

Institut für Genetik der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Mechanismen der epigenetischen Inaktivierung von  
tumorassoziierten Genen in humanen  
Lungentumoren**

*Mechanisms of epigenetic inactivation of tumor-  
associated genes in human lung tumors*

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

***Doctor rerum naturalium***

**- Dr. rer. nat.-**

der naturwissenschaftlichen Fakultät  
(Fachbereich 08 Biologie und Chemie)  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Dipl. Biol. Steffen Kiehl  
geb. am 14.02.1984 in Siegen

Gießen 2015

Dekan: Prof. Dr. Volker Wissemann

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Dammann

2. Gutachter: Prof. Dr. Lienhard Schmitz

**Teile der vorliegenden Dissertation wurden bereits veröffentlicht:**

Kiehl S, Herkt SC, Richter AM, Fuhrmann L, El-Nikhely N, Seeger W, Savai R, Dammann RH (2014) **ABCB4 is frequently epigenetically silenced in human cancers and inhibits tumor growth**. *Scientific reports* **4**: 6899

**Manuskript in Vorbereitung:**

Kiehl S, Zimmermann T, Bartkuhn M, Dammann RH **Predisposition of epigenetic silencing by tandem gene orientation.**

# I Inhaltsverzeichnis

## Inhalt

<b>I INHALTSVERZEICHNIS .....</b>	<b>4</b>
<b>II ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>8</b>
<b>III SUMMARY .....</b>	<b>10</b>
<b>IV ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>12</b>
<b>1. EINLEITUNG .....</b>	<b>16</b>
1.1 EPIGENETIK .....	16
1.2 CHROMATIN .....	16
1.3 HISTONMODIFIKATIONEN .....	17
1.3.1 Histon-Acetylierung .....	18
1.3.2 Histon-Methylierung .....	18
1.3.3 weitere Histonmodifikationen .....	19
1.4 DNA-METHYLIERUNG.....	20
1.5 ASSOZIATION ZWISCHEN HISTONMODIFIKATIONEN UND DNA-METHYLIERUNG .....	23
1.6 EPIGENETIK UND KREBS .....	24
1.6.1 Veränderte Histonmodifikationen in Tumoren .....	24
1.6.2 Verbindung von DNA-Methylierung und Krebs.....	25
1.7 RASSF1A .....	27
1.8 EPIGENETISCHE KREBSTHERAPIE: DNA-METHYLTRANSFERASE INHIBITOREN .....	29
1.9 ZIELSETZUNG .....	31
<b>2. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>32</b>
2.1 MATERIALIEN .....	32
2.1.1 Chemikalien .....	32
2.1.2 Längenstandards/ Molekulargewichtsstandard .....	34
2.1.3 Transfektionsreagenzien.....	35
2.1.4 Allgemeine Lösungen und Puffer .....	35
2.1.5 Kulturmedien .....	38
2.1.6 Enzyme.....	40
2.1.7 Antikörper .....	40
2.1.8 Vektoren .....	41
2.1.9 Verwendete Zelllinien und Gewebe.....	46

2.1.10 <i>Gebrauchsgegenstände</i> .....	48
2.1.11 <i>Geräte</i> .....	49
2.1.12 <i>Verwendete Softwares / Datenbanken</i> .....	50
<b>2.2 METHODEN</b> .....	<b>52</b>
2.2.1. RNA-ISOLATION .....	52
2.2.2. DNA-ISOLATION (AUS ZELLINIEN) .....	52
2.2.3 NUKLEINSÄURE-ISOLATION (RNA, DNA - AUS GEWEBE) .....	53
2.2.4 DNA-KONZENTRATIONSBESTIMMUNG .....	53
2.2.5. POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) .....	53
2.2.5.1 <i>Reverse Transkriptase (RT)-PCR</i> : .....	53
2.2.5.2 <i>DNaseI- Verdau</i> .....	53
2.2.5.3 <i>Primärstrang- Synthese</i> .....	54
2.2.5.4 <i>Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i> .....	54
2.2.5.5 <i>Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)</i> .....	55
2.2.6 KLONIERUNGEN .....	56
2.2.6.1 <i>Mutagenese-PCR zur Manipulation von Plasmidsequenzen</i> .....	56
2.2.6.2 <i>Verdau von Vektorsequenzen</i> .....	57
2.2.6.3 <i>Dephosphorylierung von Vektorsequenzen</i> .....	57
2.2.6.4 <i>Ligation</i> .....	57
2.2.6.5 <i>Gelelektrophorese</i> .....	57
2.2.6.6 <i>Gelextraktion</i> .....	57
2.2.6.7 <i>Transformation</i> .....	57
2.2.6.8 <i>Plasmid-Präparation</i> .....	58
2.2.6.9 <i>Klonierungsstrategien</i> .....	58
2.2.7 METHYLIERUNGSANALYSEN .....	61
2.2.7.1 <i>Bisulfit (BS)-Konvertierung</i> .....	61
2.2.7.2 <i>In vitro Methylierung</i> .....	62
2.2.7.3 <i>Combined Bisulfit Restriction Analysis (CoBRA)</i> .....	62
2.2.7.4 <i>Pyrosequenzierung</i> .....	62
2.2.7.5 <i>Illumina 450k Bead-Chip Array</i> .....	63
2.2.8 PROTEINANALYTIK .....	64
2.2.8.1 <i>Bradford Assay</i> .....	64
2.2.8.2 <i>SDS-PAGE</i> .....	65
2.2.8.3 <i>Western Blot</i> .....	65
2.2.9 KULTIVIERUNG VON EUKARYOTISCHEN ZELLEN .....	66
2.2.9.1 <i>Transfektion</i> .....	66
2.2.9.2 <i>Kolonie Formationsassay</i> .....	67
2.2.9.3 <i>5-Aza-2'-Desoxycytidin / Zebularin Behandlung</i> .....	67

2.2.9.4 RNA Interferenz (RNAi) .....	68
2.2.10 IMMUNFLUORESCENZ.....	68
2.2.11 CHROMATIN IMMUNOPRÄZIPITATION (CHIP) .....	69
2.2.12 DUALER LUCIFERASE ASSAY .....	70
<b>3. ERGEBNISSE .....</b>	<b>71</b>
3.1 ANALYSE DER GENOMWEITEN METHYLIERUNGSPROFILE VON HUMANEN LUNGENKREBSZELLINIEN.....	71
3.1.1 Charakterisierung der DNA-Methylierungsprofile des Illumina 450k Arrays von humanen Lungenkrebszelllinien.....	71
3.1.2 Detaillierte Analyse CpG-Insel-assoziiertes DNA-Methylierungsmuster in Lungenkrebszelllinien .....	73
3.2 DNMT-INHIBITOR-BEHANDLUNG VON HUMANEN LUNGENKREBSZELLINIEN .....	75
3.2.1 Analyse der Zebularin- bzw. 5-Aza-2'-Desoxycytosin-induzierten Demethylierung in humanen Lungenkrebszelllinien.....	75
3.2.2 Analyse der charakteristischen Demethylierung verschiedener Lungenkrebszelllinien nach Verwendung verschiedener DNMT-Inhibitoren .....	78
3.2.3 Demethylierungseffizienz verschiedener DNMT-Inhibitoren .....	80
3.3 FUNKTIONELLE ANALYSE VON LUNGENKREBSSPEZIFISCH HYPERMETHYLIERTEN CpG-INSELN.....	81
3.4 CHARAKTERISIERUNG DER DNA-METHYLIERUNGSPROFILE VON CpG-INSELN UND DAMIT ASSOZIIERTER REGIONEN .....	86
3.4.1 Differentielle Methylierungsanalyse von annotierten, funktionellen Genregionen in H322-Lungenkrebszellen und normalen Bronchialepithelzellen (NHBE) .....	86
3.4.2 DNA-Methylierungsanalyse von CpG Insel assoziierten Regionen in Lungenkrebszelllinien.....	87
3.4.3 Genomweite Analyse von hypervariablen DNA-Methylierungsmustern in CpG-Insel-shore Bereichen .....	89
3.5 ANALYSE DER RASSF1A PROMOTOR CpG-INSEL METHYLIERUNG IM ZUSAMMENSPIEL MIT EPIGENETISCHEN REGULATORPROTEINEN IN LUNGENKREBS .....	93
3.5.1 Validierung der Illumina 450k Array DNA-Methylierungsdaten anhand der RASSF1A Promotor-CpG-Insel.....	93
3.5.2 Detaillierte Analyse der DNA-Methylierung der RASSF1A CpG-Insel und der umgebenden shore Bereiche .....	94
3.5.3 Expressionsanalyse verschiedener DNMTs und direkter Interaktionspartner in Lungenkrebszelllinien .....	98
3.5.4 DNA-Methylierungsanalyse des RASSF1A-Promotors in HCT-116 DNMT-KO Mutanten .....	103
3.5.5 Bestimmung des Einflusses von DNMT-Überexpression auf die RASSF1A Expression bzw. den Promotor DNA-Methylierungsstatus .....	104
3.5.6 Klassifizierung von NSCLC-Zelllinien anhand des DNA-Methylierungsprofils der RASSF1A Promotorregion. ....	105
3.6 ANALYSE DES EPIGENETISCHEN INAKTIVIERUNGSMECHANISMUS VON RASSF1A .....	108
3.6.1 Genomische Lokalisierung prädisponiert Gene für erhöhte Promotor DNA-Methylierung .....	108

---

3.6.2 Etablierung eines EGFP-RLuc-Doppelreportersystems zur Untersuchung des Effekts des genomischen Kontextes auf die Repression der RASSF1A Expression .....	114
3.6.3 EGFP-Induktion führt zur Deacetylierung des RASSF1A- Promotors im Doppelreporterkonstrukt ....	119
3.6.4 CPSF1 und HDAC6 kooperieren in der Repression des RASSF1A-Promotor-Reporters .....	121
3.7 EPIGENETISCHE INAKTIVIERUNG VON ABCB4 IN VERSCHIEDENEN KREBSSENTITÄTEN .....	123
3.7.1 Methylierungsanalyse von ABCB4 in verschiedenen Krebsentitäten .....	123
3.7.2 DNA-Methylierungsanalyse des ABCB4 Promotors in primären Tumoren.....	125
3.7.3 Korrelationsanalyse von Inhibition der DNA-Methylierung und Steigerung der Genexpression von ABCB4 .....	126
3.7.4 ABCB4 Expression reduziert die Fähigkeit zur Kolonieformation in Lungenkrebszelllinien .....	127
3.7.5 Epigenetische Inaktivierung von Abcb4 in Maustumoren.....	128
<b>4. DISKUSSION .....</b>	<b>130</b>
4.1 ANALYSE VON LUNGENKREBSSPEZIFISCHEN DNA-METHYLIERUNGSMUSTERN.....	130
4.2 CHARAKTERISTISCHE METHYLIERUNGSMUSTER VON CPG-INSEL-ASSOZIIERTEN SHORE BEREICHEN.....	135
4.3 EXPRESSIONSANALYSE VON HUMANEN DNMTs UND ASSOZIIERTER FAKTOREN.....	142
4.4 CHARAKTERISIERUNG DER ZEBULARIN-BEDINGTEN DEMETHYLIERUNG VON LUNGENKREBSZELLINIEN.....	145
4.5 FUNKTIONELLE ANALYSE VON LUNGENKREBSSPEZIFISCH HYPERMETHYLIERTEN CPG-INSELN .....	149
4.6 ANALYSE EINES TRANSKRIPTIONSABHÄNGIGEN INTERFERENZMECHANISMUS BEI DER EPIGENETISCHEN INAKTIVIERUNG DER RASSF1A-EXPRESSION.....	156
4.7 EPIGENETISCHE INAKTIVIERUNG VON ABCB4 IN VERSCHIEDENEN HUMANEN KREBSSENTITÄTEN.....	166
<b>5. REFERENZEN .....</b>	<b>169</b>
<b>6. ANHANG .....</b>	<b>193</b>
<b>7. DANKSAGUNG .....</b>	<b>199</b>
<b>8. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG .....</b>	<b>200</b>

## II Zusammenfassung

Der epigenetischen Deregulation von tumorassoziierten Genen kommt in der Pathogenese von Lungentumoren eine zentrale Bedeutung zu. Insbesondere sind CpG- und GC-reiche Sequenzen, die als CpG Inseln (CGI) bezeichnet werden, häufig aberrant methyliert. In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Bisulfit-Konvertierung genomweite DNA-Methylierungsprofile von 480.000 CpGs in humanen Lungenkrebszelllinien und normalen bronchialen Epithelzellen generiert. Es zeigte sich, dass vor allem intra- und intergenische CGI in Lungenkrebszelllinien höher als in normalen Epithelzellen methyliert sind. Die funktionelle Annotation von lungenkrebspezifisch hypermethylierten CGI ergab, dass diese signifikant mit Homöobox-Domänengenen und Genen, die in Stammzellen repressive H3K27me3 Histonmodifikation tragen, assoziiert sind.

Zwischen den untersuchten Lungenkrebszelllinien zeigten sich sowohl bei der Analyse aller CpGs, als auch bei promotorassoziierten, intra- oder intergenischen CGI starke Unterschiede bei der Streuung der Methylierungsdaten und im mittleren Methylierungsniveau. Die stärksten Methylierungsdifferenzen zwischen verschiedenen Lungenkrebszelllinien konnten in zwei kb langen Übergangsbereichen von CGI, den sogenannten *shores* festgestellt werden. Im Gegensatz dazu lagen in normalen Lungenzellen kaum Schwankungen der *shore*-Methylierung vor. Interessanterweise konnte eine Korrelation zwischen der Transkriptionsrichtung (5'-3') und der Methylierung von CGI nachgewiesen werden. Dabei zeigte sich, dass 5'-*shores* von Transkriptionsstart-assoziierten CGI in Lungenkrebszelllinien und normalen Lungenzelllinien signifikant höher ( $p < 0,001$ ) methyliert sind als 3'-*shores*. Diese *shore*-spezifische Hypermethylierung konnte anhand der Promotor-CGI des Tumorsuppressorgens *Ras Association Domain Family 1A (RASSF1A)* in Lungentumoren verifiziert werden.

Weiterhin zeigte sich auf Grundlage der genomweiten DNA-Methylierungsprofile von Lungenkrebszellen, dass *downstream* gelegene CGI-Promotoren innerhalb von zwei Tandemorientierten Genen, eine Prädisposition zur Hypermethylierung aufwiesen. Die Intensität der CGI-Hypermethylierung korrelierte signifikant mit der Länge des intergenischen Bereichs zwischen solchen Tandemgenen. Da das *RASSF1A* Gen ebenfalls als ein *downstream* gelegenes Tandemgen vorliegt, wurde der epigenetische Inaktivierungsmechanismus des *RASSF1A* Promotors mit Hilfe eines induzierbaren Tandemreporter-Assays untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Induktion der Transkription eines *upstream* gelegenen Reportergens zu einer Repression des *downstream* gelegenen Gens und zu einer Deacetylierung der Histone im *RASSF1A*-Promotorbereich kommt. Als Faktoren, die an der Ausbildung dieses repressiven Effekts beteiligt sind, konnten HDAC6 und CPSF1 identifiziert werden. In Lungenkrebszellen ließ sich außerdem eine tumorspezifische Zunahme der Expression von Histondeactylasen, Faktoren des Polycomb-repressiven Komplexes und der DNA-Methylierungsmaschinerie im Vergleich zu normaler Lungen nachweisen. Um die therapeutische Wirkung von DNA-Methyltransferase/DNMT-Inhibitoren zu analysieren, wurden Lungenkrebszelllinien vier Tage lang mit den Cytosin-Analoga Zebularin bzw. 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-2'-dC) behandelt. Durch den Einsatz von Zebularin konnte eine stärkere Hemmung der Zellproliferation als durch 5-Aza-2'-dC erzielt werden. Die Demethylierungseffizienz einer 200  $\mu$ M Zebularin Behandlung war jedoch signifikant niedriger als die von 5  $\mu$ M 5-Aza-2'-dC. Der Vergleich von demethylierten CpGs nach Zebularin- und 5-Aza-2'-dC-Behandlung ergab eine signifikante Überschneidung gemeinsam demethylierter CpGs. Die Analyse der Methylierungsprofile der Lungenkrebszelllinien führte zur Identifizierung von aberrant methylierten Genen.

In einem weiteren Teil der Arbeit wurde die tumorspezifische Hypermethylierung des *ATP-binding cassette sub-family B member 4 (ABCB4)* Transporters verifiziert. Bei einer umfassenden

Methylierungsanalyse von verschiedenen Krebsentitäten konnte eine Hypermethylierung des *ABCB4* CGI-Promotors in Lungen-, Brust-, Hals- und Kopfkrebszellen festgestellt werden. Diese Methylierung war mit einer Reduktion der *ABCB4* Genexpression verbunden und konnte unter Verwendung von DNMT-Inhibitoren reaktiviert werden. In murinen Krebszelllinien wurde ebenfalls eine krebsspezifische epigenetische Inaktivierung von *Abcb4* detektiert werden. Eine Überexpression von *ABCB4* in humanen Lungenkrebszelllinien zeigte einen repressiven Effekt auf die Kolonieformation und die Zellproliferation.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden epigenetischen Regulationsmechanismen, die bei der Inaktivierung von tumorassoziierten Genen involviert sind, in Lungenkrebs identifiziert. Die Bedeutung der Befunde konnten anhand von verschiedenen Genen und Chromatin-assoziierten Faktoren verifiziert werden.

### III Summary

The epigenetic deregulation of tumor-associated genes is of central importance in the pathogenesis of lung tumors. In particular CpG and GC-rich sequences, known as CpG islands (CGI), are frequently aberrantly methylated. In the present work, genome-wide DNA-Methylation profiles of 480,000 CpGs in human lung cancer cell lines and normal bronchial epithelial cells after bisulfite conversion were generated. It was observed that especially intra- and intergenic CGI are methylated higher in lung cancer cell lines than in normal epithelial cells. The functional annotation of specifically hypermethylated CGI in lung cancer revealed that the hypermethylation is significantly associated with homeobox domain genes and genes that contribute to repressive histone H3K27me3 in stem cells.

Strong differences in the distribution of methylation and the average methylation levels were seen in the examined lung cancer cell lines concerning both the analysis of all CpGs, as well as promoter associated, intra- or intergenic CGI. The strongest variations of methylation in various lung cancer cell lines were seen in 2 kb long transitional areas of CGI, the so-called shores. In contrast, barely any variation of the shore methylation was detected in normal lung cells. Interestingly, a correlation between the direction of transcription (5' '3') and the methylation of CGI were detected. The 5'-shores of transcription start-associated CGI in lung cancer cell lines and normal lung cell lines were significantly higher ( $p < 0.001$ ) methylated than 3'-shores. This shore-specific hypermethylation could be verified on the basis of the promoter CGI of the *Ras Association Domain Family 1A (RASSF1A)* tumor suppressor in lung tumors.

On the basis of genome-wide DNA-Methylation profiles of lung cancer cells, a predisposition to hypermethylation of downstream located CGI promoters within two tandem oriented genes was shown. The intensity of the CGI hypermethylation correlates significantly with the length of the intergenic region between such tandem genes. Since the *RASSF1A* gene is also a downstream tandem gene, the epigenetic inactivation of *RASSF1A* was examined with an inducible reporter assay using the tandem *RASSF1A* promoter. By means of this assay, it was determined that the induction of transcription of a reporter gene located upstream led to a repression of the downstream gene and deacetylation of histones in the *RASSF1A* promoter region. HDAC6 and CPSF1 were identified as factors involved in this repressive effect. Furthermore, a tumor-specific increase in the expression of histone deacetylases, factors of the polycomb repressive complex and the DNA-Methylation machinery were detected in lung cancer cells compared to normal lung cells. To analyze the therapeutic effect of DNA-methyltransferases (DNMT) inhibitors, lung cancer cell lines were treated for four days with the cytosine analogs Zebularine and 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-2'-dC). The use of Zebularine caused a stronger inhibition of cell proliferation than 5-Aza-2'-dC. However, the efficiency of demethylation after treatment with 200  $\mu$ M Zebularine was significantly lower than the treatment with 5  $\mu$ M 5-aza-2'-dC. A significant overlap of the demethylated CpGs after treatment with Zebularin- and 5-Aza-2'-dC was revealed. The analysis of methylation profiles of lung cancer cell lines led to the identification of aberrantly methylated genes.

In a further part of this work, the tumor-specific hypermethylation of *ABCB4 (ATP-binding cassette sub-family B member 4)* transporter was verified. In a comprehensive analysis of various cancer entities, the hypermethylation of the CGI promoter of *ABCB4* in lung, breast, head and neck cancer cells was detected. The hypermethylation in these cells was associated with a reduced gene expression and a re-expression of *ABCB4* was induced with DNMT inhibitors. Further, in murine cancer cell lines a cancer-specific epigenetic inactivation of *Abcb4* was detected. Overexpression of

human lung cancer cell lines in *ABCB4* showed a repressive effect on the colony formation and cell proliferation.

In this work, epigenetic regulatory mechanisms that are involved in the inactivation of tumor-associated genes were identified in lung cancer. The significance of the findings could be verified for different genes and chromatin-associated factors.

## IV Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	griech.: alpha
A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
ad	zufügen (lat.: zu)
AK	Antikörper
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-triphosphat / Adenosinphosphosulfat in Zusammenhang mit Pyrosequenzierung
5-Aza-dC	5-Aza-2'-deoxycytidin
$\beta$	griech.: beta
bp	Basenpaare
Bs	Bisulfit-behandelt
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CAM	Chloramphenicol
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	englisch: complementary DNA, deutsch: komplementäre DNA
CGI	CpG-Insel
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
CMV	humanes Cytomegalie Virus
COBRA	Combined Bisulfite-Restriction-Analysis
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin Dinukleotid
CTCF	CCCTC-binding factor
d	Tag(e)
$\Delta$	griech.: delta
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
d.h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat

---

ECL	enhanced chemiluminescence
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	enhanced green fluorescent protein
et al.	et alterae (und andere)
EthBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FA	Formamid
FastAP	thermosensitive Alkaline Phosphatase
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
fw	forward (deutsch: vorwärts bei Primerrichtung)
g	Gramm
G	Guanin
G418	Geneticin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
griech.	griechisch
H3	Histon H3
H4	Histon H4
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
HAT	Histon-Acetyltransferase
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylase
HRP	Meerrettich-Peroxidase
IgG	Immunglobulin G
in vitro	lat. „im Glas“, nicht in einem lebenden Organismus
in vivo	lat. „im Lebendigen“, im lebenden Organismus
IP	Immunopräzipitation
i.v.m.	in vitro methyliert
K	Lysin
Kan.	Kanamycin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
lat.	lateinisch
LB	lysogeny broth (Nährmedium)
LiCl	Lithiumchlorid
Long Interspersed Nuclear Element (deutsch: lange, eingestreute Kernsequenzelemente)	
Lsg.	Lösung
μ	Mikro-
m	Milli-
M	Molar
max.	maximal

---

MCS	multiple cloning site
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min.	Minute
ml	Milliliter
MMLV-RT	Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase
mol	Stoffmenge ( $6 \times 10^{23}$ Teilchen)
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n	nano
N	standardisiertes IUPAC Symbol für any (alle Nukleotide möglich: G,A,C oder T)
NSCLC	non small cell lung cancer (deutsch: nicht kleinzelliger Lungenkrebs)
RLuc	Renilla Luciferase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNaseA	Ribonuklease A
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase PCR
rv	reverse (deutsch.: rückwärts; bei Primerrichtung)
S.	Seite
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SCLC	small cell lung cancer (deutsch: kleinzelliger Lungenkrebs)
SDS	sodium dodecyl sulfat (deutsch: Natriumdodecylsulfat)
Sek	Sekunde
SINE	shore interspersed nuclear element (deutsch: kurze, eingestreute Kernsequenzelemente)
siRNA	small interfering RNA
s.o.	siehe oben
SOC	super optimal broth with catabolite repression
Strep.	Streptomycin
SV40	Simian virus 40
t	Zeit
T	Thymin
TA	Annealing-Temperatur
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered Saline
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Temp.	Tempera
TET	Ten-Eleven Translocation
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris(hydroxymethyl-)aminomethan
TSA	Trichostatin A
TSG	Tumorsuppressorgen
TSS	Transkriptionsstart

U	Uracil
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
UDP	Uridindiphosphat
usw.	und so weiter
UV	Ultraviolett
V	Volt
Vol.	Volumen
vs.	versus (im Vergleich zu)
VT	Volumenteil
V/V	Volumenanteile (volume per volume)
Y	standardisiertes IUPAC Symbol für Pyrimidine (Cytosin oder Thymin)
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

## 1. Einleitung

### 1.1 Epigenetik

Unter dem Begriff "Epigenetik" werden mitotische und meiotische Veränderungen von Genfunktionen zusammengefasst, die nicht durch Veränderungen der DNA Sequenz hervorgerufen werden (Huang et al, 2013). Nahezu alle Zellen eines Organismus besitzen dieselbe genetische Ausstattung (Genotyp), weisen jedoch unterschiedliche Phänotypen mit unterschiedlichen Morphologien und physiologischen Funktionen auf. Verschiedene Zelltypen sind durch charakteristische Genexpressionsmuster gekennzeichnet, die sich während der Differenzierung des Organismus entwickeln und anschließend beständig aufrechtgehalten werden. Die Genexpression wird durch verschiedene epigenetische Regulationsmechanismen beeinflusst (Chen & Dent, 2014).

### 1.2 Chromatin

Der genetische Code besteht aus negativ geladenen DNA-Polymeren mit einer Gesamtlänge von ca. 3 Mrd. Basenpaaren (Venter et al, 2001). Zur Neutralisierung der elektrostatischen Abstoßung benachbarter Phosphatreste des Nukleinsäure-Rückgrates wird die DNA in eukaryotischen Zellen von stark basischen Histonproteinen gebunden. Der Komplex aus DNA, Histonproteinen und assoziierten Proteinen wird als Chromatin bezeichnet. Die Bildung des Chromatins aus DNA und Histonproteinkomplexen erlaubt eine Verdichtung der DNA um einen Faktor von 10.000 und die Faltung der DNA in Chromosomen (Woodcock & Ghosh, 2010). Die dichte Packung des Chromatins ist notwendig damit das Genom in den verhältnismäßig kleinen Zellkern passt. Durch die Verpackung der DNA in Histonkomplexe wird außerdem die Zugänglichkeit zur DNA eingeschränkt. Diese muss allerdings für Proteine gewährleistet sein, die an Prozessen wie Transkription, Replikation und DNA-Reparatur beteiligt sind (Zentner & Henikoff, 2013). Die eingeschränkte Zugänglichkeit der DNA ermöglicht eine komplexe Regulation von DNA-abhängigen Prozessen, indem eine spezifische Bindung von verschiedenen Regulationsfaktoren an Zielsequenzen entweder gestattet oder verhindert wird (Jiang & Pugh, 2009). Der Verpackungsgrad der DNA wird durch Modifikationen und Positionierung von Chromatinkomponenten bestimmt und ist mit der Ausbildung definierter Chromatinzustände verbunden (Allis et al). Dazu gehören unter anderem Prozesse wie die DNA-Methylierung, Modifikationen von Histon-Proteinen und unterschiedliche Histon-Varianten. Entwicklungsbedingte Veränderungen der Zellen sind aber auch mit dynamischen Veränderungen des Chromatins verbunden (Chen & Dent, 2014).

Die Grundeinheit des eukaryotischen Chromatins bilden Nukleosomen. Diese bestehen aus einem Histonkern, um den die DNA gewickelt ist. Jeder Histonkern besteht aus 2 Kopien der Histonproteine H2A, H2B, H3 und H4. Um dieses Histonoktamer ist eine DNA-Sequenz von ca. 147 bp Länge gewickelt. Die Amino-terminalen Enden der Histone ragen aus dem Histonkern heraus und können verschiedene kovalente Modifikationen tragen (Morales & Richard-Foy, 2000). Neben dem Nukleosomenkern ist die DNA mit dem Linkerhiston H1 verbunden, welches die Ausbildung einer kompakteren, transkriptionell inaktiven 30 nm-Chromatinstruktur ermöglicht (Jiang & Pugh, 2009).

Bei den meisten aktiven Genen sind die Nukleosomen im Bereich des Transkriptionsstarts in der gleichen Art und Weise organisiert: Es gibt eine zentrale Nukleosomen-freie Region, die von zwei genau positionierten Nukleosomen (-1 und +1 Nukleosomen) flankiert wird. Daran schließt sich eine Reihe von Nukleosomen an, in die die Gene eingepackt sind. Dieses Muster tritt bei den meisten eukaryotischen Zellen auf (Barski et al, 2007; Mavrich et al, 2008; Yuan et al, 2005).

Es gibt zwei Formen höherer Nukleosomen-Organisation, die sich im Grad der Kompaktierung der Nukleosom-Struktur unterscheiden: Euchromatin und Heterochromatin. Euchromatin ist lockerer verpackt und repräsentiert, aufgrund einer erhöhten Zugänglichkeit der DNA, typischerweise transkriptionell aktive Gene. Heterochromatin ist dichter gepackt, und zeigt eine starke zytologische Färbung innerhalb des Nukleus, die durch die hohe Dichte an nukleären Proteinen erzeugt wird (Hilwig & Gropp, 1972). Heterochromatin kann weiter in konstitutives und fakultatives Heterochromatin unterteilt werden. Konstitutives Heterochromatin umfasst permanent ausgeschaltetes Chromatin, wie z.B. das perizentrische Heterochromatin. Fakultatives Heterochromatin umfasst inaktives Chromatin, das jedoch in Reaktion auf einen bestimmten genetischen oder umweltabhängigen Stimulus reaktiviert wird. Die Chromatinkonformation ist daher nicht vollständig festgelegt, sondern wird in einer dynamischen Art und Weise zelltypspezifisch, aufgrund von physiologischen und umweltbedingten Signalen, reguliert (Virani et al, 2012). Die Eigenschaften von Nukleosomen können auf verschiedene Arten verändert werden. Dazu zählen der Austausch von Kern-Histonen durch spezialisierte Histonvarianten (Talbert & Henikoff, 2010), die Neupositionierung oder den Ausschluss von Nukleosomen von der DNA durch ATP-abhängige Chromatin-remodeling Enzyme (Hargreaves & Crabtree, 2011) oder durch kovalente Modifikationen der Histone (Zentner & Henikoff, 2013).

Die Kombination verschiedener epigenetischer Modifikationen (wie Histon-Modifikationen und DNA-Methylierung) bilden in ihrer Gesamtheit den epigenetischen Code (Turner, 2007). Dieser Code wird von bestimmten Enzymen (*writers*) geschrieben, kann jedoch von anderen Enzymen auch wieder entfernt werden (*erasers*). Eine weitere Gruppe von Proteinen kann über spezifische Proteindomänen mit den epigenetischen Modifikationen interagieren und so an das Chromatin rekrutiert werden (*readers*) (Jenuwein & Allis, 2001; Shi & Whetstine, 2007). Durch die Kombination aus *writing*-, *reading*- und *erasing*-Aktivitäten wird ein optimales, lokales Umfeld für chromatinabhängige biologische Prozesse, wie Transkriptionsregulation und DNA-Reparatur, gebildet (Wang et al, 2007a).

### 1.3 Histonmodifikationen

Die Kombination aus Nukleosomen-Position, ihrer chemischen Modifikationen und verschiedener Histonprotein-Varianten ist der Schlüssel der genomischen Regulation (Jiang & Pugh, 2009). Histonmodifikationen umfassen unter anderem Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, ADP-Ribosylierung, Glykosylierung, Ubiquitinierung, SUMOylierung und Crotonylierung. (Bannister & Kouzarides, 2011; Tan et al, 2011). Viele Histonmodifikationen beeinflussen den Transkriptionsprozess (Li et al, 2007) und bestimmen den transkriptionellen Status der entsprechenden kodierenden DNA-Sequenzen (Henikoff & Shilatifard, 2011; Huang et al, 2013).

Die Halbwertszeit von Histonmodifikationen ist sehr unterschiedlich und variiert von Tagen, über einige Stunden (Methylierung (Zee et al, 2010)) bis hin zu wenigen Minuten (Acetylierung, Phosphorylierung) (Chestier & Yaniv, 1979; Jackson et al, 1975).

Trotz der großen Zahl unterschiedlicher Histonmodifikationen konnte gezeigt werden, dass einige Kombinationen von Modifikationen wahrscheinlicher auftreten als andere und dass sich einige Kombinationen gegenseitig ausschließen. Dies deutet auf eine gegenseitige Beeinflussung (*crosstalk*) verschiedener Histon-Modifikationen hin, welche entweder zwischen Modifikationen auf demselben Histonterminus (*cis*) oder zwischen verschiedenen Nukleosomen (*trans*) erfolgen kann. Histon-modifizierende Enzyme können ebenfalls durch bereits existierende Modifikationen beeinflusst

werden. Dadurch wiederum entstehen positive oder negative Rückkopplungsschleifen, die die Bindung und die katalytische Aktivität der Enzyme regulieren (Zhang et al, 2015).

### 1.3.1 Histon-Acetylierung

Histon-Acetylierungen sind stark mit transkriptioneller Aktivität verbunden (Hebbes et al, 1988) (Struhl, 1998). Histon-Acetylierungen treten an Lysinresten auf und wirken aktivierend auf die Transkription, indem durch sie die positiven Ladungen der Histonproteine neutralisiert werden, wodurch die Interaktion mit dem negativ geladenen DNA-Phosphatrückgrad reduziert wird (Hong et al, 1993). Das Auftreten von Histon-Acetylierungen und der dynamische Zustand der Chromatinkonformation wird durch Histon-Acetyltransferasen (HAT) und Histon-Deacetylasen (HDAC) kontrolliert (Davie, 1998). HATs katalysieren die Addition von Acetylgruppen an Lysine unter Verwendung des Cofaktors Acetyl-Coenzym A und induzieren eine Öffnung des Chromatins (Galdieri & Vancura, 2012). Dagegen werden Acetyl-Gruppen durch HDACs entfernt, wodurch ein repressiver Chromatinzustand induziert wird (Roth et al, 2001). Darüber hinaus haben sowohl HDACs als auch HATs zahlreiche nicht-Histon-Substrate (Singh et al, 2010). HDACs katalysieren die Deacetylierung einer Vielzahl von Proteinen, darunter p53, YY1 und STAT3, die einen besonderen Stellenwert für die Karzinogenese haben (Glozak et al, 2005). Im humanen System konnten 18 verschiedene Proteine mit HDAC-Aktivität identifiziert werden (de Ruijter et al, 2003). Die verschiedenen HDACs sind hochgradig spezifisch in ihrer Funktion bei Entwicklungsprozessen und Krankheitsentwicklungen (Haberland et al, 2009). Bei einigen Vertretern konnte jedoch auch eine gewisse Redundanz in der Funktion nachgewiesen werden (Jurkin et al, 2011). Acetylierte Lysinreste werden von einer spezifischen Proteindomäne, der Bromodomäne, wahrgenommen (Mujtaba et al, 2007; Zeng & Zhou, 2002). Bromodomänen konnten in einer Vielzahl von Chromatin-assoziierten Proteinen, inklusive Lysin-Acetyltransferasen und Chromatin-Remodeling-Proteinen nachgewiesen werden (Muller et al, 2011).

### 1.3.2 Histon-Methylierung

Histon-Methylierung tritt sowohl an Arginin (R)- als auch an Lysin (K)- Resten an den N-terminalen Enden von Histon H3 und H4 auf (Smith & Denu, 2009). Dabei werden die Position der modifizierten R- und K- Reste entsprechend der Aminosäureabfolge vom N-Terminus aus durchnummeriert. Die Lysin- Mono-, Di- und Trimethylierung erfolgt unter Verwendung des Methylgruppendonors S-Adenosyl-Methionin und wird von Histon-Lysin-N-Methyltransferasen katalysiert. Die Methylierung von Lysin-Resten führt nicht zu einer Beeinflussung der positiven Ladung des Lysins. Der Effekt der Methylierung scheint daher weniger direkt die Nukleosomen-Dynamik zu beeinflussen als die Acetylierung (Zentner & Henikoff, 2013).

Arginin-Methylierung wird ebenfalls unter Verwendung von S-Adenosyl-Methionin durch Protein Arginin Methyltransferasen (PRMTs) katalysiert. In Säugern konnten neun unterschiedliche PRMTs (PRMT1-PRMT9) nachgewiesen werden, die alle die Bildung von Monomethylarginin katalysieren. Typ I PRMTs katalysieren darüber hinaus die Bildung von asymmetrischem N,N'-Dimethylarginin. Die Bildung von symmetrischem N,N'-Dimethylarginin wird von Typ II PRMTs katalysiert (Smith & Denu, 2009).

Histon-Arginin- und -Lysin-Methylierung kann abhängig vom Modifikationsort und der Anzahl der Methylgruppen einen aktivierenden oder einen reprimierenden Effekt haben (Martin & Zhang, 2005; Wysocka et al, 2006).

Histon-Methylierungen werden durch verschiedene Histon-Lysin-Demethylasen entfernt, wobei verschiedene Histonmodifikationen mit spezifischen Histondemethylasen interagieren. Die größte Klasse an Histon-Demethylasen enthält als verbindendes Element eine katalytische Domäne vom Jumonji - Typ C (JmjC) (Klose et al, 2006; Tsukada et al, 2006). Die JmjC-Demethylasen katalysieren die Demethylierung von mono-, di- und trimethylierten Lysinen (Hojfeldt et al, 2013). JmjC-Proteine können darüber hinaus auch Argininreste demethylieren (Chang et al, 2007).

Chromatin-assoziierte Faktoren binden methylierte Histon-Lysine durch verschiedene Proteindomänen, darunter fallen Tudor-, Chromo-, PWWP-, MBT- und PHD-Domänen (Taverna et al, 2007; Zentner & Henikoff, 2013): So wird zum Beispiel durch die repressiven Histon-Modifikationen H3K9- und H3K27-Trimethylierung (H3K9me3 und H3K27me3), die mit der Heterochromatin Bildung und der Polycomb-Aktivität verbunden sind, die Bindungsaffinität der Chromodomäne von HP1- und Polycomb-Proteinen erhöht (Bannister et al, 2001; Margueron et al, 2009).

Spezielle *cis*-regulatorische Genom-Elemente sind durch das Auftreten bestimmter Histon-Methylierungen gekennzeichnet. Histon-Lysin-Methylierungen an H3K4 und H3K36 sind mit transkriptioneller Aktivierung verbunden, Lysin-Methylierungen an H3K9 und H3K27 wiederum mit transkriptioneller Repression (Zentner & Henikoff, 2013).

Ein Faktor, der eine wichtige Kontrollfunktion bei der Aufrechterhaltung und Differenzierung von Stammzellen hat, ist die Lysin-Methyltransferase EZH2 (Enhancer of Zeste 2), welche die Trimethylierung von H3K27 katalysiert (Chen et al, 2012). EZH2 ist ein Mitglied des *Polycomb repressive Complex 2* (PRC2), einem Proteinkomplex der Komponenten mit Lysinmethyltransferase-Aktivitäten und H3K27me3-Bindedomänen enthält (Cao et al, 2002; Kirmizis et al, 2004). H3K27me3 ist üblicherweise an der Ausschaltung von Genen beteiligt, die bei der Entwicklung und Stammzell-Differenzierung (Hox Gen-Cluster) beteiligt sind (Vieux-Rochas et al, 2015).

Die Trimethylierung des Lysin36 von Histon H3 (H3K36me3) wird im humanen System im Zuge der Transkription durch die Methyltransferase SETD2 katalysiert. H3K36me3 ist mit der Repression von intragenischer Transkriptionsinitiation (kryptische Transkription) verbunden (Lickwar et al, 2009). Dies wiederum beruht auf einer H3K36me3-abhängigen Reduktion des Nukleosomen *turn overs* (Zentner & Henikoff, 2013).

Promotoren sind generell durch ein hohes Maß an trimethylierten Lysin 4 von Histon H3 (H3K4me3) gekennzeichnet, unabhängig von ihrem transkriptionellen Zustand. Die Methylierung von H3K4 wird durch die Lysin-Methyltransferase *Mixed Lineage Leukemia* (MLL) katalysiert. MLL wirkt als Aktivator von Genen, die mit Entwicklung und Differenzierung assoziiert sind und wirkt damit als Gegenspieler des repressiven Polycomb Complexes (Milne et al, 2002). Enhancer-Sequenzen neigen dazu mit H3K4me1 alleine oder in Kombination mit H3K27ac oder H3K27me3 modifiziert zu sein. Die Kombination von Enhancer Modifikationen hängt von der transkriptionellen Aktivität der regulierten Gene ab (Rada-Iglesias et al, 2011; Zentner et al, 2011).

### 1.3.3 weitere Histonmodifikationen

Mittels Phosphorylierungen wird der Großteil der Signale in der Zelle übertragen. Bei der Protein-Phosphorylierung wird eine negative Ladung auf einen modifizierten Aminosäurerest übertragen. Im Histon-Kontext kann dies einen vergleichbaren Effekt auf die Nukleosomen Dynamik haben wie die Acetylierung (Banerjee & Chakravarti, 2011). Histon-Phosphorylierungen verändern auch die Affinität von Chromatin-Bindeproteinen für ihre Zielsubstrate. Die Phosphorylierung von H3S10 führt zu einer Reduktion der Affinität von Proteinen, die H3K9me3 binden, wie z.B. HP1 (Fischle et al, 2005).

Mono- bzw. Poly-ADP-Ribosylierungen treten bei allen Kernhistonen und bei Histon H1 auf und ist mit einer Vielzahl biologischer Prozesse verbunden (z.B. Hitzeschock, DNA-Reparatur) auf (Fischle et al, 2005). Die negative Ladung, die durch die ADP Ribosylierung auf den modifizierten Aminosäurerest übertragen wird, erhöht die Abstoßung zwischen Histonen und DNA und führt zu einer Relaxierung des Chromatins (Messner & Hottiger, 2011).

Die Glykosylierung der Histone H2A, H2B und H4 durch  $\beta$ -N-Acetylglucosamin (OGlcNAc) ist mit transkriptioneller Repression verbunden (Sakabe et al, 2010; Zhang et al, 2011).

Bei der Ubiquitinierung und SUMOylierung werden Peptide von bis zu 100 Aminosäuren an einen einzelnen Lysinrest ligiert. Die Ubiquitinierung von Lysinen hat vielfältige Effekte auf die Nukleosomen Dynamik (Chandrasekharan et al, 2009; Fierz et al, 2011; Zhang, 2003), Quelle). Die SUMOylierung wiederum ist mit transkriptioneller Repression verbunden (Shiio & Eisenman, 2003).

Zusätzlich zu Acetylierungen treten noch andere Coenzym A-abhängige Acylierungen von Histon Lysinen auf: Darunter fallen Crotonylierung, Formylierung, Succinylierung, Malonylierung, Propionylierung und Butyrylierung (Olsen, 2012) (Tan et al, 2011). Ähnlich wie Acetylierungen führen diese Histon-Modifikationen zu einer Neutralisierung der positiven Ladungen des Lysins und zur Schwächung der Histon-DNA Kontakte.

#### 1.4 DNA-Methylierung

DNA-Methylierung ist eine epigenetische Modifikation des Genoms, die eine essentielle Bedeutung für die Regulation einer Vielzahl zellulärer Prozesse hat. Darunter fallen die Embryonalentwicklung (Latham et al, 2008; Reik, 2007), zelluläre Differenzierungsprozesse (Hemberger et al, 2009), transkriptionsassoziierte Prozesse (Bell & Felsenfeld, 2000), Mechanismen der X-Inaktivierung (Barakat & Gribnau, 2012; Panning & Jaenisch, 1998) und des genomischen Imprintings (Kelsey & Feil, 2013; Li et al, 1993). Darüber hinaus hat die DNA-Methylierung auch einen großen Einfluss auf die Chromosomenstabilität (Bestor & Bourc'his, 2004; Walsh et al, 1998). Aufgrund der Bedeutung der DNA-Methylierung konnte zwangsläufig eine große Zahl von humanen Erkrankungen festgestellt werden, die mit aberranter DNA-Methylierung assoziiert sind (Robertson, 2005).

Die DNA-Methylierung ist eine der am besten untersuchten epigenetischen Modifikationen (Virani et al, 2012) und tritt in Säugerzellen am 5. Kohlenstoffatom des Cytosinrings (5-Methyl-Cytosin) bei Cytosin-Nukleotiden in einem CpG-Dinukleotid Kontext auf (Bird, 2002; Jeltsch, 2002). Bei embryonalen Stammzellen konnte darüber hinaus auch eine Methylierung von Cytosinen außerhalb von CpG-Dinukleotiden festgestellt werden (Lister et al, 2013; Lister et al, 2009).

In Säugern sind nahezu 70-80% der genomweit auftretenden CpG-Dinukleotide in einer Zelltyp-spezifischen Art und Weise methyliert (Law & Jacobsen, 2010). CpG- Dinukleotide sind jedoch nicht homogen über das Genom verteilt, sondern konzentrieren sich in repetitiven Sequenzen (wie *tandem-* und *interspersed repeats*), in distalen Gen-regulatorischen Regionen (wie *Enhancern*) und CpG-Inseln (Bird, 2002; Ehrlich, 2009; Ehrlich et al, 1982).

CpG-Inseln sind regulatorisch wirksame Bereiche die meist in den Promotorbereichen von eukaryotischen Gene auftreten (Deaton & Bird, 2011). Nach der Definition von Takai und Jones sind CpG-Inseln DNA-Sequenzen von mehr als 500bp Länge, die einen GC-Gehalt von mehr als 55% aufweisen und ein Verhältnis der Anzahl von gemessenen zu erwarteten CpG-Dinukleotiden von  $> 0,65$  aufweisen.

CpGs in CpG-armen Bereichen liegen ebenfalls meist methyliert vor (Bird, 1986). CpG-Inseln, vor allem jene, die mit Promotoren assoziiert sind, sind normalerweise unmethyliert. Es konnte jedoch

eine hohe Anzahl von CpG-Inseln identifiziert werden, die gewebsspezifisch oder krebsspezifisch hypermethyliert vorliegen (Bird, 1986; Song et al, 2005a; Stadler et al, 2011; Virani et al, 2012).

DNA-Methylierungen sind stabile epigenetische Modifikationen, die über Generationen von Zellzyklen aufrechterhalten werden können, jedoch auch dynamischen Veränderungen unterliegen können (Auclair & Weber, 2012; Schubeler et al, 2000). Die palindromischen CpG-Motive sind entweder auf beiden Strängen methyliert oder vollständig unmethyliert. Bei der semikonservativen DNA Replikation entsteht ein DNA-Doppelstrang mit hemimethylierten CpGs, bestehend aus einem neu-synthetisierten Strang (Tochterstrang) ohne DNA-Methylierung und einem parentalen Strang mit einem spezifischen DNA-Methylierungsmuster. Die hemimethylierten CpGs werden anschließend von einer Methyltransferase nach dem Vorbild des Methylierungsmusters des paternalen Strangs auf den unmethylierten Tochterstrang übertragen (Holliday & Pugh, 1975; Riggs, 1975).

Während der Embryonalentwicklung treten in Säugerzellen massive Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters auf (Seisenberger et al, 2013): Nach der Befruchtung der Eizelle kommt es zu einer aktiven Demethylierung des parentalen Genoms (Oswald et al, 2000; Shen et al, 2014). Das maternale Genom wird über mehrere Zellteilungen hinweg bis zum frühen Blastocystenstadium ebenfalls demethyliert (Rougier et al, 1998; Wang et al, 2014). Zum Zeitpunkt der Implantation kommt es zu einer genomweiten *de novo* Methylierung, die von der Differenzierung von pluripotenten Stammzellen und der Bildung spezifischer Zelltypen begleitet wird (Chen et al, 2003; Pawlak & Jaenisch, 2011). Die DNA-Methylierungsmuster von differenzierten somatischen Zellen werden während der folgenden Zellteilungen innerhalb des Embryos bzw. des adulten Organismus aufrechterhalten (Chen & Riggs, 2011). Der Differenzierungsprozess einiger Zelltypen ist jedoch auch mit spezifischen Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters verbunden (Bock et al, 2012). Primordiale Keimzellen durchlaufen bei der Differenzierung in Oozyten bzw. Spermatozyten eine zweite Welle aus Demethylierung und *de novo* DNA-Methylierung (Hajkova et al, 2002; Morgan et al, 2005).

Die Methylierung von Cytosinen wird von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert. DNA-Methyltransferasen übertragen Methylgruppen von S-Adenosyl-L-Methionin auf die Cytosinbase von CpG-Dinukleotiden. Sie tragen alle an ihrem C-Terminus eine katalytische Domäne und an ihrem N-Terminus eine regulatorische Domäne. Die Aminosäuremotive der katalytischen Domänen sind zwischen eukaryotischen und prokaryotischen C5-Cytosin-Methyltransferasen hochkonserviert (Cheng, 1995). Die Familie der DNA-Methyltransferasen besteht in Säugerzellen aus 4 Mitgliedern: DNMT1-, DNMT3A- und DNMT3B-Enzyme und dem katalytisch inaktiven DNMT3L-Protein. DNMT3A und DNMT3B sind *de novo* Methyltransferasen die notwendig für die Ausbildung von DNA-Methylierungsmustern während der Gametogenese und der Embryogenese sind (Kaneda et al, 2004; Okano et al, 1999). DNMT3L ist ein Faktor, welcher die *de novo* Methylierungsaktivität von DNMT3A und DNMT3B stimuliert und die katalytische Aktivität von DNMT3A steigert (Chedin et al, 2002; Chen et al, 2005; Gowher et al, 2005; Jia et al, 2007; Jurkowska et al, 2011; Karetta et al, 2006). Ein Verlust von DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, aber auch von DNMT3L (entweder alleine oder in verschiedenen Kombinationen) führt zur Entstehung abnormaler Phänotypen (Entwicklungsstörungen, Sterilität) oder zum Tod im Embryonalstadium (Li et al, 1992; Okano et al, 1999). Hypomorphe *DNMT3B* Keimbahn-Mutationen sind mit dem Auftreten des *Immunodeficiency, Centromere instability, Facial Anomalies* (ICF)- Syndroms verbunden. Dabei handelt es sich um eine seltene, rezessiv auftretende Erkrankung, die mit Immundefekten, Instabilität des perizentrosomischen Heterochromatins, Gesichtsfehlbildungen und geistiger Retardierung verbunden ist (Jin et al, 2008).

DNMT1 ist eine Methyltransferase, welche präferentiell hemimethylierte CpGs bindet, die im Anschluss an die DNA Replikation entstehen, und die Aufrechterhaltung des parental

Methylierungsmusters katalysiert (Bashtrykov et al, 2012; Goyal et al, 2006; Pradhan et al, 1999). Die DNMT3-Enzyme scheinen darüber hinaus ebenfalls eine Rolle bei der Aufrechterhaltung von DNA-Methylierungsmustern an repetitiven Elementen zu besitzen (Jones & Liang, 2009; Liang et al, 2002). Die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierungsmuster hat eine Fehlerrate von 5% pro CpG und pro Zellteilung (Vilkaitis et al, 2005). Dies bietet der Zelle ein gewisses Potential für kleine, aber dennoch wichtige Änderungen des DNA-Methylierungsmusters. DNMT3A und DNMT3B helfen dabei DNMT1 die Balance bei der replikationsabhängigen Aufrechterhaltung der DNA-Methylierungsmuster zu halten (Rhee et al, 2002).

DNA-Methylierung kann die Gen-Transkription über verschiedene Mechanismen reprimieren. Zum einen kann die Methylgruppe der 5-Methyl-Cytosinbasen, welche in der großen Furche der DNA Doppelhelix liegt, direkt mit der sequenzspezifischen Bindung von Transkriptionsfaktoren interferieren und dadurch die Transkriptionsinitiation inhibieren (Bell & Felsenfeld, 2000; Prendergast & Ziff, 1991; Virani et al, 2012). Zum anderen können Methyl-CpG-Binde-Proteine (MeCP) an methylierte CpG-Inseln rekrutiert werden. MeCPs wiederum können die Bindung von Transkriptionsfaktoren behindern. Sie können aber auch mit repressiven Chromatin-Remodeling-Faktoren interagieren. Dies führt zur Induktion repressiver Chromatin-Strukturen und damit zur Inhibition der Transkription (Robertson, 2005; Virani et al, 2012).

Die Demethylierung kann über aktive oder passive Mechanismen erfolgen. Die passive Demethylierung erfolgt im Zuge der Replikation durch Inhibition der Remethylierung von hemimethylierten, neu-synthetisierten DNA-Strängen. Bei diesem Mechanismus kommt es zu einer zellteilungsabhängigen Verdünnung der DNA-Methylierung innerhalb einer Zellpopulation (Kohli & Zhang, 2013). Die aktive Demethylierung erfolgt durch die enzymatische Aktivität spezifischer Demethylasen, die zu einer replikationsunabhängigen Entfernung von 5-Methyl-Cytosinbasen führt (Dalton & Bellacosa, 2012; Kinney & Pradhan, 2013). Die spontane (Cooper et al, 2010) oder enzymatische (Teperek-Tkacz et al, 2011) Deaminierung von 5-Methyl-Cytosinbasen führt zur Bildung von Thyminbasen und zur Entstehung einer *mismatch*-Situation (Thymin-Guanin-Basenpaarung). Bei einem anschließenden *base excision repair* (BER) Prozess kommt es zur Entfernung der Thyminbase durch eine Thymin-DNA-Glykosylase (TDG). Daraufhin erfolgt wiederum in einem mehrstufigen Prozess die Inkorporation eines unmodifizierten Cytosin-Desoxynukleotids (Wu & Zhang, 2010).

Die Oxidation von 5-Methyl-Cytosinbasen durch *Ten-Eleven Translocation* (TET) Enzyme führt zur Entstehung von 5-Hydroxymethylcytosin (Tahiliani et al, 2009). 5-Hydroxymethylcytosin kann durch die TET-Enzyme (TET1, TET2, TET3) wiederum zu 5-Formylcytosin und 5-Carboxylcytosin oxidiert werden (Cadet & Wagner, 2014) oder durch andere Enzyme zu 5-Hydroxymethyluracil deaminiert werden (Boorstein et al, 2001). Alle modifizierten Cytosin-Formen können durch DNA-Glykosylasen entfernt werden und über einen anschließenden BER Prozess wieder in Cytosin überführt werden (Cortellino et al, 2011).

In normalen Zellen tritt DNA-Methylierung in repetitiven Regionen, wie Satelliten DNA und transponierbaren Elementen (LINES, SINES) auf (Yoder et al, 1997). Die Ausschaltung der Genexpression der großen Menge an repetitiven Sequenzen dient zur Aufrechterhaltung der Genomstabilität, da diese sonst durch Rekombinationsereignisse eine transkriptionelle Deregulation von nahe gelegenen Genen auslösen könnten. Embryonale Stammzellen ohne DNMT-Expression sind überlebensfähig, sie sterben jedoch wenn die Differenzierung induziert wird (Panning & Jaenisch, 1998). In Mäusen konnte gezeigt werden, dass Dnmt1 und Dnmt3b essentiell für die embryonale Entwicklung sind und dass Mäuse denen Dnmt3a fehlt innerhalb weniger Wochen nach der Geburt sterben (Li et al, 1992; Okano et al, 1999). Ein Verlust der normalen DNA-Methylierungsmuster in somatischen Zellen führt zu einem Verlust der Wachstumskontrolle (Robertson, 2005).

## 1.5 Assoziation zwischen Histonmodifikationen und DNA-Methylierung

In Säugerzellen gibt es eine enge Verbindung zwischen DNA- und Histon H3K9-Methylierung (Meissner et al, 2008; Mikkelsen et al, 2007). H3K9 Methylierung wird durch eines der fünf Mitglieder der SUV39-Protein Familie (*SUV39H1*, *SUV39H2*, *G9A*, *GLP* und *SETDB1*) katalysiert (Rea et al, 2000; Schultz et al, 2002; Tachibana et al, 2001). Einige der Histon-Methyltransferasen (*SUV39H1*, *SUV39H2*, *G9A*, *GLP*) binden über spezielle Proteindomänen an die von ihnen selbst gebildeten Histonmodifikationen, wodurch ein positiver Rückkopplungsmechanismus in Gang gesetzt wird (Collins et al, 2008; Firestein et al, 2000; Rea et al, 2000).

Die G9A- bzw. GLP- katalysierte Mono- und Dimethylierung von H3K9 ist primär mit einer Repression der Genaktivität in euchromatischen Bereichen verbunden (Shinkai & Tachibana, 2011). Während der Differenzierung kommt es in murinen ES-Zellen zu einem G9a- bzw. GLP-abhängigen Anstieg der *de novo* DNA-Methylierung von Promotorbereichen. Mutationen im *G9a*- bzw. *GLP*-Gen führen zu einem Verlust dieser *de novo* DNA-Methylierung (Epsztejn-Litman et al, 2008). Ein *knockout* des *G9a* Gens in murinen embryonalen Stammzellen wiederum, war mit einer DNA Hypomethylierung an spezifischen Loci über das gesamte Genom verteilt, verbunden (Dong et al, 2008; Ikegami et al, 2007). G9a und GLP können direkt mit DNMT3A und DNMT3B interagieren (Epsztejn-Litman et al, 2008). Alternativ kann die Interaktion auch indirekt über das Chromodomänen-Protein MPP8 erfolgen (Chang et al, 2011; Kokura et al, 2010).

Die Trimethylierung von H3K9 in zentromerischem und perizentromerischem Heterochromatin wird von SUV39H1 und SUV39H2 katalysiert (Martin & Zhang, 2005; Peters et al, 2003; Shinkai & Tachibana, 2011). Der Verlust von murinem *Suv39H1* und *Suv39H2* zieht eine Reduktion der DNA-Methylierung in einem speziellen Typ von repetitiven Sequenzen (*major satellite repeats*) nach sich (Lehnertz et al, 2003). In diesen Sequenzbereichen konnte eine direkte Interaktion von SUV39H1 oder SUV39H2 mit DNMT3A festgestellt werden (Arand et al, 2012; Fuks et al, 2003; Lehnertz et al, 2003).

Die SETDB1-katalysierte Trimethylierung von H3K9 tritt im inaktivierten X-Chromosom auf (Karimi et al, 2011; Minkovsky et al, 2014). Beim *knockout* des murinen *Setdb1* Gens konnte eine reduzierte DNA-Methylierung an Genen, die mit dem Imprinting verbunden waren, festgestellt werden (Karimi et al, 2011; Leung et al, 2014). In einem reziproken Versuch konnte in DNMT-defizienten murinen ES-Zellen keine Reduktion der H3K9-Methylierung beobachtet werden (Matsui et al, 2010; Tsumura et al, 2006). Im Gegensatz dazu konnte jedoch in humanen Krebszellen eine Abhängigkeit der H3K9-Methylierung von der DNA-Methylierung festgestellt werden (Bachman et al, 2003; Espada et al, 2004; Nguyen et al, 2002).

Die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung erfolgt an den Replikationsgabeln direkt im Abschluss an die DNA Synthese. DNMT1 ist das Enzym, welches diese Methylierungsreaktion katalysiert und durch *Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)* und andere Faktoren an die Replikationsgabel rekrutiert wird (Esteve et al, 2006). Durch die direkte Interaktion von DNMT1 mit SUV39H1, SUV39H2 oder G9a können die Histon-Methyltransferasen an ihre Zielorte zur Heterochromatisierung von repetitiven Sequenzen gebracht werden (Esteve et al, 2006). DNMT1, DNMT3A und DNMT3B interagieren mit der EZH2 Untereinheit des repressiven PRC2-Komplexes. Die H3K27-Methyltransferase EZH2 wiederum rekrutiert die DNMTs an bestimmte EZH2-Zielsequenzen und kontrolliert damit direkt die DNA-Methylierung in diesen Bereichen (Vire et al, 2006).

Die repressiv wirkenden Multiproteinkomplexe Sin3, Nucleosome-Remodeling HDAC (NuRD) und CoREST enthalten HDAC-Komponenten, die eine Deacetylierung des Chromatins katalysieren (Delcuve et al, 2012). NuRD- und Sin3- Komplexe enthalten darüber hinaus auch Methyl-CpG-

Bindeproteine (MBD2, MeCP2), welche die Komplexe an methylierte DNA rekrutieren. Dadurch kommt es zu einer Kooperation zwischen Histon-Deacetylierung und DNA-Methylierung bei der epigenetischen Geninaktivierung (Delcuve et al, 2012). Die Bindung von HDACs an hypermethyliertes Chromatin kann durch Interaktion mit Methyl-CpG-Bindeproteinen erfolgen (Baylin, 2005), sie kann aber auch durch eine direkte Interaktion zwischen DNMT1 und HDACs vermittelt werden (Fuks et al, 2000).

CpG-Inseln an aktiven Promotoren werden durch die Bindung von Transkriptionsfaktoren und die Aktivität von H3K4-Methyltransferasen vor *de novo* Methylierung geschützt. DNMT3-Enzyme enthalten eine ADD-Domäne, welche mit unmethyliertem H3K4 interagieren kann (Smith & Meissner, 2013). Eine Methylierung von H3K4 inhibiert die Bindung von *de novo* DNA-Methyltransferasen (Edwards et al, 2010; Eustermann et al, 2011; Iwase et al, 2011; Karimi et al, 2011; Ooi et al, 2007; Otani et al, 2009).

Die H3K36 Trimethylierung wird im Zuge der Transkription etabliert (Bell et al, 2007). DNMT3A und DNMT3B wiederum besitzen eine PWWP-Domäne, welche H3K36me3 wahrnimmt (Morselli et al, 2015). Auf diese Weise kommt es zu einer Assoziation aus RNA-Polymerase II und DNMT3B und einer Verbindung aus Transkription und DNA-Methylierung in Genkörperbereichen (Jin et al, 2012).

*Ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domain 1- (UHRF1/ ICBP90 (Mensch))* ist ein Schlüsselfaktor für die Regulation der Aktivität von DNMT1. UHRF1 ist ein multimodulares Protein mit fünf verschiedenen Interaktionsdomänen (PHD (*Plant Homeodomain*), Tandem tudor domain, SRA (*SET- and RING-associated*), RING (*real interesting new gene*) und UBL (*ubiquitin-like*)). Das Protein bindet in Abhängigkeit von Phosphatidylinositol-5-Phosphat an H3K9me3 (Arita et al, 2012; Cheng et al, 2013; Gelato et al, 2014; Hu et al, 2011; Nady et al, 2011; Rajakumara et al, 2011; Wang et al, 2011). Darüber hinaus bindet UHRF1 über die SRA- Domäne an hemimethylierte CpGs in neusynthetisierter DNA (Arita et al, 2008; Avvakumov et al, 2008; Bostick et al, 2007; Hashimoto et al, 2008; Rottach et al, 2010; Sharif et al, 2007). DNMT1 wird durch direkte Interaktion mit UHRF1 und PCNA an die Replikationsgabeln rekrutiert, um dort die Methylierung von hemimethylierten CpGs zu katalysieren (Bashtrykov et al, 2014). Der *knockout* von *Uhrf1* in der Maus führte zu einer vergleichbar starken Reduktion der DNA-Methylierung wie der *knockout* von *Dnmt1* (Bostick et al, 2007; Karagianni et al, 2008; Sharif et al, 2007).

## 1.6 Epigenetik und Krebs

### 1.6.1 Veränderte Histonmodifikationen in Tumoren

Krebserkrankungen sind das Resultat aus einer sukzessiven Akkumulation von genetischen und epigenetischen Veränderungen (Virani et al, 2012).

Eine Deregulation von Lysin-Methyltransferasen tritt in vielen verschiedenen Krebsarten auf (Schneider et al, 2002). In einer Vielzahl von Krebstypen (Brustkrebs, Lymphomen, Glioblastomen) konnte eine Überexpression von *EZH2* festgestellt werden (Kleer et al, 2003; Suva et al, 2009; van Kemenade et al, 2001). Eine *EZH2* Überexpression war in Prostatakrebs mit dem Übergang von einer gutartigen zu einer bösartigen Erkrankung verbunden (Varambally et al, 2002). In Krebszellen ließ sich eine H3K27me3-induzierte Repression der Genexpression feststellen, die unabhängig von einer Promotor Hypermethylierung erfolgte (Kondo et al, 2008). Eine Deregulation von anderen Mitgliedern des PRC2-Komplexes konnte ebenfalls in einer Vielzahl von Karzinomen beschrieben werden (Liu et al, 2015; Martin-Perez et al, 2010).

Das *Mixed Lineage Leukemia (MLL)* Gen kodiert für eine Lysin Methyltransferase und katalysiert die Methylierung von H3K4. MLL agiert als Gegenspieler von EZH2 bei der Aktivierung von Genen die in der Entwicklung und Differenzierung beteiligt sind (Milne et al, 2002). Genfusionen und Genamplifikationen von *MLL* konnten als charakteristisches Merkmal von Leukämien ausgemacht werden (Slany, 2009). Bei der Protein Arginin Methyltransferase CARM1 konnte ebenfalls eine Überexpression in humanen Prostatakarzinomen nachgewiesen werden (Hong et al, 2004; Majumder et al, 2006).

JMJD2C ist eine Lysin-Demethylase, welche die Entfernung von Methylgruppen von H3K9 katalysiert. Die H3K9-Methylierung ist mit der Genrepression verbunden. Eine Amplifikation von JMJD2C konnte in einer Vielzahl von Krebserkrankungen (z.B. Brust- und Ösophagus-Krebs) festgestellt werden (Liu et al, 2009; Yang et al, 2000). Eine Überexpression der *Lysin-spezifischen Demethylase 1 (LSD1)*, die H3K9 und H3K4 demethyliert, konnte in Estrogenrezeptor (ER)-negativen Brusttumoren, in mesenchymalen Tumoren und Blasenkrebs festgestellt werden (Hayami et al, 2011; Lim et al, 2010; Schildhaus et al, 2011).

Es gibt 3 verschiedene Familien von Histon-Acetyltransferasen (HATs): Gcn5-, die p300/CBP- und MYST-Familie (Lee & Workman, 2007). Von jeder HAT-Familie konnten Mitglieder identifiziert werden, die eine Rolle bei der Karzinogenese spielen. Dies kann sowohl zu einer deregulierten Aktivierung als auch zu einer Repression von Zielgenen führen. Das Auftreten von Leukämien konnte mit einer Deregulation von Histon-Acetyltransferase Aktivitäten in Verbindung gebracht werden (Van Beekum & Kalkhoven, 2007). In Brusttumoren konnte eine Verstärkung der Effekte, die sich aus dem deregulierten WNT-Signalweg ergeben durch die Histon-Acetyltransferase GCN5 nachgewiesen werden (Chen et al, 2010). Der Verlust der Heterozygotie der Histon-Acetyltransferasen p300 oder CBP konnte in einer Vielzahl von Krebszelllinien festgestellt werden (Tillinghast et al, 2003). Aufgrund der wichtigen Rollen von Mitgliedern der MYST Familie von HATs bei der Hämatopoese konnte eine Verbindung zwischen einer Deregulation dieser Gene und der Entstehung von akuter myeloider Leukämie hergestellt werden (Borrow et al, 1996; Chaffanet et al, 2000; Yang & Ullah, 2007).

Die Histon-Deacetylierung konnte als frühes Ereignis in der Karzinogenese, unter anderem von primären Lymphomen (Guo & Zhang, 2012) und kolorektalen Adenomen (Stypula-Cyrus et al, 2013), identifiziert werden. Vor allem der genomweite Verlust von Monoacetylierungen des Histon H4K16 konnte als charakteristisches Merkmal von humanen Krebserkrankungen identifiziert werden (Fraga et al, 2005). Die Hypoacetylierung verschiedener Krebszellen im Vergleich zu normalen Zellen konnte mit einer Überexpression von Histon-Deacetylasen (HDACs) in Brust, Prostata) und Kolorektalkarzinomen in Verbindung gebracht werden (Krusche et al, 2005; Ropero & Esteller, 2007; Weichert et al, 2008). Eine aberrante Rekrutierung von Klasse I und II HDACs ist mit dem Auftreten von Leukämien und Lymphomen verbunden (Virani et al, 2012). Das häufige Auftreten von HDAC-Überexpressionen hat diese zu vielversprechenden Zielen für die Entwicklung von Chemotherapeutika zur Behandlung von Krebserkrankungen gemacht (Marks & Breslow, 2007).

### **1.6.2 Verbindung von DNA-Methylierung und Krebs**

Es gibt eine große Zahl von humanen Krankheiten, die mit der Entstehung aberranter DNA-Methylierungsmuster in Verbindung stehen. Darunter fallen Krebserkrankungen, psychische Erkrankungen und Entwicklungsstörungen (Bergman & Cedar, 2013; Grayson & Guidotti, 2013; Jones & Baylin, 2007; Portela & Esteller, 2010; Yin et al, 2012). Mittels verschiedener pharmakologischer Ansätze wurde versucht diese epigenetische Abnormalitäten wieder umzukehren (Brown & Strathdee, 2002). DNA-Methylierung ist in Krebserkrankungen hochgradig dereguliert. Die

aberranten Methylierungsmuster äußern sich in einer Hypomethylierung von distalen regulatorischen Regionen (Aran et al, 2013) und repetitiven Elementen (Ehrlich, 2002) und einer Hypermethylierung von CpG-Inseln (Esteller, 2002). Tumore zeichnen sich durch spezifische CpG-Methylierungsprofile aus, die sich in unterschiedlichen Tumortransformationswegen äußern (Sartor et al, 2011; Shen et al, 2007). Die Ausbildung eines spezifischen Hypermethylommusters erlaubt darüber hinaus die Identifizierung von Biomarkern, die charakteristisch für das Auftreten einer bestimmten Tumorentität sind. Eine Kombination von Biomarkern gestattet eine verbesserte Diagnose, Prognose und kann helfen die Erfolgsaussichten einer Chemotherapie zu bewerten (Grawenda & O'Neill, 2015).

Der Verlust von DNA-Methylierung war eine der ersten epigenetischen Veränderungen, die in humanen Karzinomen beschrieben wurde. Es konnte gezeigt werden, dass Tumorgewebe einen niedrigeren Gehalt an methylierten Cytosinen aufweisen als normale Gewebe (Feinberg & Vogelstein, 1983). Der Gesamtgehalt an 5-Methyl-Cytosin ist invers mit dem Tumorfortschritt assoziiert (Gama-Sosa et al, 1983). Darüber hinaus konnte nachgewiesen werden, dass nahezu jeder Krebstyp ein Defizit an 5-Methyl-Cytosin im Vergleich zu normalen Geweben aufweist (Ehrlich, 2009). Die hypomethylierten Bereiche in intergenischen, repetitiven Regionen sind mit genomischer Instabilität und einer Förderung des Tumorfortschritts verbunden (Eden et al, 2003; Virani et al, 2012). Transponierbare Elemente (z.B. LINE1) können ebenfalls das Ziel krebsspezifischer Hypomethylierung sein (Miousse & Koturbash, 2015).

Gleichzeitig zu den Hypomethylierungen treten genspezifische Hypermethylierungen auf. Aberrante Hypermethylierungen in Krebszellen erfolgen typischerweise in Promotor-assoziierten CpG-Inseln, welche in normalen somatischen Zellen unmethyliert vorliegen (Song et al, 2005a; Strichman-Almashanu et al, 2002). Die Hypermethylierungen werden meist von Histon-Hypoacetylierungen begleitet und führen zur Ausbildung von repressiven Chromatinstrukturen (Eden et al, 1998). Eine krebsspezifische Promotor-Hypermethylierung konnte bei verschiedenen Genen nachgewiesen werden, die in einer Vielzahl unterschiedlicher Prozesse involviert sind. Darunter fallen Zellzyklus-Regulation, Tumorzellinvasion, DNA-Reparatur, Chromatin-*Remodeling*, Signaltransduktion, Transkription und Apoptose. Die Inaktivierung dieser Gene wiederum ist mit einem Wachstumsvorteil, einer Erhöhung der genomischen Instabilität und einer Steigerung des Metastasierungspotentials verbunden (Robertson, 2005). Sowohl DNA-Hypomethylierungen, als auch DNA-Hypermethylierungen können gemeinsam in unterschiedlichen Regionen innerhalb einer Tumorzellpopulation vorkommen und zur Ausbildung verschiedener Krebs-Subtypen führen (Virani et al, 2012).

Als Auslöser von genspezifischen Hypermethylierungen wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen: Die Rekrutierung von DNA-Methyltransferasen zu bestimmten Genpromotoren könnte durch bestimmte, onkogenisch wirkende Transkriptionsfaktoren erfolgen (Di Croce et al, 2002; Okano et al, 1999). Eine andere Theorie geht davon aus, dass Hypermethylierungen im Zuge von tumorspezifischen Histonmodifikationsmustern auftreten (Hatzia Apostolou & Iliopoulos, 2011). Von verschiedenen DNA-Methyltransferasen konnte eine erhöhte Expression in Dickdarm-, Prostata-, Brust, Leberkrebs und in Leukämien nachgewiesen werden (el-Deiry et al, 1991; Girault et al, 2003a; Girault et al, 2003b; Melki et al, 1998; Oh et al, 2007; Patra et al, 2002). In humanen Fibroblasten konnte eine Überexpression von *DNMT1* mit einer prozessiven und zeitabhängigen Hypermethylierung verschiedener CpG-Inseln in Verbindung gebracht werden (Vertino et al, 1996).

Die Deletion des *DNMT1*-Gens in HCT116 Kolorektalkarzinomzellen war zwar mit einer Reduktion des Zellwachstums, aber nur mit einer leichten Abnahme der DNA-Methylierung um ca. 20% verbunden (Xie et al, 1999). Die Aufrechterhaltung der aberranten CpG-Inseln Methylierung deutet darauf hin,

dass andere DNA-Methyltransferasen den Ausfall der *DNMT1* Expression kompensieren. In Übereinstimmung damit konnte eine Überexpression von *DNMT3A* und *DNMT3B* in Tumoren nachgewiesen werden (Robertson et al, 1999; Xie et al, 1999).

Bei Genen, die in normalem Dickdarmgewebe eine Anreicherung von H3K27 Methylierung in ihren Promotorsequenzen zeigten, kam es zu einem signifikant erhöhten Auftreten von DNA Hypermethylierungen in Dickdarmkrebs, im Vergleich zu Genen wo keine H3K27 Methylierung in normalem Gewebe auftritt (Schlesinger et al, 2007).

Polycomb-Zielsequenzen in embryonalen Stammzellen zeigten darüber hinaus eine erhöhte Wahrscheinlichkeit krebsspezifisch hypermethyliert zu werden (McGarvey et al, 2008; Widschwendter et al, 2007). Viele Gene, die in Prostatakrebszelllinien hypermethyliert vorliegen, waren in normalen Prostatazellen von Polycomb-Proteinen gebunden. Das krebsspezifische Auftreten von DNA-Methylierung in diesen Bereichen war mit dem Verlust der Polycomb-Bindung assoziiert (Gal-Yam et al, 2008; Jin et al, 2009).

Die gezielte Deregulation von DNMTs durch Hepatitis B Virus X Protein konnte sowohl mit einer Förderung von spezifischer regionaler Hypermethylierung, als auch mit einer globalen Hypomethylierung in Verbindung gebracht werden (Park et al, 2007).

### 1.7 RASSF1A

Das *Ras association domain family 1A (RASSF1A)* Gen ist eines der am häufigsten epigenetisch inaktivierten Gene in humanen Krebserkrankungen (Gordon et al, 2012). *RASSF1A* kodiert für einen Tumorsuppressor, der auf Chromosom 3 an Position 3p21.23 lokalisiert ist (Richter et al, 2009). Die Region, in der *RASSF1A* lokalisiert liegt (3p21), ist ein *hotspot* für Deletionen von Chromosomenabschnitten (Brauch et al, 1987; Kok et al, 1987; Kovacs et al, 1988; Lothe et al, 1989; Naylor et al, 1987) und für „Verlust von Heterozygosität“-Ereignisse (Ali et al, 1989; Devilee et al, 1989; Yokota et al, 1987). In verschiedenen Lungen-, Brust-, Cervix-, und Ovarialkarzinomen konnte in 90% der analysierten Tumore eine Deletion der Region 3p21.3 festgestellt werden (Kashuba et al, 2009). In der Region 3p21.3 sind in einem Abschnitt von 120kb acht verschiedene Gene lokalisiert (*CACNA2D2*, *PL6/Placental protein 6*, *101F6*, *TUSC4/NPRL2*, *ZMYND10/BLU*, *RASSF1*, *TUSC2/FUS1* und *HYAL2*), darunter mehrere Tumorsuppressorgene (Hesson et al, 2007).

Das *RASSF1* Gen besteht aus acht alternativ gespleißten Exons, die zur Expression von acht verschiedenen Isoformen führen (*RASSF1-H*). Von diesen werden jedoch nur die Isoformen *RASSF1A* und *RASSF1C* ubiquitär in normalen Geweben exprimiert (Dammann et al, 2005a; Donninger et al, 2007; van der Weyden & Adams, 2007). Das *RASSF1A*-Protein besitzt, neben der charakteristischen Ras Assoziationsdomäne, drei verschiedene funktionell relevante Domänen, darunter eine Diacylglycerol-bindende C1 Domäne, eine ATM Konsensus Sequenz, und die Protein-Interaktionsdomäne SARAH (Gordon et al, 2012).

Die zellulären Funktionen des *RASSF1A*-Proteins sind vielfältig (Hesson et al, 2007). *RASSF1A* ist unter anderem an der Regulation der Apoptose über einen MST1-Kinase-abhängigen Weg (Praskova et al, 2004) und einen MOAP-1-abhängigen Weg (Khokhlatchev et al, 2002) beteiligt. Darüber hinaus hat das *RASSF1A*-Protein eine Funktion bei der Regulation der Zytoskelett-Dynamik und ist mit Microtubuli, Spindelapparat und Zentrosomen kolokalisiert (Dallol et al, 2004; Liu et al, 2003; Vos et al, 2004). Durch die Interaktion mit p120<sup>E4F</sup>, einem Protein, das mit pRb, p53 und p14<sup>ARF</sup> interagiert (Fajas et al, 2000; Sandy et al, 2000), kann *RASSF1A* den G1-S Phasen Übergang inhibieren (Rizos et al, 2003)

Die Reexpression von *RASSF1A* in Zellen mit hypermethyliertem *RASSF1A*-Promotor resultiert in einer Reduktion des Zellwachstums in Lungen-, Brust-, Nieren-, Prostatakarzinomzellen, Nasenrachenfibrom- und Gliomazellen (Burbée et al, 2001; Chow et al, 2004; Dammann et al, 2000; Dreijerink et al, 2001; Hesson et al, 2004; Kuzmin et al, 2002).

Die Überexpression von *RASSF1A* ist mit dramatischen Expressionsänderungen der verschiedensten Faktoren verbunden (Agathangelou et al, 2003; Chow et al, 2006), unter anderem der Expression von CyclinD (Shivakumar et al, 2002), aber auch von Genen die diverse Rollen bei der Transkription, der Zytoskelett-Organisation, der Angiogenese, der Signaltransduktion, der Zelladhäsion, der Zellmigration und der Apoptose haben (Hesson et al, 2007).

Die epigenetische Inaktivierung von *RASSF1A* ist stark mit der Inaktivierung dreier anderer Gene korreliert: *P16<sup>INK4a</sup>*, *Death Associated Protein Kinase* (DAPK) und Caspase-8 (Fischer et al, 2006; Jing et al, 2010; Schagdarsurengin et al, 2003; Yu et al, 2002). DAPK und Caspase-8 treten genau wie *RASSF1A* ebenfalls in proapoptotischen Signalwegen auf (Bialik & Kimchi, 2006; Kang et al, 2004; Pennarun et al, 2010).

*RASSF1A* konnte bei einer Vielzahl von soliden Tumoren als prognostischer Marker für eine schlechte Überlebensprognose identifiziert werden. Anhand der *RASSF1A* Expression können Prognosen über den Erfolg bestimmter antitumorale Behandlungen getroffen werden (Hesson et al, 2007). Darüber hinaus ist das *RASSF1A*-Protein eine Komponente von mehreren krebsspezifisch deregulierten Signalwegen (Ras/PI3K/AKT-, des Ras/RAF/MEK/ERK- und des Hippo Signalweges), sodass die Inaktivierung von *RASSF1A* ein wichtiger Faktor ist, der zur Pathogenese und zum Fortschreiten von soliden Tumoren beiträgt (Dammann et al, 2003; Guo et al, 2007; van der Weyden & Adams, 2007).

Die Häufigkeit einer *RASSF1A* Promotor Hypermethylierung ist in Lungen-, Brust- und Prostatakarzinomen am höchsten (Donninger et al, 2007). In Lungenkrebs ist eine epigenetische Inaktivierung der *RASSF1A* Promotor Region durch DNA-Methylierung weiter verbreitet als der Verlust der Heterozygotie (Dammann et al, 2000; Kok et al, 1987). Die Methylierung von *RASSF1A* konnte mit einem erhöhten Risiko einer Lungenkrebserkrankung korreliert werden (Donninger et al, 2007). Im Gegensatz dazu tritt in normalen Lungengewebe eine Methylierung des *RASSF1A* Gens nur sehr selten auf. Lungentumore mit hypermethyliertem *RASSF1A* Promotor sind schlecht differenziert (Tomizawa et al, 2002; Wang et al, 2007c), mit einem fortgeschrittenem Stadium (Lee et al, 2012; Wang et al, 2007c) und dem Auftreten von Rezidiven verbunden (Buckingham et al, 2010; Endoh et al, 2003; Kubo et al, 2009; Lee et al, 2012; Tomizawa et al, 2002). Eine signifikante Verkürzung der Überlebensdauer konnte bei jenen Lungenkrebspatienten mit inaktiviertem *RASSF1A* (Grawenda & O'Neill, 2015) festgestellt werden. Eine *RASSF1A*-Methylierung konnte als guter Indikator für das Ansprechen einer Chemotherapie in Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungentumoren ausgemacht werden (Dammann et al, 2001).

Es konnte auch eine Beteiligung der *RASSF1A* Hypermethylierung mit der Tumorgenese von Brustkrebs festgestellt werden (Buhmeida et al, 2011; Gobel et al, 2011; Hagrass et al, 2014; Jiang et al, 2012; Karray-Chouayekh et al, 2010; Stuopelyte et al, 2013; Wang et al, 2012c; Xu et al, 2012). Bei Brustkrebs ist eine *RASSF1A* Hypermethylierung stark mit einer schlechten Prognose und einem ungünstigen Ausgang assoziiert: Inaktiviertes *RASSF1A* ist mit einem fortgeschrittenem Brustkrebs-Stadium (Hagrass et al, 2014; Karray-Chouayekh et al, 2010), mit dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen (Bagadi et al, 2008; Hagrass et al, 2014), mit einem höherem Risiko des Auftretens von Rezidiven (Jiang et al, 2012) und einer generell schlechten Überlebensprognose verbunden (Gobel et al, 2011; Jiang et al, 2012; Karray-Chouayekh et al, 2010; Wang et al, 2012c; Xu et al, 2012). Die Inaktivierung von *RASSF1A* in Brusttumoren führt zu einem aggressiveren Phänotyp und einem höheren Risiko der Metastasierung (Grawenda & O'Neill, 2015).

Eine *RASSF1A* Methylierung konnte auch mit einem fortgeschrittenem Stadium und einem aggressiven Phänotyp in Blasenkrebs (Gao et al, 2012; Jarmalaite et al, 2008; Kim et al, 2012b; Lee et al, 2001; Maruyama et al, 2001), Gebärmutter Schleimhautkarzinomen (Jo et al, 2006; Liao et al, 2008; Pallares et al, 2008), Gebärmutterhalskarzinomen (Neyaz et al, 2008), Hals/ Kopftumoren (Fendri et al, 2009; Li et al, 2005; Yang et al, 2015; Zhang et al, 2014), Melanomen (Tanemura et al, 2009), Nierenkrebs (Kawai et al, 2010), Gehirntumoren (Gliome (Hesson et al, 2004), Neuroblastomen (Stutterheim et al, 2012) und Hypophysenadenomen (Qian et al, 2005) in Verbindung gebracht werden. Einige dieser fortgeschrittenen Tumore sind mit lokalen und distalen Metastasen verbunden, darunter Blasenkarzinome (Jarmalaite et al, 2008; Maruyama et al, 2001; Meng et al, 2012), Gebärmutter Schleimhautkarzinome (Jo et al, 2006) und Hals/ Kopftumore (Fendri et al, 2009; Li et al, 2005). Bei einigen der Tumore ist die *RASSF1A*-Inaktivierung mit einer kürzeren Gesamtüberlebenszeit verbunden (Blasenkrebs (Kim et al, 2012b), Gebärmutterhalskarzinome (Mitra et al, 2012), Hals/ Kopftumore (Ghosh et al, 2008; Lee et al, 2008; Zhang et al, 2014), Neuroblastome (Stutterheim et al, 2012; Yang et al, 2015) und Nierenkrebs (Kawai et al, 2010; Ohshima et al, 2012)). Eine *RASSF1A* Hypermethylierung wurde auch als ein prognostischer Marker für einen schlechten Ausgang der Erkrankung bei Sarkomen beschrieben (Danielsen et al, 2015; Seidel et al, 2005). Dies deutet darauf hin, dass die epigenetische Inaktivierung von *RASSF1A* eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Krebserkrankung zu einer metastasierenden Form spielt (Grawenda & O'Neill, 2015).

### 1.8 Epigenetische Krebstherapie: DNA-Methyltransferase Inhibitoren

Fehlerhafte epigenetische Markierungen führen zu einer Deregulation von verschiedensten Proteinen. Diese Deregulation wiederum kann mit der Entstehung von Krebserkrankungen verbunden sein (Esteller, 2008; Feinberg, 2007). Im Gegensatz zu genetischen Mutationen sind epigenetische Veränderungen umkehrbar (Ramchandani et al, 1999). Durch den Einsatz von DNA-Methyltransferase-Inhibitoren, wie 5-Azacytidin (Vidaza) und 5-Aza-2'-Deoxycytidin (Decitabin oder Dacogen) konnte die Reexpression verschiedener Tumorsuppressorgene (wie z.B. *p15<sup>INK4b</sup>*, *CDKN1C*, *RARb2*, *RASSF1A*) induziert werden. Bei 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-Deoxycytidin handelt es sich um Cytidin-Analoga, bei denen das Kohlenstoffatom an Position 5 der Cytosinbase durch ein Stickstoffatom ersetzt wurde (Constantinides et al, 1977; Constantinides et al, 1978). DNMT-Inhibitoren lassen sich in zwei Familien unterteilen: Nukleosid-Analoga und nicht-Nukleosid-Inhibitoren. Die Struktur der nicht-Nukleosid-Inhibitoren unterscheidet sich deutlich von den Nukleosid-Analoga, genau wie ihre Wirkmechanismen (Yang et al, 2010). Nicht-Nukleosid-Analoga wirken meist durch direkte und selektive Inhibition von DNA-Methyltransferasen (Kuck et al, 2010; Yoo et al, 2013). Nukleosid-Analoga wirken durch einen indirekteren Mechanismus: Nukleosid-Analoga werden in humanen Zellen durch das Transporterprotein hCNT1 in die Zelle eingeschleust und anschließend in mehreren Schritten in ihre aktive, triphosphorylierte Form überführt. 5-Azacytidin wird in RNA und, nach enzymatischer Reduktion in die entsprechende Deoxyribnukleosid-Struktur, auch in DNA inkorporiert. 5-Aza-2'-Deoxycytidin wird nur in DNA inkorporiert. Während der S-Phase wird 5-Aza-2'-Deoxycytidin in das Genom von aktiv replizierenden Zellen integriert. Es besteht dabei eine Spezifität der Inkorporation zugunsten von schnell proliferierenden Krebszellen (Cihak et al, 1980). Nach der Inkorporation in die DNA werden die Nukleosid-Analoga durch DNMTs gebunden. Die Bindung von DNMT1 an 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Nukleotide innerhalb der DNA führt zur Bildung einer kovalenten Bindung zwischen Nukleosid-Analoga und dem Enzym und der Formation eines irreversiblen Komplexes (Ghoshal et al, 2005; Kuo et al, 2007; Santi et al, 1984; Yang et al, 2010). Dies wiederum führt zu einem Verlust an aktiven DNMT1-Enzymen und einem passiven

Demethylierungsprozess, da die neusynthetisierten DNA-Stränge hypomethyliert bleiben und es auf diese Weise zu einem replikationsabhängigen Verlust der DNA-Methylierungsmuster kommt (Christman, 2002). Zusammen mit HDAC-Inhibitoren werden 5-Azacytidin bei der Behandlung des Myelodysplastischen Syndroms (MDS), bei akuter myeloischer Leukämie (AML) and bei chronischer myelomonozytäre Leukämie (CMML) eingesetzt. 5-Aza-2'-Deoxycytidin wird nur bei der Behandlung von MDS und AML eingesetzt (Hollenbach et al, 2010). Trotz des klinischen Nutzens von 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-Deoxycytidin haben diese DNMT-Inhibitoren jedoch auch deutliche Nachteile: Sie wirken nicht selektiv auf bestimmte DNA-Methyltransferasen; sie sind chemisch instabil und wirken stark zytotoxisch (Wijermans et al, 2000; Wijermans et al, 2005). Daher besteht ein Bedarf nach spezifischeren bzw. selektiveren Substanzen. Von 5-Aza-2'-Deoxycytidin ist bekannt, dass es sowohl zur Induktion der Aktivität von Tumorsuppressorgenen, als auch von pro-metastatischen Genen führt. Die Ribose-Cytidinanaloga (5-Azacytidin) werden auch in RNA inkorporiert. Dies führt zu einer Störung der Proteinsynthese, aber auch zu einem Anstieg der sekundären Effekte (Gravina et al, 2010; Hollenbach et al, 2010)

Die chemische Instabilität und die hohe Zytotoxizität von 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-Deoxycytidin führten zur Entwicklung anderer Nukleosid-Analoga DNMT-Inhibitoren, unter anderem auch von Zebularin. Bei Zebularin handelt es sich ebenfalls um ein Cytidin-Analoga, welches einen 2-(1H)-Pyrimidin-Ring enthält und einen leicht veränderten Wirkmechanismus im Vergleich zu 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-Deoxycytidin aufweist (Yang et al, 2010). Zebularin muss in höheren Konzentrationen eingesetzt werden, um den gleichen Demethylierungseffekt wie 5-Azacytidin bzw. 5-Aza-2'-Deoxycytidin zu erreichen, es wirkt dabei jedoch weniger zytotoxisch (Flotho et al, 2009). Im Gegensatz zu 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-Deoxycytidin zeichnet sich Zebularin darüber hinaus auch durch eine stark erhöhte Stabilität aus. Aufgrund dieser positiven Eigenschaften ist Zebularin ein vielversprechendes Medikament für die epigenetische Krebstherapie, da sowohl eine orale Verabreichungsform möglich ist als auch eine längere Behandlungsdauer (Yoo et al, 2008).

## 1.9 Zielsetzung

Das Auftreten aberranter DNA-Methylierungsmuster ist ein bekanntes Phänomen in einer Vielzahl verschiedener Krebsentitäten (Esteller, 2005). Die Entwicklung genomweiter Analysemethoden von DNA-Methylierungsprofilen gestattet einen detaillierten Einblick in die dynamischen Veränderungen der DNA-Methylierung die während der Tumorgenese auftreten (Unterberger et al, 2012). Darüber können auf Grundlage dieser Methylierungsprofile Rückschlüsse auf die Mechanismen gezogen werden, die zur Ausprägung krebspezifischer DNA-Methylierungsmustern führen (Maekawa et al, 2013). Ziel dieser Arbeit war es, unter Verwendung von *Illumina* 450k Arrays, genomweite DNA-Methylierungsprofile verschiedener nicht kleinzelliger Lungenkrebszelllinien (A427, A549 und H322) und normaler humaner Bronchialepithelzellen (NHBE) zu generieren. Anschließend sollten auf Grundlage dieser Methylierungsprofile eine detaillierte Analyse der DNA-Methylierungsmuster in Krebszellen im Vergleich zu normalen Lungenzellen durchgeführt werden. Der Fokus lag dabei auf Veränderungen der DNA-Methylierung in CpG-Insel-Bereichen und damit assoziierter Regionen. Anhand der genomweiten DNA-Methylierungsmuster von Krebs- und Normalzellen sollten des weiteren Kandidaten-Gene mit krebspezifisch hypermethylierten Promotor CpG-Inseln identifiziert werden. Außerdem sollte eine *Gene Ontology* (GO) Analyse, zur funktionellen Klassifizierung von Genen die mit krebspezifisch hypermethylierten CpG-Inseln assoziiert sind, durchgeführt werden. Die Ausprägung aberranter DNA-Methylierungsmuster ist durch den Einsatz von DNA-Methyltransferase Inhibitoren reversibel (Baylin, 2005). Die am häufigsten in der epigenetischen Krebstherapie verwendeten DNMT-Inhibitoren sind 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-2'dC) und 5-Azacytidin. Deren Einsatz ist jedoch aufgrund ihrer hohen Zytotoxizität und geringen chemischen Stabilität begrenzt (Gnyszka et al, 2013). Auf Grund dessen sollten A427-, A549- und H322-Lungenkrebszelllinien mit Zebularin, einem stabileren und weniger toxischen Cytidin-Analogen behandelt werden. Im Anschluss daran wurden die zellwachstumshemmenden Effekte und die Demethylierungseffizienzen von Zebularin bestimmt und mit denen von 5-Aza-2'dC verglichen. Das Tumorsuppressorgen *RASSF1A* hat vielfältige Funktionen in der Zellzyklus-Regulation, der Regulation der Mikrotubuli-Stabilität und der Apoptose (Richter et al, 2009). Darüber hinaus ist *RASSF1A* eines der am häufigsten epigenetisch inaktivierten Gene in humanen Krebserkrankungen (Pfeifer et al, 2002). Die Inaktivierung der *RASSF1A* Expression erfolgt durch Hypermethylierung der Promotor CpG-Insel (Dammann et al, 2000). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Mechanismus der epigenetischen *RASSF1A*-Inaktivierung untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

5-Aza-2'-desoxycytidin (Decitabin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Acrylamid	Merck KGaA, Darmstadt
Agar Agar	Merck KGaA, Darmstadt
Agarose	LE Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Ammoniumacetat	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ampicillin (Natrium-Salz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Blasticidin-S-HCL	Invitrogen, Life technologies GmbH, Darmstadt
Borsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Chelex	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Chloroform (Trichlormethan)	Merck KGaA, Darmstadt
Complete Proteaseinhibitorenmix	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Coomassie brilliant blue	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
4',6-diamino-2-phenylindol (DAPI)	SERVA Electrophoresis
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
dNTPs	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Dynabeads <sup>®</sup>	Life technologies GmbH, Darmstadt
Doxycyclin-Hyclat	Applichem GmbH, Darmstadt
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	GIBCO <sup>®</sup> , Life Technologies GmbH, Darmstadt
EDTA	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol 96% (rein/vergällt)	Merck KGaA, Darmstadt

---

Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Formaldehyd (37%)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Formamid	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Geneticin (G418)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Glucose	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Glycogen	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
N-2-Hydroxyethylpiperazin (HEPES)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Hydrochinon	Merck KGaA, Darmstadt
Immobilon Western Chemiluminescent	Millipore GmbH, Schwalheim/Ts
Isol-RNA Lysis Reagent™	5Prime GmbH, Hamburg
HRP Substrate	Millipore GmbH, Schwalheim/Ts
Hydrochinon	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol (2-Propanol)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Kanamycin	AppliChem GmbH, Darmstadt
Lithium-Chlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Magnesiumsulfat	Merck KGaA, Darmstadt
Mc Coy's 5A Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Natrium-Metabisulfit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nonidet P40	Fluka Biochemica, Ulm

Opti-MEM®	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Orange G	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	GIBCO®, Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Phenol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Protein G-Plus/Protein A Agarose beads	Calbiochem, Merck, Darmstadt
Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI)	GIBCO®, Life Technologies GmbH, Darmstadt
Rotiphoresis® Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Saccharose	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
S-adenosylmethionin	New England BioLabs, Schwalbach
SDS	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Streptavidin Sepharose	GE Healthcare, München
Sodium Deoxycholat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SYBR® Select Master Mix	Life technologies GmbH, Darmstadt
N, N, N', N'- tetramethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Tris	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Triton X100	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Tween20	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Wasser, DEPC-behandelt	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
X-Gal	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe
Zebularin	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
Zeocin	Invitrogen, Life technologies GmbH, Darmstadt

### 2.1.2 Längenstandards/ Molekulargewichtsstandard

GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
PageRuler Prestained	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte

**2.1.3 Transfektionsreagenzien**

jetPEI	Polyplus-Transfection SA, Illkirch, France
<b>X-trem0eGENE 9</b>	Roche Applied Science, Mannheim
Turbofect	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Lipofectamin™ RNAimax	Invitrogen Life technologies GmbH, Darmstadt

**2.1.4 Allgemeine Lösungen und Puffer****2.1.4.1 Allgemeine Lösungen**

Hydrochinon (0,1 M)	Hydrochinon	0,11 g
	<i>Ad</i> steriles ddH <sub>2</sub> O auf 10 ml Endvolumen	
Lade-Puffer (6x)	Saccharose	22,5 g
	TBE buffer (10 x)	6 ml
	OrangeG	0,5 g
	<i>Ad</i> ddH <sub>2</sub> O auf ein Endvolumen von 50 ml	
NaAc Natriumacetat (3M; pH 5,2)	Natrium- Acetat	12,3 g
	pH auf 5 bis 5,3 mit Essigsäure einstellen	
	<i>Ad</i> steriles ddH <sub>2</sub> O auf 50 ml Endvolumen;	
	Autoklavieren	
Na-Bisulfit (3,6 M; pH 5,5)	Natriumbisulfit	3,8 g
	<i>Ad</i> steriles ddH <sub>2</sub> O auf 8 ml Endvolumen	
	<i>Ad</i> NaOH (3 M) auf 10 ml Endvolumen	
NaOH (3 M)	Natriumhydroxid	1,2 g
	<i>Ad</i> steriles ddH <sub>2</sub> O auf 10 ml Endvolumen	
NH <sub>4</sub> Ac (7,5 M)	Ammonium-Acetat	28,9 g
	<i>Ad</i> steriles ddH <sub>2</sub> O auf 50 ml Endvolumen	
	Autoklavieren	
NH <sub>4</sub> Puffer (10x)	Tris-HCl pH 8.8 (bei 25°C)	500 mM
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	160 mM
	Tween20	0,1%
Phosphate buffered saline (10x)	NaCl	1 M

	KCl	20 mM
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O	60 mM
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8 mM
	<i>Ad ddH<sub>2</sub>O</i>	
ProteinaseK Puffer	Tris/HCl pH 7,6	50 mM
	EDTA x Na <sub>2</sub>	25 mM
	NP40	0,5%
	SDS	0,5%
	<i>Ad ddH<sub>2</sub>O</i>	
TAE Puffer (10x)	Tris (pH 7,8)	40 mM
	Natriunacetat	0,5 mM
	2Na EDTA	0,01 mM
	<i>Ad ddH<sub>2</sub>O</i>	
TBE Puffer (10x)	Tris/HCl	1 M
	Borsäure	0,8 M
	EDTA x Na <sub>2</sub>	10 mM
	<i>Ad ddH<sub>2</sub>O</i>	
TBS Puffer (10x)	Tris/HCl	50 mM
	NaCl	1,4 M
	Mit HCl pH 7,6 einstellen	
TE Puffer (1x)	Tris/HCl pH 7,6	10 mM
	EDTA x Na <sub>2</sub>	1 mM
	<i>Ad ddH<sub>2</sub>O</i>	
Tris/HCl (1 M; pH var.)	Tris/HCl	121,1 g
	pH mit HCl einstellen	
	<i>Ad steriles ddH<sub>2</sub>O auf 1 l Endvolumen</i>	
<b>2.1.4.2 Puffer für SDS-PAGE und Western Blot</b>		
Blockierlösung	5% Magermilchpulver	
	<i>Ad 1x TBS-T</i>	
Blotting Puffer	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1 M

	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 M
Flag Lyse Puffer	Tris/HCl pH 7,4	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	Triton X-100	1%
	<i>Ad ddH<sub>2</sub>O und Complete</i>	
Laemmli Puffer (2x)	Tris/HCl pH 6.8	140 mM
	Glycerin	20%
	SDS	4%
	β-Mercaptoethanol	1 M
	Bromphenol Blau	0,01%
	<i>Ad ddH<sub>2</sub>O</i>	
RIPA Puffer	NP40	1%
	Sodium deoxycholate	0,5%
	SDS	0,1%
	<i>Ad 1x PBS und Complete</i>	
SDS-PAGE Laufpuffer (10x)	Tris	250 mM
	Glycin	1,92 M
	SDS	1%
	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5 M
TBS-T	Tween20	0,05%
	<i>Ad 1x TBS</i>	
Trenngelpuffer	Tris/HCl pH 8,8	1,5 M
	<i>Ad ddH<sub>2</sub>O</i>	
Trenngel (10%)	ddH <sub>2</sub> O	4,1 ml
	Polyacrylamid	3,3 ml
	Trenngelpuffer	2,5 ml
	10% SDS	0,1 ml
	10% APS	50 µl
	TEMED	5 µl

Sammelgepuffer	Tris-HCl pH 6,8	0,5 M
Sammelgel (4%)	ddH <sub>2</sub> O	6,1 ml
	Polyacrylamid	1,3 ml
	Sammelgepuffer	2,5 ml
	10% SDS	0,1 ml
	10% APS	50 µl
	TEMED	5 µl

#### 2.1.4.3 Puffer für Chromatin-Immunopräzipitation

SDS-Lysepuffer (frisch ansetzen)	10 ml	1 ml
	10 mM EDTA	200 µl 0,5 M EDTA
	50 mM Tris-HCl, pH 8,1	500 µl 1 M Tris-HCl
	+ Proteinaseinhibitor-Tablette (1 Tab. in 1 ml H <sub>2</sub> O und 100 µl Lösung pro 1 ml Lysepuffer)	
	8,3 ml H <sub>2</sub> O + Proteinaseinhibitor-Tablette	
Dilutionbuffer (50ml)	0,01% SDS	50 µl 10% SDS
	1,1% Triton X100	5,5 ml 10% TritonX-100
	1,2 mM EDTA	120 µl 0,5M EDTA
	16,7 mM Tris/HCl, pH 8,1	835 µl 1M Tris-HCl
	167 mM NaCl	1,67 ml 5M NaCl
	41,825 ml H <sub>2</sub> O	
IP Puffer (50ml)	150 mM NaCl	1,5 ml 5M NaCl
	0,5% NP-40	2,5 ml 10% NP-40
	5 mM EDTA	500 µl 0,5M EDTA
	50 mM Tris-HCl, pH 7,5	2,0 µl 1M Tris-HCl, pH 7,5
	1% Triton X-100	5 ml 10% Triton X-100
	34,4ml H <sub>2</sub> O	

#### 2.1.5 Kulturmedien

##### 2.1.5.1 Medien zur Kultivierung humaner Zellen

DMEM (1 l)	DMEM	13,38 g/l
	NaHCO <sub>3</sub>	3,7 mg
	HEPES	25 mM

	Autoklavieren	
RPMI (1l)	RPMI	10,43 g/l
	NaHCO <sub>3</sub>	2 g
	HEPES	50 mM
	pH 7,25 einstellen	
	Autoklavieren	

Allen Zellkulturmedien wurden FCS (Endkonzentration von 10%) und Penicillin/Streptomycin (Endkonzentration von 1%) zugefügt.

#### 2.1.5.2. Medien zur Kultivierung kompetenter *E. coli*-Stämme

LB medium (1 l)	Bacto Trypton	10 g
	<i>Yeast extract</i>	5 g
	NaCl	10 g
	(Bacto™ agarose 12,5 g)	
	pH 7,5	
	Autoklavieren	

NZY <sup>+</sup> Medium	NZ-amin	10 g
	Bacto™ yeast extract	5 g
	NaCl	5 g
	D (+)-Glukosemonohydrat	3,6 g
	MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	2,5 g
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	3 g
	pH 7,5 mit 3 M NaOH einstellen	
	Ad ddH <sub>2</sub> O auf ein Endvolumen von 1 l	

SOC medium	2 M Glukoselösung	
	Ad SOB-Medium auf ein Endvolumen von 1 l	
	Autoklavieren	

**2.1.5.3 Medienzusätze**Antibiotika für *E.coli*

Name	Konzentration der Stocklösung	Arbeitskonzentration
Ampicillin	50 mg/ml in H <sub>2</sub> O	60 µg/ml
Chloramphenicol	34 mg/ml in Ethanol	170 µg/ml
Kanamycin	10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	50 µg/ml

**2.1.6 Enzyme**

DNase I (1 U/µl)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
<i>FastAP</i> , thermosensitiv (1 U/µl)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Proteinase K (20 µg/µl)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl)	Promega GmbH, Mannheim
RNase A (10 µg/µl)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
RNasin (RNase A Inhibitor) (40 U/µl)	Promega GmbH, Mannheim
<i>SssI</i> Methyltransferase (20 U/µl)	New England BioLabs, Schwalbach
T4 DNA Ligase (3 U/µl)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
<i>Ribolock</i> (40 U/µl)	Fermentas, Thermo Fisher Scientific, Schwerte
<i>Taq I Polymerase</i>	isoliert aus einem <i>Taq</i> -Polymerase exprimierenden <i>E.coli</i> -Stamm (durchgeführt von Mitarbeitern der AG Dammann)

**2.1.7 Antikörper**

EGFP Kaninchen polyklonal	Dr. Jörg Leers
GAPDH Kaninchen polyklonal IgG (FL-335)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Inc., CA, USA
H3K9ac (pAb-004-050)	Abcam, Cambridge, MA, USA
H4ac (06-866)	Merck Chemicals GmbH, Darmstadt
Histon H3 (1791)	Abcam, Cambridge, MA, USA
IgG (46540)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Inc., CA, USA
PolII Antibody (N-20)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Inc., CA, USA
Ziege anti Kaninchen IgG-HRP (sc-2004)	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Inc., CA, USA
Ziege anti Maus IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, Inc., CA, USA

F(ab')<sub>2</sub>- Ziege-anti-Kaninchen-Alexa-488Invitrogen, Life technologies GmbH,  
Darmstadt

### 2.1.8 Vektoren

Die *HDAC1*<sup>\*-</sup>, *HDAC2*<sup>\*-</sup>, *HDAC3-FLAG*<sup>\*-</sup>, *HDAC4-FLAG*<sup>\*-</sup>, *HDAC5-FLAG*<sup>\*-</sup>, *HDAC6*<sup>\*-</sup>, *HDAC8*<sup>\*-</sup>, *HDAC10-FLAG*<sup>\*-</sup>, *Myc-Sirtuin1*<sup>\*-</sup>, pEGFPC2\_DNMT1<sup>\*\*</sup>- und *Dnmt3a-EGFP*<sup>\*</sup>-Überexpressionsvektoren wurden von der AG Schmitz zur Verfügung gestellt (\*Ampicillin-Resistenz, \*\* Kanamycin-Resistenz)

In Tabelle 1 sind die verwendeten Vektorsysteme mit den entsprechenden Resistenzen angegeben

**Tabelle 1: Verwendete Vektorsysteme.**

Vektorname	Resistenz	Hersteller	Bemerkung
pcDNA3.1 (+)	Ampicillin	Invitrogen, Life technologies GmbH, Darmstadt	Leervektor
pCMV-Tag1	Kanamycin	Addgene, Cambridge, England	Leervektor
pEGFP-C1	Kanamycin	Clontech, Saint-Germain-en-Laye, Frankreich	Leervektor
pGEM <sup>+</sup> -T	Ampicillin	Promega, Heidelberg	Erstvektor
pRLNull	Ampicillin	Promega, Heidelberg	<i>Renilla</i> Luciferase Reporter Vector
pGL3.1	Ampicillin	Promega, Heidelberg	Firefly Luciferase Reporter Vector
pcMV-Sport6	Ampicillin	Invitrogen Life technologies GmbH, Darmstadt	Leervektor
pcDNA4/TO/myc-His-C	Ampicillin, Zeocin	Invitrogen, Life technologies GmbH, Darmstadt	T-Rex-System (enthält zwei Tetrazyclin-Operatoren)
pcDNA4/TO/myc-His/lacZ	Ampicillin, Zeocin	Invitrogen, Life technologies GmbH, Darmstadt	T-Rex-System
pcDNA6-TR	Ampicillin, Blasticidin	Invitrogen, Life technologies GmbH, Darmstadt	T-Rex-System (enthält Tetracyclin-Repressor-Gen)

Tabelle 2: Verwendete Primer für Expressionsanalysen. Die Angaben zur MgCl<sub>2</sub>-Konzentration beziehen sich auf semiquantitative RT-PCR.

Region	Forward Primer	Reverse Primer	MgCl <sub>2</sub> [mM]	Zyklen	Elongationszeit	PCR-Produkt [bp]	annealing Temperatur (T <sub>A</sub> )	Formamid (%)
<i>Actin</i>	bACTRTFW: CCTTCCTCCTGGGCATGGAGTC	bACTRTRV: CGGAGTACTTGCCTCAGGAGGA	1,5	27	30 s	226	60°C	-
<i>GAPDH</i>	UGAP389: TGGAGAAGGCTGGGGCTCAT	LGAP545: GACCTTGGCCAGGGGTGCTA	1,5	27	30 s	176	60°C	-
<i>Gapdh</i>	mGAPDHRTF1: GCCGCTGGAGAACCTGCC	mGAPDHRT1: CCCCGGCATCGAAGGTGGAA	1,5	25	30 s	156	60°C	-
<i>RASSF1A</i>	UHE2ab: GGCTGGGAACCCGCGGTG	L27111: TCCTGCAAGGAGGGTGGCTTCT	1,5	36	30 s	239	60°C	-
<i>RASSF1A</i> ( <i>qRT-PCR</i> )	UHE2ab: GGCTGGGAACCCGCGGTG	P21L251: AAGCCTGTGTAAGAACCCTCT	1,5	-	30 s	167	60°C	-
<i>RASSF1C</i> ( <i>qRT-PCR</i> )	G21U0521: GGGCGGTGGTTGGCGGCTACGGAC	P21L251: AAGCCTGTGTAAGAACCCTCT	1,5	30	30 s	333	60°C	-
<i>ZMYND10</i>	ZMYND10RTF1: GCCCATCTGACCCTAACTGA	ZMYND10RTR1: CACTGCCTCTAGCACATCCA	1,5	42	30 s	219	60°C	-
<i>ZMYND10</i> <i>qRT-PCR</i>	ZMYND10RTF2: CCTGGAGAAGCTGAACATGC	TagL1-Primer: GGCAGTATCGTGAATTCGATGC:	1,5	-	30 s	159	60°C	-
<i>EGFP</i>	EGFPRTF1: ACGTAAACGGCCACAAGTTC	EGFPRTR1: AAGTCGTGCTGCTTCATGTG	1,5	32	30 s	187	60°C	-
<i>ABCB4</i>	ABCB4RTF1: GCAGACGGTGGCCCTGGTTGG	ABCB4RTR1: TGGAAAACAGCACCGGCTCCTG	1,5	40	30 s	185	60°C	1
<i>mABCB4</i>	mABCB4RTF1: CCCTCCAGCCGGCTTTCTCCA	mABCB4RTR1: GGACCGGAGCCTTGTGGTGAGG	1,5	40	30 s	200	60°C	-
<i>CPSF1</i> ( <i>qRT-PCR</i> )	CPSF1RTF1: CTGGCCACCTACTCCTTTGA	CPSF1RTR1: GCGATGACTGTCCACATGTC	-	-	30 s	248	60°C	-
<i>DNMT1</i> ( <i>qRT-PCR</i> )	DNMT1RTFW1: CCACCGCCCTGGCCAAAGC	DNMT1RTRW1: CAGGGGTGACGGGAGGGCAGAAC	-	-	30 s	133	60°C	-
<i>DNMT3a</i> ( <i>qRT-PCR</i> )	DNMT3ARTFW1: ATGTGGTGGCCATGGGCGTTAGTG	DNMT3ARTRW1: CACAGTGGATGCCAACGGCCTGT	-	-	30 s	158	60°C	-
<i>DNMT3b</i> ( <i>qRT-PCR</i> )	DNMT3BRTFW1: CTCGAGCTGCAGGACTGCTTGAA	DNMT3BRTRW1: TCCTTCGAGCTCAGTGACCACA	-	-	30 s	163	60°C	-

Fortsetzung von Tabelle 2:

<i>UHRF1</i> (qRT-PCR)	UHRF1: GTCGAGATCTTTCCGGCAAC	UHRF1: TAGATGCCATCGTAGCGGTT	-	-	30 s	229	60°C	-
<i>HDAC1</i> (qRT-PCR)	HDAC1RTF2: TGCAAAGAAGTCCGAGGCAT	HDAC1RTR2 TGGCCTCATAGGACTCGTCA	-	-	30 s	296	60°C	-
<i>HDAC2</i> (qRT-PCR)	HDAC2RTF1: GCCACTGCCGAAGAAATGAC	HDAC2RTR1: TCCAGCCCAATTAACAGCCA	-	-	30 s	237	60°C	-
<i>HDAC3</i> (qRT-PCR)	HDAC3RTF1: ACTTCGAGTACTTTGCCCCA	HDAC3RTR1: GGCACGTCATGAATCTGGAC	-	-	30 s	160	60°C	-
<i>HDAC4</i> (qRT-PCR)	HDAC4RTF1: TGGGAAACGAGCTTGATCCT	HDAC4RTR1: CATCTGGTCTCTTTTCGGCG	-	-	30 s	246	60°C	-
<i>HDAC5</i> (qRT-PCR)	HDAC5RTF1: CAGAAGTTGAACGTGGGCAA	HDAC5RTR1: GTCCTCCACCAACTCTTCA	-	-	30 s	172	60°C	-
<i>HDAC6</i> (qRT-PCR)	HDAC6RTF1: TGTGCTCCCAATCCTGACAT	HDAC6RTR1: ACGTACTIONACTGTGACA	-	-	30 s	243	60°C	-
<i>HDAC8</i> (qRT-PCR)	HDAC8RTF1: ACGTGTCTGATGTTGGCCTA	HDAC8RTR1: TCCCAGCTGTAAGACCACTG	-	-	30 s	158	60°C	-
<i>HDAC10</i> (qRT-PCR)	HDAC10RTF1: GGCCTTTGAGTTTGACCCTG	HDAC10RTR1: CAGCGTCTGTACTGTATGC	-	-	30 s	217	60°C	-
<i>Sirt1</i> (qRT-PCR)	Sirt1RTF1: GCCGGAACAATACCTCCAC	Sirt1RTR1: ACCCAGCTCCAGTTAGAAC	-	-	30 s	174	60°C	-

Tabelle 3: Verwendete Primer für Methylierungsanalysen

Region	Forward Primer	Reverse Primer	MgCl <sub>2</sub> [mM]	Zyklen	Elongationszeit	PCR-Produkt [bp]	annealing Temperatur (T <sub>A</sub> )	Formamid (%)
<i>RASSF1A</i> (-400)	RF1A-500BSU1: GGTGATAGAGTTAAATGAGGGTTGTA	RF1A-300BSL1: Biotin- AACACACTTAACCTACCCACTAAAT	2,5	45	30 s	233	62	-
<i>RASSF1A</i> (TSS)	RF1APYROFOR: AGTTTGGATTTTGGGGGAGG	RF1APYROBIO: Biotin- CAACTCAATAAACTCAAACCTCCCC	2	45	30 s	136	60	2%

Fortsetzung von Tabelle 3:

RASSF1A (+400)	+400/+600BSU1: GGAAGGGGTAGTTAAGGG	+400/+600BSL1: AAACAACCACCTCTACTCAT	3,5	45	30 s	186	53	-
ABCB4 (CoBRA, Pyroseq.)	ABCB4BSU1: GAGTAAAGTTTAGGTTTTTTTGTGTAG	ABCB4BSL1: (Biotin)- CCTCAAACCAAATACACCCTCTCC	1,5	45	30 s	218	57	4
mABCB4	mABCB4BSU1 GTGAAGTTTAGGTGAGGGAGGA	mABCB4BSL1 ACTACCTAAAAAAAAAACCTCCAAA	2	45	30 s	148	52	2
RASSF1A-Renilla-LUC	DoxRF1ABSU1: GGAGGGAAGGAAGGGTAA	DoxRF1ABSL1: CTTAATACTTACCTACCCAATACCTC	1,5	45	30 s	320	57	-

Tabelle 4: Verwendete Sequenzierprimer für Pyrosequenzierungen.

Region	Pyromark-Assay	Sequenzierprimer	Analysierte Region
RASSF1A: (-400)	-500,-300 (überarbeitet).pyrosetup	RF1A-500BSeq: AGAATGTATTTTGAATTTAAGA	TTAYGGTTTAGTTTTGTGAGTTTTAGTTTTYGTAGTGGAGAGTAGAGYGGYGGTAAAGTTGTTGATYGATTTTTTTTTTTTTATTTAAGT
RASSF1A: (TSS)	RASSF1AQIA. pyrosetup	RF1APYROSEQ: GGGGTTAGTTTTGTGGTTT	YGTTYGGTTYGYGTTTGTAGYGTAAAGTTAGYGAAGTAYGGTTTAATYGGGTTATGTYGGGGAGTTTGTAGTTATTGAGTTG
RASSF1A: (+400)	+400,+600 (überarbeitet).pyrosetup	400BSeqU3 GGGGTAGTTAAGGGG	TAGYGTAGTYGTYGGGTTAAGTYGYGGTAGAGGGGGTYGGYGGGGATAGTTTT
ABCB4	ABCB4.pyrosetup	ABCB4Bseq: TTTAGAGTTTTGTTAGATA	YGYGYGAGGTTYGAGGTGAGAGAGGTTYGGYGYGTTTGGTTTTYGAAGGGAGATT

Tabelle 5: Verwendete Primer für Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP).

Region	Forward Primer	Reverse Primer	MgCl <sub>2</sub> [mM]	Zyklen	Elongationszeit	PCR-Produkt [bp]	annealing Temperatur (T <sub>A</sub> )
EGFP	EGFPRTF1: ACGTAAACGGCCACAAGTTC	EGFPRT1: AAGTCGTGCTGCTTCATGTG	-	-	30 s	187	60
RASSF1A-RLuc	RF1ALucChIPU1: GCTCTCTCAGCTCCTTCC	RF1ALucChIPL1: GTGCCTCAGACCAACTTCT	-	-	30 s	195	60

**Tabelle 6: Verwendete Primer für ZMYND10-, EGFP-ZMYND10-3'-RACE Experimente bzw. die RT-PCR und die sequenzspezifische RT-PCR von ZMYND10, RASSF1A und GAPDH.**

Region	Forward Primer	Reverse Primer	MgCl <sub>2</sub> [mM]	Zyklen	Elongationszeit	PCR-Produkt [bp]	<i>annealing</i> Temperatur (T <sub>a</sub> )
ZMYND10-3'Ende (RT-PCR)	-	3'RACE-PCR GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATCTTTTTT TTTTTTTTTT	Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5.1 Reverse Transkriptase (RT)-PCR				
ZMYND10-3'Ende (1. Runde)	NU278: AGCGTGTCTCAGATGCCAGAA	LP25: GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATC	1,5	30	30 s	Ca. 530	60
ZMYND10-3'Ende (2. Runde)	NU500: GCCGACCACCCATGCCAAGG	LP25: GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATC	1,5	30	30 s	Ca. 300	60
EGFP-ZMYND10-3'Ende (RT-PCR)	-	3'RACE-PCR GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATCTTTTTT TTTTTTTTTT	Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5.1 Reverse Transkriptase (RT)-PCR				
EGFP-ZMYND10-3'Ende (1. Runde)	EGFPRTF1: ACGTAAACGGCCACAAGTTC	LP25: GCGGTGACCCGGGAGATCTGAATC	1,5	40	160 s	Ca. 1700	60
Primer für RT-PCR	-	oligodT: TTTTTTTTTTTTTTTTTT, Hexamer: NNNNNNN	Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5.1 Reverse Transkriptase (RT)-PCR				
ZMYND10 (RT-PCR)	-	ZMYND10TAGRTR2 GGCAGTATCGTGAATTCGATGCCTGCAGAA CACAGGGAACAC	Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5.1 Reverse Transkriptase (RT)-PCR				
RASSF1A (RT-PCR)	-	L18316: CGCGCACTGCAGGCCTTTG	Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5.1 Reverse Transkriptase (RT)-PCR				
GAPDH (RT-PCR)	-	GAPDHCHR2: TGGTCCAGGGGTCTTACTCC	Bedingungen siehe Abschnitt 2.2.5.1 Reverse Transkriptase (RT)-PCR				

## 2.1.9 Verwendete Zelllinien und Gewebe

### 2.1.9.1 Lungenkrebszelllinien

ABC-1, SW1573, HOP18, HCC1171, LXFL529, H1703, H441, EBC-1, H322, A427, H1568, CHA-GO-K-1, H2087, H1975, H226, H2444, HCC515, H1299, H2030, H2405, HCC2935, H1373, H1666, RERF-LC-Ad1, Calu-6, H1155, H1651, H2347, H358, H838, H2228, HCC827, H2073, H1650, H23, H1993, Calu-3, H650, H460, H727, A549, H292, HCC4006, H2170, H1838, H820, H1355, RERF-LC-MS, H2122, H1793, H661, HOP62, HCC15, EK VX, H1792, H2110.1, Calu-1, H2110, HCC4017, H2009, HOP92, SK-MES-1, RERF-LC-KJ, H1437, H647, H2126, H2172, H1435, H1755 (NCBI-GEO-Accession: GSE36216)

CRL-5808, CRL-5886, CRL-5898, CRL-5976, HTB-171, HTB-173

### 2.1.9.2 Normale Lungenzelllinien

gBEC1, gBEC1\_UI, gSAC1, gSAC1\_UI, gBEC, gSAC (NCBI-GEO-Accession: GSE36216)

NHBE, PAF (*pulmonary arterial fibroblasts*), PASMC (*pulmonary artery smooth muscle cells*), HF54 (humane Fibroblasten), HF55 (humane Fibroblasten)

### 2.1.9.3 Brustkarzinomzelllinien:

MCF-7, MCF-10, MDA-MB-231, T47D, ZR75-1, HMEC (humane Mammar epithelzellen)

### 2.1.9.4 Melanomzelllinien:

SK Mel 13, IGR1, buf1280wt, C8161,

### 2.1.9.5 Sonstige Karzinome:

Hep2 (Larynx-Epithelioma), 1777 (Testis), HepB3 (Hepatozelluläres Karzinom), RPMI 2650 (Nasenscheidewandkarzinom), UM-SCC-14C (Mundkarzinom)

### 2.1.9.6 Normale Lungengewebe

GSM1264690, GSM1264711, GSM1264727, GSM1264764, GSM1264854, GSM1264699,  
GSM1264709, GSM1264716, GSM1264724, GSM1264738, GSM1264748, GSM1264753,  
GSM1264759, GSM1264765, GSM1264770, GSM1264775, GSM1264791, GSM1264804,  
GSM1264813, GSM1264814 (NCBI-GEO-Accession-Nummer: GSE52401)

### 2.1.7 Primäre Lungentumore

Primäre Adenokarzinome: TA14, TA59, TA74, TA94, TA247,

Primäre Plattenepithelkarzinome: TS41, TS42, TS71, TS02, TS03, TS12, TS29, TS37,

### 2.1.8 Primäre Brusttumore und normales Brustgewebe (Tumorproben (T), Normalgewebe (N))

primäre Mammarkarzinome: B1-T, B2-T, B3-T, B4-T, B5-T, B6-T, B7-T, B8-T, B9-T, B10-T, B11-T, B12-T, B13-T, B14-T, B15-T, B16-T, B17-T, B18-T, B19-T, B20-T, B21-T, B23-T, B25-T, B28-T, B31-T, B33-T, B34-T, B36-T, B38-T, B47-T, B51-T

normale Brustgewebe: B4-N, B7-N, B9-N, B10-N, B11-N, B12-N, B13-N, B14-N, B16-N, B17-N, B18-N, B19-N, B20-N, B21-T, B23-N, B25-N, B28-N, B31-N, B33-N, B34-N, B36-N, B38-N, B47-N, B51-N

### 2.1.9 Primäre Kopf-Hals-Karzinome und normales Gewebe (Tumorproben (T), Normalgewebe (N))

Kopf-Hals-Karzinom: MTH-T, JG-T, NW-T, KH-T, GKD-T, HTH-T, SCHH-T, WR-T, BH-T, WTH-T

Normale Gewebe: MTH-N, JG-N, NW-N, KH-N, GKD-N, HTH-N, SCHH-N, WR-N, BH-N, WTH-N

**2.1.9.10 Murine Zelllinien und Gewebe**

F9 (Testis-Embryonal-Karzinom), LLC1 (Lewis lung carcinoma cell line), Ltk (murine embryonale Fibroblasten), NIH-3T3 (murine embryonale Fibroblasten), MEF (murine embryonale Fibroblasten), Leber, Lunge, Milz, Niere, Herz

**2.1.9.11 HCT-116 Wildtyp (WT) und *Knockout* Zelllinien**

HCT-116 WT\*

HCT-116 3bKO\* DNMT3B-*knockout* Zelllinie (DNMT3B<sup>-/-</sup>)

HCT-116 DKO\* DNMT1<sup>-/-</sup> und DNMT3B<sup>-/-</sup> *knockout*

NCBI-GEO-Accession: GSE29290 (HCT-116 WT Zellen: GSM815136, GSM815137, GSM815138, HCT-116 DKO Zellen: GSM815139, GSM815140, GSM815141)

\*Von Bert Vogelstein, John Hopkins University zur Verfügung gestellt (Rhee et al, 2002; Rhee et al, 2000)(Rhee et al, 2002; Rhee et al, 2000)

**2.1.9.5 Kultivierte Zelllinien**

Der nachfolgenden Tabelle sind die kultivierten Zellen mit den entsprechenden Kulturmedien, sowie die Herkunft der Zellen zu entnehmen.

**Tabelle 7: Kultivierte Zelllinien mit entsprechenden Kulturmedien.**

Zelllinie	Herkunft	Medium
A427	Nicht-kleinzelliges Lungenadenokarzinom	RPMI
A549	Nicht-kleinzelliges Lungenadenokarzinom	DMEM
H322	Nicht-kleinzelliges Lungenplatteneithelkarzinom	DMEM
H358	Nicht-kleinzelliges Lungenadenokarzinom	RPMI
HCT-116 WT	Kolorektalkarzinom	Mc Coy's 5A Medium
HCT-116 3bKO	Kolorektalkarzinom	Mc Coy's 5A Medium
HCT-116 DKO	Kolorektalkarzinom	Mc Coy's 5A Medium
HeLa	Zervixadenokarzinomzellen	DMEM
HEK 293	Humane embryonale Nierenzellen	DMEM
HEK 293 T-REx	HEK-293, die das Tetracyclin-Repressor-Protein stabil exprimieren	DMEM

**2.1.10 Vorgefertigte Systeme (Kits)**

Dual Luciferase <sup>®</sup> Reporter Assay System	Promega, Heidelberg
EpiTect Bisulfite Kit	Qiagen GmbH, Hilden
MSB <sup>®</sup> Spin PCRapace	Invitek GmbH, Berlin
NucleoSpin <sup>®</sup> Extract II	Macherey-Nagel GmbH, Düren
NucleoSpin <sup>®</sup> Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel GmbH, Düren
NucleoBond <sup>®</sup> Xtra Midi Mutagenesis Kit	Macherey-Nagel GmbH, Düren Promega, Heidelberg
Geräte und Lösungen für Pyrosequenzierung	
PyroMark <sup>®</sup>	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquickChange Lightning	Agilent
QIAquick Nucleotide Removal Kit	Qiagen GmbH, Hilden

**2.1.10 Gebrauchsgegenstände**

Amersham Hybond-P PVDF Membran	GE Healthcare, Munich
	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Zellkulturschalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Glaswaren	Schott AG, Mainz
Handschuhe (rotiprotect Nitril)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kanülen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Parafilm <sup>®</sup>	Pechiney Plastic Packaging; Menasha, WI, USA
PCR plate 24 well	Qiagen GmbH, Hilden
Petrischalen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Plastikwaren	Elkay Laboratory Products, Hampshire, UK Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Skalpell	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Sterile Filter	Sartorius AG, Göttingen
Strip Caps	Qiagen GmbH, Hilden Techno Plastic Products AG Trasadingen
Whatman paper	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe

**2.1.11 Geräte**

AutoclavTechnoclav	120 Technomara AG, Wallisellen, Switzerland
	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Blotting Apparatur	Bio-Rad, Munich
Elektrophoresekammer	PEQlab Biotschnologie GmbH, Erlangen
Fluorescencemikroskop Observer Z1	Carl Zeiss GmbH, Jena
Fresco 17 Zentrifuge	Heraeus®, Hanau
Gefrierschrank -80°C DF8517	Labotec GmbH, Göttingen
Geldokumentation/Transilluminator	Decon Science Tec GmbH, Hohengandern
	Grant Instruments (Cambridge), Ltd. Shepreth, Cambridgeshire, UK Zentrifugen
HERAcell 150	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
Inkubator Type B6	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
<u>Inkubatoren</u>	
Inkubatorschüttler TH30	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Inversemikroskop	Motic Dutschland GmbH, Wetzlar
Luminometer	SIRIUS, Berthold Detection Systems
Magnetrührer (VMS-C7)	VWR Internation GmbH, Darmstadt
Mikrowelle	Cinex Electronic GmbH, Aschenberg
Molecular Imager VersaDoc	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
<u>PCR Thermo Cyclers</u>	
Mastercycler Gradient	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Mastercycler	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Rotor-Gene3000	Corbett Research
Pipetten	Gilson, Villiers le Bel, France
pH-Meter, pH 211	Microprocessor Hanna Instruments, Kehl a.R.
Pyrosquencer PyroMark Q24	Qiagen GmbH, Hilden
PyroMarkQ24 Vacuum Workstation	Qiagen GmbH, Hilden
Safety Cabinet	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold
<u>Schüttler</u>	
Shaker Rotamax 120	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach

Shaker Roto-Shake Genie	Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA
Thermomixer compact	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Thermoshaker TS1	Biometra biomedical Analytic GmbH, Gottingen
Spectrometer, Gene Quant Pro	Biochrom Ltd., Cambridge, UK
Sonifizierer Modell Bioruptor	Diagenode Inc.; USA
Spannungsgerät (Power Pac 200)	Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA
Tecan Infinite M200 PRO	Tecan GmbH, Grödig, Austria
Vortexer	VWR International GmbH, Darmstadt

Waagen

Acculab precision scale VIC-123	Sartorius AG, Gottingen
Acculab precision scale VIC-5101	Sartorius AG, Gottingen

Wasserbäder

WB10 P-D	Industriegesellschaft mbH, Dresden
AL-5 Lauda	Dr. R. Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Zellbanken	MSC-Advantage Biological

Zentrifugen

Multifuge 1S/1S-R	Heraeus <sup>®</sup> , Hanau
Zentrifuge 5418	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Pico 17 Zentrifuge	Heraeus <sup>®</sup> , Hanau

**2.1.12 Verwendete Softwares / Datenbanken**

<https://www.thermofisher.com/de/de/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-restriction-modifying-enzymes/restriction-enzymes-thermo-scientific/double-digest-calculator-thermo-scientific.html>

<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>

<http://string-db.org/>

<http://bejerano.stanford.edu/great/public/html/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>

<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>

<https://www.r-project.org/>

<https://www.bioconductor.org/>

<http://studentsttest.com/>

<https://genome.ucsc.edu/>

BioEdit Sequence Alignment Editor, Version 7.1.3.0

PyroMark Q24 Software

Qiagen GmbH, Hilden

Rotor-Gene6

Corbett Research, Qiagen, Hilden

Illumina GenomeStudio

Illumina, Inc., USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1. RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden die Zellen einer >70% konfluent bewachsenen 3,5 cm bzw. 10 cm Zellkulturschale verwendet. Zu Beginn wurde das Zellmedium abgesaugt und die Zellen durch zweimalige Zugabe von 5 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml Trypsin-Ersatz (5 min Inkubation bei 37 °C) oder mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte abgelöst. Im Anschluss daran wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und 3 min lang bei 1500 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml TRIzol (Guanidin-Iso-Thiocyanat) lysiert und resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden pro Reaktionsansatz 200 µl Chloroform hinzugegeben und kräftig gevortext (30 s). Im Anschluss daran erfolgte ein Inkubationsschritt von 5 min bei RT, gefolgt von einem Zentrifugationsschritt von 10 min bei 11.000 rpm. Nach dieser Behandlung ist die RNA im sauren TRIzol in der oberen, wässrigen Phase lokalisiert und DNA ist als weiße Interphase an der Grenze zur roten, organischen Phase erkennbar. Die obere Phase wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl 100% Isopropanol versetzt und anschließend mindestens 15 s gevortext. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei 11.000 rpm bei RT. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 150 µl 70% Ethanol (verdünnt in DEPC-Wasser) gewaschen. Im Anschluss daran folgte ein Zentrifugationsschritt von 5 min bei 11.000 rpm bei RT. Der Überstand wurde anschließend vollständig entfernt, das Pellet 3 min lang bei 37 °C getrocknet und anschließend in 20-50 µl DEPC-Wasser gelöst.

### 2.2.2. DNA-Isolation (aus Zelllinien)

Für die DNA-Isolation wurden die Zellen einer >70% konfluent bewachsenen 3,5 cm bzw. 10 cm Zellkulturschale verwendet. Zu Beginn wurde das Zellmedium abgesaugt und die Zellen durch zweimalige Zugabe von 5 ml 1x PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 1 ml TrypLE-Lösung (5 min Inkubation bei 37 °C) oder mit einem Zellschaber von der Zellkulturplatte abgelöst. Danach wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß überführt und 3 min lang bei 1500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml 1x PBS gewaschen. Durch Zugabe von 600 µl Proteinase K Puffer und 22 µl Proteinase K (Stock 20 mg/ml), anschließendes vortexen und Inkubation des Ansatzes bei 56 °C über Nacht, wurden die Proteine verdaut. Der Reaktionsansatz wurde im Anschluss mit 500 µl Phenol versetzt, eine Minute lang geschüttelt und dann 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Chloroform/ Phenol/ Isoamylalkohol (25/24/1) versetzt, 1 min gemischt und anschließend für 3 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde abermals die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 500 µl Chloroform versetzt, für eine Minute gemischt und dann 3 min lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die DNA befindet sich anschließend in der oberen Phase und wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit  $\frac{1}{10}$  Volumenteile 3 M NaAc (35 µl) und 1 Volumenteil 100% Isopropanol (350 µl) versetzt und 1 min lang per Hand gemischt. Im Folgenden wurde die DNA für 20 min bei -20 °C gefällt. Die DNA wurde im Anschluss daran 10 min bei 13.000 rpm pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet anschließend mit 150 µl 70% EtOH gewaschen und 4 min lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde im nächsten Schritt vollständig abgenommen und das Pellet für etwa 10 min bei 37 °C getrocknet.

Das Pellet wurde schließlich in 30-50 µl ddH<sub>2</sub>O resuspendiert, mit 2 µl RNase (Stock 10 mg/ml) versetzt und 10 min lang bei 37 °C inkubiert.

### 2.2.3 Nukleinsäure-Isolation (RNA, DNA - aus Gewebe)

Für die Isolation von Nukleinsäuren aus tiefgefrorenen Gewebeproben wurden kleine Gewebestücke (20 mg), zusammen mit 600 µl Proteinase K-Puffer (für DNA-Isolation) bzw. 1 ml TRIzol (für RNA-Isolation) in spezielle 2 ml Reaktionsgefäße überführt. Für den effektiven Zellaufschluss befanden sich in den Röhrchen 400 mg eines Mixes aus autoklavierten Keramikkügelchen (CKM) mit einem Durchmesser von 1,4 mm bzw. 2,8 mm. Die Proben wurden anschließend in konventionelle Reaktionsgefäße überführt. Für die RNA-Isolation wurde die TRIzol-Lösung im Folgenden mit 200 µl Chloroform versetzt und die Behandlung anschließend nach den Angaben des RNA-Isolationsprotokolls in „2.2.2 RNA-Isolation“ weitergeführt. Für die DNA-Isolation wurde der Proteinase K Ansatz wiederum mit 500 µl Phenol versetzt und es wurde entsprechend dem DNA-Isolationsprotokoll in „2.2.2 DNA-Isolation (aus Zelllinien)“ verfahren.

### 2.2.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte mit der *Nanoquant* Applikation des *Infinite 200 Multiwell Readers* (Tecan). Dafür wurden 2 µl einer Nukleinsäure-Lösung auf die Quarzlinsen der geöffneten *Nanoquant Plate* pipettiert, sodass bei geschlossener Platte eine durchgehende Flüssigkeitssäule zwischen den Linsen der Platte vorlag. Die Analyse erfolgte unter Verwendung der Software *i-Control*. Hierbei wurden die gemessenen Werte zu den *Blank*-Werten (Absorption der Flüssigkeit, in der die Nukleinsäuren gelöst waren) normalisiert.

### 2.2.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

#### 2.2.5.1 Reverse Transkriptase (RT)-PCR:

Für die Umschreibung von mRNA in cDNA, zum Zwecke von Expressionsanalysen, wurde die M-MLV reverse Transkriptase im entsprechenden M-MLV-Puffer benutzt.

#### 2.2.5.2 DNaseI- Verdau

Zur Entfernung von DNA-Kontaminationen wurde die RNA vor Beginn der RT-PCR mit DNaseI inkubiert. Ein Ansatz war wie folgt zusammengestellt:

10,0 µl	1 µg RNA
2,0 µl	10x DNaseI Puffer
2,0 µl	DNaseI (2U)
1,0 µl	Ribolock (40U)
<hr/>	
20,0 µl	Gesamtvolumen

Die Proben wurden 1 h bei 37 °C und anschließend 10 min lang bei 65 °C inkubiert.

### 2.2.5.3 Primärstrang- Synthese

Die Synthese des Primärstrangs der cDNA erfolgte mit dem nachfolgenden Ansatz unter den in Tabelle 8 angegebenen Bedingungen:

5,0 µl	5x M-MLV-Puffer
8,0 µl	2,5 mM dNTP-Mix
0,5 µl	10 µM Oligo(dT) Primer
0,5 µl	10 µM <i>random</i> Hexamer Primer
10,0 µl	DNase I verdaute RNA
<hr/>	
24,0 µl	Gesamtvolumen

Tabelle 8: Cycler Programm der Primärstrang-Synthese.

Programm	
62 °C	10 min
62°C	Hold
Proben auf Eis abkühlen	
0.5 µl M-MLV RT (100U) + 0.5 µl Ribolock (20U)	
42 °C	Hold
42 °C	60 min
90 °C	5 min
4 °C	Pause

### 2.2.5.4 Semiquantitative Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Diese Methode wurde zur Amplifikation Bisulfit-konvertierter DNA, cDNA und genomischer DNA verwendet. Ein typischer PCR Ansatz sah aus wie folgt:

2,5 µl	10x NH <sub>4</sub> -Puffer
0,5 µl	10 mM dNTP Mix
1,0 µl	10 µM <i>forward</i> Primer
1,0 µl	10 µM <i>reverse</i> Primer
X µl	50 mM MgCl <sub>2</sub> (variable Menge)
Y µl	100% Formamid (variable Menge)
0,5 µl	Taq-Polymerase
<hr/>	
25,0 µl	Gesamtvolumen

Die Konzentrationen von MgCl<sub>2</sub>, Formamid und *annealing*-Temperaturen sind der Tabelle 2, Tabelle 3, Tabelle 5 zu entnehmen.

Die Primer für Expressionsanalysen wurden idealerweise über Exongrenzen hinweg designt. Die optimale *annealing*-Temperatur sowie die optimale Anzahl an Amplifikationszyklen für semi-quantitative Expressionsanalysen wurden empirisch für jedes Primerpaar bestimmt. Für die Amplifikation Bisulfit-konvertierter DNA wurde die Spezifität der verwendeten Primerpaare für BS-DNA gegenüber genomischer DNA bestimmt. Die Amplifikation von BS-DNA wurde pauschal für 44 Zyklen wiederholt.

Ein Standard PCR-Temperaturprofil ist Tabelle 9 zu entnehmen.

**Tabelle 9: Temperaturprofil einer PCR.**

Schritt		Temperatur [°C]	Dauer
1	Hold	95	
2		95	2 min
3	Denaturierung	95	30 s
4	<i>Annealing</i>	X (optimiert für Primer-Paar)	30 s
5	Elongation	72	30 s
Go to 3	44xl wiederholen		
6	Finale Elongation	72	2 min

Für die Amplifikation längerer DNA Fragmente (> 1 kb) wurde der Elongationsschritt entsprechend verlängert (30 s pro 1 kb).

Im Anschluss an die PCR wurden 5 µl PCR Produkt mit 1 µl 6x Ladepuffer versetzt und die anschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese ausgewertet.

### 2.2.5.5 Quantitative Polymerase-Kettenreaktion (qPCR)

Die Reaktionsansätze für quantitative PCR-Experimente wurden in 0,1 ml Strip-Tubes unter Verwendung von 5 µl 2x SYBR Select-Mix, 1 µl eines 4 µM Primermix (*forward*- und *reverse*-Primer), einem variablen Template-Volumen (1-4 µl) und entsprechend ddH<sub>2</sub>O in einem Gesamtvolumen von 10 µl durchgeführt. Die PCR-Amplifikation erfolgte in einem Rotorgene 3000-Cycler, mit einer maximalen Kapazität von 72 Proben pro Durchgang. Die Analyse der Ergebnisse wurde unter Verwendung der Rotorgene6 Software durchgeführt.

Der verwendete SYBRSelect-Mix (Hersteller) beinhaltet einen dNTP-Mix, welcher neben dTTP- auch dUTP-Nukleotiden umfasst. Darüber hinaus sind in jedem Reaktionsansatz Uracil-DNA Glykosylase (UDG)-Enzyme enthalten, welche die N-glykosylische Bindung von Uracilbasen in einzel- und doppelsträngiger DNA schneiden. Zur Aktivierung der Uracil-DNA Glykosylase (UDG) umfasste das qPCR Programm einen initialen 2-minütigen 50 °C Schritt. Die katalytisch aktiven UDG-Enzyme verhindern die erneute Amplifikation verschleppter UTP-haltiger PCR-Produkte aus früheren PCRs. Ein anschließender Denaturierungsschritt bei 95 °C für 2 min diente der Denaturierung der DNA-Templates, aber auch der Inaktivierung der Hitze-labilen UDG-Enzyme. Im Anschluss daran folgte eine klassische dreistufige Abfolge verschiedener Temperaturstufen von 60 °C (15 s), 72 °C (30 s), 95 °C (30 s) für eine variable Anzahl an Zyklen.

Zur Beurteilung der Spezifität der entstandenen PCR-Produkte wurde abschließend eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt: Dafür wurde die Temperatur von 72 °C in 1°C Schritten (für jeweils für 5 s) bis auf 95 °C erhöht.

Für Expressionsanalysen erfolgte die Analyse über die „*Comperative Quantitation*“ Methode. Dabei wird über die 2te Ableitung der Amplifikationsrohdaten jedes PCR-Ansatzes der Abstand zwischen dem „*take off*“ Punkt (Anfang der exponentiellen Phase) und dem Punkt der maximalen Steigung (s)

(Ende der exponentiellen Phase) bestimmt. Die Höhe der Steigung zwischen „take off“ und Maximum dient anschließend der Berechnung der Amplifikationseffizienz (Effizienz,  $E = 10^{(-\frac{1}{s})} - 1$ ); Effizienzen über 1,6 = OK).

Darauf aufbauend wurden anschließend relative Konzentrationen zwischen den Proben eines qPCR files berechnet. Die relativen Konzentrationen beziehen sich alle auf eine spezielle Probe innerhalb des qPCR-Laufs (*calibrator sample*). Auf Grundlage der Amplifikationseffizienz und der Differenz des „take off“ Punkts des Kalibrators (z.B. Probe A) und einer weiteren Probe (z.B. Probe B) wird die relative Konzentration (*comparative concentration*) der Probe B bestimmt (der Kalibrator hat die relative Konzentration 1). Bei der Darstellung von qRT-PCR Daten wurde die erste Probe der Abbildung auf den Faktor 1 gesetzt (vergl. "3. Ergebnisse")

Die Quantifizierung der Chromatin IP (ChIP)- Proben erfolgte über die „Quantitation“ Funktion der RotorGene6 Software. Voraussetzung für die Verwendung dieser Methode ist die Berücksichtigung von Standards, welche sich aus 1% Inputproben und mehreren Verdünnungsstufen (1:10, 1:100) zusammensetzen und der Konstruktion einer Eichkurve dienen. Die Grundlage der Analyse bildet die komperative CT ( $\Delta\Delta CT$ ) Methode ( $R = 2^{(-\Delta\Delta CT)}$ ) (Livak & Schmittgen, 2001).

## 2.2.6 Klonierungen

### 2.2.6.1 Mutagenese-PCR zur Manipulation von Plasmidsequenzen

Die Deletion von DNA-Sequenzen oder die Insertion von Restriktionsenzym-Schnittstellen *in vitro* erfolgte mittels des *Quikchange site directed mutagenesis*- Kit der Firma *Agilent Technologies*. Die verwendeten Primer wurden mit einer Online-Software von *Agilent Technologies* designt (<http://www.genomics.agilent.com/article.jsp?pageId=7100004>). Die Durchführung erfolgte, wie nachfolgend aufgeführt, abgewandelt nach den Gebrauchsinformationen:

X µl	Plasmid-DNA (100 ng)
5,0 µl	10× <i>Reaktionspuffer</i>
1,5 µl	<i>Quiksolution</i>
0,5µl	<i>Pfu</i> Ultra High Fidelity DNA polymerase (1,25U)
1,3 µl	10 µM Primer1
1,3 µl	10 µM Primer2
1,0 µl	dNTP Mix

---

50 µl mit ddH<sub>2</sub>O

Die verwendeten Mutagenese-Primer sind in der Klonierungsübersicht (Abbildung 10) angegeben.

Die Amplifikation von Vektorsequenzen erfolgte nach dem folgenden Schema:

95 °C	2 min
95 °C	20 s
60 °C	10 s
68 °C	30 s/kb
68 °C	5 min

Anschließend wurden die Adenin-methylierten Ausgangsvektoren mit 1,0 µl DpnI-Enzym (5 U) 1 h bei 37 °C verdaut.

### 2.2.6.2 Verdau von Vektorsequenzen

Für präparative Restriktionsansätze wurden 10 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtansatz von 50 µl mit 20 U Restriktionsenzymen (oder einer Kombination mehrerer Enzyme) unter optimalen Puffer- und Inkubationsbedingungen 3 h lang verdaut. Bei der Verwendung mehrerer Restriktionsenzyme wurden die optimalen Pufferbedingungen mit dem *double digest finder* von Thermo Scientific (<http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest/>) bestimmt. Die Proben wurden anschließend auf einem Agarose-Gel (Konzentration abhängig von der Größe der DNA-Fragmente) aufgetrennt.

Für die Überprüfung der Integrität und des qualitativen Verdaumusters eines bestimmten Plasmids wurden 200 ng Vektor-DNA in einem 10 µl Ansatz 1 h lang verdaut.

### 2.2.6.3 Dephosphorylierung von Vektorsequenzen

Die Dephosphorylierung von linearen DNA-Molekülen erfolgte durch Inkubation von 2 µg DNA mit 2 µl der alkalischen Phosphatase *FastAP* und 1 µl 10x FastAP-Puffer in einem Gesamtansatz von 10 µl. Der Ansatz wurde 45 min bei 37 °C inkubiert und anschließend wurde die DNA mit einem Gelextraktionskit aufgereinigt.

### 2.2.6.4 Ligation

Für die Ligation wurden Vektor und *insert* in einem Verhältnis von 1:3 eingesetzt und zusammen mit 1 µl T4 DNA Ligase und 1 µl 10x Ligase Puffer mit ddH<sub>2</sub>O auf einen Gesamtansatz von 10 µl gebracht und über Nacht bei RT inkubiert. Die eingesetzten Verhältnisse aus Vektor und *insert* wurden vor der Ligationsreaktion jeweils mittels Agarose-Gelelektrophorese bestimmt.

### 2.2.6.5 Gelelektrophorese

Für die Analyse von DNA Proben wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Die Agarosekonzentration wurde entsprechend der Größe der zu trennenden DNA Fragmente variiert (2% Agarose für DNA Fragmente <1 kb, 1% Agarose für DNA Fragmente >1 kb), um eine optimale Auflösung zu erreichen. Die Agarose wurde in 0,5% TBE aufgekocht, mit Ethidiumbromid versetzt und im horizontalen Agarose Gel System von Peqlab eingesetzt. DNA Proben wurden mit 1:6 6x Ladepuffer (Glycerin, TBE, Bromphenolrot) gemischt und ca. 15 min bei 200 V aufgetrennt. Die Analyse und Dokumentation erfolgte auf einem UV-Tisch bei einer Wellenlänge von ca. 300 nm.

### 2.2.6.6 Gelextraktion

Die Aufreinigung von DNA Fragmenten aus Restriktionsansätzen oder PCR-Produkten erfolgte mit dem NucleoSpin®Extract II Kit, gemäß Bedienungsanleitung.

### 2.2.6.7 Transformation

Arbeiten mit Bakterienkulturen wurden unter sterilen Bedingungen und unter Benutzung eines Bunsenbrenners durchgeführt. Die Bakterien wurden auf LB-Agaroseplatten oder in LB-Flüssigmedium unter Antibiotika-Selektion über Nacht bei 37 °C kultiviert.

Für die Transformation wurden 45 µl kompetente Zellen zusammen mit 5 µl Ligationsansatz 15 min lang auf Eis inkubiert. Es folgten ein Hitzeschock bei 42 °C für 45 s und ein weiterer Inkubationsschritt von 2 min auf Eis. Nach Zugabe von 200 µl SOC Medium und 1 h Inkubation bei 37 °C wurde der Transformationsansatz auf eine LB-Agar Platte mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen.

### 2.2.6.8 Plasmid-Präparation

Die Plasmid-Präparation erfolgte mittels NucleoSpin® Plasmid Kits von Macharay-Nagel.

### 2.2.6.9 Klonierungsstrategien

Der Tabelle 10 sind die verschiedenen Klonierungsstrategien für die in dieser Arbeit generierten Plasmide zu entnehmen. Bei den Klonierungsschritten sind in der Zeile „DNA-Komponenten“ das *insert* rechts und das Plasmidsystem links aufgeführt. In der Zeile „Enzyme“ sind die verwendeten Restriktionsenzyme entsprechend ihrer Bezeichnung von Thermo-Fischer aufgeführt (in Klammern dahinter sind bei einigen Restriktionsenzymen die New England Biolabs (NEB)-Bezeichnungen angegeben). Am Ende der jeweiligen Klonierungsschritte wurden *insert* und Vektor ligiert. Für die konventionellen PCRs und Mutagenese-PCR sind jeweils das DNA-Template und die verwendeten Primer angegeben. Die PCR Bedingungen lassen sich aus Tabelle 9 entnehmen. Bei kommerziell erhältlichen cDNA-Klonen, bei denen eine Mutagenese-PCRs durchgeführt wurde ist die Source Bioscience ID aufgeführt.

**Tabelle 10: Übersicht über die Klonierungen, Subklonierungen und die mutagenisierten Vektoren.** Die Antibiotika-Resistenzen zur Selektion der Vektoren in Bakterien und eukaryotischen Zellen sind in Tabelle 7 angegeben.

<b>Name</b>	<b>pGEM-T_0,5-RF1A-P.</b>	
<b>Beschreibung</b>	Subklonierung eines 0,5 kb langen <i>RASSF1A</i> -Promotor PCR-Fragments in pGEM-T	
<b>DNA-Komponenten</b>	linearer pGEM-T (Promega)	PCR-Produkt: 0,5 kb <i>RASSF1A</i> -Promotersequenz Template: genomische DNA (humane Fibroblasten) Verwendete Primer: PSP2U1: GAATTCATTAATTGGAGAGCAGAGCGGGCGGTA PSL1: GAATTCACCGGTTCCAGGCTCCCCGACATGGC
<b>Enzyme</b>	-	-
<b>Name</b>	<b>pGEM-T_1,8-RF1A-P.</b>	
<b>Beschreibung</b>	Subklonierung eines 1,8 kb langen <i>RASSF1A</i> -Promotor PCR-Fragments in pGEM-T	
<b>DNA-Komponenten</b>	linearer pGEM-T (Promega)	PCR-Produkt: 1,8 kb <i>RASSF1A</i> -Promoter Template: genomische DNA (humane Fibroblasten) Primer: RF1AXHOASEU1: TCGAGATTAATACTGTGGAGGGCTGGAAGACCGG pr-3l: CTCGAGCCTTCACTTGGGGT
<b>Enzyme</b>	-	-
<b>Name</b>	<b>pRL-0,5_RF1A</b>	
<b>Beschreibung</b>	Klonierung des 0,5 kb <i>RASSF1A</i> -Promotorfragments in pRL-Null (Promega)	
<b>DNA-Komponenten</b>	pRL Null	pGEM-T_0,5 kb-RF1A-P.
<b>Enzyme</b>	EcoRI	EcoRI
<b>Name</b>	<b>pRL-2,3_RF1A</b>	
<b>Beschreibung</b>	Erweiterung des 0,5 kb <i>RASSF1A</i> -Promotors um ein <i>upstream</i> gelegenes 1,8 kb DNA-Fragment unter Bildung eines 2,3 kb langen <i>RASSF1A</i> -Promotor Luciferase-Reporters	
<b>DNA-Komponenten</b>	pRL-0,5 kb_RF1A	pGEM-T_1,8 kb-RF1A-P.
<b>Enzyme</b>	XhoI +Dephosphorylierung	XhoI
<b>Name</b>	<b>pEGFPC1-BglII-Ins.</b>	
<b>Beschreibung</b>	Mutagenese-PCR: Veränderung einer AseI- zu einer BglII- Schnittstelle , um über BglII die „CMV-Promotor/ EGFP“ Kassetten aus pEGFPC1 rausschneiden zu können (1. BglII site vor CMV-Promoter, 2. BglII site im EGFP Gen)	
<b>DNA-Komponenten</b>	Template: pEGFPC1 (Clontech) Mutagenese-Primer: EFPCMVBGL2U1: ATTACCGCCATGCATTAGATCTTAATAGTAATCAATTACG EFPCMVBGL2L1: CGTAATTGATTACTATTAAGATCTAATGCATGGCGGTAAT	-
<b>Enzyme</b>	-	-

<b>Name</b>	<b>pRL-EGFP-0,5_RF1A</b>	
<b>Beschreibung</b>	Klonierung eines Fragments aus CMV-Promotor und eine C-Terminal verkürzten EGFP-cDNA in den 0,5 kb RASSF1A-Luciferase Promotor	
<b>DNA-Komponenten</b>	pRL-0,5_RF1A	pEGFPC1_BgIII-Ins.
<b>Enzyme</b>	BgIII	BgIII
<b>Name</b>	<b>pRL-EGFP 2,3_RF1A</b>	
<b>Beschreibung</b>	Klonierung eines Fragments, bestehend aus CMV-Promotor und einer C-Terminal verkürzten EGFP-cDNA, in den 2,3 kb RASSF1A-Luciferase Promotor	
<b>DNA-Komponenten</b>	pRL 2,3 kb-RF1A-Prom._RLuc	pEGFPC1_BgIII-Ins.
<b>Enzyme</b>	BgIII	BgIII
<b>Name</b>	<b>pRL Null (2)</b>	
<b>Beschreibung</b>	Erstellung eines Kontrollvektor für Luciferaseassays ohne hohe Hintergrundaktivität (ohne T7 Promotor) ( <i>multi cloning site</i> + T7-Promoter (-17 bis +2, inkl. TATA + Transkriptionsinitiationssite) deletiert)	
<b>DNA-Komponenten</b>	pRL Null	-
<b>Enzyme</b>	BcuI/ (SpeI) + NheI	-
<b>Name</b>	<b>pcDNA4-TO-EGFP-0,5-LUC</b>	
<b>Beschreibung</b>	Übertragung des EGFP/ Renilla Luciferase-Doppelreporters aus pRL-EGFP-0,5_RF1A in ein Tetracyclin-induzierbares pcDNA4-TO System	
<b>DNA-Komponenten</b>	pcDNA4-TO-C	pRL-EGFP-0,5_RF1A
<b>Enzyme</b>	EcoRV + NotI	AfeI + NotI
<b>Name</b>	<b>pcDNA4-TO-EGFP-2,3-LUC (1)</b>	
<b>Beschreibung</b>	Übertragung des EGFP/ Renilla Luciferase-Doppelreporters aus pRL-EGFP-2,3_RF1A in ein Tetracyclin-induzierbares pcDNA4-TO System. Klonierungsprodukt enthält noch den CMV-Promotor aus der „CMV-EGFP-2,3-LUC“-Kassette und ist nicht induzierbar (TO-CMV-Promotor-CMV-Promotor-EGFP-Sequenz).	
<b>DNA-Komponenten</b>	pcDNA4- TO-C	pRL-EGFP-2,3_RF1A
<b>Enzyme</b>	EcoRV + NotI	SnaBI + NotI
<b>Name</b>	<b>pcDNA4-TO-EGFP-2,3-LUC (2)</b>	
<b>Beschreibung</b>	Entfernung der „TO-CMV-Promotor-CMV-Promotor-EGFP-Sequenz aus dem Vektor pcDNA4-TO-EGFP-2,3-LUC (1) und Austausch gegen die (TO-CMV-Promotor-EGFP-Sequenz aus pcDNA4-TO-EGFP-0,5_RF1A.	
<b>DNA-Komponenten</b>	pcDNA4-TO-EGFP-2,3-LUC (1)	pcDNA4-TO-EGFP-0,5_RF1A
<b>Enzyme</b>	Kpn2I	Kpn2I
<b>Name</b>	<b>pcDNA4-TO-EGFP-2,3-LUC (3)</b>	
<b>Beschreibung</b>	Mutagenese-PCR: Entfernung eines Stop-Codons am 3'-Ende der EGFP-cDNA	
<b>DNA-Komponenten</b>	Template: pcDNA4-TO-EGFP-2,3-LUC (2) Primer: StopEGFPMutL1: GACTCAGATCTCGAGATCCTGCCTCTACTCAC StopEGFPMutU1: GTGAGTAGAGGCAGGATCTCGAGATCTGAGTC	-
<b>Enzyme</b>	-	-
<b>Name</b>	<b>pcDNA4-0,5-LUC</b>	
<b>Beschreibung</b>	Entfernung der induzierbaren EGFP-Kassette. Dadurch entsteht ein Renilla Luciferase-Reporter in einem pcDNA4-Vektorsystem.	
<b>DNA-Komponenten</b>	pcDNA4-TO-EGFP-0,5-LUC	-
<b>Enzyme</b>	BgIII	-
<b>Name</b>	<b>pGEM-T-EGFP-SV40pA</b>	
<b>Beschreibung</b>	Amplifikation des C-Terminus von EGFP und der nachfolgenden SV40 polyA-Sequenz aus pEGFPC1 und Subklonierung der Sequenz in pGEM-T	
<b>DNA-Komponenten</b>	Linearer pGEM-T	PCR: Sequenz aus EGFP-C-Term, SV40-polyA und jeweils flankierenden BsiwI-Schnittstellen Template: pEGFPC1 Primer: BsiwIMutU1: AGGCAGGATCTCGAGATCTGAGCGTACGCTTGTACAGCTCGTCCATGCCG BsiwIMutL1: CGGCATGGACGAGCTGTACAAGCGTACGCTCAGATCTCGAGATCTGCCT
<b>Enzyme</b>	-	-

<b>Name</b>	<b>pcDNA4-TO-EGFPpA-2,3-LUC (1)</b>	
<b>Beschreibung</b>	Einfügen des C-Terminus der EGFP-cDNA und einer SV40-polyA Sequenz in den pcDNA4-TO-EGFP-2,3-LUC Vektor	
<b>DNA-Komponenten</b>	pcDNA4-TO-EGFPpA-2,3-LUC (3)	pGEM-T-EGFP-SV40pA
<b>Enzyme</b>	BsiwI	BsiwI

<b>Name</b>	<b>pcDNA4-Null-LUC</b>	
<b>Beschreibung</b>	Erstellung eines Renilla Luciferase-Kontrollvektors ohne Promotorsequenzen in einem pcDNA4 System. Der Vektor dient als Kontrollvektor für Experimente mit pcDNA4-0,5-LUC.	
<b>DNA-Komponenten</b>	pcDNA4-2,3-LUC	-
<b>Enzyme</b>	Scal	-

<b>Name</b>	<b>pcDNA4-TO-EGFPpA-0,5-LUC</b>	
<b>Beschreibung</b>	Entfernung eines 1,8 kb langen <i>RASSF1A</i> Promotorfragments aus dem Vektor „pcDNA4-TO-EGFPpA-2,3-LUC (1)“. Es bleibt eine 0,5 kb lange <i>RASSF1A</i> Promotorsequenz erhalten.	
<b>DNA-Komponenten</b>	pcDNA4-TO-EGFPpA-2,3-LUC	-
<b>Enzyme</b>	XhoI	-

<b>Name</b>	<b>pBluescriptT_ABCB4-Xmal - Steffi Herkt</b>	
<b>Beschreibung</b>	Mutagenese-PCR, zur Erzeugung einer Xmal Schnittstelle am C-Terminus der ABCB4-cDNA	
<b>DNA-Komponenten</b>	Template: pBluescriptT_ABCB4 (IRATp970F09103D) Primer: ABCB4MutU: CGCCCTGTGATTGGTGGGCGTCCGG ABCB4MutL: CCGGACGCCCAATCACAGGGCG	-
<b>Enzyme</b>	-	-

<b>Name</b>	<b>pEGFPC1_ABCB4 - Steffi Herkt</b>	
<b>Beschreibung</b>	Klonierung eines ABCB4 Überexpressionskonstrukts	
<b>DNA-Komponenten</b>	pEGFPC1	pBluescriptT ABCB4-Xmal
<b>Enzyme</b>	SacII + Xmal	SacII + Xmal

<b>Name</b>	<b>pGEM-T_0,5-RF1A-P.</b>	
<b>Beschreibung</b>	Subklonierung eines 0,5 kb langen <i>RASSF1A</i> -Promotor PCR-Fragments in pGEM-T	
<b>DNA-Komponenten</b>	linearer pGEM-T (Promega)	PCR-Produkt: 0,5 kb <i>ABCB4</i> -Promotersequenz Template: genomische DNA (humane Fibroblasten) Verwendete Primer: ABCB4Bg 2AseI U1: GAGTCTTTGGGAAGAGTGTGGAGGAATTA ABCB4EcoRI L1: GAATTCGCGCGTGTCTGGCAGG
<b>Enzyme</b>	-	-

<b>Name</b>	<b>pOTB7- CPSF1 (1)</b>	
<b>Beschreibung</b>	Mutagenese-PCR, zur Erzeugung von BamHI- und EcoRI-Schnittstellen am 5' Ende von CPSF1 einfügen	
<b>DNA-Komponenten</b>	Template: pOTB7-CPSF1 (IRAU p969E0360D) Primer: BamEcoMutU1: GTCGGCTCCAAGTCCAGGATCCGAATTCGCCGGGTT BamEcoMutL1: AACCCGGGCGAATTCGGATCCTGGCAGTTGGAGCCGAC	-
<b>Enzyme</b>	-	-

<b>Name</b>	<b>pOTB7- CPSF1 (2)</b>	
<b>Beschreibung</b>	Mutagenese-PCR, zur Erzeugung einer EcoRV-Schnittstelle am 3' Ende von CPSF1	
<b>DNA-Komponenten</b>	Template: pOTB7-CPSF1 (1) Primer: EcoRVMutU1: CGTCACCGCCCACTTCTAGATATCTGGATGCCGTCACCACCAG EcoRVMutL1: CTGGTGGTGACGGCATCCAGATATCTAGAAGTGGGCGGTGACG	-
<b>Enzyme</b>	-	-

<b>Name</b>	<b>pEGFPC2_CPSF1</b>	
<b>Beschreibung</b>	Klonierung der <i>CPSF1</i> -cDNA in pEGFPC2	
<b>DNA-Komponenten</b>	pEGFPC2	pOTB7-CPSF1 (2)
<b>Enzyme</b>	EcoRI, SmaI	EcoRI, EcoRV

<b>Name</b>	<b>pCMV_CPSF1</b>	
<b>Beschreibung</b>	Klonierung der <i>CPSF1</i> -cDNA in pCMV_(EcoRI)-Tag1	
<b>DNA-Komponenten</b>	pCMV (EcoRI)	pOTB7-CPSF1 (BamEco, EcoRV)
<b>Enzyme</b>	BamHI, EcoRV	EcoRI, EcoRV

<b>Name</b>	<b>pEGFPC2_DNMT1</b>	
<b>Beschreibung</b>	Umklonierung der <i>DNMT1</i> -cDNA in einen <i>EGFP</i> -Vektor	
<b>DNA-Komponenten</b>	pEGFPC2	pcDNA3_DNMT1
<b>Enzyme</b>	Sall, EcoRI	Sall, EcoRI

<b>Name</b>	<b>pcDNA6-DNMT1-EGFP</b>	
<b>Beschreibung</b>	Umklonierung von <i>DNMT1-EGFP</i> in ein System mit Blasticidin-Resistenz (pcDNA6)	
<b>DNA-Komponenten</b>	pcDNA6-TR	EGFPC2_DNMT1
<b>Enzyme</b>	NheI/ XhoI	NheI/ Sall - Scal

<b>Name</b>	<b>pcDNA6-Dnmt3a-EGFP</b>	
<b>Beschreibung</b>	Umklonierung von <i>Dnmt3a-EGFP</i> in ein System mit Blasticidin-Resistenz	
<b>DNA-Komponenten</b>	pcDNA6/TR	Dnmt3a-EGFP
<b>Enzyme</b>	NheI/XhoI	NheI/ Sall

## 2.2.7 Methylierungsanalysen

### 2.2.7.1 Bisulfit (BS)-Konvertierung

Zentrales Element der Bisulfit-Reaktion ist die Konvertierung unmethylierter Cytosinbasen in einzelsträngiger DNA zu Uracilbasen. 5-Methyl substituierte Cytosinbasen (5-mC) bleiben als Cytosine in der DNA Sequenz als solche erhalten. Auf die Bisulfitkonvertierung folgt eine Amplifikation der behandelten DNA mittels PCR. Die Uracilbasen verhalten sich in ihrem Basenpaarungsverhalten wie Thymin und werden im Laufe der PCR in ihrem Anteil von Thyminbasen verdrängt. Die Methylierungsanalyse auf Grundlage der Bisulfit-Konvertierung liefert DNA-Methylierungsinformationen auf Einzelnukleotid-Niveau (im Gegensatz zu Immunopräzipitation-basierenden Methoden). Diese Methode lässt jedoch keine Unterscheidung zwischen 5-Methylcytosin (5-mC) und 5-Hydroxymethylcytosin (5-hmC) zu, da beide Cytosin-Modifikationen nach Bisulfitbehandlung als Cytosine erhalten bleiben und 5hm-C nicht zu Uracil konvertiert wird.

Die Bisulfit-Behandlung wurde modifiziert nach Clark et al. (1994) durchgeführt (Clark et al, 1994). Pro Konvertierungsansatz wurden 2 µg DNA in 18 µl ddH<sub>2</sub>O mit 2 µl 3 M NaOH versetzt und anschließend 10 min lang bei 37 °C inkubiert um eine Denaturierung der DNA zu erzielen. Anschließend wurde diese Probe mit 208 µl 2 M Natrium-Metabisulfit und 15 µl 0,1 M Hydrochinon versetzt, gut gemischt und anschließend für 15-17 h bei 50 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die DNA mittels eines DNA-Extraktionskits (*NucleoSpin*<sup>®</sup>) aufgereinigt und anschließend in 50 µl ddH<sub>2</sub>O eluiert. Im Anschluss daran erfolgte durch Zugabe von 5 µl 3 M NaOH und Inkubation für 10 min bei 37 °C die Desulfonierung der BS-behandelten DNA. Danach wurde der DNA-Ansatz mit 5 µl Glykogen (2 mg/ml), 55 µl 7,5 M Ammoniumacetat und 275 µl 100% Ethanol versetzt, gründlich

geschüttelt und 10 min lang bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gefällt. Anschließend wurde die DNA 10 min lang bei 13.000 rpm pelletiert. Im nächsten Schritt wurde das DNA-Pellet mit  $100\text{ }\mu\text{l}$  70% Ethanol gewaschen und anschließend 2 min lang bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde danach vollständig entfernt und das Pellet für einige Minuten bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in  $20\text{ }\mu\text{l}$  ddH<sub>2</sub>O gelöst.

Zusätzlich wurden auch Bisulfitkonvertierungskits von EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen) und EZ DNA-Methylation™ Kit (Zymo Research) benutzt und nach den entsprechenden Gebrauchsinformationen durchgeführt.

### 2.2.7.2 *In vitro* Methylierung

Zur Generierung von Positivkontrollen für die DNA-Methylierungsanalysen wurden  $20\text{ }\mu\text{g}$  genomische DNA mit  $15\text{ }\mu\text{l}$  M.SssI,  $1\text{ }\mu\text{l}$  200x SAM und  $20\text{ }\mu\text{l}$  NEBuffer2 versetzt und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von  $200\text{ }\mu\text{l}$  gebracht. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach 2-3 h wurde zusätzlich  $1\text{ }\mu\text{l}$  200x SAM zum Reaktionsansatz dazu gegeben. Die Aufreinigung erfolgte mittels Phenol-Chloroform Extraktion (siehe Abschnitt:

2.2.2. DNA-Isolation (aus Zelllinien)).

### 2.2.7.3 Combined Bisulfite Restriction Analysis (CoBRA)

Die qualitative Analyse des DNA-Methylierungsstatus von genomischen DNA-Sequenzen erfolgte mit Hilfe der *Combined Bisulfite Restriction Analysis* (CoBRA) Methode (Xiong & Laird, 1997). Dafür wurde Bisulfit konvertierte DNA als Template für die PCR Amplifikation von CG-reichen Promotorbereichen bestimmter Gene verwendet. Anschließend erfolgte ein 1-stündiger Restriktionsverdau der PCR-Produkte mit spezifischen Restriktionsenzymen (Restriktionsenzyme deren DNA Bindemotive CG Sequenzen enthalten: TaqI, BstUI) bei einer enzymespezifischen Inkubationstemperatur. Die Analyse des Methylierungsstatus erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese. Methylierte Ausgangs-DNA lässt sich aufgrund eines positiven Restriktionsverdaus von unmethylierten Proben unterscheiden. Nachfolgend ist ein Restriktionsansatz aufgeführt.

5,0 $\mu\text{l}$	PCR-Produkt (50 ng)
1,0 $\mu\text{l}$	10x Puffer
0,5 $\mu\text{l}$	Restriktionsenzym (TaqI/ BstUI – 10 U/ $\mu\text{l}$ )
3,5 $\mu\text{l}$	ddH <sub>2</sub> O
10,0	$\mu\text{l}$ Gesamtansatz

In einem Kontrollansatz (*mock*) wurde zusätzlich der gleiche Reaktionsansatz (d.h. gleiches PCR-Ansatz-Volumen, gleiche Pufferbedingungen), jedoch ohne Restriktionsenzym in einem Gesamtvolumen von  $10\text{ }\mu\text{l}$  für 1 h zusammen mit den enzymhaltigen Proben inkubiert. Alle Proben wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

### 2.2.7.4 Pyrosequenzierung

Die Pyrosequenzierung wurde zur quantitativen Analyse von DNA-Methylierungsleveln eingesetzt. Die Grundlage der Sequenzierungsreaktion bilden PCR-Produkte aus der Amplifikation einer Bisulfit-konvertierten Promotorregion. Die PCR-Amplifikation erfolgt unter Verwendung eines Biotin-

gekoppelten Primers (und eines unmodifizierten Primers), sodass die PCR-Produkte über den Biotintag an Streptavidin-gekoppelte Sepharosekügelchen gebunden werden können.

Für die Bindung von PCR-Produkten an Sepharose-*beads* wurden 10 µl PCR Produkt (50-100 ng) mit 40 µl *binding buffer* und 2 µl Sepharose-*beads* zusammen mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 80 µl gebracht und 5 min lang auf einem Schüttler bei RT inkubiert.

Ein anschließender Denaturierungsschritt des PCR-Produkts mittels 70% Ethanol und 0,2 M NaOH diente der Trennung von Komplementärstrang und Templatestrang. Durch Einsatz einer Vakuumpumpe wurden Komplementärstränge und sonstige störende Chemikalien entfernt und nur die biotinylierten PCR-Sequenzen als Template für die Sequenzierung übrig behalten.

Die immobilisierten Templatestränge wurden anschließend über die Vakuumpumpe in ein spezielles *well* überführt, in welchem bereits 25 µl 0,3 µM Sequenzierprimer in *annealing*-Puffer vorgelegt wurden. Anschließend wurde dieser Ansatz 2 min auf 80 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen des einzelsträngigen Templates aufzulösen. Im Anschluss daran wurde der Sequenzieransatz innerhalb von 5 min auf RT abgekühlt, wobei der Sequenzierprimer spezifisch an den Templatestrang hybridisiert.

Es folgte die eigentliche Sequenzier-Reaktion, die eine wiederkehrende Abfolge der folgenden Schritte darstellte: Der Pyrosequenzierer injiziert ein bestimmtes Volumen eines Enzym-Mixes, bestehend aus DNA-Polymerase, ATP-Sulfurylase, Luciferase und Apyrase, und eines Substrat-Mixes (bestehend aus APS, Luciferin) in das *well*, in dem die Sequenzierprimer/PCR-Produkt-Hybride vorliegen. In einer definierten Abfolge werden anschließend verschiedene Nukleosid-Phosphat-Sulfate in die Reaktionskammer injiziert. Im Anschluss an die Inkooperation eines bestimmten Nukleotids kommt es zur Abspaltung äquimolarer Mengen von Pyrophosphat (PPi). Die ATP-Sulfurylase wandelt PPi, in Gegenwart von Adenosin-5'-Phosphosulfat (APS) in Adenosintriphosphat (ATP) um (APS kann von der ATP-Sulfurylase nicht als Substrat verwendet werden). Das ATP dient der Luciferase zur katalysierten Umwandlung von Luciferin in Oxyluciferin. Oxyluciferin wiederum emittiert ein Photon und fällt in den Grundzustand zurück, wobei die Lichtmenge proportional zur ATP-Menge ist. Das Licht wird schließlich von einem CCD-Chip detektiert. Im Anschluss daran baut die Apyrase (Nukleotid-degradierendes Enzym) nicht-inkooperierte Nukleotide und ATP ab. Wenn der Abbau abgeschlossen ist, wird der Vorgang mit einem anderen Nukleotid wiederholt. Die Auswertung der Pyrosequenzierung erfolgte mit der *Pyromark* Software von *Qiagen*.

#### **2.2.7.5 Illumina 450k Bead-Chip Array**

Genomweite DNA-Methylierungsanalysen wurden unter Verwendung der *Human Methylation450 BeadChip Array* Technologie von *Illumina* durchgeführt. Die Probenvorbereitung, der Scanning Prozess und die Rohdaten Gewinnung wurde in Kooperation mit Dr. Hoffmann und Mitarbeitern (*life & brain*, Bonn) durchgeführt.

Der 450k Bead-Chip Array bietet die Möglichkeit pro Chip 12 Proben zu analysieren und jeweils Informationen über die DNA-Methylierung, auf Einzelnukleotid-Niveau, von mehr als 485.000 unterschiedlichen Positionen verteilt über das gesamte Genom, zu gewinnen. Der Array liefert DNA-Methylierungsinformationen zu 99% aller annotierten humanen Gene. Pro Gen werden durchschnittlich 17 CpGs untersucht und diese verteilen sich wiederum auf Promotorregion, 5'UTR-Region, 1stes Exon, Genkörper (*gene body*) und 3'UTR-Region. Es werden 96% der annotierten humanen CpG-Inseln abgedeckt, inklusive der flankierenden Bereiche ([http://www.illumina.com/products/methylation\\_450\\_beadchip\\_kits.html](http://www.illumina.com/products/methylation_450_beadchip_kits.html)).

Die Probenvorbereitung startet mit einer konventionellen Bisulfit-Konvertierung von genomischer DNA (methylierte Cytosin-Nukleotide bleiben als Cytosine erhalten, unmethylierte Cytosin-Basen

werden zu Uracil-Basen deaminiert), als Grundlage für die Unterscheidung zwischen methylierten bzw. unmethylierten Cytosin Nukleotiden auf Einzelnukleotid Niveau. Für die Konvertierungsreaktion wurde das EpiTect Bisulfite Kit von Qiagen verwendet.

Es folgte eine Amplifikation der Bisulfite-konvertierten DNA mittels Hexamer-Primern und eine anschließende enzymatische Fragmentierung der DNA. Im Anschluss daran wurden diese Fragmente erst in Alkohol gefällt, dann in Hybridisierungspuffer resuspendiert und schließlich auf einem Bead Chip aufgetragen.

Der Chip ist mit Silica Beads beschichtet, an welche wiederum 50mer Oligonukleotid Sonden gebunden sind. Bei der hier verwendeten Art von *Illumina* Chips werden 2 Arten von Sonden Design (InfiniumI, InfiniumII) kombiniert (Bibikova et al, 2011). Jedes CpG ist jeweils durch verschiedene Sonden mehrfach auf dem Chip vertreten. Bei der InfiniumI Technologie gibt es pro untersuchtem CpG Lokus 2 Sondentypen, von denen eine ausschließlich mit der Sequenz eines ursprünglich methylierten BS-DNA Fragment hybridisieren kann und eine Sonde, welche ausschließlich mit einem „unmethylierten“ BS-DNA Fragment hybridisieren kann. Die verschiedenen Sondentypen befinden sich auf verschiedenen Positionen des Chips. Nachdem eine Hybridisierung erfolgt ist und ungebundene bzw. unspezifisch-gebundene BS-DNA Fragmente gewaschen wurden, wird die Sequenz der Sonde am 3'-Ende um ein einzelnes Fluoreszenz-gekoppeltes Didesoxynukleotid verlängert (das hybridisierte BS-DNA Fragment dient dabei als Template). Mittels eines *Illumina* iScan Systems werden die Fluorophore anschließend angeregt und ein hochaufgelöstes Bild der emittierten Signale erstellt. Die Analyse der Position des Fluoreszenzsignals gibt anschließend Aufschluss über den Methylierungszustand.

Bei der InfiniumII Technologie erfolgt die BS-DNA Hybridisierung an eine entsprechende komplementäre Sonde auf dem Chips unabhängig vom Methylierungsstatus des BS-DNA Fragments. Die Unterscheidung zwischen „methyliert“ und „unmethyliert“ erfolgt im Anschluss an die Hybridisierung durch Addition eines, zur BS-DNA komplementären und Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotids an das 3'-Ende der Sonde. Durch den Einsatz von Nukleotiden, welche mit verschiedenen Fluorophoren gekoppelt sind, wird nach der Analyse mit einem iScan System, die Unterscheidung in methylierte und unmethylierte CGs gewährleistet.

Die Analyse der so gewonnen Rohdaten und die Skripte zur bioinformatischen Auswertung, auf Grundlage deren die Abbildungen des Ergebnisteils generiert wurden, erfolgte durch Tobias Zimmermann, unter der Betreuung von Marek Bartkuhn.

## 2.2.8 Proteinanalytik

### 2.2.8.1 Bradford Assay

Die Bestimmung der Protein-Konzentration erfolgte nach der Methode von Bradford et al., 1976. Das Prinzip beruht auf der Bindung zwischen unpolaren Proteinseitenketten und dem Farbstoff *Coomassie Brilliant Blue*, wobei sich nach Komplexbildung das Absorptionsmaximums des Farbstoffs von 470 nm auf 595 nm verschiebt (Bradford, 1976).

Es wurde eine BSA Verdünnungsreihe (0, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100 µg/ml) erstellt, auf deren Grundlage die Konzentration von verdünnten (1:100, 1:200) Messproben bestimmt wurde. Jeweils 50 µl der Standards bzw. der unbekannt Proben (in Duplikaten) wurden in ein transparentes 96well pipettiert. Anschließend wurden 150 µl 1x Bradford-Lösung hinzugefügt und 5 min bei RT inkubiert. Die Auswertung der Absorption bei 595 nm erfolgte in einem *Infinite 200 PRO Multiwellreader*.

### 2.2.8.2 SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen anhand ihrer Größe erfolgte nach der Methode von Laemmli et al., 1970. Die denaturierten Proteine wandern dabei in einem elektrischen Feld durch eine Matrix aus Polyacrylamid. Durch den Zusatz von SDS in Puffer und Gelmatrix wird die Auftrennung der Proteine unabhängig von der Eigenladung der Proteine gewährleistet, sondern ausschließlich aufgrund der Länge ihrer Aminosäureketten (Laemmli, 1970).

100 µl einer Proteinsuspension (Konzentration: ca. 2 mg/ml) wurden mit 25 µl 5x Laemmli-Puffer versetzt und zur vollständigen Denaturierung der Proteine 5 min lang auf 95 °C erhitzt. Anschließend wurden die Proben auf Eis abgekühlt und abhängig von der Probenkonzentration 10-20 µl (ca. 20-30 µg) auf ein 12% Polyacrylamid Gel geladen, an welches 2 h lang eine elektrische Spannung von 120 V angelegt wurde.

### 2.2.8.3 Western Blot

Die qualitative Analyse spezifischer Proteine in einem Zelllysat setzt neben der Auftrennung von Proteinen in Polyacrylamid-Gelen, einen anschließenden Transfer der Proteine auf die Oberfläche von Nitrozellulose- oder PVDF- Membranen voraus. Daran schließt sich wiederum ein Antikörpergekoppeltes Nachweisverfahren verschiedener Proteinkomponenten an.

Für den Proteintransfer aus SDS-PA-Gelen wurden ausschließlich PVDF-Membranen verwendet. Diese wurden vor der Verwendung 5 min lang in 100% Methanol aktiviert. Anschließend wurden Membran und SDS-PA-Gel 30 min lang in Blotting Puffer inkubiert. Pro Blot wurden ebenfalls jeweils 2 spezielle Schwämme und Whatman-Papier in Blotting Puffer getränkt. Im Anschluss daran wurden die Komponenten der Blotting Reaktion nach der Anleitung des Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell Systems von Biorad angeordnet: Auf die schwarze Hälfte einer speziellen Plastikklammer wurden Schwamm, Whatman-Papier, Gel, Blot und nochmal Whatman-Papier und Schwamm übereinander gestapelt. Anschließend wurden Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen des Blotting-Ansatzes durch vorsichtiges Pressen entfernt und die Klammer geschlossen. Die Klammer wurde schließlich in eine vertikale Haltevorrichtung gesetzt und diese wiederum in einen Flüssigkeitstank eingesetzt. Es wurde zusätzlich ein Kühlblock mit Eis und kalter Blotting Puffer in den Tank gegeben. Die elektrophoretische Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte 2 h lang bei 350 mA bei 4 °C. Der Blot wurde anschließend 45 min lang bei RT in einer Lösung aus 5% Milchpulver in TBS und 0,05% Tween20 inkubiert, um unspezifische Bindungen zu sättigen.

Im nächsten Schritt wurde der Blot in einer TBS-T (0,05% Tween20) Lösung unter Zusatz von 5% Milchpulverzusatz und einem bestimmten Primärantikörper (Konzentrationen s. Tabelle 11) über Nacht bei 4 °C inkubiert.

**Tabelle 11: Übersicht über die verwendeten Primärantikörperkonzentrationen im Western Blot**

Name	anti-EGFP	anti-GAPDH	anti-Myc-Tag
Ursprung	Kaninchen	Maus	Maus
Verdünnung	1:1.000	1:10.000	1:2.000
Inkubationsdauer	über Nacht	über Nacht	über Nacht

Anschließend wurde der Blot dreimal 10 min lang mit TBS-T (0,05% Tween20) gewaschen. Darauf folgte eine weitere Inkubation des Blots in einer TBS-T (0,05% Tween20) Lösung unter Zusatz von 5%

Milchpulver und eines bestimmten HRP-gekoppelten Sekundärantikörpers, in Abhängigkeit des Primärantikörpers (siehe Tabelle 12).

**Tabelle 12: Übersicht über die verwendeten Sekundärantikörperkonzentrationen im Western Blot**

Name	Ziege anti-Kaninchen gegen anti-EGFP	Ziege anti-Kaninchen gegen anti-GAPDH	Ziege anti-Maus gegen anti-Myc
Ursprung	Ziege	Ziege	Ziege
Verdünnung	1:10.000	1:10.000	1:2.000
Inkubationsdauer	1 h	1 h	ÜN

Dieser Inkubationsschritt wurde für den Nachweis von GAPDH und EGFP 1 h lang bei RT durchgeführt. Für Myc wurde die Inkubation über Nacht bei 4 °C durchgeführt.

Zuletzt wurde der Blot erneut dreimal 10 min mit TBS-T (0,05% Tween20) gewaschen. Sämtliche Inkubationsschritte wurden auf einem Horizontalschüttler durchgeführt.

Die Analyse der Western Blots erfolgte mittels eines VersaDoc Imagers und der Software QuantityOne.

## 2.2.9 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle Arbeiten in der Zellkultur wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt. Alle Glaswaren und Zellkulturmedien wurden 2 h lang auf 180 °C erhitzt. Verschiedene Zelllinien wurden mit speziellen Medien (siehe Tabelle 7) in einem Inkubator bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die Passagierung von Zellen wurden diese zweimal in autoklaviertem 1x PBS gewaschen (Volumen abhängig von Zellkulturschale) und anschließend mit 1 ml Trypsin Lösung bei 37 °C 3 min inkubiert. Nachdem sich die Zellen von der Zellkulturplatte gelöst hatten, wurden sie in entsprechendem Medium verdünnt und auf eine neue Schale überführt.

Für eine stabile Transfektion eukaryotischer Zellen wurden Antibiotika Konzentrationen empirisch anhand einer *kill curve* bestimmt. Die entsprechenden Konzentrationen sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

### 2.2.9.1 Transfektion

Für die Überexpression spezifischer Gene wurden Plasmide mit den entsprechenden cDNAs über Liposomen basierte Methoden in eukaryotische Zellen eingeschleust.

Eine 3,5 cm Zellkulturschale wurden bei ca. 50% Konfluenz (ca. 500.000 Zellen) mit 4 µg Plasmid-DNA transfiziert. Die Art und das Volumen des eingesetzten Transfektionsreagenz wurden empirisch bestimmt und richteten sich nach der verwendeten Zelllinie (Transfektionsbedingungen sind aus Tabelle 13 zu entnehmen). Für die Ausbildung von Liposomenkomplexen wurde die angegebene Plasmid-DNA-Menge in OptiMem oder einer NaCl-Lösung zu einem Transfektionsreagenz in OptiMem oder NaCl-Lösung pipettiert. Nach einer bestimmten Inkubationsdauer (abhängig vom Transfektionsreagenz) wurde der Transfektionsansatz vorsichtig auf die Zellen geträufelt. Am folgenden Tag wurde das Transfektionsmedium durch Vollmedium mit 10% FCS und 1% Pen/ Strep ersetzt. Die Zellen wurden anschließend für 3-5 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

**Tabelle 13: Übersicht der Transfektionsreagenzien abhängig von den verwendeten Zelllinien.**

Zelllinie	Reagenz	Volumen Reagenz	Optimum	Alternativ-medium	DNA-Menge	Optimum	Alternativ-medium	Optimum über den Zellen
HeLa	jetPEI	6 µl	-	100 µl 150 mM NaCl	4 µg	-	100 µl 150 mM NaCl	800 µl DMEM
A549	Turbofect	4 µl	400 µl	-	4 µg	400 µl	-	200 µl
H322	X-treme Gene HP	4 µl	100 µl	-	4 µg	100 µl	-	800 µl
A427	X-treme Gene 9	4 µl	100 µl	-	4 µg	100 µl	-	800 µl
H358	X-treme Gene HP	4 µl	100 µl	-	4 µg	100 µl	-	800 µl
HEK- 293	PEI (4,91 M; pH 7,1)	5 µl	100 µl	-	4 µg	100 µl	-	800 µl
HCT-116	PEI	5 µl	100 µl	-	4 µg	100 µl	-	800 µl

**Tabelle 14: Empirisch bestimmte G418 Konzentrationen von verschiedenen Zelllinien.**

Zelllinie	Medium	G418 (Stocklösung: <sup>50.000 µg</sup> / <sub>ml</sub> )
		[ <sup>µl</sup> / <sub>ml Medium</sub> ]
HeLa	DMEM	20 µl
A549	DMEM	50 µl
H322	DMEM	20 µl
A427	RPMI	5 µl
HEK-293	DMEM	5 µl

### 2.2.9.2 Kolonie Formationsassay

Humane Lungenkrebszelllinien wurden bei ca. 20% Konfluenz (ca. 200.000 Zellen) mit 4 µg Plasmid-DNA transfiziert. Die Art und das Volumen des eingesetzten Transfektionsreagenz wurden empirisch bestimmt und richteten sich nach der verwendeten Zelllinie (Transfektionsbedingungen). Am nächsten Tag wurde das Medium durch Vollmedium (Medium mit 10% FCS, 1% Pen/Strep) mit G418 ersetzt. Die Menge des zugesetzten G418 wurde für jede Zelllinie empirisch mit Hilfe einer *kill curve* bestimmt (Bedingungen s. Tabelle 14). Im Folgenden wurde alle 3-4 Tage das Medium mit G418 ersetzt und nach 3-4 Wochen die gebildeten Zellkolonien mit 1:10 verdünnter GIEMSA-Lösung (5 ml GIEMSA + 45 ml ddH<sub>2</sub>O) gefärbt.

### 2.2.9.3 5-Aza-2'-Desoxycytidin / Zebularin Behandlung

Die Demethylierung genomischer DNA durch die DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (DNMT-I) 5-Azacytidin, 5-Aza-2'-Desoxycytidin bzw. Zebularin beruht auf einer Inkooperation der Cytidin-Analoga während der Replikation in die neusynthetisierte DNA und einer anschließenden Inhibition der DNMT1-Aktivität durch kovalente Bindungen der DNMTs an die DNA (Cheng et al, 2004a).

Die Zellen wurden auf 10 cm Schalen mit 20% (ca. 1,5Mio Zellen) Konfluenz ausgesät. Am nächsten Tag wurden die angehefteten Zellen zweimal mit 5 ml 1x PBS gewaschen und anschließend in 5 ml Medium mit 5  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M 5-Aza-2'-deoxycytidine (5-Aza-2'dC) kultiviert. Die Zellen wurden ebenfalls unter Verwendung verschiedener Zebularin-Konzentrationen (100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M) kultiviert. Zusätzlich wurde jeweils eine Kontrolle ohne zugesetzten DNMT-Inhibitor mitgeführt. Da 5-Aza-2'dC replikationsabhängig in die DNA kooperiert wird, wurde die Behandlung, unter Berücksichtigung der Verdopplungszeit der verwendeten Zelllinien (A549: 22 h (Schmid, 2008) A427: 38 h (Korpi, 2013)), über einen Zeitraum von 4 Tagen durchgeführt. Aufgrund der geringen Stabilität von 5-Aza-2'dC (8-12 h in Zellkultur (Hollenbach et al, 2010)), im humanen System bei <25 min (Karahoca & Momparler, 2013) wurde das Medium mit zugesetzten 5-Aza-2'dC täglich ausgetauscht. Die Behandlung der Zellen mit Zebularin erfolgte ebenfalls über einen Zeitraum von 4 Tagen und das Medium wurde ebenfalls täglich ersetzt, ungeachtet der Tatsache, dass Zebularin eine deutlich längere Halbwertszeit besitzt (Halbwertszeit: 508 h bei pH 7, 37 °C, (Champion et al, 2010)).

#### 2.2.9.4 RNA Interferenz (RNAi)

Eine 3,5 cm Zellkulturschale wurde bei ca. 50% Konfluenz (ca. 500.000 Zellen) mit 50 pmol siRNA und 5  $\mu$ l (HeLa) bzw. 9  $\mu$ l (HCT-116) Lipofecamine RNAiMAX (life-Tech) in Optimem transfiziert: Transfektionsreagenz und siRNA wurden zusammen pipettiert, 30 min bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden über Nacht mit dem Transfektionsansatz in einem Gesamtvolumen von 1 ml bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Art und das Volumen des eingesetzten Transfektionsreagenz wurden empirisch unter Verwendung einer fluoreszierenden Kontroll-siRNA (*siGLO RNAi Control*, GE Dhermacon) bestimmt und richteten sich nach der verwendeten Zelllinie. Am Tag nach der Transfektion wurde das Transfektionsmedium durch Vollmedium mit 10% FCS und 1% Pen/ Strep ersetzt. Die Zellen wurden anschließend für 3-5 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

#### 2.2.10 Immunfluoreszenz

Für die Immunfluoreszenz-Versuche wurden die Zellen auf Deckgläschen in 3,5 cm Zellkulturschalen ausgesät, am folgenden Tag transfiziert (Bedingungen siehe Abschnitt: Transfektion) und anschließend 3-5 Tage bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Nach 3-5 Tagen wurden die Zellen zweimal mit 1 ml 1x PBS gewaschen und anschließend mit 4% Formaldehyd (verdünnt in 1x PBS) für 10 min bei RT fixiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen dreimal 5 min mit jeweils 1 ml 1x PBS gewaschen. Im nächsten Schritt erfolgte die Permeabilisierung von Zell- und Kernmembranen durch Inkubation in 1 ml 0,5% Triton-X100 (verdünnt in 1x PBS) 5 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellen dreimal 5 min lang mit jeweils 1 ml 1x PBS gewaschen.

Zum Absättigen unspezifischer Bindungen wurden die Zellen 15 min mit 1% BSA in PBS bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 1 h lang bei RT in 1 ml einer anti-EGFP Primäantikörperlösung (1:1000 Verdünnung) in 1x PBS inkubiert und danach dreimal 5 min lang mit jeweils 2 ml 1x PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden die Zellen 1 h bei RT in 1 ml einer Ziegenanti-Kaninchen-Alexa-488 Sekundäantikörperlösung (1:1000 Verdünnung) in 1x PBS inkubiert. Darauf folgten 3 Waschschrte für 5 min bei RT in jeweils 2 ml 1x PBS. Durch Zugabe von 2  $\mu$ l DAPI (0,2 mg/ml) in 10 ml 1x PBS für 10 min bei RT wurde anschließend noch die genomische DNA des Zellkerns markiert. Sämtliche Inkubationsschritte wurden auf einem horizontalen Schüttler

durchgeführt. Im Anschluss daran wurden die Zellen zweimal mit jeweils 2 ml 1x PBS gewaschen und mittels Glycerin-basierten Einbettmediums auf einem Objektträger fixiert.

### 2.2.11 Chromatin Immunopräzipitation (ChIP)

Pro ChIP Experiment wurden Platten mit einer Dichte von mindestens  $1 \times 10^7$  Zellen verwendet. Durch Zugabe von 37% Formaldehyd auf die Zellkulturschale mit einer Endkonzentration von 1% direkt in das Zellmedium werden Proteine kovalent mit DNA verbunden (bei 20 ml 540  $\mu$ l 37% Formaldehyd). Anschließend wurde die Schale für 10 min bei RT geschwenkt. Durch Zugabe von 1/7 Volumenteile 1 M Glycin zum Medium (bei 20 ml Medium 2,9 ml 1 M Glycin) wurde die Aktivität des Formaldehyds reduziert. Die Schale wurde anschließend für 5 min bei RT geschwenkt. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 10 ml kaltem 1x PBS gewaschen, um danach auf Eis in 1 ml kaltem 1x PBS mittels eines Zellschabers abgekratzt zu werden. Die Zellsuspension wurde anschließend in gelbe 15 ml Polystyrol-Falcons überführt und 5 min lang bei 4 °C und 2000 rpm zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde das Zellpellet in 1 ml frisch angesetztem SDS-Lysepuffer resuspendiert und für 10 min auf Eis inkubiert. Es folgte die Sonifizierung der partiell lysierten Zellen auf Eis um die Zellen vollständig aufzuschließen und das Chromatin der Zelle auf Fragmente von ca. 500 bp Länge zu scheren. Vor der Sonifizierung wurden 10  $\mu$ l Zelllysate in ein separates Reaktionsgefäß überführt um die Fragmentgrößen vor und nach der Sonifizierung vergleichen zu können. Die Sonifizierung erfolgte mit einem *Digital Sonifier* (Branson) bei 20% Amplitude für 60 Pulse à 1 s mit einer Pause von 2 s zwischen den Pulsen. Im nächsten Schritt wurden durch Zentrifugation der sonifizierten Zelllysate die Zelltrümmer von den quervernetzten Chromatinfragmenten getrennt. Der Überstand wurde weiterverwendet, das Pellet aus Zelltrümmern verworfen. Anschließend erfolgte eine IgG Vorinkubation (*preclearing*) der Zellextrakte. Dabei wurden durch Einsatz eines unspezifischen IgG-Antikörpers Komponenten aus dem Zelllysate entfernt, welche für unspezifische, (hypersensitive) Bindungen im weiteren Verlauf der Behandlung verantwortlich sein können. Für diesen Schritt wurden pro Immunpräzipitationsansatz (IP) 30  $\mu$ l Protein-G-Plus/ Protein-A Agarose Sepharose-Kügelchen in 500  $\mu$ l Dilutionbuffer äquilibriert und im Anschluss 1 min lang bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die äquilibrierten Sepharose-Kügelchen jedoch mit 1:10 verdünntem Zellextrakt (150  $\mu$ l Zellextrakt + 1350  $\mu$ l Dilutionbuffer) und 5  $\mu$ l IgG Antikörper versetzt und 2 h bei 4 °C rotierend inkubiert. An diesem Punkt wurden ebenfalls 2 Aliquots à 15  $\mu$ l Zellextrakt eingefroren, welche später als Input für den Vergleich verschiedener IPs dienen. Nach 2 h erfolgte eine Zentrifugation für 1 min bei 4 °C und 2000 rpm.

Der Überstand jedes *Preclearing* Ansatzes wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und anschließend wurde ein spezifischer Antikörper hinzugefügt (ca. 5  $\mu$ g; H3 2  $\mu$ l; IgG 5  $\mu$ l; RNA-Pol II 25  $\mu$ l; H4ac (06-866) 7  $\mu$ l; H3K9ac (pAb-004-050) 7  $\mu$ l). Es folgte eine Inkubation bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag wurden abermals 30  $\mu$ l Protein-G-Plus/ Protein-A Agarose Sepharose-Kügelchen mit 500  $\mu$ l Dilutionbuffer äquilibriert, anschließend zentrifugiert (1 min, 2000 rpm, 4 °C) und der Überstand verworfen. Zu den äquilibrierten Sepharose-Kügelchen wurde die Über-Nacht-Suspension gegeben und diese 2 h bei 4 °C rotierend gemischt. Anschließend wurden die Ansätze 1 min lang bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, die Sepharose-Kügelchen mehrmals in IP-Puffer gewaschen, um unspezifische Bindungen zu reduzieren. Beim 1. Waschschriff wurden die Sepharose-Kügelchen 5 min lang bei 4 °C in 900  $\mu$ l IP-Puffer auf einem Rotator inkubiert und anschließend 1 min bei 2000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand entfernt wurde, wurden 4 weitere 5-minütige Inkubationsschritte mit jeweils 900  $\mu$ l IP-Puffer bei 4 °C mit anschließendem Zentrifugationsschritt (1 min bei 2000 rpm) durchgeführt. Anschließend wurden die Sepharose-

Kügelchen zweimal mit jeweils 5 min lang (4 °C) mit 900 µl TE-Puffer rotierend gewaschen. Nach jedem Schritt wurden die Sepharose-Kügelchen 1 min lang bei 2000 rpm zentrifugiert.

Im Folgenden wurden die Überstände von allen IPs und den Input-Proben vollständig abgenommen. Anschließend wurden 100 µl 10% Chelex zu allen Proben pipettiert und die Proben dann 10 min aufgeköcht. Nach Zugabe von 3,8 µl Proteinase K (20 mg/ml) folgte eine 30-minütige Inkubation bei 56 °C. Nach diesem Schritt wurden die Proben noch einmal 10 min lang aufgeköcht. Nachdem die Proben abgekühlt waren, wurden zu jedem Ansatz 100 µl ddH<sub>2</sub>O pipettiert. Anschließend wurden 100 µl Flüssigkeit aus jeder IP in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### 2.2.12 Dualer Luciferase Assay

Der Einfluss von Transkriptions-regulierenden Faktoren auf die Aktivität eines genspezifischen Promoters wurde mit Hilfe dualer Luciferase Systeme untersucht.

Ein Luciferase-Reporter besteht typischerweise aus einer variablen, genspezifischen Promotersequenz, gefolgt von einem *Renilla Luciferase* Reporter gen. Für die Normalisierung verschiedener experimenteller Bedingungen wurde zusätzlich ein *Firefly Luciferase* Konstrukt als interne Kontrolle eingesetzt, welches von einem viralen Promoter reguliert wird. Die Verwendung verschiedener Luciferasen beruht auf unterschiedlichen Substratanforderungen und verschiedenen Emissionswellenlängen, bedingt durch die verschiedenen evolutionären Ursprünge der entsprechenden Luciferase Gene: Die *Renilla* Luciferase katalysiert die Addition von Sauerstoff an Coelenterazin unter der Entstehung von Coelenteramid (Stepanyuk et al, 2009). Bei dieser Reaktion wird neben CO<sub>2</sub> auch Licht freigesetzt, das bei einer Wellenlänge von 480 nm gemessen werden kann. Bei der Firefly Luciferase dient Luciferin als Substrat, welches unter Verbrauch von ATP und O<sub>2</sub> zu Oxoluciferin oxidiert wird (Marques & Esteves da Silva, 2009). Das angeregte Oxoluciferin fällt unter Emission von Licht von ca. 560 nm Wellenlänge in den Grundzustand zurück.

Für transiente Luciferase-Assays wurde ein Verhältnis von Renilla zu Firefly- Plasmiden von ca. 16:1 gewählt (Transfektion von 4000 ng *Renilla* Luciferase-Vektor und 250 ng Firefly-Vektor) um *trans*-Effekte zwischen starkem viralen Firefly- und genspezifischem *Renilla*- Promotor zu vermeiden. Zelllinien mit stabil transfiziertem *Renilla* Reporter wurden, für die Normalisierung des Luciferaseassays, ebenfalls transient mit 250 ng Firefly Vektor (pGL3) transfiziert.

Nach der Transfektion und einer entsprechenden Inkubationsdauer von 3 bis 5 Tagen wurden die Zellen verschiedener Versuchsansätze zweimal mit 1 ml 1x PBS gewaschen, anschließend in 200 µl 1x passivem Lysepuffer (PLB) lysiert und mit einem Zellschaber abgekratzt. Die Zellsuspensionen wurden anschließend in Reaktionsgefäße überführt und 1 min lang bei 11.000 rpm zentrifugiert. Von den entsprechenden Zellsuspensionen wurden 20 µl in ein weißes 96well Mikrotiterplatte überführt. Für die Analyse der Firefly Luciferase wurden anschließend 33 µl LarII Substrat zur Zellsuspension pipettiert und unter Verwendung eines OrionL-Luminometers (Berthold) nach einer Verzögerung von 1 s die Summe der Lichtsignale innerhalb 1 s gemessen. Durch anschließende Zugabe von 33 µl 1x Stop/Glow-Lösung wird das Firefly Luciferase Signal gequencht und stattdessen nach 1 s Verzögerung für 1 s das *Renilla* Luciferase Signal gemessen.

### 3. Ergebnisse

Die DNA-Methylierung und die regulatorischen Prozesse die damit verbunden sind, sind fundamental für die Entwicklung und Aufrechterhaltung der Zellidentität. Die Bedeutung der DNA-Methylierung lässt sich aus den Konsequenzen ermessen, welche aberrante DNA-Methylierungsmustern nach sich ziehen (Krebs (Baylin, 2005; De Carvalho et al, 2012; Kulis & Esteller, 2010), Imprinting-assoziierte Krankheiten (Conerly & Grady, 2010), neurodegenerative Erkrankungen (Conerly & Grady, 2010; Wood, 2013).

Durch die Entwicklung von Microarray- oder *next generation sequencing*-basierten Analysetechnologien werden Möglichkeiten geliefert Informationen im genomweiten Maßstab zu generieren, welche früher nur für spezifische Loci in einer begrenzten Anzahl an Genen zur Verfügung standen (Bibikova et al, 2011).

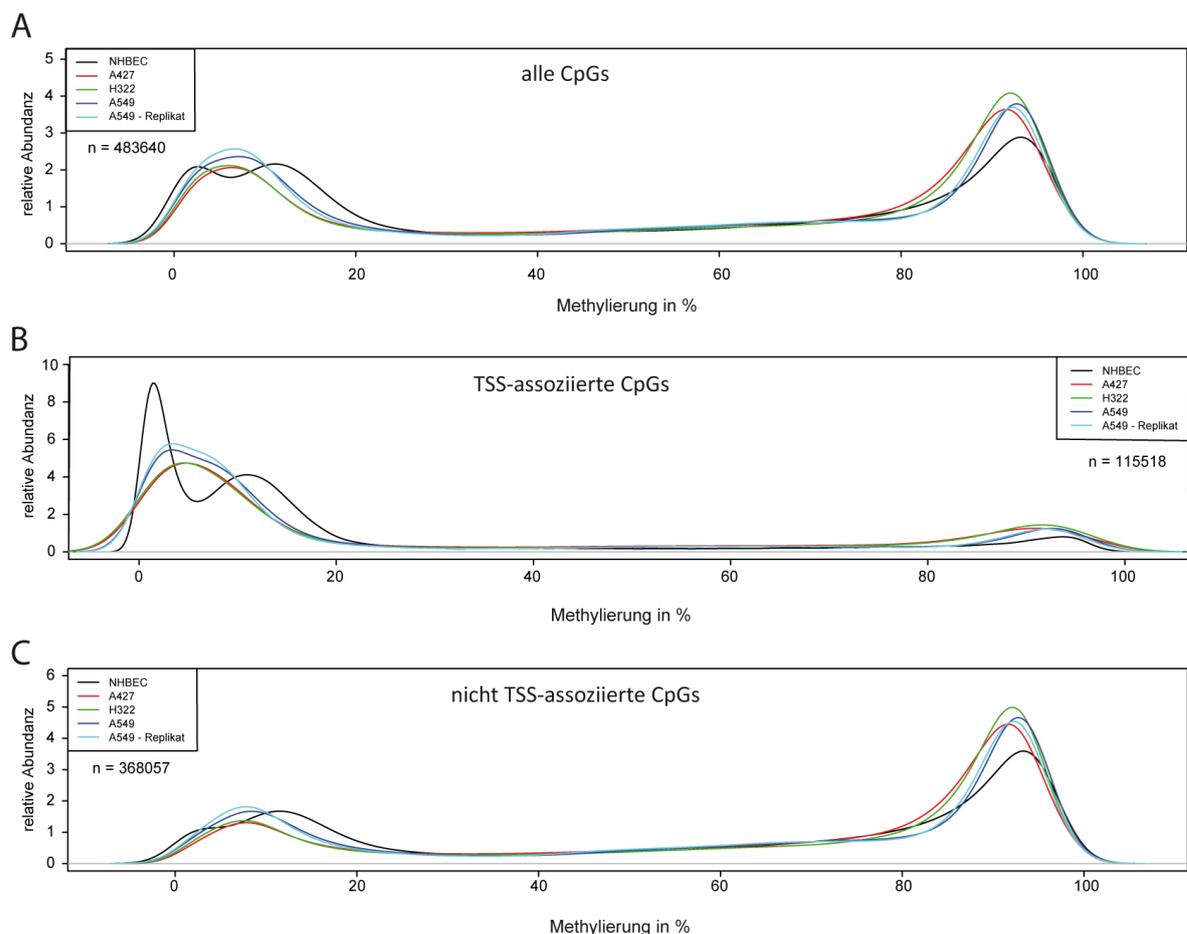
Im Rahmen dieser Arbeit wurden mithilfe der *Illumina HumanMethylation 450 BeadChip* Technologie genomweite DNA-Methylierungsprofile verschiedener humaner Lungenkrebszelllinien (A427, A549, H322), sowie von humanen Bronchialepithelzellen (NHBE) erstellt. Auf Grundlage dieser Daten wurden genomweite Einblicke in die Veränderungen des DNA-Methyloms sowohl im Laufe der Tumorgenese, aber auch nach Einsatz von DNA-Methyltransferase Inhibitoren während der epigenetischen Krebstherapie, gewonnen. Als DNA-Methyltransferase inhibierende Substanzen wurden dabei 5-Aza-2'-Desoxycytidin und Zebularin (1-( $\beta$ -D-Ribofuranosyl)-2(1*H*)-Pyrimidinon) eingesetzt. Darüber hinaus dienten die DNA-Methylierungsprofile als Grundlage für die Entschlüsselung der Mechanismen, welche zur epigenetischen Inaktivierung der Expression des *RASSF1A* Tumorsuppressorgens führen.

#### 3.1 Analyse der genomweiten Methylierungsprofile von humanen Lungenkrebszelllinien

##### 3.1.1 Charakterisierung der DNA-Methylierungsprofile des *Illumina* 450k Arrays von humanen Lungenkrebszelllinien

Die genomische DNA der nicht kleinzelligen Lungenkrebszelllinien A427, A549 und H322 und normaler humaner Bronchialepithelzellen (NHBE) wurde isoliert und anschließend einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. In Kooperation mit dem *Life&Brain* Zentrum in Bonn wurden von diesen Bisulfit-behandelten DNA-Proben genomweite DNA-Methylierungsprofile erstellt. Die Methylierungsdaten wurden mithilfe von *Illumina* 450k Arrays gewonnen, welche die Analyse von über 450.000 CpGs auf Einzelnukleotidniveau ermöglicht. Es werden bei der Analyse 96% aller annotierten humanen Transkripte (*RefSeq*-Gene) und 95% aller CpG-Insel-Bereiche abgedeckt. CpG Inseln sind als DNA-Sequenzen definiert, welche länger als 500 bp sind, einen GC-Gehalt von mehr als 55% besitzen und im Bezug auf die Anzahl von gemessenen zu erwarteter CpG-Dinukleotiden ein Verhältnis von 0,65 ausweisen (Takai & Jones, 2002). Als Teil der Charakterisierung der genomweiten *Illumina* 450k Arrays Methylierungsdaten von A427, A549 und H322 Lungenkrebszelllinien und normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBE) wurde die relative Abundanz verschiedener DNA-Methylierungsniveaus dargestellt. Es lässt sich dabei eine bimodale Verteilung der DNA-Methylierungslevel feststellen (Abbildung 1). Diese Verteilung tritt unabhängig von der untersuchten Zelllinie auf und lässt erkennen, dass die überwiegende Anzahl der analysierten CpGs entweder stark

methyliert ( $> 80\%$  Methylierungslevel) oder unmethyliert ( $< 20\%$  Methylierungslevel) vorliegt (Abbildung 1 A-C). Intermediäre Methylierungslevel treten nur sehr selten auf. Bei der Betrachtung des gesamten Methylierungsspektrums des *Illumina* 450k Arrays, ist festzustellen, dass bei allen untersuchten Lungenkrebszelllinien das maximale Abundanz-Niveau (relativer Abundanzwert von ca. 4) der stark methylierten CpGs ( $>80\%$  Methylierung) knapp doppelt so hoch liegt wie wie das entsprechende Abundanz-Niveau der unmethylierten CpGs ( $<20\%$  Methylierung) (relativer Abundanzwert von ca. 2) (Abbildung 1 A). Auch die Intervallbreite der Abundanz-Peaks ist zwischen den verschiedenen Lungenkrebszelllinien ähnlich ausgeprägt. Im Gegensatz dazu ist jedoch bei NHBE-Zellen (NHBEZ) das Abundanzmaximum von hoch methylierten CpGs ( $> 80\%$  Methylierungslevel) ca. 20% niedriger.



**Abbildung 1: Relative Abundanz verschiedener Methylierungsniveaus von unterschiedlichen Lungenkrebszelllinien und normalen Bronchialepithelzellen (NHBEZ).** Die genomische DNA von A427-, H322- und A549- Lungenkrebszelllinien und von normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBEZ) wurde isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Anschließend wurden mithilfe von *Illumina* 450k Arrays genomweite DNA-Methylierungsprofile der Bisulfit-behandelten Proben erstellt. Die Durchführung folgte in Kooperation mit dem *Life&Brain* Zentrum, Bonn. Für A549 Zellen wurde ein zusätzliches Replikat analysiert. **A**, Aufschlüsselung der DNA-Methylierungsdaten nach der relativen Abundanz (y-Achse) verschiedener Methylierungsniveaus (x-Achse) von normalen Bronchialepithelzellen (NHBEZ) und A427, H322, A549 Lungenkrebszellen, welche mittels *Illumina* 450k Array gewonnen wurden. **B**, Darstellung der relativen Methylierungsniveau-Abundanz von DNA-Methylierungsdaten gefiltert nach Transkriptionsstart (TSS)-assoziierten CpGs von normalen Bronchialepithelzellen und der verschiedenen Lungenkrebszelllinien (TSS-assoziierte CpGs entsprechen der CpGs im Bereich von -300 bp bis +300 bp vom Transkriptionsstart). **C**, Darstellung der relativen Methylierungsniveau-Abundanz von DNA-Methylierungsdaten gefiltert nach nicht-TSS-assoziierten CpGs von normalen Bronchialepithelzellen und verschiedenen Lungenkrebszelllinien.

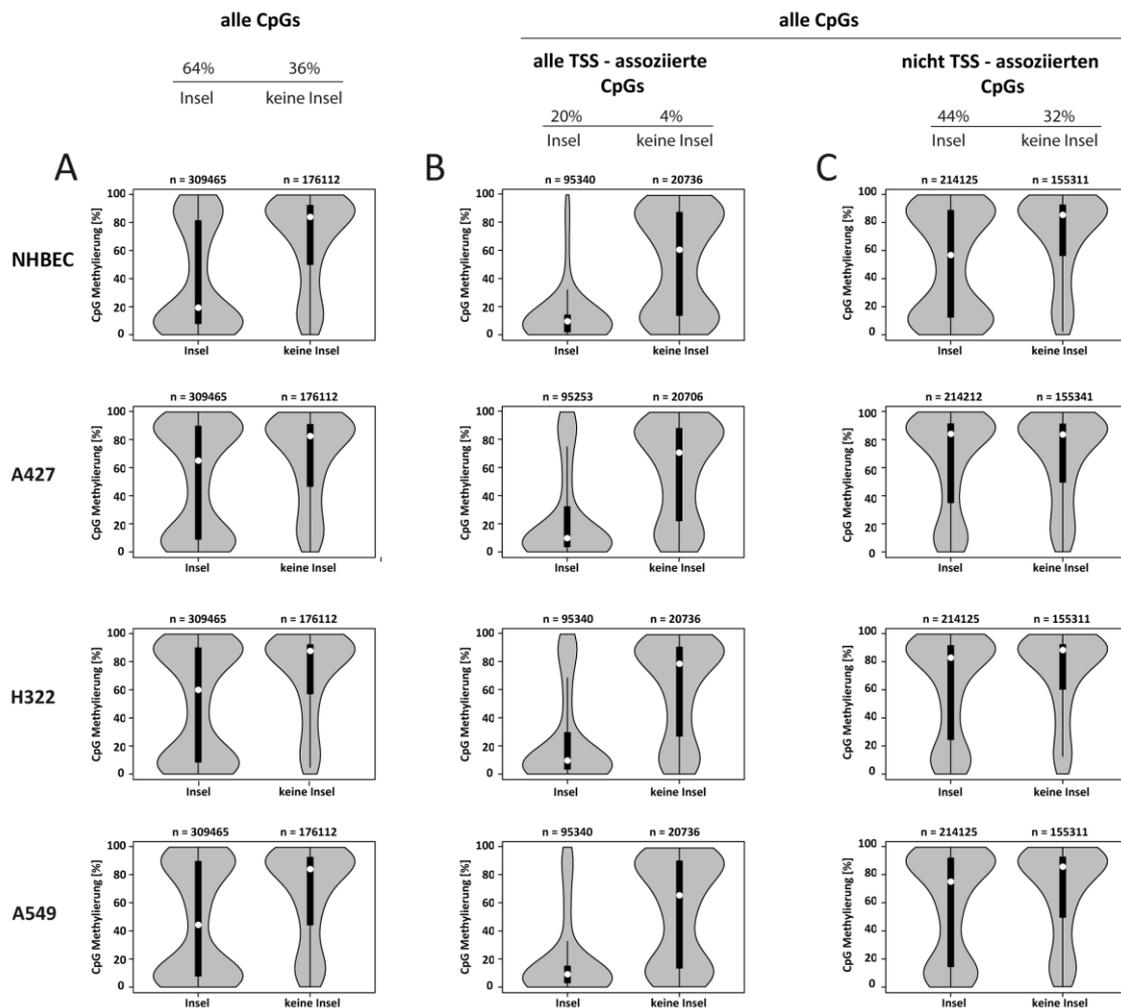
Das Intervall der niedrig methylierten CpGs (< 20% Methylierungslevel) ist in NHBEZ wiederum breiter ausgeprägt, aber das relative Abundanzmaximum liegt in etwa so hoch wie bei den Krebszellen (relativer Abundanzwert von ca. 2) (Abbildung 1). Bei der Betrachtung von Promoter-assoziierten CpGs im Bereich von -300 bp bis +300 bp relativ zu Transkriptionsstartstellen (TSS) (ca. 24% der CpGs des *Illumina* 450k Arrays) bleibt bei Krebszellen und NHBEZ die bimodale Verteilung erhalten, der überwiegende Anteil der CpGs liegt jedoch unmethyliert vor (Abbildung 1 B). Bei normalen, humanen Bronchialepithelzellen (NHBEZ) spalten sich die unmethylierten TSS-assoziierten CpGs zusätzlich in 2 Peaks, mit maximalen relativen Abundanz-Werten von 9 bzw. 4, auf (Abbildung 1 B). Die nicht TSS-assoziierten CpGs (ca. 76% der CpGs) zeigen ebenfalls eine 2-gipfelige Verteilung der relativen Methylierungslevel-Abundanzen, sie sind jedoch überwiegend besonders stark methyliert (>80%). Nur ein kleiner Anteil der CpGs außerhalb von Promotorbereichen sind schwach methyliert (<20%) (Abbildung 1 C). Der Vergleich der jeweiligen Abundanz-Kurven der beiden A549 Replikate zeigt eine hohe Reproduzierbarkeit der *Illumina* 450k Methylierungsdaten (Abbildung 1).

### 3.1.2 Detaillierte Analyse CpG-Insel-assoziiertes DNA-Methylierungsmuster in Lungenkrebszelllinien

Die genomweiten *Illumina* 450k Methylierungsdaten der Lungenkrebszelllinien A427, A549 bzw. H322 und der normalen Lungenbronchialepithelzellen (NHBEZ) wurden ebenfalls bezüglich der auftretenden DNA-Methylierung in bzw. außerhalb von CpG-Inseln charakterisiert (Abbildung 2). Bei allen analysierten Zelllinien waren CpG-Insel assoziierte CpGs (ca. 64% der analysierten CpGs auf dem *Illumina* 450k Array) im Schnitt 37% niedriger methyliert ( $\emptyset$ -Median-Zelllinien: ca. 46%) als CpGs außerhalb von CG reichen Regionen (ca. 36% der analysierten CpGs;  $\emptyset$ -Median-Zelllinien: ca. 83%) (Abbildung 2 A). Diese Beobachtung tritt bei allen CpGs auf, unabhängig von ihrer Lokalisierung im Genom.

Wenn die Klassifizierung der CpGs aufgrund ihrer Lokalisierung in bzw. außerhalb von CpG-Inseln (Insel, keine Insel) zusätzlich um den Faktor „Fehlen oder Vorhandensein von Transkriptionsstartstellen (TSS) innerhalb/ außerhalb einer CpG-Insel“ erweitert wird (Abbildung 2 B, C), zeigt sich folgendes: TSS-assoziierte CpG-Inseln (ca. 20% der analysierten CpGs) liegen nahezu unmethyliert vor ( $\emptyset$ -Median-Zelllinien: ca. 8%) (Abbildung 2 B). CpG-Insel assoziierte CpGs ohne TSS (ca. 44% der analysierten CpGs;  $\emptyset$ -Median-Zelllinien: ca. 73%) hingegen sind nur knapp 6% niedriger methyliert als nicht-CpG-Insel Promotoren (ca. 4% der analysierten CpGs;  $\emptyset$ -Median-Zelllinien: 67%) (Abbildung 2 B, C). Es zeigt sich jedoch auch, dass CpGs in CG-armen Promotorregionen (ca. 4% der analysierten CpGs) trotzdem signifikant ( $p < 0,01$ ) niedriger methyliert vorliegen als CpGs außerhalb von CpG-Inseln und ohne Promotorbezug (ca. 32% der analysierten CpGs;  $\emptyset$ -Median-Zelllinien: ca. 84%) (Abbildung 2 B,C).

Im Vergleich zu Lungenkrebszelllinien (LKZ) haben normale Bronchialepithelzellen (NHBEZ) signifikant niedrigere DNA-Methylierungslevel ( $p < 0,01$ ) in CpG-Insel Bereichen (ca. 64% der analysierten CpGs:  $\emptyset$ -Median-LKZ: ca. 46%; Median-NHBEZ: ca. 18%) (Abbildung 2 A). Außerhalb von CpG-Inseln (ca. 36% der analysierten CpGs) sind nur Unterschiede in der DNA-Methylierung zwischen Krebs- und Normalbronchialzellen im Bereich von <1% zu erkennen ( $\emptyset$ -Median-LKZ: ca. 83%; Median-NHBEZ: ca. 82%) (Abbildung 2 A-C).



**Abbildung 2: CpG-Insel spezifische DNA-Methylierungsmuster von normalen Bronchialepithelzellen und verschiedener Lungenkrebszelllinien.** Die genomische DNA von A427-, H322- und A549- Lungenkrebszelllinien und von normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBE) wurde isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Anschließend wurden mithilfe von *Illumina* 450k Arrays genomweite DNA-Methylierungsprofile der Bisulfit-behandelten Proben erstellt. Die Durchführung folgte in Kooperation mit dem *Life&Brain* Zentrum, Bonn. Die DNA-Methylierungsdaten (in %) der normalen Bronchialepithelzellen (NHBE) und der verschiedenen Lungenkrebszelllinien (A427, H322, A549) sind als Violin-Plots dargestellt. Die weiße Raute gibt den Median und die schwarze Box 50% der Datenpunkte an. Zusätzlich sind die relativen Abundanz verschiedener Methylierungsniveaus angegeben (graue „Violine“). Die Methylierungsdaten der *Illumina* 450k Arrays sind jeweils nach CpG-Insel-assozierten Sonden (Insel) und den restlichen Sonden, außerhalb von CpG-Inseln (keine Insel), aufgeschlüsselt. In Prozent ist jeweils der Anteil an Sonden des *Illumina* 450k Screens, die in die entsprechenden Kategorien fallen, angegeben. **A**, Darstellung der Methylierung in und außerhalb von CpG-Inseln von NHBE und A427-, H322- und A549- Zellen unter Verwendung der gesamten *Illumina* 450k Datensätze. **B**, Methylierungsanalyse der Transkriptionsstart (TSS)-assozierte CpGs (CpGs von -300 bp bis +300 bp, relativ zum TSS) von NHBE- und A427-, H322- und A549-Zellen und Unterteilung der Daten nach CpG-Insel Zugehörigkeit. **C**, Darstellung von nicht-TSS-assozierten CpGs (alle CpGs der verschiedenen Datensätze, abgesehen von den TSS-assozierten CpGs) in NHBE und den verschiedenen Lungenkrebszelllinien und Untergliederung nach CpG-Insel-Zugehörigkeit.

CpG-Inseln, welche mit Transkriptionsstartstellen überlappen (ca. 20% der analysierten CpGs), sind in Krebszellen nur knapp 0,1 % höher methyliert als in NHBE-Zellen ( $\emptyset$ -Median-LKZ: 8,1%; Median-NHBE: 8,2%) (Abbildung 2 B). Im Gegensatz dazu sind nicht-TSS-assozierte CpG-Inseln (ca. 44% der analysierten CpGs) in Krebszellen ca. 17% stärker methyliert im Vergleich zu den Normalzellen ( $\emptyset$ -Median-LKZ: ca. 73%; Median-NHBE: ca. 56%) (Abbildung 2 C).

In Bezug auf die DNA-Methylierung innerhalb von CpG-Inseln (ca. 64% der analysierten CpGs) gibt es Unterschiede von bis zu ca. 21% zwischen den verschiedenen Lungenkrebszelllinien (Vergleich der

DNA-Methylierung von A549-Zellen (A549-Median: ca. 43%) zu H322- bzw. A427 Zellen (H322-Median: ca. 59%, A427-Median: ca. 64%) (Abbildung 2 A). Diese ergeben sich überwiegend aus Unterschieden in der Methylierung von nicht-TSS-assoziierten CpG-Inseln (A427-Median: ca. 83%, H322-Median: ca. 81%, A549-Median: ca. 74%) (Abbildung 2 B).

## 3.2 DNMT-Inhibitor-Behandlung von humanen Lungenkrebszelllinien

### 3.2.1 Analyse der Zebularin- bzw. 5-Aza-2'-Desoxycytosin-induzierten Demethylierung in humanen Lungenkrebszelllinien

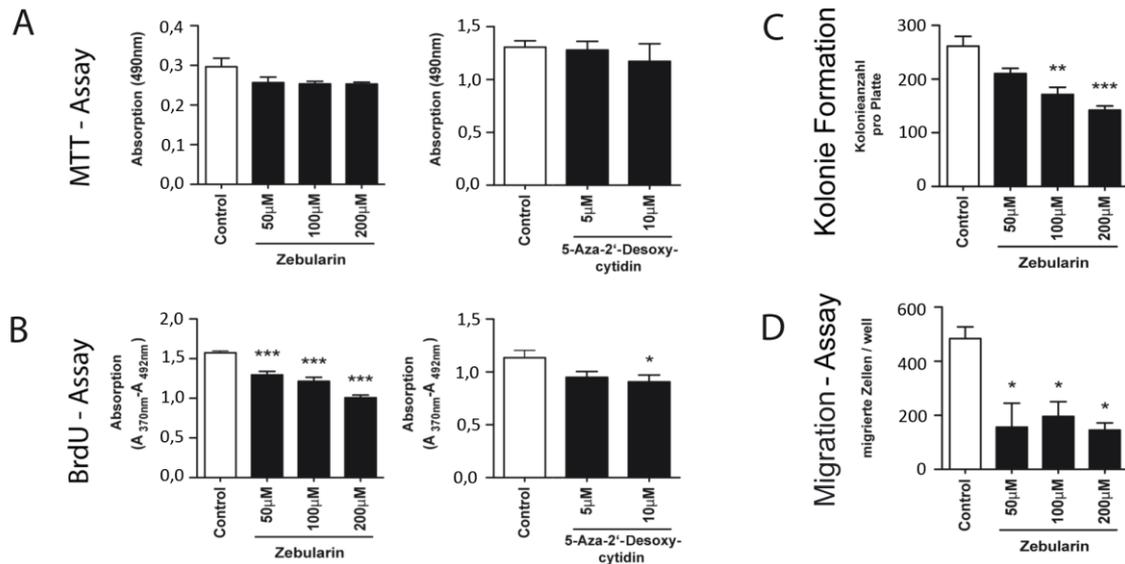
A427-, A549- und H322- Lungenkrebszelllinien wurden 4 Tage lang mit verschiedenen DNA-Methyltransferase inhibierenden Substanzen (DNMT-I) in unterschiedlichen Konzentrationen (100  $\mu\text{M}$  und 200  $\mu\text{M}$  Zebularin bzw. 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  5-Aza-2'-Desoxycytidin) behandelt. Anschließend wurden diese Zellen unter Verwendung von *Illumina* 450k Arrays einer genomweiten DNA-Methylierungsanalyse unterzogen. Die DNMT-I-induzierten Veränderungen des, auf dem 450k-Array repräsentierten, Methyloms wurden relativ zu einem unbehandelten Kontrollansatz (0  $\mu\text{M}$  DNMT-I-Konzentration) betrachtet. Die verwendeten DNMT-I-Konzentrationen wurden so gewählt, dass sie die Zellproliferation reduzieren (Abbildung 3 A), dieser Effekt jedoch nicht durch einen konzentrationsbedingten, zytotoxischen Effekt hervorgerufen wird (Abbildung 3 B). Neben dem Einfluss auf die Proliferation wurde außerdem der Effekt der verschiedenen DNMT-I-Konzentrationen auf die Migrationsfähigkeit und die Fähigkeit zur Kolonieformation untersucht (Abbildung 3 C, D). Diese Versuche wurden in Zusammenarbeit mit Raj Savai, Max-Planck-Institut für Herz- und Lungenforschung (Bad Nauheim) durchgeführt.

Die Bestimmung der Zytotoxizität der eingesetzten Chemotherapeutika-Konzentrationen erfolgte mittels MTT-Assay. Bei Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  bzw. 200  $\mu\text{M}$  Zebularin im Zellkulturmedium konnte keine signifikante Reduktion der Zellviabilität gegenüber unbehandelten Zellen (0  $\mu\text{M}$ ) festgestellt werden (Abbildung 3 A). Entsprechende Untersuchungen für 5-Aza-2'-Desoxycytidin (5-Aza-2'dC) zeigten, dass bei 5  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  5-Aza-2'dC ebenfalls kein Rückgang der Überlebensfähigkeit der Zellen detektiert werden konnte (Abbildung 3 A). Auf Grundlage der Inkoooperation von BrdU-Nukleotiden wurde anschließend der Effekt der zuvor beschriebenen DNMT-I-Konzentrationen auf die Zellproliferation untersucht: Die Verwendung von 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$  bzw. 200  $\mu\text{M}$  Zebularin führte jeweils zu einer signifikanten Reduktion ( $p > 0.001$ ) der Zellproliferation. Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  5-Aza-2'-Desoxycytidin konnte ebenfalls das Zellwachstum signifikant ( $p > 0,05$ ) reduziert werden (Abbildung 3 B).

Über einen Zeitraum von ca. 2 Wochen wurde außerdem der Einfluss von Zebularin (0  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ ) auf die Fähigkeit von A549 Zellen zur Kolonieformation beobachtet. Durch Zugabe von 100  $\mu\text{M}$  bzw. 200  $\mu\text{M}$  Zebularin ins Zellkulturmedium konnte die Anzahl an Kolonien signifikant reduziert werden (100  $\mu\text{M}$  Zebularin,  $p < 0,01$ ; 200  $\mu\text{M}$  Zebularin,  $p < 0,001$ ) (Abbildung 3 C).

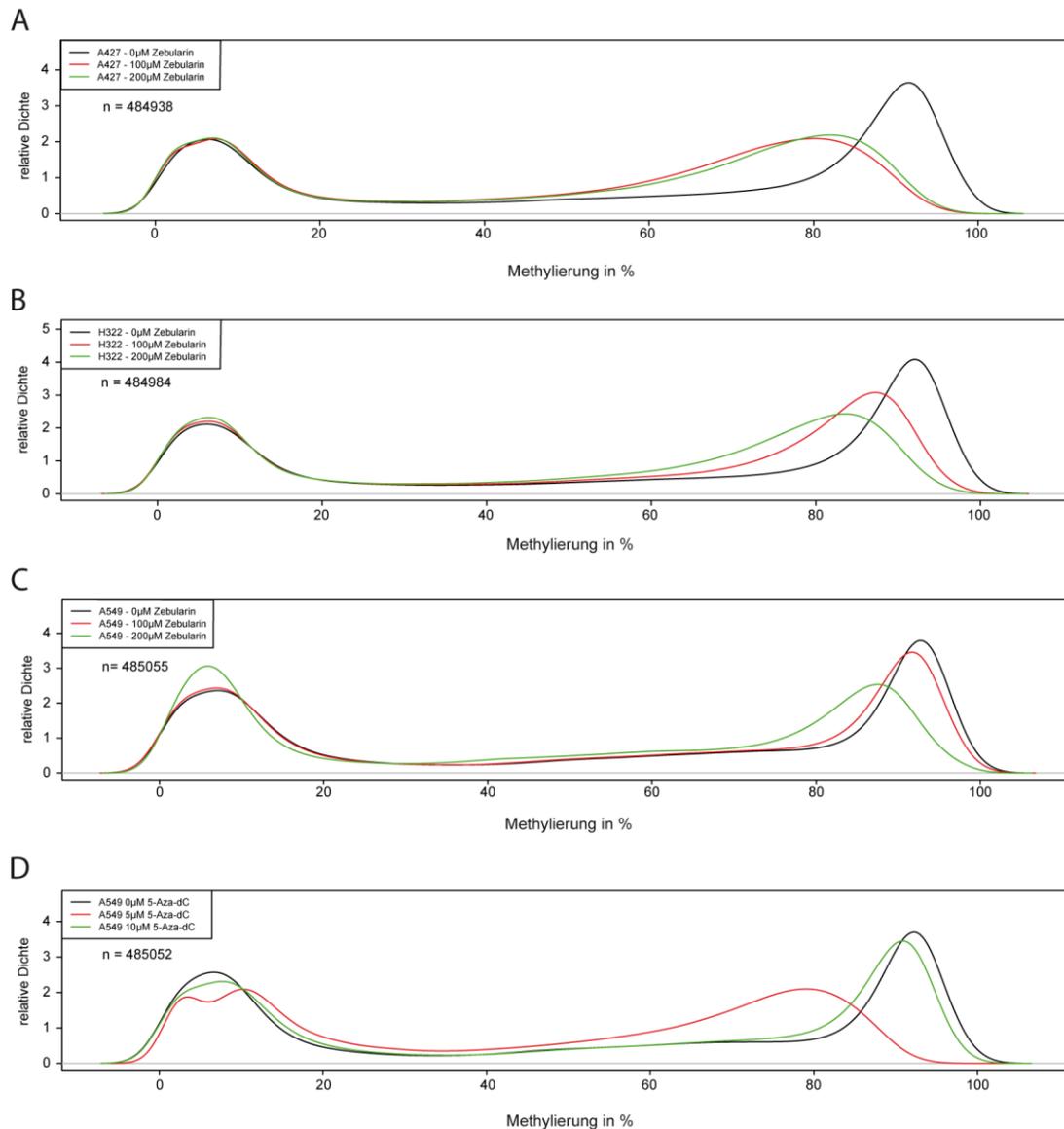
Mittels eines Transwell-Systems (*Boyden chamber*) wurde darüber hinaus die Migrationsfähigkeit von A549-Zellen über einen Zeitraum von 48 h in einem FCS-Gradienten (von 0% zu 20% FCS) in Abhängigkeit von Zebularin (0  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ ) quantifiziert. Die Zugabe von Zebularin reduzierte signifikant die Anzahl an migrierenden Zellen die die Transwellmembran durchquert hatten ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 3 D).

Zur Bestimmung des Einflusses verschiedener DNMT-I-Konzentrationen auf die DNA-Methylierung von A427-, A549- und H322- Lungenkrebszelllinien wurde, nach 4 tägiger DNMT-I-Behandlung, genomische DNA aus diesen Zelllinien isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen.



**Abbildung 3: DNMT-Inhibitor basierende Therapie von Lungenkrebszelllinien.** **A**, Bestimmung des zytotoxischen Effekts verschiedener Zebularin- (0  $\mu$ M (Control), 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M) bzw. 5-Aza-2'dC- (0  $\mu$ M (Control), 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) Konzentrationen auf A549 Lungenkrebszellen nach 24 h mittels MTT-Assay. **B**, Einfluss von Zebularin (0  $\mu$ M (Control), 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M) bzw. 5-Aza-2'dC (0  $\mu$ M (Control), 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M) auf die Proliferation mittels BrdU-Assay, **C**, Analyse der Fähigkeit zur Koloniebildung nach 15 tägiger Behandlung von A549 Zellen mit Zebularin (0  $\mu$ M (Control), 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M). **D**, Analyse der Migrationsfähigkeit von A549 Zellen nach 2 tägiger Behandlung mit Zebularin (0  $\mu$ M (Control), 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M). Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung (SD). Für signifikante Unterschiede zwischen 0  $\mu$ M Zebularin bzw. 5-Aza-2'dC (Control) und DNMT-I-behandelten Ansätzen wurden die entsprechenden Signifikanzniveaus angegeben: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . Die Ergebnisse wurden in Kooperation mit Raj Savai, MPI Bad Nauheim gewonnen.

Anschließend wurden mithilfe von *Illumina* 450k Arrays genomweite DNA-Methylierungsprofile der Bisulfit-behandelten Proben erstellt. Diese Methylierungsprofile sind in Abbildung 4 abgebildet. Dargestellt ist die relative Abundanz verschiedener DNA-Methylierungsniveaus von unterschiedlichen Lungenkrebszelllinien und die Veränderungen der Abundanz-Spitzen nach DNMT-I-Behandlung (0  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 200  $\mu$ M Zebularin bzw. 0  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M 5-Aza-2'dC). Die Zebularinbehandlung führt bei den hochmethylierten CpGs (> 80% Methylierungslevel) in allen untersuchten Zelllinien zu einer Demethylierung dieser CpGs, welche sich in einer konzentrationsabhängigen Abnahme des relativen Abundanz-Maximums äußert: (Abbildung 4 A-C): Die Zugabe von 100  $\mu$ M Zebularin ins Zellkulturmedium führt bei A427- bzw. H322-Zellen zu einer ca. 40%igen bzw. 25%igen Reduktion des Peaks von hochmethylierten CpGs und zu einer Verschiebung des relativen Abundanz-Maximums zu niedrigeren Methylierungsniveaus (bei A427- und H322-Zellen von ca. 92 % DNA-Methylierung auf unter 88 %).



**Abbildung 4: Verschiebung der relativen Abundanz von hoch bzw. niedrig methylierten CpGs von Lungenkrebszelllinien nach DNMT-Inhibitor Behandlung.** A427-, H322- und A549-Lungenkrebszelllinien wurden 4 Tage lang mit 0  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  Zebularin behandelt. A549-Zellen wurden darüber hinaus auch unter Zugabe von 0  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  5-Aza-2'dC kultiviert. Anschließend wurde die genomische DNA der Lungenkrebszelllinien isoliert und einer Bisulfit-Behandlung unterzogen. Mithilfe von *Illumina* 450k Arrays wurden im Anschluss daran genomweite DNA-Methylierungsprofile der Bisulfit-behandelten Proben erstellt. Die Durchführung folgte in Kooperation mit dem *Life&Brain* Zentrum, Bonn. **A**, relative Abundanz der DNA-Methylierungsdaten von A427 Zellen nach 4 tägiger Behandlung mit Zebularin (0  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  Zebularin). **B**, relative Abundanz der DNA-Methylierungsdaten von H322 Zellen nach 4 tägiger Behandlung mit Zebularin (0  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  Zebularin). **C**, relative Abundanz der DNA-Methylierungsdaten von A549 Zellen nach 4 tägiger Behandlung mit Zebularin (0  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  Zebularin). **D**, relative Abundanz der DNA-Methylierungsdaten von A549 Zellen nach 4 tägiger Behandlung mit 5-Aza-2'dC (0  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  5-Aza-2'dC).

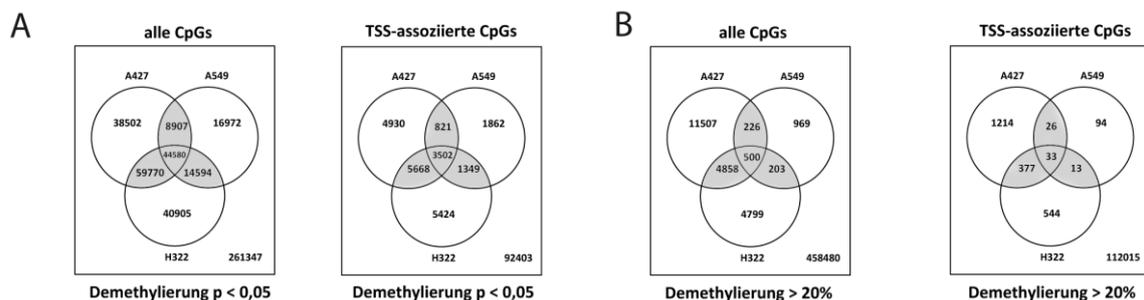
Dieser Effekt konnte durch Erhöhung der Zebularin-Konzentration auf 200  $\mu\text{M}$  bei allen Zelllinien noch verstärkt werden (Abbildung 4 A-C). Die Stärke des demethylierenden Effekts nach Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  bzw. 200  $\mu\text{M}$  Zebularin ist jedoch zwischen unterschiedlichen Zelllinien unterschiedlich hoch (Abbildung 4 A-C). Unter Verwendung von 100  $\mu\text{M}$  Zebularin kommt es in A427-Zellen zu einer Reduktion des relativen Abundanzmaximums von hochmethylierten CpGs von ca. 92% auf ca. 82% (Abbildung 4 A). Bei H322-Zellen kommt es zu einer Reduktion von ca. 92% auf ca. 87% (100  $\mu\text{M}$  Zebularin) (Abbildung 4 B) und bei A549-Zellen zu einer Reduktion von ca. 92% auf ca. 91% (100  $\mu\text{M}$  Zebularin) (Abbildung 4 C). Bei einer Zebularinkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  beträgt die Abnahme des

relativen Abundanzmaximums von hochmethylierten CpGs (ausgehend von ca. 92% (0  $\mu$ M Zebularin) bei A427-Zellen 12%, bei H322-Zellen 9% und bei A549-Zellen 5% (Abbildung 4).

Für A549-Lungenkrebszellen wurde zusätzlich die 5-Aza-2'dC-induzierte Demethylierung im gleichen Stil dargestellt: Die Behandlung von A549-Zellen mit 5  $\mu$ M 5-Aza-2'dC führt zu einer Verschiebung des Abundanzmaximums von hochmethylierten CpGs von ca. 92% auf ca. 79% (Abbildung 4 D). Dieser Effekt ist bei A549-Zellen stärker als jener der mit der höchsten verwendeten Zebularin-Konzentration (200  $\mu$ M) erzielt werden konnte (200  $\mu$ M Zebularin-Behandlung bei A549-Zellen führt zu einer Reduktion des Abundanzmaximums von hochmethylierten CpGs von ca. 92% auf ca. 87%) (Abbildung 4 C, D). Mit einem Anstieg der 5-Aza-2'dC Konzentration auf 10  $\mu$ M konnte jedoch der demethylierende Effekt nicht weiter verstärkt werden (Abbildung 4 D).

### 3.2.2 Analyse der charakteristischen Demethylierung verschiedener Lungenkrebszelllinien nach Verwendung verschiedener DNMT-Inhibitoren

Mit zunehmender DNMT Inhibitor Konzentration kommt es bei den untersuchten Lungenkrebszelllinien (A427, H322 und A549) zu einem Anstieg des Demethylierungseffekts bei CpGs mit hohen Ausgangsmethylierungsleveln (>80% Methylierungslevel) (Abbildung 4 A). Zwischen den verschiedenen Lungenkrebszelllinien wurden signifikant demethylierte CpGs ( $p < 0,05$ ) oder besonders stark demethylierten CpGs (> 20% Demethylierung) miteinander verglichen. Signifikant demethylierte CpGs berechnen sich aus der *Difference-Score* Transformation des p-Wertes.

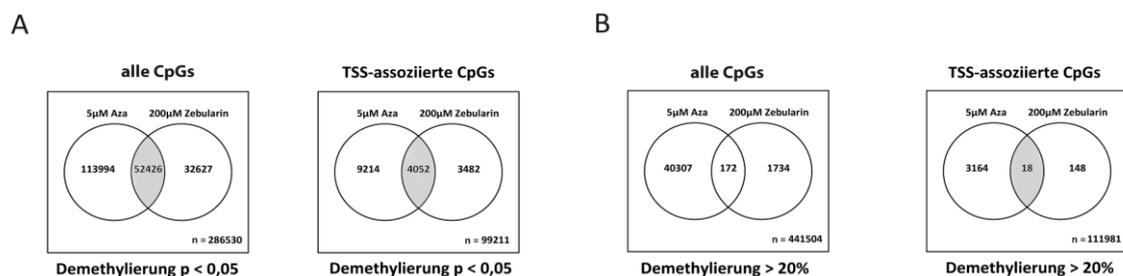


**Abbildung 5: Demethylierungsmuster verschiedener Lungenkrebszelllinien nach Behandlung mit 200  $\mu$ M Zebularin.** Venn Diagramm von signifikant demethylierten ( $p < 0,05$ ) bzw. stark demethylierten (>20%) CpGs. Angegeben sind die zelllinienspezifisch demethylierten CpGs, die gemeinsam demethylierten CpGs und die restlichen Methylierungsdaten (jeweils rechte, untere Ecke) des *Illumina* 450k Arrays. Die höhere Gesamtanzahl von CpGs bei der Berechnung von signifikant demethylierten ( $p < 0,05$ ) CpGs im Vergleich zu >20% demethylierten CpGs ergibt sich aus fehlenden Zahlenwerten der Bezugs- (200  $\mu$ M Zebularin) oder Referenzgruppe (0  $\mu$ M Zebularin) die eine Berechnung einer absoluten Demethylierung verhindert. Eine Berechnung des *Difference Scores* zur p-Wert-Transformation wird dadurch nicht beeinträchtigt. Bei signifikant hohen Überschneidungen ( $p < 0,01$ ) zwischen den verschiedenen Zelllinien sind die Schnittmengen grau hinterlegt. **A**, Venn Diagramm von signifikant demethylierten CpGs ( $p < 0,05$ ) zwischen A427-, H322- und A549-Lungenkrebszellen. Angegeben sind demethylierte CpGs im gesamten *Illumina* 450k Array ( $n = 485577$ ) und TSS-assoziierte CpGs (-300 bp bis +300 bp,  $n = 115959$ ). Die Demethylierung wurde nach 4 tägiger 200  $\mu$ M Zebularin Behandlung untersucht. **B**, Gegenüberstellung von besonders stark demethylierten CpGs (>20% Demethylierung) nach 4 tägiger Zebularin-Behandlung zwischen A427-, H322- und A549-Lungenkrebszellen. Angegeben sind demethylierte CpGs im gesamten *Illumina* 450k Array ( $n = 481542$ ) und TSS-assoziierte CpGs ( $n = 114316$ ). Die Demethylierung wurde nach 4 tägiger 200  $\mu$ M Zebularin Behandlung untersucht.

Dabei ergibt sich, ausgehend von der Formel  $\text{DiffScore} = 10 * |(\mu_{\text{cond}} - \mu_{\text{ref}})| * \log_{10} p$ , aus der Differenz des Durchschnittssignal der Bezugsgruppe (200  $\mu$ M Zebularin bzw. 5  $\mu$ M 5-Aza-2'dC) und der Referenzgruppe (0  $\mu$ M Zebularin bzw. 0  $\mu$ M 5-Aza-2'dC) bei einem Diff-Score von -13 eine signifikante Demethylierung mit einem p-Wert von 0,05. Ein Diff-Score von -22 entspricht einem p-Wert von 0,01 und ein Diff-Score von -33 entspricht einem p-Wert von 0,001 (Lenk et al, 2007).

Anschließend wurde untersucht, ob diese CpGs jeweils zelllinienspezifisch stark demethyliert werden, oder ob dieselben CpGs in unterschiedlichen Zelllinien Ziele von starken Demethylierungseffekten sind (Abbildung 5). Beim Vergleich von signifikant demethylierten CpGs ( $p < 0,05$ ) nach Behandlung mit einer Zebularin-Konzentration von 200  $\mu\text{M}$  konnte bei den untersuchten Lungenkrebszelllinien ein signifikanter Überschneidungsgrad an CpGs festgestellt werden, welche in mehreren oder in allen untersuchten Zelllinien stark demethyliert werden (Abbildung 5 A).

Wenn die Analyse auf besonders stark demethylierte CpGs (Reduktion des CpG Methylierungslevel um min. 20%) eingeschränkt wurde, konnte trotzdem ein signifikanter Überlapp ( $p < 0,01$ ) zwischen verschiedenen Zelllinien nachgewiesen werden (Abbildung 5 B). Der beschriebene Effekt konnte unter Berücksichtigung aller 485576 CpGs der verschiedenen Datensätze beobachtet werden, aber auch wenn nur die Transkriptionsstart-assoziierten CpGs (-300 bp bis +300 bp) betrachtet wurden (Abbildung 5 A, B). A549 Adenokarzinomzelllinien wurden mit zwei verschiedenen DNMT-inhibierenden Nukleosid- Analoga Typen (Zebularin und 5-Aza-2'-Desoxycytidin) in unterschiedlichen Konzentrationsstufen (0  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$  Zebularin bzw. 0  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  5-Aza-2'dC) behandelt. Bei der Behandlung der A549-Zellen mit 200  $\mu\text{M}$  Zebularin bzw. 5  $\mu\text{M}$  5-Aza-2'-Desoxycytidin waren die stärksten Demethylierungseffekte pro DNMTi-Typ festzustellen (Abbildung 4). Von diesen beiden DNMT-I-Ansätzen wurden ebenfalls die signifikant demethylierten CpGs ( $p < 0,05$ ) und die besonders stark demethylierten CpGs (> 20% Demethylierung) miteinander verglichen (Abbildung 6): Beim Vergleich der signifikant demethylierten CpGs ( $p < 0,05$ ) ergab sich bei der Verwendung von 200  $\mu\text{M}$  Zebularin bzw. 5  $\mu\text{M}$  5-Aza-2'-Desoxycytidin ebenfalls eine signifikante Überschneidung ( $p < 0,01$ ) an gemeinsam, signifikant demethylierten CpGs zwischen den verschiedenen DNMTi-Typen (Abbildung 6 A). Dies gilt sowohl bei der Betrachtung aller CpGs des Screens, als auch wenn nur die TSS-assoziierten CpGs (-300 bp bis +300 bp) berücksichtigt werden ( $p < 0,01$ ) (Abbildung 6 A, B). Die Gegenüberstellung besonders stark demethylierter CpGs (>20% Demethylierung) zwischen den verschiedenen DNMTi-Typen ergab einen signifikanten Überlapp an gemeinsam stark demethylierten CpGs bei Promotor-assoziierten CpGs (Abbildung 6 B). Insgesamt beträgt der durchschnittliche Demethylierungseffekt der durch 5  $\mu\text{M}$  5-Aza-2'dC vermittelt wird ca. 7,2% pro CpG. Im Vergleich dazu beträgt die durchschnittliche Demethylierung durch Zebularin ca. 5,3% pro CpG.

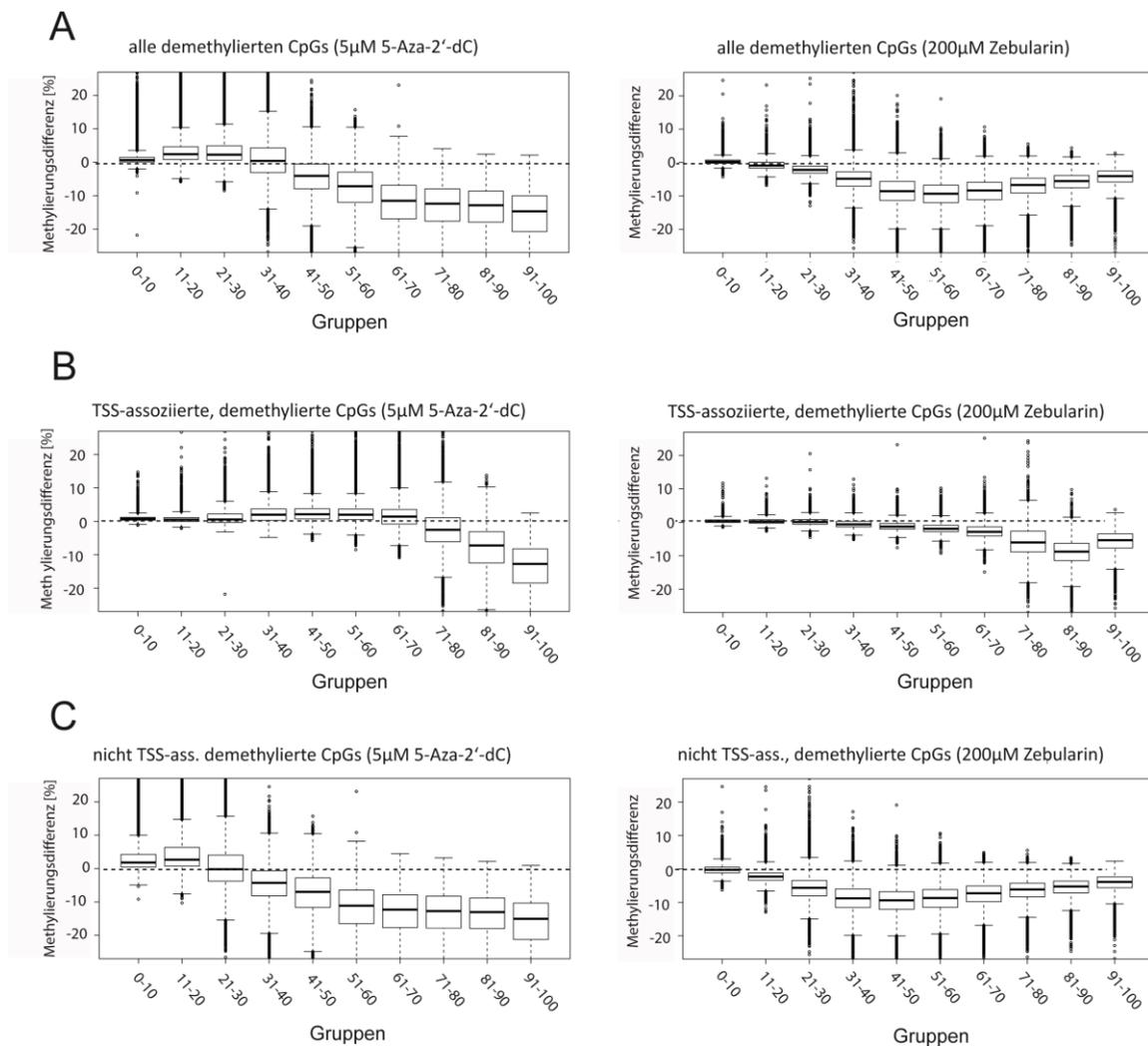


**Abbildung 6: Demethylierungsmuster verschiedener Lungenkrebszelllinien nach DNMT-Inhibitor Behandlung.** Venn Diagramm von signifikant demethylierten ( $p < 0,05$ ) bzw. stark demethylierten (>20%) CpGs. Angegeben sind die zelllinienspezifisch demethylierten CpGs, die gemeinsam demethylierten CpGs und die restlichen Methylierungsdaten (jeweils rechte, untere Ecke) des *Illumina* 450k Arrays. Die höhere Gesamtanzahl von CpGs bei der Berechnung von signifikant demethylierten ( $p < 0,05$ ) CpGs im Vergleich zu >20% demethylierten CpGs ergibt sich aus fehlenden Zahlenwerten der Bezugs- (200  $\mu\text{M}$  Zebularin) bzw. der Referenzgruppe (0  $\mu\text{M}$  Zebularin) die eine Berechnung einer absoluten Demethylierung verhindert. Eine Berechnung des *Difference Scores* zur p-Wert-Transformation wird dadurch nicht beeinträchtigt. Bei signifikant hohen Überschneidungen ( $p < 0,01$ ) zwischen den verschiedenen Zelllinien sind die Schnittmengen grau hinterlegt. **A**, Venn Diagramm von signifikant demethylierten CpGs ( $p < 0,05$ ) zwischen 5  $\mu\text{M}$  5-Aza-2'dC- (Aza) und 200  $\mu\text{M}$  Zebularin- behandelten A549 Lungenkrebszellen (Analyse nach jeweils 4 tägiger DNMT-Inhibitor Behandlung). **B**, Gegenüberstellung von besonders stark demethylierten CpGs (>20% Demethylierung) nach 4 tägiger 5-Aza-2'dC (Aza)- bzw. Zebularin-Behandlung.

### 3.2.3 Demethylierungseffizienz verschiedener DNMT-Inhibitoren

In Abbildung 7 wurde die Stärke der Zebularin- bzw. 5-Aza-2'-Desoxycytidin vermittelten DNA Demethylierung in Abhängigkeit vom ursprünglichen Methylierungsniveau der analysierten CpGs dargestellt (exemplarisch sind die Daten von A549 Lungenkrebszellen aufgeführt, A427- und H322-Daten sind im Anhang aufgeführt (Abbildung 36)). Es wurden dafür 10 Gruppen (Gruppe „0%-10%“ mit CpGs von 0% bis 10% Ausgangsmethylierungslevel bis Gruppe „91-100%“ mit CpGs von 91 bis 100% Ausgangsmethylierungslevel) gebildet und pro Gruppe die Differenz aus Ausgangsmethylierungslevel und Methylierungslevel nach Behandlung mit 5  $\mu$ M 5-Aza-2'-Desoxycytidin bzw. 200  $\mu$ M Zebularin angegeben. Nach Behandlung mit 5  $\mu$ M 5-Aza-2'-Desoxycytidin stellt man die stärkste Demethylierung bei besonders stark methylierten CpGs (Gruppe „91-100%“) fest (Abbildung 7 A). Mit abnehmendem Ausgangsniveau an DNA-Methylierung nimmt auch die Stärke der Demethylierung ab. Bei der entsprechenden Darstellung der Zebularin vermittelten Demethylierung in A549 Zellen zeigt sich ein charakteristischer Unterschied (welcher ebenfalls bei A427 und H322 Zellen auftritt (Abbildung 36): Von 0% bis 60% Ausgangsmethylierungslevel steigt die Stärke der Demethylierung stetig an. Bei höher methylierten CpGs (61%-100%) nimmt die Demethylierung, im Vergleich zur 5-Aza-2'-dC-induzierten Demethylierung, jedoch wieder ab (Abbildung 7 A).

Sowohl nach der Behandlung mit Zebularin als auch mit 5-Aza-2'dC unterscheiden sich die Demethylierungsprofile von TSS-assoziierten-CpGs im Vergleich zu nicht-TSS-assoziierten-CpGs (Abbildung 7 B, C): Nach Zebularin-Therapie zeigen bei den TSS-assoziierten-CpGs die stark methylierten CpGs (>70%) die stärkste Demethylierung (>10%) (Abbildung 7 B). Im Gegensatz dazu werden bei nicht-TSS-assoziierten CpGs die stark methylierten CpGs (>70%) nicht am stärksten demethyliert (Abbildung 7 C). Nach 5-Aza-2'dC-Behandlung tritt nur bei stark methylierten TSS-assoziierten CpGs (>80%) ein Demethylierungseffekt auf (Abbildung 7 B). Bei den nicht-TSS-assoziierten CpGs tritt auch bei niedrigeren Ausgangsmethylierungsniveaus (<60%) eine Demethylierung von >10% auf (Abbildung 7 C).



**Abbildung 7: Demethylierungseffizienz verschiedener DNMT-Inhibitoren in Lungenkrebszelllinien.** Dargestellt ist die Demethylierung in Abhängigkeit vom Ausgangsmethylierungslevel von A549 Zellen nach 4 tägiger DNMT-Inhibitor Behandlung mit 200 µM Zebularin bzw. 5 µM 5-Aza-2'dC. Die Ausgangsmethylierungslevel sind zu jeweils 10 Gruppen zusammengefasst: Gruppe 0-10 = 0-10% Ausgangsmethylierungslevel bis Gruppe 91-100 = 91-100% Ausgangsmethylierungslevel. Die Demethylierung wurde für alle verfügbaren CpGs (A), für Transkriptionsstart (TSS)-assoziierte CpGs (B) und für nicht TSS-assoziierte CpGs (C) nach DNMT-Inhibitor Behandlung dargestellt.

### 3.3 Funktionelle Analyse von lungenkrebspezifisch hypermethylierten CpG-Inseln

Auf Grundlage genomweiter *Illumina* 450k DNA-Methylierungsprofile von verschiedenen Lungenkrebszelllinien (A427, A549 und H322) und normalen Bronchialepithelzellen (NHBE) wurde eine *gene ontology* (GO) Analyse durchgeführt. Dies diente der funktionellen Klassifizierung hypermethylierter CpG-Inseln die in den Lungenkrebszelllinien auftreten.

Es wurden dabei funktionelle Annotationsgruppen (*GO terms*) identifiziert, welche eine statistische Anreicherung innerhalb der Gesamtheit an CpG-Insel-assoziierten Genen zeigen. Außerdem wurden Kandidaten Gene mit krebspezifisch, hypermethylierten Promotor-Regionen identifiziert, deren epigenetische Inaktivierung zur Ausprägung der Charakteristik des entsprechenden Lungenkrebs-Krankheitsbildes beitragen können.

Für jede Zelllinie wurde dafür das mittlere Methylierungsniveau jeder CpG-Insel bestimmt (309465 von 485577 Sonden des *Illumina* 450k Array (64%) liegen in 26661 CpG-Inseln). Im Anschluss daran wiederum wurden die CpG-Insel-Methylierungsdaten der verschiedenen Lungenkrebszelllinien gemittelt, um ein durchschnittliches Methylierungslevel pro CpG-Insel von allen untersuchten

Krebszelllinien zu erhalten. Anschließend wurde die Differenz aus den CpG-Insel Methylierungsdaten der Lungenkrebszelllinien und normalen Bronchialepithelzellen gebildet. Alle CpG-Inseln, deren Methylierungsdaten in Krebszellen im Vergleich zu normalen Bronchialepithelzellen eine durchschnittliche Hypermethylierung von mindestens 50% zeigten wurden auf eine Anreicherung bestimmter *GO terms* getestet.

Die Analyse erfolgte mit dem *Genomic Regions Enrichment of Annotations Tool* (GREAT, <http://great.stanford.edu/>). Dabei werden in einem zweistufigen Prozess zuerst Gen-assoziierte Regionen (z.B. CpG-Inseln) definiert: In der gegenwertigen Arbeit wurden Regionen 5 kb *upstream* bis 1 kb *downstream* vom Transkriptionsstart als Gen-assoziierte Regionen erfasst. Anschließend wurden von einem Set an genomischen Input-Regionen (in diesem Fall hypermethylierte CpG-Inseln) bestimmt, mit welchen Gen-assoziierten Regionen diese überlappen. Der GREAT Algorithmus errechnet im Anschluss daran anhand von bekannten Gen-Annotationen von jenen Genen, die mit Gen-assoziierten Regionen verbunden sind, eine statistische Anreicherung bestimmter *GO-Terms* (McLean et al, 2010). Als Referenz diente der Datensatz aller CpG-Inseln *des Illumina 450k BeadChips*. Es wurden 3260 lungenkrebspezifisch, hypermethylierte CpG-Inseln (>50% Hypermethylierung von Lungenkrebszellen im Vergleich zu NHBE-Zellen) analysiert und eine Anreicherung von *GO-terms* aus einer Gesamtzahl von 26661 CpG-Inseln untersucht. Unter den verwendeten Kriterien zur Definition von Gen-assoziierten Regionen (s.o.) waren knapp 30% der getesteten CpG-Inseln mit einem Gen verbunden, der überwiegende Teil an CpG-Inseln war jedoch mit zwei Genen assoziiert.

Die angereicherten *GO-terms* von Lungenkrebs-spezifisch hypermethylierten Genen sind in Tabelle 15 aufgeführt: Bezogen auf den Ontologie-Begriff „molekulare Funktion“, weisen lungenkrebspezifisch hypermethylierte Genprodukte aus der Kategorie „Sequenz spezifische DNA Bindung (ID: GO:0043565)“ die höchste statistische Anreicherung auf (Tabelle 15). Darunter fallen Gene die an GC-reiche DNA-Sequenzen, an spezifische Sequenzmotive oder an verschiedene DNA-Typen (z.B.: Promotor- oder rDNA- Bindung) binden. Die funktionelle Analyse von Proteinfunktion, -familien durch die *InterPro* Datenbank ergab, dass unter den Genen, welche mit hypermethylierten CpG-Insel assoziiert sind, jene mit Homeobox-Domänen am stärksten angereichert sind („Homeobox domain“, ID: IPR001356) (Tabelle 15). Die hypermethylierten CpG-Inseln waren außerdem signifikant mit Genen assoziiert, welche in embryonalen Stammzellen die repressive Histonmodifikation H3K27me3 in ihren Promotoren tragen (ID: BENPORATH\_ES\_WITH\_H3K27ME3). Übereinstimmend damit gibt es auch eine signifikante Überschneidung mit jenen Genen, welche von *Embryonic Ectoderm Development Protein (EED)*, als Teil des repressiven Polycomb Komplexes, in humanen embryonalen Stammzellen gebunden werden (ID: BENPORATH\_EED\_TARGETS) (Tabelle 15). Es gibt ebenfalls eine starke Anreicherung von Genen, welche an der Regulation der beta Zell Entwicklung (ID: REACTOME\_REGULATION\_OF\_BETA\_CELL\_DEVELOPMENT) innerhalb der Langerhans-Inseln und der Regulation der Genexpression von beta Zellen (ID: REACTOME\_REGULATION\_OF\_GENE\_EXPRESSION\_IN\_BETA\_CELLS) beteiligt sind.

**Tabelle 15: Übersicht über die analysierten GO-Terms der CpG-Inseln, die in Lungenkrebs im Vergleich zu NHBE-Zellen hypermethyliert vorliegen.** Dargestellt sind die verschiedenen Ontologie Kategorien mit den zugeordneten GO-Terms, welche die stärkste statistische Anreicherung (auf Grundlage des *false discovery rate (FDR)*- angepassten p-Wertes (q-value)) zeigen.

Ontologie-Name (Datenbanken)	Erklärung	GO-Term Name	Hyper FDR Q-Value	Anzahl von Genen aus der Input-Liste vs. Gesamtzahl von annotierten Genen
<b>GO Consortium</b> <i>molecular function</i>	Molekulare Funktion	sequence-specific DNA binding (ID: GO:0043565)	<b>2.5680</b> * 10 <sup>-113</sup>	333 von 697 Genen
<b>InterPro</b>	Datenbank mit Daten zu Proteindomänen, -familien, und funktionellen sites	Homeobox domain (ID: IPR001356)	<b>4.6471</b> * 10 <sup>-127</sup>	162 von 243 Genen
<b>MSigDB</b> <i>Perturbation</i>	Datenbank mit Genexpressionsprofilen von genetischen und Chemiebedingten Störungen	Set 'H3K27 bound': genes possessing the trimethylated H3K27 (H3K27me3) mark in their promoters in human embryonic stem cells, as identified by ChIP on chip. (ID: BENPORATH_ES_WITH_H3K27ME3)	<b>3.1532</b> * 10 <sup>-159</sup>	520 von 1059 Genen
		Set 'Eed targets': genes identified by ChIP on chip as targets of the Polycomb protein EED [GeneID=8726] in human embryonic stem cells. (ID: BENPORATH_EED_TARGETS)	<b>2.2925</b> * 10 <sup>-147</sup>	454 von 1005 Genen
		Set 'PRC2 targets': Polycomb Repression Complex 2 (PRC) targets; identified by ChIP on chip on human embryonic stem cells as genes that: possess the trimethylated H3K27 mark in their promoters and are bound by SUZ12 [GeneID=23512] and EED [GeneID=8726] Polycomb proteins. (ID: BENPORATH_PRC2_TARGETS)	<b>3.6522</b> * 10 <sup>-130</sup>	324 von 613 Genen
<b>MSigDB</b> <i>Pathway</i>	Datenbank mit Genen, welche mit Signalwegen assoziiert sind	Genes involved in Regulation of beta-cell development (ID: REACTOME_REGULATION_OF_BETA_CELL_DEVELOPMENT)	<b>1.8217</b> * 10 <sup>-10</sup>	16 von 30 Genen
		Maturity onset diabetes of the young (ID: KEGG_MATURITY_ONSET_DIABETES_OF_THE_YOUNG)	<b>3.5505</b> * 10 <sup>-10</sup>	14 von 25 Genen
		Genes involved in Regulation of gene expression in beta cells (ID: REACTOME_REGULATION_OF_GENE_EXPRESSION_IN_BETA_CELLS)	<b>2.4774</b> * 10 <sup>-6</sup>	10 von 20 Genen
<b>MSigDB</b> <i>Predicted promoter motifs</i>	Datenbank mit Genen, welche ein bestimmtes Transkriptionsfaktor-Binde-Motiv in ihren Promotoren tragen	Motif NNNTAATTAGCANN matches VSX1: visual system homeobox 1 homolog, CHX10-like (zebrafish) (ID: V\$CHX10_01)	<b>3.5309</b> * 10 <sup>-34</sup>	78 von 211 Genen
		Motif NAAWAATTANS matches PAX4: paired box gene 4 (ID: V\$PAX4_02)	<b>3.4385</b> * 10 <sup>-31</sup>	74 von 225 Genen
		Motif YNNNTAATCYCMN matches CRX: cone-rod homeobox (ID: V\$CRX_Q4)	<b>2.4854</b> * 10 <sup>-28</sup>	102 von 277 Genen
		Motif NNKGAATTAVAVTDN matches POU3F1: POU domain, class 3, transcription factor 1 (ID: V\$TST1_01)	<b>6.8428</b> * 10 <sup>-27</sup>	87 von 246 Genen
		Motif TGATTRY matches GF11: growth factor independent 1 (ID: TGATTRY_V\$GF11_01)	<b>2.1314</b> * 10 <sup>-26</sup>	85 von 278 Genen
		Motif NNNNNNNWATGCAAATNNNNWNA matches POU2F1: POU domain, class 2, transcription factor 1 (ID: V\$OCT1_04)	<b>2.2480</b> * 10 <sup>-25</sup>	78 von 227 Genen

Darüber hinaus sind aber auch Gene überrepräsentiert, die mit einem Typ3 Diabetes Subtyp (*Maturity onset diabetes of the young* – MODY) verbunden sind (ID: KEGG\_MATURITY\_ONSET\_DIABETES\_OF\_THE\_YOUNG) (Tabelle 15). Ein bevorzugt auftretendes Transkriptionsfaktor-Bindemotiv innerhalb der Liste an hypermethylierten CpG-Inseln ist das NNNTAATTAGCNNN Motiv, welches dem Konsensus von *visual system homeobox 1 homolog (VSX1)* bzw. *CHX10-like* entspricht (ID: V\$CHX10\_01). Ein anderes stark angereichertes Sequenzmotiv ist TGATTTTRY des *growth factor independent 1 (GF1)*, welches als transkriptioneller Repressor wirkt (ID: TGATTTTRY\_V\$GFI1\_01). Darüber hinaus treten die Bindemotive verschiedener anderer Homeobox Transkriptionsfaktoren (PAX4, CRX, POU3F1 und POU2F1) mit hochsignifikanter Häufigkeit in der Liste der hypermethylierten CpG-Inseln auf (Tabelle 15).

Durch stringenteres Filterung der hypermethylierten CpG-Inseln (> 60%, 70%, 80% Hypermethylierung der Lungenkrebszelllinien im Vergleich zu NHBE-Zellen) kommt es innerhalb der beschriebenen GO-Kategorien zu keiner Verschiebung der stark angereicherten GO-Subtypen. Da die Methylierungsmuster von H322 und A427 deutlich ähnlicher sind (im Vergleich zu A549) (Abbildung 9) wurde die *GO-Term* Analyse außerdem nur mit diesen beiden Zelllinien durchgeführt. Die Analyse-Parameter (50% CpG-Insel Hypermethylierung und Definition von Gen-assoziierte Regionen: 5 kb *upstream* bis 1 kb *downstream* vom TSS) wurden beibehalten. Auch in dieser Kombination kommt es zu keiner Veränderung der statistisch am Stärksten angereicherten *GO-Term* Kategorien.

Die entsprechenden Analysen wurden mit einem ausgedehnten Set an nicht kleinzelligen Lungenkrebszelllinien (NSCLC-Zelllinien, n=69) verifiziert. Dabei wurde die differenzielle CpG-Insel DNA-Methylierung der NSCLC-Zelllinien im Vergleich zu verschiedenen normalen Lungenzelllinien (n=6) untersucht. Es wurde dabei auf Datensätze der NCBI-GEO Datenbank zurückgegriffen, welche im Rahmen einer Studie von Walter et al., 2012 veröffentlicht wurden (Walter et al, 2012). Es konnten grundsätzlich die Ergebnisse, welche bei der Analyse der vier Zelllinien (A427, A549, H322 und NHBEC) gewonnen wurden, bestätigt werden. Zusätzlich konnte eine Anreicherung des GO-Terms „zelluläre Komponente“ in der Kategorie „*transcription factor complex*“ nachgewiesen werden. In NSCLC-Zellen sind jene CpG-Insel-assoziierten Gene angereichert, welche in epithelialen Brustkrebszelllinien aufgrund einer *K-Ras* Überexpression als hochreguliert beschrieben wurden (ID: KRAS.600.LUNG.BREAST\_UP.V1\_UP). Es zeigt sich aber auch, dass jene Gene angereichert sind, welche in *ATF2*-überexprimierten myometrischen Zellen eine reduzierte Expression zeigen (ID: ATF2\_UP.V1\_DN).

Zusätzlich wurden von den lungenkrebspezifisch, hypermethylierten CpG-Inseln die Promotor-assoziierten CpG-Inseln herausgefiltert (Tabelle 16). Unter den Genen mit hypermethylierten Promotoren befinden sich einige interessante Kandidaten, die bereits in einem Krebs-Kontext beschrieben wurden: Der Transkriptionsfaktor *Paired Box Gene 5 (PAX5)* wurde bereits in dukualen Karzinomen und in invasivem Brusttumoren als hypermethyliert beschrieben (Moelans et al, 2011). Von einem anderen Kandidatengen, welches als hypermethyliert in Lungenkrebszelllinien identifiziert wurde, ist Homöobox-Protein *MEIS2*. Von diesem Gen ist bekannt, dass seine Expression in akuter myeloider Leukämie durch Promotor-Hypermethylierung reprimiert wird (Lasa et al, 2004). Bei dem Kandidatengen PLK5 handelt es sich um einen putativen Tumorsuppressor, dessen Expression mittels Promotor-Hypermethylierung in Astrozyten und Glioblastomen ausgeschaltet ist

**Tabelle 16: Top 20 Kandidatengene, welche in Lungenkrebszelllinien stark hypermethylierte CpG-Insel Promotoren aufweisen.** Für die verschiedenen Zelllinien sind die CpG-Insel-Methylierungsdaten in Prozent angegeben. Aus den drei Krebszelllinien (A427, A549, H322) wurde für die verschiedenen CpG-Inseln der Mittelwert gebildet ( $\emptyset$  Lungenkrebszelllinien) und dieser anschließend vom Wert der NHBE-Zellen abgezogen (Hypermethylierung). Zusätzlich sind die Namen der Gene angegeben, welche mit den Promotor-CpG-Inseln assoziiert sind.

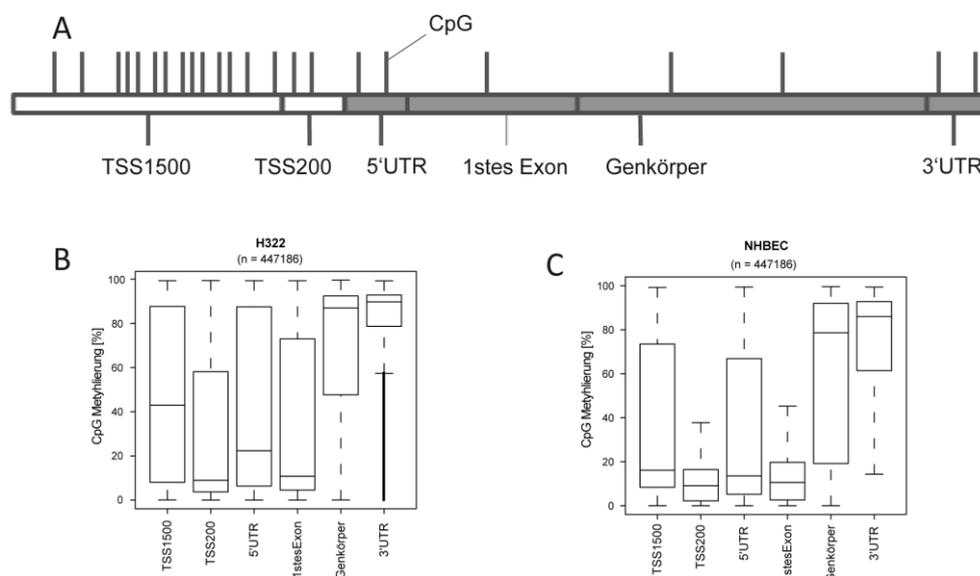
Nr.	CpG-Insel	Promotor CpG-Insel Methylierung [%]						assoziertes Gen
		A427	A549	H322	$\emptyset$ Lungen- krebs- zelllinien	NHBE	Hypermethylierung (Differenz auf Lungenkrebszellini- en und NHBE)	
1	chr11: 72975469-72975797	99	97	99	98	2	96	<i>P2RY6</i>
2	chr9: 37002489-37002957	99	96	99	98	5	93	<i>PAX5</i> , Isoform 14
3	chr17: 7832532-7833164	97	97	96	97	4	93	<i>KCNAB3</i>
4	chr15: 37390175-37390380	96	97	94	96	4	92	<i>MEIS2</i> , Isoform G
5	chr5: 137610105-137610311	96	94	96	95	4	91	<i>GFRA3</i>
6	chr19: 1523705-1524565	94	94	89	92	2	90	<i>PLK5</i>
7	chr19: 18118741-18119553	95	93	94	94	4	90	<i>ARRDC2</i>
8	chr2: 228736230-228736544	94	94	94	94	4	90	<i>DAW1</i>
10	chr4: 682724-683079	93	94	94	94	4	90	<i>MFSD7</i>
9	chr4: 57371582-57372022	95	94	95	95	5	89	<i>ARL9</i>
11	chr14: 24837872-24838324	96	94	95	95	6	89	<i>NFATC4</i>
12	chr2: 27665251-27665670	96	96	97	96	7	89	<i>KRTCAP3</i>
13	chr17: 41177336-41177593	93	87	97	92	3	89	<i>RND2</i>
14	chr10: 102495116-102495613	95	95	92	94	5	89	<i>PAX2</i> , Isoform F
15	chr2: 54086776-54087266	92	93	93	93	4	89	<i>ASB3</i> , <i>GPR75</i>
16	chr12: 49487963-49488202	97	80	98	92	3	89	<i>DHH</i>
17	chr20: 44540445-44540957	94	93	80	89	1	88	<i>PLTP</i>
19	chrX: 100546063-100546550	96	96	96	96	8	86	<i>TAF7L</i>
18	chr15: 72489478-72490119	93	93	94	93	6	87	<i>GRAMD2</i>
20	chr12: 124246524-124247254	95	84	95	92	5	87	<i>DNAH10</i>
126	chr3: 50377803-50378540	92	93	92	93	13	80	<i>RASSF1A</i>
1381	chr7: 87104723-87105305	48	21	88	53	7	46	<i>ABCB4</i>

Darüber hinaus gibt es andere interessante Kandidaten, welche noch nicht in einem Krebskontext in Zusammenhang mit DNA Hypermethylierung beschrieben wurden. Die Promotor-CpG-Insel des *ABCB4* Gens weist in A427- und H322-Zellen im Vergleich zu NHBE-Zellen ebenfalls eine starke Hypermethylierung auf. In einem späteren Abschnitt dieser Arbeit folgt eine ausführliche Analyse der Promotor-Methylierung dieses Gens in verschiedenen Tumorentitäten (vergl. Seite 123).

### 3.4 Charakterisierung der DNA-Methylierungsprofile von CpG-Inseln und damit assoziierter Regionen

#### 3.4.1 Differentielle Methylierungsanalyse von annotierten, funktionellen Genregionen in H322-Lungenkrebszellen und normalen Bronchialepithelzellen (NHBE)

Die verschiedenen funktionellen Elemente eines Gens, wie z.B. Promoter-Region, Gen-Körper und 3'UTR, weisen charakteristische DNA-Methylierungsmuster auf (Jones, 2012; Karlsson et al, 2014). 92% (447186 CpGs) der, auf dem *Illumina 450k BeadChip*, untersuchten CpGs sind mit funktionellen Regionen (TSS1500, TSS200, 5'UTR, 1stes Exon, Genkörper, 3'UTR) eines oder mehrerer Transkripte assoziiert (Abbildung 8 A). Die TSS1500-Region umfasst den Bereich 1500 bp *upstream* vom Transkriptionsstart bis 200 bp *upstream* vom Transkriptionsstart (TSS). Die TSS200-Region wiederum erstreckt sich 200 bp *upstream* vom TSS bis zum Transkriptionsstart. Anhand dieses Annotationschemas wurden Unterschiede der DNA-Methylierung von H322 Lungenkrebszellen im Vergleich zu normalen Bronchialepithelzellen (NHBE) analysiert (Abbildung 8 B, C).



**Abbildung 8: Vergleich der DNA-Methylierung von verschiedenen funktionellen Regionen zwischen H322 Lungenkrebszellen und normalen Bronchialepithelzellen (NHBE).** A, schematische Darstellung der verschiedenen funktionellen Regionen (TSS1500, TSS200, 5'UTR, 1stes Exon, Genkörper und 3'UTR), die auf dem *Illumina 450k Array* annotiert vorliegen (Schema abgewandelt nach dem (HumanMethylation450 BeadChip Data Sheet, Illumina). TSS = Transkriptionsstart, UTR= untranslatierte Region. B, Verteilung der DNA-Methylierung (in %) des *Illumina 450k* Datensatzes von H322 Lungenkrebszellen auf die verschiedenen Gen-Regionen. C, Verteilung der DNA-Methylierung (in %) des *Illumina 450k* Datensatzes von normalen Bronchialepithelzellen auf die verschiedenen Gen-Regionen.

Promotor-assoziierte CpGs in den Bereichen 200 bp *upstream* vom Transkriptionsstart (TSS), der 5'UTR Region bis zum 1sten Exon sind sowohl in H322 als auch in NHBE schwach methyliert (Mediane der Promotor-assoziierten Regionen von H322-Zellen: TSS200: 9%, 5'UTR: 22%, 1stes Exon: 11%; Mediane der Promotor-assoziierten Regionen von NHBE-Zellen: TSS200: 9%, 5'UTR: 14%, 1stes Exon: 11%; Abbildung 8 B, C). Dies lässt sich auch bei anderen analysierten NSCLC-Zelllinien (A427 und A549) feststellen (Abbildung 37). Interessanterweise sind zwischen den Regionen im Bereich des TSS (TSS200, 5'UTR, 1stes Exon) trotzdem Unterschiede in den DNA-Methylierungsleveln zu erkennen: Das mittlere Methylierungsniveau der 5'UTR Region liegt in H322-Zellen um ca. 12% höher

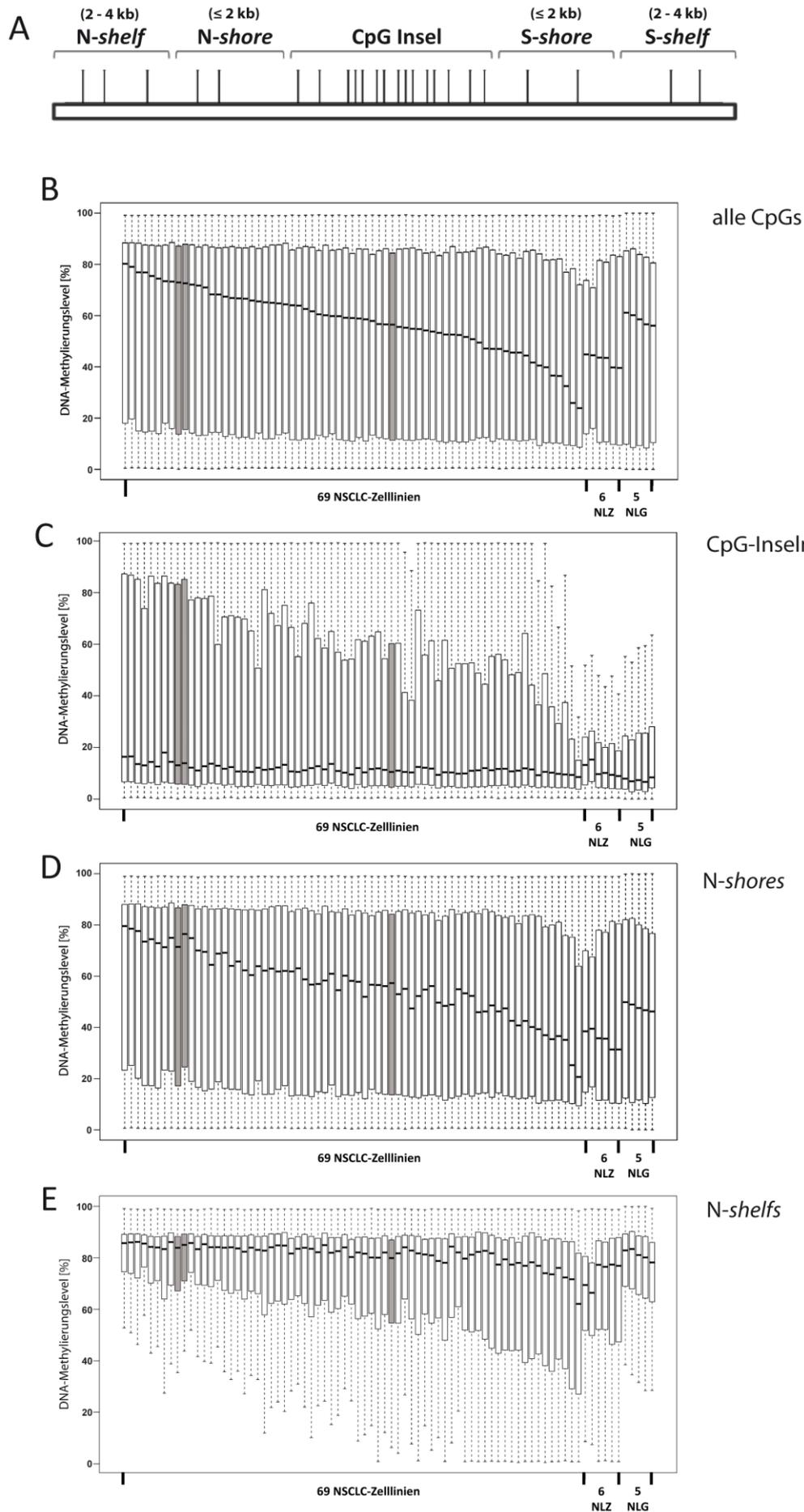
als jenes der TSS200- bzw. der Exon 1-Region (Abbildung 8 B, C). Auch dies lässt sich bei anderen analysierten NSCLC-Zelllinien (A427 und A549) feststellen (Abbildung 37).

Die Region 1500 bp *upstream* vom TSS (TSS1500) zeigt in H322 Zellen ein um ca. 29% höheres mittleres DNA-Methylierungslevel im Vergleich zu den TSS-assoziierten Regionen (TSS200, 5'UTR, 1stes Exon). Die TSS1500-Region ist in H322 Zellen wiederum um ca. 23% höher methyliert als in NHBE-Zellen (Abbildung 8 B, C). Die Methylierungslevel in dieser Region weisen in Krebs- und Normalbronchialzellen jeweils zwischen dem oberen und unterem Quartil eine sehr hohe Streuung auf (H322: ca. 80%, NHBEC: ca. 65%; Abbildung 8 B, C). Die kodierenden Bereiche des Genkörpers und des 3'UTRs sind sowohl in H322-Zellen als auch in den normalen Bronchialepithelzellen von sehr hohen Methylierungsleveln gekennzeichnet (Median der Genkörper-assoziierten Methylierung: 87% (H322), 76% (NHBEC); Median der 3'UTR-assoziierten Methylierung: 90% (H322), 86% (NHBEC), Abbildung 8 B, C).

### 3.4.2 DNA-Methylierungsanalyse von CpG Insel assoziierten Regionen in Lungenkrebszelllinien

Neben der Analyse der DNA-Methylierungsdaten nach Gen-assoziierten Parametern (Promoter-Region, Gen-Körper, 3'UTR) wurden diese ebenfalls anhand ihrer relativen Position zu annotierten CpG-Inseln untersucht (Abbildung 9 A). Es wurden dabei 69 nicht kleinzellige Lungenkrebszelllinien (ABC-1, SW1573, HOP18, HCC1171, LXFL529, H1703, H441, EBC-1, **H322**, **A427**, H1568, CHA-GO-K-1, H2087, H1975, H226, H2444, HCC515, H1299, H2030, H2405, HCC2935, H1373, H1666, RERF-LC-Ad1, Calu-6, H1155, H1651, H2347, H358, H838, H2228, HCC827, H2073, H1650, H23, H1993, Calu-3, H650, H460, H727, **A549**, H292, HCC4006, H2170, H1838, H820, H1355, RERF-LC-MS, H2122, H1793, H661, HOP62, HCC15, EK VX, H1792, H2110.1, Calu-1, H2110, HCC4017, H2009, HOP92, SK-MES-1, RERF-LC-KJ, H1437, H647, H2126, H2172, H1435, H1755) in Bezug auf die DNA-Methylierung in CpG-Inseln und den umgebenden Sequenzbereichen mit sechs normalen Lungenzelllinien (gBEC1, gBEC1\_UI, gSAC1, gSAC1\_UI, gBEC, gSAC) und fünf normalen Lungengewebe (GSM1264690, GSM1264711, GSM1264727, GSM1264764, GSM1264854) verglichen. Die Methylierungsdaten der NSCLC-Zelllinien und der normalen Lungenzelllinien stammen von der NCBI-GEO Datenbank (GEO-Accession: GSE36216) und wurden im Rahmen der Studie von Walter et al, 2012 veröffentlicht. Diese Daten wurden mittels Bisulfit-Sequenzierung validiert (Korrelation zwischen *Illumina 450k Array* und Bisulfit-Sequenzierung:  $r = 0,926$ , Walter et al., 2012). Die Methylierungsdaten der normalen Lungengewebe stammen ebenfalls aus der NCBI-GEO Datenbank und wurden von Shi et al. 2014 veröffentlicht (GEO-Accession: GSE52401) (Shi et al, 2014).

Bedingt durch die Betrachtung verschiedener Subtypen (Adenokarzinome, Plattenepithelkrazinom, etc.) nicht kleinzelliger Lungenkrebszelllinien sind die mittleren Methylierungsniveaus sehr heterogen, wenn man alle Methylierungsinformationen des *Illumina 450k Arrays* berücksichtigt. Im Vergleich dazu ist die Streuung der DNA-Methylierungsdaten zwischen verschiedenen normalen Lungenzelllinien bzw. verschiedenen Lungengewebeproben geringer (Abbildung 9 A). CpG-Inseln sind grundsätzlich sehr niedrig methyliert, sowohl bei Krebs- als auch bei Normalzelllinien, jedoch zeigt sich bei einigen Krebszelllinien eine starke Streuung des Interquartilabstandes im Vergleich zu normalen Zelllinien und Geweben (Abbildung 9 B).



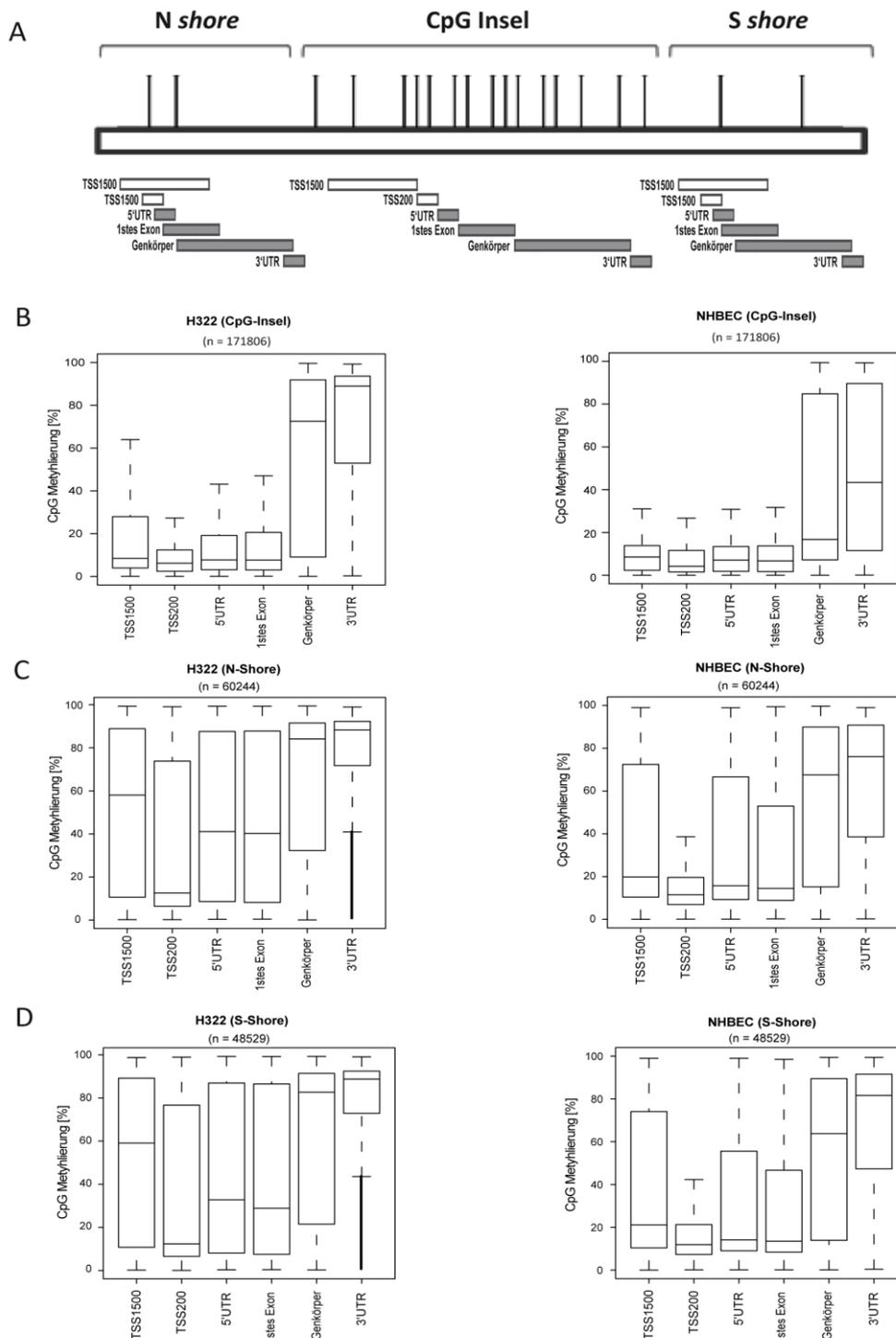
**Abbildung 9: DNA-Methylierungsanalyse von CpG-Insel assoziierten Regionen.** **A**, schematische Darstellung einer CpG-Insel (Insel) und der verschiedenen CpG-Insel-flankierenden Regionen (*N/S-shelf*, *N/S-shore*), die auf dem *Illumina 450k Array* annotiert vorliegen (Schema abgewandelt nach HumanMethylation450 BeadChip Data Sheet, Illumina). **B**, *Illumina 450k Array* DNA-Methylierungsinformationen von 69 NSCLC-Zelllinien (ABC-1, SW1573, HOP18, HCC1171, LXF529, H1703, H441, EBC-1, **H322**, **A427**, H1568, CHA-GO-K-1, H2087, H1975, H226, H2444, HCC515, H1299, H2030, H2405, HCC2935, H1373, H1666, RERF-LC-Ad1, Calu-6, H1155, H1651, H2347, H358, H838, H2228, HCC827, H2073, H1650, H23, H1993, Calu-3, H650, H460, H727, **A549**, H292, HCC4006, H2170, H1838, H820, H1355, RERF-LC-MS, H2122, H1793, H661, HOP62, HCC15, EKVX, H1792, H2110.1, Calu-1, H2110, HCC4017, H2009, HOP92, SK-MES-1, RERF-LC-KJ, H1437, H647, H2126, H2172, H1435, H1755), 6 normalen Lungenzelllinien (gBEC1, gBEC1\_UI, gSAC1, gSAC1\_UI, gBEC, gSAC) und 5 Lungengewebe. Die DNA-Methylierungsdaten der NSCLC-Zelllinien und der normalen Lungenzelllinien (GSM1264690, GSM1264711, GSM1264727, GSM1264764, GSM1264854) wurden von Walter et al, 2012 generiert (NCBI-GEO-Accession: GSE36216) bereitgestellt. Die Methylierungsprofile der normalen Lungengewebe wurden von Shi et al., 2012 zur Verfügung gestellt (NCBI-GEO-Accession: GSE52401). Übersicht über die DNA-Methylierung in CpG-Insel (**C**), *N-shore* (**D**) und *N-shelf* (**E**) der verschiedenen Zelllinien. Norm. Zell = normale Lungenzelllinien, norm. Gew. = normales Lungengewebe.

In Anlehnung an den Terminus CpG-„Insel“ werden die DNA Sequenzen, welche räumlich die CpG-Inseln (bis zu 2 kb) umgeben als *shores* bezeichnet (Irizarry et al, 2009). Diese Bereiche weisen im Vergleich zu CpG-Inseln eine deutlich niedrigere CG-Dinukleotid-Dichte auf. Bereiche die in einem Abstand von 2 kb bis 4 kb von einer CpG-Insel liegen werden darüber hinaus als *shelves* bezeichnet (Abbildung 9 A). Zur Unterscheidung der beiden möglichen Enden einer CpG-Insel bedient man sich der relativen Orientierung einer CpG-Insel auf einem Chromosom. An das Ende einer CpG-Insel mit niedrigerer Chromosomen Koordinate (ausgehend vom Telomer des p-Armes eines Chromosoms) schließt sich die "N(orthern)-*shore*" an. Am anderen Ende der CpG-Insel (höhere Chromosomen Koordinate) wiederum liegt die sogenannte „S(outhern)-*shore*“.

### 3.4.3 Genomweite Analyse von hypervariablen DNA-Methylierungsmustern in CpG-Insel-*shore* Bereichen

In DNA-Methylierungsstudien von Dickdarm-Karzinomen konnte gezeigt werden, dass die überwiegende Mehrheit der krebsspezifischen Veränderungen des DNA-Methyloms in Bereichen von bis zu 2 kb außerhalb von CpG-Inseln stattfindet. Innerhalb dieser *shore* Bereiche zeigen sich die größten gewebespezifischen Unterschiede in Bezug auf die DNA-Methylierung. 76% der differentiell methylierten Regionen liegen in *shore* Bereichen ( $\leq 2$  kb von CpG Inseln entfernt) (Irizarry et al, 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde für 69 NSCLC-Zelllinien ebenfalls eine Analyse der *shore* Bereiche durchgeführt und die *shore* Methylierung der Krebszelllinien mit normalem Lungenzelllinien (NLZ) und normalem Lungengewebe (NLG) verglichen (Abbildung 9 B). Entsprechende Analysen wurden darüber hinaus auch für die Methylierung innerhalb von CpG-Inseln (Abbildung 9 C) und CpG-Insel-*shelf* Bereichen (Bereiche 2-4 kb entfernt von CpG-Inseln) durchgeführt (Abbildung 9 D). Die Analyse der DNA-Methylierung in den *shore* Bereichen der verschiedenen NSCLC-Zelllinien zeigt, dass diese im Vergleich zu den CpG-Insel-Bereichen signifikant höher ( $p = 2,2 \cdot 10^{-16}$ ) methyliert sind (Abbildung 9C, Abbildung 10 B, C, D). In den *shore* Bereichen lassen sich darüber hinaus signifikante Unterschiede ( $p = 2,2 \cdot 10^{-16}$ ) zwischen den verschiedenen, untersuchten Krebszelllinien (NSCLC-Median: 55%) und den normalen Lungenzelllinien (NLZ-Median: 35%) feststellen (Abbildung 9 ,D, Abbildung 11 C).

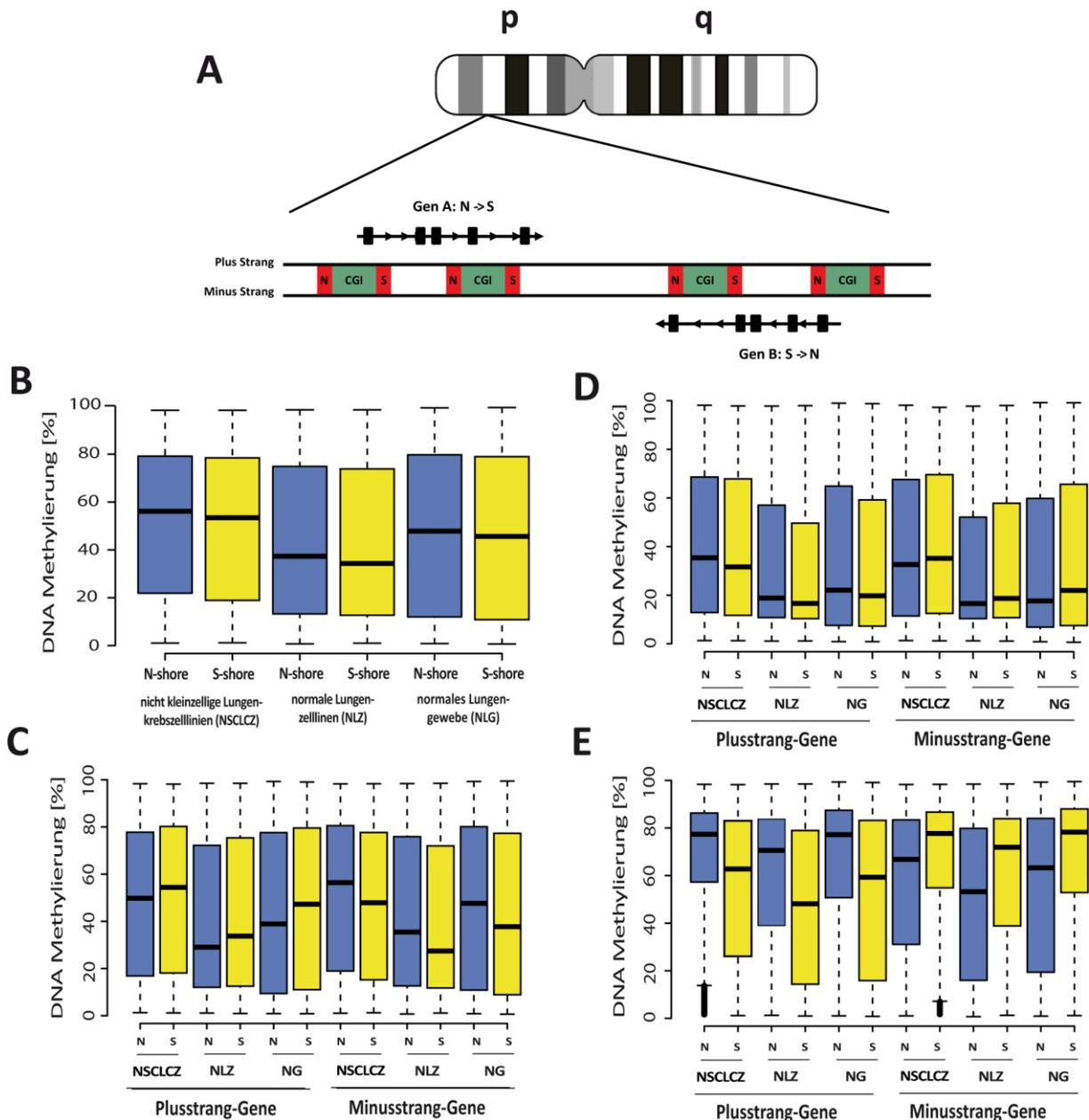


**Abbildung 10: Analyse der DNA-Methylierung in funktionellen Regionen von H322 Zellen und NHBEC unter Berücksichtigung von deren Position relativ zu annotierten CpG-Inseln und umgebenden Sequenzen (*shores*). A, schematische Darstellung der verschiedenen CpG-Insel-assoziierten Regionen (N/S-shelf, N/S-*shore*, Insel), die auf dem *Illumina* 450k Array annotiert vorliegen. (Schema abgewandelt nach HumanMethylation450 BeadChip Data Sheet, Illumina) B, Verteilung der DNA-Methylierung (in %) des *Illumina* 450k Datensatzes von H322 Lungenkrebszellen auf die verschiedenen Gen-Regionen in CpG-Inseln bzw. *shore*-Bereichen. C, Verteilung der DNA-Methylierung (in %) des *Illumina* 450k Datensatzes von normalen Bronchialepithelzellen auf die verschiedenen Gen-Regionen in CpG-Inseln bzw. *shore*-Bereichen. TSS = Transkriptionsstart, UTR= untranslatierte Region.**

Im Vergleich dazu betragen die Unterschiede des mittleren Methylierungsniveaus zwischen NSCLC- und normalen Lungenzelllinien in CpG-Insel- und shelf- Bereichen jeweils nur ca. 4% (CpG-Inseln: Median-NSCLC: 15%, Median-NLZ: 11%; *shelf*-Bereiche: Median-NSCLC: 77%, Median-NLZ: 73%) (Abbildung 9 C, D). Die *shelf* Bereiche sind unabhängig vom Krebskontext in allen untersuchten Proben stark methyliert (Abbildung 9 D).

Bei der Betrachtung von promotornahen Bereichen (TSS200, 5'UTR, 1stes Exon) im Kontext von *shore*-Bereichen (N- und *S-shore*) lässt sich ein Anstieg der DNA-Methylierung von H322-Zellen im Vergleich zu NHBE-Zellen feststellen (Abbildung 10 C, D). Bei den *shore*-Bereichen die mit Promotorsequenzen (TSS1500, 5'UTR und 1stes Exon) zusammenfallen fällt darüber hinaus auf, dass das mittlere DNA-Methylierungslevel des 1sten Exons in H322-Zellen in etwa so hoch ist wie das der 5'UTR Bereiche (Median vom 5'UTR: ca. 41%, Median der Exon 1-Region: ca. 40% (Abbildung 10 C, D). Dieser Effekt tritt ebenfalls in Normalzelllinien (NHBE) auf, das mittlere Methylierungsniveau in diesen Zellen liegt jedoch ca. 25% niedriger (Median vom 5'UTR: ca. 15%, Median der Exon 1-Region: ca. 14%). CpG-Inseln (CGI) die mit Genkörper-Sequenzen zusammenfallen sind in NHBE-Zellen niedriger methyliert (Median - Genkörper/CGI (NHBE): ca. 17%) als in Lungenkrebszelllinien (Median - Genkörper/CGI (H322): ca. 72%) (Abbildung 10 B-D).

Die mittlere Methylierung sowohl der *S-* als auch der *N-shore*-Bereiche ist in allen untersuchten NSCLC-Zelllinien höher als in den untersuchten normalen Lungenzelllinien oder normalen Lungengewebe (Abbildung 11 B). Die DNA-Methylierung der *N-shore* Region ist darüber hinaus in jeder untersuchten Zelllinie signifikant höher (NSCLC:  $p = 2,9 * 10^{-14}$ , NLZ:  $p = 8,5 * 10^{-10}$ , NG:  $p = 1,4 * 10^{-7}$ ) als in der *S-shore* Region (Abbildung 11 B). Dies gilt für NSCLC-Zelllinien ebenso wie für normale Lungenzelllinien und normale Lungengewebe. Bei der Analyse wurden Methylierungsdaten von 62870 *N-shore*-assoziierten Sonden und von 49198 *S-shore*-assoziierten Sonden berücksichtigt. Da sich die Bezeichnung der *shore*-Bereiche (*N-* oder *S-shore*) nur nach der Chromosomenorientierung richtet wurden *N-* und *S-shore* Bereiche, die auf dem *Illumina* 450k Array abgebildet sind und mit kodierten Sequenzen überlappen, zusätzlich nach der Transkriptionsrichtung der Gene mit denen zusammenfallen, gefiltert (Abbildung 11 C, D, E). Es zeigt sich dabei sowohl für die NSCLC-Zelllinien, als auch für die normalen Lungenzelllinien und Lungengewebe für die Plusstrang-Gene eine höhere Methylierung für die *S-shore*-Region im Vergleich zur korrespondierenden *N-shore*-Region. Für die Minusstrang-Gene zeigt sich eine höhere Methylierung für die *N-shore* Region im Vergleich zur assoziierten *S-shore* Region (Abbildung 11 C). Wenn die *shore*-Methylierungsdaten zusätzlich nach Promotor-assoziierten Regionen gefiltert werden (TSS1500, TSS200, 5'UTR, 1stes Exon) kehrt sich die Präferenz für die höher methylierte *shore*-Region um (Abbildung 11 D): Für die Plusstrang-Gene tritt eine höhere Methylierung in der *N-shore*-Region im Vergleich zur korrespondierenden *S-shore*-Region auf. Für die Minusstrang-Gene tritt eine höhere Methylierung in der *S-shore* Region im Vergleich zur *N-shore* Region auf. Bei Promotor-assoziierten *shore*-Bereichen scheint es, dass jeweils die *shore*-Region höher methyliert ist, die weiter *upstream* vom 5'-Ende des Gen weg liegt (Abbildung 11 D). Bei der entsprechenden Analyse von intragenischen CpG-Insel ergibt sich ein ähnliches Bild: Die Plusstrang-Gene zeigen eine höhere Methylierung für die *N-shore*-Region im Vergleich zur korrespondierenden *S-shore*-Region. Die Minusstrang-Gene zeigen das umgekehrte Bild (Abbildung 11 E).

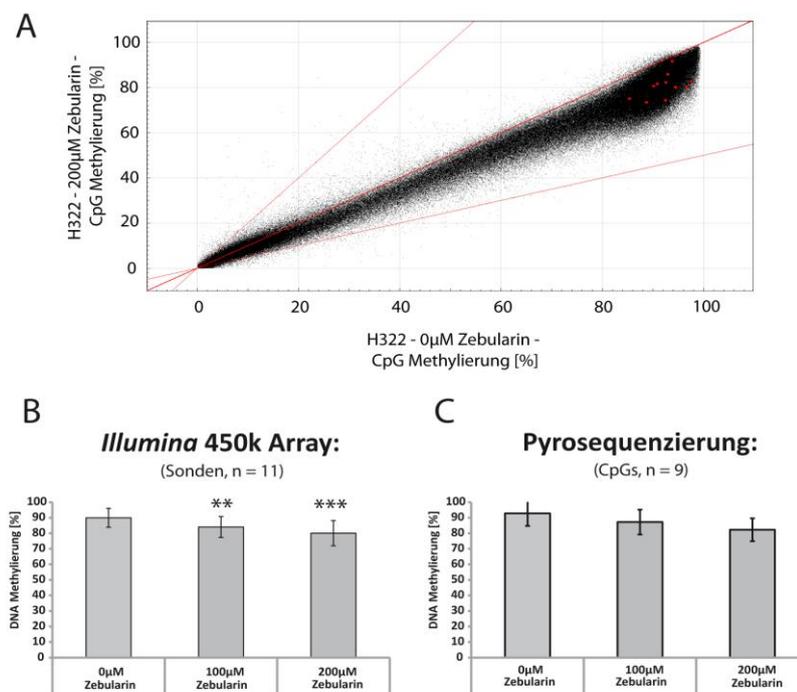


**Abbildung 11: Methylierungsanalyse von N- und S-shore Regionen in NSCLC-Zelllinien, normalen Lungenzelllinien und normalem Lungengewebe.** Methylierungsanalyse der CpG-Insel shore Bereiche mit zusätzlicher Unterscheidung nach der Genorientierung. **A**, Schematische Darstellung von CpG-Inseln (grün) und shore Bereichen (rot) auf einem Chromosomarm. Gene sind als schwarze, horizontale Striche dargestellt, die Pfeilspitzen geben die Transkriptionsorientierung an. Die dickeren, schwarzen Kästen geben Exonsequenzen an. Die Transkriptionsorientierung unterscheidet die Gene in "Plusstrang"- und "Minusstrang"- orientierte Gene. **B**, Darstellung der N-shore Methylierung (blau) und der S-shore Methylierung (gelb) von 69 NSCLC-Zelllinien (NSCLCZ), 7 normalen Lungenzelllinien (NLZ) und 5 normalen Lungengewebe (NG). **C**, N- und S-shore Methylierung von 69 NSCLC-Zelllinien (NSCLCZ), 7 normalen Lungenzelllinien (NLZ) und 5 normalen Lungengewebe (NG). Die Methylierungsdaten der shore-Bereiche wurden nach der Transkriptionsorientierung der Gene, mit denen die CpG-Insel shore Bereiche zusammenfallen, untergliedert. **D**, Darstellung der N- und S-shore Methylierung von 69 NSCLC-Zelllinien (NSCLCZ), 7 normalen Lungenzelllinien (NLZ) und 5 normalen Lungengewebe (NG), die mit dem Promotorbereich (-1500 bp vor einem TSS bis zum 1sten Exon) von Plus- oder Minusstrang orientierten Genen zusammenfallen. **E**, Darstellung der N- und S-shore Methylierung von 69 NSCLC-Zelllinien (NSCLCZ), 7 normalen Lungenzelllinien (NLZ) und 5 normalen Lungengewebe (NG), die mit dem intragenischen Bereichen (Genkörper und 3'UTR) von Plus- bzw. Minusstrang orientierten Genen überlappen.

### 3.5 Analyse der *RASSF1A* Promotor CpG-Insel Methylierung im Zusammenspiel mit epigenetischen Regulatorproteinen in Lungenkrebs

#### 3.5.1 Validierung der *Illumina 450k Array* DNA-Methylierungsdaten anhand der *RASSF1A* Promotor-CpG-Insel

Das Tumorsuppressorgen *Ras-association domain family member 1* (*RASSF1A*) kodiert für ein Mitglied in der Gruppe der Ras-Effektoren, das an der Regulation der Zellproliferation, der Apoptose und der Mikrotubuli Stabilität beteiligt ist. In einer Vielzahl verschiedener Primärtumore (u.a. Lungentumore) konnte eine epigenetische Inaktivierung von *RASSF1A* durch eine Hypermethylierung von dessen Promotor-CpG-Insel-Bereich festgestellt werden (Dammann et al, 2000). Die epigenetische Inaktivierung von *RASSF1A* kann als ein frühes Ereignis in der Tumorgenese auftreten, was dieses Gen zu einem interessanten Biomarker der frühen Karzinogenese macht (Feng et al, 2010). Exemplarisch wurden für die *RASSF1A* Promotor CpG-Insel die Daten der Zebularin-bedingten Demethylierung (Abbildung 5), welche mit dem *Illumina 450k Array* gewonnen wurden, mittels Pyrosequenzierung verifiziert (Abbildung 12).



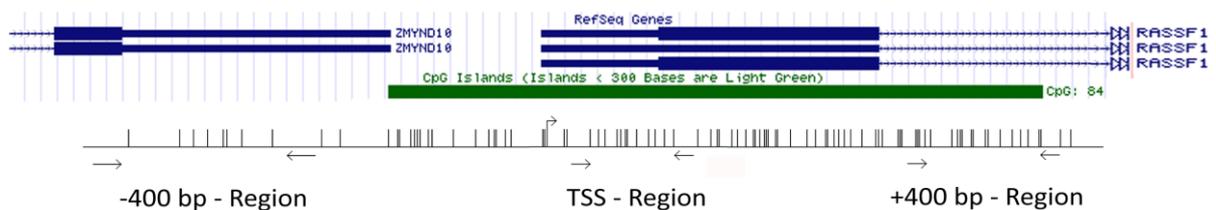
**Abbildung 12: Validierung der DNA-Methylierungsdaten des *Illumina 450k Array*:** **A**, Scatterplot mit DNA-Methylierungsdaten von H322 Zellen. Der x-Achsenwert gibt das Methylierungsniveau jedes CpG des *Illumina 450k* Datensatzes ohne Zebularin-Behandlung an und der y-Achsenwert die DNA-Methylierung der entsprechenden CpGs nach Behandlung mit 200 µM Zebularin (rote Punkte: *RASSF1A* Promotor CpG-Insel assoziierte Sonden des *Illumina 450k* Arrays). Die roten Linien geben die halbierten ([halb]), die verdoppelten ([doppelt]) und die unveränderten ([0]) Methylierungswerte (ausgehend von der Ausgangsmethylierung ohne Zebularin Behandlung (0 µM Zebularin)) an. **DNA-Methylierungsanalyse der *RASSF1A* CpG-Insel in H322 Zellen nach 4 tägiger Zebularin-Behandlung (0 µM, 100 µM, 200 µM Zebularin):** **B**, Methylierungsdaten der *RASSF1A* CpG-Insel-assoziierter Sonden (n = 11) gewonnen mittels *Illumina 450k* BeadChip Array. **C**, Pyrosequenzierungsanalyse (Pyromark Q24 System, *Qiagen*) von 9 CpGs innerhalb der *RASSF1A* CpG-Insel in einer Region ca. 100 bp hinter vom *RASSF1A*- Transkriptionsstart – vergl. Abbildung 13 (TSS- Region). Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung (SD). Für signifikante Unterschiede zwischen 0 µM Zebularin und DNMT-I-behandelten Ansätzen wurden die entsprechenden Signifikanzniveaus angegeben: \* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001.

In Abbildung 12 B und C sind die entsprechenden DNA-Methylierungsdaten des *Illumina* 450k Arrays und der Pyrosequenzierung (für die analysierte Region der *RASSF1A* CpG-Insel vergl. Abbildung 13 (TSS-Region)) für die Zebularin-Behandlung von H322-Lungenkrebszellen aufgeführt. Die Abnahme der DNA-Methylierung bei den *RASSF1A* Promotor-CpG-Insel assoziierten CpGs ist zusätzlich in Abbildung 12 A als *Scatterplot* dargestellt. Dabei ist festzustellen, dass bei den *Illumina* 450k Array Methylierungsdaten jedes mit der *RASSF1A*-CpG Insel assoziierte CpG nach Zebularin-Behandlung einen Demethylierungseffekt zeigt (Abbildung 12 A) und es insgesamt eine signifikante Reduktion (100  $\mu$ M,  $p < 0.01$ ; 200  $\mu$ M  $p < 0.001$ ) des mittleren Methylierungsniveaus von ca. 90% auf ca. 80% gibt (Abbildung 12 B). Mittels Pyrosequenzierungsanalyse konnte die Zebularin konzentrationsabhängige Abnahme der DNA-Methylierung in der *RASSF1A*- Promotor Region bestätigt werden (Abbildung 12 C). Es zeigen sich bei beiden Methoden sehr ähnliche Ergebnisse. Die absoluten Methylierungswerte sind bei der Pyromark24 (*Qiagen*)-Pyrosequenzierung jedoch im Schnitt um 3% höher im Vergleich zum *Illumina* 450k *BeadChip*.

### 3.5.2 Detaillierte Analyse der DNA-Methylierung der *RASSF1A* CpG-Insel und der umgebenden *shore* Bereiche

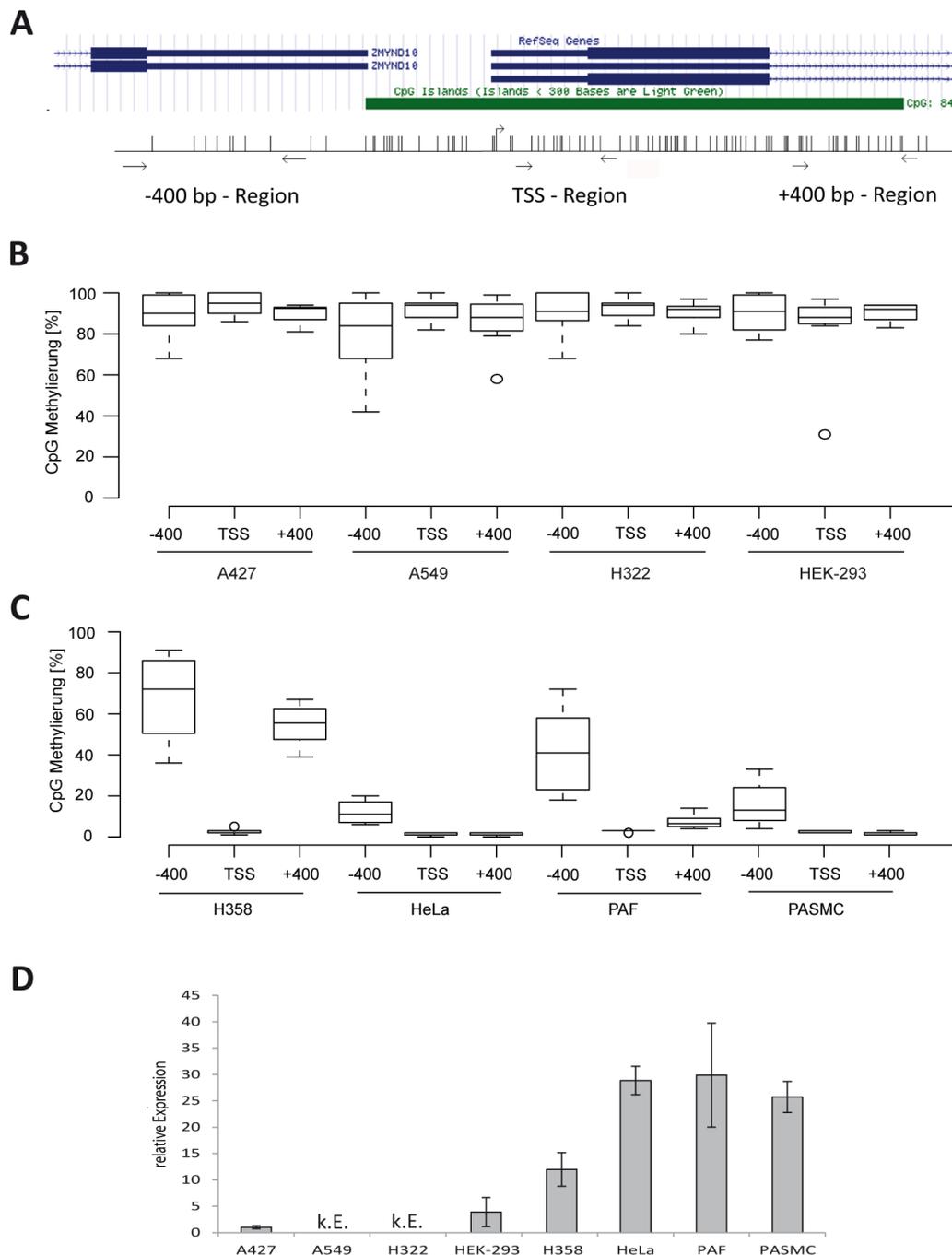
Bereits in früheren Studien konnte gezeigt werden, dass differentiell auftretende DNA-Methylierung in CpG-Insel *shore* Bereichen ein häufiges Phänomen in der Pathogenese darstellen und dass die epigenetischen DNA Modifikationen in diesen Bereichen darüber hinaus einen regulatorischen Einfluss auf die Genexpression haben (Irizarry et al, 2009).

Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit eine umfassende Analyse der DNA-Methylierung in der Promotor Region von *RASSF1A* durchgeführt, in welcher die Methylierung im *S-shore* Bereich der *RASSF1A* Promotor CpG-Insel und darüber hinaus in 2 verschiedenen Abschnitten innerhalb der Promotor CpG-Insel des *RASSF1A* Gens mittels Pyrosequenzierung detailliert untersucht wurde (Abbildung 13).



**Abbildung 13: Schematische Darstellung der drei Regionen im *RASSF1A*-Promotor Bereich, die mittels Pyrosequenzierung analysiert wurden.** Die vertikalen Linien (|) innerhalb des Schemas geben die verschiedenen CpGs in der *RASSF1A*-Promotorsequenz an. Die Pfeile (→, ←) unterhalb der dargestellten CpGs markieren die verschiedenen PCR-Amplikons und die Nummern geben die jeweils analysierten CpGs an. Transkriptionsstart (TSS) = ↑. Der grüne Kasten gibt die Position der *RASSF1A*-Promotor CpG-Insel an. Die blauen Kästen geben (von links nach rechts) die Position des letzten Exons des *ZMYND10*-Gens bzw. des ersten Exons des *RASSF1A*-Gens an. Die schmaleren blauen Kästen, die sich an die Exonsequenzen anschließen, geben die Position des *ZMYND10*-3'UTR bzw. des *RASSF1A*-5'UTR an.

Die DNA-Methylierung der *S-shore* Region wurde an 6 CpGs in einem Bereich 400 bp *upstream* vom *RASSF1A* Transkriptionsstart analysiert. Für die Charakterisierung der DNA-Methylierung innerhalb der *RASSF1A* CpG-Insel wurden 9 CpGs in der Region 100 bp *downstream* vom *RASSF1A* Transkriptionsstart (TSS) und 8 CpGs in einer weiteren Region 400 bp *downstream* vom *RASSF1A* TSS untersucht.



**Abbildung 14: Methylierungsanalyse der *RASSF1A* Promotorregion in verschiedenen Lungenkrebszelllinien.** **A**, schematische Darstellung der drei verschiedenen Regionen des *RASSF1A* Promotorbereichs (-400 bp, TSS, +400 bp) deren DNA-Methylierung in verschiedenen Zelllinien (A427, A549, H322, H358, HEK-293, HeLa, PAF und PASMIC), mittels Pyrosequenzierung analysiert wurde. Für Details siehe Abbildung 13. **B**, Pyrosequenzierungsanalyse von 3 Regionen des *RASSF1A* Promotorbereichs (-400, TSS, +400) von Zelllinien mit hypermethylierter *RASSF1A* CpG-Insel. **C**, Pyrosequenzierungsanalyse von 3 Regionen des *RASSF1A* Promotorbereichs (-400, TSS, +400) von Zelllinien mit unmethylierter *RASSF1A* CpG-Insel. **D**, *RASSF1A* Expressionsanalyse von verschiedenen Zelllinien mittels qRT-PCR (k.E. = keine Expression). Die relativen Expressionslevel wurden darüber hinaus zu *Aktin* normalisiert.

Die DNA-Methylierung in den zuvor beschriebenen Regionen des *RASSF1A*-Promotors wurde in verschiedenen Lungenkrebszelllinien (A427, A549, H322, H358), aber auch in HeLa-Zervixkarzinomzellen und in HEK-293 Zellen analysiert. Anschließend wurden die Methylierungsdaten

der verschiedenen Krebszelllinien in Relation zur Methylierung von arteriellen Lungenfibroblasten (*pulmonary arterial fibroblasts* - PAF) und glatten, arteriellen Lungenmuskelzellen (*pulmonary artery smooth muscle cells* – PASM) betrachtet (Abbildung 14 B, C).

Die Analyse ergab 2 Gruppen von Zelllinien mit charakteristischen *RASSF1A* CpG-Insel Methylierungsprofilen: Bei der ersten Gruppe war die gesamte *RASSF1A* CpG-Insel ähnlich stark methyliert wie der *S-shore* Bereich (Abbildung 14 B). Diese Zelllinien zeigen keine oder nur sehr geringe Genexpression von *RASSF1A* (Abbildung 14 D). Im Gegensatz dazu gab es eine Gruppe von Zelllinien mit unmethylierter *RASSF1A* CpG-Insel, jedoch mit signifikant erhöhter ( $p < 0,001$ ) DNA-Methylierung im *S-shore* Bereich, im Vergleich zur CpG-Insel (Abbildung 14 C). Eine unmethylierte CpG-Insel korreliert mit einer Expression von *RASSF1A*. Es zeigen sich jedoch abhängig von der *S-shore* Methylierung deutliche Variationen der Expressionsstärke der verschiedenen analysierten Zelllinien (Abbildung 14 D).

Bei den untersuchten Zelllinien war durchweg eine erhöhte DNA-Methylierung im *S-shore* Bereich (-400 bp Region) der *RASSF1A* CpG-Insel festzustellen, im Gegensatz zur Region +400 bp vor dem *RASSF1A* TSS (Abbildung 14 B, C). In den Zelllinien mit unmethylierter *RASSF1A*-Promotor CpG-Insel (PAF, PASM, HeLa) und niedriger *S-shore* Methylierung war eine hohe *RASSF1A* Expression messbar (Abbildung 14 D). Im Vergleich dazu war die *RASSF1A* Expression in H358-Zellen deutlich niedriger (Abbildung 14 D). H358-Zellen besitzen ebenfalls eine unmethylierte *RASSF1A*-Promotor CpG-Insel, weisen jedoch im *S-shore* Bereich einen höheren Methylierungsgrad (Median: 72%) als PAF- (Median: 41%), PASM- (Median: 13%) bzw. HeLa-Zellen (Median: 11%) auf (Abbildung 14 C).

Diese Region wurde auch in 12 primären Lungentumoren und entsprechenden tumorfreien Kontrollgeweben untersucht. Interessanterweise zeigt sich bei diesen Proben kein generell erhöhtes DNA-Methylierungslevel in der *S-shore* Region, wie bei den Krebszelllinien (Abbildung 15 B). Es lässt sich jedoch bei einigen Patienten eine tumorspezifische Zunahme der DNA-Methylierung in dieser Region feststellen (Abbildung 15 B). In normalem Lungengewebe liegt das durchschnittliche *S-shore* Methylierungslevel bei  $10 \pm 2$  % ( $n=12$ ), im Vergleich zu  $35 \pm 16$  % bei einigen Tumorgeweben (*S-shore* Methylierungslevel von  $>18\%$ ,  $n=7$  (Patient 2, 5, 6, 7, 8, 11, 12)) (Abbildung 15 B). Das DNA-Methylierungslevel der Lungentumorproben mit erhöhter *S-shore* Methylierung (*S-shore* Methylierungslevel  $>18\%$ ,  $n=7$ ) ist damit höher als jenes der Zelllinien, die eine Expression von *RASSF1A* zeigen (H358, HeLa, PAF, PASM – mit durchschnittlicher *S-shore* Methylierung von  $16 \pm 10$  %). Die restlichen primären Lungentumorgewebe (*S-shore* Methylierungslevel  $<18\%$ ,  $n=5$ ) des Probenpanels (Patient 1, 3, 4, 9, 10) weisen mit  $9 \pm 2\%$  ähnliche DNA-Methylierungslevel im *S-shore* Bereich auf, wie die entsprechenden tumorfreien Kontrollgewebe ( $10 \pm 2$  % ( $n=12$ )) auf (Abbildung 15 B).

Exemplarisch wurde in zwei Proben (Patient 5 und Patient 11 mit Lungentumor und zugehörigem Lungennormalgewebe) die Auswirkung der Methylierung auf die Expression analysiert (Abbildung 17 A). Patient 5 weist eine tumorspezifisch erhöhte DNA-Methylierung in den *S-shore* Region der *RASSF1A* CpG-Insel auf (Abbildung 15 B) (*S-shore*:  $\emptyset$ -Methylierung im Normalgewebe: ca. 11%,  $\emptyset$ -Methylierung im Tumorgewebe: ca. 22%). Der TSS-Bereich der *RASSF1A*-CpG-Insel liegt bei Patient 5 unmethyliert vor (Abbildung 15 C). Im Gegensatz dazu steigt jedoch die Methylierung der +400 bp Region tumorspezifisch an (Abbildung 15 D) (+400 bp Region:  $\emptyset$ -Methylierung im Normalgewebe: ca. 12%,  $\emptyset$ -Methylierung im Tumorgewebe: ca. 31%). Die *RASSF1A*-Expression von Patient 5 ist tumorspezifisch signifikant reduziert ( $p < 0,01$ ) (Abbildung 17 A).



### 3.5.3 Expressionsanalyse verschiedener DNMTs und direkter Interaktionspartner in Lungenkrebszelllinien

Die Etablierung und Aufrechterhaltung genomweiter DNA-Methylierungsmuster in Säugern beruht auf der Aktivität von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) und damit assoziierten Interaktionspartnern (DNMT3L, HDAC1, HDAC2, UHRF1, SUV39H1, etc. - Abbildung 16 A) (Choi et al, 2011; Ostler et al, 2007; Wang et al, 2007b; Wang et al, 2006a; Wang et al, 2006b). Das Spektrum an DNMT-bezogenen Veränderungen die während der Karzinogenese auftreten und welche bereits in früheren Studien mit der Ausprägung krebsspezifischer DNA Hypermethylierungen in Verbindung gebracht werden konnten, sind vielfältig: Sie reichen von veränderten DNMT-Expressionsstärken (Mizuno et al, 2001), mutationsbedingten Veränderungen der DNMT-Enzymaktivitäten (Kanai et al, 2003), veränderten Substratspezifitäten (Klein et al, 2013), veränderten Aktivitäten von Interaktionsfaktoren (Bashtrykov et al, 2012; Gokul et al, 2009; Robertson, 2001), Veränderungen der DNMT-Enzymstabilität (durch posttranslationale Modifikationen (PTMs) oder miRNAs) (Denis et al, 2011) bis zu fehlerhafter DNMT-Zielführung (durch Cofaktoren, Mutationen, siRNAs, piRNAs) (Denis et al, 2011). Veränderte Expressionslevel der humanen DNA-Methyltransferasen sind bekannte Phänomene die in den verschiedensten Tumorentitäten auftreten und wichtige Faktoren bei der Ausprägung aberranter DNA-Methylierungsmuster darstellen (Tang et al, 2009). Es wurden deshalb die Expression von *DNMT1*, *DNMT3A* und *DNMT3B* und einiger dokumentierter Interaktionspartner in 49 primären Lungenplattenepithelkarzinomen (PEK), 41 primären Lungenadenokarzinomen (AD) und 15 nicht-malignen Lungenerkrankungen (NML) analysiert und deren Expressionslevel mit der Expression in 6 normalen Lungengewebeproben (N) verglichen (Abbildung 16 B-D). Für die Analyse wurde auf Microarray Daten zurückgegriffen, welche von Dammann et al., 2005 veröffentlicht wurden (Dammann et al, 2005b). Signifikante Expressionsunterschiede der verschiedenen analysierten Faktoren in Tumor- und Normalgeweben sind in Tabelle 17 dargestellt.

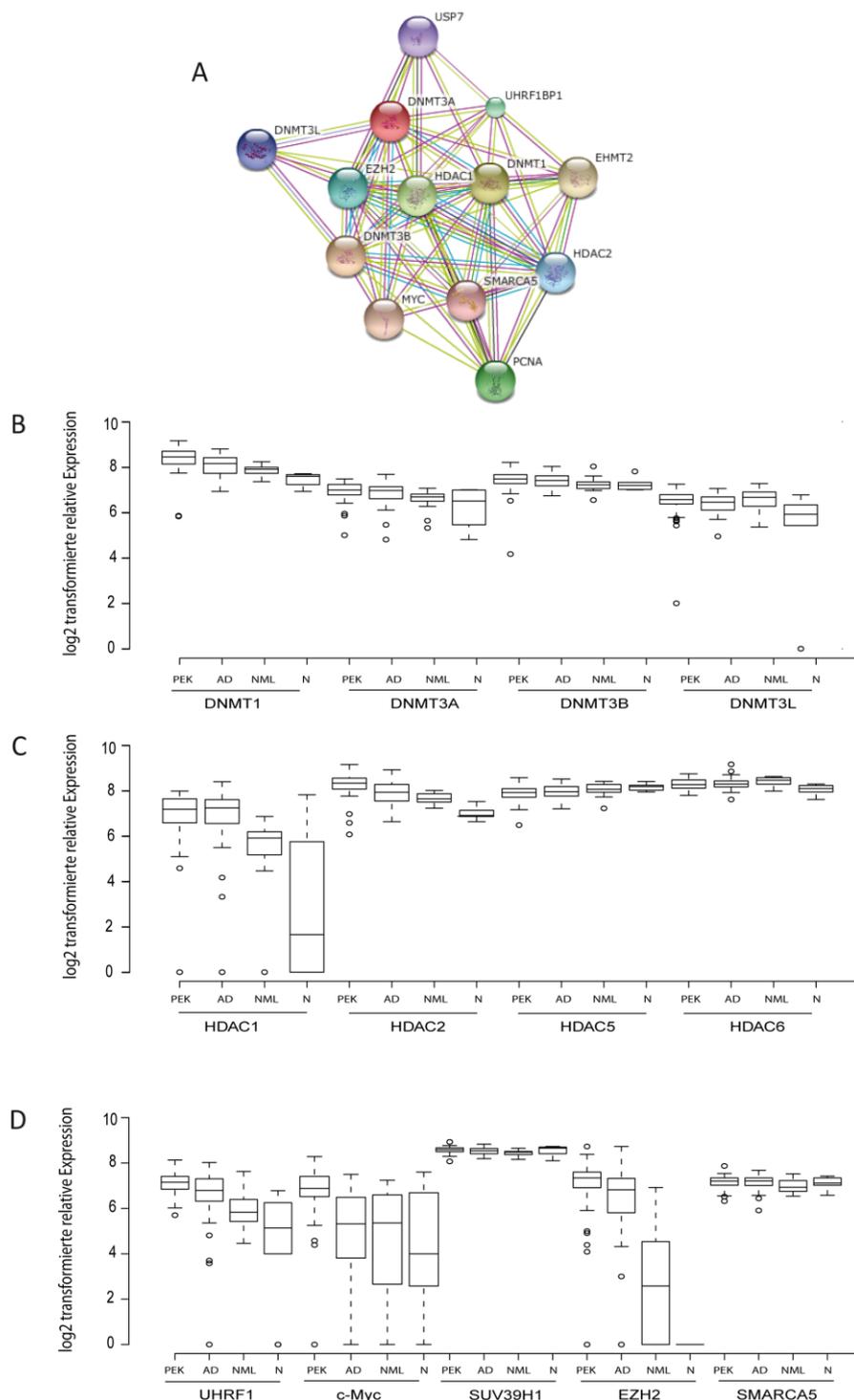
Die Expressionsprofile von *DNMT1*, *DNMT3A* zeigen, dass diese Enzyme sowohl in Lungenadenokarzinomen als auch in Lungenplattenepithelkarzinomen im Vergleich zu normalem Lungengewebe signifikant stärker exprimiert werden (*DNMT1*,  $p < 0,01$ ; *DNMT3A*,  $p < 0,01$ ) (Tabelle 17). Die Zunahme der Expressionsstärke korreliert mit der Schwere der Erkrankung (Karzinom vs. nicht-maligne Tumore vs. normales Lungengewebe) (Tabelle 17, Abbildung 16 B). Für *DNMT3B* konnte keine signifikante, krebsspezifische Zunahme der Expression festgestellt werden (Abbildung 16 B).

Darüber hinaus zeigt sich auch bei einigen direkten DNMT- Interaktionspartnern ein krebsspezifischer Anstieg der Genexpression: Bei *HDAC1* und *HDAC2* kommt es im Laufe der Karzinogenese zu einem signifikanten Anstieg der Expression (*HDAC1*,  $p < 0,05$ ; *HDAC2*,  $p < 0,0001$ ). Vergleichbare Expressionscharakteristika lassen sich auch bei *UHRF1* ( $p < 0,01$ ), *DNMT3L* ( $p < 0,01$ ) und *EZH2* ( $p < 0,0001$ ) feststellen (Abbildung 16 C, D, Tabelle 17). Eine Analyse der *RASSF1A*-Expression auf Grundlage der Microarray-Daten von Dammann et al., 2005 war nicht möglich, da der verwendete Microarray keine spezifische Sonde für die *RASSF1A*-Isoform umfasste.

Von verschiedenen primären Lungengeweben, von denen der DNA-Methylierungsstatus des *RASSF1A* Promotors bestimmt wurde, wurden ebenfalls die Expressionsprofile der DNA-Methyltransferasen analysiert. Die qualitative Integrität der aus dem Lungengewebe gewonnenen RNA wurde mittels eines Bioanalyzers 2100 bestimmt. Mittels qRT-PCR wurden anschließend die Expressionsprofile verschiedener DNMTs und von *RASSF1A* ermittelt (Abbildung 17 B-D). Die relativen Expressionen von DNMTs in primären Lungenproben wurden normalisiert zur Expression von *RPS9* dargestellt. Das *RPS9* Gen wurde aufgrund seiner stabilen Expression in normalem Lungengewebe und Lungenkarzinomen als ideales Referenzgen für die qRT-PCR Analyse beschrieben (Zhan et al, 2014).

Wie bereits im Kapitel "3.5.2 Detaillierte Analyse der DNA-Methylierung der *RASSF1A* CpG-Insel und der umgebenden *shore* Bereiche" beschrieben konnte bereits bei einer leichten tumorspezifischen Zunahme der DNA-Methylierung im *S-shore* Bereich und der *RASSF1A* CpG-Insel (*S-shore* von Patient 5 und 11: Zunahme der DNA-Methylierung von ca. 10% auf 20% von Normalgewebe zu Tumorgewebe, vergl. Abbildung 14, Abbildung 15 B) eine Reduktion der *RASSF1A* Expression festgestellt werden. Bei den Tumorproben mit reduzierter *RASSF1A* Expression ließ sich ein signifikanter Anstieg ( $p < 0,05$ ) der *DNMT1*, *DNMT3A* und *DNMT3B* Expression feststellen (Abbildung 17 B-D). Gewebeprouben, die keine Zunahme der DNMT Expression zeigen, zeigen ebenfalls keine Reduktion der *RASSF1A* Expression bzw. eine Hypermethylierung der *RASSF1A* CpG-Insel (vergl. Patient 4 in Abbildung 15 und Abbildung 38).

Die entsprechenden Faktoren wurden ebenfalls mittels qRT-PCR in verschiedenen Lungenkrebszelllinien (A427, A549, H322, H358) untersucht und in Relation zu arteriellen Lungenfibroblasten (*pulmonary arterial fibroblasts*, PAF) und glatten, arteriellen Lungenmuskelzellen (*pulmonary artery smooth muscle cells*, PASMC) betrachtet. Zur Darstellung der Ergebnisse wurden die Daten für die Lungenkrebszelllinien bzw. die normalen Zelllinien jeweils gemittelt gegenüber gestellt (Abbildung 17 A). Es konnte dabei ebenfalls ein krebsspezifischer signifikanter Expressionsanstieg verschiedener Faktoren festgestellt werden: Darunter fallen alle DNMTs (*DNMT1*,  $p < 0,01$ ; *DNMT3A*,  $p < 0,01$ ; *DNMT3B*,  $p < 0,05$ ), aber auch *UHRF1* ( $p < 0,05$ ) (Abbildung 17 A).



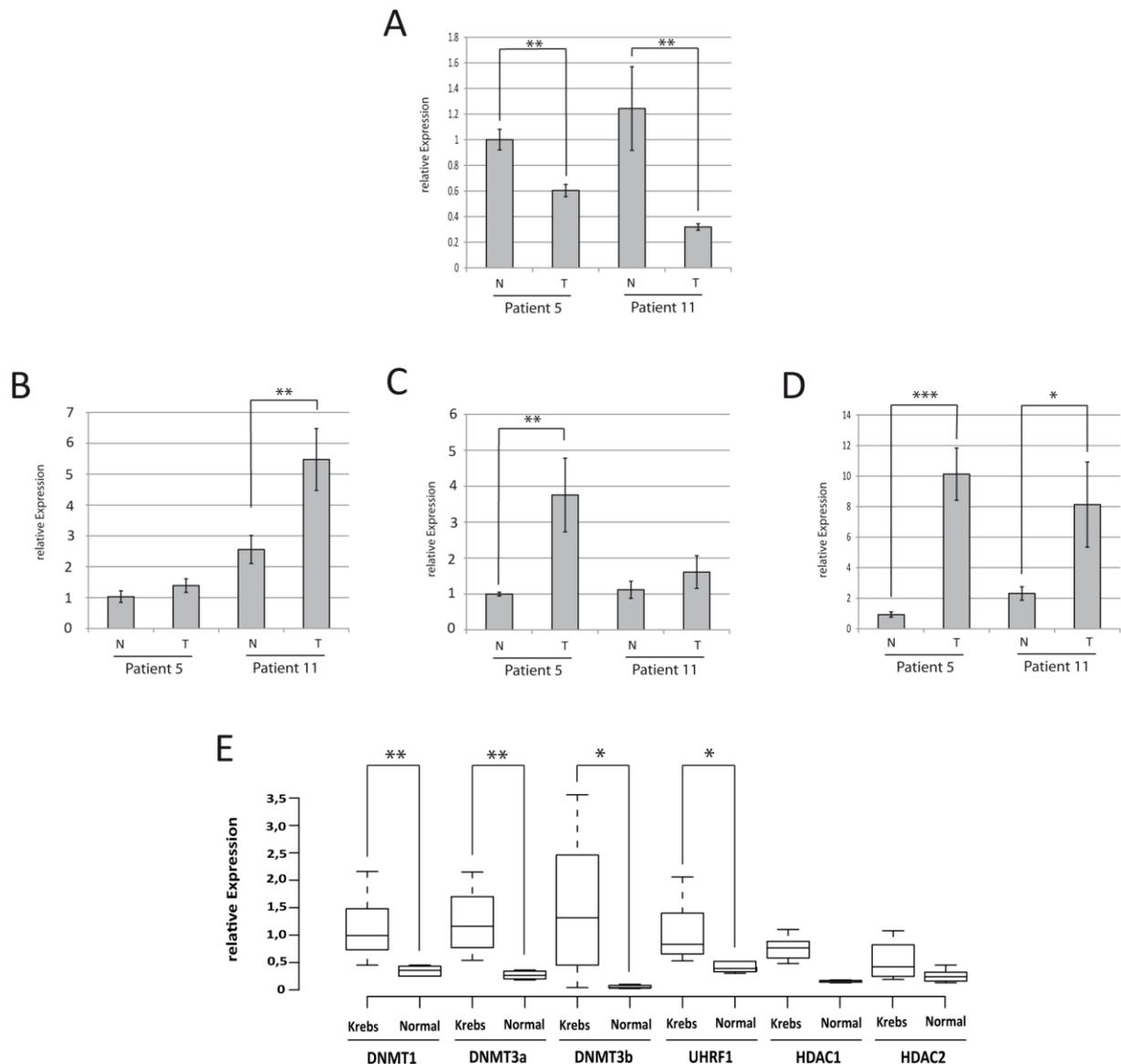
**Abbildung 16: Expressionsprofile von DNMTs und direkten Interaktionspartnern.** **A**, schematische Übersicht der direkten Interaktionspartner der DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT3A, DNMT3B. Das Schema wurde mithilfe der String Database erstellt. Die Verbindungen zwischen den Faktoren beruhen auf physischen Interaktionen, nachgewiesen durch Co-IP Experimente (<http://string-db.org/>). Die Expressionsanalysen wurden auf Grundlage von Microarraydaten von 49 primären Lungenplattenepithelkarzinomen (PEK), 41 primären Lungenadenokarzinomen (AD), 15 nicht-malignen Lungenerkrankungen (NML) und 6 normalen Lungengeweben (N) durchgeführt ((Dammann et al, 2005b). Die Daten wurden als log<sub>2</sub> transformierte relative Expression dargestellt. PEK, AD und NML wurde in Relation zu normalen Lungengeweben auf signifikante Unterschiede in der Expression untersucht. Für signifikante Expressionsunterschiede zwischen PEK, AD bzw. NML und Normalgeweben (N) wurden die entsprechenden Signifikanzniveaus in Tabelle 17 angegeben. **B**, Expressionsanalyse von *DNMT1*, *DNMT3A* und *DNMT3B* und *DNMT3L* in nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen und Normalgeweben. **C**, Expressionsanalyse der *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC5* und *HDAC6* in nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen und Normalgeweben. **D**, Expressionsanalyse der *UHRF1*, *c-Myc*, *SUV39H1*, *EZH2* und *SMARCA5* in nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen und Normalgeweben.

**Tabelle 17: Analyse von expressionellen Unterschieden verschiedener Faktoren zwischen verschiedenen Lungenkrebstypen bzw. normalen Lungengeweben mittels Student's t-Test (2-tailed).** PEK = Plattenepithelkarzinom, AD = Adenokarzinom, NML = nicht maligne Lungenerkrankungen, N = normales Lungengewebe. Die Signifikanzniveaus sind farbig hinterlegt (p < 0,05 (blau), p < 0,01 (grün), p < 0,001 (orange)). (blau), p < 0,01 (grün), p < 0,001 (orange)).

DNMT1				DNMT3A				DNMT3B				DNMT3L			
PEK	AD	NML	N												
p = 0.18238				p = 0.93675				p = 0.81349				p = 0.84813			
p = 0.00563				p = 0.00371				p = 0.22749				p = 0.64401			
p = 0.00152				p = 0.0014				p = 0.48975				p = 0.00517			
p = 0.00691				p = 0.00211				p = 0.08849				p = 0.3849			
p = 0.00021				p = 0.00081				p = 0.30215				p = 0.0022			
p = 0.00636				p = 0.00636				p = 0.87989				p = 0.043			

HDAC1				HDAC2				HDAC5				HDAC6			
PEK	AD	NML	N	PEK	AD	NML	N	PEK	AD	NML	N	PEK	AD	NML	N
p = 0.07079				p = 0.03418				p = 0.39528				p = 0.07182			
p = 0.09571				p = 0.00021				p = 0.0605				p = 0.0574			
p = 0.01108				p = 2.618452 x 10 <sup>-5</sup>				p = 0.03991				p = 0.02624			
p = 0.61864				p = 0.00278				p = 0.175				p = 0.60773			
p = 0.04898				p = 1.029069 x 10 <sup>-5</sup>				p = 0.07352				p = 0.00396			
p = 0.191				p = 3.97021 x 10 <sup>-5</sup>				p = 0.42921				p = 0.00163			

UHRF1				SUV39H1				c-Myc				EZH2				SMARCA5			
PEK	AD	NML	N	PEK	AD	NML	N	PEK	AD	NML	N	PEK	AD	NML	N	PEK	AD	NML	N
p = 0.0057				p = 0.16313				p = 1.21 x 10 <sup>-5</sup>				p = 0.00263				p = 0.88584			
p = 1.2299 x 10 <sup>-9</sup>				p = 0.00431				p = 0.00041				p = 8.9419870 x 10 <sup>-12</sup>				p = 0.04975			
p = 3.105459 x 10 <sup>-8</sup>				p = 0.62402				p = 0.0019				p = 7.2465583 x 10 <sup>-17</sup>				p = 0.59289			
p = 0.14063				p = 0.07438				p = 0.91441				p = 0.00014				p = 0.12316			
p = 0.0074				p = 0.88034				p = 0.70355				p = 6.3468025 x 10 <sup>-7</sup>				p = 0.71138			
p = 0.0666				p = 0.26094				p = 0.79915				p = 0.01937				p = 0.50595			

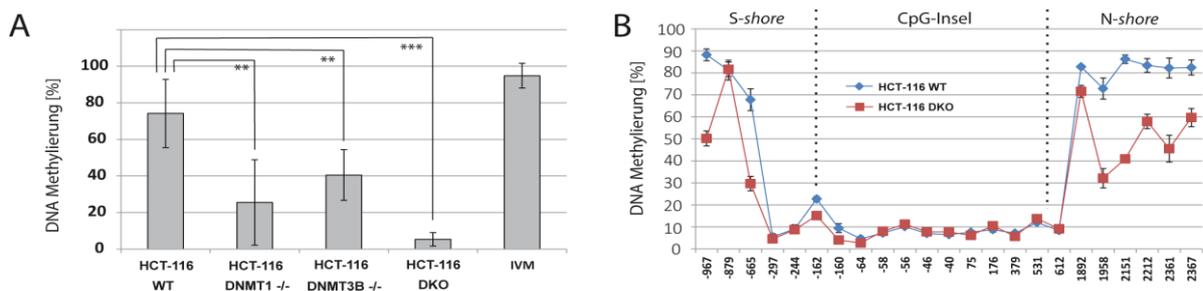


**Abbildung 17: Expressionsprofile von *RASSF1A* und verschiedener DNMTs und einiger Interaktionspartner in Lungenkrebszelllinien und primären Lungentumoren.** A-D: Expressionsanalyse von primären Lungentumoren (T) und zugehörigen Normalgeweben (N) von 2 unterschiedlichen Lungenkrebs-Patienten mittel qRT-PCR: Es wurde die Expression von *RASSF1A* (A), *DNMT1* (B), *DNMT3A* (C) und *DNMT3B* (D) analysiert. Die relativen Expressionen der primären Lungengewebe sind normalisiert zur *RSP9* Expression dargestellt. E, Expressionsanalyse von *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *UHRF1*, *HDAC1* und *HDAC2* in verschiedenen Lungenkrebszelllinien (Krebs- A427, A549, H322, H358) und in normalen Lungenzelllinien (Normal - PAF, PASMC) mittels qRT-PCR. Die relativen Expressionen der Krebszelllinien und normalen Zelllinien wurden normalisiert zur *Actin* Expression dargestellt.

Die signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Krebszelllinien und normalen Zelllinien wurden durch die entsprechenden Signifikanzniveaus dargestellt: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

### 3.5.4 DNA-Methylierungsanalyse des *RASSF1A*-Promotors in HCT-116 DNMT-KO Mutanten

Zur Untersuchung welchen Einfluss einzelne DNA-Methyltransferasen auf die Hypermethylierung des *RASSF1A*-Promotors haben wurde die DNA-Methylierung dieser Region in HCT-116 Wildtyp Kolorektalkarzinomzellen, aber auch in verschiedenen HCT-116 DNMT-*knockout* Zelllinien (DNMT1<sup>-/-</sup>, DNMT3B<sup>-/-</sup> und Kombination aus DNMT1<sup>-/-</sup> und DNMT3B<sup>-/-</sup> (DKO)) mittels Pyrosequenzierung untersucht. Die Zelllinien wurden von Bert Vogelstein, John Hopkins University zur Verfügung gestellt (Rhee et al, 2002; Rhee et al, 2000). Die *RASSF1A* Promotor CpG-Insel lag in HCT-116 Wildtyp Zellen unmethyliert vor ( $3 \pm 1\%$  DNA-Methylierung), im *S-shore* Bereich zeigte sich jedoch mit  $78 \pm 19\%$  eine starke DNA-Methylierung wie sie ebenfalls bei verschiedenen anderen Krebszelllinien dokumentiert wurde (*S-shore* Methylierung in A427-Zellen: ca. 90 %, *S-shore* Methylierung in H322-Zellen: ca 91%, H358-Zellen: ca. 72%) (Abbildung 14 B, C, Abbildung 18 A). Im Vergleich dazu lag die mittlere DNA-Methylierung der *RASSF1A S-shore* Region in unmethylierten, primären Lungengewebe bei ca. 10% (vergl. Abbildung 15 B). Der homozygote Verlust von DNMT3B in HCT-116 Zellen war im Bezug auf die DNA-Methylierung in der *S-shore* Region der *RASSF1A*-Promotor CpG-Insel mit einer signifikanten ( $p < 0,01$ ) Reduktion des DNA-Methylierungslevels um knapp 50% (von  $78 \pm 19\%$  auf  $41 \pm 14\%$ ) verbunden (Abbildung 18 A). Erstaunlicherweise zog auch die homozygote Deletion beider DNMT1 Allele ebenfalls eine starke Verringerung der DNA-Methylierung in dieser Region nach sich (von  $78 \pm 19\%$  auf  $26 \pm 23\%$ ). Innerhalb des analysierten *S-shore* Abschnitts schwankten die DNA-Methylierungsniveaus der einzelnen analysierten CpGs in HCT DNMT<sup>-/-</sup> Zellen jedoch sehr stark (Abbildung 18 A). Bei einer gemeinsamen Deletion von DNMT3B<sup>-/-</sup> und DNMT1<sup>-/-</sup> sind HCT-116 Zellen (DKO) noch vital, aber die globalen Methylierungslevel sind drastisch reduziert (Jacinto et al, 2007). Die DNA-Methylierung im *S-shore* Bereich ca. 400 bp vor dem *RASSF1A* Transkriptionsstart sinkt dabei auf ein Niveau von  $5 \pm 4\%$  (Abbildung 18 A). Unter Verwendung von *Illumina* 450k Methylierungsdatensätzen von HCT-116 Zellen aus der NCBI-GEO Datenbank, welche im Rahmen der Publikation „Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology“ von (Dedeurwaerder et al, 2011) veröffentlicht wurden, wurden DNA-Methylierungsprofile des *RASSF1A* Promotor-Bereichs in HCT-116 Wildtyp Zellen (n=3) mit HCT-116 DNMT-Doppel-KO (DKO) (n=3) Zellen verglichen.



**Abbildung 18: DNA-Methylierungsanalyse der *RASSF1A* CpG-Insel in verschiedenen DNMT-*knockout* HCT-116 Zelllinien.** **A**, Pyrosequenzierung der -400 bp Region (*S-shore*, vergl. mit Abbildung 13) des *RASSF1A* Promotorbereichs von HCT-116 WT-, HCT-116 DNMT1<sup>-/-</sup>; HCT-116 DNMT3B<sup>-/-</sup> und HCT-116 DKO- (DNMT1<sup>-/-</sup> und DNMT3B<sup>-/-</sup>) Zellen (Die Zelllinien wurden von Bert Vogelstein, John Hopkins University zur Verfügung gestellt.). Für die Pyrosequenzierung wurde eine *in vitro* methylierte und Bisulfit-konvertierte Probe von genomischer HCT-116 DNA (IVM) als Positivkontrolle mitgeführt. Signifikante Methylierungsunterschiede zwischen HCT-116 WT Zellen und den HCT-116 DNMT-Mutanten wurden durch die entsprechenden Signifikanzniveaus dargestellt: \* = 0,05; \*\* = 0,01; \*\*\* = 0,001. **B**, DNA-Methylierungsniveaus an den angegebenen Positionen relativ zum *RASSF1A* TSS im Bereich der *RASSF1A* CpG-Insel und damit assoziierter *shore*-Bereiche von HCT-116 WT Zellen und HCT-116 DKO-Zellen (DNMT1<sup>-/-</sup> und DNMT3B<sup>-/-</sup>) (GEO-Datenbank: GSE29290 (Dedeurwaerder et al, 2011)).

Die DNA-Methylierung in den *S-* bzw. *N-shore* Bereichen der *RASSF1A* Promotor CpG-Insel ist in HCT-116 DKO-Zellen, im Vergleich zu HCT-116 WT Zellen, reduziert: Durch Verlust von DNMT3B<sup>-/-</sup> und

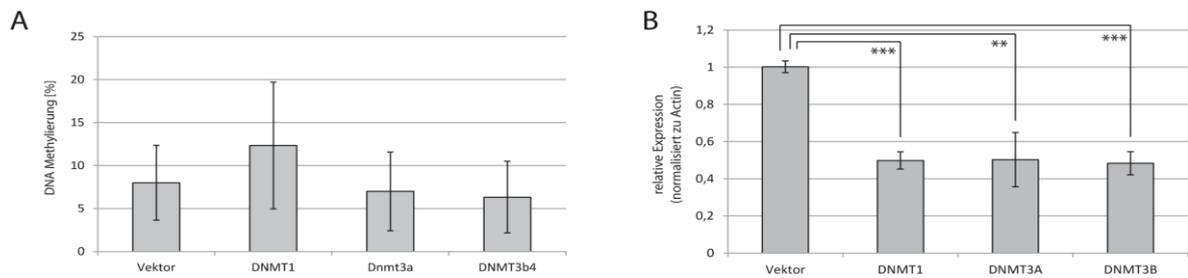
DNMT1<sup>-/-</sup> in HCT-116 Zellen kommt es zu einer Reduktion der DNA-Methylierung in der *S-shore* Region von 50 ± 40% auf 35 ± 32% und in der *N-shore* Region von 72 ± 28% auf 45 ± 21% (Abbildung 18 B). Trotz genomweit reduzierter DNA-Methylierungslevel in HCT-116 DKO-Zellen zeigten einige Sequenzbereiche jedoch keine Abnahme der DNA-Methylierung: In den Übergangsbereichen zwischen CpG-Insel und *shore* bzw. innerhalb der *shore* Regionen traten jeweils Abschnitte auf, in denen die ursprüngliche DNA-Methylierung der HCT-116 WT-Zellen auch in HCT-116 DKO Zellen überwiegend konserviert wurde (vergl. Position -879 bp *upstream* vom *RASSF1A*-TSS (*S-shore* und Position 1072 bp *downstream* vom *RASSF1A*-TSS (*N-shore*)) (Abbildung 18 B).

### 3.5.5 Bestimmung des Einflusses von DNMT-Überexpression auf die *RASSF1A* Expression bzw. den Promotor DNA-Methylierungsstatus

Durch Überexpression verschiedener DNA-Methyltransferasen in Doppel-KO (DNMT1<sup>-/-</sup>, DNMT3B<sup>-/-</sup>) HCT-116 Zellen (HCT-116 DKO Zellen) sollten Veränderungen des endogenen DNA-Methylierungslevel induziert werden. Dafür wurden stabile HCT-116 Zellpools generiert, welche entweder *DNMT1-EGFP* oder *Dnmt3a-EGFP* Fusionsproteine exprimieren. Das *DNMT3A* Gen des Menschen liegt zum Maus-Homolog (*Dnmt3a*) hochkonserviert vor und die Proteinsequenz ist zwischen den beiden Organismen zu 98% identisch (Xie et al, 1999). Darüber hinaus wurde eine HCT-116 Zelllinie erstellt, die die DNMT3B-Isoform DNMT3B4 exprimiert. Bereits in früheren Studien konnte eine Beteiligung der DNMT3B4 Isoform an der *RASSF1A*-Promotor Methylierung gezeigt werden (Wang et al, 2007b). Als Transfektionskontrolle wurde zusätzlich eine HCT-116 Zelllinie generiert, welche stabil mit einem pcDNA4-TO Leervektor transfiziert wurde (im Folgenden als „Vektor“ bezeichnet). Die erfolgreiche Überexpression der verschiedenen DNMTs (DNMT1, *Dnmt3a*, DNMT3B4) in HCT-116 Zell-Pools konnte mittels qRT-PCR bestätigt werden (Abbildung 39). Anschließend wurden Veränderungen des DNA-Methylierungsniveaus in der *S-shore* Region des *RASSF1A* Promotors, 400 bp *upstream* vom *RASSF1A* Transkriptionsstart (Abbildung 19 A), und der Einfluss der Überexpression auf die *RASSF1A* Expression in den beschriebenen Zelllinien analysiert (Abbildung 19 B).

Die DNA-Methylierung im *RASSF1A S-shore* Bereich der verschiedenen HCT-116 DNMT-Überexpressionszelllinien wurde mit dem Kontrollansatz (Vektor) verglichen. Die Überexpression von *DNMT1-EGFP* führte zu einem nicht signifikanten Anstieg der DNA-Methylierung im *S-shore* Bereich der *RASSF1A* CpG-Insel gegenüber der Leervektor-Transfektion (Abbildung 19 A). Die analysierte *S-shore* Region ist jedoch generell durch ein niedriges mittleres Methylierungsniveau und starken Streuung der Methylierungsdaten gekennzeichnet (Abbildung 18 A). Durch Überexpression von *Dnmt3a-EGFP* und *DNMT3B4* zeigte sich kein Anstieg der DNA-Methylierung im *S-shore* Bereich über das Niveau der Leervektor Transfektion hinaus (Abbildung 19 A).

Trotz der geringen Änderungen auf DNA-Methylierungsebene ließen sich zwischen den verschiedenen Zelllinien deutliche Unterschiede in der *RASSF1A* Expression feststellen: Die erhöhte Expression von *DNMT1*, *Dnmt3a* bzw. *DNMT3B4* war jeweils mit einer Reduktion der *RASSF1A* Expression gegenüber der Kontrollzelllinie verbunden (Abbildung 19 B).



**Abbildung 19: Überexpression verschiedener DNMTs in HCT DKO Zellen.** **A**, Pyrosequenzierung der -400 bp (*S-shore*) Region des *RASSF1A* Promotorbereichs in HCT DKO (DNMT1<sup>-/-</sup> und DNMT3B<sup>-/-</sup>) Zellen, welche stabil mit verschiedenen DNMT-Überexpressionskonstrukten transfiziert wurden (Vektor, DNMT1, Dnmt3a, DNMT3B4). Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichung (SD) von 3 CpGs im -400 bp Bereich dargestellt. **B**, Quantitative Expressionsanalyse von *RASSF1A* in den entsprechenden HCT DKO DNMT-Überexpressionszelllinien mittels qRT-PCR.

### 3.5.6 Klassifizierung von NSCLC-Zelllinien anhand des DNA-Methylierungsprofils der *RASSF1A* Promotorregion.

Auf Grundlage von DNA-Methylierungsdaten, welche mittels der *Illumina 450k BeadChip* Technologie gewonnen wurden, wurden die DNA-Methylierungsprofile der *RASSF1A*-Promotor CpG-Insel von 69 verschiedenen nicht kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinien, 6 normalen Lungenzelllinien und 5 normalen Lungengewebe auf Einzel-CpG-Niveau miteinander verglichen (für Details zu den Zelllinien und Gewebeproben siehe Abbildung 9). Anhand der DNA-Methylierungslevel der analysierten CpGs in der *RASSF1A* CpG-Insel konnten die untersuchten Zelllinien in verschiedene Gruppen, mit sehr ähnlichen Methylierungscharakteristiken, unterteilt werden (Tabelle 18, Abbildung 20).

**Tabelle 18: Übersicht über die Gruppen von NSCLC-Zelllinien (Einteilung anhand der DNA-Methylierung der *RASSF1A* Promotorregion).**

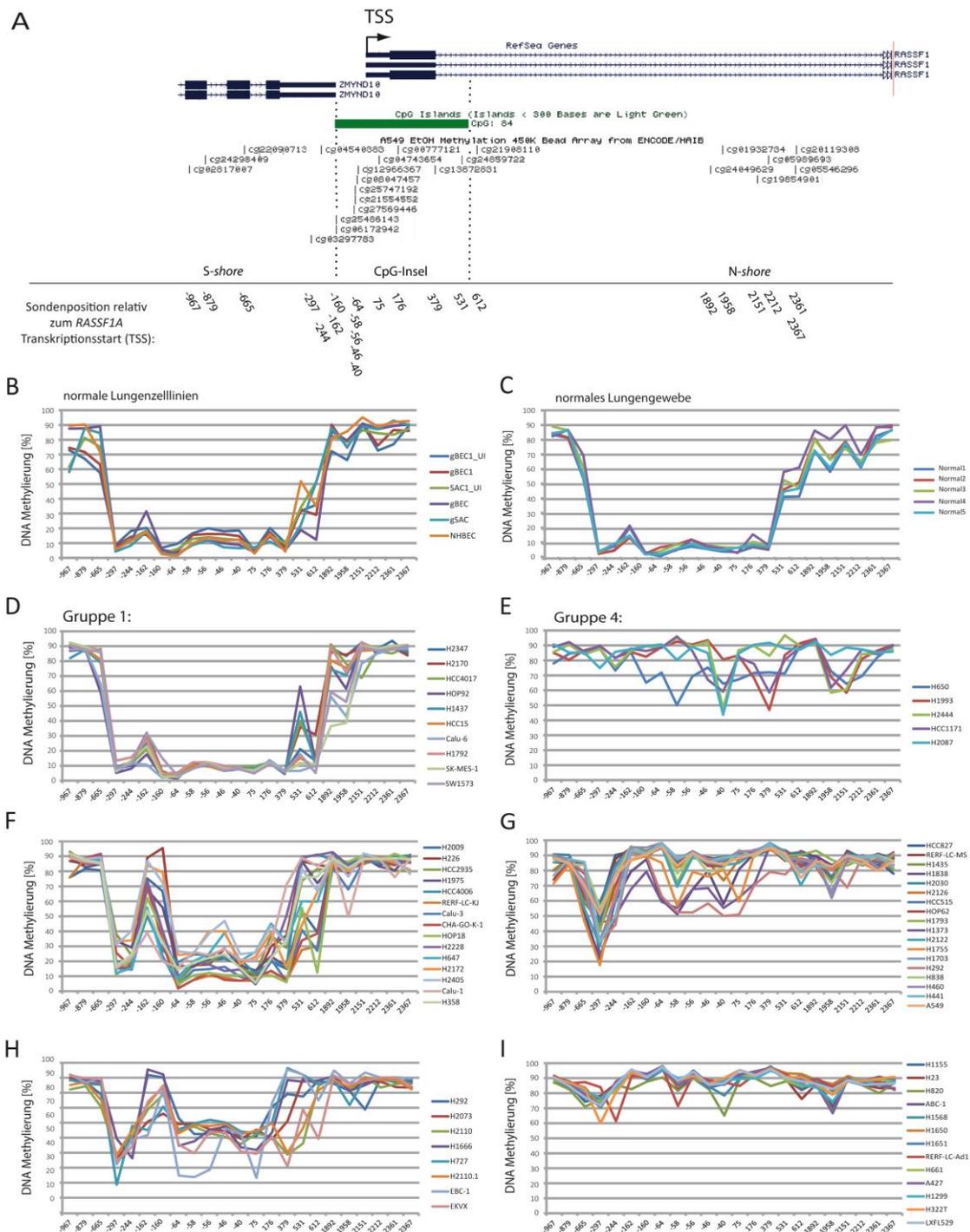
Gruppen	Probengröße der einzelnen Gruppen	Insel [%]	<i>Shore</i> [%]
		Mittelwert	Mittelwert
normale Lunge	5	12 ± 4	59 ± 4
normale Zelllinien	6	13 ± 3	65 ± 3
NSCLC-Gruppe 1 (<20% CpG-Insel Methylierung)	10	11 ± 2	65 ± 4
NSCLC-Gruppe 2 (20-50% CpG-Insel Methylierung)	15	30 ± 9	73 ± 3
NSCLC-Gruppe 3 (51-70% CpG-Insel Methylierung)	8	60 ± 5	78 ± 1
NSCLC-Gruppe 4 (71-80% CpG-Insel Methylierung)	5	80 ± 6	83 ± 2
NSCLC-Gruppe 5 (81-85% CpG-Insel Methylierung)	18	87 ± 8	79 ± 3
NSCLC-Gruppe 6 (<90% CpG-Insel Methylierung)	13	91 ± 2	84 ± 1

Bei den untersuchten normalen Lungengewebeproben (n=6) liegt das mittlere DNA-Methylierungslevel der *RASSF1A* CpG-Insel bei 12±4%. Die Unterscheidung von CpGs in *S*- und *N-shore* ergibt nur geringfügige Methylierungsunterschiede zwischen den einzelnen *shore* Typen. Ein Teil der Krebszelllinien (Gruppe 1, n=10) zeigt vergleichbare DNA-Methylierungswerte (11±2%) in der *RASSF1A* CpG-Insel und auch in den angrenzenden *shore* Bereichen (65±4%) (Abbildung 20 B, C, D). An den Positionen -162 bp bzw. 531 bp relativ zum *RASSF1A*-Transkriptionsstart lässt sich jedoch ein Anstieg der DNA-Methylierung erkennen (Abbildung 20 D). Bei einer weiteren Gruppe (Gruppe 2, n=15) ist der Anstieg der DNA-Methylierung an den Grenzen zwischen CpG-Insel zu den *shore* Bereichen stärker ausgeprägt: Die CpG-Insel assoziierten CpGs zeigen ein durchschnittliches DNA-

Methylierungsniveau von  $30\pm 9\%$ . In den *shore* Bereichen kommt es ebenfalls zu einem leichten Anstieg der DNA-Methylierung ( $73\pm 3\%$ ). Interessanterweise lässt sich zwischen den beiden *shore*-Typen ein deutlicher Unterschied in der Höhe der DNA-Methylierung feststellen (*S-shore*:  $61\pm 3\%$ , *N-shore*:  $82\pm 4\%$ ) (Abbildung 20 C). Die analysierten CpGs in den *shore* Bereichen um die *RASSF1A* CpG-Insel herum unterscheiden sich jedoch deutlich in Bezug auf den Abstand zwischen den analysierten CpGs, die dem N- bzw. dem *S-shore* Bereich zugeordnet werden und der eigentlichen CpG-Insel (*S-shore* = 5 CpGs im Abstand von bis zu 800 bp zur CpG-Insel; *N-shore* = 7 CpGs im Abstand von bis zu 1800 bp bis zur CpG-Insel).

In den weiteren Gruppen (Gruppen 3 bis 6) kann ein Anstieg der DNA-Methylierung über den gesamten CpG-Insel-Bereich, bis zur vollständigen Methylierung der CpG-Insel beobachtet werden. Dies deutet auf eine Hypermethylierung der *RASSF1A* CpG-Insel ausgehend von den *shore* Bereichen hin (Abbildung 20 D-G, Tabelle 18).

Die *shore* Bereiche sind nie niedriger methyliert als die eigentliche CpG-Insel (Abbildung 20 B-D). Die einzige Ausnahme bildet der 3'UTR Bereich von *ZMYND10* (Position -297 und -244 relativ zum *RASSF1A*-TSS), welcher im *S-shore* Bereich der *RASSF1A*-CpG Insel liegt und deutlich niedriger methyliert ist. Dieser Bereich zeigt jedoch bei einigen NSCLC-Zelllinien ebenfalls eine krebsspezifische Hypermethylierung (Abbildung 20 F): In Gruppe 6 ist der gesamte Bereich der *RASSF1A* CpG-Insel und die umgebenden *shore* Bereiche stark methyliert. Es lässt sich kein Unterschied im Methylierungsgrad von *shore* Bereichen und *RASSF1A* CpG-Insel mehr feststellen (Abbildung 20 G).



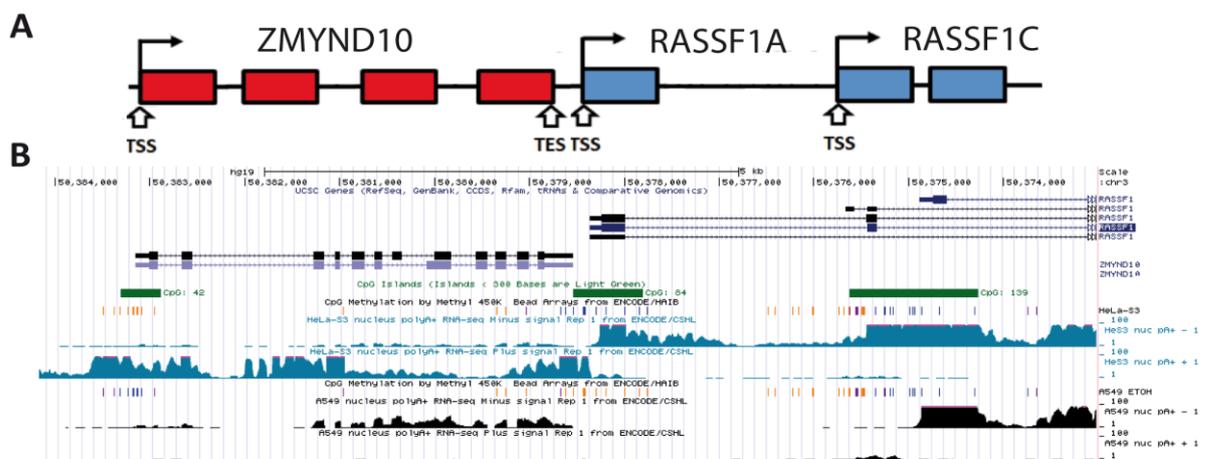
**Abbildung 20: Klassifizierung von NSCLC-Zelllinien anhand der DNA-Methylierung der *RASSF1A* Promotorregion. A, UCSC Genome Browser Ausschnitt (<https://genome.ucsc.edu/>) der *RASSF1A*-Promotorregion mit dem überlappenden 3'-Ende des *ZMYND10* Gens und einem 2,5 kb langen Bereich *downstream* des *RASSF1A* Transkriptionsstarts. Unterhalb der Gensequenz wird die Position der *RASSF1A* Promotor CpG-Insel (grüner Kasten) angezeigt. Darunter sind die 23 Sonden des *Illumina* 450k Arrays in der *RASSF1A*-Promotorregion (CpG-Insel und *shore*-Bereiche) und ihre Position relativ zum *RASSF1A* Transkriptionsstart (-967 bis 2367) dargestellt. **B, C**, DNA-Methylierung an den angegebenen Positionen relativ zum *RASSF1A* TSS im Bereich des *RASSF1A* Promotors und einem 2,5 kb langen *downstream* Bereich in 6 normalen Lungenzelllinien (**B**) und 5 normalen Lungengeweben (**C**). **D-G**, DNA-Methylierung an den angegebenen Positionen relativ zum *RASSF1A* TSS im Bereich des *RASSF1A* Promotors und einem 2,5 kb langen *downstream* Bereich in NSCLC-Zelllinien, die auf Gruppe 1 bis Gruppe 6 aufgeteilt wurden (siehe Tabelle 18). Die *Illumina* 450k Methylierungsdaten der NSCLC-Zelllinien und der normalen Lungenzelllinien wurden von Walter et al., 2012 (NCBI-GEO-Accession: GSE36216) generiert. Die Methylierungsdaten der normalen Lungengewebe wurden von Shi et al., 2014 zur Verfügung gestellt (NCBI-GEO-Accession: GSE52401).**

### 3.6 Analyse des epigenetischen Inaktivierungsmechanismus von *RASSF1A*

#### 3.6.1 Genomische Lokalisierung prädiponiert Gene für erhöhte Promotor DNA-Methylierung

Im Rahmen einer differenzierteren Analyse von Transkriptionsstart (TSS)-assoziierten CpG-Inseln wurde bestimmt, ob der genomische Kontext einen Einfluss auf die Anfälligkeit bestimmter CpG-Inseln hat, dass diese aberrant hypermethyliert werden. Der Fokus wurde dabei auf eine spezielle Konstellation von CpG-Insel Promotor Genen gelegt, bei der zwei Gene in gleicher Transkriptionsrichtung (Tandemorientierung) mit geringem Abstand zwischen der Transkriptionstermination des *upstream* gelegenen Gens und der Transkriptionsinitiation des *downstream* gelegenen Gens liegen.

Das Tumorsuppressorgen *Ras association domain family 1A* (*RASSF1A*) liegt ebenfalls in einem solchen genomischen Kontext vor (Abbildung 21) und ist eines der am Häufigsten epigenetisch inaktivierten Gene in humanen Krebserkrankungen. Das *RASSF1* Gen ist auf Chromosom 3 in Region 3p21.3 lokalisiert und der Transkriptionsstart der *RASSF1A* Isoform liegt nur 170 Basenpaare hinter der Transkriptionsterminationsstelle des *upstream* gelegenen *ZMYND10* Gens. Die Inaktivierung des *RASSF1A* Gens erfolgt durch Hypermethylierung von dessen Promotor CpG-Insel. *RASSF1A* ist an der Zellzyklusregulation, der Mikrotubuli Stabilität, Apoptose und Autophagie beteiligt (Gordon et al, 2012).

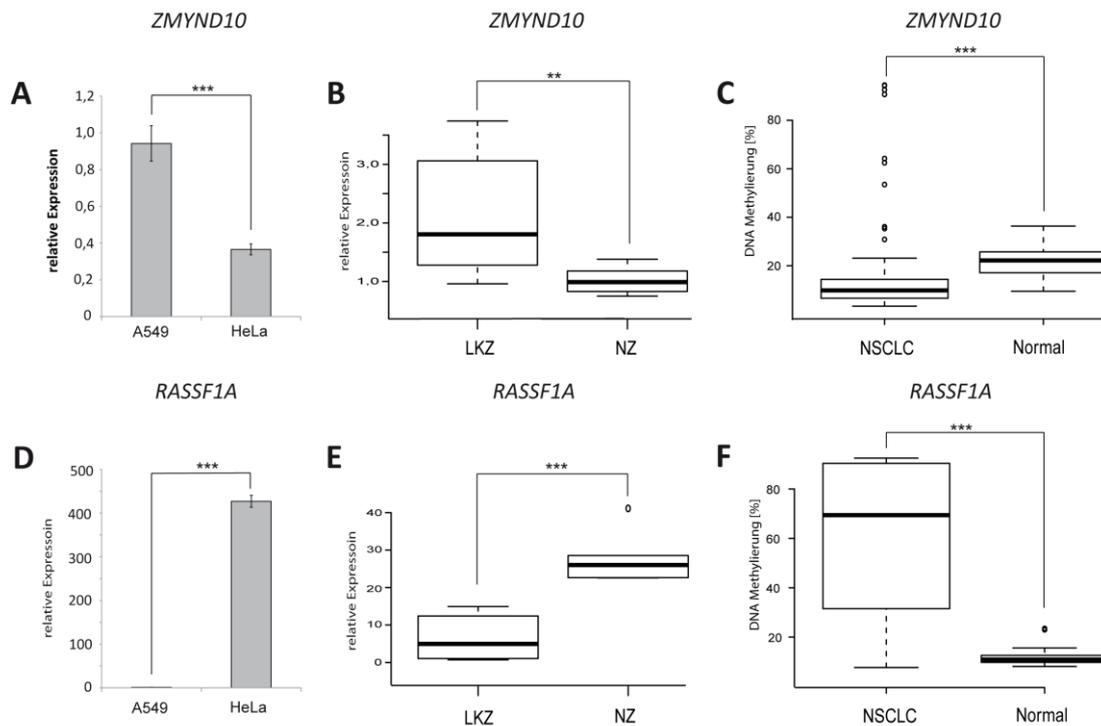


**Abbildung 21: Transkripte und DNA-Methylierung im *RASSF1A*-Lokus in HeLa und A549 Zellen.** **A**, schematische Darstellung der genomischen Anordnung der *ZMYND10*-, *RASSF1A*- und *RASSF1C*-Gene. Die Gen-Exone sind als rote und blaue Kästen angedeutet. Die Transkriptionsstartstellen sind jeweils als Pfeile (P) oberhalb des 1sten Exons markiert und mit „TSS“ bezeichnet. Die Transkriptionsterminationsstelle des *ZMYND10* Gens ist mit „TES“ markiert. **B**, UCSC Genome Browser Ausschnitt (<https://genome.ucsc.edu/>) der *RASSF1A*-Promotorregion mit dem *upstream* gelegenen *ZMYND10* Gen und dem *downstream* gelegenen *RASSF1C* Transkriptionsstart. Unterhalb der Gensequenz werden die Positionen der *ZMYND10*-, der *RASSF1A*- und der *RASSF1C*-Promotor-CpG-Insel (grüner Kasten) angezeigt. Darunter sind jeweils für HeLa- und A549-Zellen die Sonden des Illumina 450k Arrays in der *ZMYND10*/ *RASSF1A*/ *RASSF1C*-Region dargestellt (*CpG Methylation by Methyl 450k Bead Array*: orange = vollständig methyliert; blau = unmethyliert). Die Methylierungsdaten wurden im Rahmen des ENCODE Projekts vom HudsonAlpha Institute erstellt. Zusätzlich sind für HeLa- und A549-Zellen die nukleären, polyA-positiven Transkripte auf „Plus“- und „Minus“-Strang dargestellt (RNA-Seq Daten wurden im Rahmen des ENCODE Projekts von den Cold Spring Harbor Labs erstellt).

Auf Grundlage von *Illumina* 450k Methylierungsdaten und RNA Sequenzierungsprofilen der nukleären, polyA<sup>+</sup> mRNA-Fraktion von A549 Lungenkrebszellen und HeLa Zervix-Karzinomzellen wurde die Expression und die Promotor-Methylierung des *ZMYND10*-Gens und des *downstream* gelegenen *RASSF1A*-Gens analysiert. Zur grafischen Darstellung der Expressions- und Methylierungsdaten wurde die entsprechende Region im *UCSC Genome Browser* angegeben (Abbildung 21). Das RNA-Seq Profil von A549 Zellen lässt im Bereich des *ZMYND10* Gens ein positives Expressionssignal (A549 RNA-Seq, Minus-Strang) erkennen. Entsprechend dazu liegt die Promotor CpG-Insel des *ZMYND10* Gens in A549-Zellen unmethyliert vor (Abbildung 21 B). Die *downstream* vom *ZMYND10* Gen gelegene Promotor CpG-Insel des *RASSF1A* Gens ist in A549 Zellen wiederum hypermethyliert und die Expression von *RASSF1A* vollständig reprimiert (Abbildung 21 B). Im Gegensatz dazu wird in HeLa-Zellen statt eines *sense-ZMYND10* Transkripts ein starkes *ZMYND10 antisense*-Transkript exprimiert (HeLa RNA-Seq, Plus-Strang). Bei dieser Expressionskonstellation zeigt sich, dass die *ZMYND10* Promotor CpG-Insel in HeLa-Zellen methyliert vorliegt (Abbildung 21). Das *RASSF1A* Gen wiederum wird in HeLa-Zellen stark exprimiert und die *RASSF1A* Promotor CpG-Insel liegt unmethyliert vor.

Die *ZMYND10*- und *RASSF1A*-Expressionsdaten von A549- und HeLa-Zellen aus dem *UCSC Genome Browser* konnten erfolgreich mittels qRT-PCR verifiziert werden (Abbildung 22 A, D). Darüber hinaus wurde außerdem die Expression von *RASSF1A* und des *upstream* gelegenen Gens *ZMYND10* in einer Reihe verschiedener Lungenkrebszelllinien (A427, A549, H322, H358) ebenfalls mittels qRT-PCR analysiert und mit den entsprechenden Expressionsniveaus in normalen Lungenfibroblasten (PAF) und normalen Lungenmuskelzellen (PASM) verglichen. Die Werte der *ZMYND10*- und *RASSF1A*-Expression der einzelnen Lungenkrebszelllinien wurden anschließend gemittelt und gemeinsam in der Analysegruppe LKZ (Lungenkrebszelllinien) dargestellt (Abbildung 22 B). Für die normalen Lungenzelllinien (PAF und PASM) wurde entsprechend verfahren und die gemittelte Expression in der Gruppe NZ (normale Lungenzelllinien) dargestellt (Abbildung 22 E). Im Vergleich zu den normalen Lungenzelllinien (NZ) ist die Expression von *ZMYND10* in den Lungenkrebszelllinien (Lungenkrebs) signifikant erhöht ( $p = 0,019$ ) (Abbildung 22 B). Im Bezug auf die *RASSF1A* Expression ergibt sich ein entgegen gesetztes Bild: *RASSF1A* wird in normalen Lungenfibroblasten und -muskelzellen (NZ) stark exprimiert. In den Lungenkrebszelllinien hingegen wird *RASSF1A* signifikant schwächer exprimiert ( $p = 0,0009$ ) (Abbildung 22 E).

Neben der Expressionsanalyse von *ZMYND10* und *RASSF1A* wurde zusätzlich eine Analyse der Promotor CpG-Insel Methylierung der beiden Gene in 69 nicht kleinzelligen Lungenkrebszelllinien (NSCLC) und 20 normalen Lungengeweben (Normal) durchgeführt. Die *Illumina* 450k Methylierungsprofile der NSCLC-Zelllinien wurden im Rahmen einer Studie von Walter et al., 2012 generiert. Die Methylierungsprofile von normalen Lungengeweben stammen aus einer Studie von Shi et al., 2014. Die DNA-Methylierung der *RASSF1A* CpG-Insel ist in den analysierten nicht kleinzelligen Lungenkrebszelllinien (Median: ca. 11%) im Vergleich zu normalen Lungenproben (Median: ca. 69%) krebspezifisch, signifikant erhöht ( $p = 1,3 \times 10^{-8}$ ) (Abbildung 22 F). NSCLC-Zelllinien zeigen darüber hinaus eine signifikante Abnahme der *ZMYND10* CpG-Insel DNA-Methylierung (Reduktion des Medians von 24% auf 12%) verglichen zu normalen Lungengeweben ( $p = 2,2 \times 10^{-5}$ ) (Abbildung 22 C).



**Abbildung 22: Inverse Korrelation von *ZMYND10* und *RASSF1A* Expression und Promotor CpG-Insel Methylierung.** **A**, Quantitative Expressionsanalyse von *ZMYND10* in HeLa- und A549- Zellen mittels qRT-PCR. Die *ZMYND10*-Expression wurde gegen die Expression von *GAPDH* normalisiert. **C**, Gemittelte Expressionsprofile (qRT-PCR-Analyse) von *ZMYND10* in Lungenkrebszelllinien (LKZ: A427, A549, H322, H358) und normalen Lungenzelllinien (NZ: PAF, PASM). Die *ZMYND10*-Expression wurde gegen die Expression von *GAPDH* normalisiert. **D**, Die DNA-Methylierungsanalyse der *ZMYND10*- CpG-Insel von 69 NSCLC-Zelllinien (NSCLC) bzw. 20 normalen Lungengeweben (Normal) (NCBI-GEO-Accession: GSE36216). **E**, Quantitative Expressionsanalyse von *RASSF1A* in HeLa- und A549- Zellen mittels qRT-PCR. Die *RASSF1A*-Expression wurde gegen die Expression von *GAPDH* normalisiert. **F**, Gemittelte Expressionsprofile (qRT-PCR-Analyse) von *RASSF1A* in Lungenkrebszelllinien (A427, A549, H322, H358) und normalen Lungenzelllinien (PAF, PASM). Die *RASSF1A*-Expression wurde gegen die Expression von *GAPDH* normalisiert. **G**, DNA-Methylierungsanalyse der *RASSF1A*- CpG-Insel von 69 NSCLC-Zelllinien (NSCLC) bzw. 20 normalen Lungengeweben (Normal) (NCBI-GEO-Accession: GSE36216). Signifikante Expressions- und DNA-Methylierungsunterschiede zwischen Krebszelllinien und normalen Zelllinien bzw. normalen Geweben wurden durch die entsprechenden Signifikanzniveaus dargestellt: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

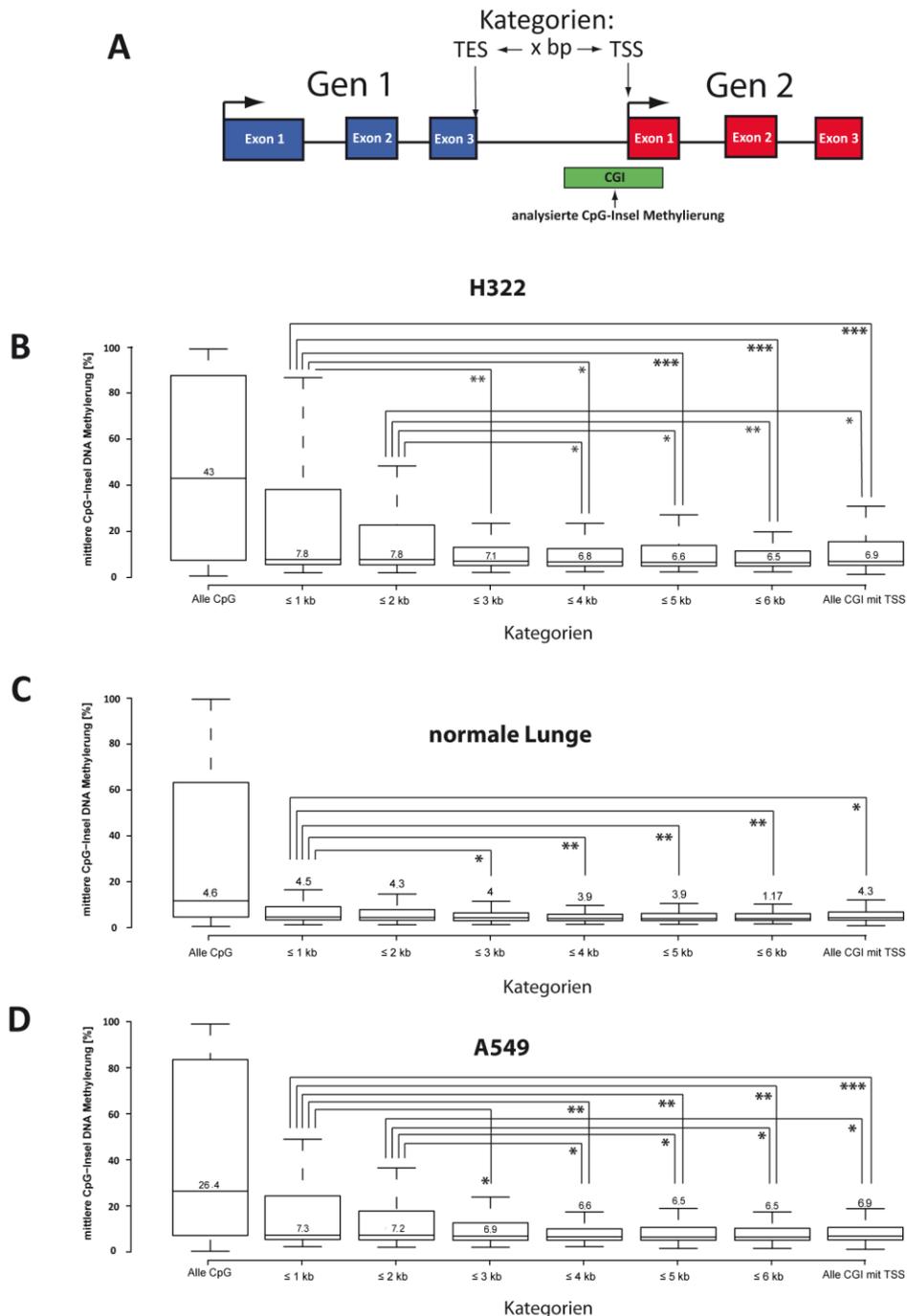
Die Methylierungsanalyse von Transkriptionsstart (TSS)- assoziierten CpG- Inseln unter Berücksichtigung ihrer Lokalisierung relativ zu einer anderen Transkriptionseinheit, wie sie exemplarisch für *RASSF1A* durchgeführt wurde, wurde in einem genomweiten Maßstab wiederholt. Es sollte damit untersucht werden, ob es einen generellen Zusammenhang zwischen der Anordnung von Genen und der Anfälligkeit bestimmter Promotor CpG-Inseln gibt, dass diese hypermethyliert werden. Zu diesem Zweck wurden Promotor CpG-Insel assoziierte Methylierungsdaten (*Illumina 450k Array* Daten) von jenen Genen analysiert, welche in geringem Abstand (maximal 6 kb) hinter dem Ende einer anderen Transkriptionseinheit (mit gleicher Transkriptionsrichtung) liegen (Abbildung 23 A). Anhand des Abstandes zwischen den Genen, d.h. zwischen der *upstream* Transkriptionsterminationsstelle (Transkriptionsendstelle - TES) und des *downstream* Transkriptionsstartbereichs (TSS), wurden Gruppen von Tandem-Genen gebildet (Kategorien  $\leq 1$  kb,  $\leq 2$  kb,  $\leq 3$  kb,  $\leq 4$  kb,  $\leq 5$  kb,  $\leq 6$  kb) und die Promoter CpG Insel Methylierung dieser Kandidatengruppen mit der Gesamtheit aller TSS- assoziierten CpG Inseln verglichen (Abbildung 23 B-D). Die verwendeten TSS und TES Koordinaten wurden aus einer Referenz Transkript-Datenbank (TxDB) der *hg19* Annotierung des humanen Genoms entnommen. Gene, bei welchen der Abstand des TSS-Bereichs zu einer *upstream* gelegenen Transkriptionsterminationsstelle eines weiteren Gens

(beide Gene mit gleicher Transkriptionsorientierung) maximal 1000 bp beträgt, werden im Weiteren als Kategorie  $\leq 1$  kb-Tandem-Gene bezeichnet. Entsprechend dazu beträgt bei Kategorie  $\leq 2$  kb-Tandem-Genen der Abstand zwischen *downstream* TSS Bereich und *upstream* TES maximal 2000 bp und bei Kategorie  $\leq 3$  kb maximal 3000 bp. Bei der Analyse wurden nur Promotor-assoziierte CpG-Inseln berücksichtigt, von denen Methylierungsinformationen von mindestens 5 CpGs vorlagen. CpG-Inseln, die durch weniger als 5 Sonden vertreten waren, zeigten deutlich größere Unterschiede in den Interquartilabständen, d. h. der Streuung der Methylierungsdaten (Abbildung 40). Bei mehr als 5 Sonden pro CpG-Inseln waren keine stärkeren Unterschiede in Interquartilabständen mehr zu erkennen, jedoch nahm die Anzahl an Kandidaten CpG-Inseln deutlich ab. Es wurde zusätzlich bei der Auswahl der Kandidatengene darauf geachtet, dass diese eine Genlänge von mindestens 1200 bp aufweisen, um eine stringenter Korrelation aus Kandidatengenen und assoziierten DNA-Methylierungsdaten zu gewährleisten.

Die DNA-Methylierung von Kategorie  $\leq 1$  kb Promotor-CpG-Inseln ist sowohl bei den A549-Zellen, als auch bei A427- und H322- Lungenkrebszelllinien im Vergleich zur Gesamtheit aller Transkriptionsstart-assoziierten CpG-Inseln signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöht (Abbildung 23). Exemplarisch sind die Ergebnisse von H322- und A549-Zellen in Abbildung 23 B, D dargestellt. Eine krebsspezifische signifikante Erhöhung ( $p < 0,05$ ) der CpG-Inseln DNA-Methylierung konnte in A549- und H322-Zellen auch bei Kategorie  $\leq 2$  kb- Genen festgestellt werden (Abbildung 23 B, D). Die DNA-Methylierung von Kategorie  $\leq 1$  kb und  $\leq 2$  kb Genen ist gegenüber der Methylierung jeder der nachfolgend analysierten Kategorien, d.h. von  $\leq 2$  kb bzw.  $\leq 3$  kb bis  $\leq 6$  kb, signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöht (Abbildung 23 D). Zusätzlich wurde diese Analyse auch mit 2 verschiedenen normalen Lungengewebe (NCBI-GEO-Accession: GSE36216, GSM1264709) durchgeführt (exemplarisch sind in Abbildung 23 C die Methylierungsdaten von GSM1264690 (normale Lunge (Normal 1)). Dabei zeigte sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung ( $p < 0,05$ ) der DNA-Methylierung von Kategorie  $\leq 1$  kb Genen, im Vergleich zu allen TSS-assoziierten Genen und im Vergleich zu Kategorie  $\leq 2$  kb bis  $\leq 6$  kb Genen (Abbildung 23 C). Die Streuung der Methylierungswerte von Kategorie  $\leq 1$  kb Promotor-CpG-Inseln zwischen dem unterem und dem oberem Quartil beträgt in H322-Zellen 33% und in A549-Zellen 19% (Abbildung 23 B, D). In den Lungengewebe beträgt der Abstand zwischen dem unterem und dem oberem Quartil der Kategorie  $\leq 1$  kb Methylierungsdaten jedoch lediglich 6% (Abbildung 23 C).

Für die Lungenkrebszelllinie A549 standen außerdem *Microarray* Expressionsdaten (NCBI-GEO-Accession: GSE17708) zur Verfügung, sodass die erhöhte DNA-Methylierung verschiedener Gen-Kategorien auch auf ihren regulatorischen Einfluss auf die Genexpression überprüft werden konnte: Es zeigt sich, dass die erhöhte DNA-Methylierung der Kategorie  $\leq 1$  kb- Tandemgenen im Vergleich zu den Kategorien  $\leq 2$  kb- bis  $\leq 6$  kb, mit einer signifikant niedrigeren Genexpression des *downstream* Gens korreliert (Abbildung 41).

Kategorie  $\leq 1$  kb-CpG-Inseln, welche in A427, A549, H322 Lungenkrebszelllinien eine durchschnittliche DNA-Methylierung von mehr als 20% aufwiesen, wurden zwischen den Krebszelllinien, aber auch mit 2 normalen Lungengewebeproben verglichen. Es zeigt sich ein Überschneidungsgrad von 36 CpG-Inseln, welche sowohl in allen Krebszelllinien, aber auch in den normalen Lungengewebe zu mindestens 20% methyliert vorliegen (Abbildung 24). Darüber hinaus konnte eine zweite Gruppe von 34 CpG-Inseln identifiziert werden die ein krebsspezifisch erhöhtes DNA-Methylierungsniveau aufweisen (Abbildung 24, Tabelle 19).



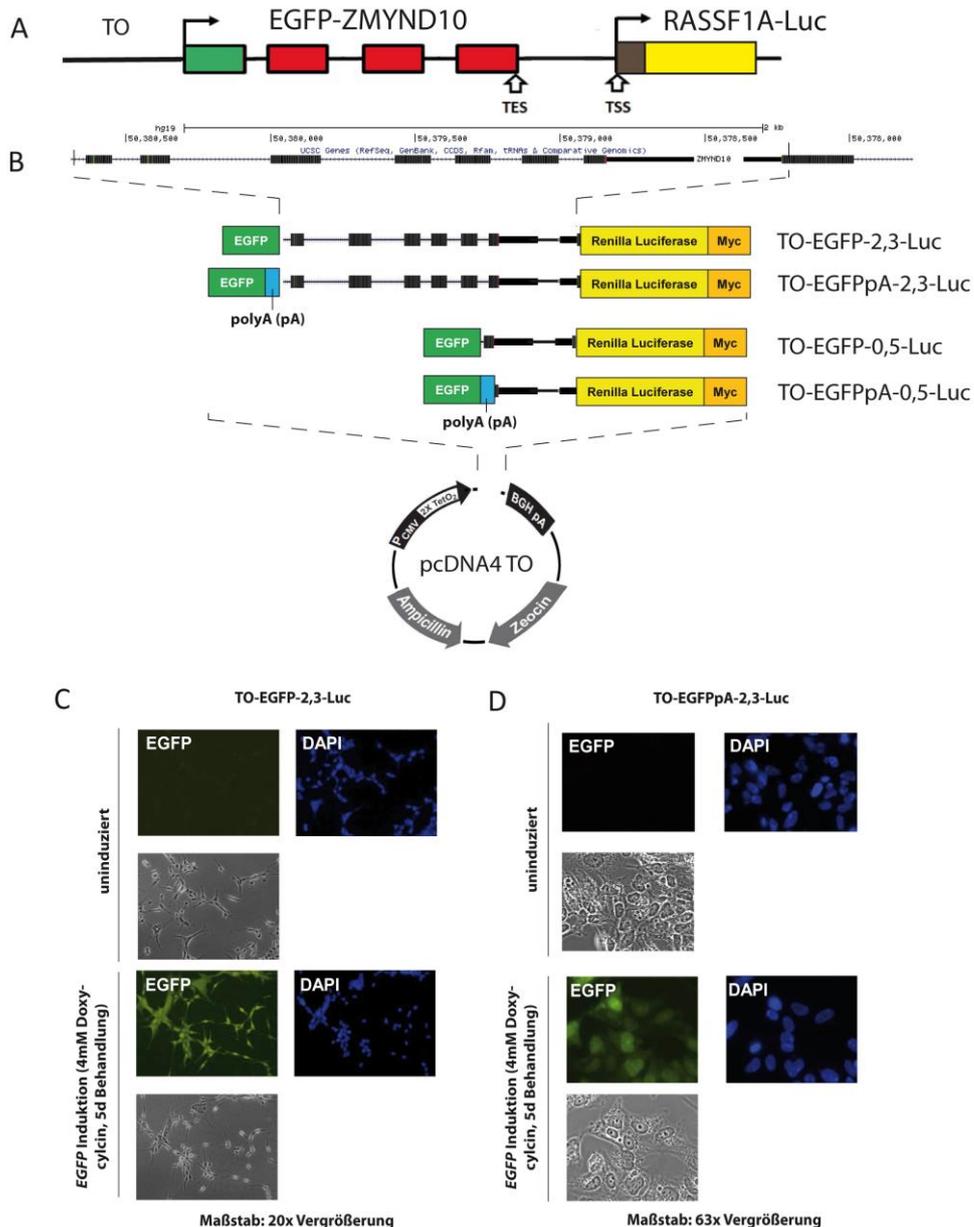
**Abbildung 23: Prädisposition bestimmter Gene für erhöhte Promotor DNA-Methylierung.** **A**, schematische Darstellung zweier Gene in Tandem-Orientierung mit Transkriptionsstopp (TES) des *upstream*-Gens und Transkriptionsstart (TSS) des *downstream*-Gens. **B**, Darstellung der CpG-Insel DNA-Methylierungsniveaus von Tandemgenen, welche im Bereich von 1-6 kb (Kategorien  $\leq 1$  kb bis  $\leq 6$  kb) hinter dem Transkriptionsstopp eines anderen Gens liegen. Der Plot wurde auf Grundlage von *Illumina* 450k Daten von H322 Lungenkrebszellen erstellt. **C**, Darstellung der CpG-Insel DNA-Methylierungsniveaus von Genen, welche im Bereich von 1-6 kb (Kategorien  $\leq 1$  kb bis  $\leq 6$  kb) hinter dem Transkriptionsstopp eines anderen Gens liegen. Der Plot wurde auf Grundlage von *Illumina* 450k Daten von normalem Lungengewebe (GSM1264690 = Normal 1) erstellt. Das Methylierungsprofil stammt von der NCBI-GEO-Datenbank. Die Accession-Nummer ist in Klammern angegeben. **D**, Darstellung der CpG-Insel DNA-Methylierungsniveaus von Genen welche im Bereich von 1-6 kb (Kategorien  $\leq 1$  kb bis  $\leq 6$  kb) hinter dem Transkriptionsstopp eines anderen Gens liegen. Der Plot wurde auf Grundlage von *Illumina* 450k Daten von A549 Lungenkrebszellen erstellt. Für die Methylierungsanalysen beträgt die Anzahl an Kategorie  $\leq 1$  kb-Genen 297, an Kategorie  $\leq 2$  kb-Genen 276, an Kategorie  $\leq 3$  kb-Genen 261, an Kategorie  $\leq 4$  kb-Genen 259, an Kategorie  $\leq 5$  kb-Genen 258 und an Kategorie  $\leq 6$  kb-Genen 271. Für die Unterschiede in der Methylierung der Kategorien  $\leq 1$  kb bis  $\leq 6$  kb mit der Kategorie allen CpG-Inseln mit Transkriptionsstart (alle CGI mit TSS) wurde für alle dargestellten *Illumina* 450k Datensätze die Signifikanzniveaus (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) dargestellt.



### 3.6.2 Etablierung eines *EGFP-RLuc*-Doppelreportersystems zur Untersuchung des Effekts des genomischen Kontextes auf die Repression der *RASSF1A* Expression

Der *ZMYND10-RASSF1A*-Genlokus mit seiner Tandemanordnung (vergl. Abbildung 21, Abbildung 25A) wurde mit einem induzierbaren Doppelreporterkonstrukt nachgestellt (Abbildung 25 B). Mithilfe dieses Reporters sollte die Beeinflussung der *RASSF1A* Expression durch die Aktivität eines *upstream* gelegenen Gens untersucht werden. Es wurde dazu ein induzierbarer *upstream Enhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)*-Reporter mit einem konstitutiv aktiven *downstream* Reporter (*Renilla Luciferase (RLuc)*) kombiniert (Abbildung 25 B). Zwischen das *EGFP*- und das *RLuc*-Reporter gen wurde eine 2,3 kb lange genomische Sequenz kloniert, welche vom Exon 7 der *ZMYND10* Isoform 1, über das 3'-Ende des *ZMYND10*-Gens bis zum ersten Exon des *RASSF1A* Transkripts reicht (Abbildung 25 B). Diese 2,3 kb lange genomische Sequenz entspricht der Promotor Region von *RASSF1A* und umfasst, neben dem *RASSF1A*-Transkriptionsstart (TSS) und *core promoter*, weitere *upstream* gelegene, potentiell regulatorische Bereiche (z.B. *S-shore* Region der *RASSF1A* CpG-Insel) (Abbildung 25 B). Im humanen Genom liegen die Bereiche der Transkriptionsinitiation bzw. -regulation von *RASSF1A* im kodierenden Bereich des *upstream* gelegenen *ZMYND10*-Gens. Die Transkriptionsterminationsstelle von *ZMYND10* liegt nur 170 bp *upstream* vom Transkriptionsstart des *RASSF1A*-Gens (Abbildung 21). Um diese Situation in dem oben beschriebenen Luciferasereporter zu imitieren wurde die cDNA des *upstream* gelegenen *EGFP*-Reporters am 3' Ende gekürzt. Durch das Fehlen des *EGFP* Stop-Codons entsteht ein *EGFP-ZMYND10* Fusionsprotein.

Die Expression des *EGFP*-Gens steht unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors. Die Induzierbarkeit wird durch mehrere Tet-Operator Sequenzen vor dem Transkriptionsstart des *EGFP* Gens sichergestellt. In dem resultierenden Doppelreporterkonstrukt entsteht nach Induktion der *EGFP* Expression ein Transkript, welches in einem Bereich von ca. 200 bp vor dem Transkriptionsstart des *Renilla* Luciferase-Reporters terminiert wird (Abbildung 25 B). Das Reporterkonstrukt bestehend aus einem *EGFP*-Gen unter der Kontrolle eines induzierbaren CMV-Promotors, gefolgt von einer 2,3 kb langen *RASSF1A*-Promotorsequenz vor einem *RLuc*-Gen wird im Weiteren als TO-EGFP-2,3-Luc bezeichnet (Abbildung 25 B). Dieses Konstrukt wurde stabil in HEK-293 T-REx Zellen eingebracht, welche bereits konstitutiv das bakterielle Tetracyclin-Repressor (*TetR*) Gen exprimieren. Im Sinne eines Tet-ON Systems kommt es nach Zugabe von Tetracyclin oder Doxycyclin in das Zellkulturmedium zu einer Dissoziation von Tet-Repressor Proteinen von den entsprechenden Operator Sequenzen. Dies ermöglicht die Expression des nachgeschalteten Gens, in diesem Fall des *EGFP* Gens. Nach Induktion der *EGFP* Expression wurde anschließend sowohl Expression als auch Aktivität der *Renilla* Luciferase-Proteine gemessen, um einen möglichen Effekt der *EGFP* Transkription auf das *downstream* gelegene Tandemgen zu untersuchen (Abbildung 26). Zur Normalisierung der *Renilla* Luciferase Aktivität, d.h. um Zelllyse-bedingte und messungsbedingte Unterschiede zu eliminieren, wurde ein Firefly Luciferase Konstrukt transient transfiziert. Die verschiedenen *EGFP-RLuc*-Reporter-Konstrukte wurden stabil in HEK T-REx-293 Zellen (*In vitro*) transfiziert, nach 3 Wochen wurden Einzelklone isoliert und expandiert. Die Einzelklone wurden anschließend auf *EGFP*-Induktivität, Homogenität der Zellpopulation (Abbildung 25 C, D) und auf vollständige Integration des Reporterkonstrukts getestet.



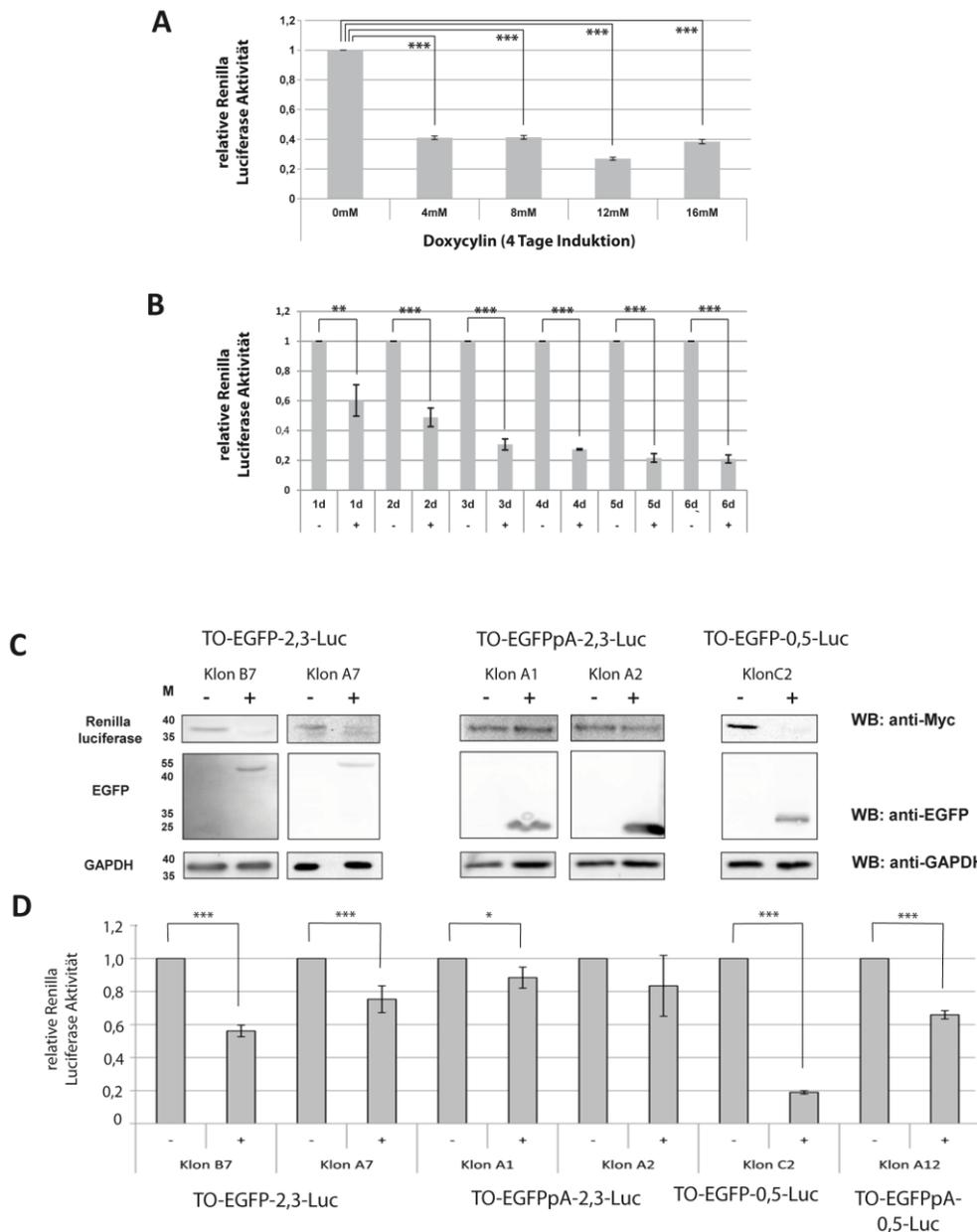
**Abbildung 25: Generierung und Validierung des induzierbaren *EGFP-RLuc* Reporter Systems.** **A**, Schematische Darstellung des *EGFP-RLuc* Doppelreporters. Die Kästen geben die cDNA-Sequenzen (grün = *EGFP*, gelb = *RLuc*) bzw. die Exon-Sequenzen von *ZMYND10* (rote Kästen) und *RASSF1A* (*RASSF1A* 5'UTR + 17 bp des Exon1α = dunkelbrauner Kasten). Das Ende des *EGFP-ZMYND10* Fusionstranskripts ist mit TES (Transkriptionseinstelle) bezeichnet. Der Transkriptionsstart von *RASSF1A-RLuc* ist mit TSS gekennzeichnet. Die Expression des *EGFP-ZMYND10* Transkripts steht unter der Kontrolle von CMV-Promotor/ Tet-Operator- Sequenzen (TO). **B**, Übersicht über die verschiedenen Reporterkonstrukte, die stabil in HEK-293 T-Rex- Zellen transfiziert wurden und von denen im Anschluss Zellklone isoliert wurden. Der grüne Kasten im Schema gibt die *EGFP*-cDNA-Sequenz an. Bei einigen Konstrukten wurde eine virale polyA-Sequenz (SV40) in das Konstrukt integriert (blauer Kasten). Der Abschnitt mit schwarzen Kästen stellt die genomische Sequenz. **Überprüfung der stabil transfizierten HEK-293 T-Rex Zellklone auf homogene Induzierbarkeit.** **C**, 20fache Vergrößerung des HEK-293 T-Rex Zellklons B7, welche stabil mit dem TO-*EGFP*-2,3-*Luc*- Konstrukt transfiziert wurden. *EGFP* wurde vor und nach 5 tägiger Induktion mit 4 mM Doxycyclin (induziert = +, uninduziert = -) mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie analysiert. Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen gemäß dem Protokoll "2.2.10 Immunfluoreszenz", unter Verwendung von 1:1.000 verdünnten Anti-*EGFP*-Primär-Antikörper inkubiert (1h) und 1:1.000 Ziege-anti-Kaninchen-Alexa-488 Antikörper (1h), behandelt. **D**, 63fache Vergrößerung von HEK-293 T-Rex-Zellen, welche stabil mit dem TO-*EGFP*pA-2,3-*Luc*- Konstrukt transfiziert wurden (Zellklon A1). *EGFP* Protein wurde nach 4-tägiger Induktion (induziert = +, uninduziert = -) direkt mittels Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen.

Die *EGFP*-Fusionsproteine, welche nach Induktion mit Doxycyclin in den Zellen mit dem TO-EGFP-2,3-Luc-Konstrukt entstehen, lassen sich nicht zur Fluoreszenz anregen. Mittels eines EGFP-spezifischen Antikörpers kann das entsprechende Genprodukt jedoch in Immunfluoreszenz-Assay und Westernblot nachgewiesen werden (Abbildung 25 C, Abbildung 26 C). Die Immunfluoreszenz-Analyse der stabil transfizierten HEK T-REx-293 Klone zeigen eine homogene Induktionsfähigkeit und keine Autoinduktion ohne Doxycyclin (Abbildung 25 C). Zum Test auf vollständige Integration des *EGFP-RLuc* Tandemreporters in die verwendeten HEK T-REx-293 Klone wurde mittels PCR ein Bereich zwischen *EGFP*- und dem *RLuc*-Gen amplifiziert und anschließend mittels Restriktionsverdau verifiziert. Die Charakterisierung der prozessierten *EGFP* Transkripte zur Bestimmung der 3'-Enden der *EGFP* Transkripte der verschiedenen Reporter-Konstrukte erfolgte mittels 3'RACE- (*rapid amplification of cDNA-ends*) PCR.

Neben dem oben beschriebenen Reporter (TO-EGFP-2,3-Luc) wurden darüber hinaus weitere Konstrukte generiert, welche sich im Abstand der induzierbaren *EGFP*-Kassette zum *RLuc*-Gen unterscheiden: Der Abstand zwischen den beiden Reportern wird über die Länge des *RASSF1A* Promotorbereichs moduliert. In einer verkürzten Version reicht der *RASSF1A*-Promotor von ca. -500 bp des *RASSF1A*-Transkriptionsstarts bis zum 1sten Exon von *RASSF1A* (TO-EGFP-0,5-Luc, Abbildung 25 B). Zusätzlich zu den Plasmiden mit C-Terminal verkürzten *EGFP*-Reportern (ohne *EGFP* Stop-Codon) wurden auch Vektoren mit vollständiger *EGFP*-Sequenz und einer zusätzlich integrierten viralen polyA-Sequenz an das 3'-Ende der *EGFP* kloniert, wodurch die Bildung von *EGFP-ZMYND10* Fusionsprodukten verhindert wird (TO-EGFPpA-2,3-Luc und TO-EGFPpA-0,5-Luc, Abbildung 25B).

Dass EGFP-Protein, welches in den TO-EGFPpA-2,3-Luc bzw. TO-EGFPpA-0,5-Luc Doppelreportern gebildet wird, kann selbstständig fluoreszieren (Abbildung 25 D). Auch bei dem HEK T-REx-293 TO-EGFPpA-2,3-Luc Zellklon zeigt sich eine Induktion der *EGFP*-Expression nach Zugabe von Doxycyclin ins Medium. Ohne den Zusatz von Doxycyclin ist keine Fluoreszenz erkennbar (Abbildung 26 D).

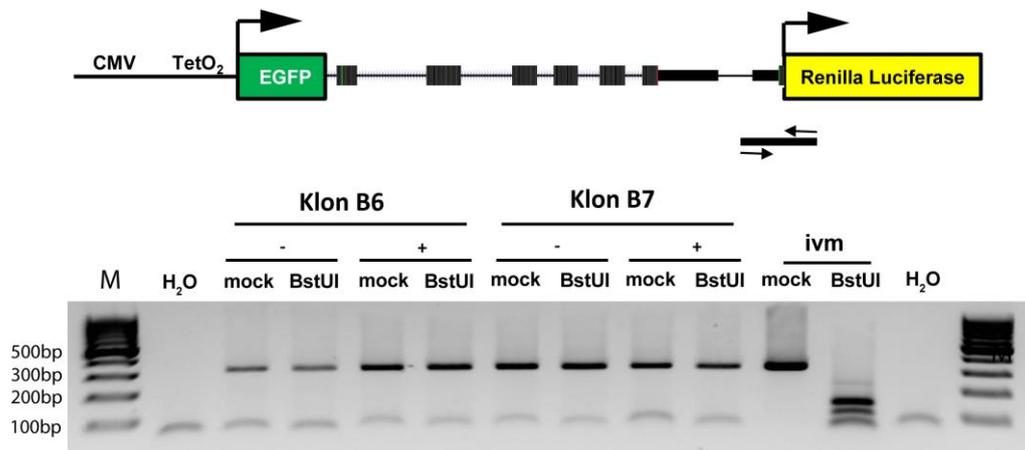
In stabil transfizierten HEK-T-REx-293 TO-EGFP-2,3-Luc Zellklonen führte die Komplementierung des Zellkulturmediums mit 4 mM Doxycyclin zur Induktion der *EGFP*-Expression und zu einer signifikanten ( $p < 0,01$ ) Reduktion der *Renilla* Luciferase Aktivität (Abbildung 26 A). Zur Bestimmung der optimalen Doxycyclin Konzentration wurden empirisch verschiedene Konzentrationen (4 mM, 8 mM, 12 mM, 16 mM Doxycyclin) getestet. Ein Anstieg der Doxycyclin Konzentration auf über 4 mM Doxycyclin führte jedoch zu keiner Verstärkung des repressiven Effektes (Abbildung 26 A). Die Induktion der *EGFP* Expression wurde über einen Zeitraum von 5 Tagen variiert und führte zu einer graduellen Reduktion der *Renilla* Luciferase Aktivität (Abbildung 26 B).



**Abbildung 26: Validierung des induzierbaren EGFP-RLuc Tandemreporter Systems.** Analyse der *Renilla* Luciferase-Aktivität nach EGFP-Induktion mittels Luciferase-Assay. Für die Luciferase-Assays wurden die Zellen zur Normalisierung der RLuc-Aktivität jeweils transient mit Firefly-Luciferase Konstrukten transfiziert. Für signifikante Unterschiede der RLuc-Aktivitäten zwischen uninduzierten (0 mM Doxycyclin bzw. Minus (-)) und induzierten (4 mM, 8 mM, 12 mM, 16 mM Doxycyclin bzw. Plus (+)) HEK-293 T-REx TO-EGFP-2,3-LUC Zellklonen wurden die entsprechenden Signifikanzniveaus angegeben: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . **A**, Einfluss verschiedener Doxycyclin Konzentrationen auf die *Renilla* Luciferase Expression. **B**, Messung der RLuc-Aktivität über einen Zeitraum von 6 Tagen unter täglicher Zugabe von 4 mM Doxycyclin. Validierung der Luciferase-Assay Ergebnisse mittels Westernblot-Analyse. **C**, **D** Darstellung verschiedener Zellklone, welche stabil mit den angegebenen Konstrukten transfiziert und anschließend 4 Tage lang mit 4 mM Doxycyclin induziert wurden. Von den induzierten (+) bzw. uninduzierten (-) Zellklonen wurden anschließend die Expressionsniveaus von *Renilla Luciferase* (Luc) und EGFP mittels Westernblot analysiert und diese Ergebnisse durch Messung der *Renilla* -Luciferase Aktivität verifiziert. Für die Westernblot-Analyse wurden die Zellen gemäß dem Protokoll „2.2.8.3 Western Blot“ behandelt. Für den Nachweis von GAPDH, EGFP und Myc wurden die entsprechenden Antikörper gemäß Tabelle 11 und Tabelle 12 eingesetzt. Für die Luciferase-Assays wurden die *Renilla* -Luciferase Aktivität normalisiert gegen transient transfizierte *Firefly*-Luciferase dargestellt.

Die Reduktion der Luciferase Aktivität nach *EGFP*-Induktion, welche mittels Luciferase-Assay ermittelt wurden, wurde zusätzlich mittels Westernblot verifiziert (Abbildung 26 C). Dies diente der Bestätigung, dass der reprimierende Effekt durch eine reduzierte Genaktivität des Luciferasegens und nicht durch die Bildung von funktionsunfähigen *Renilla* Luciferase Fusionsproteinen hervorgerufen werden. Nach Induktion der *EGFP*-Transkription kommt es bei den TO-*EGFP*-2,3-LUC- bzw. TO-*EGFP*-0,5-LUC-Konstrukten zu einer signifikanten Reduktion ( $p < 0,001$ ) der *Renilla* Luciferase Aktivität, die durch eine Reduktion an *Renilla* Luciferase Enzym ausgelöst wird (Abbildung 26 C). Je kürzer der Abstand zwischen den Reportern ist, desto stärker ist der repressive Effekt auf die *RLuc*-Expression (vergl. TO-*EGFP*-2,3-LUC und TO-*EGFP*-0,5-LUC, Abbildung 26 C, D). Durch die Verhinderung der Ausbildung von *EGFP*-ZMYND10-Fusionsprodukten im TO-*EGFP*pA-2,3-LUC-Konstrukt kommt es nur zu einer geringen Reduktion der *Renilla* Luciferase Aktivität und zu keiner Reduktion an gemessenem *Renilla* Luciferase Protein (C). Durch eine Verringerung des Abstandes zwischen *EGFP*- und *RLuc*-Reporter im TO-*EGFP*pA-0,5-LUC-Konstrukt kann der Effekt wiederum verstärkt werden (entsprechend dem TO-*EGFP*-0,5-LUC-Konstrukt) (Abbildung 26 C). Der reprimierende Effekt des TO-*EGFP*pA-0,5-LUC-Konstrukts ist jedoch geringer als jener des TO-*EGFP*-0,5-LUC-Konstrukts (Abbildung 26 C, D).

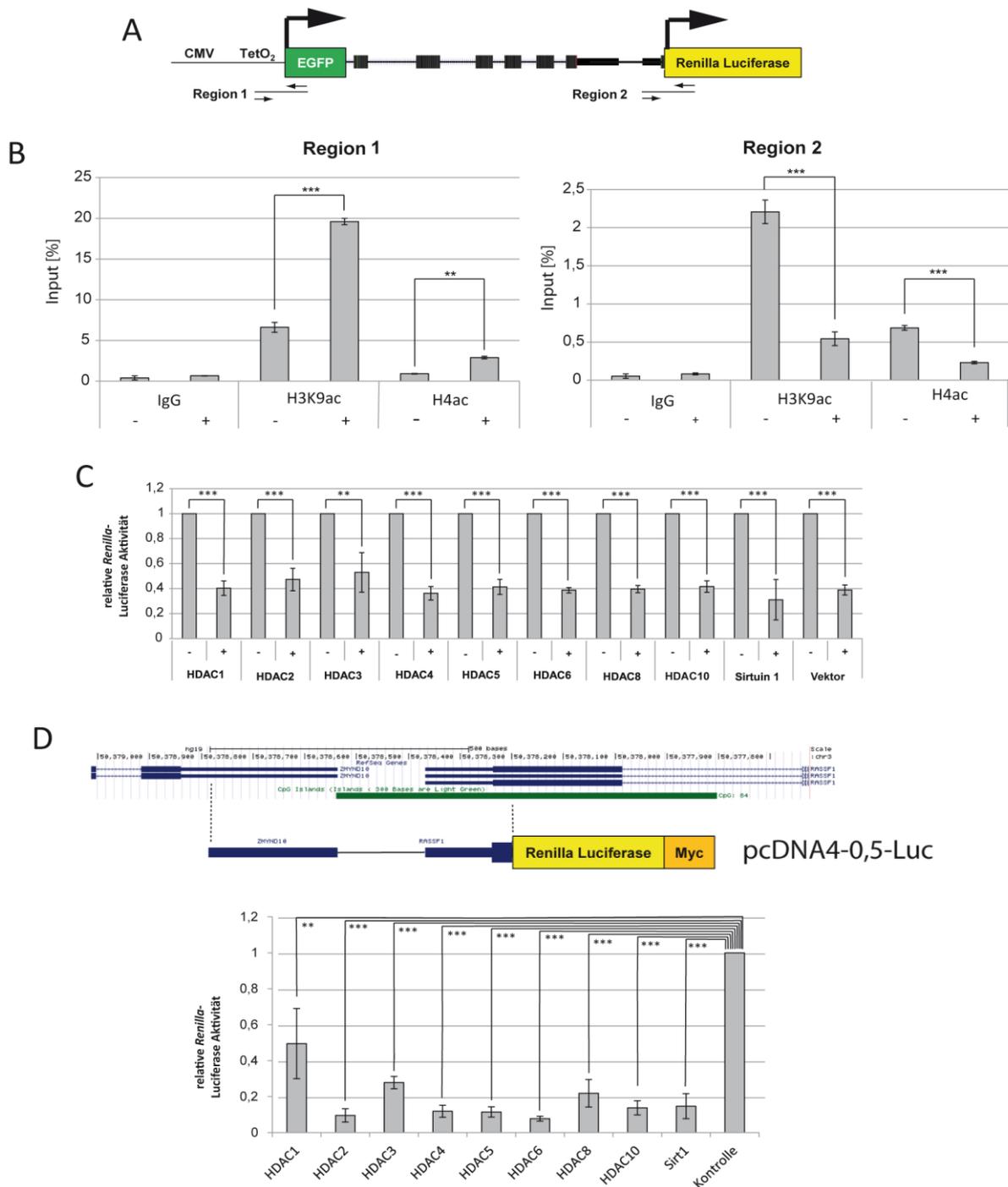
Zur Untersuchung, ob die *EGFP*-Transkription mit einem Anstieg der DNA-Methylierung im *RASSF1A*-Promotorbereich des *RLuc*-Reporters verbunden ist wurde eine Methylierungsanalyse dieser Region durchgeführt. Dafür wurde genomische DNA von HEK-293 T-REx TO-*EGFP*-2,3-LUC-Zellklonien isoliert und anschließend Bisulfit (BS)-konvertiert. Im Anschluss daran wurde die *RASSF1A*-Promotorsequenz des *RLuc*-Reportergens mittels BS-DNA spezifischer PCR amplifiziert. Die Bisulfit-Konvertierung führt zu einer Deaminierung von unmethylierten Cytosinen in einem CpG-Kontext zu Uracil. Diese wiederum werden im Laufe der PCR durch Thymin-Nukleotide ersetzt. Dadurch kommt es zu einer Veränderung der DNA-Sequenz. Methylierte Cytosine in einem CpG-Kontext bleiben als Cytosine erhalten. Durch Verwendung von Restriktionsenzymen (BstUI), die eine CG-spezifische Erkennungssequenz schneiden, werden methylierte Ausgangssequenzen geschnitten, unmethylierte Ausgangssequenzen jedoch nicht. Zusätzlich wurde eine *in vitro* methylierte und Bisulfit-konvertierte Probe genomischer HEK-293 T-REx TO-*EGFP*-2,3-LUC DNA (ivm) als Positivkontrolle mitgeführt. Nach 5 tägiger Doxycyclin-Induktion konnten jedoch keine Restriktionsverdauprodukte bzw. keine Zunahme an DNA-Methylierung in der *RASSF1A*-Promotorregion im Vergleich zu einer uninduzierten Probe festgestellt werden. Bei einer Verlängerung des *EGFP*-Induktionszeitraums auf 30d kam es ebenfalls zu keiner Messung von *de novo* Methylierung in der Promotorregion (Abbildung 27): Die *RASSF1A*-Promotorsequenzen des stabil transfizierten Doppelreporters waren im uninduzierten (-) Zustand unmethyliert und auch nach *EGFP*-Induktion (+) war kein Anstieg der DNA-Methylierung festzustellen. Neben der exemplarisch in Abbildung 27 dargestellten Region wurden noch weitere *upstream* gelegene Sequenzbereiche analysiert. Es konnte jedoch in keiner Region ein positives DNA-Methylierungssignal festgestellt werden



**Abbildung 27: DNA-Methylierungsanalyse der *RASSF1A* Promotorsequenz des *EGFP-RLuc* Doppelreporters.** Methylierungsanalyse von 2 unterschiedlichen HEK-293 T-Rex TO-EGFP-2,3-Luc- Zellklonen (Klon B6, B7). Die induzierten Zellen wurden 30 Tage lang unter Zusatz von 4 mM Doxycyclin kultiviert (Dox-Induktion = +, uninduziert = -). Nach Bisulfitkonvertierung der genomischen DNA und PCR-Amplifizierung (Primerpositionen im Schema) wurden die PCR-Produkte mit BstUI (+) verdaut und zusammen mit einem Mockverdau (*mock*) auf einem 2% Agarosegel aufgetrennt. Als Positivkontrolle diente eine in vitro methylierte DNA-Probe des TO-EGFP-2,3-Luc- Zellklon B6 (*ivm*). M = Marker.

### 3.6.3 *EGFP*-Induktion führt zur Deacetylierung des *RASSF1A*- Promotors im Doppelreporterkonstrukt

Zur Aufklärung des Mechanismus, welcher der Reduktion der *RLuc*-Expression nach *EGFP*-Induktion zu Grunde liegt, wurden lokale Veränderungen von aktiven Histonmodifikationen (Acetylierung des Lysin 9 von Histon H3 (H3K9) und Acetylierung von Histon H4) im *RASSF1A* Promotorbereich des Luciferase-Reporters nach *EGFP*-Induktion analysiert. Zu diesem Zweck wurde von Zellen des HEK-293 T-Rex Zellklons B7 (mit stabil integriertem TO-EGFP-2,3-Luc Reporter), welche 4 Tage lang mit Doxycyclin induziert worden waren eine Chromatin-Immunopräzipitation (ChIP) mit Antikörpern gegen Acetyl-H3-Lysin9 und Acetyl-H4 durchgeführt (Abbildung 28 B). Ein entsprechender Versuch wurde ebenfalls mit uninduzierten Zellen des HEK-293 T-Rex Zellklons B7 durchgeführt. Von den induzierten bzw. uninduzierten Zellen wurde jeweils außerdem ein Immunpräzipitationsansatz mit IgG-Antikörpern als ChIP-Negativkontrolle und Histon H3-Antikörpern als ChIP-Positivkontrolle in den Versuchsaufbau integriert. Von allen gewonnenen DNA-Präzipitaten wurde anschließend ein Bereich in der *RASSF1A*-Promotor Region des *RLuc*-Reporters mittels PCR amplifiziert (Region 2 – Abbildung 28 A und B). Die Menge des entstandenen PCR-Produkts von Doxycyclin-induzierten Zellen wurde mit uninduzierten Zellen verglichen und diente als Maß bei der Quantifizierung der Veränderungen von acetyliertem Histon H3-Lysin9 und acetyliertem Histon H4 nach *EGFP*-Induktion. In dem stabil transfizierten HEK-293 T-Rex Klon B7 konnte nach *EGFP*-Induktion eine signifikante Reduktion ( $p < 0,001$ ) der Acetylierung von Histon H3 Lysin9 und Histon H4 im Bereich des *RASSF1A*-Luciferase Promotors (Region 2) nachgewiesen werden (Abbildung 28 B). Zur Kontrolle der Ergebnisse aus der *RASSF1A*-Promotor-Region wurde ebenfalls ein Bereich innerhalb des *EGFP*-Gens amplifiziert (Region 1- Abbildung 28 A). In dieser Region kommt es im Gegensatz zur *RASSF1A*-Promotor Region zu einem Anstieg von H3K9- und H4-Histonacetylierungen (Abbildung 28 B).



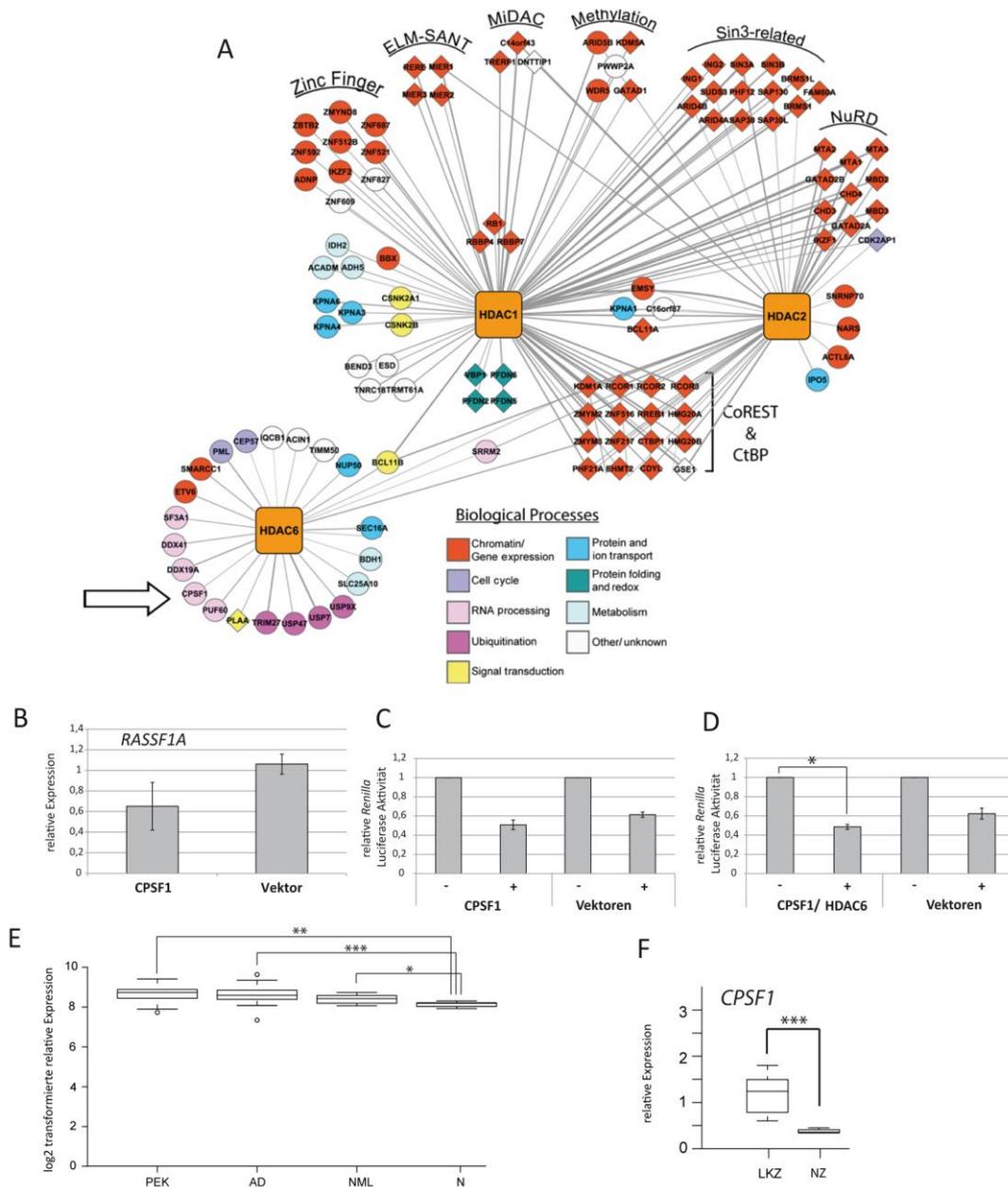
**Abbildung 28: Deacetylierung des *RASSF1A*-Promotor Reporters.** **A**, schematische Darstellung des TO-EGFP-2,3-Luc Reporters mit den Primerpositionen und Regionen, welche in den ChIP-Präzipitaten analysiert wurden. **B**, ChIP Analyse des HEK-293 T-Rex TO-EGFP-2,3-Luc Zellklons B7, welcher 4 Tage lang mit Doxycyclin induziert (+) wurde und von dem zusammen mit einer uninduzierten Kontrolle (-) anschließend verschiedene Histon Acetylierungen (H3K9ac, H4ac) und Positiv (H3)- und Negativkontrolle (IgG) im Bereich des *RASSF1A*-Promotor des Luciferase-Reporters bzw. im Bereich des *EGFP*-Gens analysiert wurden. **Identifizierung von Faktoren die an die Deacetylierung des *RASSF1A*-Promotors beteiligt sind.** **C**, Cotransfektion verschiedener Histon Deacetylasen in den TO-EGFP-2,3-Luc - Zellklon B7 und Analyse der *Renilla* Luciferase Aktivität vor und nach 4 tägiger *EGFP* Induktion (induziert = +, uninduziert = -). **D**, Transiente Cotransfektion verschiedener Histon Deacetylasen (HDAC) in HEK-293 Zell-Pools, welche stabil mit einem pcDNA4-0,5-LUC-Reporter (Einzelreporter mit 0,5 kb *RASSF1A*-Promotorsequenz vor einem *RLuc*-Gen, ohne induzierbare *EGFP*-Kassette) transfiziert wurden. 3 Tage nach der HDAC-Cotransfektion erfolgte die Analyse der Luciferase-Aktivität. Für die Luciferase-Assays wurden die Zellen zur Normalisierung der *Renilla* -Luciferase Aktivität jeweils transient mit Firefly-Luciferase transfiziert.

Aufgrund der Reduktion von Histonacetylierungen im *RASSF1A*-Promotorbereich nach *EGFP*-Induktion wurden im Anschluss verschiedene Histon-Deacetylasen (HDACs: *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*, *HDAC4*, *HDAC5*, *HDAC6*, *HDAC8*, *HDAC10* und *Sirt1*) auf ihre Beteiligung an dem Prozess der Repression der *Renilla* Luciferase-Expression untersucht (Abbildung 28 C). Es wurde dabei getestet, ob durch transiente Cotransfektion verschiedener HDACs in einen HEK-293 T-REx Zellklon mit stabil integriertem TO-EGFP-2,3-Luc-Doppelreporter (Zellklon B7) der repressive Effekt auf die RLuc-Aktivität nach *EGFP*-Induktion zusätzlich verstärkt werden konnte (Abbildung 28 C). Es konnte jedoch keine Verstärkung des reprimierenden Effekts aus *EGFP*-Induktion und Cotransfektion verschiedener Histon-Deacetylasen, im Vergleich zur Vektorkontrolle, nachgewiesen werden. Es gab keine zusätzliche signifikante Reduktion der *Renilla* Luciferase Aktivität (Abbildung 28 C).

In einem weiteren Ansatz wurde mit einem veränderten Versuchsaufbau ebenfalls untersucht welche Histon Deacetylase einen repressiven Effekt auf den *RASSF1A*-Promotorbereich hat: Es wurde dafür ein Reporterkonstrukt verwendet, welches aus einem *Renilla* Luciferase-Gen unter der Kontrolle einer *RASSF1A*-Promotorsequenz steht und stabil in HEK-293 Zellen integriert wurde. Durch transiente Cotransfektion von HDACs in dieses Zellsystem wurde anschließend der Effekt verschiedener HDACs auf die Aktivität des *Renilla* Luciferase-Reporters analysiert. Bei diesem Reportersystem konnte ein differenzierterer Effekt auf die RLuc-Aktivität nach Cotransfektion verschiedener HDACs festgestellt werden. Durch Überexpression von HDAC6 konnte der stärkste reprimierende Effekt auf einen Luciferase Reporter mit *RASSF1A*-Promotor erzielt werden (Abbildung 28 D).

#### **3.6.4 CPSF1 und HDAC6 kooperieren in der Repression des *RASSF1A*-Promotor-Reporters**

Basierend auf dem HDAC Interaktom von Joshi et al., 2013 wurde nach interessanten Kandidaten für die Verbindung zwischen Histon Deacetylierung und Transkriptionsassoziierten Prozessen gesucht (Abbildung 29 A) (Joshi et al, 2013). Da die Transkriptionsinitiation von *RASSF1A* in einem Bereich erfolgt in welchem die Transkriptionstermination des *ZMYND10* Gens und die 3'-Prozessierung des entsprechenden Genprodukts erfolgt, wurde untersucht ob Faktoren, welche mit Transkriptionstermination und mRNA-Prozessierung assoziiert sind das Potential haben mit der Transkription von *RASSF1A* zu interferieren. Interessante Interaktionspartner, die eine direkte Verbindung zwischen Histondeacetylierung und Transkriptionstermination/ mRNA-Prozessierung bilden, sind HDAC6 und CPSF1 (Abbildung 29 A): CPSF1 bzw. CPSF160 (*cleavage and polyadenylation specific factor 1*, 160 kDa Untereinheit) ist die größte Untereinheit des „*Cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF)“ Komplexes, welcher bei der Prozessierung des mRNA 3'-Endes involviert ist. CPSF160 ist verantwortlich für die Erkennung des (AAUAAA) poly(A) Signals auf der prä-mRNA und interagiert mit anderen Faktoren, um dadurch den Schneide- und Polyadenylierungsprozess der mRNA zu erleichtern (Yang & Doublie, 2011). Zusammen mit den CstF (*cleavage and stimulation factor*) Proteinen sind die CPSF Proteine notwendig für die Erkennung von *cis*-wirkenden Sequenzelementen auf der prä-mRNA, welche die Position für das Abspalten der 3' Signalregion von der prä-mRNA und die anschließende Polyadenylierung vorgeben.



**Abbildung 29: CPSF1 und HDAC6 kooperieren in der Repression des *RASSF1A*-Promotor Reporters.** **A**, Schema des umfangreichen HDAC-Interactoms (Joshi et al., 2012). **B**, quantitative Expressionsanalyse (mittels qRT-PCR) von *RASSF1A* in einem A427 Zellpool, welcher stabil mit einem *CPSF1*-Überexpressionskonstrukt bzw. einem Kontrollkonstrukt transfiziert wurde. **C**, stabile Cotransfektion von *CPSF1* (bzw. Kontrollvektoren) in den TO-CMV-EGFP-2,3- Zellklon B7 und Analyse der *Renilla* Luciferase Aktivität vor und nach 4 tägiger *EGFP* Induktion. **D**, stabile Cotransfektion von *CPSF1* und transiente Transfektion von *HDAC6* (bzw. Kontrollvektoren) in den TO-CMV-EGFP-2,3- Zellklon B7 und Analyse der *Renilla* Luciferase Aktivität vor und nach 4 tägiger *EGFP* Induktion. **E**, Expressionsanalyse von *CPSF1* in nicht kleinzelligen Lungenkarzinomen und Normalgeweben. Die Expressionsanalysen wurden auf Grundlage von Microarraydaten von 49 Lungenplatteneithelkarzinomen (PEK), 41 Lungenadenokarzinomen (AD), 15 nicht-malignen Lungenerkrankungen (NML) und 6 normalen Lungengewebe (N) durchgeführt (Dammann et al, 2005b). Die Daten wurden als log<sub>2</sub> transformierte relative Expression dargestellt. Die Expression in PEK, AD und NML wurde in Relation zu normalen Lungengewebe (N) auf signifikante Unterschiede in der Expression untersucht. Für signifikante Expressionsunterschiede zwischen PEK bzw. AK und Normalgewebe (N) wurden die entsprechenden Signifikanzniveaus angegeben: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ . **F**, quantitative Expressionanalyse (mittels qRT-PCR) von *CPSF1* in verschiedenen Lungenkrebszelllinien (LKZ - A427, A549, H322, H358) und verschiedener normaler Lungenzelllinien (NZ - PAF, PASM). Die relative *CPSF1*-Expressionen wurden normalisiert zu Actin dargestellt. Für signifikante Expressionsunterschiede zwischen LKZ und NZ wurden die entsprechenden Signifikanzniveaus angegeben: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

Das Erkennen und Spalten des poly(A)-Signals auf die prä-mRNA ist ein kritischer Schritt in der Transkriptionstermination und führt zu einer Freisetzung von CPSF1 von der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II. Die Präsenz von CPSF1 am TES könnte zu einer Rekrutierung von HDAC6 führen (Hsin & Manley, 2012). Ein *CPSF1* Überexpressionskonstrukt wurde kloniert und anschließend stabil in A427 Lungenkrebszellen transfiziert. Eine Expressionsanalyse der A427-Überexpressionszelllinie ergab, dass der *CPSF1* überexprimierende Ansatz, im Vergleich zu einem Kontrollansatz, eine reduzierte *RASSF1A* Expression zeigt ( $p = 0.008$ ) (Abbildung 29 B). Durch Cotransfektion von *CPSF1* (stabil) und *HDAC6* (transient) in ein HEK-293 T-REx Zellsystem, welches vorher bereits stabil mit dem TO-EGFP-2,3-LUC Tandemreporter transfiziert wurde, konnte eine Verstärkung des reprimierenden Effekts auf die *Renilla*-Luciferase Aktivität durch die *EGFP* Transkription festgestellt werden ( $p = 0.01877$ ) (Abbildung 29 D). Im Gegensatz dazu führte die alleinige stabile Transfektion von *CPSF1* in das TO-EGFP-2,3-LUC System zu keiner signifikanten Reduktion der *Renilla*-Luciferase Aktivität (Abbildung 29 C). Die Expressionsanalyse von *CPSF1* in verschiedenen NSCLC-Lungentumoren (49 Lungenplattenepithelkarzinomen (PEK), 41 Lungenadenokarzinomen (AD), 15 nicht-bösartigen Lungenerkrankungen (NM) und 6 normalen Lungengewebe (N) ergab eine signifikant gesteigerte ( $p < 0,01$ ) Expression von *CPSF1* in Lungentumoren im Vergleich zu normalen Lungengewebe festgestellt werden (Abbildung 29 D). Die krebspezifische signifikante ( $p < 0,001$ ) Expressionssteigerung von *CPSF1* konnte ebenfalls mittels qRT-PCR in Lungenkrebszelllinien (A427, A549, H322, H358) gegenüber normalen Lungenzelllinien (PAF und PASM) bestätigt werden (Abbildung 29 E).

### 3.7 Epigenetische Inaktivierung von *ABCB4* in verschiedenen Krebsentitäten

#### 3.7.1 Methylierungsanalyse von *ABCB4* in verschiedenen Krebsentitäten

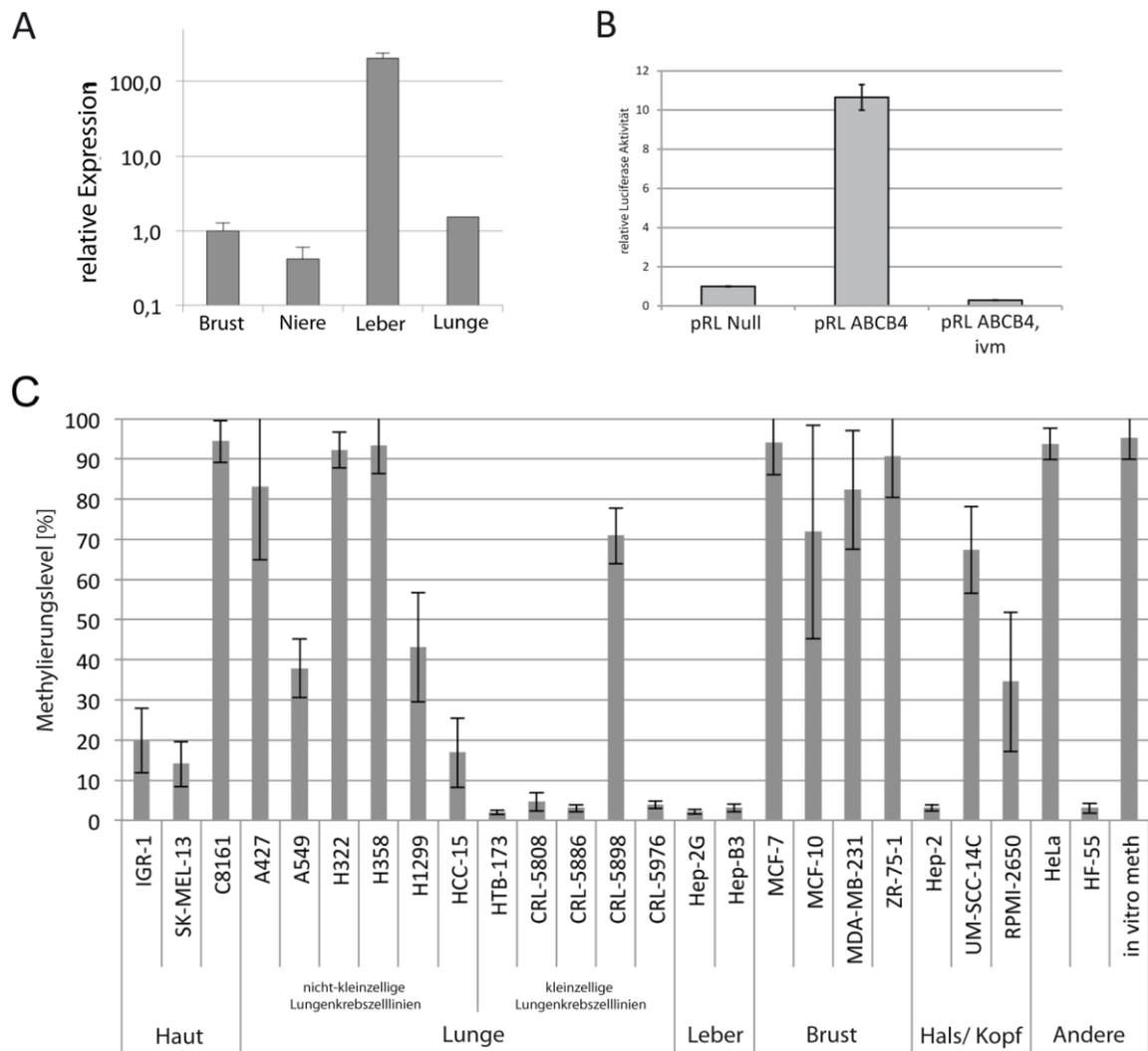
Multiresistenzen gegen Arzneimittel haben einen großen Einfluss, sowohl auf eine erfolgreiche Krebstherapie, aber auch auf die Bekämpfung bakterieller infektiöser Erkrankungen. Die Resistenz gegen Chemotherapeutika wird durch die Präsenz bestimmter molekularer „Pumpen“ in den Membranen von Krebszellen vermittelt. Diese können Medikamente aktiv aus den Zellen ausschleusen und dadurch direkte toxische Effekte der Mittel oder aber die durch die Aufnahme verbundenen schädlichen sekundären Prozesse in der Zelle verhindern (Persidis, 1999). Diese „Pumpen“ gehören zur Superfamilie der *ATP binding cassette* (ABC) Transporter. Bei der ABC Transporter Superfamilie handelt es sich um integrale Membranproteine, welche den ATP-Hydrolyse-abhängigen Transport einer Vielzahl von Substanzen (Xenobiotika, Arzneimittel, Lipide und andere metabolische Produkte) über die Plasmamembran oder die Kernmembran katalysieren (Rees et al, 2009). Die Familie der ABC-Transporter gliedert sich (anhand von Homologie Analysen der *nucleotide binding domain*) in 7 Subfamilien (A-G) mit den Bezeichnungen ABC1 (A), MDR/TAP (B), MRP (C), ALD (D), OA BP (E), GCN20 (F) bzw. White (G). Ein Mitglied der MDR-Subfamilie ist *ABCB4* (*MDR3*), welches am Efflux von Phospholipiden (z.B. Phosphatidylcholine) von der inneren zur äußeren Seite von Hepatozytenmembranen beteiligt ist. Die ausgeschleusten Phospholipide bilden Mizellen in denen Gallensalze aufgenommen werden, wodurch unter anderem die zytotoxischen Effekte der Gallensalze reduziert werden, aber auch ihre detergente Wirkung reguliert wird (Morita & Terada, 2014). Das exakte Funktionsspektrum von *ABCB4* ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. In Übereinstimmung mit der beschriebenen Funktion des *ABCB4*-Proteins wird das Gen am stärksten in der Leber exprimiert. Mittels qRT-PCR konnte jedoch auch eine Expression in anderen humanen Geweben nachgewiesen werden, unter anderem in Brust, Niere und Lunge (Abbildung 30 A). Die

qRT-PCR-Daten konnten durch Expressionsdaten (Protein- und RNA Daten) des *Human Protein Atlas* (<http://www.proteinatlas.org/ENSG00000005471-ABCB4/tissue>) bestätigt werden: In verschiedenen Geweben (Leber, Galle, Pankreas, Verdauungssystem, Reproduktionssystem, endokrine Drüsen, respiratorisches System) – meist in sekretierenden Epithelzellen – konnte auf Proteinebene ein positives *ABCB4*-Expressionssignal detektiert werden. Im Rahmen von Studien mit *Abcb4 knockout* Mäusen konnte das Fehlen dieses speziellen Transporters in Verbindung mit der spontanen Entwicklung von starken Entzündungen der Gallengänge (primäre sklerotisierende Cholangitis) und einer stark fortschreitenden Leberzirrhose gebracht werden. Da Leberkrebs zu einem sehr hohen Prozentsatz die Folge einer Leberzirrhose ist (Malek et al, 2014) wurde untersucht, ob in Leberkarzinomzelllinien die Aktivität des *ABCB4* Gens durch epigenetische Inaktivierung der Promotor CpG-Insel reprimiert wird.

Die regulatorische Kapazität der *ABCB4*-Promotor CpG-Insel auf die Expression des entsprechenden Gens wurde mithilfe eines Luciferase Reporters bestimmt. Es wurde dazu ein 918 bp langes *ABCB4*-Promotors Fragment (welches partiell sowohl mit der *ABCB4*-Promotor CpG-Insel, als auch dem Transkriptionsstart überlappt) in ein Luciferase Reporter Konstrukt (pRL-System, *Promega*) kloniert. Anschließend wurde die Induktion dieses Luciferase Konstrukts im Vergleich zu einem *in vitro* methylierten Pendant in HeLa- und HEK-293- Zellen untersucht. Im Ergebnis zeigte sich, dass im Vergleich zu einem unmethylierten *ABCB4*- Promotor durch die *in vitro* Methylierung des Konstrukts die Aktivität des *ABCB4*- Promotors deutlich reduziert wurde (Abbildung 30 B).

Mittels Pyrosequenzierung wurde die DNA-Methylierung von 8 CpGs der *ABCB4*-Promotor CpG-Insel von 2 Leberkrebszelllinien (Hep-B3 und Hep-2G) analysiert. Bei den untersuchten Leberkarzinomzelllinien konnte jedoch keine DNA-Methylierung des *ABCB4* Promotors festgestellt werden (Abbildung 30 C). Des Weiteren wurden auch 6 nicht kleinzellige Lungenkrebszelllinien (A427, A549, H322, H358, HCC-15 und H1299), 6 kleinzellige Lungenkrebszelllinien (HTB-171\*, HTB-173, CRL-5808, CRL-5976, CRL-5886\*, CRL-5898, HTB-171), 4 Brustkrebs- (MCF-7, MCF-10, ZR-75-1 und MDA-MB-231), 3 Hautkrebs- (C8161\*, IGR-1, SK-MEL-13, C8161), 3 Hals/Kopf- (Hep-2, UMSSC-14C, UM-SCC-22B\*, M-SCC-14C\* und RPMI-2650) und eine Zervixkarzinom-Zelllinie (HeLa) mittels Pyrosequenzierung untersucht (Abbildung 30 C (\* = nicht in Abbildung 30 C dargestellt)). Als Negativkontrolle wurden zusätzlich humane Fibroblasten (HF-55) und *in vitro* methylierte DNA als Positivkontrolle in das Probenpanel aufgenommen. Die beschriebenen Zelllinien und wurden außerdem durch *Combined Bisulfite Restriction Analysis* (CoBRA) verifiziert. Bei verschiedenen Tumorentitäten – vor allem Lunge-, Brust- und Hals/Kopf- Krebszelllinien konnte eine Hypermethylierung des *ABCB4* Promotors festgestellt werden: Von den Lungenkrebszelllinien wiesen 5 von 6 untersuchten nicht kleinzelligen Lungenkrebszelllinien (A427, A549, H322, H358 and H1299) eine DNA-Methylierung von mehr als 20% auf. Von den kleinzelligen Lungenkrebszelllinien (HTB-171, CRL-5898 and CRL-5896) wiederum waren 3 von 7 Zelllinien hypermethyliert. Eine deutlich erhöhte *ABCB4* Promotor Methylierung zeigte sich außerdem in 3 Brustkrebszelllinien (MCF-7, ZR-75-1 und MDA-MB-231), in 3 Kopf/Hals-Karzinomzelllinien (M-SCC-14C, UM-SCC-22B und RPMI-2650), der Hautkrebszelllinie C8161 und in HeLa-Zellen. Insgesamt wurden 26 Krebszelllinien untersucht, von denen 16 (62%) einen hypermethylierten *ABCB4* Promotor aufwiesen.

In humanen Fibroblasten (HF-55) konnte keine DNA-Methylierung des *ABCB4* Promotors festgestellt werden (Abbildung 30 C).



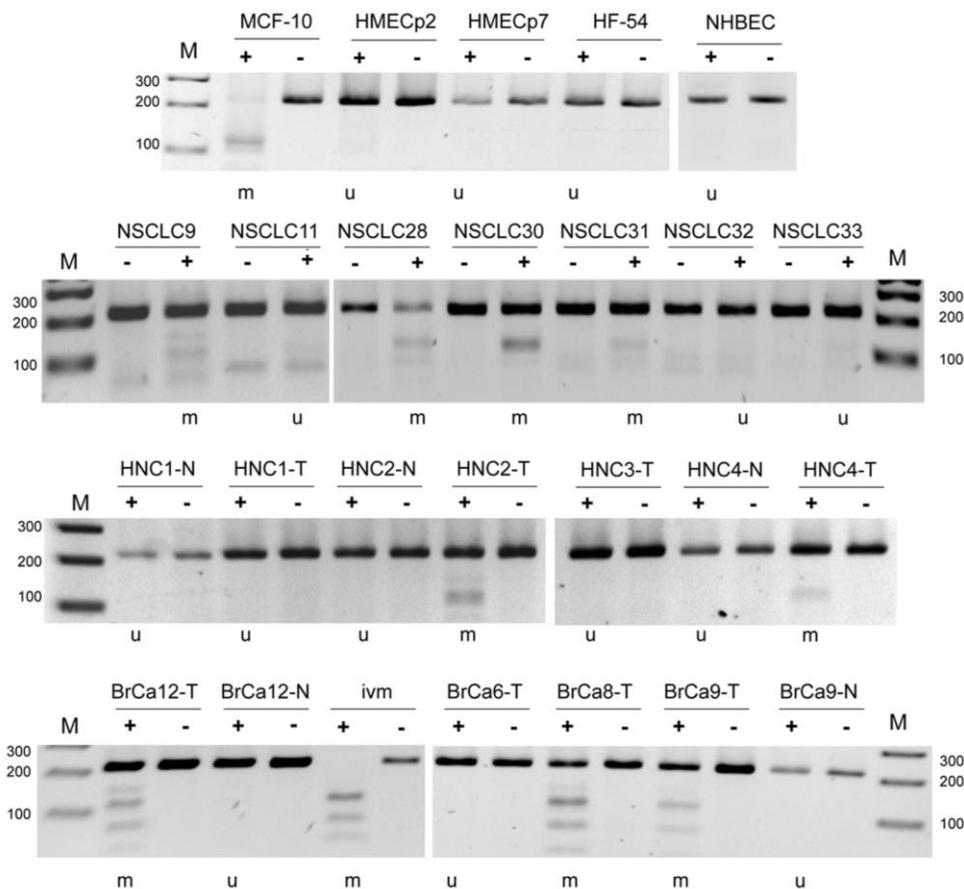
**Abbildung 30: Epigenetische Inaktivierung des ABCB4-Promotors.** **A**, quantitative Expressionsanalyse von ABCB4 in verschiedenen normalen Geweben (Kiehl et al, 2014). **B**, Renilla Luciferase-Assay eines ABCB4-Promotor-Konstrukts, Kontrollkonstrukt (pRL\_Null) und in vitro methyliertes ABCB4-Promotor-Konstrukt (pRL\_ABCB4, ivm) in HEK-293 Zellen. **C**, Pyrosequenzierung des ABCB4-Promotors von verschiedenen Zelllinien.

Die CoBRA-Analyse von normalen humanen Bronchialepithelzellen, humanen Mammaepithelzellen und humanen Fibroblasten (HF-54) (Abbildung 31) zeigte ebenfalls jeweils eine unmethylierte ABCB4 Promotor-Region.

### 3.7.2 DNA-Methylierungsanalyse des ABCB4 Promotors in primären Tumoren

Es wurde zusätzlich der Methylierungsstatus verschiedener Primärtumore untersucht: Insgesamt wurden 46 nicht kleinzellige Lungenkarzinome, 27 Brusttumore, 10 Hals/ Kopf-Tumore mit zahlreichen entsprechenden Kontrollproben analysiert. Bei den nicht kleinzellige Lungenkarzinomen zeigten 18 von 46 Proben eine partielle DNA-Methylierung des ABCB4 Promotors (Ausschnitt in Abbildung 31). Von den untersuchten Hals/Kopf-Tumoren zeigten 2 von 10 Proben eine partielle Methylierung des ABCB4-Promotors (Ausschnitt in Abbildung 31). 11 von 27 untersuchten Brustkarzinomen wiesen ebenfalls einen teilweise methylierten ABCB4-Promotor auf (Ausschnitt in Abbildung 31). Die zugehörigen 20 normalen Brustgewebe waren jedoch alle unmethyliert, sodass

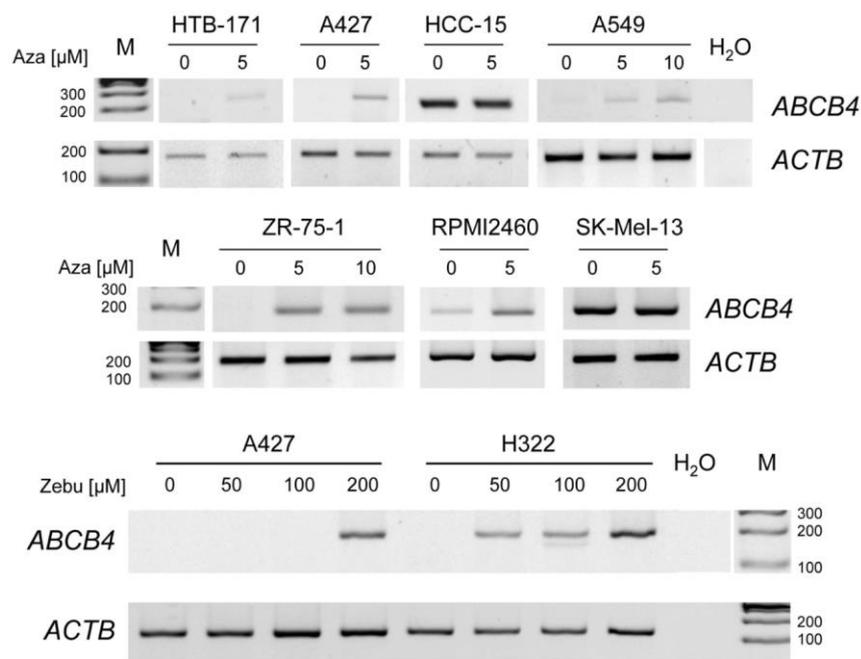
für Brust-Tumore eine signifikante Tumor-spezifische ( $p = 0.002$ ) DNA-Methylierung des *ABCB4* Promotors festzustellen war.



**Abbildung 31: Methylierungsanalyse des *ABCB4* Promotors in primären Tumoren.** CoBRA Analyse von normalen humanen Bronchialepithelzellen (NHBEC), humane Mammaepithelzellen (HMEC, Passage 2-7) und normalen humanen Fibroblasten (HF-54) und primäre nicht kleinzellige Lungenkrebszellen (NSCLC), Hals/Kopf Krebs (HNC) und Brust-Krebs (BrCa). TaqI-Verdau (+), Mock-Verdau (-), T= Tumor, N= passendes Normalgewebe, ivm = in vitro methylierte Positivkontrolle (Kiehl et al, 2014).

### 3.7.3 Korrelationsanalyse von Inhibition der DNA-Methylierung und Steigerung der Genexpression von *ABCB4*

Die Lungenkrebszelllinien A427, A549, H322, HCC-15, HTB171 und H1299, die Brustkrebszelllinie ZR-75-1, die Hals/Kopf Krebszelllinie RPMI-2650 und die Hautkrebszelllinie SK-Mel-13 wurden mit 5-Aza-2'-Desoxycytidin und Zebularin behandelt und anschließend wurde das *ABCB4* Expressionslevel bestimmt (Abbildung 32). In A427, A549, H322, HTB-171, ZR-75-1 und H1299 Zellen liegt der *ABCB4* Promotor hypermethyliert vor und es ist kein endogenes *ABCB4* mRNA-Expressionslevel festzustellen. Eine Behandlung dieser Zelllinien mit 5  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M 5-Aza-2'dC oder 200 mM Zebularin führt einer Reexpression der *ABCB4* Genaktivität auf RNA Level (Abbildung 32). Ähnliche Resultate wurden auch mit RPMI-2650 Zellen erzielt, welche einen partiell methylierten *ABCB4* Promotor aufwiesen und deren *ABCB4* Expression nach Aza Behandlung anstieg. HCC-15 und SK-Mel-13 liegen mit einem unmethylierten *ABCB4* Promotoren vor und zeigen auch keinen Anstieg der Genexpression nach Behandlung mit 5  $\mu$ M 5-Aza-2'dC.



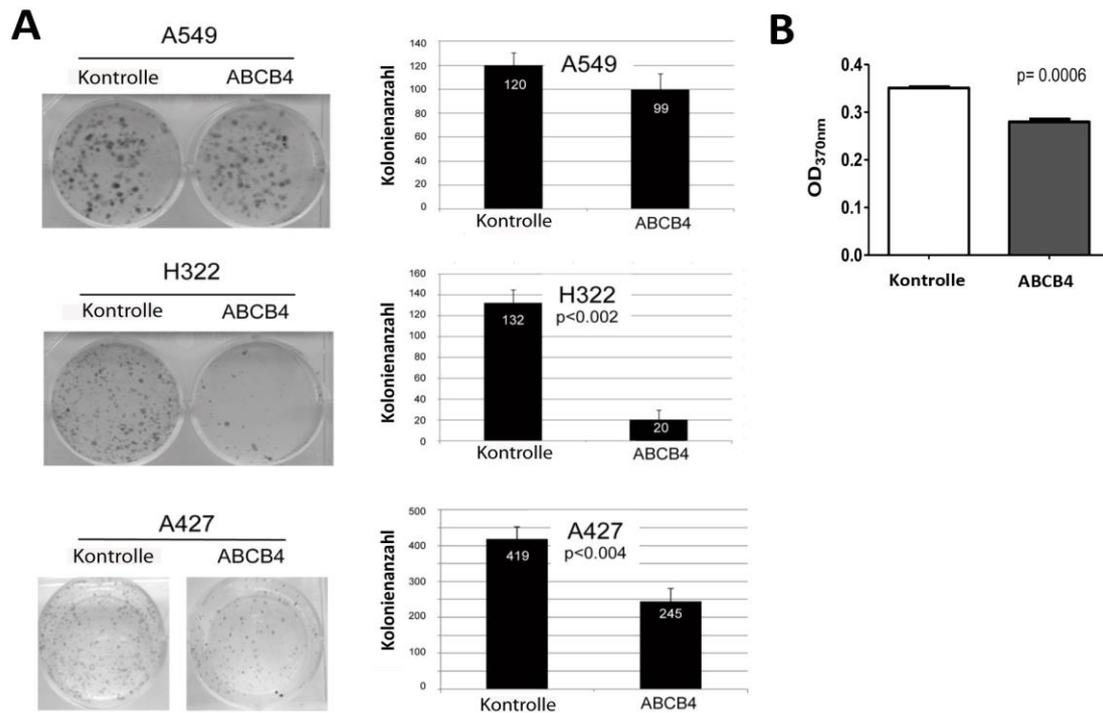
**Abbildung 32: ABCB4 Expressionsanalyse von verschiedenen Zelllinien.** Semiquantitative Expressionsanalyse von *ABCB4* nach 5-Aza-2'dC (Aza) bzw. Zebularin (Zebu) Behandlung (jeweils 4 Tage) von verschiedenen Lungenkrebszelllinien (A427, A549, H322, HCC-15, HTB-171), Brustkrebszelllinie (ZR-75-1), Hals/ Kopf- Krebszelllinie (RPMI-2650) und Melanomzelllinie (SK-Mel-13) (Kiehl et al, 2014).

### 3.7.4 *ABCB4* Expression reduziert die Fähigkeit zur Kolonieformation in Lungenkrebszelllinien

Mittels Kolonie Formations- und Proliferationsassay wurde die Fähigkeit von *ABCB4* getestet die Tumorformation zu unterdrücken. Zu diesem Zweck wurden A427, A549 und H322-Lungenkrebszelllinien mit einem pEGFP-*ABCB4*-Überexpressionsvektor bzw. mit einem Kontrollkonstrukt (pEGFP) transfiziert und anschließend einer 3 wöchigen G418 Selektion unterzogen. G418-resistente Zellkolonien wurden anschließend mit Giemsa gefärbt und repräsentative Bilder sind in Abbildung 33 dargestellt.

In allen 3 Krebszelllinien mit methyliertem *ABCB4* Promotor führte die ektopische Expression von *ABCB4* zu einer Reduktion der Kolonienanzahl. Für H322 und A427 Zellen war der wachstumssuppressive Effekt signifikant ( $p < 0.002$  (H322) bzw.  $p < 0.004$  (A427)).

Zusätzlich wurde die Proliferation von A549 Zellen signifikant reduziert ( $p < 0.0006$ ). Zusammengefasst deuten diese Daten darauf hin, dass *ABCB4* eine tumorsuppressive Funktion in humanen Lungenkrebszellen aufweist.



**Abbildung 33: Überexpression von ABCB4 reduziert die Fähigkeit zur Kolonieformation in Lungenkrebszelllinien.** A, Verschiedene Lungenkrebszelllinien (A549, H322, A427) wurden mit ABCB4-EGFP Expressionsvektoren transfiziert und 4 Wochen lang unter G418 Selektion kultiviert. Anschließend wurde die Zellen mit Giemsa gefärbt und die Kolonienanzahl bestimmt. Die gemittelte Koloniezahl von 3 biologischen Replikaten ist innerhalb des Balkendiagramms angegeben. B, Proliferationsassay von A549-Zellen unter Messung der Inkorporation von BrdU-Nukleotiden (Kiehl et al, 2014).

### 3.7.5 Epigenetische Inaktivierung von *Abcb4* in Maustumoren

Es wurden ebenfalls umfassende Analysen des Methylierungsstatus und der korrelierenden Expression des murinen *Abcb4* Gens in Maustumoren durchgeführt (Abbildung 34 A, B). Dazu wurde die *Abcb4* Promotor-Methylierung von normalen Mausgeweben (Milz, Niere, Lunge und Leber) und Maus-Zelllinien (Lewis lung cancer 1 (LLC1), NIH3T3, Teratomzelllinie F9 and Ltk<sup>-</sup>-Zellen untersucht. Alle untersuchten normalen Mausgeweben wiesen einen unmethylierten *Abcb4* Promotor auf, im Gegensatz dazu konnte jedoch in 3 Zelllinien (LLC1, NIH3T3 and Ltk<sup>-</sup>) eine Methylierung des *Abcb4* Promotors detektiert werden (Abbildung 34 A). Zusätzlich wurde die Expression von *Abcb4* mittels semi-quantitativer RT-PCR analysiert: In normalen Geweben konnte ein positives Expressionssignal festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigten die Zelllinien LLC1 and Ltk<sup>-</sup> keine *Abcb4* Expression (Abbildung 34 B). Die Daten deuten darauf hin, dass eine epigenetische Repression von *Abcb4* auch in der Pathogenese von Maustumoren auftritt.



## 4. Diskussion

### 4.1 Analyse von lungenkrebspezifischen DNA-Methylierungsmustern

Im Rahmen dieser Arbeit wurde genomische DNA aus Lungenkrebszelllinien (A427, A549, H322) und normalen Bronchialepithelzellen (NHBE) isoliert. Unter Verwendung von Natriumbisulfit wurden anschließend unmethylierte Cytosine in einem CpG-Kontext zu Uracil deaminiert. Methylierte Cytosine bleiben bei dieser Reaktion als Cytosine erhalten. Diese Änderungen in der DNA-Sequenz gestatten eine Unterscheidung von methylierten bzw. unmethylierten Cytosinen. Die Sequenzanalyse kann mit einer der gegenwärtigen Hochdurchsatz Sequenzanalysemethoden (Microarray, RRBS, BS-Seq) durchgeführt werden. Die dabei gewonnenen Methylierungsprofile liefern Informationen zu Methylierungsniveaus von einzelnen CpGs in einem genomweiten Maßstab.

Für die Methylierungsanalyse wurde in der vorliegenden Arbeit der 450k Array von *Illumina* verwendet (Roessler et al, 2012). Diese Plattform liefert DNA-Methylierungsdaten von 480.000 CpGs von denen mehr als 300.000 Sonden mit CpG-Insel-Regionen assoziiert sind. Knapp zwei Drittel der CpG-Insel-assoziierten Sonden liegen in intragenischen CpG-Inseln und das restliche Drittel in promotorassoziierten CpG-Inseln.

Die CpG Insel Definition des *Illumina 450k Arrays* erfolgte nach den Kriterien von Takai und Jones, 2002 (Takai & Jones, 2002) und umfasst DNA-Sequenzen, welche länger als 500 bp sind, einen GC-Gehalt von mehr als 55% besitzen und eine Ratio von 0,65 im Bezug auf die Anzahl von gemessenen zu erwarteter CpG-Dinukleotiden ausweisen. Auf Grundlage dieser Filterkriterien ergeben sich ca. 27800 CpG-Inseln für das humane Genom von denen 26658 CpG-Inseln (96%) auf dem *Illumina 450k Arrays* vertreten sind (Bibikova et al, 2011). Nach der beschriebenen CpG-Insel-Definition des Arrays weisen ca. 60% der humanen RefSeq Gene eine oder mehrere CpG-Inseln auf. Nahezu alle *housekeeping* Gene, aber auch ein Teil der Gewebe- und entwicklungspezifisch exprimierten Gene des menschlichen Genoms sind mit einer Promotor CpG-Insel assoziiert (Larsen et al, 1992; Zhu et al, 2008).

Die genomweiten DNA-Methylierungsmuster in Säuger-Zellpopulationen sind typischerweise durch eine bimodale Verteilung der DNA-Methylierung an CpG-Dinukleotiden gekennzeichnet (Abbildung 1 A-C). Dies äußert sich im Auftreten von sehr stark methylierten (>80% DNA-Methylierung) bzw. unmethylierten CpGs (<20% DNA-Methylierung). Dies trifft für Lungenkrebszelllinien aber auch für normale Bronchialepithelzellen (NHBE) zu (Abbildung 1).

Das Genom weist generell eine geringe Dichte an CpG-Dinukleotiden auf, sodass stark methylierte CpG-arme Regionen den überwiegenden Teil des Genoms repräsentieren und als Ergebnis einer erhöhten Anfälligkeit von methylierten Cytosin-Basen zu Thymin deaminiert zu werden angesehen werden (Han et al, 2008). CpG-Methylierungen innerhalb von Exonbereichen des Genkörpers können, aufgrund dieser Anfälligkeit von methylierten Cytosinen zu Thymin-Basen mutiert zu werden, in somatischen Zellen und in der Keimbahn zur Krebsentstehung bzw. zur Entstehung anderer Krankheiten beitragen (Rideout et al, 1990). Unmethylierte CpGs, wie sie in CpG-Inselbereichen auftreten, sind von diesem Prozess nicht betroffen, sodass es im Laufe der Evolution in diesen Regionen zu keiner Reduktion der CpG-Dichte kam (Bird et al, 1985). Diese Befunde werden durch Untersuchungen von Invertebraten (*Caenorhabditis elegans* (Chen et al, 2014), *Saccharomyces cerevisiae* (Proffitt et al, 1984)) ohne CpG-Methylierungsmechanismen unterstützt, bei denen keine reduzierte CpG-Dichte festgestellt werden konnte (Deaton & Bird, 2011).

Unmethylierte CpGs (< 20% Methylierung) konnten mit Promotor-assoziierten CpG-reichen Regionen (CpG-Inseln) in Verbindung gebracht werden (Abbildung 2 B). CpGs mit hohem Methylierungsgrad wiederum treten in CpG-armen Regionen auf (Abbildung 2B, C). Dieses Phänomen ist bereits in zahlreichen früheren Studien beschrieben worden (Cocozza et al, 2011; Jones, 2012).

Die Sonden des *Illumina* 450k Arrays decken darüber hinaus auch die Promotorbereiche von Genen ohne Promotor-CpG-Insel (40%) ab, jedoch mit nur ca. 4% der Sonden des Arrays. Die nicht-CpG-Insel Promotoren waren in den untersuchten Lungenkrebszelllinien, aber auch in normalen Bronchialepithelzellen (NHBE) stark methyliert (Abbildung 2C). Gene, die keine CpG-Insel assoziierten Genpromotoren aufweisen, sind meist mit der Regulation von Genen verbunden, die gewebsspezifisch exprimiert werden (Takai & Jones, 2002).

In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass CpG-arme Promotoren in somatischen Zellen präferentiell hypermethyliert vorliegen, dies aber nicht mit einer Beeinträchtigung ihrer Aktivität verbunden ist (Weber et al, 2007). Anhand verschiedener Beispiele (*LAMB3*, *RUNX3*) wurden an anderer Stelle jedoch auch Belege dafür gefunden, dass bei Genen mit geringer CpG-Dichte in ihren Promotorregionen, die DNA-Methylierung in diesen Regionen auch mit einer Reduktion der Genexpression verbunden ist (Han et al, 2011). Eine Überlegung für zukünftige Untersuchungsansätze wäre die gewonnenen Methylierungsdaten von den analysierten Lungenkrebszelllinien (A427, A549, H322) und Bronchialepithelzellen mit genomweiten Expressionsprofilen zu kombinieren. Dadurch ließen sich Aussagen über die Konsequenzen der Ausbildung krebsspezifischer Methylierungsmuster sowohl bei Genen, deren Promotorregion mit einer CpG-Insel assoziiert ist, als auch bei nicht-CpG-Insel-Promotor Genen, treffen.

Für eine detaillierte Analyse der Promotor-Methylierung wurde dieser Bereich in die Regionen TSS1500, TSS200, 5'UTR und 1stes Exon aufgeschlüsselt. In den Regionen TSS200, 5'UTR und 1stes Exon konnten für die Lungenkrebszelllinien und die normalen Bronchialepithelzellen generell die niedrigen Methylierungsniveaus in diesem Bereich bestätigt werden (Vgl. Abbildung 2B und Abbildung 8). Die TSS200-Region, d.h. der Bereich 200 bp *upstream* einer Transkriptionsstartstelle (TSS) bis zum Transkriptionsstart war sowohl in den Krebszelllinien als auch in normalen Bronchialepithelzellen am niedrigsten methyliert (Abbildung 8). Erstaunlicherweise zeigte sich jedoch für den 5'UTR Bereich ein signifikanter Anstieg der mittleren DNA-Methylierung im 5'UTR im Vergleich zur TSS200-Region bzw. dem 1sten Exon (Abbildung 8). Darüber hinaus zeigte sich jedoch auch eine stärkere Streuung der 5'UTR-Methylierungsdaten im Vergleich zur TSS200- und 1st Exon-Gruppe. Dieser Effekt konnte sowohl bei Lungenkrebs- als auch bei NHBE-Zellen beobachtet werden. In einer früheren Studie bei der die Methylierungsprofile verschiedener somatischer Gewebe nach denselben Analysegruppen aufgeschlüsselt wurden, konnte dieser Effekt ebenfalls beobachtet werden. In dieser Studie wurden die Methylierungsdaten von TSS200, 5'UTR und 1stem Exon zusätzlich in 10 Quantile aufgegliedert: Dabei zeigte sich bei den 5'UTR-Daten, dass die meisten CpGs in dieser Region unmethyliert vorliegen (<10% Methylierung). Ein Teil der Methylierungsdaten weist jedoch ein besonders hohes Methylierungsniveau auf (>80% Methylierung), wodurch die starke Streuung innerhalb dieser Gruppe erklärt wird (Lokk et al, 2014). Das 5'UTR scheint tendenziell heterogener im Bezug auf das auftretende Methylierungsniveau zu sein (Abbildung 8). Dies könnte eventuell durch Unterschiede im GC-Gehalt, in der Länge oder der Lage dieser Region relativ zu einer CpG-Insel bedingt sein. Die Annotation der Sonden des *Illumina* 450k Arrays liefert nur wenige Kategorien von Gen-assoziierten Positionen. Für eine detaillierte Analyse wurden die Transkriptionsstart-assoziierten Sonden bei Price et al., 2013 in weitere Gruppen untergliedert (5'UTR und 1stes Exon, 5'UTR und intragenisches Exon, 5'UTR und Intronsequenzen) (Price et al,

2013). Eine Analyse unter Verwendung dieser Kategorien könnte ein differenziertes Bild der Promotor-assoziierten DNA-Methylierung im Bezug auf 5'UTR und 1stes Exon liefern.

Die TSS1500-Region zwischen -1500 bp und dem Transkriptionsstart zeigte im Vergleich von H322 Lungenkrebszellen zu NBHEC-Zellen die stärksten Unterschiede bei der mittleren Methylierung und der Streuung der Datenpunkte. Die hohe Variabilität der Methylierung in dieser Region wurde bereits in früheren Studien beschrieben und in diesem Zusammenhang wurde auch vermutet, dass diese Regionen als potentielle Kandidaten für differentiell methylierte Regionen angesehen werden könnten (Wang et al, 2012a). Die DNA-Methylierung innerhalb des restlichen Genkörpers und des 3'UTR war bei allen untersuchten Proben sehr hoch (Abbildung 8). Der Übergang vom Genkörper zum 3'UTR war darüber hinaus mit einem weiteren Anstieg der Methylierung verbunden (Abbildung 8). Es gibt Indizien dafür, dass die Transkriptionselongation durch DNA-Methylierung an beiden Enden eines Gens reguliert wird. Im Rahmen einer Studie von Choi et al, 2009 wurde vermutet, dass durch epigenetische Inhibition der RNA Polymerase II-Elongation die Aufnahme von konstitutiven Exons während des Splicing-Prozesses erleichtert zu werden scheint. Besonders die DNA-Methylierung im letzten kodierenden Exon scheint dieses vor einem Skipping-Event zu bewahren (Choi et al, 2009).

Bei der Analyse des Methylierungsniveaus von CpG-Inseln, welche innerhalb des Genkörpers liegen, konnte in den untersuchten Lungenkrebszelllinien, aber auch in NHBE-Zellen eine starke Methylierung festgestellt werden (Abbildung 2C, Abbildung 10 B, C). Die meisten Genkörper-assoziierten DNA-Sequenzen sind CpG-arm, stark methyliert und enthalten unterschiedlichste repetitive und transponierbare Elemente (Hahn et al, 2011). Die Funktion von intragenischen CpG-Inseln, aber auch von CpG-Inseln in Regionen ohne kodierende Bereiche (*gene deserts*) wurde noch nicht ausgiebig untersucht. Ursprünglich wurde angenommen, dass die Funktion der CpG-Insel Methylierung außerhalb eines Promotorkontextes primär der Stilllegung von repetitiven DNA Elementen (wie retrovirale Sequenzen, ALU oder LINE1 Elemente, etc.) dient (Yoder et al, 1997). Auf Grundlage von Beobachtungen, dass H3K36 Trimethylierung (H3K36me3) mit der Transkriptionselongation in Verbindung steht und dass H3K36me3 wiederum an der Rekrutierung von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) involviert ist, wurde die Hypothese aufgestellt, dass der Prozess der Transkriptionselongation an sich einen stimulierenden Effekt auf die DNA-Methylierung hat (Hahn et al, 2011).

Innerhalb von CpG-Inselnsequenzen, die mit Genkörperbereichen und 3'UTR zusammenfallen, lassen sich beim Vergleich von NHBE- und H322-Zellen eine krebspezifische Zunahme der DNA-Methylierung feststellen. Dies deutet darauf hin, dass intragenische CpG-Inseln in normalen Zellen nicht *per se* stark methyliert vorkommen, sondern dass dies erst im Laufe der Tumorgenese erfolgt. Dies lässt sich ebenfalls mit den Befunden, dass intragenische CpG-Inseln ein präferentielles Ziel für *de novo* Methylierung in Krebszellen darstellen, in Einklang bringen (Jones, 2012; Nguyen et al, 2001). In einer wiederführenden Analyse müsste festgestellt werden welche Gene intragenische hypermethylierte CpG-Inseln aufweisen und mit welchen GO-Terms diese assoziiert sind. Zur Bewertung der Konsequenzen, die sich aus der Hypermethylierung ergeben wäre eine Analyse, ob die hypermethylierten CpG in Exon- oder Intronsequenzen liegen, sinnvoll. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Exonsequenzen höher als Intronsequenzen methyliert sind und dass es an Exon-Intron-Grenzen zu einem Wechsel des Methylierungsgrades kommt (Laurent et al, 2010). Diese Befunde wurden als Hinweise für eine Rolle der intragenischen DNA-Methylierung bei der Regulation des Spleißings gedeutet (Laurent et al, 2010). Zusätzlich konnte eine Verbindung zwischen der methylierungssensitiven Bindung von CTCF in Genkörperbereichen und dem Prozess des alternativen Splicings gezogen werden (Shukla et al, 2011).

Die Verbindung aus DNA-Methylierung und Genexpression ist komplex und nicht generell mit einem repressiven Effekt verbunden (Wagner et al, 2014). Der regulatorische Einfluss einer methylierten DNA-Sequenz wird durch dessen Position relativ zu einer Transkriptionseinheit bestimmt. Die DNA-Methylierung im Bereich des Transkriptionsstarts inhibiert die Initiation der Transkription. Paradoxerweise korreliert jedoch die DNA-Methylierung im Genkörper positiv mit der Genexpression (Jones, 2012). Yang et al., 2014 konnte zeigen, dass die Behandlung von HCT-116 Kolorektalkarzinomzellen mit 5-Aza-2'dC nicht nur mit einer generellen Reaktivierung der Genaktivität verbunden war, sondern ebenfalls mit einer Abnahme der Expression bestimmter Gene. Diese 5-Aza-2'dC-bedingte Repression konnte einer Demethylierung von Genkörpersequenzen zugeschrieben werden. Die Wiederherstellung der ursprünglichen Genaktivität war mit einer Remethylierung dieser Bereiche durch DNMT3B verbunden (Yang et al, 2014). Darüber hinaus hat die Methylierung des Genkörpers einen stimulierenden Effekt auf die Transkriptionselongation (Yang et al, 2014). Intragenische, hypermethylierte CpG-Inseln enthalten, wie die promotorassoziierten CpG-Inseln, repressive Histon-Modifikationen (wie H3K9m3) und werden von Methyl CpG Binding Protein 2 (MECP2) gebunden. Diese Faktoren sind jedoch nur mit der Transkriptionsrepression verbunden, wenn sie an Transkriptionsstartsequenzen vorkommen (Jones, 2012).

Beim Vergleich der DNA Methylierungsmuster, die mit dem *Illumina* 450k Array von Lungenkrebszelllinien zu normalen Bronchialepithelzellen gewonnen wurden, fällt auf, dass CpG-Insel Bereiche in normalen Bronchialepithelzellen generell niedriger methyliert sind als in Krebszelllinien. Dies wird vor allem durch die niedrigere DNA-Methylierung von NHBE-Zellen in intragenischen, nicht-Transkriptionsstart-assoziierten CpG-Inseln bedingt (Abbildung 2C, Abbildung 10 B). Intragenische CpG-Inseln konnten bereits in früheren Studien als präferentielles Ziel für die *de novo* Methylierung in Krebszellen identifiziert werden (Jones, 2012; Nguyen et al, 2001). Durch Erstellung von Expressionsprofilen der verwendeten Zelllinien könnte in einem zukünftigen Projekt eine funktionelle Charakterisierung der Konsequenzen einer krebspezifischen Hypermethylierung in intragenische CpG-Inseln erfolgen.

Erstaunlicherweise zeigen sich zwischen den untersuchten Lungenkrebszelllinien starke Unterschiede im Bezug auf die mittlere Methylierung (Median) und der Streuung der Daten. Dies gilt bei der Betrachtung des kompletten Spektrums an Methylierungsinformationen (Abbildung 9A), aber auch wenn nur die DNA-Methylierung in bzw. außerhalb von CpG-Insel Bereichen berücksichtigt wird (Abbildung 2, Abbildung 9B-D). Bei den untersuchten Lungenkrebszelllinien handelt es sich um nicht-kleinzellige Lungenkrebs- (NSCLC)- Zelllinien. Nicht-kleinzellige Lungentumore sind weltweit die Ursache für die meisten Krebs-bedingten Todesfälle (Walter et al, 2012). Zu dieser Gruppe gehören verschiedene histologische Subtypen, die unter anderem Adenokarzinome (AD), Plattenepithelkarzinome (PEK) und großzellige Karzinome umfassen. Es gibt Befunde, dass die Histologie der Krebszellen einen Einfluss auf das Ansprechverhalten verschiedener Chemotherapeutika (Bevacizumab, Erlotinib und Pemetrexed) und damit auf die Therapiegestaltung bzw. den Erfolg der Krebstherapie haben (Walter et al, 2012). Im Rahmen einer früheren Studie konnten spezifische Genexpressionsmuster von Krebszellen identifiziert werden, welche *in vitro* mit einer Sensitivität bzw. Resistenz gegen den Tyrosinkinase-Hemmer Erlotinib verbunden war. Auf Grundlage dieser Genexpressionsprofile war eine Klassifizierung von NSCLC-Zelllinien in *epithelial-like* oder *mesenchymal-like* möglich (Yauch et al, 2005). In vielen Tumortypen ist der Übergang von einem epithelialen zu einem mesenchymalen Typ mit einer Zunahme der Aggressivität der Krebserkrankung, aufgrund erhöhter Motilität, Invasivität und Resistenz gegen Chemotherapeutika, verbunden (Sequist et al, 2011; Suda et al, 2011) (Hanahan & Weinberg, 2011; Kalluri & Weinberg, 2009; Mani et al, 2008; Singh & Settleman, 2010). Die Höhe der mittleren Methylierung der

verschiedenen NSCLC-Zelllinien wurde mit phänotypischen Gesichtspunkten, der Zugehörigkeit zum epithelialen oder mesenchymalen Typ, und dem Tumorstadium korreliert (Daten nicht gezeigt). Es konnte dabei jedoch keine Korrelation festgestellt werden. Exemplarisch wurde darüber hinaus für die Lungenkrebszelllinien A427, A549, H322 und H358 die Expression der DNA-Methyltransferasen DNMT1, DNMT3A und DNMT3B bestimmt. Auf Grundlage dieser Daten konnte festgestellt werden, dass mit steigendem Expressionsniveau von *DNMT1*, *DNMT3A* bzw. *DNMT3B* ebenfalls die Höhe der mittleren Methylierung der Lungenkrebszelllinie zunahm (Abbildung 42). Zur Validierung dieser Korrelation wäre in weiterführenden Experimenten eine Ausweitung dieser Analyse auf andere NSCLC-Zelllinien zu empfehlen.

Repetitive Sequenzen, wie sie an den Zentromeren vorkommen, weisen einen hohen Methylierungsgrad auf. Die Hypermethylierung dieser Sequenzen liefert einen wichtigen Beitrag für die Stabilität der Chromosomen (z.B. bei der Trennung der Chromosomen während der Mitose). Durch DNA-Methylierung wird auch die Expression von transponierbaren Elementen reprimiert und damit ebenfalls ein Beitrag zur genomischen Stabilität geleistet (Jones, 2012). Die krebspezifischen Veränderungen des Methyloms ziehen neben Hypermethylierungen auch Hypomethylierungen von verschiedenen Bereichen des Genoms nach sich. Der Großteil des Genoms ist dabei einer Reduktion des Methylierungsgrades (Hypomethylierung) ausgesetzt, die besonders an repetitiven DNA Sequenzen, wie heterochromatischen DNA *repeats*, Retrotransposons und endogenen retroviralen Elementen auftritt (Dammann et al, 2010). Hypermethylierungen konnten dagegen überwiegend nur in CpG-Insel Regionen beobachtet werden (Ehrlich, 2002).

Auf Grundlage der Methylierungsdaten des *Illumina* 450k Arrays konnten für jede Analysegruppe ein höheres Methylierungslevel in den Lungenkrebszelllinien im Vergleich zu den NHBE-Zellen festgestellt werden (Abbildung 1, Abbildung 2, Abbildung 8, Abbildung 11). Krebspezifische Hypomethylierungen konnten nicht festgestellt werden. Dies liegt höchstwahrscheinlich an den Limitierungen des *Illumina* 450k Assays durch fehlende Sonden in repetitiven Sequenzen. Auf dem *Illumina* 450k Array sind 64% der Sonden mit CpG-Insel-Bereichen assoziiert, jedoch sind von den ca. 29,8 Mio. CpGs des humanen Genoms nur 1,9 Mio. CpGs in CpG-Inseln lokalisiert (Rollins et al, 2006). Die meisten CpGs sind in Transposonelementen lokalisiert, diese werden jedoch auf dem *Illumina* 450k Array nur teilweise berücksichtigt (5% der Sonden liefern spezifische Informationen zur Methylierung in repetitiven Bereichen) bzw. stellen potentielle Fehlerquellen durch unspezifische Hybridisierung dar (Price et al, 2013). Durch die starke Überrepräsentation von CpG-Inselbereichen außerhalb von repetitiven Elementen werden die Bereiche in denen typischerweise Hypomethylierungen auftreten von der Analyse ausgenommen. Dies muss auch bei der Betrachtung der relativen Abundanz verschiedener Methylierungsniveaus berücksichtigt werden (Abbildung 1 A-C). Darüber hinaus wurden bereits generelle Array-bedingte Schwachstellen des *Illumina* 450k Arrays beschrieben: Im Hinblick auf das Sonden-Design konnten *Cross-Hybridisierungen* der Sonden mit nicht-Zielsequenzen festgestellt werden (Chen et al, 2013b). Zusätzlich konnten „*batch*“-Effekte, d.h. systematische Fehler, die durch Aufteilung der analysierten Proben auf mehrere Arrays entstehen, als Ursache von Problemen bei nachfolgenden Analysen beobachtet werden (Harper et al, 2013). Für beide Probleme konnten jedoch verschiedene Lösungen entwickelt werden, die diese Fehlerquellen bei der Daten-Analyse ausschließen (Chen et al, 2011; Fortin et al, 2014).

Die Etablierung der genomweiten Methylierungsmuster erfolgt im Anschluss an die Implantierung des Embryos in die Gebärmutter durch die Aktivität von *de novo* DNA-Methyltransferasen (DNMT3A, DNMT3B). CpG-dichte Regionen werden durch einen gegenteilig wirkenden, noch nicht vollständig verstandenen Mechanismus vor einer Methylierung bewahrt (Cedar & Bergman, 2009). Zur Erklärung

wie CpG-Inseln frei von DNA-Methylierung gehalten werden, wurden verschiedene Modelle entwickelt: Ein Modell geht von einem aktiven DNA Demethylierungsmechanismus aus, bei welchem es zu einer spezifischen Entfernung der 5-Methylreste von den Cytosinbasen innerhalb von CpG-Inseln kommt. Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt konnte jedoch in somatischen Geweben noch kein Faktor mit einer entsprechenden Demethylase-Aktivität identifiziert werden (Illingworth & Bird, 2009). Ein weiterer möglicher Mechanismus geht davon aus, dass die Anwesenheit von Transkriptionsfaktoren an CpG-Inselbereichen die Assoziation von DNMTs mit den entsprechenden Sequenzen aus sterischen Gründen verhindert. Am Beispiel des *Aprt* Gens konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass durch die Entfernung von Bindestellen des ubiquitär exprimierten Transkriptionsfaktors Sp1 aus der Promotor CpG-Insel des *Aprt* Gens, die *de novo* Methylierung dieser DNA Sequenzen induziert werden konnte (Illingworth & Bird, 2009). Ein anderes Modell bringt das Erscheinen von DNA-Methylierung an bestimmten Stellen im Genom während der Frühentwicklung des Embryos mit speziellen Histonmodifikationen in Verbindung. Vor allem das Auftreten der Methylierung von Histon H3 an Lysin4 (H3K4 - Mono-, Di- und Trimethylierung) scheint einen Einfluss auf die Verhinderung der Ausprägung von DNA-Methylierung an CpG-Inseln zu haben. Die Methylierung von H3K4 wird durch H3K4 Methyltransferasen katalysiert, welche zur initierenden Form der RNA Polymerase II rekrutiert werden. Die RNA Polymerase II bindet im frühen Embryo überwiegend an CpG-Inseln und nur diese Regionen werden mit H3K4 Methylierung modifiziert. *De novo* DNA-Methylierung wird durch die DNA-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B katalysiert. Die Rekrutierung von DNMT3A und DNMT3B zu ihren Zielsequenzen erfolgt durch DNMT3L, einem Faktor, der wiederum an Histon H3 bindet. Die Bindung von DNMT3L an Nukleosomen wird durch die Methylierung von H3K4 verhindert. Als Konsequenz daraus tritt eine *de novo* Methylierung an CpGs überall im Genom auf, CpG-Inseln werden jedoch ausgespart (Cedar & Bergman, 2009). Generell ist jedoch davon auszugehen, dass mehr als eines der vorgestellten Modelle bei der Entstehung von CpG-Inseln und an der Hypomethylierung dieser Sequenzen, welche normalerweise auch nach der Differenzierung bestehen bleibt, beteiligt sind (Illingworth & Bird, 2009). Diese Modelle liefern darüber hinaus auch Ansätze bei der Untersuchung, wie es zur Entstehung aberranter DNA-Methylierungsmuster in Krebs kommen kann.

## 4.2 Charakteristische Methylierungsmuster von CpG-Insel-assoziierten *shore* Bereichen

Mittels des *Illumina* 450k Arrays wurden auf der Grundlage von Bisulfit-behandelter DNA die DNA-Methylierungsprofile von verschiedenen Lungenkrebszelllinien und von normalen Bronchialepithelzellen erstellt. Darüber hinaus wurde für die Analyse auch auf ein umfangreiches Set an *Illumina* 450k Methylierungsprofilen von nicht-kleinzelligen Lungenkrebszelllinien, die aus der NCBI-GEO-Datenbank stammen, zurückgegriffen. Die Methylierungsprofile der NSCLC-Zelllinien bzw. der normalen Lungenzelllinien wurden von Walter et al, 2012 und die Methylierungsprofile der normalen Lungengewebe von Shi et al., 2014 generiert.

Wie bereits in Abschnitt 3.1.1 beschrieben hat der *Illumina* 450k Array eine gute Abdeckungsquote von CpG-Inseln. Er erlaubt jedoch darüber hinaus auch eine Analyse von Bereichen in geringem Abstand zu CpG-Inseln. 64% der Sonden des *Illumina* 450k Arrays sind mit CpG-Insel-Bereichen assoziiert, wovon wiederum 31% der Sonden innerhalb von CpG-Inseln liegen, 23% der Sonden in *shore*-Bereichen, die bis zu 2 kb außerhalb von CpG-Insel liegen, und 10% der Sonden in *shelf*-

Bereichen, die 2-4 kb außerhalb von CpG-Inseln lokalisiert sind. Die CpG-Insel Bereiche sind einheitlich sehr niedrig methyliert, die *shelf* Bereiche wiederum sind durchgehend sehr hoch methyliert (Abbildung 9B, D). Zwischen den verschiedenen Lungenkrebszelllinien bestehen jedoch starke Unterschiede bei der Streuung der Methylierungswerte (Abbildung 9B, D). Die Methylierung in den CpG-Insel bzw. *shelf*- Bereichen von normalen Lungenzelllinien und normalen Lungengewebe streut weniger stark im Vergleich zu den Krebszelllinien (Abbildung 9B, D).

In einer Studie von Wang et al., 2012 wurden die Methylierungsprofile in Blutproben von verschiedenen Kleinkindern bei der Geburt und der ersten beiden Lebensjahre miteinander verglichen. Es zeigten sich dabei nur geringe Unterschiede in der Variation der DNA-Methylierung zwischen verschiedenen Individuen. Die Unterschiede waren jedoch unter anderem in den *shore/shelf*- Regionen am höchsten (Wang et al, 2012a). Darüber hinaus wurde die DNA-Methylierung bei der Geburt mit der Methylierung nach 2 Jahren verglichen: Dabei zeigte sich, dass die Methylierungsmuster zwischen den beiden Zeitpunkten sehr stabil waren. Jedoch konnten entwicklungsabhängige Unterschiede in der DNA-Methylierung in den *shore*-Bereichen festgestellt werden. Diese Variationen wurden als Resultat von frühen Umwelteinflüssen, wie Stillen, Infektionen und Immunisierungen angesehen, die dynamische epigenetische Veränderungen nach sich ziehen könnten und damit individuell das Risiko für die Entwicklung bestimmter Krankheiten beeinflussen können (Wang et al, 2012a).

Die *shore*-Bereiche sind von niedrigeren CpG-Dichten und höheren mittleren Methylierungsniveaus gegenüber den CpG-Inseln gekennzeichnet (Abbildung 9C, D; Abbildung 10 B, C). Die mittlere Methylierung in den *shore*-Bereichen ist im Vergleich von Krebszelllinien und normalen Lungenzelllinien bzw. Lungengeweben, aber auch zwischen den verschiedenen Lungenkrebszelllinien sehr heterogen (Abbildung 9 D). Dies äußert sich in Unterschieden im Bezug auf das mittlere Methylierungsniveau und der Datenstreuung. Das mittlere Methylierungsniveau ist jedoch in den *shore*-Bereichen in den Lungenkrebszelllinien im Vergleich zu den normalen Lungenzelllinien krebsspezifisch erhöht (Abbildung 11 B). In früheren Studien wurden die CpG-Insel *shore*-Regionen als jene Bereiche identifiziert, in denen präferentiell gewebs- und krebsspezifische differentielle Methylierung auftritt (Irizarry et al, 2009). Darüber hinaus konnte auf Grundlage einer umfassenden DNA-Methylierungskarte von hämatopoetischen Vorläuferzellen gezeigt werden, dass differentielle DNA-Methylierung in CpG-Insel *shores* stärker mit der Genexpression korreliert als die Methylierung in den CpG-Inseln. 70% der differentiel methylierten Regionen, die mit Reprogrammierung assoziiert sind, liegen in CpG-Insel *shores* (Doi et al, 2009; Ji et al, 2010). Der potentielle Einfluss von DNA-Methylierung außerhalb von CpG-Insel-Promotoren auf die Ausprägung humaner Krankheiten wurde lange übersehen, weil der Fokus auf aberranten DNA-Methylierungen innerhalb von CpG-Inseln in Krebs lag (Jones, 2012).

Zur Unterscheidung der beiden *shore*- bzw. *shelf*-Bereiche einer CpG-Insel wird der *shore/shelf*-Bereich, der sich an das Ende einer CpG-Insel mit niedrigerer Chromosomen Koordinate anschließt, als N(*orthern*)-*shore*-Region bzw. N-*shelf*-Region bezeichnet. Auf das Ende der CpG-Insel mit höherer Chromosomen Koordinate wiederum folgt die S(*outhern*)-*shore*-Region bzw. s-*shelf*-Region. Für den N-*shore* Bereich ließ sich generell eine höhere Methylierung relativ zu den S-*shore*-Bereichen feststellen (Abbildung 11). Es kann spekuliert werden, dass Methylierungsprozesse an den Enden von CpG-Inseln nicht symmetrisch erfolgen, sondern in Abhängigkeit von der Transkriptionsrichtung. Die Analyse von Transkriptionsstart-assoziierten bzw. Genkörper-assoziierten CpG-Insel *shore*-Bereichen zeigte sich, dass N-*shore* bzw. S-*shore* Bereiche abhängig von der Transkriptionsorientierung des Gens mit dem sie co-lokalisiert sind, mehr oder weniger methyliert sind (Abbildung 11 C, D, E). Auf dem *Illumina* 450k Array werden Methylierungsinformationen von genomischen Regionen

berücksichtigt die mit 28364 verschiedenen Transkripten assoziiert sind. Mit *shore*-Regionen sind ca. 7300 Plusstrang-Transkripte bzw. 6800 Minusstrang-Transkripten assoziiert. Die Analyse von Plusstrang-assoziierten *shore*-Bereichen zeigt, dass *S-shore* gegenüber *N-shore*-Bereichen stärker methyliert sind (Abbildung 11 B). Bei Minusstrang-assoziierten Genen ergibt sich ein umgekehrtes Bild: *N-shore*-Bereiche sind höher methyliert als *S-shore*-Bereiche. Bei der zusätzlichen Filterung nach Promotor- oder Genkörperbereichen verändert sich die Präferenz, sodass bei Plusstrang-Genen, sowohl im Promotor, als auch im Genkörper eine höhere Methylierung in *N-shore* Bereichen auftritt. Bei Minusstrang-Genen ist die Beziehung wieder umgekehrt (Abbildung 11 D, E). Generell scheint es eine Abhängigkeit von der Transkriptionsrichtung auf den Methylierungsgrad zu geben, jedoch ist die Präferenz abhängig von der genauen Position innerhalb des Gens. Es ist unwahrscheinlich, dass der Effekt durch ein Missverhältnis von Sonden für die entsprechenden Regionen auf dem *Illumina* 450k Array entsteht, da es unabhängig von der jeweiligen Sondenanzahl immer diese inverse Korrelation zwischen den Plus bzw. Minusstranggenen gibt. Ob dieses Phänomen auch zwischen *N-shore* und *S-shore*-Bereichen die mit derselben CpG-Insel assoziiert sind müsste in einer zusätzlichen Analyse geklärt werden. Die funktionellen Konsequenzen die sich aus dieser Kopplung ergeben müssten ebenfalls bestimmt werden, ebenso wie die Mechanismen wie es zur Ausbildung dieses Effektes kommt.

Es gibt darüber hinaus Berichte darüber, dass der Abstand verschiedener CpG-Inseln zueinander die *shore* Methylierung beeinflusst. Es scheint einen „*Crosstalk*“ zwischen benachbarten CpG-Inseln zu geben, sodass Methylierungsänderungen in einer CpG-Insel einen Einfluss auf die Methylierung von CpG-Inseln in der Umgebung zu haben (Grandi et al, 2015). Es konnte gezeigt werden, dass CpG-Inseln einen Einfluss aufeinander ausüben wenn sie in einem Abstand von bis zu ca. 3 kb zueinander lokalisiert sind. Für hypomethylierte CpG-Inseln konnte ein steilerer Anstieg der *shore* Methylierung (*shore slope*) festgestellt werden, wenn eine benachbarte CpG-Insel hypermethyliert vorliegt (Grandi et al, 2015).

Die *shore*-Bereiche die mit Genkörpersequenzen zusammenfallen sind in NHBE-Zellen niedriger methyliert als in Lungenkrebszelllinien (Abbildung 10B, C). Dies gilt auch für *shore*-Bereiche, die in Promotorsequenzen (TSS1500, 5'UTR und 1stes Exon) liegen. Auch bei diesen Bereichen lässt sich ein Anstieg der DNA-Methylierung von H322-Zellen im Vergleich zu NHBE-Zellen feststellen (Abbildung 10B, C). Dies könnte darauf hindeuten, dass Gene deren Promotoren mit CpG-Insel-assoziierten *shore*-Bereichen zusammenfallen ein höheres Risiko dafür besitzen krebsspezifisch hypermethyliert zu werden. Eine solche Situation könnte vor allem in komplexeren Genkonstellationen auftreten in der mehrere CpG-Insel-Promotorbereiche zusammentreffen bzw. die Promotoren einiger Transkripte nur teilweise mit der/den Promotor-CpG-Insel(n) überlappen. Eine ausführliche Analyse von Genen deren Promotorbereiche sich mit CpG-Insel-*shore*-Regionen überschneiden könnte zur Identifizierung interessanter Kandidatengene führen, die krebsspezifisch hypermethyliert werden.

Am Beispiel des *Cav1* Genes wurde der Einfluss der DNA-Methylierung in den *shore*-Bereichen der assoziierten Promotor CpG-Insel in Brustkarzinomen analysiert. Es zeigte sich dabei, dass eine differentielle Methylierung der *shore*-Bereiche ausreicht um einen Einfluss auf die Genexpression zu haben. Durch Demethylierung der *shore* Bereiche konnte die Reexpression des *Cav1*-Gens induziert werden (Grandi et al, 2015). Für die *RASSF1A* Promotor CpG-Insel wurde ebenfalls eine umfangreiche Analyse der DNA-Methylierung innerhalb der CpG-Insel, als auch in der *S-shore* Region in Krebszelllinien und primären Lungentumoren und korrespondierenden Normalgeweben durchgeführt (Abbildung 14B, C; Abbildung 15B, C, D). In verschiedenen Zelllinien war eine komplette krebsspezifische Methylierung der CpG-Insel und der angrenzenden *S-shore* Region zu beobachten (Abbildung 14B). Die Gruppe von Krebszelllinien mit unmethylierter *RASSF1A* Promotor CpG-Insel

zeigten eine erhöhte *shore*-Methylierung (>20% Methylierung) (Abbildung 14C). Der Anstieg der *shore*-Methylierung in verschiedenen Krebszelllinien war ebenfalls mit einer Reduktion der *RASSF1A*-Expression verbunden (Abbildung 14D, Abbildung 17A). Eine inverse Korrelation zwischen differentieller Genexpression und DNA-Methylierung in CpG-Insel *shores* konnte bereits in normalen Geweben in Krebserkrankungen und während der Differenzierung beobachtet werden (Doi et al, 2009; Irizarry et al, 2009; Ji et al, 2010). Bei den untersuchten primären Lungentumoren ließ sich bei 7 von 12 Proben ebenfalls eine krebspezifische Hypermethylierung von mindestens 20% im *S-shore* Bereich feststellen (Abbildung 15B). Bei den meisten Primärtumoren bzw. Normalgeweben zeigte sich jedoch kein Anstieg der Methylierung in den *shore*- bzw. CpG-Insel-Bereichen (21 von 36 analysierte Bereiche in Lungentumorproben von 12 Patienten) (Abbildung 15B-D). In früheren Studien wurden bereits die Hypermethylierungsphänotypen von Krebszelllinien analysiert und anschließend mit den Methylierungsdaten von Primärtumoren verglichen. Dabei konnte in allen untersuchten Fällen eine signifikant erhöhte CpG-Insel Methylierung in Krebszelllinien im Vergleich zu den zugrunde liegenden Primärtumoren festgestellt werden (Smiraglia et al, 2001). Mehr als 57% der Loci, die in Krebszelllinien hypermethyliert vorliegen, waren in 114 verschiedenen Primärtumoren stets unmethyliert. Darüber hinaus waren 70% der Loci, die in Zelllinien hypermethyliert vorlagen, in mindestens einem anderen Krebstyp ebenfalls hypermethyliert. Dies deutet darauf hin, dass der Großteil der CpG-Insel Hypermethylierung in Krebszelllinien eine intrinsische Eigenschaft der Zelllinien ist, die während der Kultivierung und dem Immortalisierungsprozess dieser Zellen auftritt und nicht von dem Tumorgewebe stammt, aus dem sie hervorgegangen sind. Darüber hinaus wurde spekuliert, dass es sich bei einem Teil der zelllinienspezifisch reprimierten Gene um nicht-essentielle Gene bzw. um Gene handeln könnte, die an der terminalen Differenzierung der Zelle beteiligt sind (Smiraglia et al, 2001). Die Repression dieser Gene könnte den Zelllinien *in vitro* ein Wachstumsvorteil bescheren, *in vivo* würde die Repression dieser Gene wahrscheinlich jedoch nicht toleriert werden (Smiraglia et al, 2001).

Methylierte oder unmethylierte Bereiche innerhalb von definierten genomischen Elementen (CpG-Inseln, repetitive Sequenzen, etc.) wurden als relativ homogen im Bezug auf die Höhe ihres DNA-Methylierungsgrades beschrieben (Barrera & Peinado, 2012). Im Gegensatz dazu lassen sich jedoch in Primärtumoren Unterschiede im Methylierungsgrad innerhalb der *RASSF1A* CpG-Insel feststellen: Im TSS-Bereich der *RASSF1A* CpG-Insel treten weniger Fälle von Hypermethylierungen (>20%) auf als im +400 bp Bereich der *RASSF1A* CpG-Insel (Abbildung 15 B-D). Die +400 bp Region liegt am Übergangsbereich zur *N-shore* Region der *RASSF1A* CpG-Insel. Es wurde bereits gemutmaßt, dass Veränderungen in der DNA-Methylierung in den CpG-Insel *shore* Bereichen eventuell die relativ klar definierten Insel/*shore* Grenzen stören könnten (Hansen et al, 2011).

Auf Grundlage der *Illumina* 450k Methylierungsdaten von 69 nicht-kleinzelligen Lungenkrebszelllinien (NSCLC), 6 normalen Lungenkrebszelllinien und 5 normalen Lungengewebeproben wurde die Methylierung des Promotor CpG-Insel Bereiches des *RASSF1A* Gens analysiert. Die NSCLC-Zelllinien wurden anhand ihrer Methylierungsdaten der *RASSF1A* Promotorregion geordnet, wobei Gruppen von NSCLC-Zelllinien mit gemeinsamen Methylierungscharakteristiken identifiziert werden konnten (Abbildung 20 B-G). In normalen Lungenzelllinien treten an den Übergängen zwischen den *shore*-Bereichen und der CpG-Insel Methylierungspeaks auf (vergl. Sonden -162 und 531 relativ zum *RASSF1A*-TSS, Abbildung 20 D), welche bei den Krebszelllinien wiederum deutlich stärker ausgeprägt sind. Bei verschiedenen Zelllinien kommt es darüber hinaus, ausgehend von den *shore*-Bereichen, zu einem Anstieg der DNA-Methylierung im *RASSF1A* Promotor CpG-Insel Bereich. Das Spektrum an *RASSF1A*-Methylierungstypen reicht von intermediären Methylierungsniveaus der *RASSF1A* CpG-Insel (ca. 60%) bis zu einer großen Gruppe (36 von 69 Zelllinien) die eine Hypermethylierung von über 80%

im gesamten *RASSF1A* Promotor CpG-Inselbereich zeigt (Abbildung 20 B-G). Interessanterweise zeigt sich bei einem Großteil der analysierten Zelllinien, dass das 3'-Ende des *ZMYND10*-Gens von einer Hypermethylierung ausgenommen ist (Abbildung 20 F, H, G). Die verschiedenen Methylierungsgruppen könnten als verschiedene Stadien des Hypermethylierungsprozesses des *RASSF1A*-Promotors interpretiert werden. In weiterführenden Studien wäre eine Charakterisierung der Eigenschaften der Grenzbereiche zwischen den *shore*-Bereichen und der *RASSF1A*-CpG-Insel im notwendig. Dadurch könnte geklärt werden warum genau diese Positionen den Ausgangspunkt für die Hypermethylierung darstellen. Dabei wäre ein Vergleich im Bezug auf die auftretenden Kombination von DNA-Bindefaktoren und Histonmodifikationen, die in dem *shore*/ CpG-Insel-Grenzbereich zwischen verschiedenen *RASSF1A*-Methylierungstypen auftreten, notwendig. Interessant zu untersuchen wäre ebenfalls warum das 3'-Ende von *ZMYND10* von dem Hypermethylierungsprozess ausgenommen bleibt, obwohl Genkörperbereiche und 3'-UTR generell einen hohen Methylierungsgrad aufweisen (Abbildung 8). Darüber hinaus wäre auch eine Analyse zum Auftreten von entsprechenden Methylierungsgruppen von verschiedenen Zelllinien an anderen Hypermethylierungshotspots (z.B. *BRCA1*, *PTEN*, *CDKN2D*, etc.) notwendig, um evtl. einen vergleichbaren Effekt dokumentieren zu können und den zugrunde liegenden Mechanismus identifizieren zu können.

Bei frühen Experimenten im DNA-Methylierungsfeld wurde gezeigt, dass sich *de novo* Methylierung von integrierten retroviralen Sequenzen ausgehend, in flankierende genomische Sequenzen ausbreitet (Jahner & Jaenisch, 1985). Es scheint, dass repetitive Elemente wie *Short Interspersed Nuclear Elements* (SINEs) und *Long Interspersed Nuclear Elements* (LINEs) als Ausgangspunkt für *de novo* Methylierung dienen und dass die DNA-Methylierung sich von diesen Modifikation-„Attraktor“-Sequenzen ausdehnen (Jones & Takai, 2001; Magewu & Jones, 1994; Turker, 1999). Die Suche nach repetitiven Elementen im *RASSF1A*-Promotorbereich mit der entsprechenden Suchfunktion des *UCSC Genome Browser* ergab jedoch, dass in diesem Bereich keine repetitiven Sequenzen (*LINE*, *SINE*, *LTR* oder Mikrosatelliten) vorkommen.

Die Ausdehnung von DNA-Methylierung (*spreading*) konnte auch bei anderen Genen beobachtet werden. Ein Beispiel ist das Tumorsuppressorgen *RUNX3*, welches häufig in Magenkrebs durch Promotor-Hypermethylierung inaktiviert vorliegt. Bei der Analyse des Methylierungsstatus von verschiedenen Regionen innerhalb der *RUNX3* Promotor CpG-Insel in Magenkrebs-Zelllinien, primären Magentumoren und normaler Magenschleimhaut wurde festgestellt, wie sich die DNA-Methylierung über die CpG-Insel ausbreitet. Die Promotor Hypermethylierung geht ursprünglich von der 5'-Region der *RUNX3* CpG-Insel aus und breitet sich dann Richtung Transkriptionsstart aus bevor die *RUNX3* mRNA Expression vollständig ausgeschaltet wird (Homma et al, 2006). Im Zusammenhang mit dem Ausbreiten von DNA-Methylierung konnten auch Bereiche identifiziert werden, die diesem Prozess entgegen wirken. Im *FMR1* Gene konnte ein Grenzpunkt identifiziert werden, der einen klaren Unterscheidungspunkt zwischen methylierten und unmethylierten Bereichen markiert. Es wird davon ausgegangen, dass dieser Grenzbereich eine spezifische Chromatin Struktur darstellt, die einen hypermethylierten Bereich im Genom von dem unmethylierten *FMR1* Promotor trennt und diesen vor dem Ausbreiten von DNA-Methylierung bewahrt. Diese Grenze tritt unabhängig von Alter, Geschlecht und Entwicklungsstadium auf. Bei Patienten mit fragilem X Syndrom wiederum fehlt diese Methylierungsgrenze. Als Konsequenz kommt es zu einer Ausbreitung der DNA-Methylierung in den *FMR1* Promotorbereich und einer Inaktivierung des *FMR1*-Gens (Naumann et al, 2009).

Je höher das Expressionslevel eines Gens ist, desto unwahrscheinlicher ist dessen Promotor CpG-Insel Ziel von *de novo* Methylierung. Bestätigt wird dieses Modell unter anderem durch Studien, die zeigen, dass monoallelische Methylierung von CpG-Inseln präferentiell auf dem weniger stark

exprimierten Allel auftritt (Jones, 2012). Auch im *RASSF1*-Gen treten Hypermethylierungen nur bei der *RASSF1A*-Isoform auf. Aberrante Methylierungsmuster, im CpG-Insel Promotorbereich der stärker exprimierten *RASSF1C*-Isoform, wurden bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt keine dokumentiert. Einflussfaktoren die die Hypermethylierung der *RASSF1A*-Isoform auslösen könnten werden an anderer Stelle beschrieben und diskutiert (vergl. Abschnitte 3.6 und 4.6)

Der Prozess der Transkription scheint jedoch dabei nicht das entscheidende Merkmal zu sein, welches den hypomethylierten Zustand der CpG-Inselbereiche aufrechterhält. Es scheint einen alternativen Mechanismus zu geben, der CpG-Inseln vor *de novo* Methylierung schützt (Weber et al, 2007). Das Chromatin im Bereich des TSS von aktiv transkribierten Genen ist durch die Präsenz von H3K4me3 gekennzeichnet. Während des Transformationsprozesses zur Tumorzelle kommt es im TSS-Bereich von Genen, die durch Promotor-Hypermethylierung inaktiviert werden, zu einem Verlust von H3K4me3. Ein Modell der DNA-Methylierung von CpG-Inseln geht davon aus, dass auf die Entfernung der Methylgruppen von H3K3 durch LSD1 (Lysine-specific Demethylase 1) und JmjC Demethylasen die *de novo* Methylierung durch DNMT3A/DNMT3B/DNMT3L folgt (Balasubramanian et al, 2012). Zu einem Verlust an H3K4me3 Signalen kommt es zu Beginn des DNA Replikationsprozesses durch die Histon Demethylase KDM5C/ JARID1C. Es konnte gezeigt werden, dass die enzymatische Aktivität von KDM5C/ JARID1C notwendig für eine fehlerfreie DNA Replikation ist. Durch die Demethylierung von H3K4me3 während der S-Phase durch JARID1C wird die Bildung des Präinitiationskomplexes und die Bindung der Präinitiationsproteine CDC45 und PCNA reguliert, die wiederum wesentliche Rollen an frühen, aktiven Replikationsursprüngen haben und dort an der Prozessierung der DNA Polymerase beteiligt sind. Eine fehlende JARID1C-Enzymaktivität war mit aberranten H3K4me3-Signalen an aktiven Replikationsursprüngen und einer Verzögerung der Replikation verbunden. An späten Replikationsursprüngen konnte keine methylierte Form von H3K4 nachgewiesen werden (Rondinelli et al, 2015). Die Methylierung der DNA in eukaryotischen Zellen erfolgt unmittelbar nach der Replikation und selbst auf den Okazaki-Fragmenten konnte DNA-Methylierung nachgewiesen werden (Araujo et al, 1998). Die Reetablierung von H3K4me3 Signalen erfolgt wiederum während der G2-Phase des Zellzyklus (Black et al, 2012).

In Säugerzellen konnten 10 verschiedene H3K4 Histonmethyltransferasen nachgewiesen werden (SET1A/SET1B, MLL1, MLL2, MLL3, MLL4, PRDM9, SMYD3, ASH1 und Set7/9). SET1A/SET1B sind dabei mutmaßlich die Enzyme, die hauptsächlich an der H3K4 Trimethylierung in Säugern beteiligt sind (Clouaire et al, 2012). Trimethyliertes Histon3 Lysin4 (H3K4me3) tritt normalerweise als enger, spitzer Peak am Genpromotor von Genen auf, die aktiv transkribiert werden. In früheren Studien konnte aber auch gezeigt werden, dass bei einigen Genen ein breiter H3K4me3-Peak mit niedrigerer Methylierungsdichte auftritt, der mit einem hohen Genexpressionsniveau assoziiert ist (Chen et al, 2015). Besonders Gene, welche für die Zellidentität verantwortlich sind und Tumorsuppressorgene zeigten breitere Intervalle an H3K4me3 Modifikationen. Ein Vergleich von Normal- und Tumorzellen zeigte jedoch auch, dass der H3K4me3-Peak bei Tumorsuppressoren in Krebszellen enger wird und dies mit transkriptioneller Repression verbunden ist (Chen et al, 2015).

Es gibt Hinweise darauf, dass es während des Alterns ebenfalls zu einer graduellen Deregelation der Maschinerie kommt, die verantwortlich für die Aufrechterhaltung normaler DNA-Methylierungsmuster ist. Dies wiederum führt zu Abweichungen des normalen epigenetischen Zustandes, ein Prozess der als „epigenetischer Drift“ bezeichnet wird (Hannum et al, 2013; Teschendorff et al, 2013). Die Veränderungen des Methyloms, die während des Alterns auftreten (genomweite Hypomethylierungen und Hypermethylierungen in Promotorbereichen) sind zu einem gewissen Grad vergleichbar mit jenen, die während der Karzinogenese auftreten. Die Hypermethylierungen von Promotorbereichen tritt dabei beim Altern und bei Krebs jeweils

präferentiell bei PRC2-Zielgenen auf (Teschendorff et al, 2013). Lungenkrebspezifisch hypermethylierte CpG-Inseln sind signifikant unter jenen Genen angereichert, welche in embryonalen Stammzellen PRC2-Zielgene darstellen (Tabelle 15). In einer Studie wurde versucht auf Grundlage von DNA-Methylierungslevel das Alter von Zellen von verschiedenen Zelltypen und Geweben zu bestimmen. Es konnte dabei gezeigt werden, dass das „DNA-Methylierungsalters“ einer Zelle mit deren Passagierungsnummer korreliert und dass ein breites Spektrum an Tumorproben einen signifikant beschleunigtes Alter zeigen (von ca. 36 Jahren). Krebszellen, die wiederum nur eine geringe Beschleunigung des Alterns zeigten, waren durch eine hohe Anzahl von somatischen Mutationen gekennzeichnet (Horvath, 2013). Diese Befunde stehen ebenfalls in Einklang mit dem vermehrten Auftreten von aberranten Methylierungen in Krebszelllinien im Vergleich zu primären Tumoren wie es am Beispiel des *RASSF1A*-Promotors festgestellt werden konnte (Abbildung 14 B, C; Abbildung 15 B, C, D).

Bei der Ausbildung von aberranten DNA-Methylierungsmustern könnte man von einem Mechanismus ausgehen, bei dem es im Laufe einer hohen Anzahl an Replikationszyklen (wie sie z.B. in immortalisierten Zelllinien auftreten) zu einer erhöhten Wahrscheinlichkeit von *de novo* Methylierung während eines Demethylierungsereignisses von H3K4 kommt. Der Verlust von H3K4me3 Signalen als Voraussetzung für die *de novo* Methylierung könnte dabei in Bereichen mit niedriger H3K4 Dichte auftreten, wie eventuell die *shore* Bereiche von schwach exprimierten Genen. Diese *shore* Bereiche bestimmter Gene könnten anfälliger für einen solchen Zustand sein und den Ausgangspunkt für *de novo* Methylierung darstellen. In zukünftigen Projekten wäre eine Analyse von H3K4 Methylierungsprofilen an den *shore* Regionen sinnvoll, sodass festgestellt werden könnte, ob es in Krebszellen signifikante Änderungen der H3K4 Methylierung in *shore*-Bereichen im Vergleich zu Normalzellen gibt.

Es ist jedoch auch denkbar, dass es ein Zusammenspiel aus replikations- und transkriptions-assoziierten Prozessen gibt, die eine Reduktion an methyliertem H3K4 nach sich ziehen und dadurch ein passendes Substrat für eine *de novo* Methylierung an Promotorsequenzen schaffen. Dies könnte durch eine direkte Demethylierung oder durch einen indirekten Prozess erfolgen. Ein Beispiel hierfür ist die Co-Lokalisation von H3K4me3 Modifikation und H3 Acetylierung. Das gemeinsame Auftreten deutet auf einen „*Crosstalk*“ zwischen den beiden Modifikationstypen hin, wobei die eine Modifikation die Ausbildung und Aufrechterhaltung der anderen bedingt. In diesem Zusammenhang konnte bereits gezeigt werden, dass in Hefe die H3 Acetylierung die Aufrechterhaltung des H3K4me3-Niveaus durch negative Regulation der Aktivität der H3K4 Demethylase Jdh2 beeinflusst. Die Kinetik der Deacetylierung ist deutlich schneller als diejenige, bei der Demethylierung von H3K4 (Maltby et al, 2012). Die Histon-Deacetylierung und die damit verbundene transkriptionelle Repression erfolgt durch Rekrutierung von Histon Deacetylasen (HDACs) durch Sequenz-spezifische DNA Binde Proteine (Kaluvarachchi Duffy et al, 2012). Eine Verbindung aus transkriptionsassoziierten Prozessen und der epigenetischen Inaktivierung von *RASSF1A* wird in Kapitel 4.6 diskutiert.

### 4.3 Expressionsanalyse von humanen DNMTs und assoziierter Faktoren

Die Hypermethylierung von CpG-Inselbereichen konnte bereits in verschiedenen humanen Tumorentitäten beobachtet werden, ebenso wie eine Deregulation der Expression der verschiedenen humanen DNA-Methyltransferasen (Feinberg, 2007; Jones & Baylin, 2007; Noshio et al, 2009). Die *de novo* Methyltransferasen *DNMT3A* und *DNMT3B* zeigen während der frühen Embryonalentwicklung ein hohes Expressionsniveau (Gao et al, 2011). In den meisten ausdifferenzierten, somatischen Geweben jedoch kommt es zu einer starken Reduktion der *DNMT3A*- bzw. *DNMT3B*-Expression. In verschiedenen humanen Krebsentitäten ist eine Überexpression von *DNMT3B* ein häufig vorkommendes Phänomen (Gao et al, 2011). In einer Studie konnte die epigenetische Inaktivierung von *RASSF1A* in Verbindung mit der Aktivität von *DNMT3B* gebracht werden. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Rekrutierung von DNMT3B an den *RASSF1A*-Promotor mit der Hypermethylierung des *RASSF1A* Promotors und der Repression der Genaktivität in Verbindung steht (Palakurthy et al, 2009). Darüber hinaus konnte auch gezeigt werden, dass die *deltaDNMT3B4* Isoform (*dDNMT3B4*) die hauptsächlich exprimierte *DNMT3B* Variante in nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) ist. Bei einer Expressionsanalyse der verschiedenen *dDNMT3B*-Varianten konnte eine Expression in 80% der NSCLC-Tumore festgestellt werden. In den korrespondierenden normalen Lungengewebe lag die Quote nur bei 18%. Es konnte ebenfalls eine starke, positive Korrelation zwischen der Expression der *dDNMT3B4* Isoform und dem Auftreten einer *RASSF1A* Promotormethylierung gemessen werden (Wang et al, 2006a). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch durch Überexpression von *dDNMT3B4* in HCT-116 Zellen, einer Zelllinie mit aktiver *RASSF1A*-Expression, keine *de novo* Methylierung am *RASSF1A*-Promotor induziert werden (Abbildung 19B). Es konnte jedoch ein signifikanter Rückgang der *RASSF1A*-Expression beobachtet werden (Abbildung 19 B). Generell kann die Expression verschiedener DNMT-Isoformen mit Veränderungen der zellulären Lokalisation, der DNA-Bindungseigenschaften oder der Enzymaktivität verbunden sein und dies wiederum kann Auswirkungen auf das DNA-Methylierungsprofil der Zelle haben (Carlson et al, 1992; Gopalakrishnan et al, 2009). Eine Überexpression von *DNMT3A* konnte ebenfalls in verschiedenen Tumortypen beobachtet werden (Robertson et al, 1999). *DNMT1* ist mit Abstand die am höchsten exprimierte DNA-Methyltransferase (Laurent et al, 2010; Robertson et al, 1999). Darüber hinaus konnte in früheren Studien bereits gezeigt werden, dass neben den klassischen *de novo* Methyltransferasen (*DNMT3A*, *DNMT3B*) auch die DNA-Methyltransferase 1 (*DNMT1*) an der Entstehung von aberranten DNA-Methylierungsmustern an bekannten DNA Hypermethylierungshotspots beteiligt ist (Jair et al, 2006). Durch Überexpression von *DNMT1* ließ sich eine Zunahme des DNA-Methylierungsniveaus im *S-shore* Bereich der *RASSF1A*-CpG-Insel um ca. 4% induzieren (Abbildung 19 A). Aufgrund der hohen Streuung der Methylierungslevel von einzelnen CpGs in dieser Region ist diese Zunahme jedoch nicht statistisch signifikant.

*DNMT3A* und *DNMT1* kooperieren funktionell bei dem *de novo* Methylierungsprozess. Es gibt Indizien dafür, dass die enzymatische Aktivität von *DNMT3A* die Aktivierung von *DNMT1* stimuliert (Fatemi et al, 2002). Bei den untersuchten nicht-kleinzelligen Lungenkrebsproben konnte ebenfalls eine Überexpression von *DNMT1* und *DNMT3A* im Vergleich zu Normalgewebeproben festgestellt werden (Abbildung 16B). Vergleichbare Ergebnisse ließen sich auch mittels qRT-PCR mit unterschiedlichen Lungenkrebszelllinien im Vergleich zu normalen Lungenzelllinien erzielen (Abbildung 17A). In verschiedenen primären Lungentumoren, in denen das Auftreten einer Hypermethylierung (>20%) der *S-shore*-Region der *RASSF1A* CpG-Insel festgestellt werden konnte, (Abbildung 15 B) zeigte sich ebenfalls eine krebsspezifische Expressionssteigerung von *DNMT1*, *DNMT3A* und *DNMT3B*. Diese Zunahme der DNMT-Expression war mit einer Repression der *RASSF1A*

Expression verbunden (Abbildung 17E). Erstaunlicherweise zeigte der Verlust sowohl von *DNMT1* als auch von *DNMT3B* einen vergleichbar starken Effekt auf die Abnahme des DNA-Methylierungsgrades in der *S-shore* Region der *RASSF1A* CpG-Insel in HCT-116 Zellen (Abbildung 18 A). Der gemeinsame Verlust von *DNMT1* und *DNMT3B* zog einen deutlich stärkeren Verlust der DNA-Methylierung in der *S-shore* Region nach sich (Abbildung A). Durch den Vergleich von HCT-116 Zellen mit einzelnen ausgeschalteten DNMTs (*DNMT1*<sup>-/-</sup> oder *DNMT3B*<sup>-/-</sup>) mit HCT-116 DKO-Zellen (*DNMT1*<sup>-/-</sup> und *DNMT3B*<sup>-/-</sup>) konnte gezeigt werden, dass *DNMT1* und *DNMT3B* bei der Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung und bei der epigenetischen Geninaktivierung in humanen Krebszellen kooperieren (Rhee et al, 2002). In den N- und *S-shore*-Bereichen der *RASSF1A* Promotor-CpG-Insel (in den Regionen -879 bp bzw. 1892 bp relativ zum *RASSF1A*-TSS, s. Abbildung 18 B), war der *knockout* von *DNMT1* und *DNMT3B* (HCT-116 DKO) jedoch nicht mit einer Reduktion der DNA-Methylierung verbunden. An diesen Positionen blieb das Ausgangsmethylierungsniveau nahezu erhalten (Abbildung 18 B). Es lässt sich spekulieren, ob der Verlust von *DNMT3B* und *DNMT1* an diesen Bereichen durch *DNMT3A* kompensiert wird. Unter Verwendung der HCT-116 DKO Zellen konnte bereits gezeigt werden, dass durch den gemeinsamen Verlust von *DNMT1* und *DNMT3B* eine globale Hypomethylierung erfolgt, diese jedoch in repetitiven Sequenzen effektiver ist als bei Gen-assoziierten CpGs (Hagemann et al, 2011; Jacinto et al, 2007). Die Überexpression einzelner DNMTs reicht jedoch nicht aus um in HCT-116 DKO Zellen im *S-shore* Bereich der *RASSF1A* CpG-Insel eine signifikante *de novo* Methylierung zu induzieren (Abbildung 19A). Über die Gründe, warum die Remethylierung der *S-shore* Region der *RASSF1A* CpG-Insel ausblieb, lässt sich spekulieren. Eventuell fehlte das passende DNA Substrat oder die passende Kombination aus Faktoren der Methylierungsmaschinerie, die notwendig für den Prozess sind. Die DNA-Methylierungsmaschinerie interagiert mit einer Vielzahl verschiedener Faktoren (Abbildung 16A). In den NSCLC-Proben konnte eine Überexpression von *EZH2*, *HDAC1*, *HDAC2*, *UHRF1* und *DNMT3L* festgestellt werden (Abbildung 16 C-D). Eventuell war auch die Versuchsdauer von ca. 1 Monat nicht ausreichend um eine *de novo* Methylierung zu induzieren.

Die Trimethylierung von H3K27 wird durch EZH2, einer Komponente des PRC2-Komplexes, katalysiert und ist an der Repression verschiedener entwicklungs- und differenzierungsspezifischer Gene beteiligt (Boyer et al, 2006; Kuzmichev et al, 2002). H3K27me3 und DNA-Methylierung sind epigenetische Modifikationen, die beide repressiv wirken, deren Auftreten sich jedoch an CpG-Inseln gegenseitig ausschließt (Brinkman et al, 2012). Es ist jedoch auch bekannt, dass PRC2-Zielbereiche in Stammzellen, welche normalerweise an der Embryonalentwicklung beteiligt sind, in Krebs eine höhere Wahrscheinlichkeit aufweisen hypermethyliert zu werden als nicht-PRC2-Ziele (Baylin & Jones, 2011). Während der Tumorgenese kommt es bei den Polycomb-regulierten Genen zu einem Austausch der dynamischeren H3K27me3 Markierung gegen die statischere DNA-Methylierung. Die DNA-Methylierung wiederum interferiert mit der Bindung von PRC2 an die entsprechenden Zielsequenzen (Bartke et al, 2010). Eine Überexpression von EZH2 konnte in einer Vielzahl verschiedener Tumorentitäten nachgewiesen werden, wobei eine hohe EZH2 Expression mit einem aggressiven Tumortyp assoziiert ist (Bracken et al, 2003; Varambally et al, 2002). In Lungenplattenepithelkarzinomen und Lungenadenokarzinomen konnte ebenfalls eine signifikante ( $p < 0,001$ ) Überexpression von EZH2 im Vergleich zu normalem Lungengewebe dokumentiert werden (Abbildung 16D). Die Störung der PRC2/ EZH2 Aktivität führte in Zellen mit hoher EZH2 Expression zu einer Reduktion des Wachstums von humanen Krebszelllinien (Tan et al, 2007; Wilson et al, 2010). Die Bindung von DNMTs an EZH2-reprimierten Genen beruht auf der Interaktion zwischen EZH2 innerhalb des PRC2 und PRC3-Komplexes. Dies deutet auf eine Rolle von EZH2 als Plattform für die Rekrutierung von DNA-Methyltransferasen hin (Vire et al, 2006).

DNMT1 und UHRF1 sind Schlüsselfaktoren für die Aufrechterhaltung der DNA-Methylierung und zeigen signifikant veränderte Expressionsprofile in verschiedenen Krebstypen. UHRF1 hat eine essentielle Rolle bei der Erkennung von hemimethylierter DNA während der DNA Replikation und rekrutiert DNMT1, um die Übertragung von DNA-Methylierungsmustern auf die Tochterzellen zu gewährleisten (Mudbhary et al, 2014). In humanen Prostatakarzinomen konnte eine häufig auftretende Überexpression von UHRF1 beobachtet werden. Eine gesteigerte *UHRF1* Expression war mit einer Reduktion der Überlebensrate von Patienten mit Prostatatumoren verbunden. Die *UHRF1* Expression korrelierte negativ mit verschiedenen Tumorsuppressorgenen und positiv mit der *EZH2*-Expression in Prostata-Primärtumoren und –Zelllinien. Ein Knockdown von *UHRF1* führt zur Reduktion der Zellproliferation, des „verankerungsunabhängigen“ Wachstums von Prostatakrebszellen und zur Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen (Babbio et al, 2012). Eine Überexpression von *UHRF1* mit einer epigenetischen Inaktivierung von *BRCA1* in Brusttumoren verbunden. Dies erfolgte durch eine UHRF1 induzierte Bindung von HDAC1 und der H3K9-Methyltransferase G9a an den *BRCA1*-Promotor (Jin et al, 2010). Da die *UHRF1* Expression mit einer schlechten Prognose von NSCLC Patienten assoziiert ist und es in einer Vielzahl von Lungenkrebstypen eine Überexpression von *UHRF1* bereits in frühen pathologischen Stadien detektiert werden kann, könnte es als prognostischer Marker in Lungenkrebs dienen (Unoki et al, 2010). In Übereinstimmung mit diesen Berichten konnte sowohl in primären Lungentumoren, als auch in Lungenkrebszelllinien eine krebspezifisch, signifikante ( $p < 0,001$ ) Überexpression von *UHRF1* festgestellt werden (Abbildung 16D). Auch in Kolorektalkarzinomen konnte eine Überexpression von *UHRF1* festgestellt werden, die mit einem stimulierenden Einfluss auf das Zellwachstum und die Metastasierung verbunden war (Wang et al, 2012b).

DNA-Methyltransferase3-like (DNMT3L) ist ein regulatorischer Faktor, der hohe Sequenzhomologien zu DNMT3A und DNMT3B besitzt. Im Gegensatz zu den anderen DNMTs ist DNMT3L jedoch katalytisch inaktiv. Es konnte gezeigt werden, dass DNMT3L durch eine direkte Interaktion mit DNMT3A und DNMT3B, deren Methylierungsaktivität stimuliert (Gowher et al, 2005; Suetake et al, 2004). Obwohl DNMT3L keine enzymatische Aktivität besitzt, ist ein Verlust dieses Faktors mit Fehlern in der Embryonalentwicklung und mit Fehlern bei der Ausbildung des paternalen Imprintings verbunden (Bourc'his & Bestor, 2004; Webster et al, 2005). In Zervixkarzinom-Zelllinien war die Überexpression von DNMT3L mit einem Anstieg der Zellproliferation und des „verankerungsunabhängigen“ Wachstums verbunden (Gokul et al, 2009). Auf Grundlage von Expressionsprofilen von Lungenkarzinomen ließ sich eine Überexpression von *DNMT3L* im Vergleich zu normalem Lungengewebe feststellen (Abbildung 16 D). Es ist dabei jedoch nicht eindeutig, ob DNMT3L direkt die DNA-Methylierung in Krebszellen reguliert (Kim et al, 2010).

Die DNA-Methylierung und Histon-Deacetylierung sind beide Prozesse, die einen negativen Einfluss auf die Genexpression haben. Der repressive Effekt von DNMT1 auf die Transkription erfolgt zum Teil durch einen methylierungsunabhängigen Mechanismus, bei dem die DNA-Methylierung die Rekrutierung von Methyl-CpG-Binding Protein (MeCP2) nach sich zieht, welche wiederum die Bindung von Histon Deacetylasen an das Chromatin stimulieren (Fuks et al, 2000).

HDAC1 ist ein Bestandteil von mindestens 3 verschiedenen Multiprotein Komplexen (Sin3, CoREST, NuRD) (Cress & Seto, 2000). Der NuRD-Komplex umfasst 7 Komponenten, u.a. die ATPase/Helikase Mi-2, HDAC1 und HDAC2 (Wade et al, 1998; Zhang et al, 1998). Durch die Interaktion mit Transkriptionsfaktoren wird NuRD zu den entsprechenden Zielgenen rekrutiert und kann dort sowohl als Aktivator als auch als Repressor fungieren (Hutchins et al, 2002; Williams et al, 2004). Auch eine physikalische und funktionelle Interaktionen zwischen Schlüsselkomponenten (u.a. HDAC1) des NuRD Komplexes mit DNMTs konnte festgestellt werden, um die epigenetische

Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen in Kolorektalkarzinomen aufrecht zu erhalten (Cai et al, 2014). Für HDAC2 konnte auch eine direkte Interaktion mit der N-terminalen Domäne von DNMT3B nachgewiesen werden (Bai et al, 2005). HDAC1 und HDAC2 sind in der transkriptionellen Repression involviert, die durch den Tumorsuppressor Retinoblastom-Protein (Rb) reguliert wird (Robertson et al, 2000). Eine Überexpression von HDAC1 konnte in Magenkrebs (Choi et al, 2001), in Prostatakrebs (Halkidou et al, 2004), in Dickdarmkrebs (Wilson et al, 2006) und in Brustkrebs (Zhang et al, 2004) festgestellt werden. Für *HDAC2* wiederum konnte eine Überexpression in Zervixkarzinomen (Huang et al, 2005), Magenkrebs (Song et al, 2005b) und in Kolorektalkarzinomen (Zhu et al, 2004) beobachtet werden. Für beide Faktoren konnte in der gegenwärtigen Arbeit eine Überexpression in primären Lungentumoren und Lungenkrebszelllinien im Vergleich zu normalem Lungengewebe bzw. normalen Lungenzelllinien gemessen werden (Abbildung 16D). Die Rolle von HDACs in Krebs ist nicht nur auf die Deacetylierung von Histonen beschränkt. Sie katalysieren ebenfalls die Deacetylierung von nicht-Histon Proteinen. So konnte für HDAC1 eine Interaktion und Deacetylierung von p53 nachgewiesen werden (Juan et al, 2000).

Generell bedarf es weitergehender Studien die den mechanistischen Zusammenhang zwischen krebsspezifischer Überexpression von Faktoren die mit repressiven Chromatinstrukturen assoziiert sind und Lokus-spezifischer Hypermethylierung bzw. genomweit auftretenden Hypomethylierung aufklären. Dabei wäre auch eine Überexpression einer Kombination von Faktoren möglich, um damit die Ausbildung repressiver Chromatinstrukturen zu induzieren.

#### 4.4 Charakterisierung der Zebularin-bedingten Demethylierung von Lungenkrebszelllinien

Aberrante DNA-Methylierungsmuster sind eines der Hauptkennzeichen von Krebserkrankungen. 5-Aza-2'-Desoxycytidine (5-Aza-2'dC) und 5-Azacytidin (5-Aza-C) sind wirksame Inhibitoren der DNA-Methylierung, welche bereits bei der Behandlung des myelodysplastischen Syndroms und akuter Leukämieformen klinische Anwendung finden (Bradbury, 2004; Herranz et al, 2006). Die Wirkung von 5-Aza-2'dC und 5-Aza-C als DNA-Methyltransferase (DNMT) Inhibitoren beruht darauf, dass sie zusätzlich zu den normalen Cytosin-Nukleotiden während der Replikation in die DNA eingebaut werden und kovalente Bindungen zu DNMT1 ausbilden. Dies führt schließlich zur Inhibition der DNMT-Enzym-Aktivität (Cheng et al, 2004a). Bei höheren Dosen (50-100 mg/m<sup>2</sup>/d), führt die Inkooperation von 5-Aza-CdR in die DNA zur Inhibition der DNA-Synthese und zum Zelltod. Bei niedrigeren Dosen (5-20 mg/m<sup>2</sup>/d) wiederum kommt es zu einer Induktion der DNA Demethylierung und zur Reaktivierung von reprimierten Tumorsuppressorgenen (Aimiwu et al, 2012). (Die Dosisierung bezieht sich auf die Oberfläche des Patienten in m<sup>2</sup> und kann über die Formel  $0,016667 \times \text{KG}^{0.5} \times \text{G}^{0.5}$  von Mosteller aus Körpergewicht (KG, in kg) und Größe (G, in cm) berechnet werden (Mosteller, 1987)).

5-Aza-2'dC und 5-Aza-C weisen beide eine hohe Demethylierungseffizienz auf. Beide Chemikalien wirken jedoch auch sehr stark zytotoxisch und sind sehr instabil (Cheng et al, 2004a). Die zytotoxische Wirkung dieser Chemikalien stand im Fokus bei ihrer Entwicklung. Ihr klinischer Einsatz auf Grundlage dieses Effekts war jedoch nicht erfolgreich - stattdessen rückten die Demethylierungseffekte in den Vordergrund (Bradbury, 2004). Aufgrund der Nachteile von 5-Aza-CR und 5-Aza-CdR kam es zur Entwicklung weiterer Chemikalien mit besserer Verträglichkeit, u.a. auch von Zebularin (1-(β-D-Ribofuranosyl)-2(1H)-pyrimidinon). Es handelt sich dabei um ein Nukleosid-Analogon der zweiten Generation. Es ist ein sehr stabiler, hydrophiler Inhibitor der DNA-

Methylierung, welcher die Möglichkeit der oralen Verabreichung bietet. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Zebularin präferentiell von Krebszellen aufgenommen wird (wie in Harnblasen-, Prostata-, Lungen-, Dickdarm- und Pankreaskarzinomzelllinien gezeigt werden konnte (Cheng et al, 2004b). Dies beruht auf einer krebsspezifisch erhöhten Aktivität der Uridin Cytidin Kinase, welche die Phosphorylierung von Zebularin und damit den 1. Schritt für die Inkooperation von Zebularin in die DNA katalysiert (Cheng et al, 2004b). Zebularin zeichnet sich neben einer hohen Stabilität durch eine geringe Zytotoxizität aus, wie in Mausversuchen, selbst nach längerer Verabreichung, gezeigt werden konnte (Yoo et al, 2008). Der Wirkmechanismus auf DNA-Ebene beinhaltet ebenfalls eine Inkooperation von Zebularin in genomische DNA und eine anschließende Komplexbildung mit DNMT-Proteinen, die zum Verlust der DNMT-Aktivität führt (Nakamura et al, 2013). In T24 Blasenkarzinomzellen konnte gezeigt werden, dass die kontinuierliche Behandlung (40 Tage) mit 100  $\mu\text{M}$  Zebularin zu einem vollständigen Verlust an freien DNMT1-Enzymen und einer partiellen Reduktion an DNMT3A und DNMT3B3 Enzymen führt (Cheng et al, 2004a).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Zebularin als DNMT-Inhibitor in Lungenkrebszelllinien eingesetzt. Der Schwerpunkt der Untersuchungen lag dabei in einer Bestimmung der Demethylierungseffekte nach Zebularin-Behandlung. Dies erfolgte bei Konzentrationen, bei denen auch ein signifikanter Rückgang der Zellproliferation induziert werden konnte, jedoch keine signifikante Reduktion der Zelllebensfähigkeit zu beobachten war (Abbildung 3A, B). In Studien mit MDA-MB-231- und MCF-7-Zellen konnte eine mittlere inhibitorische Zebularin-Konzentration (IC-50) von 100  $\mu\text{M}$  (MDA-MB-231) bzw. 150  $\mu\text{M}$  (MCF-7) ermittelt werden (nach 96-stündiger Behandlung), bei der es zu einer signifikanten Inhibition des Zellwachstums kommt (Billam et al, 2010). Diese Inhibition wurde von einem Anstieg der *p21* Expression, einer Reduktion der *Cyclin-D* Expression, sowie eines S-Phasen Arrest begleitet (Billam et al, 2010). Die Stärke des zytotoxischen Effekts von Zebularin könnte möglicherweise in Verbindung mit der Expression des Estrogen-Rezeptors (ER) stehen. In ER-negativen MDA-MB-231 Zellen war ein stärkerer Zebularin-induzierter zytotoxischer Effekt festzustellen als in ER-positiven MCF-7 Zellen (Billam et al, 2010). A427- und A549-Zellen zeigen nach 4 tägiger Behandlung bei 200  $\mu\text{M}$  Zebularin keine signifikanten zytotoxischen Effekte und in diesen Zellen und vielen weiteren NSCLC-Zelllinien war eine positive Expression von ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  nachgewiesen worden (Weinberg et al, 2005). Bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  Zebularin konnte in HLE B-3 Linsenepithelzellen ebenfalls eine vollständige Reduktion an aktivem DNMT1-Protein und eine Inhibition der Zellmigration um 60% festgestellt werden (Zhou et al, 2012). Im Bezug auf die Zellmigration konnten in der gegenwärtigen Studie in A549-Zellen ähnliche Ergebnisse erzielt werden (Abbildung 3D).

Die genomweiten DNA-Methylierungsanalysen wurden mittels *Illumina* 450k Arrays bestimmt. Dafür wurden A549-, A427- und H322- Zellen 4 Tage lang mit 100  $\mu\text{M}$  bzw. 200  $\mu\text{M}$  Zebularin-haltigem Medium inkubiert. A549 Zellen wurden darüber hinaus auch mit 5  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  5-Aza-2'dC behandelt. Zusätzlich wurde jeweils ein Kontrollansatz ohne Zusatz von DNMT-Inhibitoren in den Versuchsaufbau integriert. Die Behandlung von Lungenkrebszelllinien mit Zebularin (50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ ) führte zu einer signifikanten Reduktion der Proliferation ( $p < 0,001$ ) (Abbildung 3B). Der Effekt der Proliferationsreduktion war nach Zebularinbehandlung signifikant höher im Vergleich zur 5-Aza-2'dC-induzierten Reduktion (Abbildung 3B), obwohl der DNA Demethylierungseffekt nach 5-Aza-2'dC-Behandlung wiederum höher war als nach Zebularin-Behandlung (Abbildung 4C, D; Abbildung 6 A, B; Abbildung 7).

Die Demethylierungseffizienz von 5-Aza-2'dC wurde bereits in Studien mit HCT-116 Zellen beschrieben. Grundlage für die DNA-Methylierungsanalyse bildete dabei der *Illumina* 27k Array (Hagemann et al, 2011). Nach einer Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  5-Aza-2'dC über einen Zeitraum von einem

Tag konnte bei 11% (1.487 von 13.911) der untersuchten CpGs eine Demethylierung von mindestens 20% festgestellt werden (Hagemann et al, 2011). In der gegenwärtigen Studie konnte, unter Verwendung der *Illumina* 450k Technologie, in A549-Zellen nach 4-tägiger 5-Aza-2'-dC-Behandlung bei 9% (40.479 von 441.676) der CpGs eine Demethylierung von mindestens 20% festgestellt werden. Bei der Verwendung von 200  $\mu$ M Zebularin konnte wiederum bei nur 0,4% der CpGs (1906 von 443410) eine Demethylierung von 20% festgestellt werden. Beim Einsatz von 5  $\mu$ M 5-Aza-2'-dC konnte demnach ein 22,5-fach höherer Effekt erzielt werden (Abbildung 6 B). Bereits in früheren Studien konnte mit Zebularin-Konzentrationen von 200  $\mu$ M in HepG2-Zellen ebenfalls starke inhibierende Effekte auf die Zellproliferation und eine Induktion der Apoptose erzielt werden. Übereinstimmend konnten jedoch nach 72 h unter 200  $\mu$ M Zebularin-Zusatz ebenfalls nur geringe Effekte im Bezug auf die DNA-Demethylierung beobachtet werden (Nakamura et al, 2013). Es ist davon auszugehen, dass sich die deutlichen Unterschiede in den Demethylierungseffizienzen aufgrund der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der verschiedenen Chemikalien ergeben.

Beim Vergleich von signifikant demethylierten ( $p < 0,05$ ) CpGs zwischen verschiedenen Zelllinien zeigte eine signifikante Überschneidung ( $p < 0,01$ ) von gemeinsam demethylierten CpGs (Abbildung 5). Auf Grundlage dieser Beobachtung kann von einer Zelllinien-übergreifenden, Lokus-spezifischen Demethylierung bestimmter CpGs ausgegangen werden. Trotz der Unterschiede der Demethylierungseffizienzen (d.h. der Anzahl der signifikant demethylierten CpGs), die sich nach Verwendung verschiedener DNMT-Inhibitoren (Zebularin und 5-Aza-2'-dC) ergeben, lässt sich in A549-Zellen eine signifikante Überschneidung ( $p < 10^{-16}$ ) bei jenen CpGs feststellen, die sowohl nach Behandlung mit Zebularin als auch nach der Behandlung mit 5-Aza-2'-dC jeweils eine signifikante Demethylierung zeigen (Abbildung 6). Beim Vergleich der Demethylierungseffekte von 5-Aza-dC mit 5-Aza-2'-dC konnte in HCT-116 Zellen unter Verwendung des *Illumina* 27k Arrays ebenfalls ein signifikanter Überlapp bei gemeinsam demethylierten CpGs festgestellt werden (Hagemann et al, 2011).

In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass durch Zebularin-Behandlung CpG-arme Regionen effektiver demethyliert werden, als CpG-reiche Regionen (Cheng et al, 2004a). Bei A549-Zellen, die mit 200  $\mu$ M Zebularin behandelt wurden, zeigten sich bei den signifikant demethylierten CpGs ebenfalls Unterschiede im Bezug auf die Lokalisierung der CpGs innerhalb bzw. außerhalb von CpG-Inseln. Nach der Zebularin-Behandlung zeigte sich bei 15% der CpGs innerhalb bzw. bei 22% außerhalb von CpG-Inseln eine signifikante Demethylierung. Nach Behandlung mit 5  $\mu$ M 5-Aza-2'-dC konnte in A549-Zellen bei 74% der CpGs außerhalb von CpG-Inseln eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Demethylierung festgestellt werden. Innerhalb von CpG-Inseln zeigte sich jedoch nur bei 50% der CpGs eine signifikante Demethylierung.

Durch die Zebularin-Behandlung konnte in A549-Zellen eine Verschiebung in der Abundanz hochmethylierter CpGs zu niedrigeren Methylierungsniveaus induziert werden. Unter Verwendung von 5  $\mu$ M 5-Aza-2'-dC war dieser Effekt in A549-Zellen wiederum signifikant höher (Abbildung 4). Bei vergleichbaren Experimenten von Hagemann et al., 2011 in HCT-116 Zellen und unter Verwendung von 1  $\mu$ M 5-Aza-2'-dC bzw. 5-Aza-C zeigte sich ebenfalls eine Abnahme in der Abundanz hochmethylierter CpGs. Im Bezug auf die Stärke des Demethylierungseffektes von 5-Aza-2'-dC und 5-Aza-C ließen sich zwischen den beiden Chemikalien kein Unterschied feststellen, obwohl es sich bei 5-Aza-C (wie bei Zebularin) um ein Ribose-Nukleosid handelt (Hagemann et al, 2011).

Vieles spricht dafür, dass die Unterschiede der Demethylierungseffizienzen zwischen 5-Aza-2'-dC und Zebularin auf den strukturellen Unterschieden von Ribose-Nukleosiden (Zebularin, 5-Azacytidin) bzw. Desoxyribose-Nukleosiden (5-Aza-2'-dC) beruhen. Bei 5-Azacytidin konnte gezeigt werden, dass der Großteil der applizierten Nukleosidanaloga in die RNA eingebaut und dass maximal 10-35% in die

DNA eingebaut werden, nachgewiesen werden konnten (Hagemann, 2010(Aimiuwu et al, 2012; Stresemann & Lyko, 2008). Die Inkooperation von 5-Aza-CR in die RNA führt zum Abbau von Polyribosomen, Behinderung der tRNA Cytosine-5-Methyltransferase-Aktivität und deutlicher Inhibition der Proteinsynthese (Li et al, 1970; Momparler et al, 1976; Reichman & Penman, 1973). Für Zebularin ist ein ähnlicher Effekt auf RNA-Ebene denkbar (Ben-Kasus et al, 2005). Die Aufnahme von Zebularin in RNA könnte die wachstumshemmenden Eigenschaften der Chemikalie in Krebszelllinien erklären. Zebularin kann auf verschiedene Ebenen wirken und seine präferentielle Wirkung in Krebszellen macht es zu einem sehr interessanten Kandidaten in der Krebstherapie (Cheng et al, 2004b).

Die Inkooperation von Zebularin in Nukleinsäuren setzt die Phosphorylierung von Zebularin zur Triphosphatform voraus. Dieser Schritt wird von der Uridin/Cytidin Kinase katalysiert, welche in Krebszellen eine bis zu 40-fach höhere Enzymaktivität aufweist als in normalen Fibroblasten. Daher kommt es zu einer präferentiellen Inkooperation von Zebularin in Krebszellen im Vergleich zu Normalzellen (Cheng et al, 2004b). Trotz der schwachen Zebularin-induzierten Demethylierungseffekte scheint es einen stärkeren inhibierenden Einfluss auf die Zellproliferation zu haben. Die hemmenden Effekte von Zebularin auf die Zellproliferation wurden mit Konzentrationen erzielt, welche 40-fach höher als die effektivste 5-Aza-2'dC Konzentrationen lagen. Bei der Übertragung, der an Zellkulturbedingungen optimierten Konzentrationen (200 µM Zebularin) an Therapie-Dosen beträgt bei einem 80 kg schweren und 180 cm großen Patienten die Menge an Zebularin ca. 3,7 g. Im Vergleich dazu beträgt die Menge an 5-Aza-2'dC, wie sie in einem Behandlungszyklus bei der Therapie des myodysplastischen Syndroms eingesetzt wird, übertragen auf dieselben Patientencharakteristika 0,27 g 5-Aza-2'dC (bei einer *body surface area* nach der Berechnung von Mosteller von 2 m<sup>2</sup>) (Kantarjian et al, 2006).

Bei den beschriebenen Versuchsbedingungen wurde jedoch täglich das Zebularin-haltige Medium ersetzt. Zebularin ist jedoch relativ stabil und hat bei einem pH von 7 eine Halbwertszeit von 508 h (> 3 Wochen) (Champion et al, 2010), sodass ohne starke zytotoxische Effekte die Behandlung über einen längeren Zeitraum mit niedrigeren Konzentrationen durchgeführt werden kann (Cheng et al, 2004a).

Ein Problem von allen Nukleosid-Analoga stellt auch die Remethylierung der DNA nach Ende der Therapie dar. Ein aktueller Therapieansatz sieht daher eine Kombination aus 5-Aza-2'dC (1 µM über 24 h) und Zebularin (100 µM über 30 Tage) vor (Cheng et al, 2004a). Dabei werden die positiven Eigenschaften beider Chemikalien kombiniert. Durch den Einsatz von 5-Aza-2'dC wird eine starke Demethylierung am Anfang der Behandlung erzielt und durch die Behandlung mit gut verträglichem Zebularin kann die Therapie über einen längeren Zeitraum aufrechterhalten werden. Mit dieser Kombination konnte die Remethylierung des p16 Promotors in T24 Zellen verhindert werden (Cheng et al, 2004a).

Erstaunlicherweise zeigten sich beim Vergleich der Demethylierungseffizienzen als Funktion der Ausgangsmethylierungslevel zwischen den verschiedenen verwendeten DNMT-Inhibitoren charakteristische Unterschiede (Abbildung 7). Bei der Behandlung von A549 Zellen mit 5-Aza-2'dC wurden stark methylierte CpGs auch stärker demethyliert. Dieser Effekt zeigte sich sowohl bei TSS-assoziierten CpGs, aber auch bei jenen CpGs, die nicht mit einem Transkriptionsstart assoziiert waren. Nach der Zebularin-Behandlung zeigte sich ein anderes Bild: CpGs mit einem Ausgangsmethylierungslevel von 50-70% wurden am stärksten demethyliert. Eine mögliche Erklärung für diesen Effekt könnte im Mechanismus der replikationsabhängigen Demethylierung der DNMT-Inhibitoren liegen. Unmethylierte Genomabschnitte werden früher repliziert und Zebularin zeigt einen stärkeren, reprimierenden Effekt auf die Zellproliferation im Vergleich zu 5-Aza-2'dC. Eine

Reduktion der Zellproliferation ist mit einer Reduktion der DNA-Replikation verbunden, sodass auch weniger Zebularin in die hochmethylierten DNA-Abschnitte inkorporiert wird. Eventuell ließe sich dadurch erklären, warum nach der Behandlung mit 200  $\mu\text{M}$  Zebularin die Demethylierungseffekte bei weniger starken Ausgangsmethylierungsleveln am höchsten sind. Im Vergleich dazu zeigt 5-Aza-2'dC einen nicht so stark hemmenden Effekt auf die Proliferation, sodass 5-Aza-2'dC auch in die hochmethylierten Bereiche im Genom eingebaut werden kann.

#### 4.5 Funktionelle Analyse von lungenkrebspezifisch hypermethylierten CpG-Inseln

Durch den Vergleich der genomweiten DNA-Methylierungsprofile von A549-, A427- und H322-Lungenkrebszelllinien mit normalen Bronchialepithelzellen (NHBE) konnte ein detailliertes Bild der aberranten DNA-Methylierung erstellt werden, welche sich im Laufe der Karzinogenese von Lungenkrebszellen einstellt. Da CpG-Inseln eine Schlüsselrolle in der Expressionsregulation von Genen haben (Liefke R und Shi Y, 2015), wurde von Genen, die mit lungenkrebspezifisch hypermethylierten CpG-Inseln assoziiert sind, auf Grundlage des *Gene Ontology-Term* (GO-Term) Systems eine hierarchische Klassifizierung durchgeführt. Die GO-Term Analyse unterstützt die Interpretation komplexer Input-Listen für die Klassifizierung dieser Gene anhand von biologischen Aspekten. Es werden dabei funktionelle Annotationen (*GO terms*) identifiziert, welche eine statistische Anreicherung innerhalb der Input-Daten zeigen (Psarros et al, 2005). Die Identifizierung von Gemeinsamkeiten zwischen Genen erfolgt auf Grundlage von Gen-Annotationen, die vom *Gene Ontology (GO) Consortium* (Ashburner et al, 2000) oder der *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) (Kanehisa & Goto, 2000) bereitgestellt werden (Geeleher et al, 2013).

Das Ziel des *Gene Ontology Consortiums* ist ein dynamisches, kontrolliertes Vokabular zu schaffen, um die Attribute von Genprodukten zu beschreiben. Diese können wiederum für verschiedene Eukaryoten angewandt werden. Da die GO-Term Analyse auf Grundlage von CpG-Insel-Methylierungsdaten durchgeführt wurde und diese Sequenzintervalle prinzipiell unabhängig von Genannotationen zu betrachten sind, wurde das *Genomic Regions Enrichment of Annotation Tool* (GREAT) verwendet. Mit dieser Software lässt sich die funktionelle Signifikanz von *cis*-regulatorischen Regionen bestimmen. Hierbei können sowohl genomische Sequenzen, welche proximal (2-5 kb) zum Gen-Transkriptionsstart liegen, als auch distale Sequenzen (bis 50 kb) berücksichtigt werden (McLean et al, 2010). Die klassischen GO-Annotationen des GO-Konsortiums liefern Erkenntnisse über die funktionellen Aktivitäten spezifischer Proteine (*molecular function*), die übergeordneten biologischen Rollen oder Prozesse, in denen spezifische Funktionen gemeinsam vorkommen (*biological process*), und die zelluläre Lokalisierung (*cellular component*) (Blake, 2013). GREAT ermöglicht eine direkte *enrichment* Analyse von 20 separaten Ontologien, die Informationen über Genfunktionen, Phänotypen und Krankheitsassoziationen, regulatorische und metabolische Signalwege, Genexpressionsdaten, regulatorische Sequenzmotive und Genfamilien liefern (McLean et al, 2010).

Grundlage für die GO-Term-Analyse bildeten gemittelte CpG-Insel Methylierungsdaten verschiedener Lungenkrebszelllinien (A427-, A549- und H322- Zellen), welche mittels des *Illumina* 450k Arrays gewonnen wurden und im Vergleich zu NHBE-Zellen (NHBE) eine Hypermethylierung von mindestens 50% pro CpG-Insel zeigten.

Im Bezug auf den Ontologie-Begriff „molekulare Funktion“ zeigte sich unter jenen Genen, die mit lungenkrebspezifisch hypermethylierten Promotorsequenzen assoziiert waren, eine starke statistische Anreicherung des GO-Terms „Sequenz-spezifische DNA Bindung“ (GO:0043565- „*sequence-specific DNA binding*“) (Tabelle 15). Unter diesem GO-Term sind Faktoren zusammengefasst, die selektiv und nicht-kovalent mit DNA-Sequenzen mit einer spezifischen

Nukleotidzusammensetzung interagieren (z.B. Faktoren, die an GC-reiche Regionen, an spezifische Sequenzmotiven oder an bestimmten DNA-Typen (Promotor-Regionen, rDNA-Bereiche) binden).

Bereits in früheren Studien konnte bei der Analyse von DNA-Methylierungsdaten von Lungentumoren (kleinzelligen Lungenkarzinomen und Adenokarzinomen), aber auch einer Vielzahl anderer Tumorentitäten (Brust-, Prostata-, Ovar-, Nieren- Magen- und Kolorektalkarzinomen, Glioblastomen und Myelomen) eine signifikante Anreicherung von Sequenz-spezifischen DNA-Bindfaktoren innerhalb der Gruppe der krebstypisch hypermethylierten Gene nachgewiesen werden. Transkriptionsfaktoren, als Teil der Gruppe „Sequenz-spezifische DNA Bindung“, haben die Tendenz Krebs-spezifisch hypermethyliert zu werden (Kim et al, 2012a). Eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren konnte identifiziert werden, die in verschiedenen Tumorentitäten hypermethyliert vorliegen, darunter Mitglieder der HOX Genfamilie, der FOX Genfamilie, der PAX Genfamilie und der Tumorsuppressor WT1 (Kim et al, 2012a). Auch unter den am höchsten lungenkrebstypisch hypermethylierten Kandidatengen befanden sich einige PAX-Familienmitglieder (Tabelle 16).

Interessanterweise waren von den hypermethylierten Transkriptionsfaktoren über 80% Ziele des repressiven PRC2-Komplexes. Diese Analyse wurde auf Grundlage von DNA-Methylierungsdaten durchgeführt, welche mit der *Illumina* 27k Plattform gewonnen wurden, der Vorgänger-Version des *Illumina* 450k Arrays (Kim et al, 2012a). Auch bei der Analyse von DNA-Methylierungsprofilen von Patienten mit akuter Leukämie konnte bei Genen mit hypermethylierten Promotoren eine statistische Anreicherung des GO-Terms „Sequenz-spezifische DNA Bindung“ nachgewiesen werden (Figuroa et al, 2009). Darüber hinaus konnte aber auch eine altersabhängige Hypermethylierung von Genen dieses GO-Terms nachgewiesen werden (Marttila et al, 2015). Ebenfalls konnte ein altersabhängiger Anstieg der DNA-Methylierung an Promotorbereichen von entwicklungspezifischen PRC2-Zielgenen nachgewiesen werden, deren Promotorbereiche in embryonalen Stammzellen sowohl H3K27me3 als auch H3K4me3-Signale besitzen. Viele dieser bivalenten PRC2-Zielgene kodieren für Tumorsuppressoren und Transkriptionsfaktoren, die für die Differenzierung notwendig sind (Teschendorff et al, 2013).

Unter Verwendung der InterPro Datenbank wurde von den hypermethylierten Genen eine Klassifizierung nach Proteinfamilien und Proteindomänen durchgeführt. Übereinstimmend mit den zuvor beschriebenen Befunden waren bei den analysierten Lungenkrebszelllinien (A427, A549, H322) hypermethylierte Gene überrepräsentiert, die zur Familie der Homöobox Gene gehören. Die Homöodomäne beinhaltet ein Helix-turn-Helix (HTH) Motiv über, das die Bindung an DNA vermittelt wird (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/IPR001356>) (Tabelle 15). Homöobox Domänen oder Homöodomänen wurden zuerst in homöotischen Proteinen und Segmentierungsproteinen in *Drosophila* identifiziert, kommen aber auch hochkonserviert in Vertebraten vor (Gehring, 1992; Scott et al, 1989). Hox-Gene kodieren für Transkriptionsregulatoren, die eine Homöodomäne beinhalten und unterschiedliche genetische Programme entlang der anterior-posterior Achse steuern (Alonso, 2002).

Homöobox Gene wurden als potentiell hilfreiche DNA-Methylierungsmarker für die frühe Diagnose von Lungenkrebs beschrieben (Rauch et al, 2007). In einer früheren Studien wurde festgestellt, dass alle vier humanen Hox Gen Cluster auf Chromosom 2, 7, 12, 17 präferentielle Ziele für *de novo* Methylierung in Lungenkrebszelllinien und frühen Lungenkrebsstadien sind. CpG-Inseln, die mit anderen Homöobox Genen, wie SIX, LHX, PAX, DLX und Engrailed assoziiert sind, sind ebenfalls stark methyliert. In der Lungenkrebszelllinie A549 lagen 104 (54%) von 192 CpG-Inseln assoziierten Homöobox Genen methyliert vor. Analysen von paralogenen HOX-Genen zeigten, dass diese nicht alle krebstypisch methyliert sind. Methylierungsanalysen des HOXA-Gen Clusters in primären Lungen-

Plattenepithelkarzinomen zeigten, dass die HOXA7 und HOXA0 assoziierten CpG-Inseln in Stufe 1 Tumoren häufig methyliert vorlagen (Rauch et al, 2007).

Die *molecular signature database* (MSigDB) umfasst 10348 Gen-Listen, welche in acht unterschiedliche Kategorien (*collections*) untergliedert ist. Eine dieser Kategorien enthält 3395 Gen-Listen, die spezifische Informationen zu Genexpressionsprofilen von verschiedenen genetisch und chemisch bedingten Störungen enthalten (*chemical and genetic perturbations, CGP*). Unter Verwendung dieser *CGP* Gen-Listen konnte festgestellt werden, dass innerhalb der Gesamtheit von Genen mit lungenkrebspezifisch hypermethylierten Promotoren, jene Gene, in deren Promotorregionen in humanen embryonalen Stammzellen trimethyliertes H3K27 auftritt, statistisch signifikant überrepräsentiert sind (Tabelle 15). Die Anreicherung bzw. die Expression von Genen, die mit der Identität von embryonalen Stammzellen verbunden sind, wurde mit den Expressionsmustern verschiedener humaner Tumortypen verglichen. Dabei konnte gezeigt werden, dass in histologisch schlecht differenzierten Tumoren präferenziell jene Gene überexprimiert werden, die normalerweise auch in embryonalen Stammzellen exprimiert werden. Darüber hinaus sind in diesen Tumoren Polycomb-regulierte Gene vorrangig reprimiert (Ben-Porath et al, 2008). In Übereinstimmung damit konnte auch bei den hypermethylierten Genen eine Anreicherung von PRC2 Zielgenen festgestellt werden. Gene in dieser Kategorie tragen H3K27me3 in ihren Promotoren und die entsprechenden Sequenzen sind von den PRC2-Komplex Komponenten *Embryonic ectoderm development (EED)* und *SUZ12 polycomb repressive complex 2 subunit (SUZ12)* gebunden. In vorangegangenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass es eine koordinierte Regulation zwischen DNA-Methylierung und Histon H3K27 Trimethylierung gibt (Kondo, 2014). Beide epigenetischen Regulationsmechanismen sind an der Initiierung und Aufrechterhaltung epigenetischer Repression beteiligt. Ferner konnte gezeigt werden, dass es zur Gewährleistung der Repression der Genaktivität, ein Zusammenspiel der Enzyme, die die Methylierung von H3K27 katalysieren, und der DNA-Methylierungsmaschinerie gibt (Kondo, 2014).

Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass die beiden Prozesse antagonistisch aufeinander wirken. Die DNA-Methylierung scheint genomweit repressiv auf die Trimethylierung von H3K27 zu wirken. So konnte gezeigt werden, dass wenn die DNA-Methylierung unterdrückt wird, über 471.000 unabhängige Bereiche des Mausgenoms einen Anstieg an H3K27me3 zeigen. Von diesen Bereichen zeigten in Wildtyp ES-Zellen über 466.000 eine vollständige DNA-Methylierung. In einem reziproken Ansatz zeigte der Verlust von PRC2 bzw. H3K27me3 jedoch nur einen geringen Effekt auf die DNA-Methylierung (Hagarman et al, 2013). CpG-Insel Promotoren, die bereits durch Polycomb Komplexe reprimiert waren, sind viel anfälliger dafür im Laufe der Karzinogenese methyliert zu werden (im Vergleich zu Genen die kein PRC2 Ziel darstellen). Indizien sprechen dafür, dass der Polycomb reprimierte Zustand der DNA-Methylierung vorgeht (Gal-Yam et al, 2008; Irizarry et al, 2009; Ohm et al, 2007; Schlesinger et al, 2007). Dementsprechend wird die DNA-Methylierung eher als das finale Stadium als das initiale Ereignis der Heterochromatisierung angesehen (Jones, 2012).

Auch in Studien an Magenkarzinomen konnte eine Korrelation zwischen Promotorhypermethylierung in Krebszellen und PRC2 Zielgenen festgestellt werden. Mittels BS-Sequenzierungen und H3K27me3 bzw. H3K4me3 CHIP-Seq Experimenten konnte gezeigt werden, dass jene Gene, die sowohl in Krebs- und Normalzellen eine Anreicherung von H3K27me3 in ihren Promotorsequenzen zeigen, in Krebszellen zusätzlich eine aberrante Hypermethylierung der Promotorsequenzen aufweisen. Diese Hypermethylierung tritt jedoch nicht in Normalzellen auf. Eine solche Hypermethylierung konnte in Krebszellen nicht nachgewiesen werden, sobald die Trimethylierung von H3K27 gestört wurde (Gao et al, 2014).

Es ist ein bekanntes Phänomen, dass PRC2-Zielsequenzen in Stammzellen, welche normalerweise mit der embryonalen Entwicklung verbunden sind, eher eine krebsspezifische Promotor-DNA-Methylierung aufweisen als nicht-PRC2-Ziele. Während der Tumorgenese kommt es bei diesen anfälligen Genen zu einem Austausch der dynamischeren H3K27me3-Modifikation gegen die statischere DNA-Methylierung. Die CpG-Methylierung wiederum interferiert mit der PRC2 Rekrutierung. Durch umfangreiche genomweite Analysen konnte festgestellt werden, dass H3K27me3 und DNA-Methylierung sich in CpG Inseln gegenseitig ausschließen. Dies führte zu der Idee, dass während der Tumorgenese die aberranten DNA-Methylierungsmuster die Affinität der PRC2 Bindung beeinflussen und eine Neuverteilung des PRC2 Musters steuern (Kondo, 2014).

Die *molecular signature database* umfasst auch 1330 Gen-Listen die mit verschiedenen Signalwegen verbunden sind (*canonical representations of a biological process*). Unter Verwendung dieser Genlisten konnte gezeigt werden, dass das Set an lungenkrebspezifisch hypermethylierten Genen auch eine signifikante Anzahl von Genen beinhaltet, welche an der Entwicklung von beta-Zellen bzw. mit der Ausprägung einer speziellen Form von Typ II Diabetes verbunden sind (Tabelle 15). Knapp 2-5% der Diabetespatienten leiden an einer autosomal-dominant vererbten Form von Typ II Diabetes, welches als „maturity onset diabetes of the young“ (MODY) bezeichnet wird. MODY wird durch heterozygote Mutationen bei mindestens 5 verschiedenen Transkriptionsfaktoren (*HNF4alpha* (MODY1), *HNF1alpha* (MODY3), *PDX1* (MODY4), *HNF1beta* (MODY5) und *NEUROD1* (MODY6)) ausgelöst. Der MODY2 Subtyp ist die einzige Form, die nicht mit einem bestimmten Transkriptionsfaktor verbunden ist, sondern durch Mutationen im Glucokinase (*GCK*) Gen ausgelöst wird. Mutationen der MODY-Transkriptionsfaktor-Gene führen zu abnormalen Expressionsmustern von Genen, die bei der Entwicklung und dem Stoffwechsel von Pankreasinseln beteiligt sind (<http://www.reactome.org/content/detail/186712>). Eine Reihe der beschriebenen MODY-Transkriptionsfaktoren weisen auch in einigen der analysierten Lungenkrebszelllinien (A427, A549 und H322) im Vergleich zu normalen Bronchialepithelzellen (NHBE) einen hypermethylierten CpG-Insel Promotor auf. Die Promotor CpG-Insel des *HNF1alpha*-Gens ist in H322- und A427-Zellen zu ca. 80% methyliert, während das Methylierungslevel in NHBE-Zellen nur ca. 60% beträgt. Das *PDX1* und das *NEUROD1* Gen sind in H322-, A427- und A549-Zellen zu jeweils ca. 61% methyliert, in NHBE-Zellen jedoch nur zu 16%. Die Promotor CpG-Insel des *HNF1beta* Gens von H322- und A427-Zellen ist zu ca. 80% methyliert und in NHBE-Zellen lediglich zu 9% ([http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/KEGG\\_MATURITY\\_ONSET\\_DIABETES\\_OF\\_THE\\_YOUNG](http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/cards/KEGG_MATURITY_ONSET_DIABETES_OF_THE_YOUNG)). Die beiden Transkriptionsfaktoren *PDX1* und *HNF1a* spielen ebenfalls Schlüsselrollen bei der Aufrechterhaltung der Genexpressionsmuster, die charakteristisch für endokrine Beta-Zellen des Pankreas sind. Zielgene von *PDX1* und *HNF1a* sind das Insulingen, der GLUT2 Glukosetransporter, eine leber- (-und pankreas-) spezifische Form der Pyruvatkinase und andere Transkriptionsfaktoren wie *HNF4A*, *HNF4G* und *FOXA3*. Die Expression von *PDX1* wird durch die Aktivität von *MAFA*, *FOXA2* und *PAX6* reguliert (<http://www.reactome.org/content/detail/210745>) (Tabelle 15). Diese Transkriptionsfaktoren sind auch lungenkrebspezifisch hypermethyliert. Das Methylierungsniveau der Promotor CpG-Insel des *MAFA* Gens beträgt in H322-, A427- und A549-Zellen ca. 43%, in NHBE-Zellen jedoch nur ca. 16%. Das *FOXA2* Gen ist in H322-, A427- und A549-Zellen zu 46% methyliert, in NHBE-Zellen nur zu 15%. Die beiden *PAX6* CpG-Inseln weisen in H322-, A427- und A549-Zellen ein Methylierungslevel von ca. 64% bzw. 70% auf, in NHBE nur 9% bzw. 11%.

Seit den 1970er Jahren gibt es Berichte über das gemeinsame Auftreten von familiärem, autosomal-dominantem Diabetes Mellitus und Leber Adenomatose. Dies deutet auf einen gemeinsamen genetischen Faktor hin, welcher mit beiden Bedingungen assoziiert ist (Chiche et al, 2000; Foster et

al, 1978). Biallelische, somatische *TCF1* Inaktivierung wurde in 50% von Leberkarzinomen nachgewiesen, das darauf hindeutet, dass dieses Gen als Tumorsuppressor in der Leber wirkt (Lerario et al, 2010). Der autosomal-dominant vererbte Diabetes Mellitus Subtyp „Maturity-onset diabetes of the young type 3“ (MODY-3) ist eine nicht-keetonische Form von Diabetes, deren Ausbruchsalter in jungen Jahren charakteristisch für die Erkrankung ist, genau wie die starke Einschränkung in der Insulin Sekretion 1. Die Erkrankung wird durch eine heterozygote Keimbahn-Mutation des *TCF1*-Gens ausgelöst. Das Genprodukt ist der *Hepatocyte Nuclear Factor 1 alpha (HNF1alpha)*, ein Transkriptionsfaktor, welcher eine wichtige physiologische Rolle in dem Pankreas, der Leber und der Niere spielt (Lerario et al, 2010).

Die Hypermethylierung dieser Gene mit einer sehr gewebespezifischen Funktion deutet ebenfalls auf eine Zelllinien-spezifische Inaktivierung von nicht-essentiellen Genen wie sie an früherer Stelle bereits diskutiert wurde (vergl. S. 138).

Die Sequenzen der hypermethylierten Promotor CpG-Inseln weisen auch eine statistische Anreicherung von Transkriptionsfaktor-Konsensusbindemotiven in ihren Promotorregionen auf. Die Grundlage für diese Analysen waren *molecular signature database* Genlisten von Genen, die ein gemeinsames und im Menschen, der Maus, der Ratte und dem Hund konserviertes *cis*-regulatorisches Motiv in den Promotorbereichen und den 3'-UTRs enthalten (Xie et al, 2005) (Tabelle 15). Die stärkste Anreicherung in hypermethylierten CpG-Inseln Promotor-Sequenzen zeigte das Bindemotiv des *PAX4* Transkriptionsfaktors. In früheren Studien wurde vermutet, dass eine Deregulation der Expressionslevel von entwicklungspezifischen Regulatoren in ausdifferenzierten Organismen zur Tumorentwicklung führen und den Verlauf von malignen Prozessen beeinflussen kann. Die *PAX* Gene wurden als orthologe Gene des *Drosophila* „paired“ Transkriptionsfaktors entdeckt, welche die Expression von Zielgenen regulieren, die wiederum den Entwicklungsprozess beeinflussen.

In einer Studie von Hata et al., 2008 wurden die Expressionslevel von neun verschiedenen *PAX* Genen in *Naevus pigmentosus*-Geweben, Melanom-Geweben und Melanom-Zelllinien analysiert. Dabei wurde festgestellt, dass die Expression von *PAX4* und *PAX9* in den Melanomzellen im Vergleich zu den Nävi-Geweben extrem reduziert war. In Zelllinien mit ektoischer *PAX4*-Überexpression wiederum konnte *in vitro* eine Reduktion des Zellwachstums von humanen Melanomzellen beobachtet werden. Mittels FACS-Analysen konnte festgestellt werden, dass die Proliferationsreduktion auf eine reduzierte DNA-Synthese und einen Zellzyklus-Arrest zurückzuführen waren. Darüber hinaus führte die Behandlung von C8161- und MeWo-Zellen mit 5-Azacytidin zu einer Induktion der *PAX4*-Expression. Dies deutet daraufhin, dass die *PAX4* Expression in humanen Melanomen durch DNA-Methylierung reprimiert wird und auf eine mögliche Funktion von *PAX4* als Tumorsuppressor (Hata et al, 2008).

Ein anderes Bindemotiv, das eine signifikante Anreicherung in den Promotor CpG-Inseln zeigte, war jenes des *Cone-rod homeobox protein (CRX)* Transkriptionsfaktors. Das *CRX*-Gen kodiert für einen Homöobox Transkriptionsfaktor dessen Expression und Funktion notwendig für die Aufrechterhaltung retinaler und pinealer Stammzellen ist. Zur Untersuchung des biologischen und diagnostischen Potentials von *CRX* in humanen Tumoren wurde dessen Expression in verschiedenen Zelltypen bestimmt. Auf Grundlage dieser Analysen wurde das *CRX* Gen als sensitiver, spezifischer klinischer Marker und therapeutisches Ziel in Retinoblastom und Pinealoblastom beschrieben (Santagata et al, 2009).

Innerhalb der hypermethylierten CpG-Inseln Sequenzen war auch das Konsensusbindemotiv von *Growth Factor Independence 1 (GFI1)* signifikant überpräsentiert (Tabelle 15). Es konnte gezeigt werden, dass *GFI1* eine wichtige Rolle bei der normalen Entwicklung des lymphatischen Systems hat,

darüber hinaus jedoch auch die Entstehung von T-Zell Leukämie beschleunigt (Khandanpour et al, 2013). Eine Reduktion des GF11 Spiegels konnte mit einer Rückbildung lymphatischer Neoplasien durch die Induktion p53-abhängiger Apoptose-Signalwege in Verbindung gebracht werden. GF11 wirkt als Gegenspieler von p53, indem es an kodierende Sequenzen von p53-Zielgenen (*Bax*, *Pmaip1* und *Bbc3*) bindet, direkt oder indirekt an p53 bindet oder indem es die Methylierung von p53 verhindert und dadurch dessen Aktivität einschränkt (Khandanpour et al, 2013).

Darüber hinaus waren auch die Bindemotive der beiden Homöobox-Transkriptionsfaktoren *POU2F1* und *POU3F1* in den hypermethylierten CpG-Insel-Sequenzen hoch signifikant angereichert (Tabelle 15). Das *Oct4* Paralog *Oct1* (*POU2F1*) ist ein zentraler Regulator der normalen und Krebs-Stammzell-Funktion. Die Wirkung von *POU Class 2 Homeobox 1* (*POU2F1*) in einem Krebskontext konnte im Zusammenhang mit der Expression von verschiedenen HoxD-Genen in Plattenepithelkarzinom des Kopf-Hals-Bereiches (HNSCC) gezeigt werden (Sharpe et al, 2014). HOX-Gene sind Schlüsselregulatoren in der Organmorphogenese und Zelldifferenzierung während der Embryonalentwicklung und werden darüber hinaus auch post-natal exprimiert. Bei Expressionsanalysen von Hals/Kopf-Krebszelllinien und Primärtumoren konnte eine Überexpression von *HOXD10* und *HOXD11* festgestellt werden. Am 5'-Ende des *HOXD10* und des *HOXD11* Gens konnte eine *POU2F1* Konsensus-Sequenz identifiziert werden. Der *knockdown* von *POU2F1* war mit einer signifikanten Reduktion der *HODX10*- bzw. *HOXD11*-Expression und HNSCC-Zellproliferation verbunden. Eine reduzierte Krebszellproliferation und -invasion konnte wiederum nach dem *knockdown* des *HOXD10* Gens in HNSCC Zellen nachgewiesen werden (Sharpe et al, 2014).

Unter den Genen, die mit stark lungenkrebspezifisch hypermethylierten CpG-Inseln assoziiert sind, sind interessante Kandidaten, die bereits in einem Krebskontext beschrieben wurden bzw. die in verschiedenen Krebsentitäten als epigenetisch inaktiviert vorliegen (Tabelle 16). Darüber hinaus sind einige der hochmethylierten Gene zuvor noch nicht in einem entsprechenden Kontext beschrieben worden (Tabelle 16). Das Gen mit der höchsten lungenkrebspezifischen Hypermethylierung seiner Promotor CpG-Insel war das *P2RY6* Gen, welches in allen untersuchten Lungenkrebszelllinien einen Methylierungsgrad der Promotor CpG-Insel von 98%-99% zeigte, in NHBE-Zellen jedoch unmethyliert (2% DNA-Methylierung) vorlag. Das *P2RY6* Gen kodiert für einen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (*P2Y<sub>6</sub>*) ((Communi et al, 1996). Eine epigenetische Inaktivierung dieses Gens in einem Krebskontext ist derzeit noch nicht dokumentiert worden.

Ein weiteres hypermethyliertes Kandidatengen ist das *KCNA3*-Gen, welches für einen mitochondrienmembranständigen, spannungsabhängigen Kalium-Kanal kodiert (<http://www.liquisearch.com/kcna3/function>). In umfangreichen Methylierungsanalysen konnte bereits gezeigt werden, dass spannungsabhängige K<sup>+</sup>-Kanäle häufig krebspezifisch hypermethyliert vorliegen (Huang & Jan, 2014). In 8 von 10 untersuchten Tumorentitäten (Brust, Lunge (AD), Kolorektal, Niere, Ovar, Prostata) konnte eine Hypermethylierung des *KCNA3* Promotors festgestellt werden (Brevet et al, 2009; Kim et al, 2012a). Mittels bioinformatischer Analysen (*LRpath*) konnten darüber hinaus signifikant veränderte Aktivitäten von verschiedenen spannungsabhängigen Ionenkanälen in unterschiedlichen Krebstypen nachgewiesen werden. Davon betroffen sind das *KCNA3*-Gen, das *KCNQ*-Gen und das *SNAP25*-Gen und andere Gene, die ebenfalls für K<sup>+</sup>-Kanäle kodieren, welche eine Rolle bei der Zellproliferation spielen (Kim et al, 2012a). Der CpG-Insel Promotor des *PLK5*-Gens liegt ebenfalls lungenkrebspezifisch hypermethyliert vor (Tabelle 16). Pololike Kinasen werden durch das Auftreten einer spezifischen Polo Box Domäne charakterisiert, welche an Protein-Protein Interaktionen beteiligt ist. *PLK1* bis *PLK4* sind an der Regulation der Mitose, der Zytokinese und des Zellzyklus beteiligt. Dem humanen *PLK5* Protein fehlt die Kinase Domäne. Von diesem Protein wird daher angenommen, dass es keine Rolle in der Zellzyklusregulation spielt. Im

Menschen und in der Maus wird *PLK5* hauptsächlich im Gehirn exprimiert und moduliert dort die BDNF/NGF-Ras abhängige Formation neuritischer Prozesse in Neuronen. In Astrozytomen und in Glioblastomen ist das *PLK5* Gen durch eine Promotor-Hypermethylierung inaktiviert. Die Überexpression von *PLK5* hat starke apoptotische Effekte in diesen Tumorzellen, was auf eine tumorsuppressive Funktion dieses Gens hindeutet (de Carcer et al, 2011).

Ein anderes interessantes Kandidatengen ist das *TAF7L* Gen, welches zuvor als *cancer testis antigens* (CTAs) identifiziert wurde. CTAs zeichnen sich durch eine normale Expression im Hoden, aber darüber hinaus auch durch eine aberrante Expression in verschiedenen Tumortypen aus. Diese Gene haben jedoch spezielle Charakteristiken, die sie zu potentiellen Tumor-Impfstoff-Zielen machen, wodurch sie zu überaus interessanten Kandidaten für die Krebsforschung geworden sind. In einer Studie, mit dem Ziel neue CTAs in akuter myeloider Leukämie (AML) zu finden, wurde die Expression verschiedener Testis-spezifischer Gene in AML und Myelodysplasie-Patienten mit gesunden Proben verglichen. Akute myeloide Leukämie ist ein sehr heterogenes, hämatologisches Krankheitsbild, das durch vielfältige Veränderungen der Genexpression charakterisiert ist. In dieser Studie konnten geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression von *TAF7L* und *OIP5* festgestellt werden. In weiblichen AML-Patienten (41%) konnte eine Überexpression von *OIP5* im Vergleich zu gesunden Frauen gemessen werden. Im Gegensatz dazu zeigten die männlichen AML-Patienten (59%) jedoch eine Reduktion der *TAF7L* Expression im Vergleich zu gesunden Männern. Eventuell kann auf Grundlage dieser Erkenntnisse die Diagnose, Prognose und Behandlung von AML beeinflusst werden (Yazarloo et al, 2013).

Der Promotor des Gens, der für den nukleären Transkriptionsfaktoren *PAX5* kodiert, ist ebenfalls lungenkrebspezifisch hypermethyliert (Tabelle 16). Unter Verwendung genomweiter DNA-Methylierungsdaten konnte bereits ein Einfluss des *Paired Box Gen 5* (*PAX5*) auf die Entstehung von Magenkrebs im Menschen nachgewiesen werden. In Magenkarzinom-Zelllinien und Magen-Primärtumoren konnte eine signifikante Reduktion der *PAX5*-Expression gemessen werden. Diese Expressionsreduktion war mit einer Hypermethylierung des *PAX5* Promotors verbunden (Li et al, 2012). Magenkarzinom-Patienten mit hypermethyliertem *PAX5*-Promotor zeigten eine signifikant reduzierte Überlebensrate im Vergleich zu den Patienten mit unmethylierten Promotoren. *PAX5* konnte als neuer Tumorsuppressor in Magenkarzinomen identifiziert werden und der Methylierungsstatus von *PAX5* könnte als unabhängiger prognostischer Faktor in Magenkrebs genutzt werden (Li et al, 2012).

Darüber hinaus sind auch die CpG-Insel Promotoren einiger anderer Transkriptionsfaktoren (*MEIS2*, *PAX2*), verschiedene Rezeptormoleküle (*GFRA3*, *GPR75*) und einige Mitglieder der GTPase Familie (*ARL9*, *RND2*) lungenkrebspezifisch hypermethyliert.

Zusammenfassend ergab die funktionelle Annotation von lungenkrebspezifisch hypermethylierten CGI, dass diese signifikant mit Homöobox-Domänengenen und Genen, die in Stammzellen repressive H3K27me3 Histonmodifikation tragen, assoziiert sind. Darüber hinaus konnten verschiedene Sequenzmotive identifiziert werden die in hypermethylierten CpG-Insel signifikant angereichert vorkommen und deren Aktivität evtl. an der Ausprägung des Hypermethylierungseffekts beitragen könnte. Außerdem konnten verschiedene interessante Kandidatengene identifiziert werden, deren weitere Charakterisierung auch Einblicke in die Ausprägung des Krankheitsbildes von Lungenkrebs und anderer Krebserkrankungen liefern könnte.

#### 4.6 Analyse eines transkriptionsabhängigen Interferenzmechanismus bei der epigenetischen Inaktivierung der *RASSF1A*-Expression

Die Verbindung aus Promotor-DNA-Methylierung und transkriptioneller Repression wurde bereits in zahlreichen Publikationen ausgiebig beschrieben (Boyes & Bird, 1992; Curradi et al, 2002; Robertson & Jones, 2000). Bei den meisten Studien, die sich mit der Thematik beschäftigen, wird die DNA-Methylierung von Promotorbereichen als Ursache für die transkriptionelle Repression der Genexpression angesehen. Zur Untersuchung, wie es zur Entstehung aberranter DNA-Methylierungsmuster bzw. zur Heterochromatisierung von Promotorbereichen kommt, wurden jedoch in der gegenwärtigen Studie Transkription und epigenetische Geninaktivierung in umgekehrtem, kausalen Zusammenhang betrachtet. Die Transkription bzw. transkriptionsassoziierte Prozesse (wie die Transkriptionstermination) wurden dabei als potentieller Auslöser epigenetischer Inaktivierung bestimmter Gene betrachtet. Ein spezieller Fokus lag dabei auf Genen, welche im Genom an Positionen lokalisiert sind, wo sie dem Einfluss anderer, unabhängiger Transkriptionseinheiten ausgesetzt sein können. Es wurde dabei der Frage nachgegangen, ob bestimmte Promotorbereiche aufgrund ihrer genomischen Lokalisierung relativ zu anderen Genen prädisponiert dafür sind hypermethyliert bzw. anderweitig epigenetisch inaktiviert zu werden. Darüber hinaus wurde versucht die zugrunde liegenden Mechanismen aufzuklären.

Die Grundlage für diese speziellen Analyse Kriterien bildeten Beobachtungen, die im Zusammenhang mit der Genexpression von *Ras Association Domain Family 1A (RASSF1A)* und Zinc Finger, *MYND-type containing 10 (ZMYND10)* gemacht wurden. Das *RASSF1A* Gen ist auf Chromosom 3p21.3 des humanen Genoms lokalisiert. Die Expression von *RASSF1A* wird in einer Vielzahl von humanen Krebsentitäten durch Hypermethylierung des *RASSF1A* CpG-Insel Promotors reprimiert, das es zu einem der am häufigsten epigenetisch inaktivierten Elemente in humanen Karzinomen macht (Gordon et al, 2012). Der entsprechende Mechanismus, der zur epigenetischen Inaktivierung von *RASSF1A* führt, ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt.

*Upstream* vom *RASSF1A* Gen Locus liegt das *ZMYND10 (BLU)* Gen. Beide Gene haben dieselbe Transkriptionsorientierung und die Transkriptionseinstelle (TES) des *ZMYND10*- Gens befindet sich nur 170 bp *upstream* vom Transkriptionsstart des *RASSF1A*-Gens (Abbildung 21).

Die tandemartige Orientierung und der geringe Abstand zwischen den beiden Transkriptionseinheiten liefern Potential für einen möglichen transkriptionsgekoppelten Interferenz-Mechanismus, bei welchem die *ZMYND10*-Transkription zu einer epigenetischen Repression der *RASSF1A*-Genexpression führen könnte. Diese Theorie wird durch Expressionsanalysen von *RASSF1A* und des *upstream* gelegenen *ZMYND10* Gens in verschiedenen Nasopharynxkarzinomzelllinien und -Gewebe (Xenografts) unterstützt (Chow et al, 2004). Es konnte dort in allen untersuchten Zelllinien bzw. Xenografts auf Transkriptionsebene eine *ZMYND10* Expression festgestellt werden. In jenen Xenografts, in denen eine erhöhte *ZMYND10* Expression vorlag war jedoch eine reduzierte oder komplett fehlende *RASSF1A* Expression zu beobachten (Chow et al, 2004). Auch bei verschiedenen Lungenkrebszelllinien (H1299, IMR90) und primären Lungentumoren konnte mittels semiquantitativer PCR eine inverse Korrelation aus *ZMYND10*- bzw. *RASSF1A*-Expression festgestellt werden (Chang et al, 2010). In der Lungenkrebszelllinie H1299 konnte eine starke *ZMYND10* Expression, jedoch keine *RASSF1A*-Expression, gemessen werden (Chang et al, 2010). Im Gegensatz dazu trat in IMR90-Zellen keine *ZMYND10*-Expression auf, dafür konnte eine *RASSF1A*-Expression detektiert werden. Diese Korrelation konnte ebenfalls in 3 von 4 analysierten primären Lungentumoren ermittelt werden. Die Proben mit fehlender *RASSF1A*-Expression zeigten jeweils eine stark methylierte *RASSF1A*-Promotorregion (Chang et al, 2010).

Diese Daten deuten darauf hin, dass eine Zunahme der Expression von *ZMYND10* mit einer epigenetischen Repression der Genaktivität des *downstream* gelegenen *RASSF1A* Gens verbunden sein könnte. Verbindendes Element zwischen den beiden Prozessen und Auslöser der epigenetischen Inaktivierung von *RASSF1A* könnte die *ZMYND10*-Transkription sein.

In der Literatur gibt es verschiedene Befunde dazu, dass transkriptionsabhängige Prozesse Veränderungen auf epigenetischer Ebene nach sich ziehen können. In Pflanzen tritt ein siRNA-induzierter Repressionsmechanismus von endogenen DNA-Sequenzen auf, welche homolog zu Transgen-Sequenzen sind. Bei diesem Prozess kann auch eine Hypermethylierung der endogenen DNA-Sequenzen auftreten. Transkriptionsgekoppelte Genrepression in *Arabidopsis thaliana* setzt ebenfalls siRNA-metabolisierende Faktoren voraus (Chan et al, 2004; Zilberman et al, 2003). Die Aufrechterhaltung der Heterochromatisierung von Zentromer-Sequenzen von *Schizosaccharomyces pombe* wird durch siRNA-gesteuerte Methylierung von Lysin 9 von Histon H3 gewährleistet (Mette et al, 2000; Volpe et al, 2002; Weinberg et al, 2006). Bis jetzt gibt es zwar keine Befunde, dass es einen siRNA-vermittelten transkriptionsgekoppelten Repressionsmechanismus in Säugerzellen gibt. Jedoch gibt es Indizien dafür, dass siRNAs, deren Zielsequenzen nahe an Promotorbereichen liegen, zu Transkriptionsrepression führen (Castanotto et al, 2005; Morris et al, 2004; Suzuki et al, 2005; Ting et al, 2005).

In diesen Studien konnte gezeigt werden, dass die transkriptionelle Inhibition mit der *de novo* DNA-Methylierung der siRNA-Zielsequenzen verbunden war (Castanotto et al, 2005; Morris et al, 2004; Suzuki et al, 2005; Ting et al, 2005). Ein anderer transkriptionsassoziierter Prozess, von dem angenommen wird, dass er die *de novo* DNA-Methylierung stimulieren könnte, ist die Transkriptionselongation. Die Transkriptionselongation ist mit dem Auftreten von dreifach methylierten Histon H3 Lysin36 (H3K36me3) verbunden. Diese Histonmodifikation tritt nur im Rahmen der Transkriptionselongation in intragenischen Bereichen (Genkörper) von aktiv transkribierten Genen auf, jedoch nicht bei der Transkriptionsinitiation. Die H3K36 Methylierung wird von Setd2-Enzymen katalysiert, welche abhängig vom Phosphorylierungszustand der C-terminalen Domäne (CTD) von elongierender RNA-Polymerase II (RNA-PolII) mit der Transkriptionsmaschinerie interagieren (Edmunds et al, 2008; Rose & Klose, 2014). Es gibt zahlreiche Studien, die auf einen Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und H3K36me3 Modifikationen hinweisen (Hahn et al, 2011; Jones, 2012) und es wird angenommen, dass diese Histonmodifikation auch an der Rekrutierung von DNA-Methyltransferasen beteiligt sein könnte. Darüber hinaus wurde zur weiteren Untersuchung der Hypothese eines transkriptionell regulierten Interferenzmechanismus bei der Inaktivierung der *RASSF1A* Expression im Rahmen dieser Arbeit mittels qPCR die Expression von *ZMYND10* und *RASSF1A* in verschiedenen Lungenkrebszelllinien (A427, A549, H322, H358) und normalen Lungenzelllinien (PAF, PASMC) analysiert. Die gemittelten Expressionsdaten der verschiedenen Lungenkrebszelllinien zeigten im Vergleich zu normalen Lungenzelllinien einen signifikanten Anstieg der *ZMYND10*-Expression. Für *RASSF1A* ergab sich die umgekehrte Situation. In Lungenkrebszelllinien war die *RASSF1A* Expression signifikant niedriger als in normalen Lungenzelllinien (Abbildung 22).

Zur Verifizierung der Expressionsdaten von *ZMYND10* und *RASSF1A* in Lungenkrebszelllinien wurde zusätzlich der Methylierungsstatus der *ZMYND10*- bzw. *RASSF1A*-Promotor-CpG-Insel in 69 nicht-kleinzellige Lungenkrebszelllinien und 7 normale Lungenzelllinien analysiert. Es zeigte sich dabei auf DNA-Methylierungsebene ebenfalls eine inverse Korrelation der CpG-Insel Methylierung zwischen den beiden Analysegruppen. Für den *ZMYND10*-Promotor konnte eine krebsspezifische Reduktion der DNA-Methylierung festgestellt werden. Bereits in einer früheren Studie, bei der NSCLC-Proben auf einem Set von vielversprechenden Biomarkern untersucht wurde, konnte eine krebsspezifische

Hypomethylierung des *ZMYND10* Promotors festgestellt werden (Guo et al, 2015). Der *RASSF1A*-Promotor war in den Lungenkrebszelllinien jedoch signifikant höher methyliert als in normalen Lungenzelllinien (Abbildung 22 F). Es gibt eine krebsspezifische Reduktion der *ZMYND10*-Promotor Methylierung, welche sich in einem Anstieg der *ZMYND10* Expression äußert. Für das *RASSF1A* Gen ergibt sich die umgekehrte Situation. Eine signifikante, krebsspezifische Zunahme der Methylierung des *RASSF1A*-Promotors ist mit einem Rückgang der *RASSF1A* Expression verbunden (Abbildung 22C, D). Auf Grundlage von *Illumina* 450k Daten wurde die Methylierungsanalyse von Genen, die innerhalb des menschlichen Genoms in einer tandemartigen Orientierung vorliegen, wie sie am Beispiel von *ZMYND10* und *RASSF1A* beschrieben wurde, auf einen genomweiten Maßstab erweitert. Die entsprechenden Kandidatengene, bei welchen in einem bestimmten Abstand *upstream* von ihrem Transkriptionsstart (TSS) eine weitere, unabhängige Transkriptionseinheit in Tandemorientierung lokalisiert ist, wurden dafür einer systematischen Klassifizierung unterzogen. Anhand des Abstandes zwischen dem TSS des *downstream* gelegenen Gens und dem TES des *upstream* gelegenen Gens wurden die Kandidatengene in Gruppen von 1000 bp (Gruppen mit Abständen von  $\leq 1$  kb bis  $\leq 6$  kb) zusammengefasst. Anschließend wurde die Promotor CpG-Insel Methylierung der Kandidatengene analysiert. Die CpG-Inseln, welche auf dem *Illumina* 450k Array repräsentiert vorliegen, wiesen generell ein sehr diverses DNA-Methylierungsspektrum auf (Vgl. Abbildung 23). Das Spektrum reichte von hochmethylierten bis unmethylierten CpG-Inseln (Median: ca. 43% (H322,); ca. 26% (A549)). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei der Betrachtung von Transkriptionsstart-assoziierten CpG-Inseln, dass diese durchschnittlich sehr niedrig methyliert sind (Median: ca. 7% (H322, A549)). Wenn jedoch zusätzlich der Abstand zwischen zwei Genen in Tandemorientierung berücksichtigt wurde, konnte festgestellt werden, dass es mit sinkendem Abstand zwischen den Genen zu einer Erhöhung der DNA-Methylierung im Vergleich zur Methylierung aller Promotor assoziierten CpG-Inseln kam. Bei einem Abstand von unter 1000 bp zwischen den Genen gab es den höchsten, statistisch signifikanten Anstieg im Methylierungsgrad der Promotor CpG-Insel des *downstream* Gens im Vergleich zur Gesamtheit der Promotor-assoziierten CpG-Inseln. Bei allen analysierten Lungenkrebszelllinien (A427, A549 und H322) ließ sich bei Genen, die weniger als 2 kb entfernt hinter einem anderen, tandemorientierten Gen liegen, ein signifikanter Anstieg der DNA-Methylierung gegenüber allen Promotor-assoziierten CpG-Inseln feststellen (Abbildung 23). Mit steigendem Abstand zwischen den Genen nahm der Effekt nach und nach ab. Bei einem Abstand von  $\leq 3$  kb war keine signifikant erhöhte Promotor Methylierung mehr messbar. Bei der entsprechenden Analyse von normalem Lungengewebe zeigt sich für jene Gene mit einem Abstand von  $\leq 1$  kb zum nächstgelegenen *upstream* Gen ebenfalls ein signifikanter Anstieg der Promotor CpG-Insel Methylierung, jedoch lag das Signifikanzniveau deutlich niedriger (Abbildung 23). Die Methylierungseffekte von A549-Zellen konnten durch Expressionsdaten unterstützt werden. Es zeigte sich bei Kategorie  $\leq 1$  kb eine signifikant reduzierte Expression im Vergleich zu Kategorie  $\leq 2$  kb bis  $\leq 6$  kb Genen. Diese Befunde könnten ebenfalls als Indizien für einen Effekt angesehen werden, der durch die Lokalisierung der Gene zueinander bedingt wird und der krebsspezifisch verstärkt wird. Da der größte Effekt in einem räumlichen Abstand von  $< 1$  kb zu beobachten ist, scheint er jedoch auf Gene beschränkt zu sein, welche in geringem Abstand zu einander liegen. Die Hypermethylierung bestimmter Gene in Tandem-Anordnung ist ein genomweit auftretendes Phänomen und zieht eine krebsspezifische Repression verschiedenster Gen-Promotoren (Tabelle 19) nach sich. Bei den analysierten Krebszelllinien (A427, A549, H322) zeigte der Promotor des *Aldehyd Oxidase 1* (*AOX1*) Gens die stärkste lungenkrebsspezifische Hypermethylierung. Auf Grundlage von RNA Sequenzierungsdaten konnte die Hypermethylierung des *AOX1*-Promotors mit einer Repression der *AOX1*-Expression in A549 Zellen korreliert werden (Abbildung 43). Für das *upstream* von *AOX1*

gelegene *SGOL2* Gen hingegen konnte in A549 Zellen ein positives Expressionssignal und eine unmethylierte Promotorregion detektiert werden (Abbildung 43). Das *AOX1*-Gen kodiert für eine Aldehyd Oxidase, welche von pharmakologischer und toxologischer Bedeutung ist und die Oxidation einer Vielzahl von Xenobiotika in ihre Carbonsäure-Form katalysiert. Dem dabei als Nebenprodukt entstehenden Wasserstoffperoxid kommt eine Aufgabe als Signalstoff während der Differenzierung zu (Kamli et al, 2014). Die Hypermethylierung des *AOX1*-Promotors wurde bereits in Prostatatumoren beschrieben. Zusammen mit *C1orf114* und *HAPLN3* wird *AOX1* als potentieller Biomarker für die Prostata-Karzinom Prognostik angesehen (Strand et al, 2014). Ein anderes Kandidatengen, welches ebenfalls in Tandemorientierung vorliegt und eine starke, lungenkrebspezifische Zunahme der Promotor-Methylierung zeigte ist das *WNK lysine deficient protein kinase 4 (WNK4)* Gen (Tabelle 19). In A549 Zellen konnte die Promotor-Methylierung von *WNK4* ebenfalls mit einer Repression der Genexpression in Verbindung gebracht werden. Das *upstream* gelegene *VPS25* Gen weist einen unmethylierten Promotor auf und wird aktiv exprimiert (Abbildung 44). Das *WNK4* Gen kodiert für ein Mitglied der WNK Familie von Serin-Threonin-Proteinkinase. *WNK4* wird hauptsächlich im Aldosteron-sensitiven distalen Nephron exprimiert. Dort dient es als molekularer Schalter, der die gegenläufige Wirkungsweise von Aldosteron innerhalb der Niere vermittelt. Die Promotorregion von *WNK4* ist bereits in Estrogen Rezeptor (ER) -negativen Brusttumoren als hypermethyliert beschrieben worden (Fackler et al, 2011).

Das *RASSF1A* Gen war ebenfalls unter den besonders stark, lungenkrebspezifisch hypermethylierten Kandidatengenen in Tandemorientierung zu finden. Darüber hinaus konnten auch noch andere interessante Kandidatengene identifiziert werden, die lungenkrebspezifisch hypermethyliert vorliegen (Tabelle 19), jedoch noch nicht in einem Krebs- oder epigenetischen Kontext beschrieben wurden, wie z.B. *CPT1C*, *CNIH2*, *SH3D21*, *KIF17* und *GRIN2C*. Eine Validierung des Tandemrepressionseffektes anhand der beschriebenen Kandidatengene wäre sinnvoll.

Am Beispiel des *RASSF1A*-Promotors wurde im Anschluss daran untersucht, ob dem beschriebenen Effekt bei tandemorientierten Genen ein transkriptionsinduzierter Mechanismus zugrunde liegt. Zur direkten Messung des möglichen Einfluss der *ZMYND10* Transkription auf die *RASSF1A* Expression unter kontrollierten Bedingungen wurde sich eines induzierbaren Tandemreportersystems bedient. Das verwendete Reportersystem (TO-EGFP-2,3-Luc, Abbildung 25A, B) enthielt zwei unabhängige Transkriptionseinheiten. Ein *EGFP*-Gen unter der Kontrolle eines Doxycyclin-induzierbaren, CMV-Promotors (*upstream* Transkriptionseinheit) und eine 2,3 kb lange genomische Sequenz, die dem 3'-Ende des *ZMYND10*-Gens bzw. der *RASSF1A*-Promotorregion entspricht, welche wiederum die Expression eines *Renilla Luciferase (RLuc)*-Reportergens (*downstream* Transkriptionseinheit) regulierte. Um den geringen Abstand zwischen der Transkriptionsterminationsstelle des *ZMYND10*-Gens und dem Transkriptionsstart des *RASSF1A*-Gens auch innerhalb des Reporters zu gewährleisten wurde ein Teil des 3'-Endes (inklusive Stopcodon) des *EGFP*-Gens entfernt, sodass Fusionsproteine entstanden, deren Transkription entsprechend dem endogenen Vorbild, kurz vor dem Transkriptionsstart des *RLuc*-Reporters terminiert wurde (Abbildung 25B). Die Aktivität des stabil transfizierten *RLuc*-Reportergens wurde anschließend in Doxycyclin-induzierbaren HEK Zellen mittels Luciferase-Assay analysiert. Durch Western Blots wurde verifiziert, dass die Luciferase-Aktivität als einfach zu quantifizierendes Maß für die Transkriptionsrate der *Renilla Luciferase* anzusehen war (Abbildung 26 C).

Es zeigte sich, dass nach Induktion der *EGFP*-Transkription die Aktivität des *RLuc*-Gens deutlich reduziert wurde (Abbildung 26 C-D). Die Stärke des Effekts wurde durch die Induktionsdauer bestimmt und ließ sich noch verstärken indem der Abstand des viralen *EGFP*-Promotors zum *RLuc*-Gen reduziert wurde (Reduktion der *RASSF1A*-Promotor Sequenz von 2,3 kb auf 0,5 kb, wobei der

Abstand zwischen *EGFP*-TES und *RASSF1A*-TSS beibehalten wurde (TO-EGFP-0,5-Luc, Abbildung 25B, Abbildung 26 D). Durch die Integration einer polyA-Sequenz an das 3'-Ende des *EGFP*-Gens ließ sich der repressive Effekt auf die *RLuc*-Aktivität nahezu aufheben, da in diesem Fall die Termination des *EGFP*-Transkripts ca. zwei kb vor dem *RLuc*-Gen erfolgte. Durch die Integration einer polyA-Sequenz an das 3'-Ende des *EGFP*-Gens des TO-EGFP-0,5-Luc Reporters ließ sich der repressive Effekt reduzieren, jedoch nicht aufheben. Die Stärke der Transkriptionsaktivität des *upstream* Gens korreliert mit der Stärke des repressiven Effekts auf das *downstream* Gen (Abbildung 26 C, D).

Es scheint, dass die Induktion des *EGFP*-Gens eine repressive Wirkung auf die Aktivität des *RLuc*-Gens hat und dass dies durch einen auf transkriptioneller Interferenz beruhenden Mechanismus bedingt werden könnte. Der Begriff der transkriptionellen Interferenz bezeichnet die Beeinträchtigung der Transkription eines Gens durch einen *cis*-wirkenden Mechanismus, ausgelöst durch die Transkription eines benachbarten Gens. In höheren Eukaryoten wurde transkriptionelle Interferenz bereits in früheren Studien mittels künstlichen Promotor-Anordnungen untersucht (Eszterhas et al, 2002; Thompson & Myatt, 1997). Es wurden jedoch auch Beispiele für die endogene Genregulation über transkriptionelle Interferenz beschrieben (Shearwin et al, 2005). Der Prozess, der transkriptionellen Interferenz tritt neben Eukaryoten auch in Prokaryoten auf. In Prokaryoten wird das vergleichbare Phänomen mit dem Begriff „Promotor Verschluss“ (*promoter occlusion*) bezeichnet (Adhya & Gottesman, 1982; Frankham, 1988). Für den repressiven Effekt der transkriptionellen Interferenz ist der Akt der Transkription an sich entscheidend, nicht die Sequenz der transkribierten RNA. Transkriptionelle Interferenz kann sowohl dann auftreten wenn die betroffenen Gene auf demselben DNA Strang (sense-TI) (Martens et al, 2004) oder auch wenn sie auf unterschiedlichen Strängen liegen (antisense-TI) (Callen et al, 2004; Timmons & Good, 2006). In der Studie von Eszterhas et al., 2002 wurde der Effekt der transkriptionellen Interferenz unter Verwendung verschiedener Doppelreporterkonstrukte nachgebildet. Es wurden dabei EGFP-EYFP-Konstrukte mit konvergenter bzw. divergenter Orientierung zueinander, aber auch zwei Versionen von tandem-orientierten Doppelreportern konstruiert. Die Reportergene standen jeweils unter der Kontrolle von starken viralen Promotoren. Bei einer Tandem-Anordnung der Reportergene ergaben sich bei der Analyse der Aktivität des *downstream* Reporters vergleichbare Ergebnisse wie in der gegenwärtigen Arbeit. Ein genereller Befund war, dass zwei eng gekoppelte Transkriptionseinheiten immer miteinander interferieren. Es konnte auch gezeigt werden, dass die Unterdrückung der *downstream* Expression in einem Tandemkonstrukt nachlässt wenn eine Polyadenylierungssequenz oder eine Sequenz zur RNA-PolIII Pausierung die beiden Gene separiert. Dies lässt darauf schließen, dass ein *readthrough* der Transkription einer der möglichen Mechanismen von transkriptioneller Interferenz ist. Ein polyA-Signal hat Potential das Phänomen zu limitieren. Es zeigte sich jedoch auch, dass eine Interferenz mit der Expression des *downstream* Gens auch auftritt wenn das *upstream* Gen ein starkes polyA-Signal besitzt. Es wurde deshalb geschlossen, dass die verwendete SV40-polyA Sequenz nicht effizient die Transkription des *upstream* Gens terminieren kann oder dass ein anderer Regulationsmechanismus involviert ist (Eszterhas et al, 2002).

Die Transkriptionstermination könnte auch im Kontext der epigenetischen *RASSF1A*-Inaktivierung eine entscheidende Rolle spielen. Hinweise darauf ergeben sich aus der Organisation des *RASSF1*-Gens und den Expressionsprofilen der entstehenden *RASSF1*-Transkripte. Die Transkription des *RASSF1* Gens kann von zwei unterschiedlichen Promotorregionen starten. In Kombination mit alternativem Splicing werden auf diese Weise sieben verschiedene *RASSF1*-Transkripte gebildet. Von den möglichen Transkriptformen werden zwei Isoformen des *RASSF1* Gens (*RASSF1A*, *RASSF1C*) ubiquitär exprimiert. Jedoch wird nur die *RASSF1A* Isoform durch epigenetische Regulationsmechanismen inaktiviert. Für die *RASSF1C* Promotorregion wiederum konnte keine

krebsspezifische Hypermethylierung festgestellt werden. *RASSF1A* und *RASSF1C* unterscheiden sich in ihren N-terminalen Enden, beinhalten jedoch identische Sequenzen an ihren carboxyterminalen Enden (Estrabaud et al, 2007). Der Bereich des Transkriptionsstarts von *RASSF1C* wird von elongierender RNA-Polymerase II passiert, jedoch findet in dem Bereich keine Transkriptionstermination statt. Im Unterschied dazu wird im Bereich des Transkriptionsstarts von *RASSF1A* die Transkription des *upstream* gelegenen *ZMYND10* Gens terminiert.

Beim zugrunde liegenden Mechanismus wird davon ausgegangen, dass die RNA PolIII Maschinerie eines Gens mit der Transkriptionsinitiation, -elongation oder -termination des Nachbargens interferiert (Mazo et al, 2007). Das Phänomen der transkriptionellen Interferenz (*transcriptional interference*) in eukaryotischen Zellen wurde bereits in zahlreichen Publikationen beschrieben (Proudfoot, 1986; Valerius et al, 2002). Transkriptionelle Interferenz ist meist asymmetrisch und resultiert aus der Existenz zweier Promotoren in räumlicher Nähe eines starken Promotors, welcher die Expression eines schwachen Promotors reduziert. Diese Promotoren können konvergente Promotoren sein, welche (zum Teil) in ihrer Sequenz überlappen. Es kann sich aber auch um Tandempromotoren handeln, bei welchen ein Promotor vor dem anderen liegt, aber beide in dieselbe Richtung transkribiert werden. Die beiden Transkripte müssen dafür nicht zwangsläufig überlappen. Eine weitere Möglichkeit bilden überlappende Promotoren, die entweder divergent, konvergent oder in Tandemorientierung liegen und in welchem die beiden RNA-Polymerase Bindestellen eine gemeinsame DNA-Sequenz teilen (Shearwin et al, 2005).

Transkriptionelle Interferenz kann bei tandemartig angeordneten, RNA-PolIII transkribierten Genen die regulierte Transkription über einen Mechanismus stören, der als Konsequenz aus gesteigerter Expression eines *upstream* Gens auftritt und die Transkription eines benachbarten *downstream* gelegenen Gens beeinträchtigt oder komplett verhindert. Transkriptionelle Interferenz wird durch enge räumliche Nähe zwischen Genen begünstigt, welche nur durch eine kleine intergenische Region zwischen den jeweiligen Leserahmen (ORF) unterbrochen wird (Valerius et al, 2002).

Die Wirkmechanismen der transkriptionellen Interferenz sind prinzipiell nicht mit Veränderungen epigenetischer Modifikationen verbunden. Die dauerhafte Repression von Promotorregionen setzt jedoch die Heterochromatisierung der Promotorregion durch Veränderungen von Histon-Modifikationen oder evtl. *de novo* DNA-Methylierungen voraus (Green & Weinberg, 2011).

In dem *EGFP-RLuc*-Reportersystem (Abbildung 25) kommt es nach Doxycyclin-Induktion zu einem Anstieg der *EGFP* Expression. Die Induktion der Genexpression zieht einen Anstieg an elongierender RNA PolIII (PolIII) im *RASSF1A* Promotorbereich des *RLuc*-Reporters nach sich. Die Transkriptionseelongation bzw. -termination ist sowohl durch ein charakteristisches posttranslationales Modifikationsmuster (PTM) der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA PolIII gekennzeichnet, als auch durch das Auftreten charakteristischer Chromatin-Modifikationen. Die C-terminale Domäne der größten humanen RNA PolIII Untereinheit (POLR2A) umfasst eine Abfolge von 52 Kopien eines Heptapeptids mit der Konsensus-Sequenz „Tyr1-Ser2-Pro3-Thr4-Ser5-Pro6-Ser7“. (Phatnani & Greenleaf, 2006; Schrieck et al, 2014). Bei der Transkriptionsinitiation in der proximalen Promotorregion von aktiv transkribierten Genen wird die CTD von POLR2A an Ser5 phosphoryliert. Im Zuge der Transkriptionseelongation zum 3'-Ende des Gens nimmt die Phosphorylierung an dieser Position jedoch ab und ist am 3'-Ende des Gens nicht mehr nachweisbar. Der Abnahme von Ser5 Phosphorylierung während der Elongation steht eine Zunahme in der Phosphorylierung von Ser2 der CTD gegenüber. Diese PTM ist mit der Rekrutierung von Faktoren verbunden, die an der Transkriptionstermination und der 3'-Prozessierung nahe der Polyadenylierungsstelle des Gens beteiligt sind (Schrieck et al, 2014; Sims et al, 2004).

Die Transkriptionselongation wird begleitet vom Auftreten von trimethyliertem Histon H3K36. Die Abundanz dieser Histonmodifikation steigt ausgehend vom 5'-Ende von aktiv exprimierten Genen graduell bis zu deren 3'-Ende an (Dong & Weng, 2013; Rando & Chang, 2009). H3K36 Methylierung ist mit der Rekrutierung von repressiv auf die Genaktivität wirkenden HDAC verbunden, sodass es in diesen Bereichen zu einer Reduktion von Histon-Acetylierung kommt (Karlic et al, 2010). Die Histon-Acetylierung ist eines der Kennzeichen von Promotorregionen aktiv transkribierter Gene (Struhl, 1998).

Mittels Chromatin-Immunopräzipitation wurde untersucht, ob die Repression der RLuc-Aktivität, die nach *EGFP*-Induktion festgestellt werden konnte, mit einer Veränderung im Anteil an H3K9- bzw. H4-Acetylierung im *RASSF1A*-Promotor Bereich des *EGFP-RLuc*-Doppelreporters verbunden ist. Als Kontrollregion wurde ein Bereich im *EGFP*-Gen gewählt (Abbildung 28 B). Es konnte festgestellt werden, dass nach Induktion der *EGFP*-Transkription die Menge an Histon-Acetylierung im Bereich des *RASSF1A*-Promotors deutlich reduziert wurde.

Die Histon-Deacetylierung und die Akkumulierung von repressiven H3K9me3 Histonmodifikationen, welche mit der Inaktivierung der *RASSF1A*-Expression verbunden sind, wurden bereits in früheren Studien beschrieben (Strunnikova et al, 2005).

Zur Identifizierung der entsprechenden Enzyme, welche an der Deacetylierung der *RASSF1A*-Promotorsequenz beteiligt sind, wurden verschiedene Histon Deacetylasen (HDACs) in HEK-293 TO-EGFP-2,3-Luc- Zellklone transfiziert (Abbildung 28 C). Für die Co-Transfektionen standen Überexpressionsvektoren von *HDAC1*, *HDAC2*, *HDAC3*, *HDAC4*, *HDAC5*, *HDAC6*, *HDAC8* und *HDAC10* zur Verfügung. Bei den Sirtuinen wurde sich auf den prominentesten Faktor (Sirtuin 1 (SIRT1)) beschränkt. Mit der beschriebenen Co-Transfektionsstrategie konnte jedoch leider kein spezieller Faktor identifiziert werden, der den reprimierenden Effekt auf die RLuc-Aktivität nach induzierter *EGFP*-Transkription im HEK-293 TO-EGFP-2,3-Luc-System noch zusätzlich verstärkt (Abbildung 28 C). Aus diesem Grund wurde der Effekt verschiedener HDACs auf einen *RASSF1A*-Promotor-*RLuc*-Reporter (ohne *EGFP*-Anteil) bestimmt: Alle getesteten HDACs hatten einen repressiven Effekt auf die RLuc-Aktivität, jedoch zeigte sich nach der Co-Transfektion von *HDAC6* die stärkste Abnahme in der RLuc-Aktivität (Abbildung 28 D). *HDAC6* ist auf Grund seiner starken Beteiligung an der onkogenischen Zelltransformation ein wichtiges Ziel für die Entwicklung von Krebs-Medikamenten (Aldana-Masangkay & Sakamoto, 2011). *HDAC6* ist überwiegend im Zytoplasma lokalisiert, wo es wichtige biologische Prozesse, wie Zellmigration und Degradierung von falsch gefalteten Proteinen reguliert (Liu et al, 2012). Das Enzym hatte viele nicht-Histon-Substrate, wobei  $\alpha$ -Tubulin-Proteine das Hauptsubstrat darstellen (Liu et al, 2012). Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass *HDAC6* in den Nukleus transportiert wird, wo es an der transkriptionellen Regulation beteiligt ist (Liu et al, 2012). Die Überexpression von *HDAC6* korreliert positiv mit der Tumorgenese und erhöht die Überlebensfähigkeit von Krebszellen. Aus diesem Grund könnte *HDAC6* auch als prognostischer Marker Verwendung finden. In früheren Studien konnte zusätzlich gezeigt werden, dass in Zellen von multiplen Myelomen die Inhibition von *HDAC6* zur Apoptose führt. *HDAC6* fördert außerdem die Krebszell-Metastasierung, da die *HDAC6*-Überexpression mit einer erhöhten Motilität von MCF-7 Brustkrebszellen in Verbindung gebracht werden konnte (Aldana-Masangkay & Sakamoto, 2011). Eine signifikante Überexpression von *HDAC6* konnte auch in Lungenkrebs nachgewiesen werden (Abbildung 16 D, Tabelle 17). HDACs bilden eine diverse Familie von essentiellen transkriptionellen Regulationsenzymen, welche die räumliche und zeitliche Rekrutierung von Proteinkomplexen regulieren. In einer umfassenden Studie wurde ein Interaktionsnetzwerk aller 11 humanen HDACs in T-Zellen aufgestellt (Joshi et al, 2013). HDACs haben ein sehr breites Wirkungsspektrum, sodass nicht ausgeschlossen werden kann, dass die Repression des *RASSF1A*-Promotor-Reporters nach HDAC-

Transfektion nicht durch die direkte Wirkung der HDACs am *RASSF1A*-Promotor ausgelöst wird, sondern nur Sekundäreffekte, ausgelöst durch andere Faktoren, darstellen.

Da bereits durch Verwendung des Tandemreportersystems ein Einfluss der Transkription des *upstream* Gens (evtl. durch die Transkriptionstermination des *upstream* Gens) auf die Inaktivierung des *RASSF1A-Renilla* Luciferase Gens gezeigt werden konnte (Abbildung 25 C, D, Abbildung 26 C, D), wurde versucht eine Verbindung zwischen der am *RASSF1A*-Promotor auftretenden Deacetylierung mit Prozessen zu ziehen, die direkt oder indirekt mit der Transkriptionstermination assoziiert sind.

Innerhalb der über 200 identifizierten HDAC-Interaktionen gibt es interessante Kandidaten, welche die Prozesse der Deacetylierung mit der Transkriptionstermination miteinander verbinden. Es handelt sich dabei um die Interaktion von HDAC6, welches den stärksten repressiven Effekt auf die *RASSF1A*-Promotor-Aktivität hatte, mit dem *Cleavage And Polyadenylation Specific Factor 1* (CPSF1). Das *CPSF1* Gen kodiert für einen Faktor des CPSF-Komplexes, welcher an der 3'-Prozessierung der prä-mRNA beteiligt ist. Die Prozesse der RNA PolII Transkriptionstermination und der prä-mRNA 3'-Prozessierung sind wiederum eng miteinander verbunden (Birse et al, 1998; Buratowski, 2005; Hirose & Manley, 2000; Proudfoot, 2004; Richard & Manley, 2009; Yonaha & Proudfoot, 2000).

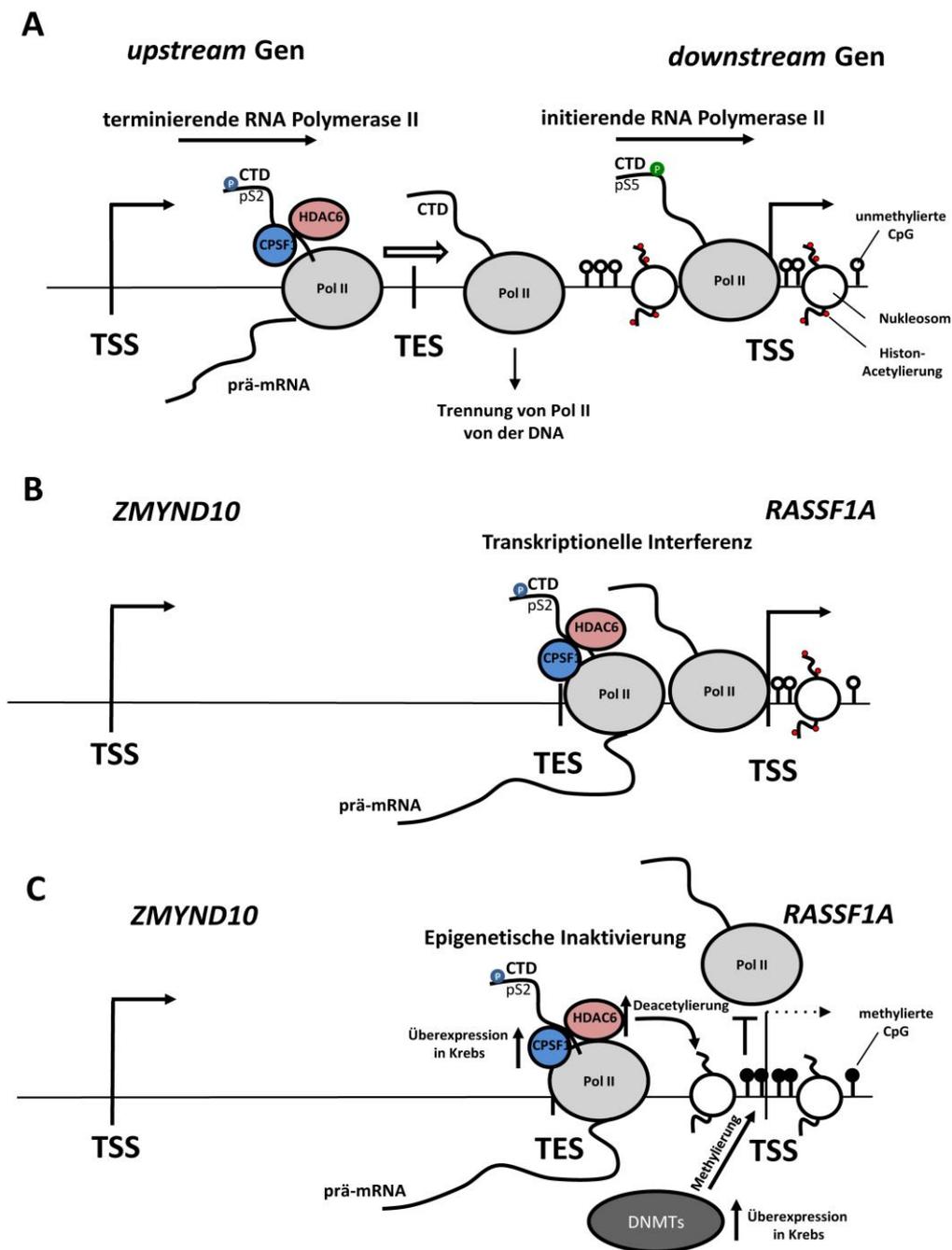
Eine korrekt regulierte Transkriptionstermination hat zahlreiche grundlegende Funktionen in der Zelle. Dabei ist die Verhinderung der Interferenz von RNA PolII mit *downstream* gelegenen DNA Elementen, wie Promotorsequenzen, nur ein Aspekt der vielfältigen Aufgabenpalette. Die Transkriptionstermination von RNA-PolII erfolgt nicht an einer konservierten Sequenz oder in einer konstanten Distanz vom 3'-Ende der RNA. In Säugetieren kann die Termination überall in einem Bereich zwischen einigen Basenpaaren und einigen Kilobasen *downstream* vom 3'-Ende der RNA erfolgen (Proudfoot, 1989). Für die Termination der Transkription von Protein-kodierenden Genen in Säugerzellen ist die Präsenz eines intakten Polyadenylierungssignals notwendig (Connelly & Manley, 1988; Logan et al, 1987; Whitelaw & Proudfoot, 1986). In Säugetieren erfolgt die Prozessierung der RNA, d.h. die Abspaltung von 3'-prä-mRNA Sequenzen und die Adenylierung, ca. 10-30 Nukleotide *downstream* eines konservierten Hexanukleotid-Motiv (AAUAAA) und 30 Nukleotide *upstream* einer weniger konservierten U- oder GU-reichen Region. Das AAUAAA Signal wird von CPSF-Komplex erkannt, welcher insgesamt aus fünf Untereinheiten besteht: CPSF-30, CPSF-73, CPSF-100, CPSF-160 und Fip1. Zusätzlich sind verschiedene Untereinheiten des Cleavage Stimulation Factor (CstF)-Komplexes an dem Prozess beteiligt: CstF-50, CstF-77 und CstF-6. CPSF160 bzw. CPSF1 ist ein 160 kDa großes Protein, welches direkt das AAUAAA Signal registriert und an CPSF-100, CstF-77, Poly(A) Polymerase (PAP) und Fip1 bindet (Kaufmann et al, 2004; Murthy & Manley, 1995; Richard & Manley, 2009).

Durch Co-Transfektion von *HDAC6*- und *CPSF1*-Überexpressionvektoren in HEK-293 Zellklone, welche stabil mit dem TO-EGFP-2,3-Luc-Doppelreportersystem transfiziert waren, ließ sich der durch Induktion der *EGFP*-Transkription ausgelöste repressive Effekt auf die RLuc-Aktivität zusätzlich signifikant verstärken (Abbildung 29 C). Verbindungen von CPSF1 mit einem Krebskontext sind gegenwärtig nicht dokumentiert. In Zebrafischen konnten Mutationen des *cpsf1*-Gens mit einer Reduktion der Überlebensfähigkeit von hämatopoetischen Stammzellen und einer generellen Störung der Differenzierung in kaudales, blutbildendes Gewebe in Verbindung gebracht werden. Störungen der Stammzell-Differenzierung sind mit Ausbildung von aplastischer Anämie, des myelodysplastischen Syndroms und/oder hematopoetischen Neoplasien verbunden (Bollí et al, 2011). In verschiedenen Lungen-Karzinomproben ließ sich eine signifikante, krebspezifische Expressionssteigerung von *HDAC6* und *CPSF1* im Vergleich zu normalem Lungengewebe feststellen (Abbildung 29D). Diese Ergebnisse konnten mittels qRT-PCR in Lungenkrebszelllinien im Vergleich zu normalen Lungenzelllinien bestätigt werden (Abbildung 29E).

Ein direkter Interaktionspartner von CPSF1 ist CPSF4 (CPSF30), dessen Überexpression bereits in nicht-kleinzelligen Lungenkrebszelllinien beschrieben wurde. Die Überexpression von *CPSF4* konnte mit einer schlechten Überlebensrate von Lungenadenokarzinom-Patienten korreliert werden (Chen et al, 2013a). Über eine Affinitätsaufreinigung-Massenspektrometrie Analyse konnte ein anderer interessanter Interaktionspartner von CPSF1 identifiziert werden. Hierbei handelt es sich um den *SWI/SNF-like Chromatin Remodeler SMARCAD1*, eine Schlüsselkomponente, die notwendig für die Aufrechterhaltung von repressivem Chromatin ist (Rowbotham et al, 2011). Die ATPase-Aktivität von SMARCAD1 wiederum ist notwendig für die globale Deacetylierung von Histon H3 und H4. SMARCAD1 fördert die Methylierung von H3K9 zur Ausbildung von heterochromatisierten DNA-Abschnitten (Rowbotham et al, 2011). Generell konnte festgestellt werden, dass globale Änderungen in der 3'-UTR Prozessierung von mRNAs ein Charakteristikum von verschiedenen Krebs-Subtypen ist (Singh et al, 2009). Im Rahmen einer Expressionsstudie von Schlüsselkomponenten der Polyadenylierungsmaschinerie konnte jedoch auch festgestellt werden, dass das ubiquitär exprimierte CSPF1 und sein direkter Interaktionspartner CstF-64 in normalem Mausemblion im Vergleich zur Leber eine ca. 250-fache Steigerung der Expression aufwies (Dass et al, 2001).

Die Induktion der *EGFP*-Expression war mit einer Reduktion von Histonmodifikationen verbunden, die mit aktiv transkribiertem Euchromatin assoziiert sind. Ein Anstieg an DNA-Methylierung innerhalb der *RASSF1A*-Promotorregion des RLuc-Reporters konnte jedoch nicht festgestellt werden. Selbst wenn die *EGFP*-Transkription über mehrere Wochen induziert wurde, kam es in dem Reporterkonstrukt zu keinem Anstieg der *de novo* DNA-Methylierung der *RASSF1A*-Promotorsequenz (Abbildung 27). Es gibt jedoch zahlreiche Befunde, dass die Heterochromatisierung über repressive Histonmodifikationen der Repression der DNA-Methylierung vorangeht (Ben-Porath et al, 2008; Brinkman et al, 2012). Die Bindung von *de novo* DNA-Methyltransferasen an ihre Zielsequenzen wird durch DNMT3L vermittelt. Die Methylierung von H3K4 jedoch verhindert die Bindung von DNMT3L an nukleosomales Histon H3 (Cedar & Bergman, 2009). Es ist durchaus vorstellbar, dass das Chromatin im Bereich des RLuc-Promotors noch ein gewisses Niveau an aktiven Histonmodifikationen, wie H3K4me3 enthält und dadurch die *de novo* Methylierung in diesem Bereich nicht erfolgt. DNA-Methylierung führt zu stabiler Langzeit Repression der Genaktivität (Jin et al, 2011). Eventuell war auch der zeitliche Rahmen (1 Monat) nicht ausreichend um messbare *de novo* Methylierung in dem Sequenzbereich zu induzieren. Darüber hinaus können auch zusätzliche Faktoren notwendig sein, die eine Rekrutierung von DNMTs an den *RASSF1A*-Promotor des RLuc-Reporters steuern. Darüber hinaus weißt, wie bereits in Kapitel 4.2 beschrieben, der Methylierungscharakter von Krebserkrankungen parallelen zum Alterungsprozess auf (Teschendorff et al, 2013). Die Korrelation aus Alter und Methylierungsänderungen bzw. dem Krebsrisiko deutet darauf hin, dass dies ein langwieriger Prozess ist (Johnson et al, 2014; Wagner et al, 2015).

Das Ausbleiben von *de novo* Methylierung könnte auch dem verwendeten, artifiziellen Reportersystem geschuldet sein. Die starke *upstream* Transkriptionsaktivität könnte mit der Ausbildung von stabilen repressiven Strukturen interferieren. Eventuell könnte durch Reduktion der Aktivität des upstream Reporters eine Situation erzeugt werden, die dem endogenen Vorbild näher kommt (auch im Hinblick auf den Inaktivierungsmechanismus).



**Abbildung 35: Modell der transkriptionellen Interferenz an tandemorientierten Genen.** **A**, Bei Genen in Tandemorientierung mit ausreichend Abstand zwischen *upstream* und *downstream* Gen führt die Transkriptionsaktivität des *upstream* Genes zu keiner Beeinflussung der Transkription des *downstream* Genes. **B**, Bei Genen in Tandemorientierung mit geringem Abstand zwischen der Transkriptionstermination des *upstream* Genes (*ZMYND10*) und der Transkriptionsinitiation des *downstream* Genes (*RASSF1A*) kann es zu einem Interferenzeffekt auf die Transkriptionsaktivität des *downstream* Genes kommen. **C**, Bedingt durch eine krebsspezifische Überexpression von *CPSF1* und *HDAC6* kann es zur Ausbildung repressiver Histonmodifikationen kommen, die die Bindung des Präinitiationskomplexes am *downstream* Genpromotor verhindern. Im Anschluss wäre ebenfalls eine Hypermethylierung der *downstream* Promotorsequenzen vorstellbar. PolIII = RNA Polymerase II, CTD = C-terminale Domäne, TSS = Transkriptionsstartstelle, TES = Transkriptionseinstelle.

Da Histonacetylierungen nicht das ganze Spektrum an aktiven Histonmodifikationen am *RASSF1A*-Promotor darstellen wäre in nachfolgenden Experimenten eine Analyse von weiteren aktiver und repressiven epigenetischen Modifikationen notwendig, um ein vollständiges Bild von den Chromatin-abhängigen Veränderungen die im Verlauf des *RASSF1A*-Inaktivierungsprozesses auftreten, zu bekommen.

Das Modell der epigenetischen *RASSF1A*-Inaktivierung in der gegenwertigen Arbeit beruht auf einen *ZMYND10*-transkriptionsabhängigen Interferenz-Mechanismus (Abbildung 35): Durch eine krebspezifische Überexpression von *ZMYND10*, über deren Ursache nur spekuliert werden kann, kommt es zu einer Reduktion aktiver Histonmodifikationen (H3K9-Acetylierung, H4-Acetylierung) am *RASSF1A*-Promotor. Eine Verbindung zwischen Prozessen die mit der Transkriptionstermination assoziiert sind und Histondeacetylierung konnte über die Interaktion von HDAC6 und CPSF1 hergestellt werden. Die Überexpression dieser beiden Faktoren war mit einer Repression der *RASSF1A* Expression verbunden. Voraussetzung für die Ausbildung des Interferenzeffektes ist der geringe Abstand (170 bp) zwischen *ZMYND10* TES und *RASSF1A* TSS. Die signifikante Zunahme der Promotor CpG-Insel Methylierung von Genen in einer Tandemanordnung und mit geringem Abstand zueinander (< 2000 bp), wie sie bei der genomweiten DNA-Methylierungsanalyse festgestellt werden konnte, deutet auf einen generellen Mechanismus hin, bei dem bestimmte Gene dafür prädisponiert sind epigenetisch inaktiviert zu werden. Die Reduktion an aktivierenden Histonmodifikationen im *RASSF1A*-Promotor, wie sie mit dem verwendeten Versuchsaufbau erzielt werden konnte, ist jedoch nicht mit einer *de novo* Methylierung der *RASSF1A*-Promotorregion verbunden.

#### **4.7 Epigenetische Inaktivierung von *ABCB4* in verschiedenen humanen Krebsentitäten**

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein neues Kandidatengen identifiziert werden, welches in verschiedenen humanen Krebsentitäten epigenetisch inaktiviert vorliegt. Es handelt sich dabei um *ABCB4*, einem Mitglied der ABC-Transporter Superfamilie. ABC-Transporter sind im Krebskontext meist durch die Vermittlung von Multiresistenzen durch den Transport von Chemotherapeutika aus der Krebszelle beschrieben. Im Menschen wurden 46 ABC Transporter identifiziert, die wichtige Rollen bei der Ausprägung verschiedenster humaner Krankheiten spielen (Dean et al, 2001). Der Ausfall oder die reduzierte Enzymaktivität verschiedener ABC Transporter ist unter anderem mit der Ausprägung von cystischer Fibrose, makulärer Dystrophie und verschiedenen neurologischen Erkrankungen assoziiert (Dean, 2005; Klein et al. 1999). Die Überexpression bestimmter Transporter und die damit einhergehende gesteigerte Efflux Aktivität ist andererseits mit der Entstehung von Multiresistenzen (*multi drug resistance* -MDR) in Krebs verbunden. Ein Beispiel für einen solchen Faktor ist *MDR1* (*ABCB1*), ein Mitglied der ABC Subfamilie B (Chen et al. 1986; Juliano and Ling, 1976). Die ABC Subfamilie B umfasst Transporter mit einem breiten Spektrum an biologischen Funktionen. Eine Hypermethylierung des *ABCB4*-Promotors konnte in verschiedenen epithelialen Krebsentitäten, wie Lunge-, Brust-, Hals/Kopf-, Haut- und Zervix-Karzinom nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten aberrante DNA-Methylierungen des *ABCB4*-Promotors auch in primären nicht-kleinzelligen Lungenkrebszellen (NSCLC) (39% der Fälle), Brusttumoren (41% der Fälle) und Hals/Kopf-Tumoren (20% der Fälle) festgestellt werden (exemplarisch Abbildung 31). In Übereinstimmung mit dem Auftreten von *ABCB4*-Promotor Hypermethylierungen zeigten 41% der untersuchten primären nicht-kleinzelligen Lungenkrebszellen keine *ABCB4* Expression. Eine Methylierung des *ABCB1* (*MDR1*)-Promotors wurde bereits in Brust-, Hals/Kopf- und anderen

Tumoren beschrieben (Bebek et al, 2012; Muggerud et al, 2010; Oberstadt et al, 2013; Sharma & Vertino, 2004). Für *ABCB4* und andere Mitglieder (*ABCA7*, *ABCA12*, *ABCB2*, *ABCB5*, *ABCD1*) der ABC-Transporter-Familie wiederum konnte eine reduzierte Expression in Melanomzelllinien und normalen Melanocyten festgestellt werden (Heimerl et al, 2007).

Die Expression von *ABCB4* wurde in verschiedenen humanen Geweben analysiert und das höchste mRNA Niveau wurde in der Leber gemessen. Darüber hinaus konnte jedoch eine *ABCB4* Expression auch in normaler Brust, Lunge und Niere beobachtet werden (Abbildung 30 A). Die starke *ABCB4* Expression in der humanen Leber lässt sich mit Befunden aus früheren Studien in Einklang bringen. Eine *ABCB4* Expression in anderen Gewebeproben (z.B. Herz und Muskel) wurde jedoch noch nicht festgestellt (Smit et al, 1995).

In normalen bronchialen Epithelzellen, Mammaepithelzellen und Fibroblasten liegt der *ABCB4*-Promotor unmethyliert ist, jedoch ließ sich in einigen primären Tumorgeweben eine aberrante *ABCB4* Promotor-Methylierung feststellen.

Eine Expression von Maus-*Abcb4* konnte auch in allen untersuchten Normalgeweben (Herz, Leber, Lunge und Niere) gemessen werden (Abbildung 30A). In diesen Geweben liegt die *Abcb4* CpG-Insel jeweils unmethyliert vor. In Lebergeweben und Leberkrebszelllinien Hep-B3 und Hep-2G konnte keine aberrante *ABCB4* Promotor-Methylierung festgestellt werden. Aufgrund der *ABCB4* Transporter Funktion von Phospholipiden von Leber Hepatozyten in die Galle zeigt *ABCB4* eine starke gewebespezifische Expression von *ABCB4* in Leberzellen.

Mutationen des *ABCB4* Gens sind mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert: Unter anderem sind sie bei progressiver familiärer intrahepatischer Cholestase Typ3 verbunden und treten bei Frauen mit intrahepatischer Cholestase in der Schwangerschaft auf. Die mit niedrigen Phospholipid-Spiegeln in der Galle assoziierte rezidivierende Cholelithiasis (LPAC) geht ebenfalls mit Mutationen des *ABCB4*-Gens (7q21.1) einher (de Vree et al, 1998; Denk et al, 2010; Mullenbach et al, 2003).

Einige Patienten mit *ABCB4* Mutationen entwickeln Leberfibrosen, Leberzirrhosen oder Cholangiokarzinome (Tougeron et al, 2012; Wendum et al, 2012). Cholangiokarzinome sind maligne transformierte Leberepitheltumore mit schlechter Prognose, welche von intra- und extrahepatischen Gallengängen ausgehen (Stutes et al, 2007).

Da eine Promotor-Methylierung von Tumor-assoziierten Genen in Cholangiokarzinomen beschrieben wurden (Lee et al, 2002; Stutes et al, 2007), wäre es wichtig den Methylierungsstatus von *ABCB4* in spezifischen Leberkrebsarten zu untersuchen.

*Abcb4 knockout* Mäuse entwickeln chronische Entzündungen des Gallengangs, die zur Entwicklung von Leberfibrose und Hepatozellularkarzinome führen können (Mauad et al, 1994). Andere Tumore wurden bis jetzt noch nicht in *Abcb4 knockout* Mäusen beschrieben.

Mittels 5-Aza-2'-dC- und Zebularin-Behandlung war es möglich *ABCB4* zu demethylieren und die Genaktivität zu reexprimieren (Abbildung 32).

Die Methylierung des *ABCB4* Gens *in vitro* reduzierte dessen Genaktivität dramatisch (Abbildung 30 B). Diese Resultate bestätigt die hypermethylierungsassoziierte Reduktion der *ABCB4*-Expression in Krebszellen.

Um die Fähigkeit von *ABCB4* das Tumorwachstum zu unterdrücken zu testen, wurden Kolonie-Formationsassays in Lungenkrebszelllinien durchgeführt (Abbildung 33). Die Resultate zeigen, dass *ABCB4* signifikant das Koloniewachstum in H322 und A427 Krebszellen unterdrückt. In beiden Zelllinien ist die Expression von *ABCB4* durch aberrante Promotor-Methylierung reduziert bzw. inaktiviert (Abbildung 30C, Abbildung 33). A549 Zellen zeigen nur eine geringe Promotor-Hypermethylierung in Vergleich zu den anderen beiden Zelllinien und zeigten dementsprechend auch

nur eine geringe Reduktion der Fähigkeit zur Kolonie-Formation. In A549-Zellen konnte jedoch die Zellproliferation signifikant reduziert werden (Abbildung 33 B).

Die exakte Funktion von *ABCB4* in Lungen- und Brustepithelzellen wurde noch nicht im Detail analysiert und es daher interessant die Rolle von *ABCB4* in der Pathogenese in Krebs zu entschlüsseln.

## 5. Referenzen

- Adhya S, Gottesman M (1982) Promoter occlusion: transcription through a promoter may inhibit its activity. *Cell* **29**: 939-944
- Agathangelou A, Bieche I, Ahmed-Choudhury J, Nicke B, Dammann R, Baksh S, Gao B, Minna JD, Downward J, Maher ER, Latif F (2003) Identification of novel gene expression targets for the Ras association domain family 1 (RASSF1A) tumor suppressor gene in non-small cell lung cancer and neuroblastoma. *Cancer research* **63**: 5344-5351
- Aimiwu J, Wang H, Chen P, Xie Z, Wang J, Liu S, Klisovic R, Mims A, Blum W, Marcucci G, Chan KK (2012) RNA-dependent inhibition of ribonucleotide reductase is a major pathway for 5-azacytidine activity in acute myeloid leukemia. *Blood* **119**: 5229-5238
- Aldana-Masangkay GI, Sakamoto KM (2011) The role of HDAC6 in cancer. *Journal of biomedicine & biotechnology* **2011**: 875824
- Ali IU, Lidereau R, Callahan R (1989) Presence of two members of c-erbA receptor gene family (c-erbA beta and c-erbA2) in smallest region of somatic homozygosity on chromosome 3p21-p25 in human breast carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* **81**: 1815-1820
- Allis CD, Caparros M-L, Jenuwein T, Reinberg D *Epigenetics*, Second edition. edn.
- Alonso CR (2002) Hox proteins: sculpting body parts by activating localized cell death. *Current biology* : *CB* **12**: R776-778
- Aran D, Sabato S, Hellman A (2013) DNA methylation of distal regulatory sites characterizes dysregulation of cancer genes. *Genome biology* **14**: R21
- Arand J, Spieler D, Karius T, Branco MR, Meilinger D, Meissner A, Jenuwein T, Xu G, Leonhardt H, Wolf V, Walter J (2012) In vivo control of CpG and non-CpG DNA methylation by DNA methyltransferases. *PLoS genetics* **8**: e1002750
- Araujo FD, Knox JD, Szyf M, Price GB, Zannis-Hadjopoulos M (1998) Concurrent replication and methylation at mammalian origins of replication. *Molecular and cellular biology* **18**: 3475-3482
- Arita K, Ariyoshi M, Tochio H, Nakamura Y, Shirakawa M (2008) Recognition of hemi-methylated DNA by the SRA protein UHRF1 by a base-flipping mechanism. *Nature* **455**: 818-821
- Arita K, Isogai S, Oda T, Unoki M, Sugita K, Sekiyama N, Kuwata K, Hamamoto R, Tochio H, Sato M, Ariyoshi M, Shirakawa M (2012) Recognition of modification status on a histone H3 tail by linked histone reader modules of the epigenetic regulator UHRF1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 12950-12955
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics* **25**: 25-29
- Auclair G, Weber M (2012) Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals. *Biochimie* **94**: 2202-2211
- Avvakumov GV, Walker JR, Xue S, Li Y, Duan S, Bronner C, Arrowsmith CH, Dhe-Paganon S (2008) Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature* **455**: 822-825
- Babbio F, Pistore C, Curti L, Castiglioni I, Kunderfranco P, Brino L, Oudet P, Seiler R, Thalman GN, Roggero E, Sarti M, Pinton S, Mello-Grand M, Chiorino G, Catapano CV, Carbone GM, Bonapace IM (2012) The SRA protein UHRF1 promotes epigenetic crosstalks and is involved in prostate cancer progression. *Oncogene* **31**: 4878-4887
- Bachman KE, Park BH, Rhee I, Rajagopalan H, Herman JG, Baylin SB, Kinzler KW, Vogelstein B (2003) Histone modifications and silencing prior to DNA methylation of a tumor suppressor gene. *Cancer cell* **3**: 89-95
- Bagadi SA, Prasad CP, Kaur J, Srivastava A, Prashad R, Gupta SD, Ralhan R (2008) Clinical significance of promoter hypermethylation of RASSF1A, RARbeta2, BRCA1 and HOXA5 in breast cancers of Indian patients. *Life sciences* **82**: 1288-1292
- Bai S, Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Yoon SO, Jacob ST (2005) DNA methyltransferase 3b regulates nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells by recruiting histone deacetylase 2. *Molecular and cellular biology* **25**: 751-766
- Balasubramanian D, Akhtar-Zaidi B, Song L, Bartels CF, Veigl M, Beard L, Myeroff L, Guda K, Lutterbaugh J, Willis J, Crawford GE, Markowitz SD, Scacheri PC (2012) H3K4me3 inversely correlates with DNA methylation at a large class of non-CpG-island-containing start sites. *Genome medicine* **4**: 47
- Banerjee T, Chakravarti D (2011) A peek into the complex realm of histone phosphorylation. *Molecular and cellular biology* **31**: 4858-4873
- Bannister AJ, Kouzarides T (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell research* **21**: 381-395
- Bannister AJ, Zegerman P, Partridge JF, Miska EA, Thomas JO, Allshire RC, Kouzarides T (2001) Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**: 120-124
- Barakat TS, Gribnau J (2012) X chromosome inactivation in the cycle of life. *Development* **139**: 2085-2089
- Barrera V, Peinado MA (2012) Evaluation of single CpG sites as proxies of CpG island methylation states at the genome scale. *Nucleic acids research* **40**: 11490-11498
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* **129**: 823-837

- Bartke T, Vermeulen M, Xhemalce B, Robson SC, Mann M, Kouzarides T (2010) Nucleosome-interacting proteins regulated by DNA and histone methylation. *Cell* **143**: 470-484
- Bashtrykov P, Jankevicius G, Jurkowska RZ, Ragozin S, Jeltsch A (2014) The UHRF1 protein stimulates the activity and specificity of the maintenance DNA methyltransferase DNMT1 by an allosteric mechanism. *The Journal of biological chemistry* **289**: 4106-4115
- Bashtrykov P, Jankevicius G, Smarandache A, Jurkowska RZ, Ragozin S, Jeltsch A (2012) Specificity of Dnmt1 for methylation of hemimethylated CpG sites resides in its catalytic domain. *Chemistry & biology* **19**: 572-578
- Baylin SB (2005) DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature clinical practice Oncology* **2 Suppl 1**: S4-11
- Baylin SB, Jones PA (2011) A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nature reviews Cancer* **11**: 726-734
- Bebek G, Bennett KL, Funchain P, Campbell R, Seth R, Scharpf J, Burkey B, Eng C (2012) Microbiomic subprofiles and MDR1 promoter methylation in head and neck squamous cell carcinoma. *Human molecular genetics* **21**: 1557-1565
- Bell AC, Felsenfeld G (2000) Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. *Nature* **405**: 482-485
- Bell O, Wirbelauer C, Hild M, Scharf AN, Schwaiger M, MacAlpine DM, Zilbermann F, van Leeuwen F, Bell SP, Imhof A, Garza D, Peters AH, Schubeler D (2007) Localized H3K36 methylation states define histone H4K16 acetylation during transcriptional elongation in Drosophila. *The EMBO journal* **26**: 4974-4984
- Ben-Kasus T, Ben-Zvi Z, Marquez VE, Kelley JA, Agbaria R (2005) Metabolic activation of zebularine, a novel DNA methylation inhibitor, in human bladder carcinoma cells. *Biochemical pharmacology* **70**: 121-133
- Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA (2008) An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature genetics* **40**: 499-507
- Bergman Y, Cedar H (2013) DNA methylation dynamics in health and disease. *Nature structural & molecular biology* **20**: 274-281
- Bestor TH, Bourc'his D (2004) Transposon silencing and imprint establishment in mammalian germ cells. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* **69**: 381-387
- Bialik S, Kimchi A (2006) The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annual review of biochemistry* **75**: 189-210
- Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, Delano D, Zhang L, Schroth GP, Gunderson KL, Fan JB, Shen R (2011) High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics* **98**: 288-295
- Billam M, Sobolewski MD, Davidson NE (2010) Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. *Breast cancer research and treatment* **120**: 581-592
- Bird A (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* **16**: 6-21
- Bird A, Taggart M, Frommer M, Miller OJ, Macleod D (1985) A fraction of the mouse genome that is derived from islands of nonmethylated, CpG-rich DNA. *Cell* **40**: 91-99
- Bird AP (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**: 209-213
- Birse CE, Minvielle-Sebastia L, Lee BA, Keller W, Proudfoot NJ (1998) Coupling termination of transcription to messenger RNA maturation in yeast. *Science* **280**: 298-301
- Black JC, Van Rechem C, Whetstone JR (2012) Histone lysine methylation dynamics: establishment, regulation, and biological impact. *Molecular cell* **48**: 491-507
- Blake JA (2013) Ten quick tips for using the gene ontology. *PLoS computational biology* **9**: e1003343
- Bock C, Beerman I, Lien WH, Smith ZD, Gu H, Boyle P, Gnirke A, Fuchs E, Rossi DJ, Meissner A (2012) DNA methylation dynamics during in vivo differentiation of blood and skin stem cells. *Molecular cell* **47**: 633-647
- Bolli N, Payne EM, Rhodes J, Gjini E, Johnston AB, Guo F, Lee JS, Stewart RA, Kanki JP, Chen AT, Zhou Y, Zon LI, Look AT (2011) cpsf1 is required for definitive HSC survival in zebrafish. *Blood* **117**: 3996-4007
- Boorstein RJ, Cummings A, Jr., Marenstein DR, Chan MK, Ma Y, Neubert TA, Brown SM, Teebor GW (2001) Definitive identification of mammalian 5-hydroxymethyluracil DNA N-glycosylase activity as SMUG1. *The Journal of biological chemistry* **276**: 41991-41997
- Borrow J, Stanton VP, Jr., Andresen JM, Becher R, Behm FG, Chaganti RS, Civin CI, Disteche C, Dube I, Frischauf AM, Horsman D, Mitelman F, Volinia S, Watmore AE, Housman DE (1996) The translocation t(8;16)(p11;p13) of acute myeloid leukaemia fuses a putative acetyltransferase to the CREB-binding protein. *Nature genetics* **14**: 33-41
- Bostick M, Kim JK, Esteve PO, Clark A, Pradhan S, Jacobsen SE (2007) UHRF1 plays a role in maintaining DNA methylation in mammalian cells. *Science* **317**: 1760-1764
- Bourc'his D, Bestor TH (2004) Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cells lacking Dnmt3L. *Nature* **431**: 96-99
- Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R (2006) Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* **441**: 349-353
- Boyes J, Bird A (1992) Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *The EMBO journal* **11**: 327-333

- Bracken AP, Pasini D, Capra M, Prosperini E, Colli E, Helin K (2003) EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *The EMBO journal* **22**: 5323-5335
- Bradbury J (2004) Zebularine: a candidate for epigenetic cancer therapy. *Drug discovery today* **9**: 906-907
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**: 248-254
- Brauch H, Johnson B, Hovis J, Yano T, Gazdar A, Pettengill OS, Graziano S, Sorenson GD, Poiesz BJ, Minna J, et al. (1987) Molecular analysis of the short arm of chromosome 3 in small-cell and non-small-cell carcinoma of the lung. *The New England journal of medicine* **317**: 1109-1113
- Brevet M, Fucks D, Chatelain D, Regimbeau JM, Delcenserie R, Sevestre H, Ouadid-Ahidouch H (2009) Deregulation of 2 potassium channels in pancreas adenocarcinomas: implication of KV1.3 gene promoter methylation. *Pancreas* **38**: 649-654
- Brinkman AB, Gu H, Bartels SJ, Zhang Y, Matarese F, Simmer F, Marks H, Bock C, Gnirke A, Meissner A, Stunnenberg HG (2012) Sequential ChIP-bisulfite sequencing enables direct genome-scale investigation of chromatin and DNA methylation cross-talk. *Genome research* **22**: 1128-1138
- Brown R, Strathdee G (2002) Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. *Trends in molecular medicine* **8**: S43-48
- Buckingham L, Penfield Faber L, Kim A, Liptay M, Barger C, Basu S, Fidler M, Walters K, Bonomi P, Coon J (2010) PTEN, RASSF1 and DAPK site-specific hypermethylation and outcome in surgically treated stage I and II nonsmall cell lung cancer patients. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* **126**: 1630-1639
- Buhmeida A, Merdad A, Al-Maghrabi J, Al-Thobaiti F, Ata M, Bugis A, Syrjanen K, Abuzenadah A, Chaudhary A, Gari M, Al-Qahtani M, Dallol A (2011) RASSF1A methylation is predictive of poor prognosis in female breast cancer in a background of overall low methylation frequency. *Anticancer research* **31**: 2975-2981
- Buratowski S (2005) Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Current opinion in cell biology* **17**: 257-261
- Burbee DG, Forgacs E, Zochbauer-Muller S, Shivakumar L, Fong K, Gao B, Randle D, Kondo M, Virmani A, Bader S, Sekido Y, Latif F, Milchgrub S, Toyooka S, Gazdar AF, Lerman MI, Zabarovsky E, White M, Minna JD (2001) Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *Journal of the National Cancer Institute* **93**: 691-699
- Cadet J, Wagner JR (2014) TET enzymatic oxidation of 5-methylcytosine, 5-hydroxymethylcytosine and 5-formylcytosine. *Mutation research Genetic toxicology and environmental mutagenesis* **764-765**: 18-35
- Cai Y, Geutjes EJ, de Lint K, Roepman P, Bruurs L, Yu LR, Wang W, van Blijswijk J, Mohammad H, de Rink I, Bernards R, Baylin SB (2014) The NuRD complex cooperates with DNMTs to maintain silencing of key colorectal tumor suppressor genes. *Oncogene* **33**: 2157-2168
- Callen BP, Shearwin KE, Egan JB (2004) Transcriptional interference between convergent promoters caused by elongation over the promoter. *Molecular cell* **14**: 647-656
- Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y (2002) Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* **298**: 1039-1043
- Carlson LL, Page AW, Bestor TH (1992) Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: implications for genomic imprinting. *Genes & development* **6**: 2536-2541
- Castanotto D, Tommasi S, Li M, Li H, Yanow S, Pfeifer GP, Rossi JJ (2005) Short hairpin RNA-directed cytosine (CpG) methylation of the RASSF1A gene promoter in HeLa cells. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **12**: 179-183
- Cedar H, Bergman Y (2009) Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nature reviews Genetics* **10**: 295-304
- Chaffanet M, Gressin L, Preudhomme C, Soenen-Cornu V, Birnbaum D, Pebusque MJ (2000) MOZ is fused to p300 in an acute monocytic leukemia with t(8;22). *Genes, chromosomes & cancer* **28**: 138-144
- Champion C, Guianvarc'h D, Senamaud-Beaufort C, Jurkowska RZ, Jeltsch A, Ponger L, Arimondo PB, Guieysse-Peugeot AL (2010) Mechanistic insights on the inhibition of c5 DNA methyltransferases by zebularine. *PLoS one* **5**: e12388
- Chan SW, Zilberman D, Xie Z, Johansen LK, Carrington JC, Jacobsen SE (2004) RNA silencing genes control de novo DNA methylation. *Science* **303**: 1336
- Chandrasekharan MB, Huang F, Sun ZW (2009) Ubiquitination of histone H2B regulates chromatin dynamics by enhancing nucleosome stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 16686-16691
- Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK (2007) JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science* **318**: 444-447
- Chang JW, Hsu HS, Ni HJ, Chuang CT, Hsiung CH, Huang TH, Wang YC (2010) Distinct epigenetic domains separated by a CTCF bound insulator between the tandem genes, BLU and RASSF1A. *PLoS one* **5**: e12847
- Chang Y, Sun L, Kokura K, Horton JR, Fukuda M, Espejo A, Izumi V, Koomen JM, Bedford MT, Zhang X, Shinkai Y, Fang J, Cheng X (2011) MPP8 mediates the interactions between DNA methyltransferase Dnmt3a and H3K9 methyltransferase GLP/G9a. *Nature communications* **2**: 533
- Chedin F, Lieber MR, Hsieh CL (2002) The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 16916-16921
- Chen C, Grennan K, Badner J, Zhang D, Gershon E, Jin L, Liu C (2011) Removing batch effects in analysis of expression microarray data: an evaluation of six batch adjustment methods. *PLoS one* **6**: e17238

- Chen J, Luo Q, Yuan Y, Huang X, Cai W, Li C, Wei T, Zhang L, Yang M, Liu Q, Ye G, Dai X, Li B (2010) Pygo2 associates with MLL2 histone methyltransferase and GCN5 histone acetyltransferase complexes to augment Wnt target gene expression and breast cancer stem-like cell expansion. *Molecular and cellular biology* **30**: 5621-5635
- Chen K, Chen Z, Wu D, Zhang L, Lin X, Su J, Rodriguez B, Xi Y, Xia Z, Chen X, Shi X, Wang Q, Li W (2015) Broad H3K4me3 is associated with increased transcription elongation and enhancer activity at tumor-suppressor genes. *Nature genetics* **47**: 1149-1157
- Chen RA, Stempor P, Down TA, Zeiser E, Feuer SK, Ahringer J (2014) Extreme HOT regions are CpG-dense promoters in *C. elegans* and humans. *Genome research* **24**: 1138-1146
- Chen T, Dent SY (2014) Chromatin modifiers and remodellers: regulators of cellular differentiation. *Nature reviews Genetics* **15**: 93-106
- Chen T, Ueda Y, Dodge JE, Wang Z, Li E (2003) Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Molecular and cellular biology* **23**: 5594-5605
- Chen W, Guo W, Li M, Shi D, Tian Y, Li Z, Wang J, Fu L, Xiao X, Liu QQ, Wang S, Huang W, Deng W (2013a) Upregulation of cleavage and polyadenylation specific factor 4 in lung adenocarcinoma and its critical role for cancer cell survival and proliferation. *PLoS one* **8**: e82728
- Chen YA, Lemire M, Choufani S, Butcher DT, Grafodatskaya D, Zanke BW, Gallinger S, Hudson TJ, Weksberg R (2013b) Discovery of cross-reactive probes and polymorphic CpGs in the Illumina Infinium HumanMethylation450 microarray. *Epigenetics* **8**: 203-209
- Chen YH, Hung MC, Li LY (2012) EZH2: a pivotal regulator in controlling cell differentiation. *American journal of translational research* **4**: 364-375
- Chen ZX, Mann JR, Hsieh CL, Riggs AD, Chedin F (2005) Physical and functional interactions between the human DNMT3L protein and members of the de novo methyltransferase family. *Journal of cellular biochemistry* **95**: 902-917
- Chen ZX, Riggs AD (2011) DNA methylation and demethylation in mammals. *The Journal of biological chemistry* **286**: 18347-18353
- Cheng J, Yang Y, Fang J, Xiao J, Zhu T, Chen F, Wang P, Li Z, Yang H, Xu Y (2013) Structural insight into coordinated recognition of trimethylated histone H3 lysine 9 (H3K9me3) by the plant homeodomain (PHD) and tandem tudor domain (TTD) of UHRF1 (ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1) protein. *The Journal of biological chemistry* **288**: 1329-1339
- Cheng JC, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Liang G, Xu GL, Hu YG, Marquez VE, Jones PA (2004a) Continuous zebularine treatment effectively sustains demethylation in human bladder cancer cells. *Molecular and cellular biology* **24**: 1270-1278
- Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, Liang G, Marquez VE, Greer S, Orntoft TF, Thykjaer T, Jones PA (2004b) Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer cell* **6**: 151-158
- Cheng X (1995) Structure and function of DNA methyltransferases. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **24**: 293-318
- Chestier A, Yaniv M (1979) Rapid turnover of acetyl groups in the four core histones of simian virus 40 minichromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **76**: 46-50
- Chiche L, Dao T, Salame E, Galais MP, Bouvard N, Schmutz G, Rousselot P, Bioulac-Sage P, Segol P, Gignoux M (2000) Liver adenomatosis: reappraisal, diagnosis, and surgical management: eight new cases and review of the literature. *Annals of surgery* **231**: 74-81
- Choi JH, Kwon HJ, Yoon BI, Kim JH, Han SU, Joo HJ, Kim DY (2001) Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Japanese journal of cancer research : Gann* **92**: 1300-1304
- Choi JK, Bae JB, Lyu J, Kim TY, Kim YJ (2009) Nucleosome deposition and DNA methylation at coding region boundaries. *Genome biology* **10**: R89
- Choi SH, Heo K, Byun HM, An W, Lu W, Yang AS (2011) Identification of preferential target sites for human DNA methyltransferases. *Nucleic acids research* **39**: 104-118
- Chow LS, Lam CW, Chan SY, Tsao SW, To KF, Tong SF, Hung WK, Dammann R, Huang DP, Lo KW (2006) Identification of RASSF1A modulated genes in nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene* **25**: 310-316
- Chow LS, Lo KW, Kwong J, To KF, Tsang KS, Lam CW, Dammann R, Huang DP (2004) RASSF1A is a target tumor suppressor from 3p21.3 in nasopharyngeal carcinoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* **109**: 839-847
- Christman JK (2002) 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* **21**: 5483-5495
- Cihak A, Madar J, Vesely J (1980) Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on antibody formation and DNA synthesis in rat spleen. *Zeitschrift fur Naturforschung Section C: Biosciences* **35**: 112-116
- Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994) High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic acids research* **22**: 2990-2997
- Clouaire T, Webb S, Skene P, Illingworth R, Kerr A, Andrews R, Lee JH, Skalnik D, Bird A (2012) Cfp1 integrates both CpG content and gene activity for accurate H3K4me3 deposition in embryonic stem cells. *Genes & development* **26**: 1714-1728
- Cocozza S, Akhtar MM, Miele G, Monticelli A (2011) CpG islands undermethylation in human genomic regions under selective pressure. *PLoS one* **6**: e23156
- Collins RE, Northrop JP, Horton JR, Lee DY, Zhang X, Stallcup MR, Cheng X (2008) The ankyrin repeats of G9a and GLP histone methyltransferases are mono- and dimethyllysine binding modules. *Nature structural & molecular biology* **15**: 245-250
- Communi D, Parmentier M, Boeynaems JM (1996) Cloning, functional expression and tissue distribution of the human P2Y6 receptor. *Biochemical and biophysical research communications* **222**: 303-308

- Conerly M, Grady WM (2010) Insights into the role of DNA methylation in disease through the use of mouse models. *Disease models & mechanisms* **3**: 290-297
- Connelly S, Manley JL (1988) A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II. *Genes & development* **2**: 440-452
- Constantinides PG, Jones PA, Gevers W (1977) Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature* **267**: 364-366
- Constantinides PG, Taylor SM, Jones PA (1978) Phenotypic conversion of cultured mouse embryo cells by aza pyrimidine nucleosides. *Developmental biology* **66**: 57-71
- Cooper DN, Mort M, Stenson PD, Ball EV, Chuzhanova NA (2010) Methylation-mediated deamination of 5-methylcytosine appears to give rise to mutations causing human inherited disease in CpNpG trinucleotides, as well as in CpG dinucleotides. *Human genomics* **4**: 406-410
- Cortellino S, Xu J, Sannai M, Moore R, Caretti E, Cigliano A, Le Coz M, Devarajan K, Wessels A, Soprano D, Abramowitz LK, Bartolomei MS, Rambow F, Bassi MR, Bruno T, Fanciulli M, Renner C, Klein-Szanto AJ, Matsumoto Y, Kobi D, Davidson I, Alberti C, Larue L, Bellacosa A (2011) Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair. *Cell* **146**: 67-79
- Cress WD, Seto E (2000) Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *Journal of cellular physiology* **184**: 1-16
- Curradi M, Izzo A, Badaracco G, Landsberger N (2002) Molecular mechanisms of gene silencing mediated by DNA methylation. *Molecular and cellular biology* **22**: 3157-3173
- Dalol A, Agathangelou A, Fenton SL, Ahmed-Choudhury J, Hesson L, Vos MD, Clark GJ, Downward J, Maher ER, Latif F (2004) RASSF1A interacts with microtubule-associated proteins and modulates microtubule dynamics. *Cancer research* **64**: 4112-4116
- Dalton SR, Bellacosa A (2012) DNA demethylation by TDG. *Epigenomics* **4**: 459-467
- Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP (2000) Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nature genetics* **25**: 315-319
- Dammann R, Schagdarsurengin U, Liu L, Otto N, Gimm O, Dralle H, Boehm BO, Pfeifer GP, Hoang-Vu C (2003) Frequent RASSF1A promoter hypermethylation and K-ras mutations in pancreatic carcinoma. *Oncogene* **22**: 3806-3812
- Dammann R, Schagdarsurengin U, Seidel C, Strunnikova M, Rastetter M, Baier K, Pfeifer GP (2005a) The tumor suppressor RASSF1A in human carcinogenesis: an update. *Histology and histopathology* **20**: 645-663
- Dammann R, Strunnikova M, Schagdarsurengin U, Rastetter M, Papritz M, Hattenhorst UE, Hofmann HS, Silber RE, Burdach S, Hansen G (2005b) CpG island methylation and expression of tumour-associated genes in lung carcinoma. *Eur J Cancer* **41**: 1223-1236
- Dammann R, Takahashi T, Pfeifer GP (2001) The CpG island of the novel tumor suppressor gene RASSF1A is intensely methylated in primary small cell lung carcinomas. *Oncogene* **20**: 3563-3567
- Dammann RH, Kirsch S, Schagdarsurengin U, Dansranjav T, Gradhand E, Schmitt WD, Hauptmann S (2010) Frequent aberrant methylation of the imprinted IGF2/H19 locus and LINE1 hypomethylation in ovarian carcinoma. *International journal of oncology* **36**: 171-179
- Danielsen SA, Lind GE, Kolberg M, Holand M, Bjerkehagen B, Sundby Hall K, van den Berg E, Mertens F, Smeland S, Picci P, Lothe RA (2015) Methylated RASSF1A in malignant peripheral nerve sheath tumors identifies neurofibromatosis type 1 patients with inferior prognosis. *Neuro-oncology* **17**: 63-69
- Dass B, Attaya EN, Michelle Wallace A, MacDonald CC (2001) Overexpression of the CstF-64 and CPSF-160 polyadenylation protein messenger RNAs in mouse male germ cells. *Biology of reproduction* **64**: 1722-1729
- Davie JR (1998) Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates. *Current opinion in genetics & development* **8**: 173-178
- de Carcer G, Escobar B, Higuero AM, Garcia L, Anson A, Perez G, Mollejo M, Manning G, Melendez B, Abad-Rodriguez J, Malumbres M (2011) Plk5, a polo box domain-only protein with specific roles in neuron differentiation and glioblastoma suppression. *Molecular and cellular biology* **31**: 1225-1239
- De Carvalho DD, Sharma S, You JS, Su SF, Taberlay PC, Kelly TK, Yang X, Liang G, Jones PA (2012) DNA methylation screening identifies driver epigenetic events of cancer cell survival. *Cancer cell* **21**: 655-667
- de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB (2003) Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *The Biochemical journal* **370**: 737-749
- de Vree JM, Jacquemin E, Sturm E, Cresteil D, Bosma PJ, Aten J, Deleuze JF, Desrochers M, Burdelski M, Bernard O, Oude Elferink RP, Hadchouel M (1998) Mutations in the MDR3 gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**: 282-287
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome research* **11**: 1156-1166
- Deaton AM, Bird A (2011) CpG islands and the regulation of transcription. *Genes & development* **25**: 1010-1022
- Dedeurwaerder S, Defrance M, Calonne E, Denis H, Sotiriou C, Fuks F (2011) Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology. *Epigenomics* **3**: 771-784
- Delcuve GP, Khan DH, Davie JR (2012) Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clinical epigenetics* **4**: 5
- Denis H, Ndlovu MN, Fuks F (2011) Regulation of mammalian DNA methyltransferases: a route to new mechanisms. *EMBO reports* **12**: 647-656

- Denk GU, Bikker H, Lekanne Dit Deprez RH, Terpstra V, van der Loos C, Beuers U, Rust C, Pust T (2010) ABCB4 deficiency: A family saga of early onset cholelithiasis, sclerosing cholangitis and cirrhosis and a novel mutation in the ABCB4 gene. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology* **40**: 937-941
- Devilee P, van den Broek M, Kuipers-Dijkshoorn N, Kolluri R, Khan PM, Pearson PL, Cornelisse CJ (1989) At least four different chromosomal regions are involved in loss of heterozygosity in human breast carcinoma. *Genomics* **5**: 554-560
- Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M, Fuks F, Lo Coco F, Kouzarides T, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG (2002) Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* **295**: 1079-1082
- Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ, Feinberg AP (2009) Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nature genetics* **41**: 1350-1353
- Dong KB, Maksakova IA, Mohn F, Leung D, Appanah R, Lee S, Yang HW, Lam LL, Mager DL, Schubeler D, Tachibana M, Shinkai Y, Lorincz MC (2008) DNA methylation in ES cells requires the lysine methyltransferase G9a but not its catalytic activity. *The EMBO journal* **27**: 2691-2701
- Dong X, Weng Z (2013) The correlation between histone modifications and gene expression. *Epigenomics* **5**: 113-116
- Donninger H, Vos MD, Clark GJ (2007) The RASSF1A tumor suppressor. *Journal of cell science* **120**: 3163-3172
- Dreijerink K, Braga E, Kuzmin I, Geil L, Duh FM, Angeloni D, Zbar B, Lerman MI, Stanbridge EJ, Minna JD, Protopopov A, Li J, Kashuba V, Klein G, Zabarovsky ER (2001) The candidate tumor suppressor gene, RASSF1A, from human chromosome 3p21.3 is involved in kidney tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**: 7504-7509
- Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R (2003) Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* **300**: 455
- Eden S, Hashimshony T, Keshet I, Cedar H, Thorne AW (1998) DNA methylation models histone acetylation. *Nature* **394**: 842
- Edmunds JW, Mahadevan LC, Clayton AL (2008) Dynamic histone H3 methylation during gene induction: HYPB/Setd2 mediates all H3K36 trimethylation. *The EMBO journal* **27**: 406-420
- Edwards JR, O'Donnell AH, Rollins RA, Peckham HE, Lee C, Milekic MH, Chanrion B, Fu Y, Su T, Hibshoosh H, Gingrich JA, Haghghi F, Nutter R, Bestor TH (2010) Chromatin and sequence features that define the fine and gross structure of genomic methylation patterns. *Genome research* **20**: 972-980
- Ehrlich M (2002) DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* **21**: 5400-5413
- Ehrlich M (2009) DNA hypomethylation in cancer cells. *Epigenomics* **1**: 239-259
- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C (1982) Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic acids research* **10**: 2709-2721
- el-Deiry WS, Nelkin BD, Celano P, Yen RW, Falco JP, Hamilton SR, Baylin SB (1991) High expression of the DNA methyltransferase gene characterizes human neoplastic cells and progression stages of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**: 3470-3474
- Endoh H, Yatabe Y, Shimizu S, Tajima K, Kuwano H, Takahashi T, Mitsudomi T (2003) RASSF1A gene inactivation in non-small cell lung cancer and its clinical implication. *International journal of cancer Journal international du cancer* **106**: 45-51
- Epsztejn-Litman S, Feldman N, Abu-Remaileh M, Shufaro Y, Gerson A, Ueda J, Deplus R, Fuks F, Shinkai Y, Cedar H, Bergman Y (2008) De novo DNA methylation promoted by G9a prevents reprogramming of embryonically silenced genes. *Nature structural & molecular biology* **15**: 1176-1183
- Espada J, Ballestar E, Fraga MF, Villar-Garea A, Juarranz A, Stockert JC, Robertson KD, Fuks F, Esteller M (2004) Human DNA methyltransferase 1 is required for maintenance of the histone H3 modification pattern. *The Journal of biological chemistry* **279**: 37175-37184
- Esteller M (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* **21**: 5427-5440
- Esteller M (2005) Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annual review of pharmacology and toxicology* **45**: 629-656
- Esteller M (2008) Epigenetics in cancer. *The New England journal of medicine* **358**: 1148-1159
- Esteve PO, Chin HG, Smallwood A, Feehery GR, Gangisetty O, Karpf AR, Carey MF, Pradhan S (2006) Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes & development* **20**: 3089-3103
- Estrabaud E, Lassot I, Blot G, Le Rouzic E, Tanchou V, Quemeneur E, Daviet L, Margottin-Goguet F, Benarous R (2007) RASSF1C, an isoform of the tumor suppressor RASSF1A, promotes the accumulation of beta-catenin by interacting with betaTrCP. *Cancer research* **67**: 1054-1061
- Eszterhas SK, Bouhassira EE, Martin DI, Fiering S (2002) Transcriptional interference by independently regulated genes occurs in any relative arrangement of the genes and is influenced by chromosomal integration position. *Molecular and cellular biology* **22**: 469-479
- Eustermann S, Yang JC, Law MJ, Amos R, Chapman LM, Jelinska C, Garrick D, Clynes D, Gibbons RJ, Rhodes D, Higgs DR, Neuhaus D (2011) Combinatorial readout of histone H3 modifications specifies localization of ATRX to heterochromatin. *Nature structural & molecular biology* **18**: 777-782
- Fackler MJ, Umbricht CB, Williams D, Argani P, Cruz LA, Merino VF, Teo WW, Zhang Z, Huang P, Visvanathan K, Marks J, Ethier S, Gray JW, Wolff AC, Cope LM, Sukumar S (2011) Genome-wide methylation analysis identifies genes specific to breast cancer hormone receptor status and risk of recurrence. *Cancer research* **71**: 6195-6207

- Fajas L, Paul C, Zugasti O, Le Cam L, Polanowska J, Fabrizio E, Medema R, Vignais ML, Sardet C (2000) pRB binds to and modulates the transrepressing activity of the E1A-regulated transcription factor p120E4F. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 7738-7743
- Fatemi M, Hermann A, Gowher H, Jeltsch A (2002) Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *European journal of biochemistry / FEBS* **269**: 4981-4984
- Feinberg AP (2007) Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature* **447**: 433-440
- Fendri A, Masmoudi A, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M, Ghorbel A, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R (2009) Inactivation of RASSF1A, RARbeta2 and DAP-kinase by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer biology & therapy* **8**: 444-451
- Feng W, Orlandi R, Zhao N, Carcangiu ML, Tagliabue E, Xu J, Bast RC, Jr., Yu Y (2010) Tumor suppressor genes are frequently methylated in lymph node metastases of breast cancers. *BMC cancer* **10**: 378
- Fierz B, Chatterjee C, McGinty RK, Bar-Dagan M, Raleigh DP, Muir TW (2011) Histone H2B ubiquitylation disrupts local and higher-order chromatin compaction. *Nature chemical biology* **7**: 113-119
- Figuroa ME, Wouters BJ, Skrabanek L, Glass J, Li Y, Erpelink-Verschueren CA, Langerak AW, Lowenberg B, Fazzari M, Grealley JM, Valk PJ, Melnick A, Delwel R (2009) Genome-wide epigenetic analysis delineates a biologically distinct immature acute leukemia with myeloid/T-lymphoid features. *Blood* **113**: 2795-2804
- Firestein R, Cui X, Huie P, Cleary ML (2000) Set domain-dependent regulation of transcriptional silencing and growth control by SUV39H1, a mammalian ortholog of Drosophila Su(var)3-9. *Molecular and cellular biology* **20**: 4900-4909
- Fischer JR, Ohnmacht U, Rieger N, Zemaitis M, Stoffregen C, Kostrzewa M, Buchholz E, Manegold C, Lahm H (2006) Promoter methylation of RASSF1A, RARbeta and DAPK predict poor prognosis of patients with malignant mesothelioma. *Lung Cancer* **54**: 109-116
- Fischle W, Tseng BS, Dormann HL, Ueberheide BM, Garcia BA, Shabanowitz J, Hunt DF, Funabiki H, Allis CD (2005) Regulation of HP1-chromatin binding by histone H3 methylation and phosphorylation. *Nature* **438**: 1116-1122
- Flotho C, Claus R, Batz C, Schneider M, Sandrock I, Ihde S, Plass C, Niemeyer CM, Lubbert M (2009) The DNA methyltransferase inhibitors azacitidine, decitabine and zebularine exert differential effects on cancer gene expression in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* **23**: 1019-1028
- Fortin JP, Labbe A, Lemire M, Zanke BW, Hudson TJ, Fertig EJ, Greenwood CM, Hansen KD (2014) Functional normalization of 450k methylation array data improves replication in large cancer studies. *Genome biology* **15**: 503
- Foster JH, Donohue TA, Berman MM (1978) Familial liver-cell adenomas and diabetes mellitus. *The New England journal of medicine* **299**: 239-241
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Perez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M (2005) Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature genetics* **37**: 391-400
- Frankham R (1988) Molecular hypotheses for position-effect variegation: anti-sense transcription and promoter occlusion. *Journal of theoretical biology* **135**: 85-107
- Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T (2000) DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature genetics* **24**: 88-91
- Fuks F, Hurd PJ, Deplus R, Kouzarides T (2003) The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic acids research* **31**: 2305-2312
- Gal-Yam EN, Egger G, Iniguez L, Holster H, Einarsson S, Zhang X, Lin JC, Liang G, Jones PA, Tanay A (2008) Frequent switching of Polycomb repressive marks and DNA hypermethylation in the PC3 prostate cancer cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**: 12979-12984
- Galdieri L, Vancura A (2012) Acetyl-CoA carboxylase regulates global histone acetylation. *The Journal of biological chemistry* **287**: 23865-23876
- Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M (1983) The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic acids research* **11**: 6883-6894
- Gao F, Ji G, Gao Z, Han X, Ye M, Yuan Z, Luo H, Huang X, Natarajan K, Wang J, Yang H, Zhang X (2014) Direct ChIP-bisulfite sequencing reveals a role of H3K27me3 mediating aberrant hypermethylation of promoter CpG islands in cancer cells. *Genomics* **103**: 204-210
- Gao Q, Steine EJ, Barrasa MI, Hockemeyer D, Pawlak M, Fu D, Reddy S, Bell GW, Jaenisch R (2011) Deletion of the de novo DNA methyltransferase Dnmt3a promotes lung tumor progression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**: 18061-18066
- Gao T, Wang S, He B, Pan Y, Song G, Gu L, Chen L, Nie Z, Xu Y, Li R (2012) The association of RAS association domain family Protein1A (RASSF1A) methylation states and bladder cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PloS one* **7**: e48300
- Geeleher P, Hartnett L, Egan LJ, Golden A, Raja Ali RA, Seoighe C (2013) Gene-set analysis is severely biased when applied to genome-wide methylation data. *Bioinformatics* **29**: 1851-1857
- Gehring WJ (1992) The homeobox in perspective. *Trends in biochemical sciences* **17**: 277-280
- Gelato KA, Tauber M, Ong MS, Winter S, Hiragami-Hamada K, Sindlinger J, Lemak A, Bultsma Y, Houliston S, Schwarzer D, Divecha N, Arrowsmith CH, Fischle W (2014) Accessibility of different histone H3-binding domains of UHRF1 is allosterically regulated by phosphatidylinositol 5-phosphate. *Molecular cell* **54**: 905-919

- Ghosh S, Ghosh A, Maiti GP, Alam N, Roy A, Roy B, Roychoudhury S, Panda CK (2008) Alterations of 3p21.31 tumor suppressor genes in head and neck squamous cell carcinoma: Correlation with progression and prognosis. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* **123**: 2594-2604
- Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T, Jacob ST (2005) 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Molecular and cellular biology* **25**: 4727-4741
- Girault I, Lerebours F, Amarir S, Tozlu S, Tubiana-Hulin M, Lidereau R, Bieche I (2003a) Expression analysis of estrogen receptor alpha coregulators in breast carcinoma: evidence that NCOR1 expression is predictive of the response to tamoxifen. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**: 1259-1266
- Girault I, Tozlu S, Lidereau R, Bieche I (2003b) Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**: 4415-4422
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E (2005) Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* **363**: 15-23
- Gnyszka A, Jastrzebski Z, Flis S (2013) DNA methyltransferase inhibitors and their emerging role in epigenetic therapy of cancer. *Anticancer research* **33**: 2989-2996
- Gobel G, Auer D, Gaugg I, Schneitter A, Lesche R, Muller-Holzner E, Marth C, Daxenbichler G (2011) Prognostic significance of methylated RASSF1A and PITX2 genes in blood- and bone marrow plasma of breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment* **130**: 109-117
- Gokul G, Ramakrishna G, Khosla S (2009) Reprogramming of HeLa cells upon DNMT3L overexpression mimics carcinogenesis. *Epigenetics* **4**: 322-329
- Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Shan J, Su Z, Fields CR, Vieweg J, Hamazaki T, Schwartz PH, Terada N, Robertson KD (2009) A novel DNMT3B splice variant expressed in tumor and pluripotent cells modulates genomic DNA methylation patterns and displays altered DNA binding. *Molecular cancer research : MCR* **7**: 1622-1634
- Gordon M, El-Kalla M, Baksh S (2012) RASSF1 Polymorphisms in Cancer. *Molecular biology international* **2012**: 365213
- Gowher H, Liebert K, Hermann A, Xu G, Jeltsch A (2005) Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *The Journal of biological chemistry* **280**: 13341-13348
- Goyal R, Reinhardt R, Jeltsch A (2006) Accuracy of DNA methylation pattern preservation by the Dnmt1 methyltransferase. *Nucleic acids research* **34**: 1182-1188
- Grandi FC, Rosser JM, Newkirk SJ, Yin J, Jiang X, Xing Z, Whitmore L, Bashir S, Ivics Z, Izsvak Z, Ye P, Yu YE, An W (2015) Retrotransposition creates sloping shores: a graded influence of hypomethylated CpG islands on flanking CpG sites. *Genome research* **25**: 1135-1146
- Gravina GL, Festuccia C, Marampon F, Popov VM, Pestell RG, Zani BM, Tombolini V (2010) Biological rationale for the use of DNA methyltransferase inhibitors as new strategy for modulation of tumor response to chemotherapy and radiation. *Molecular cancer* **9**: 305
- Grawenda AM, O'Neill E (2015) Clinical utility of RASSF1A methylation in human malignancies. *British journal of cancer* **113**: 372-381
- Grayson DR, Guidotti A (2013) The dynamics of DNA methylation in schizophrenia and related psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology* **38**: 138-166
- Green VA, Weinberg MS (2011) Small RNA-induced transcriptional gene regulation in mammals mechanisms, therapeutic applications, and scope within the genome. *Progress in molecular biology and translational science* **102**: 11-46
- Guo C, Tommasi S, Liu L, Yee JK, Dammann R, Pfeifer GP (2007) RASSF1A is part of a complex similar to the Drosophila Hippo/Salvador/Lats tumor-suppressor network. *Current biology : CB* **17**: 700-705
- Guo S, Yan F, Xu J, Bao Y, Zhu J, Wang X, Wu J, Li Y, Pu W, Liu Y, Jiang Z, Ma Y, Chen X, Xiong M, Jin L, Wang J (2015) Identification and validation of the methylation biomarkers of non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clinical epigenetics* **7**: 3
- Guo SQ, Zhang YZ (2012) Histone deacetylase inhibition: an important mechanism in the treatment of lymphoma. *Cancer biology & medicine* **9**: 85-89
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN (2009) The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nature reviews Genetics* **10**: 32-42
- Hagarman JA, Motley MP, Kristjansdottir K, Soloway PD (2013) Coordinate regulation of DNA methylation and H3K27me3 in mouse embryonic stem cells. *PLoS one* **8**: e53880
- Hagemann S (2010), Dissertation: Charakterisierung von DNA-Demethylierungs-Mechanismen zur Optimierung der epigenetischen Therapie
- Hagemann S, Heil O, Lyko F, Brueckner B (2011) Azacytidine and decitabine induce gene-specific and non-random DNA demethylation in human cancer cell lines. *PLoS one* **6**: e17388
- Hagrass HA, Pasha HF, Shaheen MA, Abdel Bary EH, Kassem R (2014) Methylation status and protein expression of RASSF1A in breast cancer patients. *Molecular biology reports* **41**: 57-65
- Hahn MA, Wu X, Li AX, Hahn T, Pfeifer GP (2011) Relationship between gene body DNA methylation and intragenic H3K9me3 and H3K36me3 chromatin marks. *PLoS one* **6**: e18844
- Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, Walter J, Surani MA (2002) Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mechanisms of development* **117**: 15-23

- Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN (2004) Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *The Prostate* **59**: 177-189
- Han H, Cortez CC, Yang X, Nichols PW, Jones PA, Liang G (2011) DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter. *Human molecular genetics* **20**: 4299-4310
- Han L, Su B, Li WH, Zhao Z (2008) CpG island density and its correlations with genomic features in mammalian genomes. *Genome biology* **9**: R79
- Hanahan D, Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**: 646-674
- Hannum G, Guinney J, Zhao L, Zhang L, Hughes G, Sada S, Klotzle B, Bibikova M, Fan JB, Gao Y, Deconde R, Chen M, Rajapakse I, Friend S, Ideker T, Zhang K (2013) Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates. *Molecular cell* **49**: 359-367
- Hansen KD, Timp W, Bravo HC, Sabuncian S, Langmead B, McDonald OG, Wen B, Wu H, Liu Y, Diep D, Briem E, Zhang K, Irizarry RA, Feinberg AP (2011) Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types. *Nature genetics* **43**: 768-775
- Hargreaves DC, Crabtree GR (2011) ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell research* **21**: 396-420
- Harper KN, Peters BA, Gamble MV (2013) Batch effects and pathway analysis: two potential perils in cancer studies involving DNA methylation array analysis. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **22**: 1052-1060
- Hashimoto H, Horton JR, Zhang X, Bostick M, Jacobsen SE, Cheng X (2008) The SRA domain of UHRF1 flips 5-methylcytosine out of the DNA helix. *Nature* **455**: 826-829
- Hata S, Hamada J, Maeda K, Murai T, Tada M, Furukawa H, Tsutsumida A, Saito A, Yamamoto Y, Moriuchi T (2008) PAX4 has the potential to function as a tumor suppressor in human melanoma. *International journal of oncology* **33**: 1065-1071
- Hayami S, Kelly JD, Cho HS, Yoshimatsu M, Unoki M, Tsunoda T, Field HI, Neal DE, Yamaue H, Ponder BA, Nakamura Y, Hamamoto R (2011) Overexpression of LSD1 contributes to human carcinogenesis through chromatin regulation in various cancers. *International journal of cancer Journal international du cancer* **128**: 574-586
- Hebbes TR, Thorne AW, Crane-Robinson C (1988) A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *The EMBO journal* **7**: 1395-1402
- Heimerl S, Bosserhoff AK, Langmann T, Ecker J, Schmitz G (2007) Mapping ATP-binding cassette transporter gene expression profiles in melanocytes and melanoma cells. *Melanoma research* **17**: 265-273
- Hemberger M, Dean W, Reik W (2009) Epigenetic dynamics of stem cells and cell lineage commitment: digging Waddington's canal. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**: 526-537
- Henikoff S, Shilatifard A (2011) Histone modification: cause or cog? *Trends in genetics : TIG* **27**: 389-396
- Herranz M, Martin-Caballero J, Fraga MF, Ruiz-Cabello J, Flores JM, Desco M, Marquez V, Esteller M (2006) The novel DNA methylation inhibitor zebularine is effective against the development of murine T-cell lymphoma. *Blood* **107**: 1174-1177
- Hesson L, Bieche I, Krex D, Criniere E, Hoang-Xuan K, Maher ER, Latif F (2004) Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A and BLU genes located within the critical 3p21.3 region in gliomas. *Oncogene* **23**: 2408-2419
- Hesson LB, Cooper WN, Latif F (2007) The role of RASSF1A methylation in cancer. *Disease markers* **23**: 73-87
- Hilwig I, Gropp A (1972) Staining of constitutive heterochromatin in mammalian chromosomes with a new fluorochrome. *Experimental cell research* **75**: 122-126
- Hirose Y, Manley JL (2000) RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes & development* **14**: 1415-1429
- Højfeldt JW, Agger K, Helin K (2013) Histone lysine demethylases as targets for anticancer therapy. *Nature reviews Drug discovery* **12**: 917-930
- Hollenbach PW, Nguyen AN, Brady H, Williams M, Ning Y, Richard N, Krushel L, Aukerman SL, Heise C, MacBeth KJ (2010) A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PloS one* **5**: e9001
- Holliday R, Pugh JE (1975) DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* **187**: 226-232
- Homma N, Tamura G, Honda T, Matsumoto Y, Nishizuka S, Kawata S, Motoyama T (2006) Spreading of methylation within RUNX3 CpG island in gastric cancer. *Cancer science* **97**: 51-56
- Hong H, Kao C, Jeng MH, Eble JN, Koch MO, Gardner TA, Zhang S, Li L, Pan CX, Hu Z, MacLennan GT, Cheng L (2004) Aberrant expression of CARM1, a transcriptional coactivator of androgen receptor, in the development of prostate carcinoma and androgen-independent status. *Cancer* **101**: 83-89
- Hong L, Schroth GP, Matthews HR, Yau P, Bradbury EM (1993) Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *The Journal of biological chemistry* **268**: 305-314
- Horvath S (2013) DNA methylation age of human tissues and cell types. *Genome biology* **14**: R115
- Hsin JP, Manley JL (2012) The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes & development* **26**: 2119-2137
- Hu L, Li Z, Wang P, Lin Y, Xu Y (2011) Crystal structure of PHD domain of UHRF1 and insights into recognition of unmodified histone H3 arginine residue 2. *Cell research* **21**: 1374-1378

- Huang BH, Laban M, Leung CH, Lee L, Lee CK, Salto-Tellez M, Raju GC, Hooi SC (2005) Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell death and differentiation* **12**: 395-404
- Huang C, Xu M, Zhu B (2013) Epigenetic inheritance mediated by histone lysine methylation: maintaining transcriptional states without the precise restoration of marks? *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **368**: 20110332
- Huang X, Jan LY (2014) Targeting potassium channels in cancer. *The Journal of cell biology* **206**: 151-162
- Hutchins AS, Mullen AC, Lee HW, Sykes KJ, High FA, Hendrich BD, Bird AP, Reiner SL (2002) Gene silencing quantitatively controls the function of a developmental trans-activator. *Molecular cell* **10**: 81-91
- Ikegami K, Iwatani M, Suzuki M, Tachibana M, Shinkai Y, Tanaka S, Grealley JM, Yagi S, Hattori N, Shiota K (2007) Genome-wide and locus-specific DNA hypomethylation in G9a deficient mouse embryonic stem cells. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **12**: 1-11
- Illingworth RS, Bird AP (2009) CpG islands--'a rough guide'. *FEBS letters* **583**: 1713-1720
- Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash JB, Sabuncuyan S, Feinberg AP (2009) The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nature genetics* **41**: 178-186
- Iwase S, Xiang B, Ghosh S, Ren T, Lewis PW, Cochrane JC, Allis CD, Picketts DJ, Patel DJ, Li H, Shi Y (2011) ATRX ADD domain links an atypical histone methylation recognition mechanism to human mental-retardation syndrome. *Nature structural & molecular biology* **18**: 769-776
- Jacinto FV, Ballestar E, Ropero S, Esteller M (2007) Discovery of epigenetically silenced genes by methylated DNA immunoprecipitation in colon cancer cells. *Cancer research* **67**: 11481-11486
- Jackson V, Shires A, Chalkley R, Granner DK (1975) Studies on highly metabolically active acetylation and phosphorylation of histones. *The Journal of biological chemistry* **250**: 4856-4863
- Jahner D, Jaenisch R (1985) Retrovirus-induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity. *Nature* **315**: 594-597
- Jair KW, Bachman KE, Suzuki H, Ting AH, Rhee I, Yen RW, Baylin SB, Schuebel KE (2006) De novo CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer research* **66**: 682-692
- Jarmalaite S, Jankevicius F, Kurgonaitė K, Suziedelis K, Mutanen P, Husgafvel-Pursiainen K (2008) Promoter hypermethylation in tumour suppressor genes shows association with stage, grade and invasiveness of bladder cancer. *Oncology* **75**: 145-151
- Jeltsch A (2002) Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* **3**: 274-293
- Jenuwein T, Allis CD (2001) Translating the histone code. *Science* **293**: 1074-1080
- Ji H, Ehrlich LI, Seita J, Murakami P, Doi A, Lindau P, Lee H, Aryee MJ, Irizarry RA, Kim K, Rossi DJ, Inlay MA, Serwold T, Karsunky H, Ho L, Daley GQ, Weissman IL, Feinberg AP (2010) Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature* **467**: 338-342
- Jia D, Jurkowska RZ, Zhang X, Jeltsch A, Cheng X (2007) Structure of Dnmt3a bound to Dnmt3L suggests a model for de novo DNA methylation. *Nature* **449**: 248-251
- Jiang C, Pugh BF (2009) Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nature reviews Genetics* **10**: 161-172
- Jiang Y, Cui L, Chen WD, Shen SH, Ding LD (2012) The prognostic role of RASSF1A promoter methylation in breast cancer: a meta-analysis of published data. *PloS one* **7**: e36780
- Jin B, Ernst J, Tiedemann RL, Xu H, Sureshchandra S, Kellis M, Dalton S, Liu C, Choi JH, Robertson KD (2012) Linking DNA methyltransferases to epigenetic marks and nucleosome structure genome-wide in human tumor cells. *Cell reports* **2**: 1411-1424
- Jin B, Li Y, Robertson KD (2011) DNA methylation: superior or subordinate in the epigenetic hierarchy? *Genes & cancer* **2**: 607-617
- Jin B, Tao Q, Peng J, Soo HM, Wu W, Ying J, Fields CR, Delmas AL, Liu X, Qiu J, Robertson KD (2008) DNA methyltransferase 3B (DNMT3B) mutations in ICF syndrome lead to altered epigenetic modifications and aberrant expression of genes regulating development, neurogenesis and immune function. *Human molecular genetics* **17**: 690-709
- Jin B, Yao B, Li JL, Fields CR, Delmas AL, Liu C, Robertson KD (2009) DNMT1 and DNMT3B modulate distinct polycomb-mediated histone modifications in colon cancer. *Cancer research* **69**: 7412-7421
- Jin W, Chen L, Chen Y, Xu SG, Di GH, Yin WJ, Wu J, Shao ZM (2010) UHRF1 is associated with epigenetic silencing of BRCA1 in sporadic breast cancer. *Breast cancer research and treatment* **123**: 359-373
- Jing F, Yuping W, Yong C, Jie L, Jun L, Xuanbing T, Lihua H (2010) CpG island methylator phenotype of multigene in serum of sporadic breast carcinoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine* **31**: 321-331
- Jo H, Kim JW, Kang GH, Park NH, Song YS, Kang SB, Lee HP (2006) Association of promoter hypermethylation of the RASSF1A gene with prognostic parameters in endometrial cancer. *Oncology research* **16**: 205-209
- Johnson KC, Koestler DC, Cheng C, Christensen BC (2014) Age-related DNA methylation in normal breast tissue and its relationship with invasive breast tumor methylation. *Epigenetics* **9**: 268-275
- Jones PA (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nature reviews Genetics* **13**: 484-492

- Jones PA, Baylin SB (2007) The epigenomics of cancer. *Cell* **128**: 683-692
- Jones PA, Liang G (2009) Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nature reviews Genetics* **10**: 805-811
- Jones PA, Takai D (2001) The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* **293**: 1068-1070
- Joshi P, Greco TM, Guise AJ, Luo Y, Yu F, Nesvizhskii AI, Cristea IM (2013) The functional interactome landscape of the human histone deacetylase family. *Molecular systems biology* **9**: 672
- Juan LJ, Shia WJ, Chen MH, Yang WM, Seto E, Lin YS, Wu CW (2000) Histone deacetylases specifically down-regulate p53-dependent gene activation. *The Journal of biological chemistry* **275**: 20436-20443
- Jurkin J, Zupkovic G, Lagger S, Grausenburger R, Hagekruys A, Kenner L, Seiser C (2011) Distinct and redundant functions of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 in proliferation and tumorigenesis. *Cell Cycle* **10**: 406-412
- Jurkowska RZ, Rajavelu A, Anspach N, Urbanke C, Jankevicius G, Ragozin S, Nellen W, Jeltsch A (2011) Oligomerization and binding of the Dnmt3a DNA methyltransferase to parallel DNA molecules: heterochromatic localization and role of Dnmt3L. *The Journal of biological chemistry* **286**: 24200-24207
- Kalluri R, Weinberg RA (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation* **119**: 1420-1428
- Kaluarachchi Duffy S, Friesen H, Baryshnikova A, Lambert JP, Chong YT, Figeys D, Andrews B (2012) Exploring the yeast acetylome using functional genomics. *Cell* **149**: 936-948
- Kamli MR, Kim J, Pokharel S, Jan AT, Lee EJ, Choi I (2014) Expressional studies of the aldehyde oxidase (AOX1) gene during myogenic differentiation in C2C12 cells. *Biochemical and biophysical research communications* **450**: 1291-1296
- Kanai Y, Ushijima S, Nakanishi Y, Sakamoto M, Hirohashi S (2003) Mutation of the DNA methyltransferase (DNMT) 1 gene in human colorectal cancers. *Cancer letters* **192**: 75-82
- Kaneda M, Okano M, Hata K, Sado T, Tsujimoto N, Li E, Sasaki H (2004) Essential role for de novo DNA methyltransferase Dnmt3a in paternal and maternal imprinting. *Nature* **429**: 900-903
- Kanehisa M, Goto S (2000) KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research* **28**: 27-30
- Kang TB, Ben-Moshe T, Varfolomeev EE, Pewzner-Jung Y, Yogev N, Jurewicz A, Waisman A, Brenner O, Haffner R, Gustafsson E, Ramakrishnan P, Lapidot T, Wallach D (2004) Caspase-8 serves both apoptotic and nonapoptotic roles. *J Immunol* **173**: 2976-2984
- Kantarjian H, Issa JP, Rosenfeld CS, Bennett JM, Albitar M, DiPersio J, Klimek V, Slack J, de Castro C, Ravandi F, Helmer R, 3rd, Shen L, Nimer SD, Leavitt R, Raza A, Saba H (2006) Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study. *Cancer* **106**: 1794-1803
- Karagianni P, Amazit L, Qin J, Wong J (2008) ICBP90, a novel methyl K9 H3 binding protein linking protein ubiquitination with heterochromatin formation. *Molecular and cellular biology* **28**: 705-717
- Karahoca M, Momparler RL (2013) Pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in the design of its dose-schedule for cancer therapy. *Clinical epigenetics* **5**: 3
- Kareta MS, Botello ZM, Ennis JJ, Chou C, Chedin F (2006) Reconstitution and mechanism of the stimulation of de novo methylation by human DNMT3L. *The Journal of biological chemistry* **281**: 25893-25902
- Karimi MM, Goyal P, Maksakova IA, Bilenky M, Leung D, Tang JX, Shinkai Y, Mager DL, Jones S, Hirst M, Lorincz MC (2011) DNA methylation and SETDB1/H3K9me3 regulate predominantly distinct sets of genes, retroelements, and chimeric transcripts in mESCs. *Cell stem cell* **8**: 676-687
- Karlic R, Chung HR, Lasserre J, Vlahovicek K, Vingron M (2010) Histone modification levels are predictive for gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 2926-2931
- Karlsson A, Jonsson M, Lauss M, Brunnstrom H, Jonsson P, Borg A, Jonsson G, Ringner M, Planck M, Staaf J (2014) Genome-wide DNA methylation analysis of lung carcinoma reveals one neuroendocrine and four adenocarcinoma epitypes associated with patient outcome. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **20**: 6127-6140
- Karray-Chouayekh S, Trifa F, Khabir A, Boujelbane N, Sellami-Boudawara T, Daoud J, Frikha M, Jlidi R, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R (2010) Aberrant methylation of RASSF1A is associated with poor survival in Tunisian breast cancer patients. *Journal of cancer research and clinical oncology* **136**: 203-210
- Kashuba VI, Pavlova TV, Grigorieva EV, Kutsenko A, Yenamandra SP, Li J, Wang F, Protopopov AI, Zabarovska VI, Senchenko V, Haraldson K, Eshchenko T, Kobliakova J, Vorontsova O, Kuzmin I, Braga E, Blinov VM, Kisselev LL, Zeng YX, Ernberg I, Lerman MI, Klein G, Zabarovsky ER (2009) High mutability of the tumor suppressor genes RASSF1 and RBSP3 (CTDSPL) in cancer. *PLoS one* **4**: e5231
- Kaufmann I, Martin G, Friedlein A, Langen H, Keller W (2004) Human Fip1 is a subunit of CPSF that binds to U-rich RNA elements and stimulates poly(A) polymerase. *The EMBO journal* **23**: 616-626
- Kawai Y, Sakano S, Suehiro Y, Okada T, Korenaga Y, Hara T, Naito K, Matsuyama H, Hinoda Y (2010) Methylation level of the RASSF1A promoter is an independent prognostic factor for clear-cell renal cell carcinoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **21**: 1612-1617
- Kelsey G, Feil R (2013) New insights into establishment and maintenance of DNA methylation imprints in mammals. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **368**: 20110336
- Khandanpour C, Phelan JD, Vassen L, Schutte J, Chen R, Horman SR, Gaudreau MC, Krongold J, Zhu J, Paul WE, Duhrsen U, Gottgens B, Grimes HL, Moroy T (2013) Growth factor independence 1 antagonizes a p53-induced DNA damage response pathway in lymphoblastic leukemia. *Cancer cell* **23**: 200-214

- Khokhlatchev A, Rabizadeh S, Xavier R, Nedwiedek M, Chen T, Zhang XF, Seed B, Avruch J (2002) Identification of a novel Ras-regulated proapoptotic pathway. *Current biology* : **CB 12**: 253-265
- Kiehl S, Herkt SC, Richter AM, Fuhrmann L, El-Nikhely N, Seeger W, Savai R, Dammann RH (2014) ABCB4 is frequently epigenetically silenced in human cancers and inhibits tumor growth. *Scientific reports* **4**: 6899
- Kim H, Park J, Jung Y, Song SH, Han SW, Oh DY, Im SA, Bang YJ, Kim TY (2010) DNA methyltransferase 3-like affects promoter methylation of thymine DNA glycosylase independently of DNMT1 and DNMT3B in cancer cells. *International journal of oncology* **36**: 1563-1572
- Kim JH, Karnovsky A, Mahavisno V, Weymouth T, Pande M, Dolinoy DC, Rozek LS, Sartor MA (2012a) LRpath analysis reveals common pathways dysregulated via DNA methylation across cancer types. *BMC genomics* **13**: 526
- Kim JS, Chae Y, Ha YS, Kim IY, Byun SS, Yun SJ, Kim WJ (2012b) Ras association domain family 1A: a promising prognostic marker in recurrent nonmuscle invasive bladder cancer. *Clinical genitourinary cancer* **10**: 114-120
- Kinney SR, Pradhan S (2013) Ten eleven translocation enzymes and 5-hydroxymethylation in mammalian development and cancer. *Advances in experimental medicine and biology* **754**: 57-79
- Kirmizis A, Bartley SM, Kuzmichev A, Margueron R, Reinberg D, Green R, Farnham PJ (2004) Silencing of human polycomb target genes is associated with methylation of histone H3 Lys 27. *Genes & development* **18**: 1592-1605
- Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, Sabel MS, Livant D, Weiss SJ, Rubin MA, Chinnaiyan AM (2003) EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 11606-11611
- Klein CJ, Bird T, Ertekin-Taner N, Lincoln S, Hjorth R, Wu Y, Kwok J, Mer G, Dyck PJ, Nicholson GA (2013) DNMT1 mutation hot spot causes varied phenotypes of HSN1 with dementia and hearing loss. *Neurology* **80**: 824-828
- Klose RJ, Kallin EM, Zhang Y (2006) JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. *Nature reviews Genetics* **7**: 715-727
- Kohli RM, Zhang Y (2013) TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature* **502**: 472-479
- Kok K, Osinga J, Carritt B, Davis MB, van der Hout AH, van der Veen AY, Landsvater RM, de Leij LF, Berendsen HH, Postmus PE, et al. (1987) Deletion of a DNA sequence at the chromosomal region 3p21 in all major types of lung cancer. *Nature* **330**: 578-581
- Kokura K, Sun L, Bedford MT, Fang J (2010) Methyl-H3K9-binding protein MPP8 mediates E-cadherin gene silencing and promotes tumour cell motility and invasion. *The EMBO journal* **29**: 3673-3687
- Kondo Y (2014) Shall we crosstalk? - The relationship between DNA methylation and histone H3 lysine 27 trimethylation. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **36**: 128
- Kondo Y, Shen L, Cheng AS, Ahmed S, Bumber Y, Charo C, Yamochi T, Urano T, Furukawa K, Kwabi-Addo B, Gold DL, Sekido Y, Huang TH, Issa JP (2008) Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nature genetics* **40**: 741-750
- Korpis K (2013), Dissertation: Apoptose und Autophagozytose in Krebszellen: Mechanismen des Zelltodes, verursacht durch  $\sigma$ -Rezeptor-Liganden und photoaktivierbare Pt<sup>IV</sup>-Komplexe
- Kovacs G, Erlandsson R, Boldog F, Ingvarsson S, Muller-Brechlin R, Klein G, Sumegi J (1988) Consistent chromosome 3p deletion and loss of heterozygosity in renal cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**: 1571-1575
- Krusche CA, Wulfing P, Kersting C, Vloet A, Bocker W, Kiesel L, Beier HM, Alfer J (2005) Histone deacetylase-1 and -3 protein expression in human breast cancer: a tissue microarray analysis. *Breast cancer research and treatment* **90**: 15-23
- Kubo T, Yamamoto H, Ichimura K, Jida M, Hayashi T, Otani H, Tsukuda K, Sano Y, Kiura K, Toyooka S (2009) DNA methylation in small lung adenocarcinoma with bronchioloalveolar carcinoma components. *Lung Cancer* **65**: 328-332
- Kuck D, Caulfield T, Lyko F, Medina-Franco JL (2010) Nanaomycin A selectively inhibits DNMT3B and reactivates silenced tumor suppressor genes in human cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* **9**: 3015-3023
- Kulis M, Esteller M (2010) DNA methylation and cancer. *Advances in genetics* **70**: 27-56
- Kuo HK, Griffith JD, Kreuzer KN (2007) 5-Azacytidine induced methyltransferase-DNA adducts block DNA replication in vivo. *Cancer research* **67**: 8248-8254
- Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D (2002) Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the Enhancer of Zeste protein. *Genes & development* **16**: 2893-2905
- Kuzmin I, Gillespie JW, Protopopov A, Geil L, Dreijerink K, Yang Y, Vocke CD, Duh FM, Zabarovsky E, Minna JD, Rhim JS, Emmert-Buck MR, Linehan WM, Lerman MI (2002) The RASSF1A tumor suppressor gene is inactivated in prostate tumors and suppresses growth of prostate carcinoma cells. *Cancer research* **62**: 3498-3502
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Larsen F, Gundersen G, Lopez R, Prydz H (1992) CpG islands as gene markers in the human genome. *Genomics* **13**: 1095-1107
- Lasa A, Carnicer MJ, Aventin A, Estivill C, Brunet S, Sierra J, Nomdedeu JF (2004) MEIS 1 expression is downregulated through promoter hypermethylation in AML1-ETO acute myeloid leukemias. *Leukemia* **18**: 1231-1237

- Latham T, Gilbert N, Ramsahoye B (2008) DNA methylation in mouse embryonic stem cells and development. *Cell and tissue research* **331**: 31-55
- Laurent L, Wong E, Li G, Huynh T, Tsigos A, Ong CT, Low HM, Kin Sung KW, Rigoutsos I, Loring J, Wei CL (2010) Dynamic changes in the human methylome during differentiation. *Genome research* **20**: 320-331
- Law JA, Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature reviews Genetics* **11**: 204-220
- Lee ES, Issa JP, Roberts DB, Williams MD, Weber RS, Kies MS, El-Naggar AK (2008) Quantitative promoter hypermethylation analysis of cancer-related genes in salivary gland carcinomas: comparison with methylation-specific PCR technique and clinical significance. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**: 2664-2672
- Lee KK, Workman JL (2007) Histone acetyltransferase complexes: one size doesn't fit all. *Nature reviews Molecular cell biology* **8**: 284-295
- Lee MG, Kim HY, Byun DS, Lee SJ, Lee CH, Kim JI, Chang SG, Chi SG (2001) Frequent epigenetic inactivation of RASSF1A in human bladder carcinoma. *Cancer research* **61**: 6688-6692
- Lee S, Kim WH, Jung HY, Yang MH, Kang GH (2002) Aberrant CpG island methylation of multiple genes in intrahepatic cholangiocarcinoma. *The American journal of pathology* **161**: 1015-1022
- Lee SM, Lee WK, Kim DS, Park JY (2012) Quantitative promoter hypermethylation analysis of RASSF1A in lung cancer: comparison with methylation-specific PCR technique and clinical significance. *Molecular medicine reports* **5**: 239-244
- Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S, Chen T, Li E, Jenuwein T, Peters AH (2003) Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Current biology : CB* **13**: 1192-1200
- Lenk GM, Tromp G, Weinsheimer S, Gatalica Z, Berguer R, Kuivaniemi H (2007) Whole genome expression profiling reveals a significant role for immune function in human abdominal aortic aneurysms. *BMC genomics* **8**: 237
- Lerario AM, Brito LP, Mariani BM, Fragoso MC, Machado MA, Teixeira R (2010) A missense TCF1 mutation in a patient with mody-3 and liver adenomatosis. *Clinics (Sao Paulo)* **65**: 1059-1060
- Leung D, Du T, Wagner U, Xie W, Lee AY, Goyal P, Li Y, Szulwach KE, Jin P, Lorincz MC, Ren B (2014) Regulation of DNA methylation turnover at LTR retrotransposons and imprinted loci by the histone methyltransferase Setdb1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 6690-6695
- Li B, Carey M, Workman JL (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* **128**: 707-719
- Li E, Beard C, Jaenisch R (1993) Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**: 362-365
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* **69**: 915-926
- Li J, El-Naggar A, Mao L (2005) Promoter methylation of p16INK4a, RASSF1A, and DAPK is frequent in salivary adenoid cystic carcinoma. *Cancer* **104**: 771-776
- Li LH, Olin EJ, Buskirk HH, Reineke LM (1970) Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia. *Cancer research* **30**: 2760-2769
- Li X, Cheung KF, Ma X, Tian L, Zhao J, Go MY, Shen B, Cheng AS, Ying J, Tao Q, Sung JJ, Kung HF, Yu J (2012) Epigenetic inactivation of paired box gene 5, a novel tumor suppressor gene, through direct upregulation of p53 is associated with prognosis in gastric cancer patients. *Oncogene* **31**: 3419-3430
- Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA (2002) Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Molecular and cellular biology* **22**: 480-491
- Liao X, Siu MK, Chan KY, Wong ES, Ngan HY, Chan QK, Li AS, Khoo US, Cheung AN (2008) Hypermethylation of RAS effector related genes and DNA methyltransferase 1 expression in endometrial carcinogenesis. *International journal of cancer Journal international du cancer* **123**: 296-302
- Lickwar CR, Rao B, Shabalin AA, Nobel AB, Strahl BD, Lieb JD (2009) The Set2/Rpd3S pathway suppresses cryptic transcription without regard to gene length or transcription frequency. *PLoS one* **4**: e4886
- Liefke R and Shi Y (2015) The PRC2-associated factor C17orf96 is a novel CpG island regulator in mouse ES cells. *Cell Discovery* **1**: 15008
- Lim S, Janzer A, Becker A, Zimmer A, Schule R, Buettner R, Kirfel J (2010) Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis* **31**: 512-520
- Lister R, Mukamel EA, Nery JR, Urich M, Puddifoot CA, Johnson ND, Lucero J, Huang Y, Dwork AJ, Schultz MD, Yu M, Tonti-Filippini J, Heyn H, Hu S, Wu JC, Rao A, Esteller M, He C, Haghghi FG, Sejnowski TJ, Behrens MM, Ecker JR (2013) Global epigenomic reconfiguration during mammalian brain development. *Science* **341**: 1237905
- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* **462**: 315-322
- Liu G, Bollig-Fischer A, Kreike B, van de Vijver MJ, Abrams J, Ethier SP, Yang ZQ (2009) Genomic amplification and oncogenic properties of the GASC1 histone demethylase gene in breast cancer. *Oncogene* **28**: 4491-4500

- Liu L, Tommasi S, Lee DH, Dammann R, Pfeifer GP (2003) Control of microtubule stability by the RASSF1A tumor suppressor. *Oncogene* **22**: 8125-8136
- Liu Y, Peng L, Seto E, Huang S, Qiu Y (2012) Modulation of histone deacetylase 6 (HDAC6) nuclear import and tubulin deacetylase activity through acetylation. *The Journal of biological chemistry* **287**: 29168-29174
- Liu YL, Gao X, Jiang Y, Zhang G, Sun ZC, Cui BB, Yang YM (2015) Expression and clinicopathological significance of EED, SUZ12 and EZH2 mRNA in colorectal cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology* **141**: 661-669
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408
- Logan J, Falck-Pedersen E, Darnell JE, Jr., Shenk T (1987) A poly(A) addition site and a downstream termination region are required for efficient cessation of transcription by RNA polymerase II in the mouse beta major-globin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 8306-8310
- Lokk K, Modhukur V, Rajashekar B, Martens K, Magi R, Kolde R, Koltšina M, Nilsson TK, Vilo J, Salumets A, Tonisson N (2014) DNA methylome profiling of human tissues identifies global and tissue-specific methylation patterns. *Genome biology* **15**: r54
- Lothe RA, Fossa SD, Stenwig AE, Nakamura Y, White R, Borresen AL, Brogger A (1989) Loss of 3p or 11p alleles is associated with testicular cancer tumors. *Genomics* **5**: 134-138
- Maekawa R, Sato S, Yamagata Y, Asada H, Tamura I, Lee L, Okada M, Tamura H, Takaki E, Nakai A, Sugino N (2013) Genome-wide DNA methylation analysis reveals a potential mechanism for the pathogenesis and development of uterine leiomyomas. *PLoS one* **8**: e66632
- Magewu AN, Jones PA (1994) Ubiquitous and tenacious methylation of the CpG site in codon 248 of the p53 gene may explain its frequent appearance as a mutational hot spot in human cancer. *Molecular and cellular biology* **14**: 4225-4232
- Majumder S, Liu Y, Ford OH, 3rd, Mohler JL, Whang YE (2006) Involvement of arginine methyltransferase CARM1 in androgen receptor function and prostate cancer cell viability. *The Prostate* **66**: 1292-1301
- Malek NP, Schmidt S, Huber P, Manns MP, Greten TF (2014) The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. *Deutsches Arzteblatt international* **111**: 101-106
- Maltby VE, Martin BJ, Brind'Amour J, Chruscicki AT, McBurney KL, Schulze JM, Johnson IJ, Hills M, Hentrich T, Kobor MS, Lorincz MC, Howe LJ (2012) Histone H3K4 demethylation is negatively regulated by histone H3 acetylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**: 18505-18510
- Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Brisken C, Yang J, Weinberg RA (2008) The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **133**: 704-715
- Margueron R, Justin N, Ohno K, Sharpe ML, Son J, Drury WJ, 3rd, Voigt P, Martin SR, Taylor WR, De Marco V, Pirrotta V, Reinberg D, Gamblin SJ (2009) Role of the polycomb protein EED in the propagation of repressive histone marks. *Nature* **461**: 762-767
- Marks PA, Breslow R (2007) Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nature biotechnology* **25**: 84-90
- Marques SM, Esteves da Silva JC (2009) Firefly bioluminescence: a mechanistic approach of luciferase catalyzed reactions. *IUBMB life* **61**: 6-17
- Martens JA, Laprade L, Winston F (2004) Intergenic transcription is required to repress the *Saccharomyces cerevisiae* SER3 gene. *Nature* **429**: 571-574
- Martin-Perez D, Sanchez E, Maestre L, Suela J, Vargiu P, Di Lisio L, Martinez N, Alves J, Piris MA, Sanchez-Beato M (2010) Deregulated expression of the polycomb-group protein SUZ12 target genes characterizes mantle cell lymphoma. *The American journal of pathology* **177**: 930-942
- Martin C, Zhang Y (2005) The diverse functions of histone lysine methylation. *Nature reviews Molecular cell biology* **6**: 838-849
- Marttila S, Kananen L, Hayrynen S, Jylhava J, Nevalainen T, Hervonen A, Jylha M, Nykter M, Hurme M (2015) Ageing-associated changes in the human DNA methylome: genomic locations and effects on gene expression. *BMC genomics* **16**: 179
- Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, Virmani AK, Zochbauer-Muller S, Farinas AJ, Vakar-Lopez F, Minna JD, Sagalowsky A, Czerniak B, Gazdar AF (2001) Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. *Cancer research* **61**: 8659-8663
- Matsui T, Leung D, Miyashita H, Maksakova IA, Miyachi H, Kimura H, Tachibana M, Lorincz MC, Shinkai Y (2010) Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature* **464**: 927-931
- Mauad TH, van Nieuwkerk CM, Dingemans KP, Smit JJ, Schinkel AH, Notenboom RG, van den Bergh Weerman MA, Verkruijsen RP, Groen AK, Oude Elferink RP, et al. (1994) Mice with homozygous disruption of the mdr2 P-glycoprotein gene. A novel animal model for studies of non-suppurative inflammatory cholangitis and hepatocarcinogenesis. *The American journal of pathology* **145**: 1237-1245
- Mavrich TN, Jiang C, Ioshikhes IP, Li X, Venters BJ, Zanton SJ, Tomsho LP, Qi J, Glaser RL, Schuster SC, Gilmour DS, Albert I, Pugh BF (2008) Nucleosome organization in the *Drosophila* genome. *Nature* **453**: 358-362
- Mazo A, Hodgson JW, Petruk S, Sedkov Y, Brock HW (2007) Transcriptional interference: an unexpected layer of complexity in gene regulation. *Journal of cell science* **120**: 2755-2761
- McGarvey KM, Van Neste L, Cope L, Ohm JE, Herman JG, Van Criekinge W, Schuebel KE, Baylin SB (2008) Defining a chromatin pattern that characterizes DNA-hypermethylated genes in colon cancer cells. *Cancer research* **68**: 5753-5759

- McLean CY, Bristor D, Hiller M, Clarke SL, Schaar BT, Lowe CB, Wenger AM, Bejerano G (2010) GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. *Nature biotechnology* **28**: 495-501
- Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES (2008) Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* **454**: 766-770
- Melki JR, Warnecke P, Vincent PC, Clark SJ (1998) Increased DNA methyltransferase expression in leukaemia. *Leukemia* **12**: 311-316
- Meng W, Huebner A, Shabsigh A, Chakravarti A, Lautenschlaeger T (2012) Combined RASSF1A and RASSF2A Promoter Methylation Analysis as Diagnostic Biomarker for Bladder Cancer. *Molecular biology international* **2012**: 701814
- Messner S, Hottiger MO (2011) Histone ADP-ribosylation in DNA repair, replication and transcription. *Trends in cell biology* **21**: 534-542
- Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke MA, Matzke AJ (2000) Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *The EMBO journal* **19**: 5194-5201
- Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE (2007) Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* **448**: 553-560
- Milne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD, Hess JL (2002) MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Molecular cell* **10**: 1107-1117
- Minkovsky A, Sahakyan A, Rankin-Gee E, Bonora G, Patel S, Plath K (2014) The Mbd1-Atf7ip-Setdb1 pathway contributes to the maintenance of X chromosome inactivation. *Epigenetics & chromatin* **7**: 12
- Miousse IR, Koturbash I (2015) The Fine LINE: Methylation Drawing the Cancer Landscape. *BioMed research international* **2015**: 131547
- Mitra S, Mazumder Indra D, Basu PS, Mondal RK, Roy A, Roychoudhury S, Panda CK (2012) Alterations of RASSF1A in premalignant cervical lesions: clinical and prognostic significance. *Molecular carcinogenesis* **51**: 723-733
- Mizuno S, Chijiwa T, Okamura T, Akashi K, Fukumaki Y, Niho Y, Sasaki H (2001) Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* **97**: 1172-1179
- Moelans CB, Verschuur-Maes AH, van Diest PJ (2011) Frequent promoter hypermethylation of BRCA2, CDH13, MSH6, PAX5, PAX6 and WT1 in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *The Journal of pathology* **225**: 222-231
- Momparler RL, Siegel S, Avila F, Lee T, Karon M (1976) Effect of tRNA from 5-azacytidine-treated hamster fibrosarcoma cells on protein synthesis in vitro in a cell-free system. *Biochemical pharmacology* **25**: 389-392
- Morales V, Richard-Foy H (2000) Role of histone N-terminal tails and their acetylation in nucleosome dynamics. *Molecular and cellular biology* **20**: 7230-7237
- Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W (2005) Epigenetic reprogramming in mammals. *Human molecular genetics* **14 Spec No 1**: R47-58
- Morita SY, Terada T (2014) Molecular mechanisms for biliary phospholipid and drug efflux mediated by ABCB4 and bile salts. *BioMed research international* **2014**: 954781
- Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ (2004) Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* **305**: 1289-1292
- Morselli M, Pastor WA, Montanini B, Nee K, Ferrari R, Fu K, Bonora G, Rubbi L, Clark AT, Ottonello S, Jacobsen SE, Pellegrini M (2015) In vivo targeting of de novo DNA methylation by histone modifications in yeast and mouse. *eLife* **4**: e06205
- Mosteller RD (1987) Simplified calculation of body-surface area. *The New England journal of medicine* **317**: 1098
- Mudbhary R, Hoshida Y, Chernyavskaya Y, Jacob V, Villanueva A, Fiel MI, Chen X, Kojima K, Thung S, Bronson RT, Lachenmayer A, Revill K, Alsinet C, Sachidanandam R, Desai A, SenBanerjee S, Ukomadu C, Llovet JM, Sadler KC (2014) UHRF1 overexpression drives DNA hypomethylation and hepatocellular carcinoma. *Cancer cell* **25**: 196-209
- Muggerud AA, Ronneberg JA, Warnberg F, Botling J, Busato F, Jovanovic J, Solvang H, Bukholm I, Borresen-Dale AL, Kristensen VN, Sorlie T, Tost J (2010) Frequent aberrant DNA methylation of ABCB1, FOXC1, PPP2R2B and PTEN in ductal carcinoma in situ and early invasive breast cancer. *Breast cancer research : BCR* **12**: R3
- Mujtaba S, Zeng L, Zhou MM (2007) Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* **26**: 5521-5527
- Mullenbach R, Linton KJ, Wiltshire S, Weerasekera N, Chambers J, Elias E, Higgins CF, Johnston DG, McCarthy MI, Williamson C (2003) ABCB4 gene sequence variation in women with intrahepatic cholestasis of pregnancy. *Journal of medical genetics* **40**: e70
- Muller S, Filippakopoulos P, Knapp S (2011) Bromodomains as therapeutic targets. *Expert reviews in molecular medicine* **13**: e29
- Murthy KG, Manley JL (1995) The 160-kD subunit of human cleavage-polyadenylation specificity factor coordinates pre-mRNA 3'-end formation. *Genes & development* **9**: 2672-2683
- Nady N, Lemak A, Walker JR, Avvakumov GV, Kareta MS, Achour M, Xue S, Duan S, Allali-Hassani A, Zuo X, Wang YX, Bronner C, Chedin F, Arrowsmith CH, Dhe-Paganon S (2011) Recognition of multivalent histone states associated with heterochromatin by UHRF1 protein. *The Journal of biological chemistry* **286**: 24300-24311
- Nakamura K, Aizawa K, Nakabayashi K, Kato N, Yamauchi J, Hata K, Tanoue A (2013) DNA methyltransferase inhibitor zebularine inhibits human hepatic carcinoma cells proliferation and induces apoptosis. *PLoS one* **8**: e54036

- Naumann A, Hochstein N, Weber S, Fanning E, Doerfler W (2009) A distinct DNA-methylation boundary in the 5'-upstream sequence of the FMR1 promoter binds nuclear proteins and is lost in fragile X syndrome. *American journal of human genetics* **85**: 606-616
- Naylor SL, Johnson BE, Minna JD, Sakaguchi AY (1987) Loss of heterozygosity of chromosome 3p markers in small-cell lung cancer. *Nature* **329**: 451-454
- Neyaz MK, Kumar RS, Hussain S, Naqvi SH, Kohaar I, Thakur N, Kashyap V, Das BC, Husain SA, Bharadwaj M (2008) Effect of aberrant promoter methylation of FHIT and RASSF1A genes on susceptibility to cervical cancer in a North Indian population. *Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals* **13**: 597-606
- Nguyen C, Liang G, Nguyen TT, Tsao-Wei D, Groshen S, Lubbert M, Zhou JH, Benedict WF, Jones PA (2001) Susceptibility of nonpromoter CpG islands to de novo methylation in normal and neoplastic cells. *Journal of the National Cancer Institute* **93**: 1465-1472
- Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M, Gonzales FA, Lin JC, Liang G, Jones PA (2002) Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer research* **62**: 6456-6461
- Nosho K, Shima K, Irahara N, Kure S, Baba Y, Kirkner GJ, Chen L, Gokhale S, Hazra A, Spiegelman D, Giovannucci EL, Jaenisch R, Fuchs CS, Ogino S (2009) DNMT3B expression might contribute to CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**: 3663-3671
- Oberstadt MC, Bien-Moller S, Weitmann K, Herzog S, Hentschel K, Rimmbach C, Vogelgesang S, Balz E, Fink M, Michael H, Zeden JP, Bruckmuller H, Werk AN, Cascorbi I, Hoffmann W, Rosskopf D, Schroeder HW, Kroemer HK (2013) Epigenetic modulation of the drug resistance genes MGMT, ABCB1 and ABCG2 in glioblastoma multiforme. *BMC cancer* **13**: 617
- Oh BK, Kim H, Park HJ, Shim YH, Choi J, Park C, Park YN (2007) DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation. *International journal of molecular medicine* **20**: 65-73
- Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, Cope L, Mohammad HP, Chen W, Daniel VC, Yu W, Berman DM, Jenuwein T, Pruitt K, Sharkis SJ, Watkins DN, Herman JG, Baylin SB (2007) A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nature genetics* **39**: 237-242
- Ohshima J, Haruta M, Fujiwara Y, Watanabe N, Arai Y, Ariga T, Okita H, Koshinaga T, Oue T, Hinotsu S, Nakadate H, Horie H, Fukuzawa M, Kaneko Y (2012) Methylation of the RASSF1A promoter is predictive of poor outcome among patients with Wilms tumor. *Pediatric blood & cancer* **59**: 499-505
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**: 247-257
- Olsen CA (2012) Expansion of the lysine acylation landscape. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**: 3755-3756
- Ooi SK, Qiu C, Bernstein E, Li K, Jia D, Yang Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lin SP, Allis CD, Cheng X, Bestor TH (2007) DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature* **448**: 714-717
- Ostler KR, Davis EM, Payne SL, Gosalia BB, Exposito-Céspedes J, Le Beau MM, Godley LA (2007) Cancer cells express aberrant DNMT3B transcripts encoding truncated proteins. *Oncogene* **26**: 5553-5563
- Oswald J, Engemann S, Lane N, Mayer W, Olek A, Fundele R, Dean W, Reik W, Walter J (2000) Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Current biology : CB* **10**: 475-478
- Otani J, Nankumo T, Arita K, Inamoto S, Ariyoshi M, Shirakawa M (2009) Structural basis for recognition of H3K4 methylation status by the DNA methyltransferase 3A ATRX-DNMT3-DNMT3L domain. *EMBO reports* **10**: 1235-1241
- Palakurthy RK, Wajapeyee N, Santra MK, Gazin C, Lin L, Gobeil S, Green MR (2009) Epigenetic silencing of the RASSF1A tumor suppressor gene through HOXB3-mediated induction of DNMT3B expression. *Molecular cell* **36**: 219-230
- Pallares J, Velasco A, Eritja N, Santacana M, Dolcet X, Cuatrecasas M, Palomar-Asenjo V, Catusas L, Prat J, Matias-Guiu X (2008) Promoter hypermethylation and reduced expression of RASSF1A are frequent molecular alterations of endometrial carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **21**: 691-699
- Panning B, Jaenisch R (1998) RNA and the epigenetic regulation of X chromosome inactivation. *Cell* **93**: 305-308
- Park IY, Sohn BH, Yu E, Suh DJ, Chung YH, Lee JH, Surzycki SJ, Lee YI (2007) Aberrant epigenetic modifications in hepatocarcinogenesis induced by hepatitis B virus X protein. *Gastroenterology* **132**: 1476-1494
- Patra SK, Patra A, Zhao H, Dahiya R (2002) DNA methyltransferase and demethylase in human prostate cancer. *Molecular carcinogenesis* **33**: 163-171
- Pawlak M, Jaenisch R (2011) De novo DNA methylation by Dnmt3a and Dnmt3b is dispensable for nuclear reprogramming of somatic cells to a pluripotent state. *Genes & development* **25**: 1035-1040
- Pennarun B, Meijer A, de Vries EG, Kleibeuker JH, Kruyt F, de Jong S (2010) Playing the DISC: turning on TRAIL death receptor-mediated apoptosis in cancer. *Biochimica et biophysica acta* **1805**: 123-140
- Persidis A (1999) Cancer multidrug resistance. *Nature biotechnology* **17**: 94-95
- Peters AH, Kubicek S, Mechtler K, O'Sullivan RJ, Derijck AA, Perez-Burgos L, Kohlmaier A, Opravil S, Tachibana M, Shinkai Y, Martens JH, Jenuwein T (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Molecular cell* **12**: 1577-1589
- Pfeifer GP, Yoon JH, Liu L, Tommasi S, Wilczynski SP, Dammann R (2002) Methylation of the RASSF1A gene in human cancers. *Biological chemistry* **383**: 907-914
- Phatnani HP, Greenleaf AL (2006) Phosphorylation and functions of the RNA polymerase II CTD. *Genes & development* **20**: 2922-2936

- Pichler G (2012), Dissertation: Crosstalk between DNA Methylation and Histone Modifications
- Portela A, Esteller M (2010) Epigenetic modifications and human disease. *Nature biotechnology* **28**: 1057-1068
- Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ (1999) Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *The Journal of biological chemistry* **274**: 33002-33010
- Praskova M, Khoklatchev A, Ortiz-Vega S, Avruch J (2004) Regulation of the MST1 kinase by autophosphorylation, by the growth inhibitory proteins, RASSF1 and NORE1, and by Ras. *The Biochemical journal* **381**: 453-462
- Prendergast GC, Ziff EB (1991) Methylation-sensitive sequence-specific DNA binding by the c-Myc basic region. *Science* **251**: 186-189
- Price ME, Cotton AM, Lam LL, Farre P, Emberly E, Brown CJ, Robinson WP, Kobor MS (2013) Additional annotation enhances potential for biologically-relevant analysis of the Illumina Infinium HumanMethylation450 BeadChip array. *Epigenetics & chromatin* **6**: 4
- Proffitt JH, Davie JR, Swinton D, Hattman S (1984) 5-Methylcytosine is not detectable in *Saccharomyces cerevisiae* DNA. *Molecular and cellular biology* **4**: 985-988
- Proudfoot N (2004) New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Current opinion in cell biology* **16**: 272-278
- Proudfoot NJ (1986) Transcriptional interference and termination between duplicated alpha-globin gene constructs suggests a novel mechanism for gene regulation. *Nature* **322**: 562-565
- Proudfoot NJ (1989) How RNA polymerase II terminates transcription in higher eukaryotes. *Trends in biochemical sciences* **14**: 105-110
- Psarros M, Heber S, Sick M, Thoppae G, Harshman K, Sick B (2005) RACE: Remote Analysis Computation for gene Expression data. *Nucleic acids research* **33**: W638-643
- Qian ZR, Sano T, Yoshimoto K, Yamada S, Ishizuka A, Mizusawa N, Horiguchi H, Hirokawa M, Asa SL (2005) Inactivation of RASSF1A tumor suppressor gene by aberrant promoter hypermethylation in human pituitary adenomas. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* **85**: 464-473
- Rada-Iglesias A, Bajpai R, Swigut T, Brugmann SA, Flynn RA, Wysocka J (2011) A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature* **470**: 279-283
- Rajakumara E, Wang Z, Ma H, Hu L, Chen H, Lin Y, Guo R, Wu F, Li H, Lan F, Shi YG, Xu Y, Patel DJ, Shi Y (2011) PHD finger recognition of unmodified histone H3R2 links UHRF1 to regulation of euchromatic gene expression. *Molecular cell* **43**: 275-284
- Ramchandani S, Bhattacharya SK, Cervoni N, Szyf M (1999) DNA methylation is a reversible biological signal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**: 6107-6112
- Rando OJ, Chang HY (2009) Genome-wide views of chromatin structure. *Annual review of biochemistry* **78**: 245-271
- Rauch T, Wang Z, Zhang X, Zhong X, Wu X, Lau SK, Kernstine KH, Riggs AD, Pfeifer GP (2007) Homeobox gene methylation in lung cancer studied by genome-wide analysis with a microarray-based methylated CpG island recovery assay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 5527-5532
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD, Jenuwein T (2000) Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature* **406**: 593-599
- Rees DC, Johnson E, Lewinson O (2009) ABC transporters: the power to change. *Nature reviews Molecular cell biology* **10**: 218-227
- Reichman M, Penman S (1973) The mechanism of inhibition of protein synthesis by 5-azacytidine in HeLa cells. *Biochimica et biophysica acta* **324**: 282-289
- Reik W (2007) Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. *Nature* **447**: 425-432
- Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B (2002) DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* **416**: 552-556
- Rhee I, Jair KW, Yen RW, Lengauer C, Herman JG, Kinzler KW, Vogelstein B, Baylin SB, Schuebel KE (2000) CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* **404**: 1003-1007
- Richard P, Manley JL (2009) Transcription termination by nuclear RNA polymerases. *Genes & development* **23**: 1247-1269
- Richter AM, Pfeifer GP, Dammann RH (2009) The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. *Biochimica et biophysica acta* **1796**: 114-128
- Rideout WM, 3rd, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA (1990) 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. *Science* **249**: 1288-1290
- Riggs AD (1975) X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenetics and cell genetics* **14**: 9-25
- Rizos H, Diefenbach E, Badhwar P, Woodruff S, Becker TM, Rooney RJ, Kefford RF (2003) Association of p14ARF with the p120E4F transcriptional repressor enhances cell cycle inhibition. *The Journal of biological chemistry* **278**: 4981-4989
- Robertson KD (2001) DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* **20**: 3139-3155
- Robertson KD (2005) DNA methylation and human disease. *Nature reviews Genetics* **6**: 597-610

- Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP (2000) DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nature genetics* **25**: 338-342
- Robertson KD, Jones PA (2000) DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis* **21**: 461-467
- Robertson KD, Uzvolgyi E, Liang G, Talmadge C, Sumegi J, Gonzales FA, Jones PA (1999) The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic acids research* **27**: 2291-2298
- Roessler J, Ammerpohl O, Gutwein J, Hasemeier B, Anwar SL, Kreipe H, Lehmann U (2012) Quantitative cross-validation and content analysis of the 450k DNA methylation array from Illumina, Inc. *BMC research notes* **5**: 210
- Rollins RA, Haghghi F, Edwards JR, Das R, Zhang MQ, Ju J, Bestor TH (2006) Large-scale structure of genomic methylation patterns. *Genome research* **16**: 157-163
- Rondinelli B, Schwerer H, Antonini E, Gaviraghi M, Lupi A, Frenquelli M, Cittaro D, Segalla S, Lemaitre JM, Tonon G (2015) H3K4me3 demethylation by the histone demethylase KDM5C/JARID1C promotes DNA replication origin firing. *Nucleic acids research* **43**: 2560-2574
- Ropero S, Esteller M (2007) The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Molecular oncology* **1**: 19-25
- Rose NR, Klose RJ (2014) Understanding the relationship between DNA methylation and histone lysine methylation. *Biochimica et biophysica acta* **1839**: 1362-1372
- Roth SY, Denu JM, Allis CD (2001) Histone acetyltransferases. *Annual review of biochemistry* **70**: 81-120
- Rottach A, Frauer C, Pichler G, Bonapace IM, Spada F, Leonhardt H (2010) The multi-domain protein Np95 connects DNA methylation and histone modification. *Nucleic acids research* **38**: 1796-1804
- Rougier N, Bourchis D, Gomes DM, Niveleau A, Plachot M, Paldi A, Viegas-Pequignot E (1998) Chromosome methylation patterns during mammalian preimplantation development. *Genes & development* **12**: 2108-2113
- Rowbotham SP, Barki L, Neves-Costa A, Santos F, Dean W, Hawkes N, Choudhary P, Will WR, Webster J, Oxley D, Green CM, Varga-Weisz P, Mermoud JE (2011) Maintenance of silent chromatin through replication requires SWI/SNF-like chromatin remodeler SMARCAD1. *Molecular cell* **42**: 285-296
- Sakabe K, Wang Z, Hart GW (2010) Beta-N-acetylglucosamine (O-GlcNAc) is part of the histone code. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**: 19915-19920
- Sandy P, Gostissa M, Fogal V, Cecco LD, Szalay K, Rooney RJ, Schneider C, Del Sal G (2000) p53 is involved in the p120E4F-mediated growth arrest. *Oncogene* **19**: 188-199
- Santagata S, Maire CL, Idbaih A, Geffers L, Correll M, Holton K, Quackenbush J, Ligon KL (2009) CRX is a diagnostic marker of retinal and pineal lineage tumors. *PLoS one* **4**: e7932
- Santi DV, Norment A, Garrett CE (1984) Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**: 6993-6997
- Sartor MA, Dolinoy DC, Jones TR, Colacino JA, Prince ME, Carey TE, Rozek LS (2011) Genome-wide methylation and expression differences in HPV(+) and HPV(-) squamous cell carcinoma cell lines are consistent with divergent mechanisms of carcinogenesis. *Epigenetics* **6**: 777-787
- Schagdarsurengin U, Wilkens L, Steinemann D, Flemming P, Kreipe HH, Pfeifer GP, Schlegelberger B, Dammann R (2003) Frequent epigenetic inactivation of the RASSF1A gene in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **22**: 1866-1871
- Schildhaus HU, Riegel R, Hartmann W, Steiner S, Wardelmann E, Merkelbach-Bruse S, Tanaka S, Sonobe H, Schule R, Buettner R, Kirfel J (2011) Lysine-specific demethylase 1 is highly expressed in solitary fibrous tumors, synovial sarcomas, rhabdomyosarcomas, desmoplastic small round cell tumors, and malignant peripheral nerve sheath tumors. *Human pathology* **42**: 1667-1675
- Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, Eden E, Yakhini Z, Ben-Shushan E, Reubinoff BE, Bergman Y, Simon I, Cedar H (2007) Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nature genetics* **39**: 232-236
- Schmid OT, Dissertation: Untersuchungen zur Genotoxizität von Formaldehyd in vitro und in vivo (2008)
- Schneider R, Bannister AJ, Kouzarides T (2002) Unsafe SETs: histone lysine methyltransferases and cancer. *Trends in biochemical sciences* **27**: 396-402
- Schrieck A, Easter AD, Etzold S, Wiederhold K, Lidschreiber M, Cramer P, Passmore LA (2014) RNA polymerase II termination involves C-terminal-domain tyrosine dephosphorylation by CPF subunit Glc7. *Nature structural & molecular biology* **21**: 175-179
- Schubeler D, Lorincz MC, Cimbora DM, Telling A, Feng YQ, Bouhassira EE, Groudine M (2000) Genomic targeting of methylated DNA: influence of methylation on transcription, replication, chromatin structure, and histone acetylation. *Molecular and cellular biology* **20**: 9103-9112
- Schultz DC, Ayyanathan K, Negorev D, Maul GG, Rauscher FJ, 3rd (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes & development* **16**: 919-932
- Scott MP, Tamkun JW, Hartzell GW, 3rd (1989) The structure and function of the homeodomain. *Biochimica et biophysica acta* **989**: 25-48
- Seidel C, Bartel F, Rastetter M, Bluemke K, Wurl P, Taubert H, Dammann R (2005) Alterations of cancer-related genes in soft tissue sarcomas: hypermethylation of RASSF1A is frequently detected in leiomyosarcoma and associated with poor prognosis in sarcoma. *International journal of cancer Journal international du cancer* **114**: 442-447

- Seisenberger S, Peat JR, Hore TA, Santos F, Dean W, Reik W (2013) Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **368**: 20110330
- Sequist LV, Waltman BA, Dias-Santagata D, Digumarthy S, Turke AB, Fidiyas P, Bergethon K, Shaw AT, Gettinger S, Cosper AK, Akhavanfard S, Heist RS, Temel J, Christensen JG, Wain JC, Lynch TJ, Vernovsky K, Mark EJ, Lanuti M, Iafrate AJ, Mino-Kenudson M, Engelman JA (2011) Genotypic and histological evolution of lung cancers acquiring resistance to EGFR inhibitors. *Science translational medicine* **3**: 75ra26
- Sharif J, Muto M, Takebayashi S, Suetake I, Iwamatsu A, Endo TA, Shinga J, Mizutani-Koseki Y, Toyoda T, Okamura K, Tajima S, Mitsuya K, Okano M, Koseki H (2007) The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* **450**: 908-912
- Sharma D, Vertino PM (2004) Epigenetic regulation of MDR1 gene in breast cancer: CpG methylation status dominates the stable maintenance of a silent gene. *Cancer biology & therapy* **3**: 549-550
- Sharpe DJ, Orr KS, Moran M, White SJ, McQuaid S, Lappin TR, Thompson A, James JA (2014) POU2F1 activity regulates HOXD10 and HOXD11 promoting a proliferative and invasive phenotype in head and neck cancer. *Oncotarget* **5**: 8803-8815
- Shearwin KE, Callen BP, Egan JB (2005) Transcriptional interference--a crash course. *Trends in genetics : TIG* **21**: 339-345
- Shen L, Inoue A, He J, Liu Y, Lu F, Zhang Y (2014) Tet3 and DNA replication mediate demethylation of both the maternal and paternal genomes in mouse zygotes. *Cell stem cell* **15**: 459-470
- Shen L, Toyota M, Kondo Y, Lin E, Zhang L, Guo Y, Hernandez NS, Chen X, Ahmed S, Konishi K, Hamilton SR, Issa JP (2007) Integrated genetic and epigenetic analysis identifies three different subclasses of colon cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**: 18654-18659
- Shi J, Marconett CN, Duan J, Hyland PL, Li P, Wang Z, Wheeler W, Zhou B, Campan M, Lee DS, Huang J, Zhou W, Triche T, Amundadottir L, Warner A, Hutchinson A, Chen PH, Chung BS, Pesatori AC, Consonni D, Bertazzi PA, Bergen AW, Freedman M, Siegmund KD, Berman BP, Borok Z, Chatterjee N, Tucker MA, Caporaso NE, Chanock SJ, Laird-Offringa IA, Landi MT (2014) Characterizing the genetic basis of methylome diversity in histologically normal human lung tissue. *Nature communications* **5**: 3365
- Shi Y, Whetstone JR (2007) Dynamic regulation of histone lysine methylation by demethylases. *Molecular cell* **25**: 1-14
- Shiio Y, Eisenman RN (2003) Histone sumoylation is associated with transcriptional repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 13225-13230
- Shinkai Y, Tachibana M (2011) H3K9 methyltransferase G9a and the related molecule GLP. *Genes & development* **25**: 781-788
- Shivakumar L, Minna J, Sakamaki T, Pestell R, White MA (2002) The RASSF1A tumor suppressor blocks cell cycle progression and inhibits cyclin D1 accumulation. *Molecular and cellular biology* **22**: 4309-4318
- Shukla S, Kavak E, Gregory M, Imashimizu M, Shutinoski B, Kashlev M, Oberdoerffer P, Sandberg R, Oberdoerffer S (2011) CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. *Nature* **479**: 74-79
- Sims RJ, 3rd, Belotserkovskaya R, Reinberg D (2004) Elongation by RNA polymerase II: the short and long of it. *Genes & development* **18**: 2437-2468
- Singh A, Settleman J (2010) EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. *Oncogene* **29**: 4741-4751
- Singh BN, Zhang G, Hwa YL, Li J, Dowdy SC, Jiang SW (2010) Nonhistone protein acetylation as cancer therapy targets. *Expert review of anticancer therapy* **10**: 935-954
- Singh P, Alley TL, Wright SM, Kamdar S, Schott W, Wilpan RY, Mills KD, Graber JH (2009) Global changes in processing of mRNA 3' untranslated regions characterize clinically distinct cancer subtypes. *Cancer research* **69**: 9422-9430
- Slany RK (2009) The molecular biology of mixed lineage leukemia. *Haematologica* **94**: 984-993
- Smiraglia DJ, Rush LJ, Fruhwald MC, Dai Z, Held WA, Costello JF, Lang JC, Eng C, Li B, Wright FA, Caligiuri MA, Plass C (2001) Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies. *Human molecular genetics* **10**: 1413-1419
- Smit JJ, Mol CA, van Deemter L, Wagenaar E, Schinkel AH, Borst P (1995) Characterization of the promoter region of the human MDR3 P-glycoprotein gene. *Biochimica et biophysica acta* **1261**: 44-56
- Smith BC, Denu JM (2009) Chemical mechanisms of histone lysine and arginine modifications. *Biochimica et biophysica acta* **1789**: 45-57
- Smith ZD, Meissner A (2013) DNA methylation: roles in mammalian development. *Nature reviews Genetics* **14**: 204-220
- Song F, Smith JF, Kimura MT, Morrow AD, Matsuyama T, Nagase H, Held WA (2005a) Association of tissue-specific differentially methylated regions (TDMs) with differential gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 3336-3341
- Song J, Noh JH, Lee JH, Eun JW, Ahn YM, Kim SY, Lee SH, Park WS, Yoo NJ, Lee JY, Nam SW (2005b) Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **113**: 264-268
- Stadler MB, Murr R, Burger L, Ivanek R, Lienert F, Scholer A, van Nimwegen E, Wirbelauer C, Oakeley EJ, Gaidatzis D, Tiwari VK, Schubeler D (2011) DNA-binding factors shape the mouse methylome at distal regulatory regions. *Nature* **480**: 490-495
- Stepanyuk GA, Liu ZJ, Vysotski ES, Lee J, Rose JP, Wang BC (2009) Structure based mechanism of the Ca(2+)-induced release of coelenterazine from the Renilla binding protein. *Proteins* **74**: 583-593
- Strand SH, Orntoft TF, Sorensen KD (2014) Prognostic DNA methylation markers for prostate cancer. *International journal of molecular sciences* **15**: 16544-16576

- Stresemann C, Lyko F (2008) Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *International journal of cancer Journal internationale du cancer* **123**: 8-13
- Strichman-Almashanu LZ, Lee RS, Onyango PO, Perlman E, Flam F, Frieman MB, Feinberg AP (2002) A genome-wide screen for normally methylated human CpG islands that can identify novel imprinted genes. *Genome research* **12**: 543-554
- Struhl K (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes & development* **12**: 599-606
- Strunnikova M, Schagdarsurengin U, Kehlen A, Garbe JC, Stampfer MR, Dammann R (2005) Chromatin inactivation precedes de novo DNA methylation during the progressive epigenetic silencing of the RASSF1A promoter. *Molecular and cellular biology* **25**: 3923-3933
- Suopelyte K, Daniunaite K, Laurinaviciene A, Ostapenko V, Jarmalaite S (2013) High-resolution melting-based quantitative analysis of RASSF1 methylation in breast cancer. *Medicina (Kaunas)* **49**: 78-83
- Stutes M, Tran S, DeMorrow S (2007) Genetic and epigenetic changes associated with cholangiocarcinoma: from DNA methylation to microRNAs. *World journal of gastroenterology* **13**: 6465-6469
- Stutterheim J, Ichou FA, den Ouden E, Versteeg R, Caron HN, Tytgat GA, van der Schoot CE (2012) Methylated RASSF1a is the first specific DNA marker for minimal residual disease testing in neuroblastoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**: 808-814
- Stypula-Cyrus Y, Damania D, Kunte DP, Cruz MD, Subramanian H, Roy HK, Backman V (2013) HDAC up-regulation in early colon field carcinogenesis is involved in cell tumorigenicity through regulation of chromatin structure. *PLoS one* **8**: e64600
- Suda K, Tomizawa K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Maehara Y, Yatabe Y, Sekido Y, Mitsudomi T (2011) Epithelial to mesenchymal transition in an epidermal growth factor receptor-mutant lung cancer cell line with acquired resistance to erlotinib. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* **6**: 1152-1161
- Suetake I, Shinozaki F, Miyagawa J, Takeshima H, Tajima S (2004) DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *The Journal of biological chemistry* **279**: 27816-27823
- Suva ML, Riggi N, Janiszewska M, Radovanovic I, Provero P, Stehle JC, Baumer K, Le Bitoux MA, Marino D, Cironi L, Marquez VE, Clement V, Stamenkovic I (2009) EZH2 is essential for glioblastoma cancer stem cell maintenance. *Cancer research* **69**: 9211-9218
- Suzuki K, Shijuuko T, Fukamachi T, Zaunders J, Guillemin G, Cooper D, Kelleher A (2005) Prolonged transcriptional silencing and CpG methylation induced by siRNAs targeted to the HIV-1 promoter region. *Journal of RNAi and gene silencing : an international journal of RNA and gene targeting research* **1**: 66-78
- Tachibana M, Sugimoto K, Fukushima T, Shinkai Y (2001) Set domain-containing protein, G9a, is a novel lysine-preferring mammalian histone methyltransferase with hyperactivity and specific selectivity to lysines 9 and 27 of histone H3. *The Journal of biological chemistry* **276**: 25309-25317
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A (2009) Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**: 930-935
- Takai D, Jones PA (2002) Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 3740-3745
- Talbert PB, Henikoff S (2010) Histone variants--ancient wrap artists of the epigenome. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 264-275
- Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee PL, Karuturi RK, Tan PB, Liu ET, Yu Q (2007) Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes & development* **21**: 1050-1063
- Tan M, Luo H, Lee S, Jin F, Yang JS, Montellier E, Buchou T, Cheng Z, Rousseaux S, Rajagopal N, Lu Z, Ye Z, Zhu Q, Wysocka J, Ye Y, Khochbin S, Ren B, Zhao Y (2011) Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* **146**: 1016-1028
- Tanemura A, Terando AM, Sim MS, van Hoesel AQ, de Maat MF, Morton DL, Hoon DS (2009) CpG island methylator phenotype predicts progression of malignant melanoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **15**: 1801-1807
- Tang M, Xu W, Wang Q, Xiao W, Xu R (2009) Potential of DNMT and its Epigenetic Regulation for Lung Cancer Therapy. *Current genomics* **10**: 336-352
- Taverna SD, Li H, Ruthenburg AJ, Allis CD, Patel DJ (2007) How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nature structural & molecular biology* **14**: 1025-1040
- Teperek-Tkacz M, Pasque V, Gentsch G, Ferguson-Smith AC (2011) Epigenetic reprogramming: is deamination key to active DNA demethylation? *Reproduction* **142**: 621-632
- Teschendorff AE, West J, Beck S (2013) Age-associated epigenetic drift: implications, and a case of epigenetic thrift? *Human molecular genetics* **22**: R7-R15
- Thompson AJ, Myatt SC (1997) Tetracycline-dependent activation of an upstream promoter reveals transcriptional interference between tandem genes within T-DNA in tomato. *Plant molecular biology* **34**: 687-692
- Tillinghast GW, Partee J, Albert P, Kelley JM, Burtow KH, Kelly K (2003) Analysis of genetic stability at the EP300 and CREBBP loci in a panel of cancer cell lines. *Genes, chromosomes & cancer* **37**: 121-131
- Timmons JA, Good L (2006) Does everything now make (anti)sense? *Biochemical Society transactions* **34**: 1148-1150
- Ting AH, Schuebel KE, Herman JG, Baylin SB (2005) Short double-stranded RNA induces transcriptional gene silencing in human cancer cells in the absence of DNA methylation. *Nature genetics* **37**: 906-910

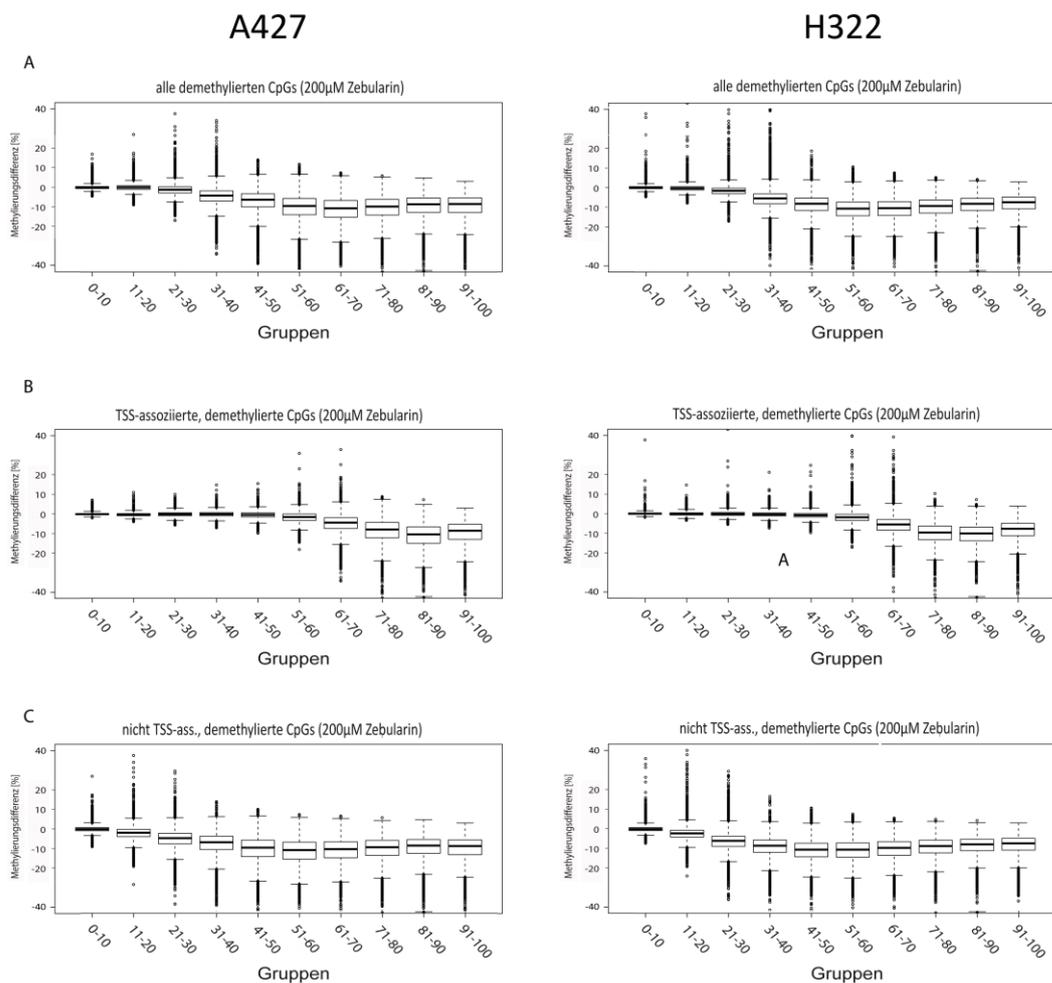
- Tomizawa Y, Kohno T, Kondo H, Otsuka A, Nishioka M, Niki T, Yamada T, Maeshima A, Yoshimura K, Saito R, Minna JD, Yokota J (2002) Clinicopathological significance of epigenetic inactivation of RASSF1A at 3p21.3 in stage I lung adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **8**: 2362-2368
- Tougeron D, Fotsing G, Barbu V, Beauchant M (2012) ABCB4/MDR3 gene mutations and cholangiocarcinomas. *Journal of hepatology* **57**: 467-468
- Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y (2006) Histone demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature* **439**: 811-816
- Tsumura A, Hayakawa T, Kumaki Y, Takebayashi S, Sakaue M, Matsuoka C, Shimotohno K, Ishikawa F, Li E, Ueda HR, Nakayama J, Okano M (2006) Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms* **11**: 805-814
- Turker MS (1999) The establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mouse somatic cells. *Seminars in cancer biology* **9**: 329-337
- Turner BM (2007) Defining an epigenetic code. *Nature cell biology* **9**: 2-6
- Unoki M, Daigo Y, Koinuma J, Tsuchiya E, Hamamoto R, Nakamura Y (2010) UHRF1 is a novel diagnostic marker of lung cancer. *British journal of cancer* **103**: 217-222
- Unterberger A, Dubuc AM, Taylor MD (2012) Genome-wide methylation analysis. *Methods Mol Biol* **863**: 303-317
- Valerius O, Brendel C, Duvel K, Braus GH (2002) Multiple factors prevent transcriptional interference at the yeast ARO4-HIS7 locus. *The Journal of biological chemistry* **277**: 21440-21445
- Van Beekum O, Kalkhoven E (2007) Aberrant forms of histone acetyltransferases in human disease. *Sub-cellular biochemistry* **41**: 233-262
- van der Weyden L, Adams DJ (2007) The Ras-association domain family (RASSF) members and their role in human tumorigenesis. *Biochimica et biophysica acta* **1776**: 58-85
- van Kemenade FJ, Raaphorst FM, Blokzijl T, Fieret E, Hamer KM, Satijn DP, Otte AP, Meijer CJ (2001) Coexpression of BMI-1 and EZH2 polycomb-group proteins is associated with cycling cells and degree of malignancy in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood* **97**: 3896-3901
- Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, Rubin MA, Chinnaiyan AM (2002) The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* **419**: 624-629
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nuskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, Yao A, Ye J, Zhan M, Zhang W, Zhang H, Zhao Q, Zheng L, Zhong F, Zhong W, Zhu S, Zhao S, Gilbert D, Baumhueter S, Spier G, Carter C, Cravchik A, Woodage T, Ali F, An H, Awe A, Baldwin D, Baden H, Barnstead M, Barrow I, Beeson K, Busam D, Carver A, Center A, Cheng ML, Curry L, Danaher S, Davenport L, Desilets R, Dietz S, Dodson K, Doup L, Ferreira S, Garg N, Gluecksmann A, Hart B, Haynes J, Haynes C, Heiner C, Hladun S, Hostin D, Houck J, Howland T, Ibegwam C, Johnson J, Kalush F, Kline L, Koduru S, Love A, Mann F, May D, McCawley S, McIntosh T, McMullen I, Moy M, Moy L, Murphy B, Nelson K, Pfannkoch C, Pratts E, Puri V, Qureshi H, Reardon M, Rodriguez R, Rogers YH, Romblad D, Ruhfel B, Scott R, Sitter C, Smallwood M, Stewart E, Strong R, Suh E, Thomas R, Tint NN, Tse S, Vech C, Wang G, Wetter J, Williams S, Williams M, Windsor S, Winn-Deen E, Wolfe K, Zaveri J, Zaveri K, Abril JF, Guigo R, Campbell MJ, Sjolander KV, Karlak B, Kejariwal A, Mi H, Lazareva B, Hatton T, Narechania A, Diemer K, Muruganujan A, Guo N, Sato S, Bafna V, Istrail S, Lippert R, Schwartz R, Walenz B, Yooshep S, Allen D, Basu A, Baxendale J, Blick L, Caminha M, Carnes-Stine J, Caulk P, Chiang YH, Coyne M, Dahlke C, Mays A, Dombroski M, Donnelly M, Ely D, Esparham S, Fosler C, Gire H, Glanowski S, Glasser K, Glodek A, Gorokhov M, Graham K, Gropman B, Harris M, Heil J, Henderson S, Hoover J, Jennings D, Jordan C, Jordan J, Kasha J, Kagan L, Kraft C, Levitsky A, Lewis M, Liu X, Lopez J, Ma D, Majoros W, McDaniel J, Murphy S, Newman M, Nguyen T, Nguyen N, Nodell M, Pan S, Peck J, Peterson M, Rowe W, Sanders R, Scott J, Simpson M, Smith T, Sprague A, Stockwell T, Turner R, Venter E, Wang M, Wen M, Wu D, Wu M, Xia A, Zandieh A, Zhu X (2001) The sequence of the human genome. *Science* **291**: 1304-1351
- Vertino PM, Yen RW, Gao J, Baylin SB (1996) De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5)-methyltransferase. *Molecular and cellular biology* **16**: 4555-4565
- Vieux-Rochas M, Fabre PJ, Leleu M, Duboule D, Noordermeer D (2015) Clustering of mammalian Hox genes with other H3K27me3 targets within an active nuclear domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 4672-4677
- Vilkaitis G, Suetake I, Klimasauskas S, Tajima S (2005) Processive methylation of hemimethylated CpG sites by mouse Dnmt1 DNA methyltransferase. *The Journal of biological chemistry* **280**: 64-72
- Virani S, Colacino JA, Kim JH, Rozek LS (2012) Cancer epigenetics: a brief review. *ILAR journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* **53**: 359-369
- Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, Bollen M, Esteller M, Di Croce L, de Launoit Y, Fuks F (2006) The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* **439**: 871-874
- Volpe TA, Kidner C, Hall IM, Teng G, Grewal SI, Martienssen RA (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**: 1833-1837
- Vos MD, Martinez A, Elam C, Dallol A, Taylor BJ, Latif F, Clark GJ (2004) A role for the RASSF1A tumor suppressor in the regulation of tubulin polymerization and genomic stability. *Cancer research* **64**: 4244-4250
- Wade PA, Jones PL, Vermaak D, Wolffe AP (1998) A multiple subunit Mi-2 histone deacetylase from *Xenopus laevis* cofractionates with an associated Snf2 superfamily ATPase. *Current biology : CB* **8**: 843-846

- Wagner JR, Busche S, Ge B, Kwan T, Pastinen T, Blanchette M (2014) The relationship between DNA methylation, genetic and expression inter-individual variation in untransformed human fibroblasts. *Genome biology* **15**: R37
- Wagner W, Weidner CI, Lin Q (2015) Do age-associated DNA methylation changes increase the risk of malignant transformation? *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* **37**: 20-24
- Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH (1998) Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nature genetics* **20**: 116-117
- Walter K, Holcomb T, Januario T, Du P, Evangelista M, Kartha N, Iniguez L, Soriano R, Huw L, Stern H, Modrusan Z, Seshagiri S, Hampton GM, Amler LC, Bourgon R, Yauch RL, Shames DS (2012) DNA methylation profiling defines clinically relevant biological subsets of non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **18**: 2360-2373
- Wang C, Shen J, Yang Z, Chen P, Zhao B, Hu W, Lan W, Tong X, Wu H, Li G, Cao C (2011) Structural basis for site-specific reading of unmodified R2 of histone H3 tail by UHRF1 PHD finger. *Cell research* **21**: 1379-1382
- Wang D, Liu X, Zhou Y, Xie H, Hong X, Tsai HJ, Wang G, Liu R, Wang X (2012a) Individual variation and longitudinal pattern of genome-wide DNA methylation from birth to the first two years of life. *Epigenetics* **7**: 594-605
- Wang F, Yang YZ, Shi CZ, Zhang P, Moyer MP, Zhang HZ, Zou Y, Qin HL (2012b) UHRF1 promotes cell growth and metastasis through repression of p16(ink4a) in colorectal cancer. *Annals of surgical oncology* **19**: 2753-2762
- Wang GG, Allis CD, Chi P (2007a) Chromatin remodeling and cancer, Part I: Covalent histone modifications. *Trends in molecular medicine* **13**: 363-372
- Wang J, Bhutani M, Pathak AK, Lang W, Ren H, Jelinek J, He R, Shen L, Issa JP, Mao L (2007b) Delta DNMT3B variants regulate DNA methylation in a promoter-specific manner. *Cancer research* **67**: 10647-10652
- Wang J, Walsh G, Liu DD, Lee JJ, Mao L (2006a) Expression of Delta DNMT3B variants and its association with promoter methylation of p16 and RASSF1A in primary non-small cell lung cancer. *Cancer research* **66**: 8361-8366
- Wang L, Wang J, Sun S, Rodriguez M, Yue P, Jang SJ, Mao L (2006b) A novel DNMT3B subfamily, DeltaDNMT3B, is the predominant form of DNMT3B in non-small cell lung cancer. *International journal of oncology* **29**: 201-207
- Wang L, Zhang J, Duan J, Gao X, Zhu W, Lu X, Yang L, Li G, Ci W, Li W, Zhou Q, Aluru N, Tang F, He C, Huang X, Liu J (2014) Programming and inheritance of parental DNA methylomes in mammals. *Cell* **157**: 979-991
- Wang S, Dorsey TH, Terunuma A, Kittles RA, Ambs S, Kwabi-Addo B (2012c) Relationship between tumor DNA methylation status and patient characteristics in African-American and European-American women with breast cancer. *PloS one* **7**: e37928
- Wang Y, Yu Z, Wang T, Zhang J, Hong L, Chen L (2007c) Identification of epigenetic aberrant promoter methylation of RASSF1A in serum DNA and its clinicopathological significance in lung cancer. *Lung Cancer* **56**: 289-294
- Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M, Schubeler D (2007) Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature genetics* **39**: 457-466
- Webster KE, O'Bryan MK, Fletcher S, Crewther PE, Aapola U, Craig J, Harrison DK, Aung H, Phutikanit N, Lyle R, Meachem SJ, Antonarakis SE, de Kretser DM, Hedger MP, Peterson P, Carroll BJ, Scott HS (2005) Meiotic and epigenetic defects in Dnmt3L-knockout mouse spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**: 4068-4073
- Weichert W, Roske A, Gekeler V, Beckers T, Stephan C, Jung K, Fritzsche FR, Niesporek S, Denkert C, Dietel M, Kristiansen G (2008) Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. *British journal of cancer* **98**: 604-610
- Weinberg MS, Villeneuve LM, Ehsani A, Amarzguioui M, Aagaard L, Chen ZX, Riggs AD, Rossi JJ, Morris KV (2006) The antisense strand of small interfering RNAs directs histone methylation and transcriptional gene silencing in human cells. *RNA* **12**: 256-262
- Weinberg OK, Marquez-Garban DC, Fishbein MC, Goodlick L, Garban HJ, Dubinett SM, Pietras RJ (2005) Aromatase inhibitors in human lung cancer therapy. *Cancer research* **65**: 11287-11291
- Wendum D, Barbu V, Rosmorduc O, Arrive L, Flejou JF, Poupon R (2012) Aspects of liver pathology in adult patients with MDR3/ABC4 gene mutations. *Virchows Archiv : an international journal of pathology* **460**: 291-298
- Whitelaw E, Proudfoot N (1986) Alpha-thalassaemia caused by a poly(A) site mutation reveals that transcriptional termination is linked to 3' end processing in the human alpha 2 globin gene. *The EMBO journal* **5**: 2915-2922
- Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, Weisenberger DJ, Campan M, Young J, Jacobs I, Laird PW (2007) Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nature genetics* **39**: 157-158
- Wijermans P, Lubbert M, Verhoef G, Bosly A, Ravoet C, Andre M, Ferrant A (2000) Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **18**: 956-962
- Wijermans PW, Lubbert M, Verhoef G, Klimek V, Bosly A (2005) An epigenetic approach to the treatment of advanced MDS; the experience with the DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in 177 patients. *Annals of hematology* **84 Suppl 1**: 9-17
- Williams CJ, Naito T, Arco PG, Seavitt JR, Cashman SM, De Souza B, Qi X, Keables P, Von Andrian UH, Georgopoulos K (2004) The chromatin remodeler Mi-2beta is required for CD4 expression and T cell development. *Immunity* **20**: 719-733
- Wilson AJ, Byun DS, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y, Arango D, Velcich A, Augenlicht LH, Mariadason JM (2006) Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *The Journal of biological chemistry* **281**: 13548-13558

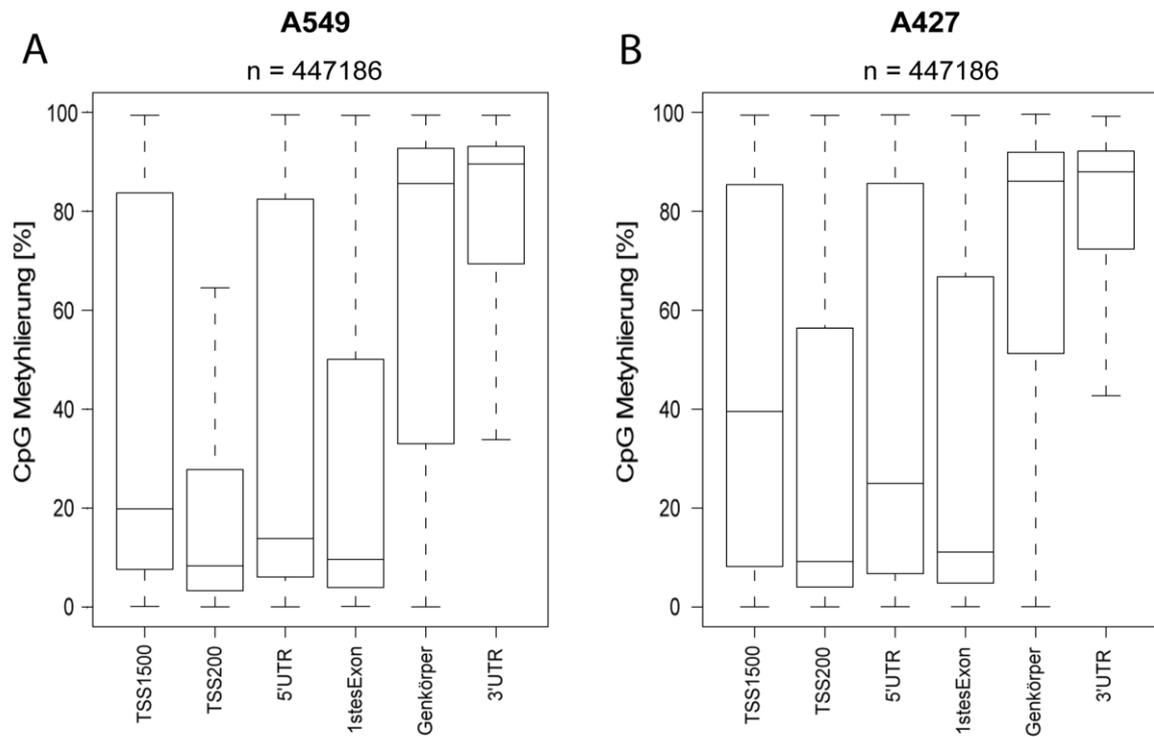
- Wilson BG, Wang X, Shen X, McKenna ES, Lemieux ME, Cho YJ, Koellhoffer EC, Pomeroy SL, Orkin SH, Roberts CW (2010) Epigenetic antagonism between polycomb and SWI/SNF complexes during oncogenic transformation. *Cancer cell* **18**: 316-328
- Wood H (2013) Neurodegenerative disease: altered DNA methylation and RNA splicing could be key mechanisms in Huntington disease. *Nature reviews Neurology* **9**: 119
- Woodcock CL, Ghosh RP (2010) Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**: a000596
- Wu SC, Zhang Y (2010) Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nature reviews Molecular cell biology* **11**: 607-620
- Wysocka J, Allis CD, Coonrod S (2006) Histone arginine methylation and its dynamic regulation. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* **11**: 344-355
- Xie S, Wang Z, Okano M, Nogami M, Li Y, He WW, Okumura K, Li E (1999) Cloning, expression and chromosome locations of the human DNMT3 gene family. *Gene* **236**: 87-95
- Xie X, Lu J, Kulbokas EJ, Golub TR, Mootha V, Lindblad-Toh K, Lander ES, Kellis M (2005) Systematic discovery of regulatory motifs in human promoters and 3' UTRs by comparison of several mammals. *Nature* **434**: 338-345
- Xiong Z, Laird PW (1997) COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic acids research* **25**: 2532-2534
- Xu J, Shetty PB, Feng W, Chenault C, Bast RC, Jr., Issa JP, Hilsenbeck SG, Yu Y (2012) Methylation of HIN-1, RASSF1A, RIL and CDH13 in breast cancer is associated with clinical characteristics, but only RASSF1A methylation is associated with outcome. *BMC cancer* **12**: 243
- Yang Q, Doublet S (2011) Structural biology of poly(A) site definition. *Wiley interdisciplinary reviews RNA* **2**: 732-747
- Yang X, Dai W, Kwong DL, Szeto CY, Wong EH, Ng WT, Lee AW, Ngan RK, Yau CC, Tung SY, Lung ML (2015) Epigenetic markers for noninvasive early detection of nasopharyngeal carcinoma by methylation-sensitive high resolution melting. *International journal of cancer Journal international du cancer* **136**: E127-135
- Yang X, Han H, De Carvalho DD, Lay FD, Jones PA, Liang G (2014) Gene body methylation can alter gene expression and is a therapeutic target in cancer. *Cancer cell* **26**: 577-590
- Yang X, Lay F, Han H, Jones PA (2010) Targeting DNA methylation for epigenetic therapy. *Trends in pharmacological sciences* **31**: 536-546
- Yang XJ, Ullah M (2007) MOZ and MORF, two large MYSTic HATs in normal and cancer stem cells. *Oncogene* **26**: 5408-5419
- Yang ZQ, Imoto I, Fukuda Y, Pimkhaokham A, Shimada Y, Imamura M, Sugano S, Nakamura Y, Inazawa J (2000) Identification of a novel gene, GASC1, within an amplicon at 9p23-24 frequently detected in esophageal cancer cell lines. *Cancer research* **60**: 4735-4739
- Yauch RL, Januario T, Eberhard DA, Cavet G, Zhu W, Fu L, Pham TQ, Soriano R, Stinson J, Seshagiri S, Modrusan Z, Lin CY, O'Neill V, Amler LC (2005) Epithelial versus mesenchymal phenotype determines in vitro sensitivity and predicts clinical activity of erlotinib in lung cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **11**: 8686-8698
- Yazarloo F, Shirkoobi R, Mobasher MB, Emami A, Modarressi MH (2013) Expression analysis of four testis-specific genes AURKC, OIP5, PIWIL2 and TAF7L in acute myeloid leukemia: a gender-dependent expression pattern. *Med Oncol* **30**: 368
- Yin LJ, Zhang Y, Lv PP, He WH, Wu YT, Liu AX, Ding GL, Dong MY, Qu F, Xu CM, Zhu XM, Huang HF (2012) Insufficient maintenance DNA methylation is associated with abnormal embryonic development. *BMC medicine* **10**: 26
- Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH (1997) Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends in genetics : TIG* **13**: 335-340
- Yokota J, Wada M, Shimosato Y, Terada M, Sugimura T (1987) Loss of heterozygosity on chromosomes 3, 13, and 17 in small-cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 9252-9256
- Yonaha M, Proudfoot NJ (2000) Transcriptional termination and coupled polyadenylation in vitro. *The EMBO journal* **19**: 3770-3777
- Yoo CB, Chuang JC, Byun HM, Egger G, Yang AS, Dubeau L, Long T, Laird PW, Marquez VE, Jones PA (2008) Long-term epigenetic therapy with oral zebularine has minimal side effects and prevents intestinal tumors in mice. *Cancer Prev Res (Phila)* **1**: 233-240
- Yoo J, Choi S, Medina-Franco JL (2013) Molecular modeling studies of the novel inhibitors of DNA methyltransferases SGI-1027 and CBC12: implications for the mechanism of inhibition of DNMTs. *PLoS one* **8**: e62152
- Yu J, Ni M, Xu J, Zhang H, Gao B, Gu J, Chen J, Zhang L, Wu M, Zhen S, Zhu J (2002) Methylation profiling of twenty promoter-CpG islands of genes which may contribute to hepatocellular carcinogenesis. *BMC cancer* **2**: 29
- Yuan GC, Liu YJ, Dion MF, Slack MD, Wu LF, Altschuler SJ, Rando OJ (2005) Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* **309**: 626-630
- Zee BM, Levin RS, Xu B, LeRoy G, Wingreen NS, Garcia BA (2010) In vivo residue-specific histone methylation dynamics. *The Journal of biological chemistry* **285**: 3341-3350
- Zeng L, Zhou MM (2002) Bromodomain: an acetyl-lysine binding domain. *FEBS letters* **513**: 124-128
- Zentner GE, Henikoff S (2013) Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature structural & molecular biology* **20**: 259-266
- Zentner GE, Tesar PJ, Scacheri PC (2011) Epigenetic signatures distinguish multiple classes of enhancers with distinct cellular functions. *Genome research* **21**: 1273-1283

- Zhan C, Zhang Y, Ma J, Wang L, Jiang W, Shi Y, Wang Q (2014) Identification of reference genes for qRT-PCR in human lung squamous-cell carcinoma by RNA-Seq. *Acta biochimica et biophysica Sinica* **46**: 330-337
- Zhang CY, Zhao YX, Xia RH, Han J, Wang BS, Tian Z, Wang LZ, Hu YH, Li J (2014) RASSF1A promoter hypermethylation is a strong biomarker of poor survival in patients with salivary adenoid cystic carcinoma in a Chinese population. *PLoS one* **9**: e110159
- Zhang S, Roche K, Nasheuer HP, Lowndes NF (2011) Modification of histones by sugar beta-N-acetylglucosamine (GlcNAc) occurs on multiple residues, including histone H3 serine 10, and is cell cycle-regulated. *The Journal of biological chemistry* **286**: 37483-37495
- Zhang T, Cooper S, Brockdorff N (2015) The interplay of histone modifications - writers that read. *EMBO reports* **16**: 1467-1481
- Zhang Y (2003) Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes & development* **17**: 2733-2740
- Zhang Y, LeRoy G, Seelig HP, Lane WS, Reinberg D (1998) The dermatomyositis-specific autoantigen Mi2 is a component of a complex containing histone deacetylase and nucleosome remodeling activities. *Cell* **95**: 279-289
- Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Omoto Y, Ando Y, Mita K, Hamaguchi M, Hayashi S, Iwase H (2004) HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**: 6962-6968
- Zhou P, Lu Y, Sun XH (2012) Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor Zebularine on human lens epithelial cells. *Molecular vision* **18**: 22-28
- Zhu J, He F, Hu S, Yu J (2008) On the nature of human housekeeping genes. *Trends in genetics : TIG* **24**: 481-484
- Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Gottlicher M (2004) Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer cell* **5**: 455-463
- Zilberman D, Cao X, Jacobsen SE (2003) ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation. *Science* **299**: 716-719

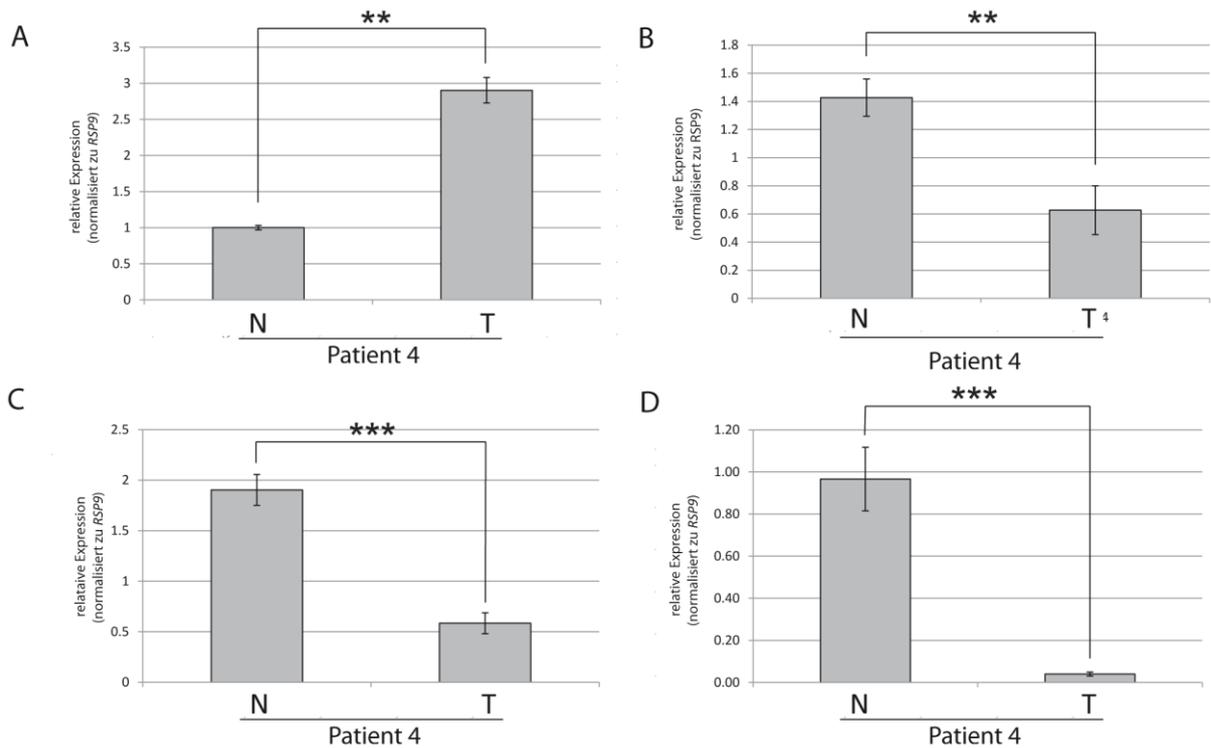
## 6. Anhang



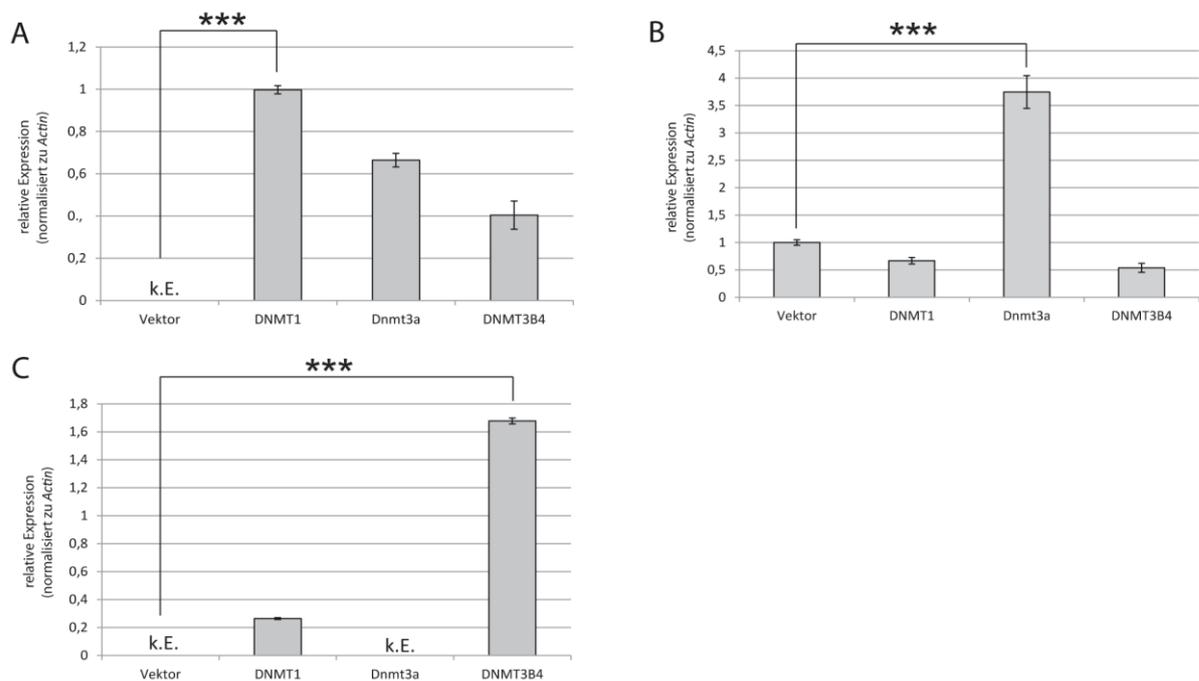
**Abbildung 36: Demethylierungseffizienz verschiedener DNMT-Inhibitoren in Lungenkrebszelllinien.** Dargestellt ist die Demethylierung in Abhängigkeit vom Ausgangsmethylierungslevel von A427- und H322-Zellen nach 4 tägiger DNMT-Inhibitor Behandlung mit 200 µM Zebularin. Die Ausgangsmethylierungslevel sind zu jeweils 10 Gruppen zusammengefasst: Gruppe 0-10 = 0-10% Ausgangsmethylierungslevel bis Gruppe 91-100 = 91-100 % Ausgangsmethylierungslevel. Die Demethylierung wurde für alle verfügbaren CpGs (A), für Transkriptionsstart (TSS)-assoziierte CpGs (B) und für nicht TSS-assoziierte CpGs (C) nach DNMT-Inhibitor Behandlung dargestellt.



**Abbildung 37: Vergleich der DNA-Methylierung von verschiedenen funktionellen Regionen zwischen A549 Lungenkrebszellen und A427.** TSS = Transkriptionsstart, UTR= untranslatierte Region. **A**, Verteilung der DNA-Methylierung (in %) des *Illumina* 450k Datensatzes von A549 Lungenkrebszellen auf die verschiedenen Gen-Regionen. **B**, Verteilung der DNA-Methylierung (in %) des *Illumina* 450k Datensatzes von A427 auf die verschiedenen Gen-Regionen.

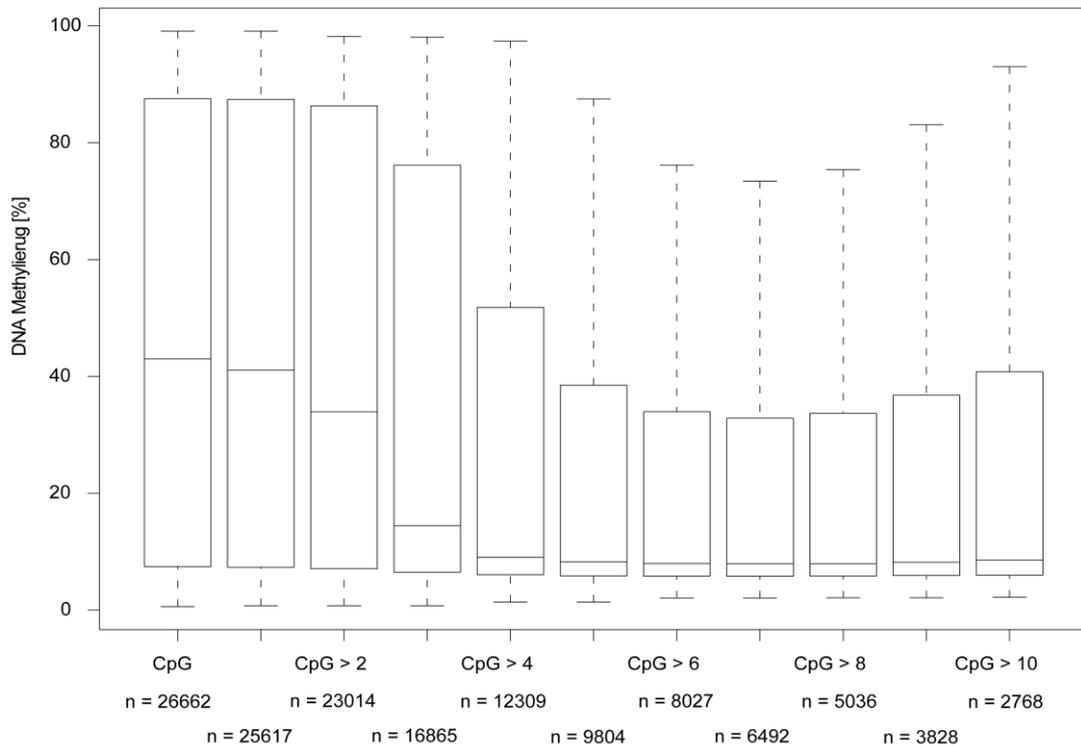


**Abbildung 38: Expressionsprofile von RASSF1A und verschiedener DNMTs und einiger Interaktionspartner in Lungenzelllinien und primären Lungentumoren.** A-D: Expressionsanalyse von primären Lungentumoren (T) und zugehörigen Normalgeweben (N) des Lungenkrebs-Patienten 4 mittel qRT-PCR: Es wurde die Expression von RASSF1A (A), DNMT1 (B), DNMT3A (C) und DNMT3B (D) analysiert. Die relativen Expressionen der primären Lungengewebe sind normalisiert zur RSP9 Expression dargestellt. Die signifikanten Expressionsunterschiede zwischen Krebszelllinien und normalen Zelllinien wurden durch die entsprechenden Signifikanzniveaus dargestellt: \* = 0,05; \*\* = 0,01; \*\*\* = 0,001.

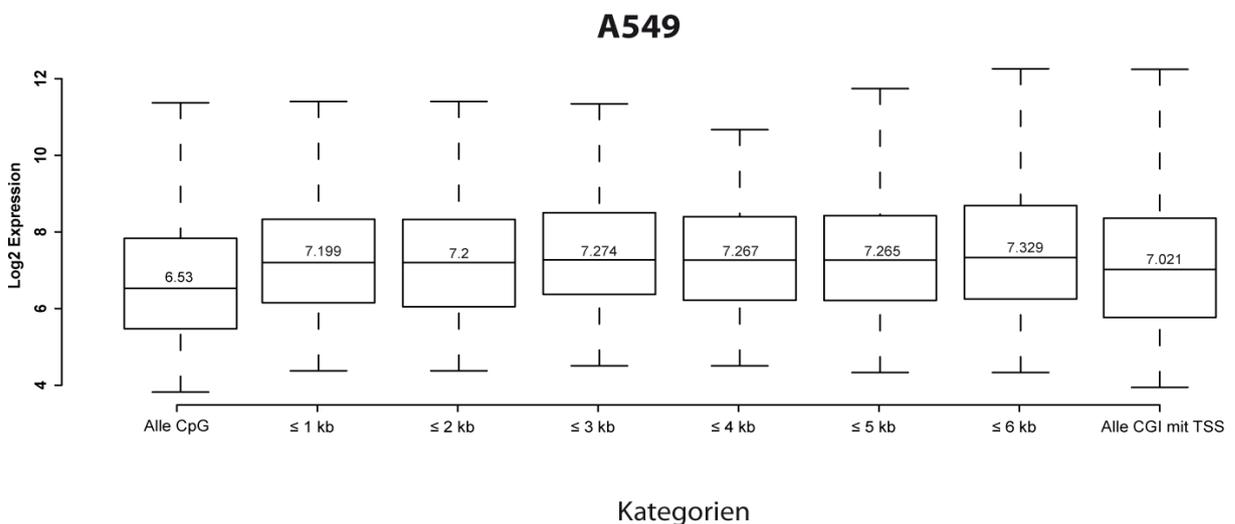


**Abbildung 39: Überexpression verschiedener DNMTs in HCT DKO Zellen.** A, Quantitative Expressionsanalyse von EGFP in den entsprechenden HCT DNMT-Überexpressionszelllinien mittels qPCR. B, Quantitative Expressionsanalyse von DNMT3A in den entsprechenden HCT DKO DNMT-Überexpressionszelllinien mittels qPCR. C, Quantitative Expressionsanalyse von DNMT3B in den entsprechenden HCT DKO DNMT-Überexpressionszelllinien mittels qPCR. Die signifikanten Expressionsunterschiede zwischen DNMT-Überexpressionszelllinien und Kontroll-Zelllinien wurden durch die

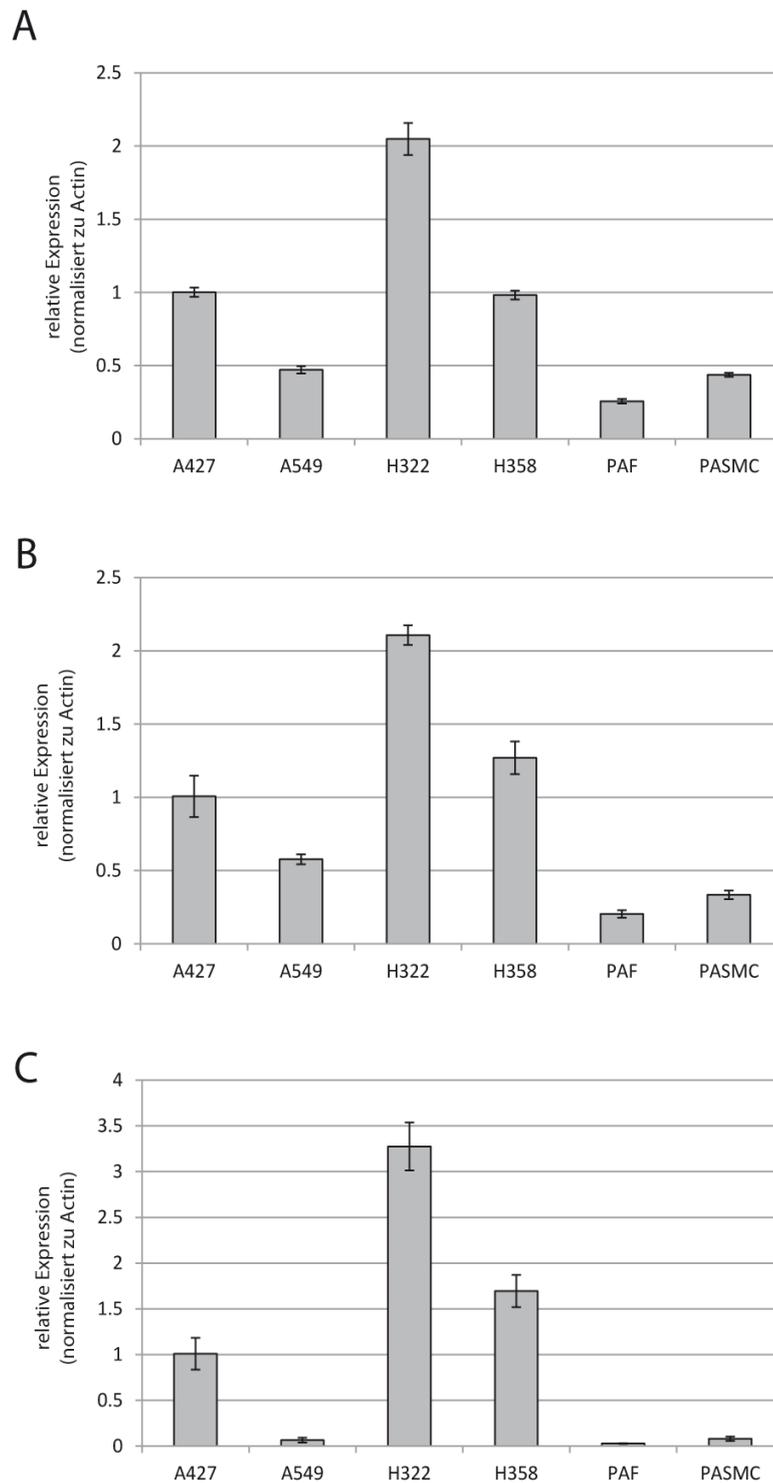
entsprechenden Signifikanzniveaus dargestellt: \* = 0,05; \*\* = 0,01; \*\*\* = 0,001. Die relativen Expressionen der primären Lungengewebe sind normalisiert zur *Actin* Expression dargestellt.



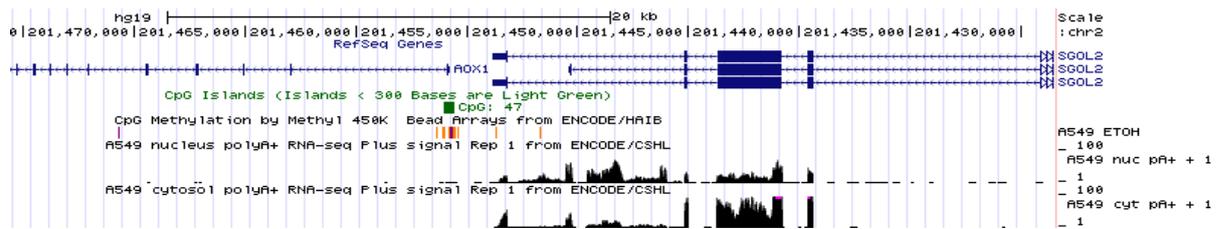
**Abbildung 40: DNA-Methylierungslevel von CpG-Inseln in Abhängigkeit von der Sondenanzahl pro CpG-Inseln in A427-Zellen.** Angegeben sind die DNA-Methylierungslevel von den CpG-Inseln des *Illumina* 450k Arrays in A427-Zellen. Die CpG-Inseln sind nach der Anzahl von Sonden, auf denen ihr gemessenes Methylierungsniveau beruht, geordnet. Pro CpG-Inseln-Kategorie (x-Achse) ist die Anzahl der CpG-Inseln angegeben.



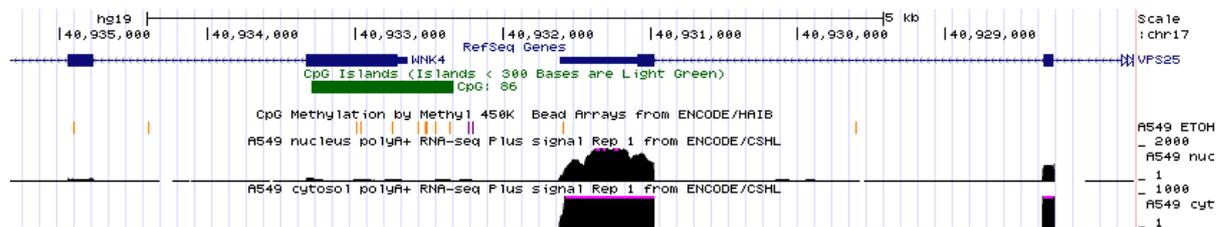
**Abbildung 41: Expressionsanalyse von downstream Genen in TES-TSS Tandemanordnung in A549.** Für A549 Zellen wurden die DNA-Methylierungsdaten mit entsprechenden Expressionsdaten korreliert. Dafür wurden Microarray-Datensätze nach den gleichen Kriterien gefiltert wie für die DNA-Methylierungsplots (vergl. Abbildung 23) und die Expression als log<sub>2</sub>-transformierte Expression dargestellt. Für die Expressionsanalyse beträgt die Anzahl an Kategorie ≤ 1 kb-Genen 257, an Kategorie ≤ 2 kb-Genen 249, an Kategorie ≤ 3 kb-Genen 238, an Kategorie ≤ 4 kb-Genen 230, an Kategorie ≤ 5 kb-Genen 233 und an Kategorie ≤ 6 kb-Genen 251. Die A549 Expressionsdaten stammen aus der NCBI-GEO Datenbank: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE17708>.



**Abbildung 42: Expressionsanalyse von DNMT1, DNMT3A und DNMT3B in verschiedenen Lungenkrebszelllinien und normalen Lungenzelllinien.** Quantitative Expressionsanalyse von *DNMT1* (A), *DNMT3A* (B) und *DNMT3B* (C) in A427-, A549-, H322-, H358-Lungenkrebszelllinien und in normalen Lungenzelllinien (PAF, PASM). Die relativen Expressionen der primären Lungengewebe sind normalisiert zur *Actin* Expression dargestellt.



**Abbildung 43: UCSC-Browser Ausschnitt des *AOX1*-Gens und des upstream davon gelegenen *SGOL2*-Gens.** Im oberen Abschnitt sind die kodierenden Sequenzen des *AOX1*- und des *SGOL2*-Gens dargestellt. Die Promotor CpG-Insel des *AOX1*-Gens ist als grüner Kasten erkennbar. In A549-Zellen liegt die Promotor CpG-Insel methyliert vor. Dies lässt sich durch die orangenen vertikalen Striche erkennen. Am unteren Ende des Ausschnitts befinden sich RNA-Sequenzierungsdaten der nukleären polyA-positiven mRNA-Fraktion und der cytoplasmatischen Fraktion von A549-Zellen.



**Abbildung 44: UCSC-Browser Ausschnitt des *WNK4*-Gens und des upstream davon gelegenen *VPS-25*-Gens.** Im oberen Abschnitt sind die kodierenden Sequenzen des *WNK4*- und des *VPS-25*-Gens dargestellt. Die Promotor CpG-Insel des *WNK4*-Gens ist als grüner Kasten erkennbar. In A549-Zellen liegt die Promotor CpG-Insel methyliert vor. Dies lässt sich durch die orangenen vertikalen Striche erkennen. Am unteren Ende des Ausschnitts befinden sich RNA-Sequenzierungsdaten der nukleären polyA-positiven mRNA-Fraktion und der cytoplasmatischen Fraktion von A549-Zellen.

## **7. Danksagung**

Die Danksagung wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

## 8. Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Referenzen und Hilfsmittel benutzt habe. Alle Ausführungen, die anderen Schriften wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, wurden kenntlich gemacht und die Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Studien- oder Prüfungsleistung gewesen. Bei den von mir durchgeführten und in der Thesis erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung „Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten. Gemäß §25 Abs. 6 der Allgemeinen Bestimmung für modularisierte Studiengänge dulde ich eine Prüfung der Thesis mittels Anti-Plagiatssoftware.

Steffen Kiehl

Name

\_\_\_\_\_

Unterschrift