- [36] HARBOUR, J. W. und D. C. DEAN: *Chromatin remodeling and Rb activity*. Current Opinion in Cell Biology, 12(6):685–689, Dez. 2000.
- [37] HEUVEL, S. VAN DEN und N. J. DYSON: *Conserved functions of the pRB and E2F families*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 9(9):713–724, Sep. 2008.
- [38] HEYNINGEN, V. VAN und W. BICKMORE: *Regulation from a distance: long-range control of gene expression in development and disease*. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 368(1620):20120372–20120372, Mai 2013.
- [39] HÜTTENHOFER, A., P. SCHATTNER, J. HALL, J. S. MATTICK, T. R. BRUMMELKAMP, R. BERNARDS und R. A. MARTIENSSEN: *Whither RNAi?*. Nat. Cell. Biol, 5:489–490, 2003.
- [40] KALUZA, D., J. KROLL, S. GESIERICH, Y. MANAVSKI, J. N. BOECKEL, C. DOEBELE, A. ZELENT, L. ROSSIG, A. M. ZEIHNER, H. G. AUGUSTIN, C. URBICH und S. DIMMELER: *Histone Deacetylase 9 Promotes Angiogenesis by Targeting the Antiangiogenic MicroRNA-17-92 Cluster in Endothelial Cells*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 33(3):533–543, Feb. 2013.

- [41] KAWASAKI, H., K. TAIRA und K. V. MORRIS: *Review siRNA Induced Transcriptional Gene Silencing in Mammalian Cells*. Cell Cycle, 4(3):442–448, 2005.
- [42] KITTLER, R. und F. BUCHHOLZ: *Functional genomic analysis of cell division by endoribonuclease-prepared siRNAs..* Cell Cycle, 4(4):564–567, Apr. 2005.
- [43] KLINGENBERG, R., N. GERDES, R. M. BADEAU, A. GISTERÅ, D. STRODT-HOFF, D. F. J. KETELHUTH, A. M. LUNDBERG, M. RUDLING, S. K. NILSSON, G. OLIVECRONA, S. ZOLLER, C. LOHMANN, T. F. LÜSCHER, M. JAUHAINEN, T. SPARWASSER und G. K. HANSSON: *Depletion of FOXP3+ regulatory T cells promotes hypercholesterolemia and atherosclerosis*. Journal of Clinical Investigation, 123(3):1323–1334, Feb. 2013.
- [44] KRAKOFF, I. H., N. C. BROWN und P. REICHARD: *Inhibition of ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea..* Cancer research, 28(8):1559–1565, Aug. 1968.
- [45] LARESGOITI, U., A. APRAIZ, M. OLEA, J. MITXELENA, N. OSINALDE, J. A. RODRIGUEZ, A. FULLAONDO und A. M. ZUBIAGA: *E2F2 and CREB cooperatively regulate transcriptional activity of cell cycle genes*. Nucleic Acids Research, Sep. 2013.
- [46] LEE, B. K., A. A. BHINGE und V. R. IYER: *Wide-ranging functions of E2F4 in transcriptional activation and repression revealed by genome-wide analysis*. Nucleic Acids Research, 39(9):3558–3573, Mai 2011.
- [47] LIBBY, P.: *Vascular biology of atherosclerosis: overview and state of the art..* The American journal of cardiology, 91(3A):3A–6A, Feb. 2003.
- [48] LIBBY, P., A. H. LICHTMAN und G. K. HANSSON: *Immune Effector Mechanisms Implicated in Atherosclerosis: From Mice to Humans*. IMMUNI, 38(6):1092–1104, Juni 2013.
- [49] LIBBY, P., P. M. RIDKER und G. K. HANSSON: *Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis*. Nature, 473(7347):317–325, Mai 2011.
- [50] LOBERA, M., K. P. MADAUSS, D. T. POHLHAUS, Q. G. WRIGHT, M. TROCHA, D. R. SCHMIDT, E. BALOGLU, R. P. TRUMP, M. S. HEAD, G. A. HOFMANN, M. MURRAY-THOMPSON, B. SCHWARTZ, S. CHAKRAVORTY, Z. WU, P. K. MANDER, L. KRUIDENIER, R. A. REID, W. BURKHART, B. J. TURUNEN, J. X. RONG, C. WAGNER, M. B. MOYER, C. WELLS, X. HONG, J. T.

- MOORE, J. D. WILLIAMS, D. SOLER, S. GHOSH und M. A. NOLAN: *selective class IIa histone deacetylase inhibition via a nonchelating zinc-binding group*. Nature Chemical Biology, 9(5):319–325, März 2013.
- [51] LUSIS, A. J.: *Atherosclerosis*.. Nature, 407(6801):233–241, Sep. 2000.
- [52] MACALUSO, M., M. MONTANARI und A. GIORDANO: *Rb family proteins as modulators of gene expression and new aspects regarding the interaction with chromatin remodeling enzymes*. Oncogene, 25(38):5263–5267, Aug. 2006.
- [53] MALLAT, Z., H. AIT-OUFELLA und A. TEDGUI: *Regulatory T-cell immunity in atherosclerosis*.. Trends in Cardiovascular Medicine, 17(4):113–118, Mai 2007.
- [54] MANN, M.: *Functional and quantitative proteomics using SILAC*.. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 7(12):952–958, Dez. 2006.
- [55] MARKS, P.: *Histone deacetylases*. Current Opinion in Pharmacology, 3(4):344–351, Aug. 2003.
- [56] MARKUS, H. S., K. M. MAKELA, S. BEVAN, E. RAITOHARJU, N. OKSALA, J. C. BIS, C. O'DONNELL, A. HAINSWORTH und T. LEHTIMAKI: *Evidence HDAC9 Genetic Variant Associated With Ischemic Stroke Increases Risk via Promoting Carotid Atherosclerosis*. Stroke, 44(5):1220–1225, Apr. 2013.
- [57] MARSMAN, J. und J. A. HORSFIELD: *Long distance relationships: enhancer-promoter communication and dynamic gene transcription*.. Biochimica et biophysica acta, 1819(11-12):1217–1227, Nov. 2012.
- [58] MATTICK, J. S.: *Non-coding RNA*. Human molecular genetics, 15(90001):R17–R29, Apr. 2006.
- [59] MEHTA, D., C. ANACKER, M. REX-HAFFNER, J. C. PRUESSNER, C. M. PARIANTE, T. W. W. PACE, K. B. MERCER, H. S. MAYBERG, B. BRADLEY, C. B. NEMEROFF, F. HOLSBOER, C. M. HEIM, K. J. RESSLER, T. REIN, T. KLENGEL und E. B. BINDER: *Allele-specific FKBP5 DNA demethylation mediates gene–childhood trauma interactions*. Nature Neuroscience, S. 1–12, Dez. 2012.
- [60] MIRAOU, H. und P. J. MARIE: *Pivotal role of Twist in skeletal biology and pathology*. Gene, 468(1-2):1–7, Nov. 2010.

- [61] MITTLER, G., F. BUTTER und M. MANN: *A SILAC-based DNA protein interaction screen that identifies candidate binding proteins to functional DNA elements*. Genome Research, 19(2):284–293, Dez. 2008.
- [62] MORAN, E.: *DNA tumor virus transforming proteins and the cell cycle*.. Current Opinion in Genetics & Development, 3(1):63–70, Feb. 1993.
- [63] MSC, M. T., M. F. FRCPATH, E. G. H. PHD, C. S. FRCP, J. C. H. PHD, Y.-C. C. PHD, M. F. PHD, M. A. I. MD, R. M. PHD und E. A. PHD, STEVE BEVAN: *Genetic risk factors for ischaemic stroke and its subtypes (the METASTROKE Collaboration): a meta-analysis of genome-wide association studies*. The Lancet Neurology, 11(11):951–962, Okt. 2012.
- [64] MÜLLER, H., A. P. BRACKEN, R. VERNELL, M. C. MORONI, F. CHRISTIANS, E. GRASSILLI, E. PROSPERINI, E. VIGO, J. D. OLINER und K. HELIN: *E2Fs regulate the expression of genes involved in differentiation, development, proliferation, and apoptosis*.. Genes & Development, 15(3):267–285, Feb. 2001.
- [65] MUSUNURU, K., A. STRONG, M. FRANK-KAMENETSKY, N. E. LEE, T. AHFELDT, K. V. SACHS, X. LI, H. LI, N. KUPERWASSER, V. M. RUDA, J. P. PIRRUCCELLO, B. MUCHMORE, L. PROKUNINA-OLSSON, J. L. HALL, E. E. SCHADT, C. R. MORALES, S. LUND-KATZ, M. C. PHILLIPS, J. WONG, W. CANTLEY, T. RACIE, K. G. EJEBE, M. ORHO-MELANDER, O. MELANDER, V. KOTELIANSKY, K. FITZGERALD, R. M. KRAUSS, C. A. COWAN, S. KATHIRESAN und D. J. RADER: *From noncoding variant to phenotype via SORT1 at the 1p13 cholesterol locus*. Nature, 466(7307):714–719, Mai 2010.
- [66] NEVINS, J. R.: *The Rb/E2F pathway and cancer*.. Human molecular genetics, 10(7):699–703, Apr. 2001.
- [67] NEVINS, J. R., G. LEONE, J. DEGREGORI und L. JAKOI: *Role of the Rb/E2F pathway in cell growth control*.. Journal of cellular physiology, 173(2):233–236, Nov. 1997.
- [68] NG, H. H. und A. BIRD: *Histone deacetylases: silencers for hire*.. Trends in biochemical sciences, 25(3):121–126, März 2000.
- [69] NILSSON, J., M. WIGREN und P. K. SHAH: *Regulatory T Cells and the Control of Modified Lipoprotein Autoimmunity-Driven Atherosclerosis*. Trends in Cardiovascular Medicine, 19(8):272–276, Nov. 2009.

- [70] ONO, Y., T. NAKATANI, Y. MINAKI und M. KUMAI: *The basic helix-loop-helix transcription factor Noto3 controls neurogenic activity in mesencephalic floor plate cells*. Development, 137(11):1897–1906, Mai 2010.
- [71] PENNACCHIO, L. A., W. BICKMORE, A. DEAN, M. A. NOBREGA und G. BEJERANO: *Enhancers: five essential questions*. Nature Reviews Genetics, 14(4):288–295, Apr. 2013.
- [72] PETRIE, K., F. GUIDEZ, L. HOWELL, L. HEALY, S. WAXMAN, M. GREAVES und A. ZELENTO: *The Histone Deacetylase 9 Gene Encodes Multiple Protein Isoforms*. Journal of Biological Chemistry, 278(18):16059–16072, Mai 2003.
- [73] PLUTZKY, J.: *The vascular biology of atherosclerosis*. The American Journal of Medicine, 115(8):55–61, Dez. 2003.
- [74] PONS, D., F. R. DE VRIES, P. J. VAN DEN ELSEN, B. T. HEIJMANS, P. H. A. QUAX und J. W. JUKEMA: *Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodelling: new targets for therapy in cardiovascular disease*. European Heart Journal, 30(3):266–277, Sep. 2008.
- [75] QIN, Q., Y. XU, T. HE, C. QIN und J. XU: *Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms*. Nature Publishing Group, 22(1):90–106, Aug. 2011.
- [76] REDDY, P. und W. ZOU: *Blocking HDACs boosts regulatory T cells*. Nature Medicine, 13(11):1282–1284, Nov. 2007.
- [77] ROPERO, S. und M. ESTELLER: *The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer*. Molecular Oncology, 1(1):19–25, Juni 2007.
- [78] ROSENBLUM, K. R., C. A. SLOAN, V. S. MALLADI, T. R. DRESZER, K. LEARNED, V. M. KIRKUP, M. C. WONG, M. MADDREN, R. FANG, S. G. HEITNER, B. T. LEE, G. P. BARBER, R. A. HARTE, M. DIEKHANS, J. C. LONG, S. P. WILDER, A. S. ZWEIG, D. KAROLCHIK, R. M. KUHN, D. HAUSSLER und W. J. KENT: *ENCODE Data in the UCSC Genome Browser: year 5 update*. Nucleic Acids Research, 41(D1):D56–D63, Dez. 2012.
- [79] ROSS, R.: *Atherosclerosis is an inflammatory disease*. American heart journal, 138(5 Pt 2):S419–20, Nov. 1999.
- [80] ROWLAND, B. D. und R. BERNARDS: *Re-Evaluating Cell-Cycle Regulation by E2Fs*. Cell, 127(5):871–874, Dez. 2006.

- [81] RUIJTER, A. J. M. DE, A. H. VAN GENNIP, H. N. CARON, S. KEMP und A. B. P. VAN KUILENBURG: *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family.* The Biochemical journal, 370(Pt 3):737–749, März 2003.
- [82] SACHDEVA, U. M. und J. M. O'BRIEN: *Understanding pRb: toward the necessary development of targeted treatments for retinoblastoma.* Journal of Clinical Investigation, 122(2):425–434, Feb. 2012.
- [83] SANYAL, A., B. R. LAJOIE, G. JAIN und J. DEKKER: *The long-range interaction landscape of gene promoters.* Nature, 489(7414):109–113, Apr. 2013.
- [84] SATO, Y.: *Is Histone Deacetylase-9-MicroRNA-17 92 Cluster a Novel Axis for Angiogenesis Regulation?*. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology, 33(3):445–446, Feb. 2013.
- [85] SHAKESPEAR, M. R., M. A. HALILI, K. M. IRVINE, D. P. FAIRLIE und M. J. SWEET: *Histone deacetylases as regulators of inflammation and immunity.* Trends in Immunology, 32(7):335–343, Juli 2011.
- [86] SHLYUEVA, D., G. STAMPFEL und A. STARK: *Transcriptional enhancers: from properties to genome-wide predictions.* Nature Reviews Genetics, 15(4):272–286, März 2014.
- [87] SIE, L., S. LOONG und E. K. TAN: *Utility of lymphoblastoid cell lines.* Journal of Neuroscience Research, 87(9):1953–1959, Juli 2009.
- [88] SILVESTRE-ROIG, C., M. P. DE WINTHER, C. WEBER, M. J. DAEMEN, E. LUTGENS und O. SOEHNLEIN: *Atherosclerotic Plaque Destabilization: Mechanisms, Models, and Therapeutic Strategies.* Circulation Research, 114(1):214–226, Jan. 2014.
- [89] SMALLWOOD, A. und B. REN: *Genome organization and long-range regulation of gene expression by enhancers.* Current Opinion in Cell Biology, 25(3):387–394, Juni 2013.
- [90] SPITZ, F. und E. E. M. FURLONG: *Transcription factors: from enhancer binding to developmental control.* Nature Reviews Genetics, 13(9):613–626, Aug. 2012.
- [91] STRANGER, B. E., M. S. FORREST, M. DUNNING, C. E. INGLE, C. BEAZLEY, N. THORNE, R. REDON, C. P. BIRD, A. DE GRASSI, C. LEE, C. TYLER-SMITH, N. CARTER, S. W. SCHERER, S. TAVARE, P. DELOUKAS, M. E. HUR-

- LES und E. T. DERMITZAKIS: *Relative Impact of Nucleotide and Copy Number Variation on Gene Expression Phenotypes*. Science, 315(5813):848–853, Feb. 2007.
- [92] SWISS, V. A. und P. CASACCIA: *Cell-context specific role of the E2F/Rb pathway in development and disease*. Glia, S. NA–NA, 2009.
- [93] TALEB, S., A. TEDGUI und Z. MALLAT: *Regulatory T-cell immunity and its relevance to atherosclerosis*. Journal of Internal Medicine, 263(5):489–499, Mai 2008.
- [94] TALLURI, S. und F. A. DICK: *Regulation of transcription and chromatin structure by pRB: Here, there and everywhere*. Cell Cycle, 11(17):3189–3198, Sep. 2012.
- [95] TAO, R., E. F. DE ZOETEN, E. ÖZKAYNAK, C. CHEN, L. WANG, P. M. PORRETT, B. LI, L. A. TURKA, E. N. OLSON, M. I. GREENE, A. D. WELLS und W. W. HANCOCK: *Deacetylase inhibition promotes the generation and function of regulatory T cells*. Nature Medicine, 13(11):1299–1307, Okt. 2007.
- [96] TRIMARCHI, J. M. und J. A. LEES: *TRANSCRIPTIONSIBLING RIVALRY IN THE E2F FAMILY*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 3(1):11–20, Jan. 2002.
- [97] VERDIN, E., F. DEQUIEDT und H. G. KASLER: *Class II histone deacetylases: versatile regulators*. Trends in Genetics, 19(5):286–293, Mai 2003.
- [98] VERMEULEN, K., D. R. VAN BOCKSTAELE und Z. N. BERNEMAN: *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. Cell proliferation, 36(3):131–149, Juni 2003.
- [99] VISEL, A., E. M. RUBIN und L. A. PENNACCHIO: *Genomic views of distant-acting enhancers*. Nature, 461(7261):199–205, Sep. 2009.
- [100] WAMSTAD, J. A., X. WANG, O. O. DEMUREN und L. A. BOYER: *Distal enhancers: new insights into heart development and disease*. Trends in Cell Biology, 24(5):294–302, Mai 2014.
- [101] WANG, W. Y. S., B. J. BARRATT, D. G. CLAYTON und J. A. TODD: *Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns*. Nature Reviews Genetics, 6(2):109–118, Feb. 2005.
- [102] WINGENDER, E., X. CHEN, R. HEHL, H. KARAS, I. LIEBICH, V. MATYS, T. MEINHARDT, M. PRÜSS, I. REUTER und F. SCHACHERER: *TRANSFAC:*



- an integrated system for gene expression regulation..* Nucleic Acids Research, 28(1):316–319, Jan. 2000.
- [103] XIAO, Y., B. LI, Z. ZHOU, W. W. HANCOCK, H. ZHANG und M. I. GREENE: *Histone acetyltransferase mediated regulation of FOXP3 acetylation and Treg function.* Current Opinion in Immunology, 22(5):583–591, Okt. 2010.
- [104] YAN, K., Q. CAO, C. M. REILLY, N. L. YOUNG, B. A. GARCIA und N. MISHRA: *Histone Deacetylase 9 Deficiency Protects against Effector T Cell-mediated Systemic Autoimmunity.* Journal of Biological Chemistry, 286(33):28833–28843, Aug. 2011.
- [105] ZHANG, C. L., T. A. MCKINSEY und E. N. OLSON: *Association of Class II Histone Deacetylases with Heterochromatin Protein 1: Potential Role for Histone Methylation in Control of Muscle Differentiation.* Molecular and Cellular Biology, 22(20):7302–7312, Okt. 2002.
- [106] ZHENG, N., E. FRAENKEL, C. O. PABO und N. P. PAVLETICH: *Structural basis of DNA recognition by the heterodimeric cell cycle transcription factor E2F-DP..* Genes & Development, 13(6):666–674, März 1999.
- [107] ZOETEN, E. F. DE, L. WANG, H. SAI, W. H. DILLMANN und W. W. HANCOCK: *Inhibition of HDAC9 Increases T Regulatory Cell Function and Prevents Colitis in Mice.* YGAST, 138(2):583–594, Feb. 2010.

# Danksagung

Ich danke **Prof. Dr. Klaus Förstemann** für seine Zeit und die Übernahme der Fachvertretung meiner Dissertation. **Prof. Dr. Martin Dichgans** möchte ich für die Möglichkeit danken diese Arbeit am Institut für Schlaganfall- und Demenzforschung anzufer-tigen, für die Initiierung des Projekts und für sein Interesse.

Ich danke ganz besonders **PD Dr. Christof Haffner** für die Betreuung dieser Arbeit. Herzlichen Dank für Deine stets offene Tür, die vielen wissenschaftlichen Diskussio-nen, Dein unendliches Fachwissen und für Deine Unterstützung bei allen Problemen, die im Verlauf dieser Arbeit aufgetreten sind.

Ich danke **Prof. Dr. Nikolaus Plesnila**, **Prof. Dr. Christian Wahl-Schott**, **Prof. Dr. Stefan Zahler** und **Prof. Dr. Martin Biel** für Ihre Zeit und Mühe, Teil meiner Prüfungskommission zu sein.

Ich danke **Dr. Rainer Malik** und **Dr. Marco Düring** für Ihre Unterstützung und die vielen Antworten bei statistischen und medizinischen Fragen. Des Weiteren möchte ich mich bei **Dr. Matthias Prestel** und **Manuel Lehm** für die Zusammenarbeit bedan-ken. Ich danke **Dr. Georg Wittmann** und der Abteilung für Transfusionsmedizin und Hämostaseologie des Klinikums Großhadern für den Aufwand und die monatelange Bereitstellung von Blutproben und **Dr. Marion Frankenberger** vom *Comprehensive Pneumology Center* für ihre wertvollen Tipps und Unterstützung bei den FACS-Analysen der regulatorischen T-Zellen.

Bei **Barbara Lindner** möchte ich mich für Ihre großartige Hilfe, für Ihre seelische Un-terstützung und Ihre ansteckende Fröhlichkeit bedanken. Ich danke **Daniel Loose** für die schnelle Hilfe bei allen Computerfragen und -problemen und für die vielen spaßigen, privaten Schunkeleien! Bei **Sepiede Azghandi** möchte ich mich besonders für die intensive Zusammenarbeit in den letzten Monaten, Ihre Hilfe als auch für Ihren erfrischenden Gute-Laune-Klingelton bedanken!

Ich möchte mich bei allen ehemaligen und derzeitigen **Mitarbeitern** am ISD für Ihre Hilfsbereitschaft, eine tolle Atmosphäre und eine richtig gute Zeit bedanken!

Ein ganz besonderer Dank geht an die drei Weibsen **Eva Scharrer, Patrizia Hanecker** und **Jessica Kast**. Ich danke euch für diese unglaubliche Zeit, die wir tagtäglich zusammen verbracht haben. Wir haben uns gemeinsam gefreut, uns in *slippery* Phasen *wings* gegeben, ausgetauscht und geholfen, historische Momente miteinander erlebt, eine gemeinsame Freude an möglichst schlechten Witzen entdeckt und aus all dem eine Freundschaft gebacken.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei meinen **Eltern**, Elfi und Richard, bedanken. Ich danke Euch, dass Ihr mich immer mit all eurer Kraft und Liebe unterstützt habt. Ihr habt mich in schwierigen Zeiten aufgefangen und angetrieben und Euch bei tollen Ereignissen mit mir begeistert und gefreut.

Ich danke von ganzem Herzen meinem mir inzwischen angetrauten, lieben Mann **Dominik Schicker**. Du hast mich in allen Phasen dieser Arbeit begleitet, ertragen und getragen, immer tatkräftig unterstützt und für spaßigen und sportlichen Ausgleich gesorgt!!

Ein weiterer Herzensdank geht an meine lieben Franken-Mädels **Kat, Hanna, Sassl, Retsch, Anne, Gebbi** und **Ela**. Ich danke Euch für euer Verständnis, wenn mal wieder Zeitmangel herrschte, für Euer Mitfiebern, Anspornen und für das Bauchweh, das man bei unseren Treffen vor lauter Lachen bekommt!