

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
Direktor: Herr Prof. Dr. med. Triantafyllos Chavakis

Funktion und epigenetische Regulation des Phospholipase A2-
Rezeptors (PLA2R1) bei Prostatatumorerkrankung und akuter
lymphoblastischer Leukämie im Kindesalter

D i s s e r t a t i o n s s c h r i f t
zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)
vorgelegt
der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus
der Technischen Universität Dresden

von

Master of Science, Markus Friedemann

aus Leipzig

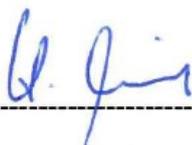
Dresden 2020

2. Blatt (2. Seite)

1. Gutachter: Prof. Dr. Mario Menschikowski

2. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Gräßler

Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2021

gez.:  _____
Vorsitzender der Promotionskommission

Anmerkung: Die Eintragung der Gutachter und Tag der mündlichen Prüfung (Verteidigung) erfolgt nach Festlegung von Seiten der Medizinischen Fakultät Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden. Die oben genannten Eintragungen werden durch die Doktoranden nach der Verteidigung zwecks Übergabe der fünf Pflichtexemplare an die Zweigbibliothek Medizin in gedruckter Form oder handschriftlich vorgenommen.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	4
2	Abstract.....	8
3	Einführung in die Thematik.....	11
4	Publikation 1: "Diverse Effects of Phospholipase A2 Receptor Expression on LNCaP and PC-3 Prostate Cancer Cell Growth in vitro and in vivo".....	24
5	Publikation 2: "Methylation of the Phospholipase A2 Receptor 1 Promoter Region in Childhood B Cell Acute Lymphoblastic Leukaemia".....	25
6	Diskussion und Ausblick.....	26
7	Literaturverzeichnis	32
8	Danksagung.....	41
9	Anlagen.....	42

1 Zusammenfassung

Hintergrund:

Der Phospholipase A2 Rezeptor 1 (PLA2R1) ist ein Typ 1 Transmembranrezeptor, welcher der Mannose-Rezeptor-Familie zugeordnet werden kann. Die Bedeutung von PLA2R1 für physiologische und pathologische Vorgänge ist noch weitestgehend unbekannt. Jedoch wird die Regulation wichtiger zellulärer Prozesse, wie Proliferation, Apoptose/ Seneszenz, Adhäsion, Migration/ Invasion und Inflammation im Zusammenhang mit dem Rezeptor diskutiert. Darüber hinaus ist eine Änderung der PLA2R1-Expression bei der Entstehung verschiedenster Krebserkrankung nachweisbar. Hierbei wird der Rezeptor einerseits mit einer pro-onkogenen und pro-migratorischen Wirkung in Verbindung gebracht. Andererseits ist ein tumorsuppressiver Effekt von PLA2R1 und eine Induktion der mitochondrialen Apoptose in Tumorzellen beschrieben. Zudem ist die Expression von PLA2R1 durch epigenetische Mechanismen kontrolliert und eine Promotor-Hypermethylierung ist assoziiert mit einer Repression der Rezeptor-Expression in der Prostatakarzinom (PCa)-Zelllinie LNCaP und der pädiatrischen, akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL)-Zelllinie Jurkat. Vorangegangene Arbeiten zeigten eine Hypermethylierung innerhalb eines definierten Bereiches des PLA2R1-Promotors bei adulten Patienten mit akuter myeloischer Leukämie und Myelodysplastischem Syndrom (MDS) sowie eine Korrelation der *PLA2R1*-Promotormethylierung mit dem Krankheitsstadium und der Klassifizierung nach dem Internationalen Prognostischen Scoring System (IPSS).

Fragestellung/ Hypothese:

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war einerseits die Untersuchung der Funktion von PLA2R1 in den PCa-Zelllinien LNCaP und PC-3. Während in LNCaP die Rezeptor-Expression durch Promotor-Hypermethylierung unterdrückt ist, kann in PC-3-Zellen eine Hochregulation von PLA2R1 im Vergleich zu normalen Prostataepithelzellen nachgewiesen werden. Durch *in vitro* Transfektionsexperimente sollte der Effekt einer Re-expression von PLA2R1 in LNCaP-Zellen sowie die Auswirkungen einer Reduktion der PLA2R1-Expression in PC-3-Zellen untersucht werden. Der Einfluss der veränderten PLA2R1-Expressionslevel auf wichtige Zellparameter wurde evaluiert. Die *in vitro* Daten der PCa-Zelllinien wurden mit den *in vivo* Ergebnissen des Tumorwachstums von transfizierten LNCaP- und PC-3-Zellen in Xenograft-Mausmodellen verglichen.

Andererseits sollte basierend auf den Ergebnissen von adulten Patienten mit AML- und MDS-Diagnose und der dabei festgestellten Hypermethylierung des Rezeptor-Promotors der Methylierungsstatus des Rezeptors bei der pädiatrischen ALL untersucht werden. Überdies

sollte die Eignung der *PLA2R1*-Methylierungsanalyse als sensitiver Biomarker für die Therapiekontrolle, Überwachung der minimalen Resterkrankung (MRD) und Risikostratifizierung der pädiatrischen ALL evaluiert werden. Die Funktion des Rezeptors im Kontext der pädiatrischen ALL wurde durch eine transfektionsbasierte Re-expression von *PLA2R1* in der Jurkat-ALL-Zelllinie untersucht. Durch *in vitro* Experimente wurden die Auswirkungen der verschiedenen *PLA2R1*-Expressionslevel auf Proliferation und Apoptose/ Nekrose in transfizierten Jurkat-Zellen analysiert.

Material und Methoden:

Durch Transfektion mit einem *PLA2R1*-Expressionsvektor konnte eine stabile Überexpression des Rezeptors in LNCaP- (LNCaP-*PLA2R1*) und Jurkat-Zellen (Jurkat-*PLA2R1*) erreicht und die Ergebnisse mit Kontrollvektor-transfizierten LNCaP- (LNCaP-Ctrl) und Jurkat-Zellen (Jurkat-Ctrl) verglichen werden. Mittels CRISPR/Cas9-Knockdown konnte eine Verminderung der *PLA2R1*-Expression in PC-3-Zellen (PC-3-KD) im Vergleich zu Kontrollvektor-transfizierten PC-3-Zellen (PC-3-Ctrl) erreicht werden. Genexpressionsanalysen wurden mittels quantitativer PCR nach reverser Transkription (RT-qPCR) durchgeführt und die Proteinsynthese des Rezeptors durch Western Blot Analyse überprüft. *In vitro* sollten die Auswirkungen der differentiellen *PLA2R1*-Expression der transfizierten Zellen auf wichtige proliferative und metastatische Zellparameter untersucht werden. Die Zellviabilität/ Proliferation wurde mittels WST-1 Assay für adhärenzte Zellen und Zellwachstumskurven-Analyse mit Trypanblau-Färbung bei Suspensionszellen analysiert. Zellmotilität und Proliferation wurden bei transfizierten PCa-Zelllinien mithilfe des Wundheilungsassays beurteilt. Apoptose konnte durch Wasserstoffperoxid stimuliert und mittels *Caspase-Glo® 3/7 Assay* und *RealTime-Glo™ Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay* für transfizierte PCa-Zelllinien sowie durchflusszytometrische Analysen nach Annexin-V-FLUOS/ Hoechst 33258 Färbung für transfizierte Jurkat-Zellen untersucht werden. Die klonogene Überlebensrate und das Koloniewachstum der transfizierten PCa-Zelllinien sollten mithilfe des klonogenen Assays analysiert werden. In einer *in vivo* Pilotstudie wurde der Effekt von *PLA2R1* auf das Tumorwachstum mittels Xenograft-Mausmodellen (männliche SCID/beige Mäuse) durch subkutane Injektion der transfizierten LNCaP- (n = 5) und PC-3-Zellen (n = 9) überprüft.

Die *PLA2R1*-Promotormethylierung als sensitiver Biomarker für die pädiatrische ALL wurde durch Isolation und Bisulfit-Behandlung der genomischen DNA von Knochenmark (KM)-Aspiraten und Leukozyten des peripheren Blutes (PB) von ALL-diagnostizierten Kindern (n = 44) sowie einer anschließenden Analyse mittels digitaler PCR (dPCR) evaluiert. Die Ergebnisse konnten mit dem Methylierungsstatus einer gesunden Kontrollgruppe (n = 20) verglichen werden.

Ergebnisse und Schlussfolgerungen:

In LNCaP-PLA2R1 und Jurkat-PLA2R1 konnte im Gegensatz zu den dazugehörigen Kontrollzellen eine stabile Überexpression des Rezeptors auf Ebene der Genexpression und Proteinsynthese detektiert werden. Bei PC-3-KD-Zellen war eine Reduktion der PLA2R1-Genexpression und eine Repression der Proteinsynthese unterhalb der Nachweisgrenze des Western Blot Assays zu verzeichnen, während PC-3-Ctrl-Zellen eine Genexpression und Proteinsynthese des Rezeptors zeigten. Die Zellviabilität/ Proliferation und Motilität war signifikant erhöht in LNCaP-PLA2R1 und PC-3-Ctrl im Vergleich zu LNCaP-Ctrl- und PC-3-KD-Zellen. Demgegenüber war eine Verminderung von Apoptose und Koloniewachstum in LNCaP-PLA2R1 und PC-3-Ctrl-Zellen nachweisbar. Durch Genexpressionsanalysen konnte eine Induktion der Expression von *Fibronektin 1 (FN1)*, *TWIST Homolog 1 (TWIST1)* und *Cyclin-abhängige Kinase 6 (CDK6)* in LNCaP-PLA2R1-Zellen identifiziert werden. *In vivo* schien die PLA2R1-abhängige negative Regulation des Koloniewachstums die pro-onkogenen Eigenschaften des Rezeptors zu überwiegen. Dies resultierte in einem verminderten Tumorwachstum von LNCaP-PLA2R1 und einer tumorsuppressiven Rolle des Rezeptors in dieser PCa-Zelllinie. Im Gegensatz dazu zeigten PC-3-Ctrl-Zellen ein schnelleres Tumorwachstum im Xenograft-Mausmodell, was für einen pro-onkogenen Effekt der endogenen PLA2R1-Expression in PC-3-Zellen sprechen würde. Der differenzielle Einfluss von PLA2R1 auf die Regulierung des Tumorzellwachstums könnte im Zusammenhang mit der veränderten Expression von *FN1*, *TWIST1* und *CDK6* stehen, jedoch sind weiterführende Experimente nötig, um die Beteiligung dieser Gene in der PLA2R1-Signaltransduktion zu untersuchen.

Die Analyse der Zellwachstumskurve der transfizierten Jurkat-Zellen zeigte eine Abnahme der Proliferationsrate und eine Zunahme des Anteils an toten Zellen bei Jurkat-PLA2R1 im Vergleich zu Jurkat-Ctrl-Zellen. Durchflusszytometrische Analysen bestätigten eine Abnahme des Anteils gesunder sowie eine vermehrte Repräsentation von apoptotischen und nekrotischen Jurkat-PLA2R1-Zellen im Vergleich zur Kontrolle, was einen tumorsuppressiven Einfluss des Rezeptors bei der pädiatrischen ALL suggeriert. Die Funktion von PLA2R1 als Tumorsuppressor steht im Einklang mit der festgestellten Hypermethylierung des Rezeptor-Promotors in KM-Aspiraten und PB-Proben von pädiatrischen Patienten mit prä-B und common ALL zum Zeitpunkt der Diagnose der primären Krebserkrankung und des ALL-Rezidives im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Der parallele Abfall der *PLA2R1*-Promotormethylierung und der relativen Blastenzahl im Verlauf der ALL-Induktionstherapie sowie eine signifikante, positive Korrelation beider Größen in KM- und PB-Proben ließen auf die leukämischen Blasten als Quelle der Hypermethylierung des *PLA2R1*-Promotors schließen.

Überdies wiesen Hochrisikopatienten der pädiatrischen ALL eine signifikant höhere *PLA2R1*-Promotormethylierung am Tag 15 der ALL-Induktionstherapie auf im Vergleich zu Patienten mit einem geringeren Risiko. Zusammenfassend deuteten die *in vitro* und *in vivo* Daten auf eine wichtige Funktion des Rezeptors bei der Regulation von Proliferation und Apoptose bei der pädiatrischen ALL hin. Die Analyse der *PLA2R1*-Promotormethylierung könnte als sensitiver Biomarker zu einer verbesserten ALL-Therapiekontrolle, MRD-Überwachung und Risikostratifizierung während der ALL-Induktionstherapie beitragen.

2 Abstract

Background:

The phospholipase A2 receptor 1 (PLA2R1) is a type I transmembrane receptor and a member of the mannose receptor family. Physiological and pathophysiological functions of PLA2R1 are still not completely understood. However, PLA2R1 expression is discussed to have an impact on proliferation, apoptosis/ senescence, adhesion, migration/ invasion as well as inflammatory cell responses and divergent PLA2R1 expression is detectable in different types of cancer compared to corresponding normal tissues. In this context, receptor expression is linked to both a pro-oncogenic/ pro-migratory and a tumour-suppressive/ pro-apoptotic impact in different cancer cells. Moreover, PLA2R1 expression is controlled by epigenetic mechanisms and hypermethylation of the PLA2R1 promoter is associated with silenced expression of the receptor in the prostate carcinoma (PCa) cell line LNCaP and the paediatric, acute lymphocytic leukaemia (ALL) cell line Jurkat. Previous work revealed a defined hypermethylated region of the *PLA2R1* promoter in adult patients with acute leukaemia and myelodysplastic syndrome (MDS). *PLA2R1* promoter methylation correlated with disease stage and International Prognostic Scoring System (IPSS) classification.

Aim:

The aim of the present study was to evaluate the function of PLA2R1 in PCa cell lines LNCaP and PC-3. The receptor expression is silenced in LNCaP but upregulated in PC-3 cells compared to normal prostate epithelial cells. A pilot *in vivo* study addressed the effects of PLA2R1 in mice xenografted with transfected LNCaP and PC-3 cells.

Based on previous findings of *PLA2R1* promoter hypermethylation in adult ALL and MDS patients, the aim of the present study was to analyse the methylation status of the *PLA2R1* promoter in paediatric ALL patients compared to healthy individuals. *PLA2R1* methylation analysis was evaluated as sensitive biomarker for ALL treatment response, minimal residual disease (MRD) monitoring, and risk stratification. The impact of the receptor in childhood ALL was investigated by transfection-based re-expression of PLA2R1 in the paediatric ALL cell line Jurkat and the effect of different PLA2R1 expression levels on proliferation and apoptosis/ necrosis was analysed in *in vitro* experiments.

Material and Methods:

Stable PLA2R1 overexpression was achieved by transfection of LNCaP (LNCaP-PLA2R1) and Jurkat cells (Jurkat-PLA2R1) with a PLA2R1 plasmid vector. Results were compared to control vector transfected LNCaP (LNCaP-Ctrl) and Jurkat cells (Jurkat-Ctrl). Alternatively, PLA2R1

was knocked down using CRISPR/Cas9 in PC-3 cells (PC-3-KD) and compared to the corresponding control-transfected cells (PC-3-Ctrl). Gene expression analysis was conducted by quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR). PLA2R1 protein synthesis was analysed by western blot. The impact of the differential PLA2R1 expression on proliferative and metastatic parameters of transfected cancer cells was investigated *in vitro*. Cell viability/proliferation was assessed by means of WST-1 Assay for adherent cells and via cell growth curve analysis after trypan blue staining for suspension cells. Cell motility and proliferation of transfected PCa cell lines were estimated by wound healing assay. Hydrogen peroxide-stimulated apoptosis was analysed by *Caspase-Glo*[®] 3/7 Assay and *RealTime-Glo*[™] Annexin V Apoptosis and Necrosis Assay for transfected PCa cell lines and flow cytometric analysis after Annexin-V-FLUOS/ Hoechst 33258 staining for transfected Jurkat cells. Colony formation of transfected PCa cell lines was evaluated by clonogenic assay. A pilot *in vivo* study addressed the effects of PLA2R1 in mice xenografted with transfected LNCaP (n = 5) and PC-3 cells (n = 9).

Evaluating *PLA2R1* promoter methylation as sensitive biomarker for paediatric ALL, genomic DNA was isolated from bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) of 44 paediatric ALL patients. After bisulfite treatment of isolated DNA samples, *PLA2R1* methylation was analysed using digital PCR and compared to 20 healthy controls.

Results and Conclusions:

PLA2R1 gene expression and protein synthesis were detectable in LNCaP-PLA2R1, PC-3-Ctrl, and Jurkat-PLA2R1 cells but not in LNCaP-Ctrl and Jurkat-Ctrl cells. In PC-3-KD cells, PLA2R1 gene expression was significantly reduced compared to PC-3-Ctrl and PLA2R1 protein synthesis of PC-3-KD cells was below the limit of detection of western blot analysis. Cell viability/proliferation and motility were significantly increased in LNCaP-PLA2R1 and PC-3-Ctrl compared to LNCaP-Ctrl and PC-3-KD cells, respectively. However, levels of apoptosis and clonogenicity were reduced in LNCaP-PLA2R1 and PC-3-Ctrl cells. Gene expression analysis revealed an up-regulation of *fibronectin 1 (FN1)*, *TWIST homolog 1 (TWIST1)*, and *cyclin-dependent kinase 6 (CDK6)* in LNCaP-PLA2R1 compared to control cells. In LNCaP xenografts, PLA2R1-dependent regulation of clonogenicity appeared to outweigh the receptor's pro-oncogenic properties, resulting in decreased tumour growth, supporting the tumour-suppressive role of PLA2R1. Alternatively, PC-3-Ctrl xenografts exhibited faster tumour growth compared to PC-3-KD cells, suggesting a pro-oncogenic effect of endogenous PLA2R1 expression. The differential growth-regulatory effects of PLA2R1 may be mediated by *FN1*, *TWIST1*, and *CDK6* expression, although further investigation is required.

Cell growth curve analyses of transfected Jurkat cells revealed a decreased proliferation and increased cell death of Jurkat-PLA2R1 compared to Jurkat-Ctrl cells. Flow cytometry

confirmed the reduced fraction of healthy cells and an increase of the apoptotic and necrotic fractions in Jurkat-*PLA2R1* cells compared to control cells, suggesting a tumour-suppressive effect of the receptor in paediatric ALL. *PLA2R1*'s tumour-suppressive function is in accordance with hypermethylation of the receptor promoter in BM aspirates and PB samples of paediatric patients diagnosed with pre-B and common ALL as well as in patients with disease relapse in comparison to healthy controls. *PLA2R1* methylation decreased along with leukaemic blast cell reduction during ALL induction treatment and significant positive correlations between *PLA2R1* methylation and leukaemic blast cell numbers of BM and PB samples were observable. Therefore, our data suggests that leukaemic blasts are the origin of *PLA2R1* hypermethylation in BM and PB samples.

Moreover, high risk paediatric ALL patients exhibited increased levels of *PLA2R1* promoter methylation compared to non-high risk groups on day 15 of ALL induction treatment. Collected data indicates that *PLA2R1* promoter methylation quantitation can be used as biomarker for ALL induction treatment control, risk stratification, and early detection of ALL relapse.

3 Einführung in die Thematik

Der Phospholipase A2 Rezeptor 1 (PLA2R1) ist ein Typ 1 Transmembranrezeptor mit einer Molekülmasse von 180 – 200 kDa. Er gilt als Vertreter der Mannose-Rezeptor-Familie, welche der C-Typ Lektin Superfamilie zugeordnet werden kann. Die Mannose-Rezeptor-Familie besteht aus vier Typ 1 Transmembranrezeptor-Glykoproteinen, welche gemeinsame strukturelle und funktionelle Merkmale teilen und Relevanz für die Entwicklung der angeborenen Immunität und der endosomalen Sortierung aufweisen (East, 2002; Allavena *et al.*, 2004; Staines *et al.*, 2014).

Der strukturelle Aufbau von PLA2R1 wird hauptsächlich durch einen großen extrazellulären Bereich, bestehend aus einer Abfolge an Kohlenhydrat-Erkennungsdomänen (CTLD), einer Fibronectin-ähnlichen Typ II (FNII)-Domäne und einer N-terminalen Cystein-reichen Region geprägt (Ancian *et al.*, 1995; Lambeau, 1999; Rouault *et al.*, 2007). Durch Mutationsstudien konnten die Domänen CTLD4–6 als verantwortlich für die Bindung von Phospholipasen A₂ (sPLA₂) identifiziert werden (Nicolas *et al.*, 1995). Diese Enzyme katalysieren die Hydrolyse der *sn*-2-Esterbindung von Glycerophospholipiden und beeinflussen die Freisetzung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren sowie die Bildung von pro-inflammatorischen Lipidmediatoren (Pruzanski und Vadas, 1989; Dennis *et al.*, 2011). Die humanen sPLA₂ werden nach Struktur- und Sequenz-Merkmalen in neun Gruppen unterteilt und stehen in Verbindung mit inflammatorischen Prozessen und Kanzerogenese (Hanasaki und Arita, 2003; Sukocheva *et al.*, 2019).

Im Gegensatz zu dem extrazellulären Bereich des Rezeptors ist der C-terminale intrazelluläre Bereich vergleichsweise kurz und beinhaltet Sequenzmotive für Casein-Kinase II Phosphorylierung und Endozytose-Vorgänge (NSYY-Motiv) (Ancian *et al.*, 1995; Zvaritch *et al.*, 1996; Lambeau, 1999; Rouault *et al.*, 2007). Letzteres legt eine Internalisierung und lysosomale Degradation des Rezeptors nach sPLA₂-Bindung sowie eine dadurch resultierende anti-inflammatorische Wirkung des Rezeptors, begründet durch Unterbrechung der pro-inflammatorischen sPLA₂-Signaltransduktion, nahe (Hanasaki und Arita, 1999; Tamaru *et al.*, 2013). In Abbildung 1 ist die Degradation des Rezeptors grafisch dargestellt.

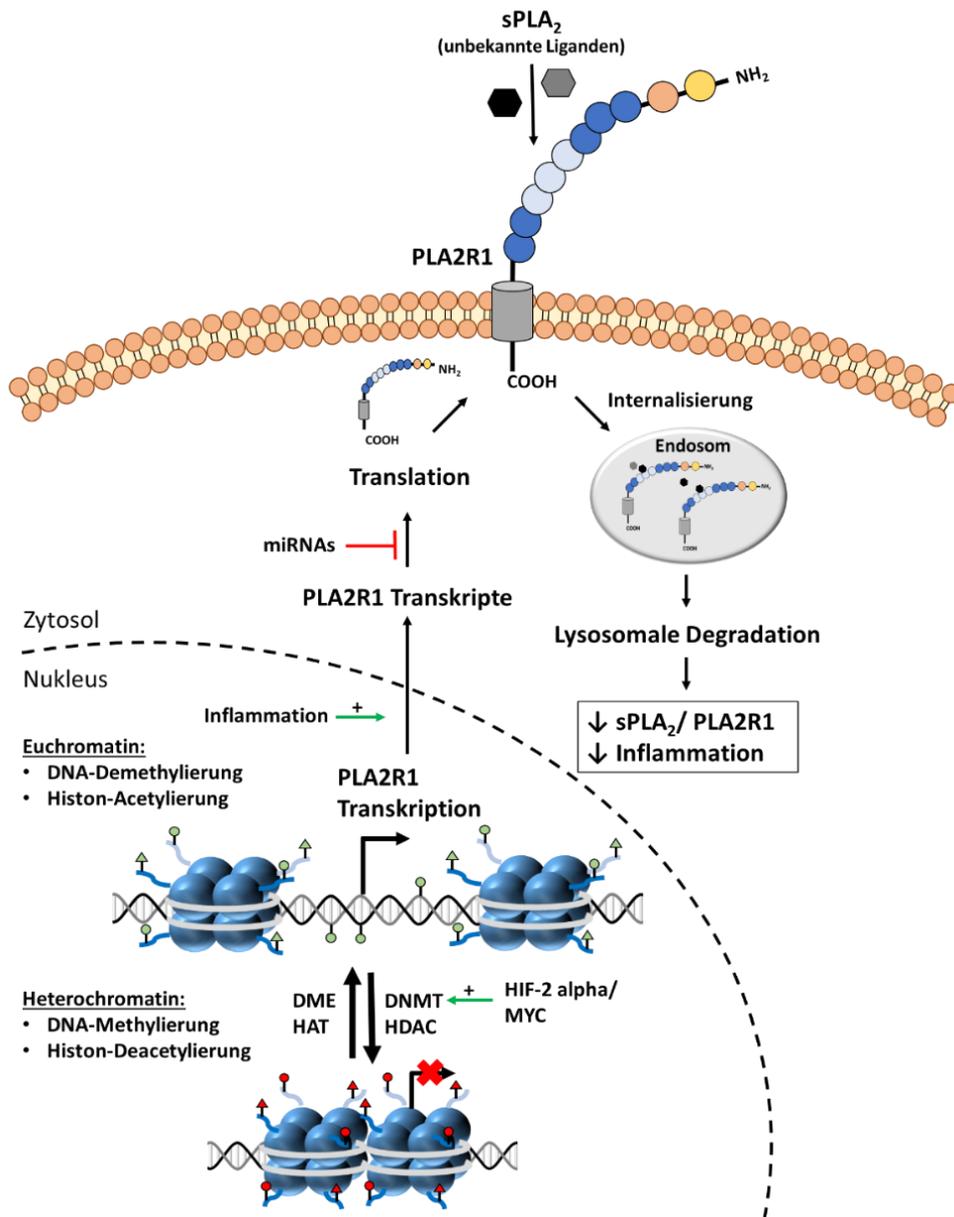


Abbildung 1. Regulation der Synthese und lysosomalen Degradation von PLA2R1. Eine epigenetische Regulation der PLA2R1-Expression ist in einer Reihe unterschiedlicher Krebszellen beschrieben. Durch Promotor-Hypermethylierung unter möglicher Beteiligung des HIF-2 alpha/MYC-Signalweges sowie durch Histon-Modifikationen kann es zur Repression der Rezeptor-Expression während der Kanzerogenese von beispielsweise Mamma-, Prostata- und Nierenzellkarzinomen kommen. Eine epigenetische Regulation wird durch das Gleichgewicht von DNA-Demethylase (DME)- und Histon-Acetylase (HAT)-Aktivität einerseits sowie DNA-Methyltransferase (DNMT)- und Histon-Deacetylase (HDAC)-Aktivität andererseits realisiert. Zudem wird eine miRNA-abhängige, translationale Repression von PLA2R1 diskutiert. Demgegenüber ist eine Induktion der PLA2R1-Expression als Folge proinflammatorischer Stimuli beschrieben. Eine Internalisierung und lysosomale Degradation des Rezeptors ist sowohl mit als auch ohne Ligandenbindung möglich. Eine Bindung von sPLA₂s durch den Rezeptor über die Domänen CTLD4–6 (hellblaue Kreise), die Endozytose des

Liganden-Rezeptor-Komplexes und eine lysosomale Degradation stehen im Zusammenhang mit einer Abnahme der extrazellulären sPLA₂-Konzentration und einer verminderten Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren.

Im Gegensatz zu dieser negativen Regulation von sPLA₂ durch den Rezeptor gibt es auch Hinweise auf eine vermehrte Freisetzung von pro-inflammatorischen Lipidmediatoren sowie einer Aktivierung von assoziierten Signalwegen durch die Interaktion von sPLA₂ mit PLA2R1 (Hanasaki und Arita, 1999). Zudem kann die Wechselwirkung zwischen sPLA₂ und PLA2R1 unabhängig von der Phospholipase-Enzymaktivität des Liganden die Signalweiterleitung beeinflussen (Kundu und Mukherjee, 1997; Granata *et al.*, 2005; Granata *et al.*, 2009; Mishina *et al.*, 2014). So konnte in humanen Makrophagen der Lunge durch die Rezeptor-Bindung von sPLA₂ der Gruppe IB und X die Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren unabhängig von der sPLA₂-Enzymaktivität über die Aktivierung der ERK1/ERK2-Signalkaskade induziert werden (Granata *et al.*, 2005; Granata *et al.*, 2009). Des Weiteren konnte eine Induktion der Apoptose von Podozyten durch Rezeptor-Bindung von sPLA₂-IB bei der membranösen Nephropathie nachgewiesen werden (Pan *et al.*, 2014). Jedoch weisen humane sPLA₂ nur eine geringe Affinität zu dem humanen Rezeptor auf (Cupillard *et al.*, 1999) und es besteht die Möglichkeit einer Liganden-unabhängigen Internalisierung des Rezeptors (Lambeau *et al.*, 1994; Ancian *et al.*, 1995; Zvaritch *et al.*, 1996), was die Bedeutung von alternativen Signalwegen des Rezeptors im Menschen bekräftigt. So sind neben sPLA₂ auch Kollagen I und IV sowie β 1-Integrin mögliche Liganden des Rezeptors (Nicolas *et al.*, 1995; Mishina *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2015). Eine Übersicht der PLA2R1-Signaltransduktion ist in Abbildung 2 dargestellt.

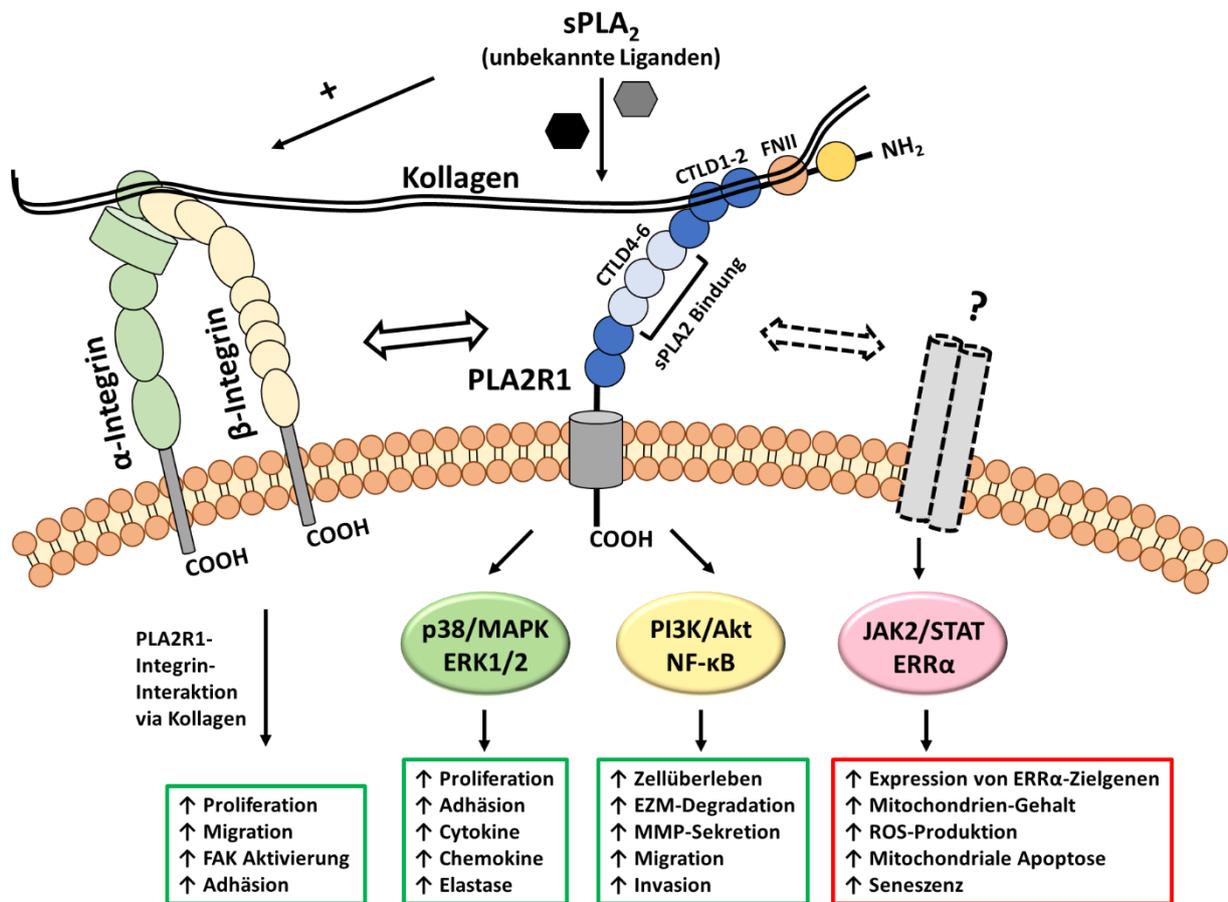


Abbildung 2. Mögliche Signalwege der PLA2R1-Signaltransduktion. Für die PLA2R1-Signaltransduktion sind sowohl zellwachstumsfördernde (grüner Rahmen) als auch proapoptische Signalwege (roter Rahmen) beschrieben. Als mögliche Grundlage für eine onkogene Wirkung des Rezeptors wird eine Signalweiterleitung über p38/MAPK und ERK1/2 sowie PI3K/Akt/NF-κB diskutiert. Dabei kann PLA2R1 neben sPLA₂s (und möglicherweise weiteren unbekanntem Liganden) auch mit Integrinen über die Bindung von Kollagen mittels der Domänen CTLD1-2 und FNII interagieren. Eine tumorsuppressive Wirkung von PLA2R1 ist durch Interaktion mit einem noch unbekanntem Rezeptor und einer Signalweiterleitung über JAK2/STAT/ERRα beschrieben, resultierend in einer Induktion der mitochondrialen Apoptose. Hypothetische Interaktionen sind durch gestrichelte Linien gekennzeichnet.

In Folge der komplexen Signaltransduktion sind auch die Auswirkungen einer physiologischen bzw. pathologischen Regulation der PLA2R1-Expression vielseitig und schließen unter anderem die Einflussnahme auf Proliferation (Mishina *et al.*, 2014), Apoptose/ Seneszenz (Augert *et al.*, 2009; Augert *et al.*, 2013; Bernard und Vindrieux, 2014), Adhäsion (Silliman *et al.*, 2002), Migration/ Invasion (Kundu und Mukherjee, 1997; Hanasaki und Arita, 1999; Mishina *et al.*, 2014) und Inflammation (Yokota *et al.*, 2000; Nolin *et al.*, 2016) ein. Zudem

können Krankheitsbilder wie Asthma (Nolin *et al.*, 2016), chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) (Sukocheva *et al.*, 2019) und chronisches Nierenversagen (Larsen und Walker, 2013; Pan *et al.*, 2014) Auswirkung einer Rezeptor-Fehlregulation sein. Darüber hinaus ist eine Änderung der PLA2R1-Expression bei der Entstehung verschiedenster Krebserkrankungen nachweisbar, wobei es sowohl Hinweise auf eine pro-onkogene als auch auf eine tumorsuppressive Wirkung des Rezeptors gibt. Einerseits steht die Wechselwirkung zwischen PLA2R1 und sPLA₂ unabhängig von der Phospholipase-Enzymaktivität in Verbindung mit einem anti-apoptotischen und pro-migratorischen Einfluss in normalen und malignen Zellen. Begründet ist dieser Effekt durch Aktivierung einer p38 MAPK-, cytosolische Phospholipase A2 (cPLA2)- sowie PI3K/Akt-Signaltransduktion (Fonteh *et al.*, 2001; Silliman *et al.*, 2002; Gorovetz *et al.*, 2008). Des Weiteren ist ein positiver Effekt des Rezeptors auf Proliferation und Migration beschrieben, realisiert durch die indirekte Interaktion von PLA2R1 mit Integrin β 1 über die Bindung von Kollagen I mithilfe der Domänen FNII und CTLD1-2 im Beisein von sPLA₂-IB (Mishina *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2015). Im Einklang mit dieser pro-onkogenen Wirkung des Rezeptors steht die Hochregulation der PLA2R1-Expression in Pankreas- und Magenkarzinomen (Bernard und Vindrieux, 2014) sowie in leukämischen Blastenzellen von Patienten mit akuter Leukämie (Amin *et al.*, 2011) und in der humanen Prostatakarzinom (PCa)-Zelllinie PC-3 (Quach *et al.*, 2014; Sukocheva *et al.*, 2019).

Andererseits ist eine Beteiligung des Rezeptors an der positiven Regulation von Seneszenz in humanen Fibroblastenzellen bzw. einer Apoptose-Induktion in malignen Zellen im Zusammenhang mit einer Aktivierung von JAK2/STAT- und Östrogen-verwandten Rezeptor α (ERR α)-Signalwegen beschrieben (Augert *et al.*, 2009; Augert *et al.*, 2013; Bernard und Vindrieux, 2014). Hierbei führt die PLA2R1/JAK2-Signaltransduktion zu einer Zunahme der ERR α -Expression, resultierend in einer vermehrten Expression von ERR α -Zielgenen und einer Induktion der mitochondrialen Apoptose durch Zunahme der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) während der Elektronenübertragung der Atmungskette innerhalb der Mitochondrienmembranen. Dabei konnten die Domänen FNII und CTLD1 als entscheidende strukturelle Elemente des Rezeptors für die Apoptose-Regulation identifiziert und eine Beteiligung der sPLA₂-Bindungsdomänen CTLD4-6 an diesem Prozess ausgeschlossen werden (Nicolas *et al.*, 1995; Augert *et al.*, 2013). In Übereinkunft mit dieser tumorsuppressiven Rolle von PLA2R1 steht die verminderte Expression des Rezeptors in verschiedenen Krebszellen, wie Brustkrebs-, Nierenkrebs- und Melanomzellen (Bernard und Vindrieux, 2014; Vindrieux *et al.*, 2014). Darüber hinaus sind epigenetische Mechanismen an der Repression der PLA2R1-Expression während der Kanzerogenese beteiligt. Eine Übersicht der epigenetischen Regulation von PLA2R1 ist in Abbildung 1 dargestellt. So findet in Nierenzellkarzinomen eine Unterdrückung der Rezeptor-Expression durch DNA-Hypermethylierung unter Beteiligung des c-MYC/ HIF-2 α -Signalweges statt (Vindrieux *et al.*,

2014). In den Mammakarzinom-Zelllinien MDA-MB-453, BT-474 und MCF-7 liegt eine Repression der PLA2R1-Expression durch synergistisches Zusammenwirken von DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung vor (Menschikowski *et al.*, 2015). Zudem sind microRNAs, wie miR-141, miR-181b und miR-181d-1 an der negativen Regulation der Rezeptor-Expression in Mammakarzinom-Zelllinien beteiligt (Menschikowski *et al.*, 2015).

Epigenetische Mechanismen, wie Änderungen von DNA-Methylierungsmustern, sind in der Regulation von zahlreichen physiologischen und pathologischen Prozessen involviert. So ist die Expression des Rezeptors durch Promotor-Hypermethylierung in den Leukämie-Zelllinien Jurkat und U937 (Menschikowski *et al.*, 2012) sowie der PCa-Zelllinie LNCaP (Sukocheva *et al.*, 2019) unterdrückt. Durch Bisulfit-Sequenzierung und Methylierungs-sensitive, hochauflösende Schmelzkurven-Analyse (MS-HRM) konnte bei adulten Patienten mit akuter Leukämie und Myelodysplastischem Syndrom (MDS) eine erhöhte Methylierung bei 77 5'-CpG-Stellen des *PLA2R1*-Promotors im Bereich von -473 bp bis +586 bp des Exons 1 festgestellt werden. Innerhalb der MDS-Kohorte korrelierte die *PLA2R1*-Promotormethylierung mit dem Krankheitsstadium und der Klassifizierung nach dem *International Prognostic Scoring System* (IPSS), was eine Verwendung der *PLA2R1*-Methylierungsanalyse zur Risikostratifizierung suggeriert (Menschikowski *et al.*, 2012). Diese aberranten Veränderungen der DNA-Methylierung sind bereits zu einem frühen Zeitpunkt während der Kanzerogenese nachweisbar, was den Nachweis von DNA-Methylierungsänderungen zu einem vielversprechenden Biomarker für den frühen und empfindlichen Nachweis sowie für die Verlaufskontrolle von malignen Erkrankungen prädisponiert (Laird, 2003; Levenson, 2007; Esteller, 2008). Dabei ist die sensitive und spezifische Detektion von malignen Veränderungen in einem frühen Stadium der Kanzerogenese essentiell für die optimale Auswahl der bestmöglichen Behandlungsoptionen und könnte auf diese Weise zu einer verbesserten Krankheitsprognose beitragen.

Um eine Änderung der DNA-Methylierung auf DNA-Sequenzebene nachweisen zu können, wird die Bisulfit-Umwandlung als „Goldstandard“ der DNA-Methylierungsanalyse verwendet. Diese besteht aus einem dreistufigen Prozess, wobei zunächst eine Sulfonierung durch Behandlung der DNA mit Bisulfit und eine anschließende Desaminierung des Cytosin-Sulfonats zu Uracil-Sulfonat stattfindet. Durch eine Desulfonierung entsteht im letzten Schritt Uracil, welches während einer nachfolgenden Polymerase-Kettenreaktion (PCR) funktionell gleichbedeutend mit Thymin ist. Die Umwandlung von Cytosin zu Uracil während der Bisulfit-Konvertierung ist jedoch nur für unmethyliertes Cytosin, nicht aber für 5'-Methylcytosin möglich, was einen DNA-Sequenzunterschied in Abhängigkeit des Methylierungsmusters erzeugt (Frommer *et al.*, 1992). Nachfolgend kann dieser Sequenzunterschied durch Sequenzierung, Massenspektrometrie oder PCR-basierten Methoden analysiert werden,

wobei die analytische Sensitivität der beschriebenen Methoden variiert. Die DNA-Sequenzierung nach Sanger weist eine analytische Sensitivität von 10-20% auf, während Massenspektrometrie und Pyrosequenzierung bei einer Sensitivität von 5% liegen (Kristensen und Hansen, 2009; Mikeska *et al.*, 2010). PCR-basierte Messverfahren, wie die Methylierungsspezifische PCR (MSP), MethyLight, MS-HRM und Methyl-BEAMing erreichen eine Steigerung der Sensitivität im Bereich von 0.1% and 1.0% (Herman *et al.*, 1996; Shen und Waterland, 2007; Kristensen *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2009; Hernández *et al.*, 2013). Jedoch besteht bei diesen Methoden die Möglichkeit eines artifiziell erhöhten Anteils methylierter Sequenzen durch fehlerhafte Primerbindung und einer unvollständigen Bisulfit-Konvertierung (Rand *et al.*, 2002; Shaw *et al.*, 2006; Kristensen *et al.*, 2008; Kristensen *et al.*, 2009; Kristensen *et al.*, 2012; Hernández *et al.*, 2013). Darüber hinaus wurden unterschiedliche PCR-Amplifikationseffizienzen von unmethylierten und methylierten DNA-Sequenzen bei den genannten PCR-basierten Methoden stark zugunsten unmethylierter Sequenzen beschrieben, die zu einer PCR-Bias führen (Warnecke *et al.*, 1997; Warnecke *et al.*, 2002; Shen *et al.*, 2007). Infolgedessen kann beispielsweise die Analyse einer Promotor-Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen durch einen dominierenden Hintergrund von unmethylierter Wildtyp-DNA sowie einer geringeren Amplifikationseffizienz der methylierten, pathologischen DNA den Tumornachweis erschweren. Um dieses Ungleichgewicht der Amplifikationseffizienz auszugleichen, wurde das Einschließen von maximal zwei 5'-CpG-Stellen mit möglichst großer Entfernung zum 3'-Ende der PCR-Primer und eine Optimierung der Primer-Annealingtemperatur beschrieben (Wojdacz und Hansen, 2006; Wojdacz und Dobrovic, 2007; Wojdacz *et al.*, 2008; Kristensen und Hansen, 2009; Wojdacz *et al.*, 2009). Diese Anforderungen an die DNA-Sequenz und an die physikalischen Merkmale des PCR-Systems schränken die Auswahl an geeigneten genomischen Regionen ein. Demgegenüber kann durch Verwendung der digitalen PCR (dPCR) als Detektionsverfahren ein Bias-freier Nachweis von unmethylierten und methylierten DNA-Sequenzen gewährleistet werden (Sykes *et al.*, 1992).

Bei der dPCR wird der Gesamt-Reaktionsraum der PCR in eine große Anzahl an getrennten Reaktionsräumen mit sehr geringem Volumen aufgeteilt. Dabei richtet sich die Aufteilung der DNA-Moleküle auf die Einzel-Kompartimente nach der Poisson-Verteilung, wobei in einem Reaktionsraum entweder eine (bzw. eine geringe Anzahl) DNA-Sequenz vorliegt oder nicht (Sykes *et al.*, 1992). Da unmethylierte und methylierte DNA-Sequenzen räumlich getrennt voneinander amplifiziert werden und das Signal-Hintergrund-Verhältnis durch die Kompartimentierung deutlich verbessert wird, können sich diese beiden Reaktionen nicht oder nur gering beeinflussen und eine PCR-Bias wird unterbunden. Nach vollzogener Taqman-PCR kann mittels Fluoreszenz-Messung ein digitales Ergebnis (positiv oder negativ) für jeden einzelnen Reaktionsraum erlangt werden. Dabei ist der Anteil positiver Reaktionsräume

proportional zu der untersuchten DNA-Menge, was eine absolute DNA-Quantifizierung ohne Erstellung einer Standardkurve ermöglicht (Sykes *et al.*, 1992; Vogelstein und Kinzler, 1999).

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war zweigeteilt und umfasste einerseits die Untersuchung der Bedeutung von PLA2R1 für die Kanzerogenese des Prostatakarzinoms anhand der PCa-Zelllinien LNCaP und PC-3. Diese Zelllinien weisen deutliche Unterschiede in ihrem Proteinexpressionsprofil auf (Dozmorov *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2013). Während in LNCaP-Zellen die Rezeptor-Expression durch Promotor-Hypermethylierung unterdrückt ist, kann in PC-3-Zellen eine Hochregulation von PLA2R1 im Vergleich zu der normalen Prostata-Epithelzelllinie PrEC nachgewiesen werden (Sukocheva *et al.*, 2019). Die divergente PLA2R1-Expression von PCa-Zelllinien und normalen Prostataepithelzellen konnte in eigenen Experimenten mittels quantitativer PCR nach reverser Transkription (RT-qPCR) bestätigt werden. Um die Funktion der PLA2R1-Expression in PCa-Zelllinien zu untersuchen, wurde durch Transfektion von LNCaP-Zellen mit einem PLA2R1-Expressionsvektor (LNCaP-PLA2R1) eine stabile Überexpression des Rezeptors erreicht und die Ergebnisse mit Kontrollvektor-transfizierten LNCaP-Zellen (LNCaP-Ctrl) verglichen. Im Gegensatz zu Wildtyp-LNCaP und LNCaP-Ctrl-Zellen ließ sich eine Re-expression des Rezeptors bei LNCaP-PLA2R1 auf mRNA-Ebene mittels RT-qPCR und auf Proteinebene durch Western Blot Analyse nachweisen. Darüber hinaus wurde die endogene Rezeptor-Expression von PC-3-Zellen durch CRISPR/Cas9 (PC-3-KD) reduziert. Mittels RT-qPCR konnte eine Reduktion der Rezeptor-Expression von PC-3-KD-Zellen auf 20% der PLA2R1-Expression von Kontrollvektor-transfizierten PC-3-Zellen (PC-3-Ctrl) gezeigt werden. Eine Rezeptor-Expression auf Proteinebene war ausschließlich bei PC-3-Ctrl-Zellen nachweisbar.

In vitro wurden in der vorliegenden Arbeit die Auswirkungen der veränderten PLA2R1-Expressionslevel auf die Zellviabilität/ Proliferation, Apoptose, Wundheilung, Genexpression und Koloniebildung untersucht. Die Zellviabilität/ Proliferation war signifikant erhöht in LNCaP-PLA2R1 im Vergleich zu LNCaP-Ctrl, während die Zellviabilität nach Verminderung der Rezeptor-Expression in PC-3-KD und siRNA-behandelten PC-3-Zellen signifikant geringer im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen war. Zur Untersuchung der Apoptose wurde die Caspase 3/7 Aktivität und die extrazelluläre Präsentation von Phosphatidylserin auf der Zellmembran nach Apoptose-Stimulation bestimmt. In LNCaP-PLA2R1 konnte eine verminderte Apoptose im Vergleich zu LNCaP-Ctrl festgestellt werden, während die Apoptose in PC-3-KD signifikant erhöht gegenüber PC-3-Ctrl-Zellen war. Zudem konnte bei LNCaP-PLA2R1 und PC-3-Ctrl-Zellen eine schnellere Wundheilung im Vergleich zu den dazugehörigen Kontrollzellen nachgewiesen werden. Durch Analyse des Expressionsprofils von Genen mit Relevanz hinsichtlich der Regulation von Proliferation, Zellzyklus-Kontrolle, Apoptose/ Seneszenz sowie Migration und Invasion konnte eine Hochregulation der

Genexpression von *Fibronectin 1 (FN1)*, *TWIST Homolog 1 (TWIST1)* und der *Cyclin-abhängigen Kinase 6 (CDK6)* in LNCaP-PLA2R1 im Vergleich zu LNCaP-Ctrl festgestellt werden. Diese Änderungen der Genexpression waren jedoch nicht bei transfizierten PC-3-Zellen nachweisbar.

Darüber hinaus war die Untersuchung des Einflusses von PLA2R1 auf die Fähigkeit zur Bildung von Zellkolonien und die klonogene Überlebensrate der transfizierten LNCaP- und PC-3-Zellen Teil der vorliegenden Arbeit. Das Koloniewachstum war signifikant reduziert in LNCaP-PLA2R1 gegenüber den Kontrollzellen. Im Gegensatz dazu zeigten PC-3-KD-Zellen eine signifikant höhere klonogene Überlebensrate im Vergleich zu PC-3-Ctrl-Zellen.

Die *in vitro* Daten wurden mit den *in vivo* Ergebnissen von Xenograft-Mausmodellen der transfizierten LNCaP- und PC-3-Zellen verglichen. Hierbei zeigten LNCaP-PLA2R1 Xenograft-Mausmodelle ein signifikant geringeres Tumorstadium im Vergleich zu LNCaP-Ctrl, während das Tumorstadium bei PC-3-Ctrl-Zellen signifikant erhöht gegenüber PC-3-KD-Zellen war. Eine Übersicht der *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse für die transfizierten Krebszelllinien ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1. Auswirkungen einer PLA2R1-Überexpression bzw. -Knockdown in verschiedenen Krebszelllinien. Dargestellt sind die Auswirkungen einer Verminderung der PLA2R1-Expression in PC-3-Zellen bzw. einer Überexpression des Rezeptors in LNCaP- und MDA-MB-453-Zellen auf *in vitro* und *in vivo* Zellparameter (Notation: ↑ Zunahme; ↓ Abnahme; - keine Änderung; x nicht exprimiert; # nicht analysiert). Eine Überexpression von PLA2R1 in MDA-MB-453 wird im Zusammenhang mit einem tumorsuppressiven Einfluss beschrieben (Augert et al., 2013; Griveau et al., 2016). Durch Reproduktion des tumorsuppressiven Effekts einer PLA2R1-Überexpression in MDA-MB-453 konnte das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell einer transfektionsbasierten Überexpression von PLA2R1 in LNCaP-Zellen verifiziert werden.

Untersuchte Eigenschaft	Krebszelllinie		
	PC-3	LNCaP	MB-453
PLA2R1-Überexpression (↑) / -Knockdown (↓)	↓	↑	↑
Zellviabilität/ Proliferation	↓	↑	↓
Apoptose	↑	↓	↑
Wundheilung	↓	↑	↓
Koloniewachstum	↑	↓	↓
<i>Fibronektin 1</i> Genexpression	-	↑	-
<i>TWIST1</i> Genexpression	-	↑	x
<i>CDK6</i> Genexpression	-	↑	-
Xenograft-Mausmodell	↓	↓	#

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit umfasste Untersuchungen zur Bedeutung des PLA2R1 für die pädiatrische, akute lymphoblastische Leukämie (ALL). Vorangegangene Studien konnten eine Repression der PLA2R1-Expression aufgrund von Hypermethylierung eines

definierten Bereiches des *PLA2R1*-Promotors in Leukämiezelllinien und adulten Patienten mit AML und MDS nachweisen (Menschikowski *et al.*, 2012). Basierend auf diesen Ergebnissen war die Untersuchung der Auswirkungen einer Re-expression von *PLA2R1* in der Leukämiezelllinie Jurkat als Modell für die pädiatrische ALL Ziel dieser Arbeit. Durch Transfektion der Jurkat-Zellen mit einem Expressionsvektor für den Rezeptor wurde eine Überexpression von *PLA2R1* erreicht (Jurkat-*PLA2R1*) und der Einfluss auf Proliferation und Apoptose/ Nekrose durch den Vergleich mit Kontrollvektor-transfizierten Jurkat-Zellen (Jurkat-Ctrl) untersucht. Für Jurkat-*PLA2R1* konnte mittels RT-PCR und Western Blot Analyse eine deutliche Re-expression des Rezeptors auf Gen- und Proteinexpressionsebene nachgewiesen werden, während in Jurkat-Ctrl-Zellen keine *PLA2R1*-Expression detektierbar war. Die Proliferationsrate der transfizierten Jurkat-Zellen wurde mittels Zellwachstumskurven-Analyse und einer Trypanblau-Färbung von toten Zellen bestimmt. Jurkat-*PLA2R1*-Zellen zeigten eine signifikant verminderte Proliferation bei gleichzeitig höherem Anteil Trypanblau-positiver, toter Zellen im Vergleich zu Jurkat-Ctrl-Zellen. Um den zugrunde liegenden Mechanismus des *PLA2R1*-abhängigen Zelltodes besser charakterisieren zu können, wurden die transfizierten Jurkat-Zellen mit Annexin-V-Fluorescein/Hoechst 33258 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der Anteil an gesunden Zellen war bei den Jurkat-*PLA2R1*-Zellen signifikant reduziert im Vergleich zu den Kontrollzellen. Demgegenüber waren die Zellfraktionen der frühen und späten Apoptose sowie der Nekrose bei Jurkat-*PLA2R1*-Zellen signifikant erhöht gegenüber Jurkat-Ctrl-Zellen.

Darüber hinaus war die Analyse der *PLA2R1*-Promotormethylierung bei der pädiatrischen ALL und die Evaluierung derselbigen als Biomarker für den Behandlungserfolg und der Überwachung der minimalen Resterkrankung (MRD) sowie der Risikostratifizierung Ziel der vorliegenden Arbeit. Hierfür wurde die genomische DNA des Knochenmarks (KM) und der Leukozyten des peripheren Blutes (PB) von ALL-diagnostizierten Kindern mittels dPCR analysiert und die Ergebnisse mit der *PLA2R1*-Promotormethylierung einer gesunden Kohorte, bestehend aus Kindern in vergleichbarem Alter, verglichen. Eine schematische Darstellung des untersuchten Promotorbereiches von *PLA2R1* und der Aufbau des dPCR-Systems sind in Abbildung 3 dargestellt.

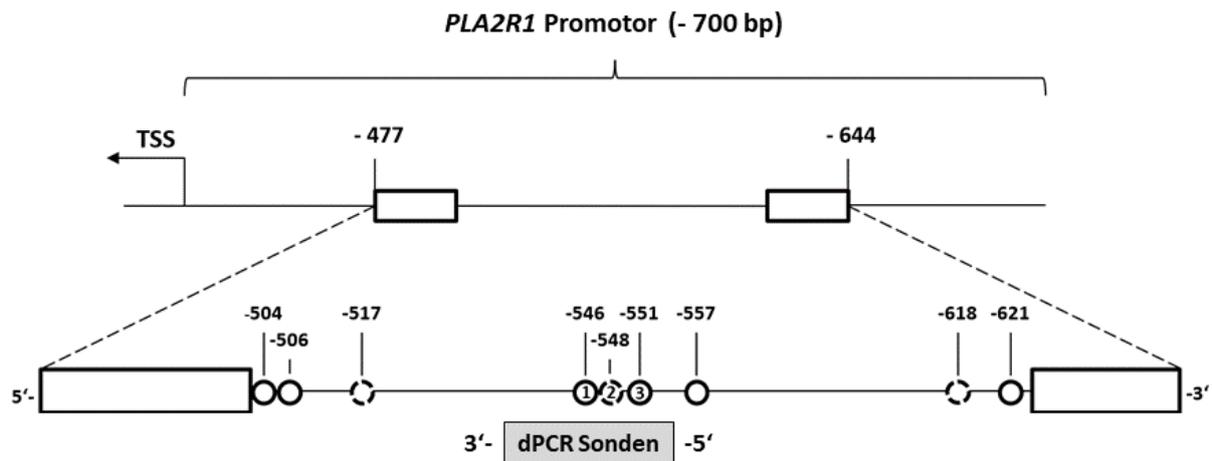


Abbildung 3: Schematische Übersicht der untersuchten *PLA2R1*-Promotorregion. Dargestellt ist der untersuchte Bereich des *PLA2R1*-Promotors mit den Positionen der eingeschlossenen 5'-CpG-Stellen (schwarze Kreise) relativ zum Transkriptionsstartpunkt (*transcription start site*, TSS). Rechtecke repräsentieren Primer- (weiß) und Sonden-Bindungsstellen (grau) innerhalb des 168 bp dPCR-Amplikons. Der Methylierungsstatus der 5'-CpG-Stellen 1-3 wurde durch dPCR-Sonden-Hybridisierung analysiert. Gestrichelte Kreise kennzeichnen 5'-CpG-Stellen, welche in dem Illumina Infinium 450k Human DNA Methylierungsarray integriert sind.

Die mittlere *PLA2R1*-Promotormethylierung der gesunden Kohorte war signifikant geringer im Vergleich zu KM- und PB-Proben von Patienten mit prä-B und common ALL zum Zeitpunkt der Diagnose. Das 97,5-Perzentil der Promotormethylierung der Kontrollgruppe war 12.05% und wurde als Grenzwert für eine pathologische *PLA2R1*-Methylierung definiert. Zudem wurde die relative Blastenzahl der prä-B- und common ALL Patienten analysiert. Zum Zeitpunkt der Diagnose zeigten alle KM-Aspirate von prä-B- und common ALL-Patienten eine relative Blastenzahl von >76%, während die relative Blastenzahl von PB-Proben im Mittel halb so hoch war im Vergleich zu den dazugehörigen KM-Proben. In KM-Aspiraten der ALL-Kohorte konnte in allen Proben sowohl ein deutlicher Anstieg der relativen Blastenzahl als auch eine signifikant erhöhte *PLA2R1*-Promotormethylierung nachgewiesen werden. Eine Ausnahme bildete ein Patient mit common ALL-Diagnose, welcher bei einer deutlich erhöhten relativen Blastenzahl von 98% eine *PLA2R1*-Promotormethylierung unterhalb des Grenzwertes der Kontrollgruppe aufwies. Während der ALL-Behandlung war eine parallele und kontinuierliche Abnahme der relativen Blastenzahl und der *PLA2R1*-Promotormethylierung in PB- und KM-Proben nachweisbar. So konnte nach 15 Tagen der ALL-Induktionstherapie eine signifikante Verminderung der *PLA2R1*-Methylierung und der relativen Blastenzahl im Vergleich zum Diagnosezeitpunkt sowie eine weitere Abnahme beider Größen nach 33 Tagen und vor Beginn

des Protokolls M der ALL-Behandlung detektiert werden. Zwischen der *PLA2R1*-Promotormethylierung und der relativen Blastenzahl von KM-Aspiraten und PB-Proben gab es eine signifikante, positive Korrelation.

Während der Dauer der durchgeführten Studie waren vier B-Zell-ALL Rezidive zu verzeichnen. Dabei waren sowohl die relative Blastenzahl als auch die *PLA2R1*-Promotormethylierung in KM- und PB-Proben zum Zeitpunkt der Rezidiv-Diagnose signifikant erhöht. Für beide Größen war eine Abnahme während der weiteren Behandlung des ALL-Rezidivs detektierbar und die *PLA2R1*-Methylierung sank unter das Niveau der Kontrollgruppe.

Die Auswahl einer bestmöglichen Strategie zur Behandlung der ALL ist essenziell für den Behandlungserfolg und hängt von der Qualität der Risikostratifizierung ab. Die Patienten der vorliegenden Studie wurden nach den AIEOP-BFM ALL 2009 Richtlinien in Abhängigkeit des vorliegenden Risikos in Subgruppen (Standard-, mittleres und Hochrisiko) unterteilt. Die *PLA2R1*-Promotormethylierung am Tag 15 der ALL-Induktionstherapie wurde als Biomarker für die Risikostratifizierung evaluiert. Dabei war die Rezeptor-Methylierung der Hochrisiko-Gruppe signifikant erhöht im Vergleich zu der Standardrisiko-Gruppe und den Patienten mit mittlerem Risiko, sodass der Grad der *PLA2R1*-Methylierung ein möglicher neuer Biomarker für die Risikostratifizierung von ALL-Erkrankungen darstellen könnte.

4 Publikation 1: “Diverse Effects of Phospholipase A2 Receptor Expression on LNCaP and PC-3 Prostate Cancer Cell Growth in vitro and in vivo”

5 Publikation 2: “Methylation of the Phospholipase A2 Receptor 1 Promoter Region in Childhood B Cell Acute Lymphoblastic Leukaemia”

6 Diskussion und Ausblick

Die Bedeutung von PLA2R1 für die Krebsentstehung wird kontrovers diskutiert, wobei sowohl eine tumorsuppressive als auch eine pro-onkogene Rolle des Rezeptors beschrieben wird (Sukocheva *et al.*, 2019). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen eine wichtige Rolle der PLA2R1-Expression für die Regulation des proliferativen und metastatischen Zellverhaltens in Prostata- und Leukämiezelllinien. Bei den Rezeptor-exprimierenden PCa-Zelllinien LNCaP-PLA2R1 und PC-3-Ctrl konnte eine Zunahme der Zellviabilität/ Proliferation bei gleichzeitiger Abnahme von Apoptose im Vergleich zu LNCaP-Ctrl bzw. PC-3-KD-Zellen nachgewiesen werden. Dieser proliferationsgesteigerte und anti-apoptotische Phänotyp der PLA2R1-exprimierenden PCa-Zelllinien konnte durch *in vitro* Wundheilungsergebnisse bestätigt werden. Mithilfe von Wundheilungsassays kann das Zusammenwirken von Proliferation und Zellmotilität untersucht werden, was zusätzlich zu dem proliferativen Effekt des Rezeptors einen positiven Einfluss der PLA2R1-Expression auf die Zellmotilität von PCa-Zelllinien nahelegt. Im Gegensatz dazu konnte in PLA2R1-exprimierenden Jurkat-Zellen eine verminderte Proliferation bei gleichzeitig erhöhter Apoptose und Nekrose im Vergleich zu Jurkat-Ctrl-Zellen detektiert werden. Dieser tumorsuppressive Einfluss der Rezeptor-Expression in Leukämiezellen steht in Übereinstimmung mit *in vitro* Untersuchungen einer transfektionsbasierten Re-expression von PLA2R1 in der Brustkrebszelllinie MDA-MB-453 und widerspricht dem pro-onkogenen Einfluss von PLA2R1 in den untersuchten PCa-Zelllinien. In MDA-MB-453-Zellen ist die Rezeptor-Expression – vergleichbar mit den Zelllinien LNCaP und Jurkat - durch Promotor-Hypermethylierung unterdrückt (Menschikowski *et al.*, 2015). Eine Re-expression von PLA2R1 in MDA-MB-453 wird im Zusammenhang mit einem tumorsuppressiven Einfluss beschrieben (Augert *et al.*, 2013; Griveau *et al.*, 2016). Das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell einer transfektionsbasierten Überexpression von PLA2R1 in LNCaP- und Jurkat-Zellen konnte durch Reproduktion des tumorsuppressiven Effekts einer PLA2R1-Überexpression in MDA-MB-453 verifiziert werden. In diesem Kontext ist eine Apoptose-Induktion durch Aktivierung von JAK2/STAT/ERR α -Signalwegen beschrieben (Augert *et al.*, 2009; Augert *et al.*, 2013; Bernard und Vindrieux, 2014). Die PLA2R1/JAK2-Signaltransduktion führt zu einer Zunahme der ERR α -Expression und zu einer schlussendlichen Induktion der mitochondrialen Apoptose durch Zunahme der Bildung von ROS innerhalb der Mitochondrienmembranen. Begleitet wird dieser Prozess durch eine Zunahme des Mitochondrien-Gehalts in PLA2R1-exprimierenden MDA-MB-453-Zellen (Griveau *et al.*, 2016). Ähnliche pro-apoptotische Signalwege könnten bei Jurkat-PLA2R1-Zellen wirksam sein, jedoch sind diesbezüglich weitere Untersuchungen nötig, um die PLA2R1-abhängige Signaltransduktion in Jurkat-Zellen aufzuklären. Im Gegensatz zu MDA-MB-453-Zellen ist der Mitochondrien-Gehalt von Wildtyp-LNCaP- und PC-3-Zellen bereits

stark erhöht im Vergleich zu normalen Prostataepithelzellen (Panov und Orynbayeva, 2013). Überdies ist der Mitochondrien-Gehalt von PLA2R1-exprimierenden Wildtyp-PC-3-Zellen geringer als bei LNCaP-Zellen, bei denen die Rezeptor-Expression durch Promotor-Hypermethylierung unterdrückt ist (Panov und Orynbayeva, 2013; Sukocheva *et al.*, 2019). Infolgedessen kann die mitochondriale Apoptose-Signaltransduktion nicht der einzige Wirkmechanismus von PLA2R1 in PCa-Zelllinien sein.

Um eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Auswirkungen einer PLA2R1-Expression zu finden, wurde das Expressionsprofil von Genen mit Relevanz für Zellzyklus-Kontrolle, Apoptose/ Seneszenz und Migration/ Invasion analysiert. Hierbei wurde eine Hochregulation der Genexpression von *FN1*, *TWIST1* und *CDK6* in LNCaP-PLA2R1 im Vergleich zu LNCaP-Ctrl festgestellt. Eine vermehrte Expression von *FN1* wäre mit dem pro-onkogenen Phänotyp von LNCaP-PLA2R1 vereinbar, da eine Überexpression von *FN1* im Zusammenhang mit einer Stimulation des Zellwachstums und einer Verminderung von Apoptose bei Chemotherapie-Behandlung von Lungenkrebs diskutiert wird (Rintoul und Sethi, 2002; Han *et al.*, 2006). Überdies könnte ein proliferativer Effekt der PLA2R1 Re-expression in LNCaP auch durch eine Hochregulation der Expression von *TWIST1* erklärt werden, da *TWIST1*-vermittelte Signalwege mit einer Verminderung von Apoptose und gesteigerter Zellmigration bei PCa-Zellen einhergehen (Kwok *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu PC-3-Zellen sind LNCaP-Zellen Androgen-sensitiv und das Zellwachstum hängt von der Expression von Androgenrezeptoren (AR) ab (Lonergan und Tindall, 2011). Die AR-Signaltransduktion involviert die Expression von Cyclin D und anderen Genen zur Zellzyklus-Kontrolle (Chen *et al.*, 1998). Die Interaktion von *CDK6* und Cyclin D1 ist wichtig für den G1-S-Übergang des Zellzykluses und wirkt sich positiv auf Zellzyklusprogression und Proliferation aus, was eine mögliche Erklärung für den proliferativen Effekt einer PLA2R1 Re-expression in LNCaP darstellen könnte (Meyerson und Harlow, 1994). Ferner kann *CDK6* in PCa-Zellen auch mit AR im Beisein von Dihydrotestosteron interagieren und die Expression von AR-Zielgenen stimulieren (Lim *et al.*, 2005). Zusammenfassend könnten die pro-onkogenen Effekte einer Re-expression von PLA2R1 in LNCaP-Zellen im Zusammenhang mit der festgestellten Hochregulation der Expression von *FN1*, *TWIST1* und *CDK6* stehen. Im Vergleich zur LNCaP-Zelllinie zeigen RNA-Sequenzierungsdaten in Wildtyp-PC-3-Zellen bereits eine starke Hochregulation von *FN1*, *TWIST1* und *CDK6* (Barretina *et al.*, 2012; Klijn *et al.*, 2015). Folglich könnte in PC-3-Zellen der Effekt einer differenziellen PLA2R1-Expression auf das Expressionsprofil dieser Gene gedämpft sein. Jedoch sind auch hier weiterführende Untersuchungen erforderlich, die auf diesen Ergebnissen aufbauen.

Der tumorsuppressive Effekt von PLA2R1 zeigte sich durch die Untersuchung des Koloniewachstums der transfizierten PCa-Zelllinien und einer Verminderung der klonogenen

Überlebensrate bei PLA2R1-exprimierenden LNCaP-PLA2R1- und PC-3-Ctrl-Zellen. Der inhibitorische Effekt einer PLA2R1-Expression auf das Koloniewachstum steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 (Vindrieux *et al.*, 2013). Mithilfe des klonogenen Assays wird die Zellfraktion analysiert, die zur unbegrenzten Zellteilung und zur Bildung einer Zellkolonie befähigt ist (Franken *et al.*, 2006). Infolgedessen müssen die Auswirkungen von PLA2R1 auf Proliferation und Koloniewachstum nicht zwangsweise übereinstimmen, da beide Assays unterschiedliche Zellfraktionen (stammzellartig und nicht-stammzellartig) untersuchen. So ließe sich der positive Einfluss einer PLA2R1-Expression auf das proliferative Zellverhalten durch Veränderungen der nicht-stammzellartigen Subpopulation erklären. Im Gegensatz dazu könnte eine Verminderung des Koloniewachstums die Auswirkungen der Rezeptor-Expression auf die stammzellartige Subpopulation der PCa-Zelllinien widerspiegeln.

Um den *in vivo* Effekt einer differenziellen PLA2R1-Expression zu untersuchen, wurden Xenograft-Mausmodelle mit den transfizierten PCa-Zelllinien erstellt. LNCaP-PLA2R1 Xenograft-Mausmodelle zeigten ein geringeres Tumorwachstum im Vergleich zu LNCaP-Ctrl-Zellen. Eine tumorsuppressive Funktion von LNCaP steht in Übereinstimmung mit *in vivo* Untersuchungen des Nierenzellkarzinoms in Xenograft-Mausmodellen (Vindrieux *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu war das Tumorwachstum bei PC-3-Ctrl signifikant erhöht gegenüber PC-3-KD-Zellen. Eine mögliche Erklärung für den unterschiedlichen *in vivo* Effekt der Rezeptor-Expression könnten Unterschiede in der Bedeutung des proliferativen und anti-apoptischen Einflusses einerseits sowie einer PLA2R1-abhängigen Hemmung des Koloniewachstums andererseits sein. So ist der Anteil der stammzellartigen CD44⁺/CD24⁻-Subpopulation mit 0.04% bei LNCaP nur sehr gering vertreten (Hurt *et al.*, 2008), während bei PC-3-Zellen diese Subpopulation einen größeren Anteil von ca. 11% einnimmt (Jaworska und Szliszka, 2017). Infolgedessen könnte in LNCaP-Zellen der negative Einfluss des Rezeptors auf das Koloniewachstum und damit auf den stark limitierten Anteil der stammzellartigen Subpopulation maßgebender für das *in vivo* Tumorwachstum im Vergleich zu dem zellwachstumsfördernden Potenzial von PLA2R1 *in vitro* sein. Demgegenüber könnte sich ein möglicher pro-onkogener Einfluss von PLA2R1 in dem gesteigerten *in vivo* Tumorwachstum von PC-3-Zellen manifestieren. In dieser Zelllinie könnte ein höherer Anteil der stammzellartigen Subpopulation diesbezügliche negative Effekte des Rezeptors kompensieren.

Ferner könnten *in vivo* Xenograft-Modelle mehr Informationen über die Bedeutung von Zell-Matrix-Interaktionen für die initiale Zelladhäsion und das nachfolgende Tumorwachstum liefern als 2D *in vitro* Assays auf Plastik-Oberflächen. So kann PLA2R1 neben sPLA₂ auch mit Kollagen I und anderen extrazellulären Matrixbestandteilen über die CLTD1-2 und FNII

Domänen interagieren. Zudem ermöglicht dies eine indirekte Wechselwirkung des Rezeptors mit Integrin β -1 (Mishina *et al.*, 2014; Takahashi *et al.*, 2015). Die Bedeutung dieser Interaktion hinsichtlich Proliferation und Zellwachstum ist jedoch abhängig von der zugehörigen Integrin- α Untereinheit (Heino, 2014). So steht Integrin α 1 β 1 im Zusammenhang mit einem positiven Einfluss auf die Proliferation, während sich die Interaktion mit Integrin α 2 β 1 negativ auf das Zellwachstum auswirken kann (Ravanti *et al.*, 1999; Rantala *et al.*, 2011; Heino, 2014). Im Gegensatz zu den LNCaP-Zellen legen RNA-Sequenzierungsdaten eine Expression der α 1 Integrin-Untereinheit in PC-3-Zellen nahe. Demgegenüber wird Integrin α -2 in beiden PCa-Zelllinien exprimiert (Barretina *et al.*, 2012; Klijn *et al.*, 2015). Infolgedessen könnte aufgrund der fehlenden Expression von Integrin α -1 in LNCaP-Zellen die Interaktion mit der α 2 Integrin-Untereinheit favorisiert werden. Dies würde eine Reduktion des *in vivo* Tumorwachstums und eine tumorsuppressive Rolle von PLA2R1 in LNCaP-Zellen zur Folge haben. Im Gegensatz dazu besteht in PC-3-Zellen die Möglichkeit einer funktionellen Interaktion des Rezeptors mit Integrin α 1 β 1. Eine Wechselwirkung des Rezeptors mit Integrin α 1 β 1 könnte eine Erklärung für den pro-onkogenen Effekt und ein beschleunigtes Tumorwachstum von PC-3-Zellen *in vivo* darstellen. Jedoch sind nachfolgende Experimente erforderlich, um diese Interaktion *in vivo* nachzuweisen.

Zusammenfassend konnten durch *in vitro* Experimente sowohl pro-onkogene (proliferativ, anti-apoptotisch und eine positive Regulation der Zellmotilität) als auch tumorsuppressive Einflüsse (negative Regulation des Koloniewachstums) einer PLA2R1-Expression in PCa-Zelllinien identifiziert werden. In Brustkrebs- und Leukämiezelllinien war hingegen ein einheitlich tumorsuppressiver Effekt des Rezeptors detektierbar. *In vivo* Untersuchungen mit Xenograft-Mausmodellen zeigten einen tumorsuppressiven Effekt des Rezeptors in LNCaP-Zellen, während PLA2R1-exprimierende PC-3-Zellen ein erhöhtes Tumorwachstum aufwiesen. Infolgedessen bekräftigen die Ergebnisse dieser Arbeit eine differenzielle Rolle von PLA2R1 bei der Krebsentstehung und Progression.

Aufgrund der besonderen Bedeutung der PLA2R1-Expression für Tumorentstehung und -progression sollte im Folgenden die Bestimmung der PLA2R1-Promotormethylierung als Biomarker für Therapieüberwachung und Risikostratifizierung bei der pädiatrischen ALL evaluiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass zusätzlich zu adulten Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (Menschikowski *et al.*, 2012) auch die KM-Aspirate und PB-Proben von pädiatrischen Patienten mit primärer ALL-Diagnose und ALL-Rezidiven eine Hypermethylierung des PLA2R1-Promotors aufweisen. Um die Ergebnisse dieser Arbeit zu verifizieren, wurde ein DNA-Methylierungsdatensatz von Nordlund *et al.* (GSE49031) hinsichtlich des in der vorliegenden Arbeit untersuchten PLA2R1-Promotorbereiches ausgewertet (Nordlund *et al.*, 2013). Das untersuchte PLA2R1-Amplikon enthält drei 5'-CpG-

Stellen, welche in dem *Illumina Infinium 450k Human DNA methylation Beadchip array* integriert sind (s. Abbildung 3). Unsere Analyse des Methylierungsstatus dieser 5'-CpG-Stellen bestätigte eine Zunahme der *PLA2R1*-Promotormethylierung in KM- und PB-Proben von pädiatrischen Patienten zum Zeitpunkt der primären ALL-Diagnose bzw. des ALL-Rezidives im Vergleich zu gesunden Probanden und Patienten in Remission.

Zum Zeitpunkt der ALL-Diagnose gab es einen Patienten mit deutlich erhöhter relativer Blastenzahl und einer *PLA2R1*-Promotormethylierung unterhalb des Grenzwertes der Kontrollgruppe. Folglich scheint eine Methylierung des Rezeptor-Promotors ein häufiger (95%, 19 von 20 B-Zell-ALL Patienten) aber nicht obligatorischer Faktor der pädiatrischen Leukämogenese zu sein. Dies steht in Übereinkunft mit der Arbeit von Amin *et al.*, welche die Existenz einer Untergruppe von AML- und ALL-Patienten mit *PLA2R1*-exprimierenden, leukämischen Blasten diskutiert (Amin *et al.*, 2011). Diese Subpopulation von leukämischen Blasten mit *PLA2R1*-Expression könnte ursächlich durch eine Hypomethylierung des *PLA2R1*-Promotors erklärt werden. Jedoch sind weiterführende Untersuchungen erforderlich, um die Bedeutung dieser Zellpopulation für die Leukämogenese und den Krankheitsverlauf der betreffenden ALL-Patienten einschätzen zu können.

Darüber hinaus konnte eine positive Korrelation zwischen der relativen Blastenzahl und der *PLA2R1*-Promotormethylierung in KM-Aspiraten und PB-Proben während der ALL-Induktionstherapie ermittelt werden. Infolgedessen lassen die Daten der vorliegenden Arbeit darauf schließen, dass leukämische Blasten für den Anstieg der *PLA2R1*-Promotormethylierung in KM- und PB-Proben verantwortlich sind. Diese Ergebnisse stehen in Übereinkunft mit den *in vitro* Ergebnissen dieser Arbeit und einer tumorsuppressiven Wirkung der Re-expression von *PLA2R1* in transfizierten Jurkat-Zellen. Demzufolge könnten leukämische Blastenzellen durch epigenetische Repression der Rezeptor-Expression der Apoptose/ Nekrose effizienter entgehen und folglich zur Progression der Krebserkrankung beitragen. Jedoch unterlag die *PLA2R1*-Promotormethylierung in KM-Aspiraten einer gewissen Schwankung von 31% bis 97% bei gleichbleibend hohen relativen Blastenzahlen. Dies deutet auf eine Heterogenität der als leukämische Blasten definierten Zellen im KM hin und steht in Übereinstimmung mit der Literatur (Baersch *et al.*, 1996; Hassanein *et al.*, 2009; Hoffmann *et al.*, 2012). Zudem könnten normale Vorläuferzellen, welche morphologische und immunphänotypische Gemeinsamkeiten mit neoplastischen Zellen der B-ALL aufweisen (Longacre *et al.*, 1989), in den untersuchten Aspiraten vorhanden gewesen sein. Durch ihre geringe Grundmethylierung würden diese Zellpopulationen zu einer Verminderung des Anteils methylierter *PLA2R1*-Promotorsequenzen beitragen (Qu *et al.*, 2014; Jung *et al.*, 2015). Diesbezüglich sind weitere Experimente erforderlich, um mittels immunphänotypischer

Zellsortierung den Methylierungsstatus des Rezeptors innerhalb der resultierenden Zellsubpopulationen bestimmen zu können.

Überdies war die *PLA2R1*-Promotormethylierung in der Subgruppe der Hochrisikopatienten signifikant erhöht im Vergleich zu Patienten mit geringerem Risiko. Die Risikostratifizierung nach den AIEOP-BFM ALL 2009 Richtlinien umfasst die umfangreiche Bestimmung von immunhistochemischen und molekularbiologischen Parametern zu verschiedenen Zeitpunkten bis zur 12. Woche des ALL-Behandlungsprotokolls. Infolgedessen könnte eine vergleichsweise einfache Bestimmung der *PLA2R1*-Methylierung am Tag 15 der ALL-Induktionstherapie zu einer frühen Identifizierung von Hochrisikopatienten und einer zeitnahen Anpassung des Therapieprotokolls beitragen. Die Sensitivität der *PLA2R1*-Methylierungsanalyse muss jedoch in nachfolgenden Experimenten mit etablierten, klonalen Markern (schwere Kette IgG- und T-Zell-Rezeptor-Rearrangements) verglichen und evaluiert werden. Die Bestimmung der *PLA2R1*-Promotormethylierung ist von besonderer Bedeutung für Patienten, bei denen kein verbreiteter ALL-Subtyp festgestellt werden kann und folglich kein molekularer Biomarker zur Verfügung steht. Betreffende Patienten der untersuchten Kohorte zeigten jedoch eine deutliche Erhöhung der *PLA2R1*-Promotormethylierung in KM- und PB-Proben, welche im weiteren ALL-Therapieverlauf unter den Grenzwert der Kontrollgruppe sank. Demgegenüber war bei diesen Patienten durch das Fehlen von ALL-spezifischen, molekulargenetischen Markern die „klassische“ Therapiekontrolle und MRD-Überwachung nur eingeschränkt möglich.

Ferner sind epigenetische Modifikationen während der Kanzerogenese im Gegensatz zu chromosomalen Veränderungen und Genmutationen reversibel. Demzufolge existieren Ansätze zur therapeutischen Intervention durch Aufnahme von epigenetisch aktiven Therapeutika in das Leukämie-Behandlungsprotokoll (Burke und Bhatla, 2014). Die Analyse der *PLA2R1*-Methylierung könnte Informationen über die Effektivität dieser Strategien liefern und als Indikator für die Bewertung der Erfolgchancen dieser Medikamente in der ALL-Behandlung dienen (Menschikowski *et al.*, 2012).

Zusammenfassend bekräftigen die Daten der vorliegenden Arbeit einen möglichen Einsatz der *PLA2R1*-Methylierungsanalyse als sensitiven Biomarker für die Therapiekontrolle, MRD-Überwachung und Risikostratifizierung bei der pädiatrischen ALL.

7 Literaturverzeichnis

Allavena P, Chieppa M, Monti P, Piemonti L. 2004. From pattern recognition receptor to regulator of homeostasis: the double-faced macrophage mannose receptor. *Crit Rev Immunol* 24:179–192 DOI: 10.1615/critrevimmunol.v24.i3.20.

Amin R, Fiancette R, Bordessoule D, Turlure P, Guerin E, Trimoreau F, Denizot Y. 2011. Phospholipase A2 receptors in human leukemic blasts. *Leuk Lymphoma* 52:908–909 DOI: 10.3109/10428194.2010.551160.

Ancian P, Lambeau G, Mattéi MG, Lazdunski M. 1995. The human 180-kDa receptor for secretory phospholipases A2. Molecular cloning, identification of a secreted soluble form, expression, and chromosomal localization. *J Biol Chem* 270:8963–8970 DOI: 10.1074/jbc.270.15.8963.

Augert A, Payré C, Launoit Y de, Gil J, Lambeau G, Bernard D. 2009. The M-type receptor PLA2R regulates senescence through the p53 pathway. *EMBO Rep* 10:271–277 DOI: 10.1038/embor.2008.255.

Augert A, Vindrieux D, Girard CA, Le Calvé B, Gras B, Ferrand M, Bouchet BP, Puisieux A, Launoit Y de, Simonnet H, Lambeau G, Bernard D. 2013. PLA2R1 kills cancer cells by inducing mitochondrial stress. *Free Radic Biol Med* 65:969–977 DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.177.

Baersch G, Baumann M, Meltzer J, Möllers T, Ritter J, Jürgens H, Vormoor J. 1996. Durchflusszytometrische Charakterisierung von Reifungsvorgängen und stammzellnahen Zellpopulationen bei der B-Vorläuferzell-ALL im Kindesalter. *Klin Padiatr* 208:160–167 DOI: 10.1055/s-2008-1046467.

Barretina J, Caponigro G, Stransky N, Venkatesan K, Margolin AA, Kim S, Wilson CJ, Lehár J, Kryukov GV, Sonkin D, Reddy A, Liu M, Murray L, Berger MF, Monahan JE, Morais P, Meltzer J, Korejwa A, Jané-Valbuena J, Mapa FA, Thibault J, Bric-Furlong E, Raman P, Shipway A, Engels IH, Cheng J, Yu GK, Yu J, Aspesi P, Silva M de, Jagtap K, Jones MD, Wang L, Hatton C, Palesscandolo E, Gupta S, Mahan S, Sougnez C, Onofrio RC, Liefeld T, MacConaill L, Winckler W, Reich M, Li N, Mesirov JP, Gabriel SB, Getz G, Ardlie K, Chan V, Myer VE, Weber BL, Porter J, Warmuth M, Finan P, Harris JL, Meyerson M, Golub TR, Morrissey MP, Sellers WR, Schlegel R, Garraway LA. 2012. The Cancer Cell Line Encyclopedia enables predictive modelling of anticancer drug sensitivity. *Nature* 483:603–607 DOI: 10.1038/nature11003.

Bernard D, Vindrieux D. 2014. PLA2R1: expression and function in cancer. *Biochim Biophys Acta* 1846:40–44 DOI: 10.1016/j.bbcan.2014.03.003.

Burke MJ, Bhatla T. 2014. Epigenetic modifications in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Front Pediatr* 2p. 42 DOI: 10.3389/fped.2014.00042.

Chen Y, Martinez LA, LaCava M, Coghlan L, Conti CJ. 1998. Increased cell growth and tumorigenicity in human prostate LNCaP cells by overexpression to cyclin D1. *Oncogene* 16:1913–1920 DOI: 10.1038/sj.onc.1201719.

Cupillard L, Mulherkar R, Gomez N, Kadam S, Valentin E, Lazdunski M, Lambeau G. 1999. Both group IB and group IIA secreted phospholipases A2 are natural ligands of the mouse 180-kDa M-type receptor. *J Biol Chem* 274:7043–7051 DOI: 10.1074/jbc.274.11.7043.

Dennis EA, Cao J, Hsu Y-H, Magrioti V, Kokotos G. 2011. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev* 111:6130–6185 DOI: 10.1021/cr200085w.

Dozmorov MG, Hurst RE, Culkin DJ, Kropp BP, Frank MB, Osban J, Penning TM, Lin H-K. 2009. Unique patterns of molecular profiling between human prostate cancer LNCaP and PC-3 cells. *Prostate* 69:1077–1090 DOI: 10.1002/pros.20960.

East L. 2002. The mannose receptor family. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1572:364–386 DOI: 10.1016/S0304-4165(02)00319-7.

Esteller M. 2008. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358:1148–1159 DOI: 10.1056/NEJMra072067.

Fonteh AN, Marion CR, Barham BJ, Edens MB, Atsumi G, Samet JM, High KP, Chilton FH. 2001. Enhancement of mast cell survival: a novel function of some secretory phospholipase A(2) isotypes. *J Immunol* 167:4161–4171 DOI: 10.4049/jimmunol.167.8.4161.

Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. 2006. Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat Protoc* 1:2315–2319 DOI: 10.1038/nprot.2006.339.

Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL. 1992. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:1827–1831 DOI: 10.1073/pnas.89.5.1827.

Gorovetz M, Schwob O, Krinsky M, Yedgar S, Reich R. 2008. MMP production in human fibrosarcoma cells and their invasiveness are regulated by group IB secretory phospholipase A2 receptor-mediated activation of cytosolic phospholipase A2. *Front Biosci* 13:1917–1925 DOI: 10.2741/2811.

Granata F, Nardicchi V, Loffredo S, Frattini A, Ilaria Staiano R, Agostini C, Triggiani M. 2009. Secreted phospholipases A(2): A proinflammatory connection between macrophages and mast cells in the human lung. *Immunobiology* 214:811–821 DOI: 10.1016/j.imbio.2009.06.006.

Granata F, Petraroli A, Boilard E, Bezzine S, Bollinger J, Del Vecchio L, Gelb MH, Lambeau G, Marone G, Triggiani M. 2005. Activation of cytokine production by secreted phospholipase A2 in human lung macrophages expressing the M-type receptor. *J Immunol* 174:464–474 DOI: 10.4049/jimmunol.174.1.464.

Griveau A, Devailly G, Eberst L, Navaratnam N, Le Calvé B, Ferrand M, Faull P, Augert A, Dante R, Vanacker JM, Vindrieux D, Bernard D. 2016. The PLA2R1-JAK2 pathway upregulates ERR α and its mitochondrial program to exert tumor-suppressive action. *Oncogene* 35:5033–5042 DOI: 10.1038/onc.2016.43.

Han S, Khuri FR, Roman J. 2006. Fibronectin stimulates non-small cell lung carcinoma cell growth through activation of Akt/mammalian target of rapamycin/S6 kinase and inactivation of LKB1/AMP-activated protein kinase signal pathways. *Cancer Res* 66:315–323 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-2367.

Hanasaki K, Arita H. 1999. Biological and pathological functions of phospholipase A(2) receptor. *Arch Biochem Biophys* 372:215–223 DOI: 10.1006/abbi.1999.1511.

Hanasaki K, Arita H. 2003. Biological functions of group X secretory PLA2. *Adv Exp Med Biol* 525:93–96 DOI: 10.1007/978-1-4419-9194-2_18.

Hassanein NM, Alcantia F, Perkinson KR, Buckley PJ, Lagoo AS. 2009. Distinct expression patterns of CD123 and CD34 on normal bone marrow B-cell precursors ("hematogones") and B lymphoblastic leukemia blasts. *Am J Clin Pathol* 132:573–580 DOI: 10.1309/AJCPO4DS0GTLSEI.

Heino J. 2014. Cellular signaling by collagen-binding integrins. *Adv Exp Med Biol* 819:143–155 DOI: 10.1007/978-94-017-9153-3_10.

Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. 1996. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:9821–9826 DOI: 10.1073/pnas.93.18.9821.

Hernández HG, Tse MY, Pang SC, Arboleda H, Forero DA. 2013. Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis. *BioTechniques* 55:181–197 DOI: 10.2144/000114087.

Hoffmann MH, Klausen TW, Boegsted M, Larsen SF, Schmitz A, Leino EB, Schmiegelow K, Hasle H, Bergmann OJ, Sorensen S, Nyegaard M, Dybkaer K, Johnsen HE. 2012. Clinical impact of leukemic blast heterogeneity at diagnosis in cytogenetic intermediate-risk acute myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* 82:123–131 DOI: 10.1002/cyto.b.20633.

Hurt EM, Kawasaki BT, Klarmann GJ, Thomas SB, Farrar WL. 2008. CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients with poor prognosis. *Br J Cancer* 98:756–765 DOI: 10.1038/sj.bjc.6604242.

Jaworska D, Szliszka E. 2017. Targeting Apoptotic Activity Against Prostate Cancer Stem Cells. *Int J Mol Sci* 18 DOI: 10.3390/ijms18081648.

Jung N, Dai B, Gentles AJ, Majeti R, Feinberg AP. 2015. An LSC epigenetic signature is largely mutation independent and implicates the HOXA cluster in AML pathogenesis. *Nat Commun* 6p. 8489 DOI: 10.1038/ncomms9489.

Klijn C, Durinck S, Stawiski EW, Haverty PM, Jiang Z, Liu H, Degenhardt J, Mayba O, Gnad F, Liu J, Pau G, Reeder J, Cao Y, Mukhyala K, Selvaraj SK, Yu M, Zynda GJ, Brauer MJ, Wu TD, Gentleman RC, Manning G, Yauch RL, Bourgon R, Stokoe D, Modrusan Z, Neve RM, Sauvage FJ de, Settleman J, Seshagiri S, Zhang Z. 2015. A comprehensive transcriptional portrait of human cancer cell lines. *Nat Biotechnol* 33:306–312 DOI: 10.1038/nbt.3080.

Kristensen LS, Hansen LL. 2009. PCR-based methods for detecting single-locus DNA methylation biomarkers in cancer diagnostics, prognostics, and response to treatment. *Clin Chem* 55:1471–1483 DOI: 10.1373/clinchem.2008.121962.

Kristensen LS, Mikeska T, Krypuy M, Dobrovic A. 2008. Sensitive Melting Analysis after Real Time- Methylation Specific PCR (SMART-MSP): high-throughput and probe-free quantitative DNA methylation detection. *Nucleic Acids Res* 36e42 DOI: 10.1093/nar/gkn113.

Kristensen LS, Raynor MP, Candiloro I, Dobrovic A. 2012. Methylation profiling of normal individuals reveals mosaic promoter methylation of cancer-associated genes. *Oncotarget* 3:450–461 DOI: 10.18632/oncotarget.480.

Kristensen LS, Wojdacz TK, Thestrup BB, Wiuf C, Hager H, Hansen LL. 2009. Quality assessment of DNA derived from up to 30 years old formalin fixed paraffin embedded (FFPE)

tissue for PCR-based methylation analysis using SMART-MSP and MS-HRM. *BMC Cancer* 9p. 453 DOI: 10.1186/1471-2407-9-453.

Kundu GC, Mukherjee AB. 1997. Evidence that porcine pancreatic phospholipase A2 via its high affinity receptor stimulates extracellular matrix invasion by normal and cancer cells. *J Biol Chem* 272:2346–2353.

Kwok WK, Ling M-T, Lee T-W, Lau TCM, Zhou C, Zhang X, Chua CW, Chan KW, Chan FL, Glackin C, Wong Y-C, Wang X. 2005. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res* 65:5153–5162 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-04-3785.

Laird PW. 2003. The power and the promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer* 3:253–266 DOI: 10.1038/nrc1045.

Lambeau G. 1999. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A2. *Trends in Pharmacological Sciences* 20:162–170 DOI: 10.1016/S0165-6147(99)01300-0.

Lambeau G, Ancian P, Barhanin J, Lazdunski M. 1994. Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A2. *J Biol Chem* 269:1575–1578.

Larsen CP, Walker PD. 2013. Phospholipase A2 receptor (PLA2R) staining is useful in the determination of de novo versus recurrent membranous glomerulopathy. *Transplantation* 95:1259–1262 DOI: 10.1097/TP.0b013e31828a947b.

Levenson VV. 2007. Biomarkers for early detection of breast cancer: what, when, and where? *Biochim Biophys Acta* 1770:847–856 DOI: 10.1016/j.bbagen.2007.01.017.

Li M, Chen W-D, Papadopoulos N, Goodman SN, Bjerregaard NC, Laurberg S, Levin B, Juhl H, Arber N, Moinova H, Durkee K, Schmidt K, He Y, Diehl F, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW, Markowitz SD, Vogelstein B. 2009. Sensitive digital quantification of DNA methylation in clinical samples. *Nat Biotechnol* 27:858–863 DOI: 10.1038/nbt.1559.

Lim JTE, Mansukhani M, Weinstein IB. 2005. Cyclin-dependent kinase 6 associates with the androgen receptor and enhances its transcriptional activity in prostate cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:5156–5161 DOI: 10.1073/pnas.0501203102.

Lin H-P, Lin C-Y, Hsiao P-H, Wang H-D, Jiang SS, Hsu J-M, Jim W-T, Chen M, Kung H-J, Chuu C-P. 2013. Difference in protein expression profile and chemotherapy drugs response of different progression stages of LNCaP sublines and other human prostate cancer cells. *PLoS ONE* 8e82625 DOI: 10.1371/journal.pone.0082625.

Lonergan PE, Tindall DJ. 2011. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J Carcinog* 10p. 20 DOI: 10.4103/1477-3163.83937.

Longacre TA, Foucar K, Crago S, Chen IM, Griffith B, Dressler L, McConnell TS, Duncan M, Gribble J. 1989. Hematogones: a multiparameter analysis of bone marrow precursor cells. *Blood* 73:543–552.

Menschikowski M, Hagelgans A, Nacke B, Jandeck C, Sukocheva O, Siegert G. 2015. Epigenetic control of phospholipase A2 receptor expression in mammary cancer cells. *BMC Cancer* 15p. 971 DOI: 10.1186/s12885-015-1937-y.

Menschikowski M, Platzbecker U, Hagelgans A, Vogel M, Thiede C, Schönefeldt C, Lehnert R, Eisenhofer G, Siegert G. 2012. Aberrant methylation of the M-type phospholipase A(2) receptor gene in leukemic cells. *BMC Cancer* 12p. 576 DOI: 10.1186/1471-2407-12-576.

Meyerson M, Harlow E. 1994. Identification of G1 kinase activity for cdk6, a novel cyclin D partner. *Mol Cell Biol* 14:2077–2086 DOI: 10.1128/MCB.14.3.2077.

Mikeska T, Candiloro ILM, Dobrovic A. 2010. The implications of heterogeneous DNA methylation for the accurate quantification of methylation. *Epigenomics* 2:561–573 DOI: 10.2217/epi.10.32.

Mishina H, Watanabe K, Tamaru S, Watanabe Y, Fujioka D, Takahashi S, Suzuki K, Nakamura T, Obata J-E, Kawabata K, Yokota Y, Inoue O, Murakami M, Hanasaki K, Kugiyama K. 2014. Lack of phospholipase A2 receptor increases susceptibility to cardiac rupture after myocardial infarction. *Circ Res* 114:493–504 DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.114.302319.

Nicolas JP, Lambeau G, Lazdunski M. 1995. Identification of the binding domain for secretory phospholipases A2 on their M-type 180-kDa membrane receptor. *J Biol Chem* 270:28869–28873 DOI: 10.1074/jbc.270.48.28869.

Nolin JD, Ogden HL, Lai Y, Altemeier WA, Frevert CW, Bollinger JG, Naika GS, Kicic A, Stick SM, Lambeau G, Henderson WR, Gelb MH, Hallstrand TS. 2016. Identification of Epithelial Phospholipase A2 Receptor 1 as a Potential Target in Asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 55:825–836 DOI: 10.1165/rcmb.2015-0150OC.

Nordlund J, Bäcklin CL, Wahlberg P, Busche S, Berglund EC, Eloranta M-L, Flaegstad T, Forestier E, Frost B-M, Harila-Saari A, Heyman M, Jónsson OG, Larsson R, Palle J, Rönnblom L, Schmiegelow K, Sinnott D, Söderhäll S, Pastinen T, Gustafsson MG, Lönnerholm G, Syvänen A-C. 2013. Genome-wide signatures of differential DNA methylation in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genome Biol* 14r105 DOI: 10.1186/gb-2013-14-9-r105.

Pan Y, Wan J, Liu Y, Yang Q, Liang W, Singhal PC, Saleem MA, Ding G. 2014. sPLA2 IB induces human podocyte apoptosis via the M-type phospholipase A2 receptor. *Sci Rep* 4p. 6660 DOI: 10.1038/srep06660.

Panov A, Orynbayeva Z. 2013. Bioenergetic and antiapoptotic properties of mitochondria from cultured human prostate cancer cell lines PC-3, DU145 and LNCaP. *PLoS ONE* 8e72078 DOI: 10.1371/journal.pone.0072078.

Pruzanski W, Vadas P. 1989. Phospholipase A2 and inflammation. *Ann Rheum Dis* 48:962–963 DOI: 10.1136/ard.48.11.962-b.

Qu Y, Lennartsson A, Gaidzik VI, Deneberg S, Karimi M, Bengtzén S, Höglund M, Bullinger L, Döhner K, Lehmann S. 2014. Differential methylation in CN-AML preferentially targets non-CGI regions and is dictated by DNMT3A mutational status and associated with predominant hypomethylation of HOX genes. *Epigenetics* 9:1108–1119 DOI: 10.4161/epi.29315.

Quach ND, Mock JN, Scholpa NE, Eggert MW, Payré C, Lambeau G, Arnold RD, Cummings BS. 2014. Role of the phospholipase A2 receptor in liposome drug delivery in prostate cancer cells. *Mol Pharm* 11:3443–3451 DOI: 10.1021/mp500174p.

Rand K, Qu W, Ho T, Clark SJ, Molloy P. 2002. Conversion-specific detection of DNA methylation using real-time polymerase chain reaction (ConLight-MSP) to avoid false positives. *Methods* 27:114–120 DOI: 10.1016/S1046-2023(02)00062-2.

Rantala JK, Pouwels J, Pellinen T, Veltel S, Laasola P, Mattila E, Potter CS, Duffy T, Sundberg JP, Kallioniemi O, Askari JA, Humphries MJ, Parsons M, Salmi M, Ivaska J. 2011. SHARPIN is an endogenous inhibitor of β 1-integrin activation. *Nat Cell Biol* 13:1315–1324 DOI: 10.1038/ncb2340.

Ravanti L, Heino J, López-Otín C, Kähäri VM. 1999. Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 274:2446–2455 DOI: 10.1074/jbc.274.4.2446.

Rintoul RC, Sethi T. 2002. Extracellular matrix regulation of drug resistance in small-cell lung cancer. *Clinical Science* 102:417–424 DOI: 10.1042/cs1020417.

Rouault M, Le Calvez C, Boilard E, Surrel F, Singer A, Ghomashchi F, Bezzine S, Scarzello S, Bollinger J, Gelb MH, Lambeau G. 2007. Recombinant production and properties of binding of the full set of mouse secreted phospholipases A2 to the mouse M-type receptor. *Biochemistry* 46:1647–1662 DOI: 10.1021/bi062119b.

Shaw RJ, Akufo-Tetteh EK, Risk JM, Field JK, Liloglou T. 2006. Methylation enrichment pyrosequencing: combining the specificity of MSP with validation by pyrosequencing. *Nucleic Acids Res* 34:e78 DOI: 10.1093/nar/gkl424.

Shen L, Guo Y, Chen X, Ahmed S, Issa J-PJ. 2007. Optimizing annealing temperature overcomes bias in bisulfite PCR methylation analysis. *BioTechniques* 42:48, 50, 52 passim DOI: 10.2144/000112312.

Shen L, Waterland RA. 2007. Methods of DNA methylation analysis. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 10:576–581 DOI: 10.1097/MCO.0b013e3282bf6f43.

Silliman CC, Moore EE, Zallen G, Gonzalez R, Johnson JL, Elzi DJ, Meng X, Hanasaki K, Ishizaki J, Arita H, Ao L, England KM, Banerjee A. 2002. Presence of the M-type sPLA(2) receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol* 283:C1102-13 DOI: 10.1152/ajpcell.00608.2001.

Staines K, Hunt LG, Young JR, Butter C. 2014. Evolution of an expanded mannose receptor gene family. *PLoS ONE* 9:e110330 DOI: 10.1371/journal.pone.0110330.

Sukocheva O, Menschikowski M, Hagelgans A, Yarla NS, Siegert G, Reddanna P, Bishayee A. 2019. Current insights into functions of phospholipase A2 receptor in normal and cancer cells: More questions than answers. *Semin Cancer Biol* 56:116–127 DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.11.002.

Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA. 1992. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques* 13:444–449.

Takahashi S, Watanabe K, Watanabe Y, Fujioka D, Nakamura T, Nakamura K, Obata J-E, Kugiyama K. 2015. C-type lectin-like domain and fibronectin-like type II domain of phospholipase A(2) receptor 1 modulate binding and migratory responses to collagen. *FEBS Lett* 589:829–835 DOI: 10.1016/j.febslet.2015.02.016.

Tamaru S, Mishina H, Watanabe Y, Watanabe K, Fujioka D, Takahashi S, Suzuki K, Nakamura T, Obata J-E, Kawabata K, Yokota Y, Murakami M, Hanasaki K, Kugiyama K. 2013. Deficiency of phospholipase A2 receptor exacerbates ovalbumin-induced lung inflammation. *J Immunol* 191:1021–1028 DOI: 10.4049/jimmunol.1300738.

Vindrieux D, Augert A, Girard CA, Gitenay D, Lallet-Daher H, Wiel C, Le Calvé B, Gras B, Ferrand M, Verbeke S, Launoit Y de, Leroy X, Puisieux A, Aubert S, Perrais M, Gelb M, Simonnet H, Lambeau G, Bernard D. 2013. PLA2R1 mediates tumor suppression by activating JAK2. *Cancer Res* 73:6334–6345 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-13-0318.

Vindrieux D, Devailly G, Augert A, Le Calvé B, Ferrand M, Pigny P, Payen L, Lambeau G, Perrais M, Aubert S, Simonnet H, Dante R, Bernard D. 2014. Repression of PLA2R1 by c-MYC and HIF-2 α promotes cancer growth. *Oncotarget* 5:1004–1013 DOI: 10.18632/oncotarget.1681.

Vogelstein B, Kinzler KW. 1999. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:9236–9241 DOI: 10.1073/pnas.96.16.9236.

Warnecke PM, Stirzaker C, Melki JR, Millar DS, Paul CL, Clark SJ. 1997. Detection and measurement of PCR bias in quantitative methylation analysis of bisulphite-treated DNA. *Nucleic Acids Res* 25:4422–4426 DOI: 10.1093/nar/25.21.4422.

Warnecke PM, Stirzaker C, Song J, Grunau C, Melki JR, Clark SJ. 2002. Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods* 27:101–107 DOI: 10.1016/S1046-2023(02)00060-9.

Wojdacz TK, Borgbo T, Hansen LL. 2009. Primer design versus PCR bias in methylation independent PCR amplifications. *Epigenetics* 4:231–234 DOI: 10.4161/epi.9020.

Wojdacz TK, Dobrovic A. 2007. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res* 35:e41 DOI: 10.1093/nar/gkm013.

Wojdacz TK, Hansen LL. 2006. Reversal of PCR bias for improved sensitivity of the DNA methylation melting curve assay. *BioTechniques* 41:274, 276, 278 DOI: 10.2144/000112240.

Wojdacz TK, Hansen LL, Dobrovic A. 2008. A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies. *BMC Res Notes* 1p. 54 DOI: 10.1186/1756-0500-1-54.

Yokota Y, Ikeda M, Higashino K, Nakano K, Fujii N, Arita H, Hanasaki K. 2000. Enhanced tissue expression and elevated circulating level of phospholipase A(2) receptor during murine endotoxic shock. *Arch Biochem Biophys* 379:7–17 DOI: 10.1006/abbi.2000.1849.

Zvaritch E, Lambeau G, Lazdunski M. 1996. Endocytic properties of the M-type 180-kDa receptor for secretory phospholipases A₂. *J Biol Chem* 271:250–257 DOI: 10.1074/jbc.271.1.250.

8 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, welche mich bei der Anfertigung der Publikationen und der Arbeit an meiner Dissertation unterstützt haben.

Insbesondere gilt mein Dank meinem Doktorvater Herr Prof. Menschikowski für die hervorragende Betreuung während des gesamten Promotionszeitraums, für unzählige Anregungen und wertvolle Diskussionen sowie für die große Hilfe bei der Erstellung der Promotionsschrift. Mein weiterer Dank gilt meinem Zweitgutachter Herr Prof. Grässler für den geleisteten Beitrag an meiner Promotion.

Darüber hinaus möchte ich mich bei der gesamten Arbeitsgruppe IKL-Epigenetik und im Speziellen bei Romy Adler und Carsten Jandek für die herzliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe und für eine stetige Unterstützung auf fachlicher sowie experimenteller Ebene beim Erstellen meiner Arbeit bedanken – beide haben, gemeinsam mit Herrn Prof. Menschikowski, durch ihre freundliche und hilfsbereite Art maßgeblich dazu beigetragen, dass ich mich vom ersten Moment an in der Arbeitsgruppe wohl gefühlt habe.

Abschließend möchte ich mich bei Alice Flohrer sowie bei meiner Familie und meinen Freunden für die Unterstützung und Geduld während meines Studiums und der Arbeit an meiner Dissertation bedanken.

9 Anlagen

Anlage 1

Erklärungen zur Eröffnung des Promotionsverfahrens

1. Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.
2. Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Prof. Mario Menschikowski
3. Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
4. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.
5. Die Inhalte dieser Dissertation wurden in folgender Form veröffentlicht: s. Publikationen
6. Ich bestätige, dass es keine zurückliegenden erfolglosen Promotionsverfahren gab.
7. Ich bestätige, dass ich die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden anerkenne.
8. Ich habe die Zitierrichtlinien für Dissertationen an der Medizinischen Fakultät der Technischen Universität Dresden zur Kenntnis genommen und befolgt.
9. Ich bin mit den "Richtlinien zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis, zur Vermeidung wissenschaftlichen Fehlverhaltens und für den Umgang mit Verstößen" der Technischen Universität Dresden einverstanden.

Dresden, 06.10.20



Ort, Datum Unterschrift des Doktoranden

(Diese Erklärungen sind an das Ende der Arbeit einzubinden)

Anlage 2

Erklärung über die Einhaltung gesetzlicher Bestimmungen

Hiermit bestätige ich die Einhaltung der folgenden aktuellen gesetzlichen Vorgaben im Rahmen meiner Dissertation

- das zustimmende Votum der Ethikkommission bei Klinischen Studien, epidemiologischen Untersuchungen mit Personenbezug oder Sachverhalten, die das Medizinproduktegesetz betreffen

.....

Hier ist die Unterschrift des Klinik- bzw. Institutsdirektors einzuholen

Aktenzeichen der zuständigen Ethikkommission: *Eudva-CT 2007-004270-43*

- die Einhaltung der Bestimmungen des Tierschutzgesetzes Aktenzeichen der Genehmigungsbehörde zum Vorhaben/zur Mitwirkung: *AZ 24-9168.21-4/2004-1*

.....

Hier ist die Unterschrift des Klinik- bzw. Institutsdirektors einzuholen

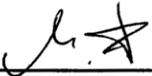
die Einhaltung des Gentechnikgesetzes/Projektnummer: *54-8451 | 28311*

.....

Hier ist die Unterschrift des Klinik- bzw. Institutsdirektors einzuholen

- die Einhaltung von Datenschutzbestimmungen der Medizinischen Fakultät und des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus.

Dresden, 06.10.20

_____ 

Ort, Datum Unterschrift des Doktoranden

(Diese Erklärungen sind an das Ende der Arbeit einzubinden)