

INAUGURAL - DISSERTATION

**zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg**

vorgelegt von

Diplom-Biologin Sabine Hagemann

aus Bückeburg

Tag der mündlichen Prüfung:

**Charakterisierung von DNA-Demethylierungs-Mechanismen
zur Optimierung der epigenetischen Therapie**

Gutachter: Prof. Dr. Frank Lyko
Prof. Dr. Peter Angel

ZUSAMMENFASSUNG

Die fehlerhafte Stilllegung von Tumorsuppressorgenen durch Hypermethylierung ihrer Promotorregion ist ein häufig beobachtetes Phänomen in Krebszellen. Die epigenetische Therapie verfolgt das Ziel, die krebsassoziierte Methylierung zu entfernen und auf diese Weise die entarteten Zellen in ihren Normalzustand zurückzusetzen. Die am weitesten entwickelten demethylierenden Wirkstoffe sind die DNA Methyltransferase-Inhibitoren 5-Azacytidin (Azacytidin) und 5-Aza-2'-Deoxycytidin (Decitabin). Beide Wirkstoffe wurden für die Behandlung des Myelodysplastischen Syndroms, einer Vorstufe der Leukämie, zugelassen. In welchem Maße neben epigenetischen Effekten auch nicht-epigenetische zytotoxische Effekte den klinischen Erfolg von Azacytidin und Decitabin beeinflussen, ist nicht eindeutig erforscht. Ein genaues Verständnis der Wirkungsweise von Azanukleosiden bildet jedoch die Voraussetzung für eine Optimierung der epigenetischen Therapie. In der vorliegenden Dissertation wurden die zytotoxischen Effekte beider Wirkstoffe in einer epigenetischen Modellzelllinie analysiert und ihre Auswirkungen auf die Demethylierungseffizienz auf globaler und genspezifischer Ebene charakterisiert. Die Ergebnisse zeigen eine konzentrationsabhängige DNA-Demethylierung für Azacytidin und Decitabin, wobei Decitabin die DNA schneller und effizienter demethylierte als Azacytidin. Beide Wirkstoffe lösten einen G2-Arrest im Zellzyklus sowie die Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen aus. Dabei waren die zytotoxischen Effekte nach Azacytidin-Behandlung stärker als nach Decitabin-Behandlung. Zusätzlich führte die Behandlung mit Azacytidin zu der Einleitung apoptotischer Signalwege. Interessanterweise zeigten die Analysen eine direkte Korrelation zwischen der Stärke der zytotoxischen Nebenwirkungen und der Effizienz der DNA-Demethylierung. Anhand Array-basierter genomweiter Methylierungsanalysen wurde außerdem festgestellt, dass Decitabin etwa 74 % der Gene demethylierte, die auch durch Azacytidin demethyliert wurden. Dabei waren die Wirkstoff-induzierten Demethylierungsmuster reproduzierbar und hochspezifisch. Die präferenzielle Demethylierung von CG-Dinukleotiden außerhalb von CpG-Inseln sowie moderat methylierter CGs, die nicht mit Komponenten des Polycomb-Komplexes PRC2 assoziiert sind, deutet auf eine spezifische und sequenzabhängige DNA-Demethylierung hin. Wirkstoffinduzierte Demethylierungsmuster zeigten außerdem eine große Ähnlichkeit zu Methylierungsmustern in Zellen mit inaktiviertem DNMT1-Enzym. Interessanterweise führte die gleichzeitige Inaktivierung von DNMT1 und DNMT3B zu einem synergistischen Effekt, der eine effektive Demethylierung krebsassoziierter Gene begünstigte. Die Ergebnisse dieser Dissertation bilden eine wichtige Grundlage zum Verständnis Wirkstoff-induzierter DNA-Demethylierung und befürworten die Entwicklung spezifischer Hemmstoffe für DNMT1 und DNMT3B zur Optimierung der epigenetischen Krebstherapie.

SUMMARY

Silencing of tumor suppressor genes by aberrant DNA hypermethylation is a major hallmark of tumor development. Epigenetic therapy aims to reactivate cancer-associated genes by DNA demethylation using DNA methyltransferase inhibitors. The most advanced epigenetic drugs are 5-azacytidine (azacytidine) and 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine). Both compounds have been approved for the treatment of the myelodysplastic syndrome, a pre-leukemic bone marrow disorder. It is still not clear, to which extent non-epigenetic effects might also contribute to the clinical efficacy of azacytidine and decitabine. Correspondingly, a detailed understanding of the mode of action of azanucleosides will be important to advance the optimization of epigenetic therapy. In the present study, we analyzed cytotoxic effects of both compounds using an epigenetic model cell line and characterized their effects on demethylation efficiency on the global and gene specific level. Our results show concentration-dependent DNA demethylation for azacytidine and decitabine, with decitabine demethylating DNA faster and more efficiently than azacytidine. Both drugs induced cell cycle arrest in G2 phase as well as DNA double strand breaks. However, cytotoxic effects were more severe after azacytidine treatment, which additionally induced apoptotic pathways. Interestingly, our analyses revealed a direct correlation between the extent of cytotoxic side effects and DNA demethylation efficiency. Array-based genome-wide methylation analyses showed that decitabine demethylated about 74 % of the genes demethylated by azacytidine. Importantly, drug-induced demethylation patterns were reproducible and highly specific. Moreover, azanucleosides demethylated CGs not located in CpG-islands more efficiently than those within CpG-islands. Finally, demethylation efficiency was reduced for CG dinucleotides associated with components of the polycomb group complex PRC2. These observations suggest a specific and sequence-context-dependent mechanism of demethylation. Interestingly, drug-induced demethylation patterns were most similar to methylation patterns in DNMT1 knockout cells and differed markedly from cells lacking DNMT3B. Significantly, the knockout of both, DNMT1 and DNMT3B enzymes resulted in a synergistic effect, and induced an efficient and preferential demethylation of cancer-associated genes. Our results provide the foundation for understanding drug-induced DNA demethylation and suggest that the development of specific inhibitors for DNMT1 and DNMT3B will improve the efficacy of epigenetic cancer therapy.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Epigenetik	1
1.2	Histonmodifikation.....	2
1.3	DNA-Methylierung.....	5
1.3.1	DNMT1	6
1.3.2	DNMT2.....	7
1.3.3	DNMT3.....	8
1.4	DNA-Demethylierung	9
1.5	Regulierung der DNA-Methylierung	10
1.6	Regulierung der Genexpression durch DNA-Methylierung	11
1.7	Methylierung und Krebs	12
1.8	Epigenetische Therapie	14
1.9	Azacytidin und Decitabin.....	15
1.10	Wirkmechanismen von Azacytidin und Decitabin	16
1.11	Ansätze zur Optimierung der epigenetischen Therapie	19
1.12	Ziel der Dissertation	21
2	ERGEBNISSE.....	22
2.1	Charakterisierung Azanukleosid-induzierter DNA-Demethylierung.....	22
2.1.1	AZA ist zytotoxischer als DAC	22
2.1.2	AZA und DAC beeinflussen den Zellzyklus auf unterschiedliche Weise.....	23
2.1.3	Hohe AZA-Konzentrationen induzieren Apoptose	24
2.1.4	Hohe AZA-Konzentrationen induzieren DNA-Schäden	25
2.1.5	DAC demethyliert DNA effizienter als AZA	26
2.1.6	DAC induziert die Reexpression von APM2 schneller als AZA	28
2.1.7	Array-basierte Charakterisierung Azanukleosid-induzierter Demethylierungsmuster	28
2.2	Identifizierung zellulärer Signalwege, die von AZA moduliert werden.....	49
2.2.1	Identifizierung Zytotoxizitäts-vermittelnder Faktoren durch genomweites RNAi-Screening	49
2.2.2	GADD45A ist für die Azanukleosid-induzierte DNA-Demethylierung nicht erforderlich ...	59
2.2.3	Die Demethylierung von tRNAs spielt eine Rolle in der Azacytidin-vermittelten Zytotoxizität.....	64

3	DISKUSSION	67
3.1	Azacytidin-induzierte Zytotoxizität verhindert eine effiziente DNA-Demethylierung	67
3.2	Wirkstoff-induzierte Demethylierungsmuster unterscheiden sich von Methylierungsmustern in DNMT-Knockout-Zellen	72
3.3	DNA-Sequenzkontext und Chromatinumgebung beeinflussen die Demethylierungseffizienz.....	74
3.4	Identifizierung zellulärer Signalwege, die von Azacytidin moduliert werden	78
3.4.1	Charakterisierung resistenzmodulierender Faktoren für Azanukleoside	78
3.4.2	GADD45A hat keinen Einfluss auf die globale DNA-Methylierung.....	81
3.4.3	Die AZA-induzierte Demethylierung von tRNAs erhöht die Toxizität des Wirkstoffes.....	81
3.5	Array-basierte Analysen befürworten die Entwicklung spezifischer DNMT-Inhibitoren zur Optimierung der epigenetischen Krebstherapie	83
4	MATERIAL UND METHODEN	85
4.1	Material	85
4.1.1	Inhibitoren	85
4.1.2	Expressions-Klone	85
4.1.3	siRNAs	86
4.1.4	Chemikalien	87
4.1.5	Antikörper.....	88
4.1.6	Geräte	89
4.1.7	Verbrauchsmaterialien	90
4.1.8	Zellkulturmaterialien.....	91
4.1.9	Enzyme und molekularbiologische Materialien.....	91
4.1.10	Lösungen	93
4.1.11	Primer.....	95
4.2	Methoden	97
4.2.1	Allgemeine Labortechniken.....	97
4.2.2	Techniken für Methylierungsuntersuchungen.....	102
4.2.3	Zellkulturtechniken	106
5	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	112
6	REFERENZEN	114
7	ANHANG	I

DANKSAGUNG

1 EINLEITUNG

1.1 Epigenetik

Die Sequenzierung einer Vielzahl eukaryotischer Genome hat gezeigt, dass das menschliche Genom, obwohl es in der Regel viel größer ist als das Genom weniger komplexer Organismen, keine proportional höhere Anzahl proteincodierender Gene aufweist. Das lässt darauf schließen, dass die biologische Komplexität weniger von der Anzahl der Gene im Genom abhängt, als von der Art, wie diese Gene genutzt werden. Diese Unterschiede in der Komplexität von Genomen sind zu einem großen Teil auf epigenetische Mechanismen zurückzuführen.

Der Begriff "Epigenetik" wurde erstmals von Conrad Waddington im Jahr 1942 vorgeschlagen und beschrieb damals den Prozess, durch den die genetische Information eines Organismus, der Genotyp, mit der Umwelt interagiert, um den Phänotyp zu bilden [1]. Heute existiert in der Molekularbiologie eine weiterentwickelte Definition des Begriffes: das Forschungsgebiet der Epigenetik untersucht die vererbare Veränderung in der Genfunktion, die keine Veränderung der zugrundeliegenden DNA Sequenz erfordert [2]. Dieses Gebiet schließt die Erforschung von Genexpressionsmustern sowie deren Vererbbarkeit auf nachfolgende Zellgenerationen, die Veränderung der Expression bestimmter Gene während der zellulären Differenzierung und die Auswirkung äußerer Einflüsse auf die Genexpression ein.

Die Expression von Genen wird durch das Chromatin epigenetisch reguliert. Dies ist ein kompakt gefalteter Komplex aus genomischer DNA, Histonen und weiteren Proteinen, der die DNA im Nukleus eukaryotischer Zellen verpackt. Das Chromatin kann durch Enzyme in offene und geschlossene Zustände umgewandelt werden, die eine Transkription der gebundenen DNA entweder erleichtern oder verhindern. Dieser epigenetische Mechanismus erhöht den Informationsgehalt des genetischen Codes. Ein einziges Genom kann im Entwicklungsprozess von einer Stammzelle zu verschiedenen differenzierten Zelltypen viele unterschiedliche „Epigenome“ bilden. Diese zeichnen sich durch jeweils spezifische Chromatinstrukturen aus, die während der Zellteilung erhalten bleiben [3, 4]. Das Genom und das Epigenom bilden zusammen den zellulären Phänotyp und legen die Funktion und Charakteristik einer Zelle während der Entwicklung und Differenzierung fest.

Die funktionelle Bedeutung des Epigenoms liegt in der Erinnerung bzw. dem Imprinting von aktueller oder bereits vergangener Genexpression. Es vermittelt z.B. die X-chromosomale Inaktivierung [5] und die genomische Prägung [6, 7]. Außerdem spielen epigenetische Mechanismen eine wichtige Rolle in vielen weiteren zellulären Prozessen, wie z.B. Differenzierung und Entwicklung [8, 9], Kontrolle der Genexpression [10], und Aufrechterhaltung der genomischen Integrität durch die Stilllegung repetitiver Sequenzen und die Stabilisierung centromerischer Regionen [11]. Sogar die Modulation von Gehirnfunktionen [12, 13] und die Entwicklung des Immunsystems [14, 15] wurde mit epigenetischen Mechanismen in Verbindung gebracht. Interessanterweise kann eine Veränderung des Phänotyps, die durch eine Änderung des epigenetischen Codes ausgelöst wurde, auch eine Rolle in kurzzeitigen Anpassungen spielen. Auf diese Weise können Organismen durch die Ein- oder Ausschaltung von Genen mit epigenetischen Mechanismen auf interne oder äußere Reize reagieren und diese nicht-genetischen Veränderungen sogar über Generationen hinweg vererben [16].

Das Epigenom kann auf verschiedenen Ebenen moduliert werden. Zu den wichtigsten epigenetischen Mechanismen, die die Expression von Genen in Säugetierzellen regulieren, gehören die DNA-Methylierung [17] und die Modifikation von Histonen [18]. Diese Mechanismen werden im Folgenden näher erläutert.

1.2 Histonmodifikation

Die Histonmodifikation ist ein epigenetischer Mechanismus, der durch die Veränderung der Chromatinstruktur die Regulation der Genexpression beeinflussen kann. Die kleinste sich wiederholende Einheit des eukaryotischen Chromatins ist ein Komplex aus DNA und Histon-Proteinen, das Nukleosom [19]. Ein Nukleosom setzt sich aus einem Oktamer mit vier basischen Kern-Histonen (H2A, H2B, H3 und H4 in jeweils in zwei Kopien) zusammen, die untereinander und mit der negativ geladenen DNA in Wechselwirkung treten [20]. Dabei umwindet die DNA in einer Sequenzlänge von ca. 146 Basenpaaren das Nukleosom 1,65-Mal. Die Kern-Histone bilden eine globuläre Struktur, ihre N-terminalen Enden sind jedoch flexibel und ragen aus dem Komplex heraus. Eine besondere Eigenschaft dieser Enden ist die große Anzahl modifizierbarer Aminosäuren; bislang wurden acht verschiedene Arten der Histonmodifikation beschrieben: Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Ubiquitylierung, Sumoylierung, ADP-Ribosylierung, Deiminierung und Prolin Isomerisierung [20].

Am besten untersucht sind die kovalenten Modifikationen durch Acetylierung und Methylierung, die durch Acetyltransferasen oder Methyltransferasen vermittelt bzw. durch Deacetylasen bzw. Demethylasen wieder entfernt werden können [21]. Diese Modifikationen verändern entweder die chemischen Bindungen im Chromatin oder führen zu einer Bindung von nicht-Histon-Proteinen an das Chromatin. Ihre Anwesenheit kann die Verpackungsweise der DNA zusätzlich ändern und außerdem weitere Chromatin- oder DNA-modulierende Enzymkomplexe heranziehen. Im Genom kann das Chromatin in zwei Hauptzuständen vorliegen: als stark kondensiertes und inaktives Heterochromatin oder als dekondensiertes Euchromatin. Diese Zustände zeichnen sich durch eine unterschiedliche Kombination an Histon- und DNA-Modifikationen aus (Abbildung 1).

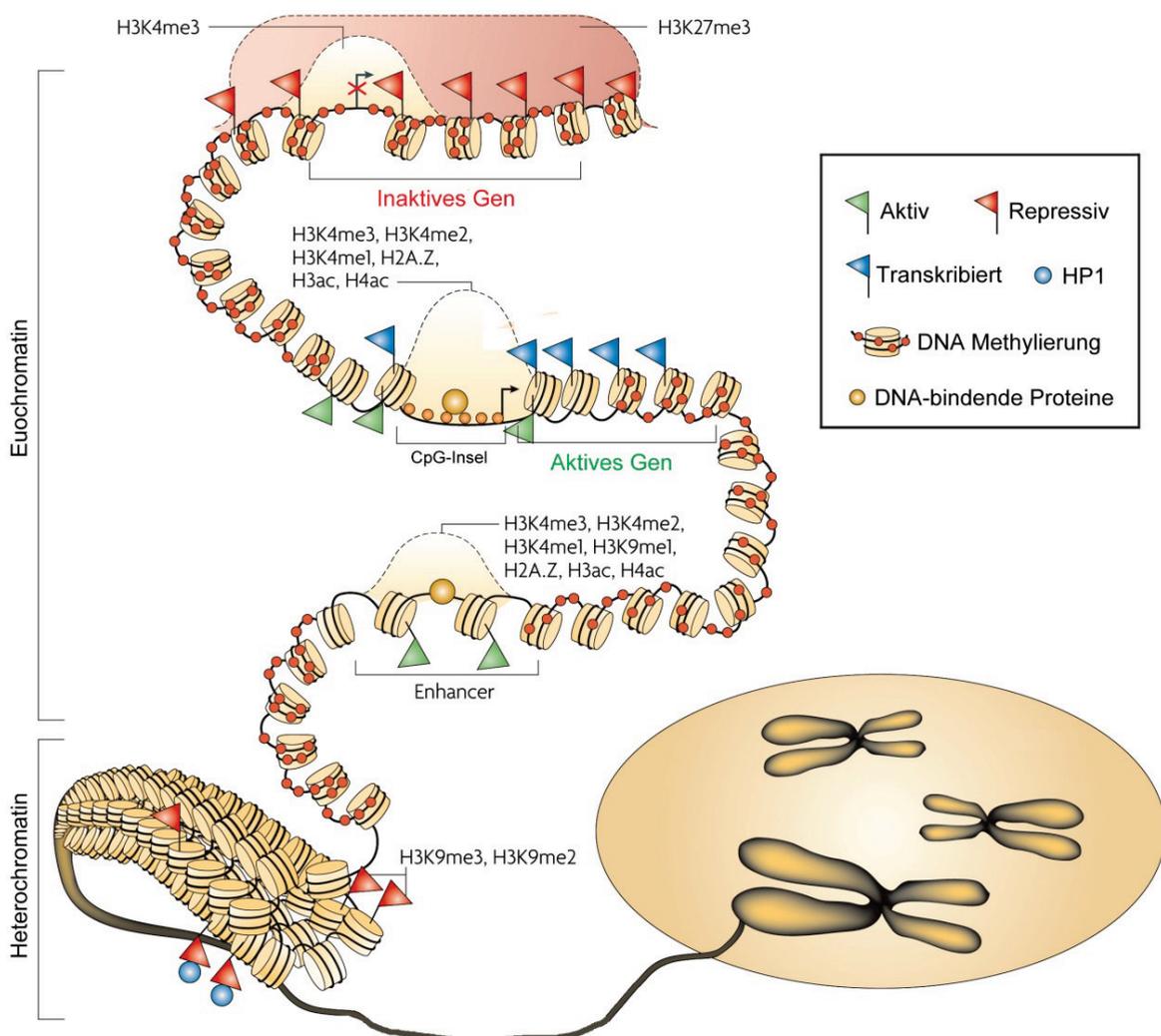


Abbildung 1 Das Epigenom. Die Interaktion zwischen DNA-Methylierung und Histonmodifikationen gestaltet das Epigenom, das die Genexpression reguliert und über Zellgenerationen hinweg vererbt wird. Verändert nach Schones et al. (2008) [22].

Das Heterochromatin dient nicht nur der engen Verpackung der DNA im Nukleus, sondern schützt zusätzlich die Enden der Chromosomen und unterstützt deren Teilung während der Mitose [20]. Der heterochromatische Zustand ist bei Säugetieren mit einer geringen Acetylierung von Lysin-Resten und einer starken Methylierung bestimmter Lysin- oder Arginin-Reste der Histone H3 und H4 (H3K9, H3K27, und H4K20) verbunden. Diese Modifikationen ziehen weitere Chromatin- bzw. DNA-modulierende Proteine heran, wie zum Beispiel Komponenten des Polycomb Protein Komplexes (PcG) oder das Heterochromatin Protein 1 (HP1), die den heterochromatischen Zustand stabilisieren und während der Mitose aufrecht erhalten [20].

Der euchromatische Zustand ermöglicht weitere biologische Funktionen der DNA: Gene können an- oder ausgeschaltet werden und die DNA kann für Reparaturzwecke oder zur Replikation entwunden werden. Das Modifikationsmuster der Histon-Enden repräsentiert dabei den jeweiligen Zustand: ist das assoziierte Gen stillgelegt, enthalten die Enden der Histone nur eine geringe Anzahl an Modifikationen durch Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung. Aktiv transkribiertes Euchromatin weist hingegen in der Regel einen hohen Grad an Acetylierung auf und ist an den Positionen H3K4 dreifach methyliert [20, 22]. Diese Konformation ermöglicht eine Bindung von Transkriptionsfaktoren an die Promotorregionen der DNA und bildet die Grundlage für eine Transkription der assoziierten Gene. Weiterhin wurden bivalente Domänen charakterisiert, die sowohl aktivierende und repressive Modifikationen enthielten [23]. Die bivalente Anreicherung von Modifikationen korreliert mit einer Repression von entwicklungspezifischen Transkriptionsfaktoren in embryonalen Stammzellen und hält diese wichtigen Gene vermutlich in einem „Bereitschaftszustand“.

Die hohe Dichte unterschiedlicher Modifikationen an den N-terminalen Histon-Enden kann einen synergistischen oder antagonistischen Effekt auf die Bindung Chromatin-assoziiierter Proteine haben [21, 24]. Dabei ist die Zusammensetzung der Modifikationen für den Wechsel zwischen transkribiertem und stillgelegtem Zustand des Chromatins von entscheidender Bedeutung [21]. Dieses epigenetische System bildet einen wichtigen Regulationsmechanismus, der das Informationspotenzial des genetischen Codes in großem Maße erhöht und viele essenzielle biologische Prozesse beeinflusst.

1.3 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist die wahrscheinlich am besten untersuchte chemische Modifikation des Chromatins. In allen eukaryotischen Organismen, von Pflanzen bis hin zum Menschen, wurde eine Bindung von Methylgruppen ausschließlich an Cytosin-Basen nachgewiesen (Abbildung 2).

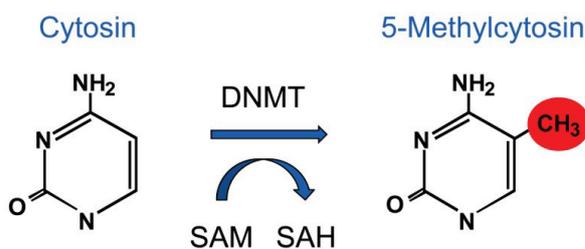


Abbildung 2 Methylierungsreaktion. Die Methylierung der C5-Position des Cytosin-Ringes wird durch Methyltransferasen (DNMTs) vermittelt. Dabei dient das Molekül SAM als Methyl donor. SAM, S-Adenosyl-L-Methionin; SAH, S-Adenosyl-Homocystein.

Bei Metazoen stellt die DNA-Methylierung die einzig bekannte kovalente Modifikation der DNA dar [11]. Während in Invertebraten häufig eine mosaikartige Verteilung von methylierten Cytosinen zu beobachten ist, in der methylierte und unmethylierte Domänen nebeneinander existieren, sind die Genome von Säugern und aller bis jetzt untersuchten Vertebraten global methyliert. Dabei werden hauptsächlich nicht-codierende DNA-Regionen wie repetitive Elemente, Sequenzen viralen Ursprungs und transponierender Sequenzelemente methyliert [25, 26]. Die Methylierung tritt meist im Kontext von CG-Dinukleotiden symmetrisch auf beiden DNA-Strängen auf [4] und gewährleistet durch eine Verhinderung der Transkription die chromosomale Integrität [27, 28]. In menschlichen somatischen Zellen konnte die Modifikation von Cytosin zu Methylcytosin je nach Gewebe bei etwa 3-4 % der gesamtgenomischen Basen festgestellt werden und ist somit ein Bestandteil von 70-80 % aller CG-Dinukleotide im Genom [25, 29].

Eine interessante Eigenschaft der Methylierungsmuster in Vertebraten ist das Auftreten von CpG-Inseln [30]. Als CpG-Inseln werden Cytosin- und Guaninreiche Regionen von etwa 0,5-4 kb Länge bezeichnet, die eine hohe Dichte an CG-Dinukleotiden aufweisen und an den 5'-Enden vieler humaner Gene lokalisiert sind [31]. In der menschlichen Genomsequenz existieren nach Computerberechnungen etwa 29000 CpG-Inseln [32-34]. Während sich die Mehrheit der CpG-Inseln in einem unmethylierten Zustand befindet, der mit einer Expression des assoziierten Gens korreliert, wird eine kleine Anzahl der CpG-Inseln während der Entwicklung methyliert [32, 35]. Dieser Vorgang geht mit einer stabilen Stilllegung des assoziierten Gens einher [32, 36]. Trotz der Anreicherung von CGs in

CpG-Inseln ist das Gesamtvorkommen von CG-Dinukleotiden im Genom sehr gering. Dieser Zustand kann auf die erhöhte Mutationsrate von methylierten Cytosinen zurückgeführt werden [11].

In Säugetieren wurden vier verschiedene DNA-Methyltransferasen identifiziert (DNMT1, DNMT2, DNMT3A und DNMT3B), die die Methylierung von Cytosinen vermitteln. Als Methylgruppendonor wird während der Methylierungsreaktion das Molekül S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) herangezogen, das nach Übertragung der Methylgruppe an das entsprechende Cytosin als S-Adenosyl-Homocystein (SAH) vorliegt [11] (Abbildung 2).

Alle DNA Methyltransferasen weisen konservierte katalytische und regulatorische Domänen auf, die die Methylierungsreaktion ermöglichen (Abbildung 3). Die Funktion der einzelnen Methyltransferasen wird im Folgenden näher erläutert.

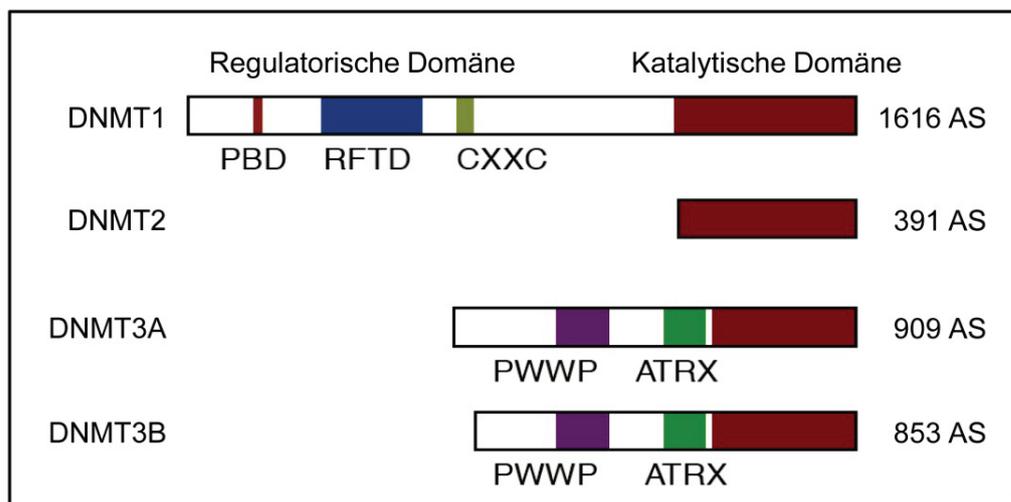


Abbildung 3 Funktionell wichtige Domänen humaner Methyltransferasen. Während die C-terminale katalytische Domäne in allen Methyltransferasen hochkonserviert ist, unterscheiden sich die N-terminalen regulatorischen Domänen teilweise erheblich. PBD, PCNA Bindedomäne; RFTD, Replikations-Ursprung-bindende Domäne; CXXC, DNA-bindende Domäne; PWWP, Protein-bindende Domäne; ATRX, Interaktion mit DNA und Proteinen. Verändert nach Brückner und Lyko 2004 [37].

1.3.1 DNMT1

Das DNMT1-Enzym besitzt eine große N-Terminale Domäne mit regulatorischer Funktion und eine kleinere C-terminale Domäne zur Katalyse der Methylierungsreaktion. Die regulatorische Domäne besteht aus verschiedenen Motiven, die die intrazelluläre Lokalisation regulieren, aber auch die Interaktion mit der DNA und verschiedenen Proteinen erlauben. Dazu gehören sowohl Regulatoren des Zellzyklus und der Replikation, Transkriptions-Repressoren und Chromatin-assoziierte Proteine [38-41]. Die

Interaktion mit Histon-modifizierenden Enzymen wie Histon-Methyltransferasen [42], Histon Deacetylasen [38, 40] sowie Methyl-CpG-bindenden Enzymen [43, 44] und dem Heterochromatin-bindenden Enzym HP1 [42] unterstützt die Stilllegung von Genen und stabilisiert den inaktiven Chromatinzustand. Interessanterweise wurde auch eine direkte Interaktion zwischen DNMT1 und den de novo-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B beschrieben [45]. Die N-terminale Domäne des DNMT1-Enzyms vermittelt somit wichtige epigenetische und nicht-epigenetische Eigenschaften.

Die C-terminale Domäne beinhaltet das aktive Zentrum des DNMT1-Enzyms und weitere charakteristische konservierte Motive, die für die DNA-Methylierung notwendig sind. DNMT1 zeigt eine etwa 15-40-fach höhere Aktivität für hemimethylierte DNA im Vergleich zu unmethylierter DNA [46-49]. Diese Beobachtung, sowie die durch die Bindung von PCNA ermöglichte Assoziation mit der Replikationsgabel während der S-Phase [39, 50] und die erhöhte Expression von DNMT1 in proliferierenden Zellen [51] deuten darauf hin, dass DNMT1 eine wichtige Rolle in der Erhaltungsmethylierung spielt. Die Kopie der Methylierungsmuster des replizierenden parentalen DNA-Stranges auf den Tochter-DNA-Strang gewährleistet die Vererbung der epigenetischen Information auf die nächste Zellgeneration [32, 36]. Die wichtige physiologische Funktion von DNMT1 wird in Knockout-Mäusen mit inaktiviertem DNMT1-Enzym deutlich, die bereits während der Embryonalentwicklung mit signifikant reduzierter DNA-Methylierung sterben [52]. Das vollständige Fehlen von DNMT1 führte auch in Zellkulturversuchen aufgrund einer starken Störung der Zellteilung zum Tod der Zellen [53].

1.3.2 DNMT2

Das DNMT2-Gen ist innerhalb der Eukaryoten hochkonserviert und zwar sowohl in Organismen mit nachgewiesener DNA-Methylierung als auch in Organismen, die keine DNA-Methylierung aufweisen [54, 55]. Ähnlich wie bakterielle Methyltransferasen besitzt DNMT2 keine N-terminale regulatorische Domäne, die katalytischen Motive weisen jedoch große Ähnlichkeiten mit der C-terminalen katalytischen Domäne anderer Methyltransferasen auf. Obwohl in biochemischen Assays eine geringe DNA Methyltransferase-Aktivität für DNMT2 beobachtet werden konnte [56] konnten *in vivo* keine Methylierungsänderungen nach dem Knockout des Enzyms festgestellt werden [57]. Nach neueren Studien stellte sich heraus, dass DNMT2 mit hoher Aktivität Cytosine in tRNAs methylieren kann [58-60]. In tRNAs kann die Methylierung eine Rolle in der Regulation von Faltungen und in der Erhaltung der RNA-Stabilität spielen [61], was die Proteinsynthese stören kann. Diese Beobachtungen sowie die Phänotypen verschiedener Organismen mit inaktiviertem DNMT2 deuten darauf hin, dass DNMT2 weniger eine DNA-

methylierende Funktion besitzt, als vielmehr metabolische Signalwege über die Methylierung von RNAs reguliert [54].

1.3.3 DNMT3

DNMT3A und DNMT3B sind zwei eng verwandte, aber durch unterschiedliche Gene codierte Enzyme, die dem DNMT1-Protein in Ihrer katalytischen C-terminalen Domäne sehr ähnlich sind. Die N-terminalen Domänen der DNMT3-Enzyme beinhalten eine ATRX-Domäne und eine PWWP-Domäne. Die ATRX-Domäne wird mit der Repression eukaryotischer Transkription in Verbindung gebracht und kann sowohl mit der DNA als auch mit weiteren Proteinen interagieren [62]; auch die PWWP-Domäne weist DNA-bindende Eigenschaften auf [63, 64].

DNMT3A- und DNMT3B-Proteine besitzen *in vitro* keine Präferenz für hemimethylierte DNA [57], sondern methylieren unmethylierte wie hemimethylierte DNA mit gleicher Aktivität. Aufgrund dieser Beobachtung sowie der hohen Expression von DNMT3A und DNMT3B in embryonalen Stammzellen, die mit der Zeitspanne der Etablierung der zellulären Methylierungsmuster zusammenfällt, wurden diese DNMTs als *de novo*-Methyltransferasen charakterisiert [57, 58, 65, 66]. Neben DNMT3A und DNMT3B existiert ein weiteres DNMT3-homologes Protein mit der Bezeichnung DNMT3L (DNMT3-like) [67]. Dieses Enzym enthält zwar keine funktionellen katalytischen Domänen, kann aber mit DNMT3A und DNMT3B interagieren [68]. Diese Interaktion kann die Aktivität der *de novo*-Methyltransferasen erhöhen [69], außerdem wird vermutet, dass DNMT3L die Etablierung genomischer Prägungsmuster reguliert [68, 70].

DNMT3A und DNMT3B spielen eine essenzielle Rolle in der Entwicklung von Säugern, wie durch die Inaktivierung von DNMT3A und DNMT3B in Mäusen gezeigt wurde [71]: während DNMT3A Knockout-Mäuse im Alter von etwa vier Wochen starben, starben Mäuse mit unterbundener DNMT3B-Expression bereits vor der Geburt mit starken Entwicklungsstörungen. Dabei zeigte der Doppelknockout beider Enzyme einen stärkeren Effekt als der jeweilige Einzelknockout, was darauf hindeutet, dass DNMT3A und DNMT3B sich gegenseitig ergänzen. Trotzdem scheinen beide Enzyme für die Methylierung spezifischer Regionen im Genom zuständig zu sein [72]. So zeichnen sich z.B. Patienten mit dem ICF (Immundefekt, Centromer-Instabilität und faziale Dysmorphien)-Syndrom, das durch mutationsbedingte DNMT3B-Inaktivierung verursacht wird [71, 73, 74], durch eine Hypomethylierung der perizentromerischen repetitiven DNA-Sequenzen und des inaktiven X-Chromosoms aus. Interessanterweise kann der Phänotyp nicht durch DNMT3A-Aktivität verhindert werden. Dies könnte in der unterschiedlichen

Methylierungsaktivität beider Enzyme begründet sein: während für DNMT3A eine distributive Aktivität beschrieben wurde, arbeitet DNMT3B prozessiv [75]. Es wird vermutet, dass die prozessive Methylierungsaktivität von DNMT3B die Methylierung der perizentrischen repetitiven Elemente mit hohem CG-Gehalt erleichtern könnte, während DNMT3A andersartige repetitive Elemente und einzelne Gene zu methylieren scheint [68, 72]. Weiterhin gibt es Hinweise darauf, dass DNMT3A und DNMT3B auch eine Rolle in der Erhaltungsmethylierung spielen und eine verringerte Aktivität von DNMT1 teilweise kompensieren können [76, 77]. Zusätzlich zu der Methylierungsaktivität für CG-Dinukleotide wurde für beide Enzyme eine methylierende Aktivität für nicht-CG-Dinukleotide beschrieben [65, 78, 79]. Diese wurde insbesondere in embryonalen Stammzellen beobachtet, in denen eine hohe Expression der de novo-Methyltransferasen mit einer erhöhten nicht-CG-Methylierung korreliert [78]. Die Methylierung von Cytosinen, die sich nicht im CG-Kontext befinden, wird allerdings wegen der hohen Substratspezifität von DNMT1 nicht kopiert [78].

1.4 DNA-Demethylierung

Die DNA-Demethylierung spielt eine wichtige Rolle während der Gametogenese sowie in der frühen Embryonalentwicklung [80, 81]. Dabei ermöglicht eine genomweite DNA-Demethylierung die Etablierung neuer somatischer Methylierungsmuster. Neben einer passiven, durch Replikation in der Abwesenheit von Methyltransferasen ausgelösten DNA-Demethylierung, wird auch die Existenz aktiver Demethylierungsmechanismen bei Säugern vermutet, die eine replikationsunabhängige DNA-Demethylierung vermitteln [11]. Die aktive DNA-Demethylierung ist besonders in Pflanzen gut erforscht. Dort wird sie durch die Glycosylasen DEMETER (DME), DEMETER-LIKE 2 und 3 (DML2 und DML3) sowie REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1) eingeleitet, die durch Zerschneiden von glycosidischen Bindungen eine Entfernung von Methylcytosinen aus der DNA-Sequenz initiieren [82]. Durch anschließende Trennung der Phosphodiesterbindung durch AP-Endonukleasen wird in der anschließenden Exzisionsreparatur das Methylcytosin durch ein unmethyliertes Cytosin ersetzt. Der Mechanismus der aktiven Demethylierung in Säugetieren ist hingegen bis heute nicht eindeutig aufgeklärt. Studien von Kangaspeska et al. (2008) und Métivier et al. (2008), die die zyklische Methylierung an der Promotorregion transkribierter Gene untersuchten, deuten darauf hin, dass die de novo-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B in Abwesenheit des Methyl donors SAM eine aktive Demethylierung initiieren können [83, 84]. Die in diesem Fall möglicherweise stattfindende oxidative Deaminierung des Methylcytosins zu Thymin könnte zu einer

Basenfehlpaarung führen, die wiederum durch Basenexzisionsreparatur repariert werden könnte. Bei diesem Vorgang würde die G-T-Fehlpaarung durch die Thymin-DNA-Glycosylase (TDG) und das methylbindende Protein MBD4 erkannt, entfernt, und durch ein unmethyliertes Cytosin ersetzt. Ähnliche Beobachtungen im Zebrafisch-Modell bestätigten eine aktive Form der DNA-Demethylierung, die ebenfalls durch eine 5-Methylcytosin-Deaminase (AID) im Zusammenspiel mit einer Thymin-Glycosylase und GADD45A (Growth Arrest and DNA Damage Inducible Protein A) vermittelt wurde [85]. Diesem Protein wurde bereits von Barreto et al. (2007) eine Funktion in der aktiven DNA-Demethylierung zugeschrieben: nach Überexpression von GADD45A wurde eine globale DNA-Demethylierung beobachtet, die bei gemeinsamer Überexpression von GADD45A und dem in die Nukleotidexzisionsreparatur involvierten XPG-Protein zunahm [86]. Wie bei einigen anderen in der Vergangenheit postulierten Kandidaten konnte die demethylierende Aktivität von GADD45A jedoch bis heute nicht eindeutig bestätigt werden [87, 88].

1.5 Regulierung der DNA-Methylierung

Die Beobachtung, dass die unterschiedlichen Methyltransferasen nicht alle Regionen im Genom in gleichem Maße methylieren, deutet darauf hin, dass eine gewisse Substratpräferenz für spezifische Methyltransferasen vorliegt. Eine Regulierung der globalen DNA-Methylierung kann somit durch Veränderung der Aktivität spezifischer Methyltransferasen in den unterschiedlichen Zelltypen bzw. Entwicklungsstadien stattfinden. Diese kann durch unterschiedliche Expression in verschiedenen Gewebetypen erreicht werden: Während de novo-Methyltransferasen z.B. in der frühen Embryonalentwicklung stark exprimiert werden, ist ihre Expression in ausdifferenzierten Geweben nur gering [11]. Weiterhin kann die Expression bestimmter DNMT-Isoformen Auswirkungen auf DNA-Bindungseigenschaften, zelluläre Lokalisation oder die Aktivität der Enzyme haben und auf diese Weise zu einer Modulation von DNA-Methylierungsmustern führen [72, 89, 90]. Neben den eben beschriebenen Mechanismen zur Regulation globaler DNA-Methylierung gibt es auch Hinweise auf eine spezifische Methylierung bestimmter Regionen im Genom. So wurde zum Beispiel beschrieben, dass Repressorkomplexe aus der Polycomb-Gruppe de novo-Methyltransferasen direkt zu bestimmten Zielsequenzen leiten und dort deren Methylierung induzieren können [91].

Die große Anzahl an unmethylierten CpG-Inseln (CGIs) im Genom von Säugern wirft die Frage auf, wie der unmethylierte Zustand in diesen Regionen trotz permanenter de novo-Methylierungsaktivität aufrecht gehalten werden kann. Eine mögliche Erklärung wäre,

dass die Bindung von Proteinen an unmethylierte CGIs die Methylierung dieser CGs verhindert. Hinweise darauf liefern neueste Studien von Thomson et al. (2010), die die Bindung des Proteins Cfp1 an unmethylierte CGIs *in vitro* und *in vivo* beobachteten [92]. Es wird vermutet, dass Cfp1 einen H3K4 Methyltransferase-Komplex an die unmethylierten CGIs heranzieht, der durch die dreifache Methylierung der H3K4-Position eine offene Chromatinstruktur erzeugt und somit die Transkription des assoziierten Gens erlaubt. Als weiteres Protein, das an unmethylierte CGs binden kann, wurde KDM2A identifiziert [93]. Dieses Enzym fungiert als H3K36 Demethylase und generiert ebenfalls eine offene Chromatinstruktur an CGIs. Auf welche Weise allerdings durch diese Proteine eine Methylierung der CGs verhindert wird, ist unklar. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass bestimmte Chromatinmodifikationen, wie z.B. die H3K4me3 eine *de novo*-Methylierung durch DNMT3 verhindern können [94]. Andererseits kann auch eine permanente Transkription der Gene eine Aufrechterhaltung des unmethylierten Zustandes bewirken [95, 96].

1.6 Regulierung der Genexpression durch DNA-Methylierung

Die Transkription vieler Gene in aktiver Chromatinumgebung kann durch den Methylierungszustand genassoziierter CpG-Inseln (CGIs) reguliert werden: während unmethylierte CGIs eine Transkription der assoziierten Gene erlauben, korreliert eine starke Methylierung (Hypermethylierung) dieser CGIs in der Regel mit einer Stilllegung des Gens [58]. Eckhardt et al. (2006) bestätigten anhand einer genauen Charakterisierung des Methylierungsprofils der Chromosomen 6, 20 und 22 in verschiedenen Gewebetypen, dass eine inverse Korrelation zwischen Methylierung und Transkription auch für Promotorregionen mit geringerem CG-Gehalt besteht [26].

Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass die Methylierung von CGs außerhalb von Promotorregionen ebenfalls einen Einfluss auf die Transkription von Genen haben kann. So wurde z.B. beobachtet, dass die Methylierung Promotor-angrenzender Regionen die Transkription von bestimmten Genen mit unmethyliertem Promotor verhindern kann [97]. Andere Studien fanden heraus, dass sich die Methylierung der Gensequenz ebenfalls auf die Transkription dieser Gene auszuwirken scheint: zum Beispiel wurde in verschiedenen Organismengruppen eine Anreicherung von Methylcytosinen in exonischen Sequenzen proteinkodierender Gene beobachtet, die mit der Stärke der Transkription dieser Gene korrelierte [98-101].

Die Regulierung der Genexpression kann über verschiedene Mechanismen erfolgen: zum einen kann die Cytosin-Methylierung die direkte Bindung von Transkriptionsfaktoren an die DNA sterisch verhindern und auf diese Weise zu einer Stilllegung des benachbarten Gens führen [102, 103]. Andererseits kann auch die Anreicherung von Methylcytosin-bindenden Proteinen die Herausbildung eines heterochromatischen Zustands herbeiführen, der zu einer Inaktivierung des Chromatins führt [104, 105]. Die Funktion der Methylierung exonischer Sequenzen ist bislang nicht eindeutig aufgeklärt worden. Es wird jedoch vermutet, dass sie entweder zur Feinregulierung der Transkription dient oder aber einen Einfluss kryptischer Promotoren auf die Genexpression verhindert [106, 107].

Es gibt außerdem Anhaltspunkte dafür, dass die DNA-Methylierung nicht nur die Stilllegung eines Gens herbeiführen, sondern auch einen bereits inaktiven Genzustand stabilisieren kann. Diese Hypothese wird durch verschiedene Beobachtungen gestützt, in denen eine Reduktion der Genexpression zeitlich mit der Etablierung inaktivierender Histonmodifikationen korrelierte und eine Zunahme der Promotormethylierung erst sekundär festgestellt werden konnte [108, 109].

1.7 Methylierung und Krebs

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die Veränderung des Epigenoms einen großen Einfluss auf die Genexpression und somit auf wichtige physiologische Prozesse, wie etwa die Kondensierung und Stabilität von Chromosomen, die Zellteilungsrate oder Apoptose haben kann. Die Störung dieser Mechanismen ist auch bei vielen Krebsarten für ein unkontrolliertes Zellwachstum verantwortlich. Dementsprechend gibt es verschiedene Anhaltspunkte dafür, dass der vielschichtige Prozess der Tumorgenese nicht nur auf der Anhäufung von genetischen Mutationen beruht, sondern auch epigenetische Mutationen eine wichtige Rolle spielen [31, 110, 111]. Die Missregulierung epigenetischer Signalwege oder Komponenten kann entweder allein oder im Zusammenspiel mit genetischen Mutationen zu einer Manifestierung oder einem Fortschreiten neoplastischer Erkrankungen beitragen. Durch die mitotische Stabilität epigenetischer Modifikationen kann es bei epigenetischen Mutationen ebenso wie bei genetischen Mutationen zu einem Selektionsprozess kommen, in dem sich Mutationen, die zu einem Wachstumsvorteil führen, anreichern und das unkontrollierte Wachstum von Tumoren fördern [112]. Dabei können in einem einzigen Tumor hunderte Gene durch eine fehlerhafte Hypermethylierung ihrer Promotoreregionen stillgelegt sein [112, 113]. Bei diesen Genen handelt es sich häufig um Tumorsuppressorgene, durch deren Expression wichtige zelluläre Mechanismen kontrolliert werden, wie etwa die Regulation des Zellzyklus, DNA-

Reparatur, Differenzierung und Apoptose. Im Unterschied zu genetischen Mutationen kann die epigenetische Stilllegung bestimmter Gene sogar die Inaktivierung weiterer Gene auslösen und so zu einer Weiterentwicklung des Tumors beitragen [112].

Neben der Hypermethylierung genassoziierter Promotorregionen wurde in Krebszellen auch eine genomweite Abnahme der Gesamtmethylierung beobachtet [29, 114, 115]. Diese entsteht durch die Verringerung der Methylierung in nichtkodierenden und repetitiven Sequenzelementen, wie z.B. dem perizentrischen Heterochromatin [116]. Die dadurch verursachte genomische Instabilität kann zur weiteren Krebsentwicklung beitragen [117] (Abbildung 4).

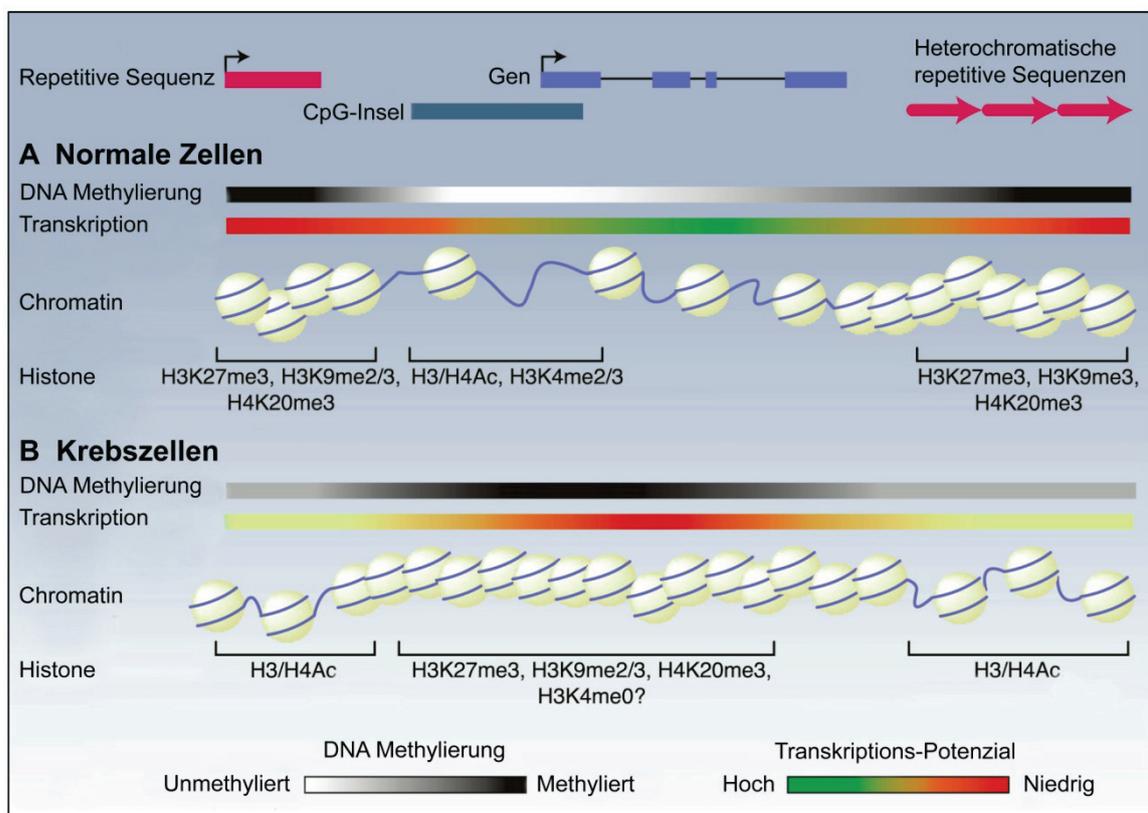


Abbildung 4 Änderung von DNA-Methylierungsmustern und Histonmodifikationen in Krebszellen. Während repetitive Sequenzelemente in normalen Zellen methyliert und mit kondensiertem Chromatin assoziiert sind, sind die CpG-Inseln in den Promotorregionen von Genen in der Regel unmethyliert und durch einen offenen Chromatinzustand charakterisiert. Im Verlauf der Krebsentstehung kommt es zu genomweiten epigenetischen Veränderungen, die häufig zu einer Hypermethylierung und Stilllegung von Genen sowie der Hypomethylierung repetitiver Elemente führen. Verändert nach McCabe et al. (2009) [118].

Da die DNA-Methylierung eng mit der Modifikation von Histonen verbunden ist, ist es nicht verwunderlich, dass mit den beobachteten globalen Methylierungsänderungen in Tumorzellen auch eine globale Änderung der Histonmodifikation einhergeht [112]. So wurden z.B. in verschiedenen Krebsarten eine erhöhte Expression bestimmter Proteine des Polycomb-Komplexes [119, 120], eine verringerte Acetylierung von H4K16 und verringerte Methylierung von H4K20 [121] beobachtet. Diese krebsassoziierten Veränderungen des Chromatins führen einerseits zu einer globalen Veränderung des Transkriptionsprofils mit Auswirkungen auf die Regulierung des Zellzyklus, die Expression endogener transponierender Elemente oder miRNAs und die Aktivierung zellulärer Reparaturmechanismen sowie andererseits zu einer erhöhten chromosomalen Instabilität [118] (Abbildung 4).

1.8 Epigenetische Therapie

Im Gegensatz zu genetischen Mutationen sind epigenetische Mutationen reversibel, was sie zu einem interessanten Ansatzpunkt für die medizinische Forschung macht. Wirkstoffe, die die Aktivität epigenetischer Enzyme regulieren, können zu einer Reaktivierung von epigenetisch stillgelegten Tumorsuppressorgenen führen, indem sie die Entfernung krebsassoziiertes epigenetischer Modifikationen bewirken und somit das Chromatin in den Normalzustand zurückversetzen [122]. Beispiele für epigenetische Wirkstoffe sind Histon-Deacetylase-Inhibitoren und DNA-Methyltransferase-Inhibitoren.

Histon-Deacetylase (HDAC)-Inhibitoren hemmen die Aktivität von Histon-Deacetylasen und können auf diese Weise eine Veränderung des Chromatins bewirken. Neben zellulärer Differenzierung und Apoptose wurde auch die verstärkte Expression von Antitumor-Genen nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren beschrieben [123]. Während der HDAC-Inhibitor Valproinsäure schon seit Jahrzehnten in der psychiatrischen und neurologischen Medizin zur Behandlung von Epilepsien und Depressionen eingesetzt wird, werden zur Behandlung von Krebserkrankungen (kutanes T-Zell Lymphom) die Wirkstoffe SAHA (Suberoylanilid Hydroxämische Säure) und Depsipeptid eingesetzt [124, 125].

DNA-Methyltransferase-Inhibitoren können anhand ihres Wirkmechanismus in drei Gruppen unterteilt werden: Einige Inhibitoren binden an das katalytische Zentrum der Methyltransferasen und hemmen auf diese Weise direkt die Aktivität der DNMTs. Zu dieser Gruppe gehören z.B. Hydralazin [126], EGCG, ein Polyphenol, das in grünem Tee enthalten ist [127], und RG108 [128]. Andere Inhibitoren wie Procain und sein Derivat

Procainamid [126, 129, 130] binden an CG-Dinukleotide und blockieren die Wechselwirkung zwischen Substrat und Enzym. Die Wirkstoffe aus diesen beiden Gruppen führen allerdings nur zu einer geringen Verminderung der Methylierung *in vitro*. Zu der dritten Gruppe der DNMT-Inhibitoren zählen Nukleotidderivate mit 5'-Modifikationen des Pyrimidin-Ringes wie z.B. 5-Azacytidin, [131] 5-Aza-2'-Deoxycytidin [132], 5-Fluoro-2'-Deoxycytidin [133] und Zebularin [134, 135]. Diese Wirkstoffe werden nach intrazellulärer Modifikation während der Replikation in die DNA eingebaut und inhibieren DNMTs während der Methylierungsreaktion, weshalb sie als Mechanismus-basierte Inhibitoren bezeichnet werden [133]. Während sich einige dieser Wirkstoffe noch in einer vergleichsweise frühen Entwicklungsphase befinden, wurden die Cytidin-Derivate 5-Azacytidin (Azacytidin, AZA) und 5-Aza-2'-Deoxycytidin (Decitabin, DAC) vor wenigen Jahren zur epigenetischen Therapie des Myelodysplastischen Syndroms (MDS), einer häufigen Knochenmarkserkrankung bei älteren Menschen, zugelassen. Beide Wirkstoffe zeichnen sich durch den Austausch des Kohlenstoff-Atoms an der 5'-Position des Pyrimidin-Ringes durch ein Stickstoff-Atom aus (Abbildung 5).

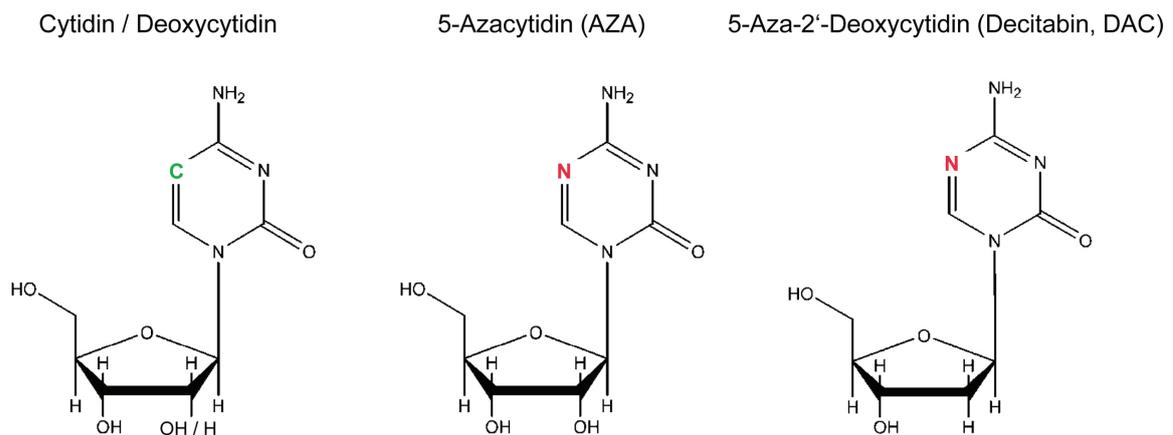


Abbildung 5 Die Cytidin-Derivate 5-Azacytidin (AZA) und 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC) sind durch den Austausch des Kohlenstoff-Atoms an der 5'-Position des Pyrimidin-Ringes durch ein Stickstoff-Atom charakterisiert. AZA und DAC unterscheiden sich in der Struktur der an die Base gebundenen Ribose.

1.9 Azacytidin und Decitabin

Die Cytosin-Analoga 5-Azacytidin (AZA) und 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC) wurden bereits in der 60er Jahren als zytotoxische Wirkstoffe gegen Krebs charakterisiert [132, 136, 137]. Frühe klinische Studien basierten deshalb auf der zytotoxischen Wirkung beider Wirkstoffe. Diese wurden mit der maximal tolerierten Wirkstoffdosis in Verbindung mit einer relativ kurzen Behandlungsdauer durchgeführt und zeigten hauptsächlich bei hämatologischen Krebserkrankungen sporadische Effekte [138-140]. Aufgrund der

starken Nebeneffekte wurden AZA und DAC jedoch zunächst nicht durch die FDA (US Food and Drug Administration) zugelassen.

In vitro wurde in den 70er Jahren beobachtet, dass die Behandlung embryonaler Zelllinien mit geringen Konzentrationen an AZA oder DAC eine DNA-Demethylierung und zelluläre Differenzierung bewirkte [133, 141, 142]. Später stellte sich heraus, dass Azanukleoside die Aktivität von DNA-Methyltransferasen hemmen [143]. Erst im letzten Jahrzehnt wurden AZA und DAC aufgrund ihrer epigenetischen Wirkungsweise erneut für klinische Anwendungen in Betracht gezogen [144, 145]. Durch die Verabreichung geringerer Dosen in mehreren Behandlungszyklen rückte die epigenetische Wirkung der Azanukleoside in den Vordergrund [146]. Heute sind AZA und DAC für die Behandlung des Myelodysplastischen Syndroms (MDS) zugelassen [147]. MDS zeichnet sich durch eine Störung der Ausreifung einzelner Blutzelllinien aus, die durch genetisch veränderte Zellen im Knochenmark verursacht wird. Dabei kommt es häufig neben einer morphologischen Veränderung von Knochenmarks- und Blutzellen zu einer Anhäufung undifferenzierter Zellen im Knochenmark (Blasten) die mit einer Verringerung von Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten im Blutbild einhergeht [147]. Als Begleiterscheinungen können Blutungen, Kurzatmigkeit und ein zunehmendes Schwächegefühl auftreten. Bei etwa 30 % der Patienten geht die Erkrankung in eine Akute Myeloische Leukämie (AML) über, die nur schwer behandelbar ist und in relativ kurzer Zeit zum Tod der Patienten führt [148].

1.10 Wirkmechanismen von Azacytidin und Decitabin

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass AZA und DAC unterschiedliche Effekte auf die Zellphysiologie ausüben [149-151], was auf die verschiedenen Wirkmechanismen beider Stoffe zurückgeführt wird. Unterschiede im intrazellulären Metabolismus der Azanukleoside sind auf die chemische Struktur des an das modifizierte Cytosin gebundenen Zuckers zurückzuführen: Während AZA eine Ribose enthält, ist der Pyrimidinring bei DAC an eine Deoxyribose gebunden (Abbildung 5). Dementsprechend kann AZA zusätzlich zur DNA auch in die RNA eingebaut werden [149, 152]. Der Einbau der Azanukleoside in Nukleinsäuren erfordert eine Modifikation der Ausgangsstoffe in die jeweilige Nukleosid- bzw. Deoxynukleosid-Triphosphat-Form. Welche Enzyme genau an dieser Umwandlung beteiligt sind, ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt worden. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass Enzyme des Cytosin-Stoffwechsels diese Funktion übernehmen können. So wurde z.B. gezeigt, dass die Deoxycytidin-Kinase, die die Umwandlung von Deoxycytidin zu Deoxycytidin-Monophosphat katalysiert, auch DAC *in*

in vitro phosphorylieren kann [153]. Es wird angenommen, dass AZA durch das analoge Enzym Uridin-Cytidin-Kinase, das die Phosphorylierung von Uridin und Cytidin katalysiert, in Azacytidin-Monophosphat umgewandelt wird. Hinweise darauf lieferten bereits frühe Studien in den 70er Jahren, die zeigten, dass Uridin und Cytidin die Toxizität von AZA vermindern können, was auf eine Konkurrenz dieser Nucleoside um die phosphorylierenden Enzyme hindeutete [152]. Eine Phosphorylierung von AZA durch dieses Enzym konnte allerdings bis heute nicht *in vitro* bestätigt werden [154]. Die weitere Phosphorylierung von AZA und DAC in ihre Diphosphatform wird voraussichtlich von dem weniger substratspezifischen Enzym UMP-CMP Kinase übernommen. Azacytosin-Diphosphat-Moleküle werden daraufhin vermutlich durch das Enzym Ribonucleotid-Reduktase zu der entsprechenden Deoxyribonucleosid-Struktur reduziert und sind somit strukturell identisch mit der diphosphorylierten Form von DAC [152]. Im weiteren metabolischen Verlauf katalysiert voraussichtlich die Nucleosid Diphosphat-Kinase die Bindung einer weiteren Phosphatgruppe an die 5-aza-dCDP-Moleküle, die daraufhin als vollständig phosphorylierte 5-Azacytidin-Triphosphate durch die DNA-Polymerase in die replizierende DNA eingebaut werden (Abbildung 6).

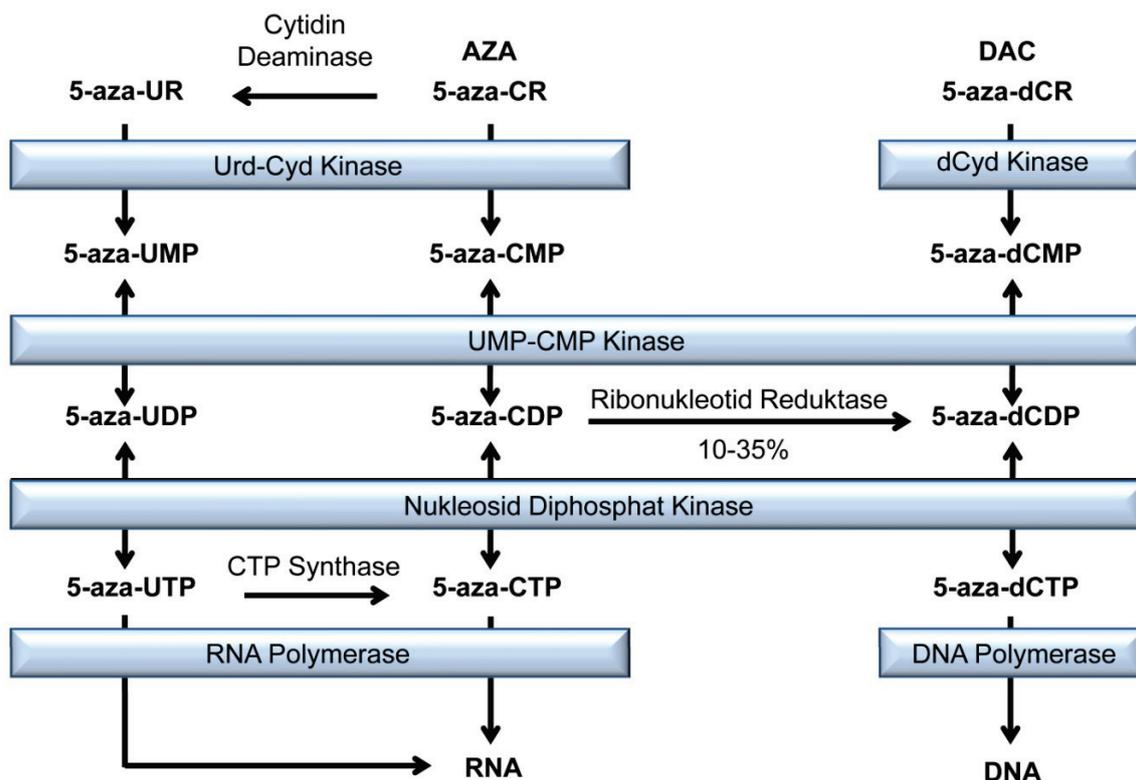


Abbildung 6 Intrazellulärer Metabolismus von Azacytidin (AZA, 5-aza-CR) und Decitabin (DAC, 5-aza-dCR). Während DAC ausschließlich in die DNA eingebaut wird, wird AZA sowohl in DNA als auch in RNA eingebaut.

Der Einbau von AZA bzw. DAC in die DNA kann zu verschiedenen zytotoxischen Effekten führen: Zum einen kann eine hydrolytische Spaltung der Azanukleoside, die im Vergleich zu natürlichen Nukleosiden eine geringere Stabilität aufweisen, zu Schäden in der DNA führen [155]. Ein anderer Effekt, auf dem die epigenetische Wirkungsweise von AZA und DAC beruht, ist die nicht auflösbare kovalente Bindung von Methyltransferasen während der Methylierungsreaktion [143, 156]. Dabei bildet sich zwischen dem C6-Atom des Pyrimidin-Ringes und der Sulfhydryl-Gruppe des katalytischen Cysteins der Methyltransferase eine kovalente Bindung aus. Diese kann nach dem Transfer der Methylgruppe jedoch nicht durch β -Eliminierung aufgelöst werden, da der Kohlenstoff an der C5-Position, der als Protonendonator für diese Reaktion notwendig ist, in Azanukleosiden durch ein Stickstoff-Atom ersetzt ist [143]. Das auf diese Weise entstehende Protein-DNA-Addukt wird von der zellulären Reparaturmaschinerie als Schaden erkannt und repariert. Dabei wird der DNA-Protein-Komplex voraussichtlich abgebaut, was zu einer Reduktion der Methyltransferasen im Zytoplasma führt. Infolge dessen wird die Effizienz der Erhaltungsmethylierung während der DNA-Replikation herabgesetzt, was zu einer passiven Demethylierung der DNA führt [157]. Die durch Azanukleosid-Behandlung verursachte globale DNA-Demethylierung führt damit zu weitreichenden Veränderungen der zellulären Genexpression [158, 159] und der Chromatinstruktur [160].

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass nur ein kleiner Anteil der AZA-Moleküle in die DNA eingebaut wird: ein Großteil der Moleküle (65-90 %) wurde nach Wirkstoff-Behandlung in der RNA nachgewiesen [149, 152]. Dies bedeutet, dass nur etwa 10-35 % der Azacytosin-Diphosphate durch die Ribonukleotid-Reduktase in die Deoxy-Form umgewandelt werden und zur DNA-Demethylierung zur Verfügung stehen. Die übrigen Azacytosin-Diphosphat-Moleküle werden somit nach weiterer Phosphorylierung durch die Nukleosid Diphosphat-Kinase in die RNA eingebaut (Abbildung 6) [152]. Der Einbau von Azanukleosiden in die RNA kann sich unter anderem auf die Prozessierung von tRNAs und rRNAs auswirken und zu einer Hemmung der Proteinsynthese führen [155, 161-164]. Diese Beobachtungen zeigen deutlich, dass AZA und DAC unterschiedliche Effekte auf die zelluläre Physiologie ausüben, die auch in der klinischen Anwendung beider Wirkstoffe berücksichtigt werden müssen. Dies ist insofern besonders erwähnenswert, da aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit von AZA und DAC häufig auf eine ähnliche Wirkungsweise geschlossen wird, was sich im allgemeinen Sprachgebrauch durch die Verwendung der Bezeichnung „AZA“ als Synonym für DAC ausdrückt. Auch die heutigen klinischen Therapieansätze konzentrieren sich hauptsächlich auf die epigenetische Wirkung beider Stoffe und verwenden sowohl AZA als auch DAC zur Behandlung desselben Krankheitsbildes.

1.11 Ansätze zur Optimierung der epigenetischen Therapie

Trotz zunehmender Akzeptanz und Anwendung in der Krebstherapie sind AZA und DAC keine idealen Wirkstoffkandidaten für die epigenetische Therapie. Ein bedeutender Nachteil der heutigen epigenetischen Therapie ist die unspezifische Wirkungsweise von AZA und DAC, sowohl auf epigenetischer als auch auf nicht-epigenetischer Ebene. Dies erschwert eine individuelle Vorhersage der klinischen Wirksamkeit erheblich. So wird z.B. vermutet, dass die unspezifische DNA-Demethylierung durch Azanukleoside eine potenzielle Gefahr für Patienten darstellt, da durch die Behandlung neben Tumorsuppressorgenen auch epigenetisch stillgelegte nicht-krebsassoziierte Gene aktiviert werden könnten [112]. Dazu gehören Genregionen mit genomischer Prägung [165], Gene des inaktivierten X-Chromosoms [138], aber auch im Laufe der Zelldifferenzierung inaktivierte Gene. Diese Vermutungen werden durch die Beobachtung gestützt, dass die Behandlung mit DAC die Expression hypermethylierter Onkogene wie z.B. COX2 [166] und TERT [167] induzieren kann. Weiterhin wurde im Zellkultursystem gezeigt, dass die Behandlung mit AZA in Krebszellen eine Aktivierung der Transkription illegitimer Fusionstranskripte auslösen kann [168, 169]. Die Ursache liegt wahrscheinlich in der Demethylierung transponierbarer Elemente, die zu einer veränderten Nutzung von Promotoren führt. Dieser Vorgang könnte ebenfalls eine potenzielle Gefährdung für Patienten in der epigenetischen Therapie darstellen.

Neben den demethylierenden Eigenschaften von AZA und DAC führen die teilweise noch nicht ausreichend charakterisierten zytotoxischen Effekte dieser Wirkstoffe zu schwer kalkulierbaren Auswirkungen auf die epigenetische Therapie. Zytotoxische Nebeneffekte entstehen, wie bereits beschrieben, durch den Einbau in die DNA und RNA [152, 170], aber möglicherweise auch durch die direkte Aktivierung proteolytischer Prozesse [171]. Inwieweit diese zytotoxischen Effekte einen positiven oder negativen Einfluss auf den klinischen Behandlungserfolg ausüben, bleibt zu untersuchen.

Eine häufige Begleiterscheinung der medikamentösen Krebstherapie ist das Auftreten von Resistenzen gegen den verabreichten Wirkstoff. Dementsprechend wurde auch in der epigenetischen Therapie beobachtet, dass einige Patienten zunächst gut auf die Behandlung ansprechen, aber im weiteren Verlauf Resistenzen gegen AZA oder DAC entwickelten [172]. Andere Patienten sprechen aus bislang unbekanntem Gründen überhaupt nicht auf eine epigenetische Therapie an [173].

Die Effizienz von AZA und DAC bezüglich der Demethylierung krebsassoziiierter Gene wurde in Patienten bislang nur wenig untersucht [174]. In den vorliegenden

Patientenstudien wurde lediglich eine moderate DNA-Demethylierung auf globaler Ebene oder in den LINE-Elementen einiger MDS-Patienten nach DAC-Behandlung beobachtet [175, 176]. Einer Therapie mit AZA resultierte in einer im Vergleich noch uneffektiveren Demethylierung der LINE-Elemente von nur 5 % [177]. Eine unterschiedlich effiziente genspezifische Demethylierung wurde außerdem in den Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen wie p15 [178] und anderer Gene beobachtet [174]. Allerdings wurde in einer hochauflösenden Methylierungsanalyse AZA-behandelter Patienten eine transiente Reduktion der globalen Methylierung in peripheren Blutzellen um bis zu 50 % festgestellt [174]. Eine Therapie-assoziierte DNA-Demethylierung konnte bislang jedoch nur in einer Untergruppe von Patienten nachgewiesen werden und korrelierte nicht oder nur moderat mit einem Behandlungserfolg [173, 174, 179, 180].

Zur Optimierung von AZA und DAC in der epigenetischen Therapie ist die Maximierung der Demethylierungseffizienz bei einer gleichzeitigen Minimierung der zytotoxischen Nebenwirkungen für den Patienten erforderlich. Die Grundlage für diese Maßnahmen bildet das genaue Verständnis der Wirkungsweise dieser Wirkstoffe. Dazu gehört neben der Identifizierung von Signalwegen, die an der metabolischen Umwandlung der Wirkstoffe in der Zelle beteiligt sind auch die spezifische Charakterisierung von Effekten auf die DNA-Demethylierung.

Bisherige Studien konzentrierten sich zu diesem Zweck auf die Analyse demethylierender Effekte von Azanukleosiden auf spezifische Genpromotoren bzw. repetitive Regionen [158, 181, 182]. Moderne genomweite Methylierungsanalysen zur spezifischen Charakterisierung des epigenetischen Wirkmechanismus von AZA und DAC wurden bislang nicht durchgeführt. Aufgrund fehlender Technologien wurden zu diesem Zweck häufig indirekte Methoden angewendet, wie die Analyse genomweiter Expressionsänderungen nach Azanukleosid-Behandlung durch Gen-Expressionsarrays [158, 159]. Da eine Induktion der Genexpression allerdings nicht immer mit einer Demethylierung der assoziierten Promotorregion einhergeht [183], können Expressionsanalysen Azanukleosid-induzierte Veränderungen im Methylierungsmuster nur eingeschränkt wiedergeben.

1.12 Ziel der Dissertation

Diese Dissertation hat zum Ziel, die Wirkungsweise von AZA und DAC anhand moderner, genomweiter Analysemethoden besser zu charakterisieren und somit neue Ansätze zur Verbesserung ihrer klinischen Wirksamkeit zu entwickeln.

Dazu wurden folgende Zielsetzungen untersucht:

- 1.) Genomweite Charakterisierung Azanukleosid-induzierter DNA-Demethylierung auf globaler und genspezifischer Ebene
- 2.) Identifizierung zellulärer Signalwege, die durch 5-Azacytidin moduliert werden

Die Ergebnisse dieser Analysen bilden eine wichtige Grundlage zum Verständnis der epigenetischen und nicht-epigenetischen Wirkungsweise von AZA und DAC und eröffnen neue Ansatzpunkte für eine Optimierung der epigenetischen Therapie.

2 ERGEBNISSE

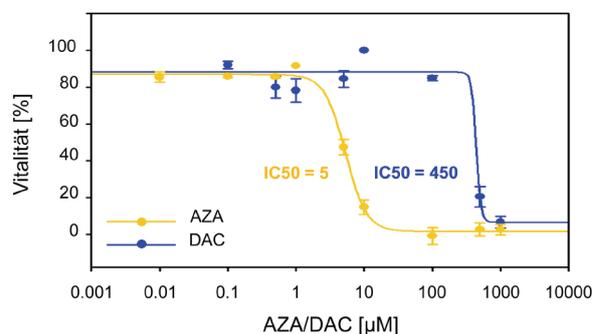
2.1 Charakterisierung Azanukleosid-induzierter DNA-Demethylierung

2.1.1 AZA ist zytotoxischer als DAC

Zur Charakterisierung der epigenetischen Wirkungsweise von 5-Azacytidin (AZA) und Decitabin (DAC) wurde zunächst der Einfluss Wirkstoff-induzierter zytotoxischer Effekte auf die Effizienz der DNA-Demethylierung untersucht. Für diese Analysen wurde die HCT116-Darmkrebszelllinie verwendet, die als epigenetisches Modellsystem vergleichsweise gut charakterisiert ist [150, 158, 184]. Außerdem existieren für diese Zelllinie verschiedene DNMT-Knockout-Zellen: 1KO (DNMT1-Knockout), 3BKO (DNMT3B-Knockout) und DKO (DNMT1- und DNMT3B-Doppelknockout) [76, 185, 186]. Diese Zelllinien erlauben einen Vergleich der Azanukleosid-induzierten Demethylierungsmuster mit Methylierungsmustern, die durch die Kultivierung von spezifischen DNMT-Knockout-Zellen entstehen.

Zum Vergleich der Zytotoxizität beider Wirkstoffe wurde der Effekt von AZA und DAC auf die Zellvitalität mit zwei verschiedenen zellulären Assays analysiert (Abbildung 7): 1.) der CellTiter-Blue®-Assay (Promega) misst die metabolische Aktivität der Zellen, die durch die Reduktion des blauen Farbstoffes Resazurin zu einem pinkfarbenen und fluoreszierenden Farbstoff (Resorufin) angezeigt wird. 2.) Der Koloniebildungs-Assay ist hingegen ein Maß für die Fähigkeit stark vereinzelter Zellen, Kolonien zu bilden.

A Proliferations-Assay (72h)



B Koloniebildungs-Assay (13 Tage)

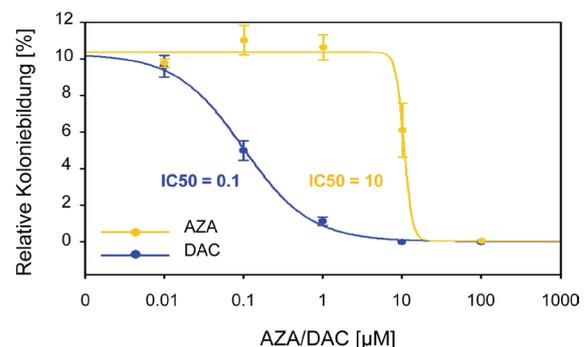


Abbildung 7 AZA und DAC zeigen unterschiedliche Zytotoxizitätsprofile. **A.** Die relative Zellvitalität wurde unter Verwendung des CellTiter Blue®-Assays nach einer Behandlungsdauer von 72 h mit den angegebenen Wirkstoffkonzentrationen gemessen. **B.** Der relative Anteil der Zellen, der nach Behandlung mit den angegebenen Wirkstoffkonzentrationen Kolonien bildete, wurde nach 13 Tagen Inkubationsdauer anhand einer Kristallviolett-Färbung bestimmt.

Während der Proliferations-Assay Aussagen über akute Zytotoxizität der Wirkstoffe erlaubt, gibt der Koloniebildungs-Assay Informationen über deren Langzeitwirkung. Als Maß für die Zytotoxizität wurde die IC50-Konzentration der Wirkstoffe berechnet. Der IC50-Wert zeigt diejenige Konzentration an, die zum Zeitpunkt des Auslesens zu einer Verringerung der Vitalität um 50 % führte. Nach einer Inkubationszeit von 72 h mit unterschiedlichen AZA- und DAC-Konzentrationen war im Proliferations-Assay ein deutlicher Unterschied in der Zytotoxizität zu erkennen. Die IC50-Konzentration lag für DAC bei 450 μM und für AZA bei 5 μM (Abbildung 7); dies bedeutet, dass zur Erreichung einer mit AZA vergleichbaren zytotoxischen Wirkung auf die Zellen fast 100-fach höhere Konzentrationen an DAC benötigt wurden. Interessanterweise zeigte der Koloniebildungs-Assay ein gegensätzliches Ergebnis: nach einer Inkubationszeit von 13 Tagen hatten die AZA-behandelten Zellen eine größere Anzahl an Kolonien gebildet als DAC-behandelte Zellen. Die IC50-Konzentration war bei diesem Assay für AZA ca. 100-fach höher als für DAC. Diese unterschiedlichen Ergebnisse deuten auf grundlegende Unterschiede in der Wirkungsweise beider Wirkstoffe hin. Aus diesem Grund wurden die Zytotoxizitätsprofile beider Wirkstoffe im Folgenden mit spezifischen Assays näher charakterisiert.

2.1.2 AZA und DAC beeinflussen den Zellzyklus auf unterschiedliche Weise

AZA und DAC werden nach metabolischer Umwandlung innerhalb der Zelle als Nukleotid-Analoga in replizierende DNA eingebaut und führen dort zu vielfältigen Effekten, unter anderem auf den Zellzyklus [149, 187, 188]. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen beider Wirkstoffe auf den Zellzyklus von HCT116-Zellen unter Verwendung der Durchflusszytometrie (FACS) näher verglichen (Abbildung 8).

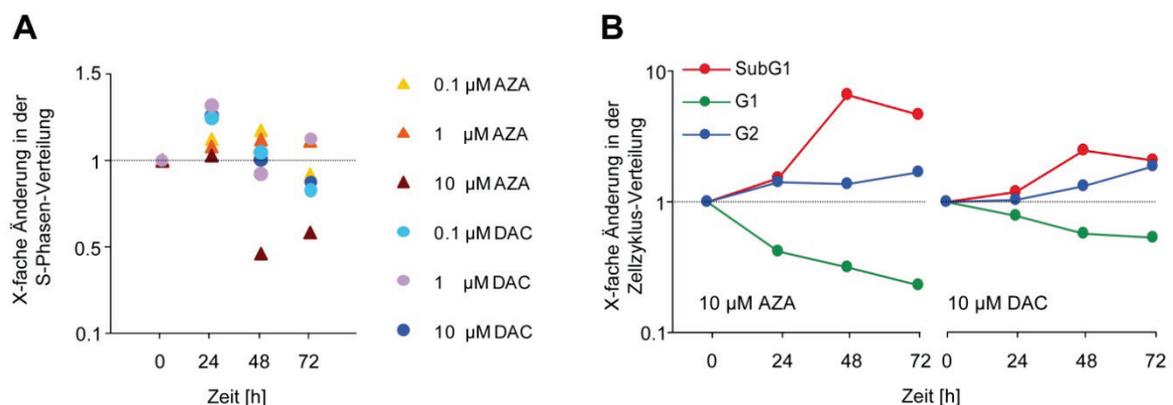


Abbildung 8 AZA und DAC beeinflussen den Zellzyklus auf unterschiedliche Weise. In einem Zeitkurs-Experiment wurde zu den angegebenen Zeitpunkten **A.** nach Behandlung mit den angegebenen Wirkstoffkonzentrationen die Anzahl der Zellen in der S-Phase oder **B.** die Zellzyklusverteilung nach der Behandlung mit 10 μM AZA oder DAC mit einer FACS-Analyse bestimmt.

Von besonderem Interesse war dabei der Einfluss von AZA und DAC auf die Fraktion der replizierenden Zellen, da eine fortwährende Zellteilung den weiteren Einbau der Wirkstoffe in die DNA und somit deren demethylierende Aktivität gewährleistet. Abbildung 8A zeigt, dass die Anzahl sich teilender Zellen 24 h nach Behandlung selbst mit hohen Konzentrationen an AZA und DAC nicht vermindert wird. Es ist sogar ein geringfügiger Anstieg in der Zahl der replizierenden Zellen zu beobachten. Nach 48-stündiger Inkubation mit 10 μM AZA verringerte sich allerdings die Anzahl sich teilender Zellen. Außerdem führten beide Wirkstoffe in HCT116-Zellen zu einem G2-Arrest, der mit einem Rückgang der Zellanzahl in G1 einherging. Weiterhin wurde insbesondere nach AZA-Behandlung eine mit der Inkubationszeit stark ansteigende Anzahl an toten Zellen (Sub-G1) beobachtet (Abbildung 8B). Weitere Daten zur FACS-Analyse von HCT116-Zellen sind in Anhang 1 aufgeführt.

2.1.3 Hohe AZA-Konzentrationen induzieren Apoptose

Da durch die FACS-Analyse eine hohe Anzahl toter Zellen nach AZA-Behandlung identifiziert worden war, wurde im Folgenden untersucht, ob der Zelltod durch Apoptose eingeleitet wurde. Aus diesem Grund wurden HCT116-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen an AZA und DAC behandelt und die Aktivierung der CASPASE3 im Western Blot analysiert [189]. Caspasen sind an allen bislang bekannten Apoptosewegen beteiligt, indem sie apoptotische Signale kaskadenartig weiterleiten und damit den Zelltod vermitteln. Der Nachweis einer Aktivierung von Caspasen ist somit ein wichtiger biochemischer Marker für die Bestimmung von Apoptose. Das CASPASE3-Protein wurde als Marker ausgewählt, da seine Spaltung sowohl eine intrinsische als auch extrinsische Aktivierung des apoptotischen Signalweges anzeigt.

Abbildung 9 zeigt, dass Apoptose in HCT116-Zellen durch hohe AZA-Konzentrationen (10 μM) ausgelöst wurde, jedoch nicht durch DAC-Behandlung.

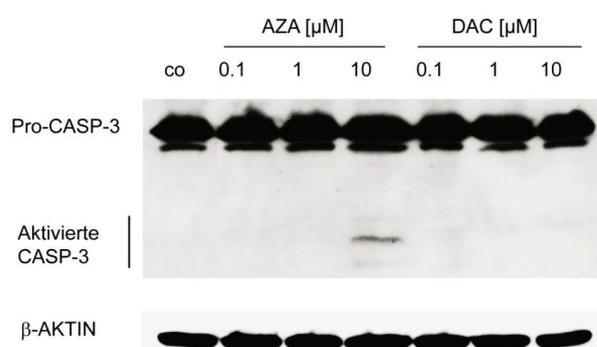


Abbildung 9 AZA induziert Apoptose. Die Spaltung der CASPASE-3 (CASP-3) wurde in HCT116-Zellen nach 48 h Behandlung mit den angegebenen Wirkstoffkonzentrationen mittels Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle wurde β -AKTIN verwendet.

2.1.4 Hohe AZA-Konzentrationen induzieren DNA-Schäden

Apoptose wird unter anderem durch Schädigung der DNA über den p53-Signalweg induziert. Um zu untersuchen, ob AZA die DNA stärker schädigt als DAC, wurde die Expression von γ H2AX als Marker für Doppelstrangbrüche [190, 191] und die GADD45A-Expression als früher Genotoxizitätsmarker [192] untersucht (Abbildung 10).

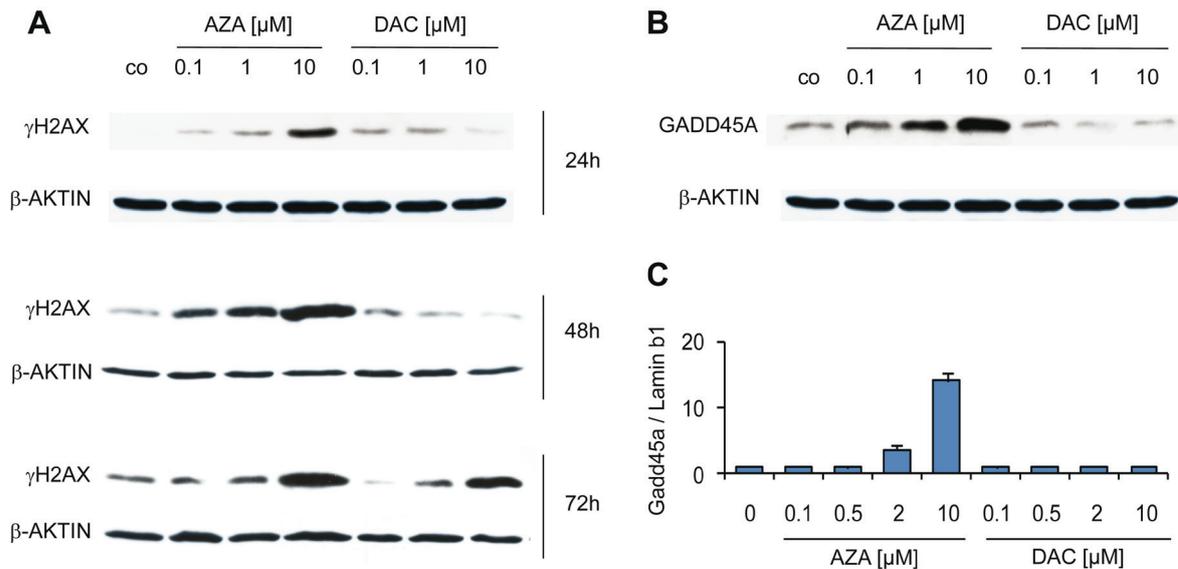


Abbildung 10 AZA induziert Genotoxizitätsmarker. Die Induktion von γ H2AX nach den angegebenen Inkubationszeiten (A) und GADD45A nach 24-stündiger Inkubation (B) wurde in HCT116-Zellen nach Behandlung mit den angegebenen Wirkstoffkonzentrationen mittels Western Blot bestimmt. C. Induktion der GADD45a-Genexpression nach Behandlung mit den angegebenen Wirkstoffkonzentrationen für 24 h. Als Referenz diente die Expression von Lamin b1. Die Werte repräsentieren die Mittelwerte aus drei Replikaten \pm SD.

Der Western Blot in Abbildung 10A zeigt, dass hohe AZA-Konzentrationen schon nach 24 h DNA-Doppelstrangbrüche induzierten, hohe DAC-Konzentrationen erst nach 72 h. GADD45A-Transkription und -Proteinexpression wurden jedoch nur durch AZA und nicht durch DAC induziert (Abbildung 10B). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Schädigung der DNA sowie die Auslösung von Apoptose durch hohe AZA-Konzentrationen zu der in der FACS-Analyse beobachteten Verlangsamung der Zellteilung beitragen.

2.1.5 DAC demethyliert DNA effizienter als AZA

Nachdem wir für AZA und DAC unterschiedliche Toxizitätsprofile beobachtet hatten, die sich individuell verschieden auf den Zellzyklus auswirkten, vermuteten wir, dass sich die verringerte Zellteilungsrate auf die Demethylierungseffizienz der S-Phasen-abhängigen Wirkstoffe auswirken könnte. Dementsprechend würde eine Behandlung mit hohen AZA-Konzentrationen zu einer Verringerung der Demethylierungseffizienz führen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden HCT116-Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen beider Wirkstoffe behandelt und die globale Methylierung mittels Kapillarelektrophorese gemessen. Abbildung 11A zeigt wie erwartet, dass hohe Konzentrationen an AZA (5-10 μM) die Demethylierungseffizienz verringerten während DAC auch in einer Konzentration von 10 μM effizient demethylierte. Für AZA bestand somit aufgrund der erhöhten Zytotoxizität eine optimale Konzentration für den maximalen Demethylierungseffekt. In einem Zeitkurs-Experiment wurden im Folgenden die optimal demethylierende Konzentration für AZA und DAC (1 μM für beide Wirkstoffe) verglichen, um die Demethylierungskinetik über einen Behandlungszeitraum von 72 h zu analysieren (Abbildung 11B). Hier wurde deutlich, dass beide Wirkstoffe schon nach 6 h eine messbare Demethylierungsaktivität zeigten, die nach 24 h seine maximale Effektivität erreichte. DAC demethylierte jedoch zu allen gemessenen Zeitpunkten effizienter als AZA.

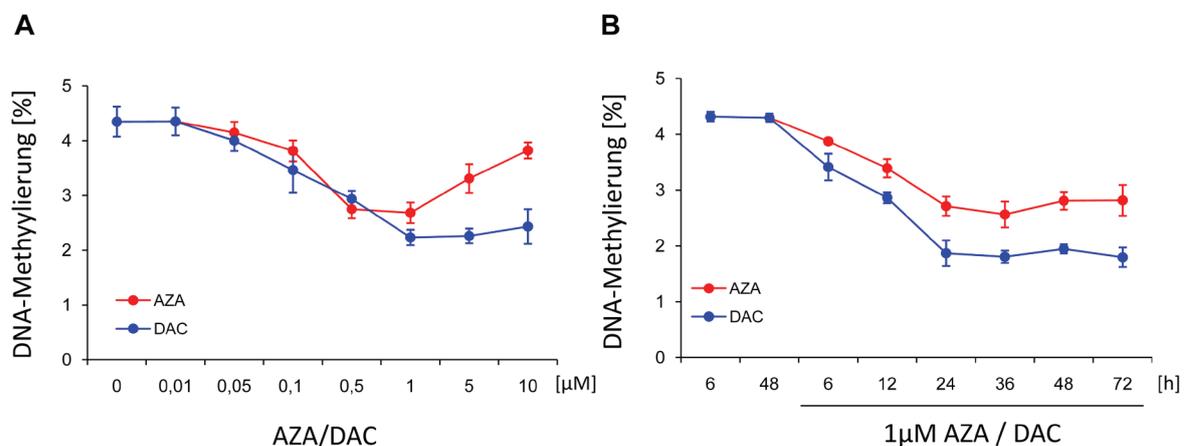


Abbildung 11 DAC demethyliert DNA effizienter als AZA. Die globale DNA-Methylierung wurde in HCT116-Zellen (**A**) nach 24 h Wirkstoffbehandlung in den angegebenen Konzentrationen oder (**B**) nach Behandlung mit maximal demethylierenden Wirkstoffkonzentrationen (1 μM AZA oder DAC) über einen Zeitraum von 72 h mittels Kapillarelektrophorese bestimmt.

Während mit der kapillarelektrophoretischen Analyse die genomweite Methylierung gemessen wird, kann mithilfe einer C1S2 COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) der Methylierungsgrad repetitiver Elemente analysiert werden [193]. Abbildung 12 zeigt, dass die analysierte Satellitenregion 2 auf Chromosom 1 (C1S2) ähnliche

Demethylierungsmuster aufweist wie die gesamtgenomische DNA. Vergleichbar mit der CE-Messung demethylierte DAC repetitive Sequenzen effizienter und auch nach Behandlung mit hohen Konzentrationen (10 μM), während AZA ein Demethylierungsoptimum bei etwa 0,5-1 μM zeigte.

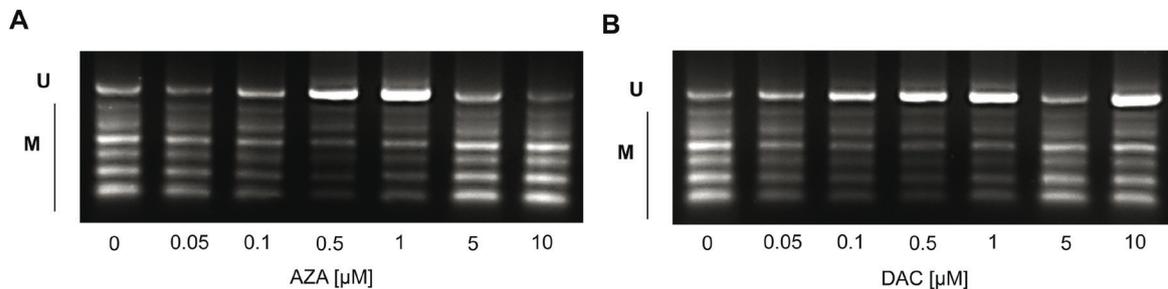


Abbildung 12 DAC demethyliert repetitive Satellitenregionen in HCT116-Zellen effizienter als AZA. C1S2 COBRA nach 24 h Inkubationszeit AZA (A) oder DAC (B) mit den angegebenen Konzentrationen; U, unmethyliert; M, methyliert.

Der Trapping-Assay in Abbildung 13 zeigt, dass die Demethylierungseffizienz mit der Stärke der DNMT1- und DNMT3B-Inaktivierung korreliert. Während eine DAC-Behandlung ab 0,1 μM zu einer starken Verminderung beider Methyltransferasen führte, war AZA weniger effektiv in der Inaktivierung von DNMTs und zeigte ein konzentrationsabhängiges Optimum (ca. 1 μM) im DNMT1-Trapping-Assay.

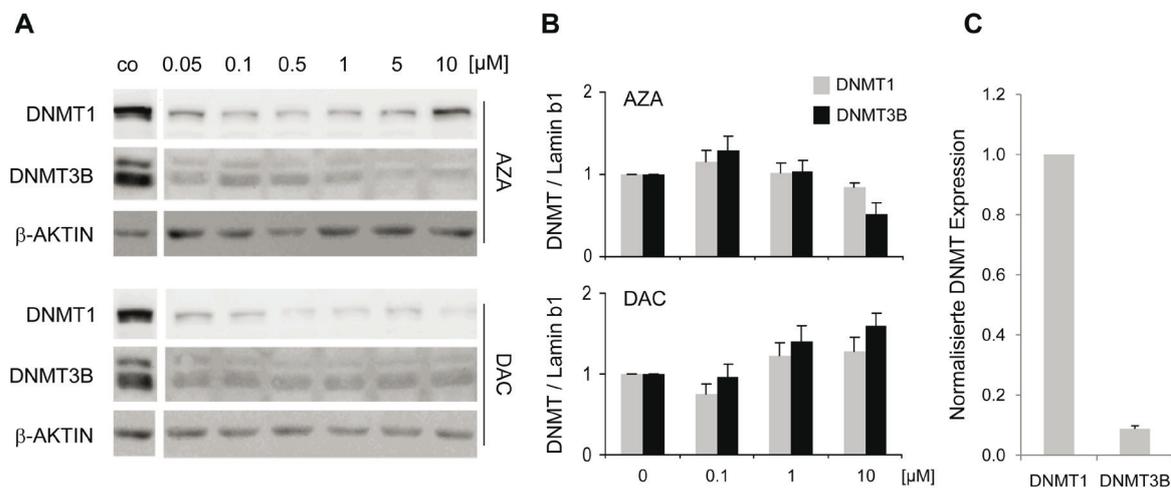


Abbildung 13 AZA und DAC induzieren DNMT1- und DNMT3B-Trapping in HCT116-Zellen. **A.** Nach einer Inkubationszeit von 24 h mit den angegebenen Wirkstoffkonzentrationen wurden DNMT1- und DNMT3B-Proteine mittels Western Blot bestimmt. β -AKTIN diente als Ladekontrolle. **B.** Die Expression von DNMT1- und DNMT3B-mRNA wurde nach einer Inkubationszeit von 24 h mit den angegebenen Wirkstoffkonzentrationen mit qRT-PCR Analyse ermittelt. Als Referenzgen wurde Lamin b1 verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit Standardabweichungen. **C.** Verhältnis von DNMT1- und DNMT3B-Expression in HCT116-Zellen, normalisiert mit Lamin b1. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit Standardabweichungen.

Aus der qRT-PCR Analyse wird außerdem ersichtlich, dass die DNMT-Inaktivierung auf Protein- und nicht auf mRNA-Ebene reguliert wurde (Abbildung 13B). Eine Verringerung der DNMT3B-Expression nach Behandlung mit 10 μ M AZA könnte der Grund dafür sein, dass die Bande des DNMT3B-Proteins im Western bei der gleichen Konzentration nicht die erwartete Stärke zeigt (vgl. DNMT1). In HCT116-Zellen wurde DNMT1 etwa 10-Mal stärker exprimiert als DNMT3B, was die qRT-PCR Analyse in Abbildung 13C verdeutlicht.

2.1.6 DAC induziert die Reexpression von APM2 schneller als AZA

Die Demethylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen von hypermethylierten und stillgelegten Genen durch Azanukleoside kann eine erneute Expression dieser Gene bewirken [194]. Ein Beispiel für diesen Mechanismus ist das APM2-Gen, dessen Expression in HCT116-Zellen durch Hypermethylierung ausgeschaltet ist. Abbildung 14 zeigt, dass die Behandlung mit AZA und DAC zu einer Demethylierung des APM2 Promotors führte und die Reexpression des APM2-Gens induzierte. Auch in diesem Assay zeigte DAC eine höhere Demethylierungseffizienz (Abbildung 14A), die mit einer früheren Induktion der APM2-Expression korrelierte.

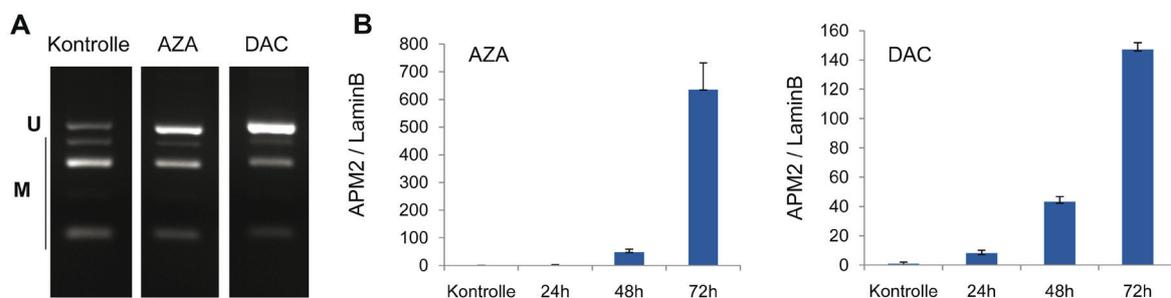


Abbildung 14 DAC induziert die Reexpression von APM2 in HCT116-Zellen schneller als AZA. **A.** APM2-COBRA in unbehandelten Zellen sowie mit AZA oder DAC für 24 h behandelte Zellen. **B.** Die Expression des APM2-Gens wurde nach 24 h AZA- oder DAC-Behandlung mittels qRT-PCR gemessen. Als Referenzgen wurde Lamin b1 verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit Standardabweichungen.

2.1.7 Array-basierte Charakterisierung Azanukleosid-induzierter Demethylierungsmuster

Zur genomweiten Charakterisierung Azanukleosid-induzierter Demethylierungsmuster in HCT116-Zellen sowie des Methylierungsmusters isogenerischer DNMT-Knockout-Zellen

wurde die Infinium Bead-Array-Technologie (Illumina) benutzt. Mit Hilfe dieses Arrays kann der Methylierungsstatus von 27578 CG-Dinukleotiden bestimmt werden, die 14475 Gene repräsentieren. Die abgefragten CGs befinden sich in der Promotorregion der assoziierten Gene, vorzugsweise innerhalb von CpG-Inseln. Die Funktionsweise des Arrays ist in Abbildung 15 schematisch dargestellt.

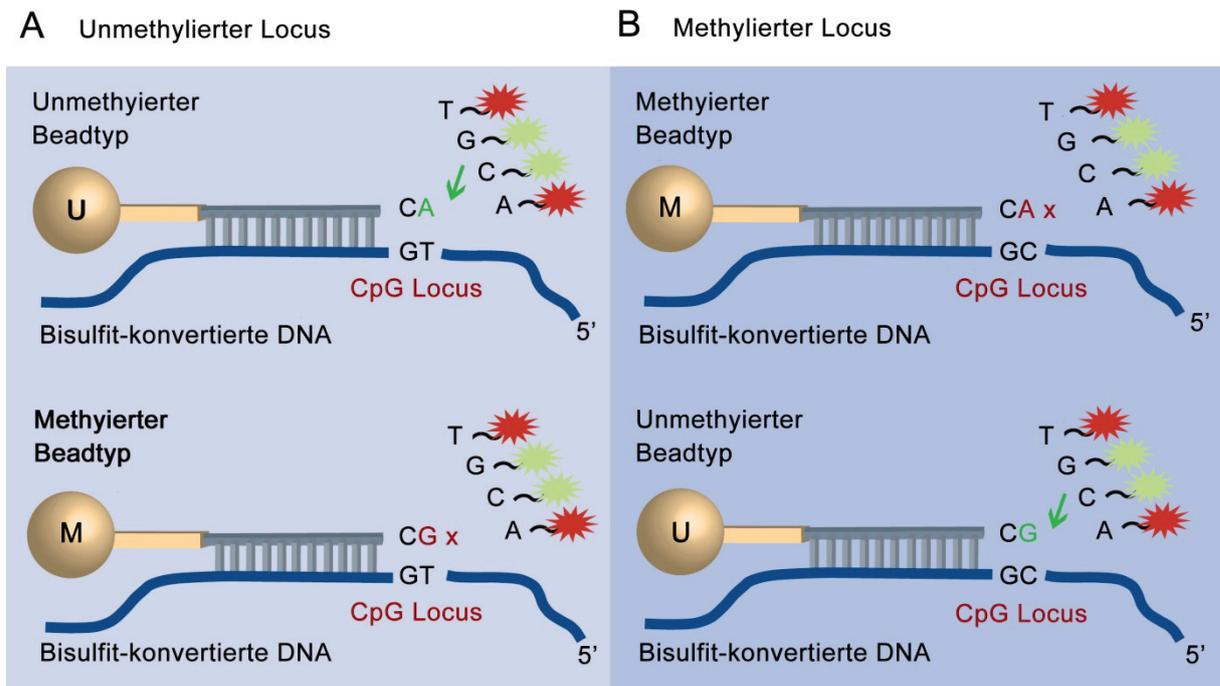


Abbildung 15 Infinium Methylierungs-Assay. Jeder CG-Locus wird durch zwei Beadtypen repräsentiert; dabei bindet der unmethylierte Beadtyp perfekt an den unmethylierten Zustand (A) und der methylierte Beadtyp an den methylierten Zustand (B) des jeweiligen Locus. Eine perfekte Basenübereinstimmung zwischen dem abgefragten Locus und der methylierungsspezifischen Sonde ermöglicht eine Einzelbasen-Verlängerung und Detektion der eingebauten markierten Base. U, unmethylierter Beadtyp; M, methylierter Beadtyp. Verändert nach Bibikova et al. (2009) [195].

Insgesamt wurden bis zu vier biologische Replikate für jede Probe auf verschiedenen Arrays analysiert. Nach statistischer Normalisierung der Rohdaten wurde die mittlere Methylierung (Average Beta, AVB) für jedes analysierte CG berechnet (durchgeführt von Oliver Heil, GPCF Heidelberg; siehe Material und Methoden). Ein mittlerer AVB-Wert von 1 entspricht einer Methylierung von 100 %, ein Wert von 0 beschreibt den unmethylierten Status von 0 %.

Die Dichte der AVB-Werte zeigte für fast alle analysierten Proben eine bimodale Verteilung mit jeweils einem Peak im unmethylierten (AVB = 0-0,2) und stark methylierten (AVB = 0,8-1) Bereich. Eine Ausnahme bildete die Dichteverteilung in DKO-Zellen, die einen einzigen Peak im niedrig-methylierten Bereich (AVB = 0-0,2) aufwies. Zwischen

biologischen Replikaten war die Dichteverteilung der AVB-Werte sehr ähnlich und zeigte eine hohe Reproduzierbarkeit der Methylierungsdaten (Abbildung 16). Auffällig war allerdings die Abweichung zweier Replikate in den DAC-behandelten Zellen: Abbildung 16D zeigt, dass zwei Behandlungen zu einer effektiven Demethylierung führten und zwei weitere Behandlungen eine vergleichsweise schwächere Demethylierung verursachten.

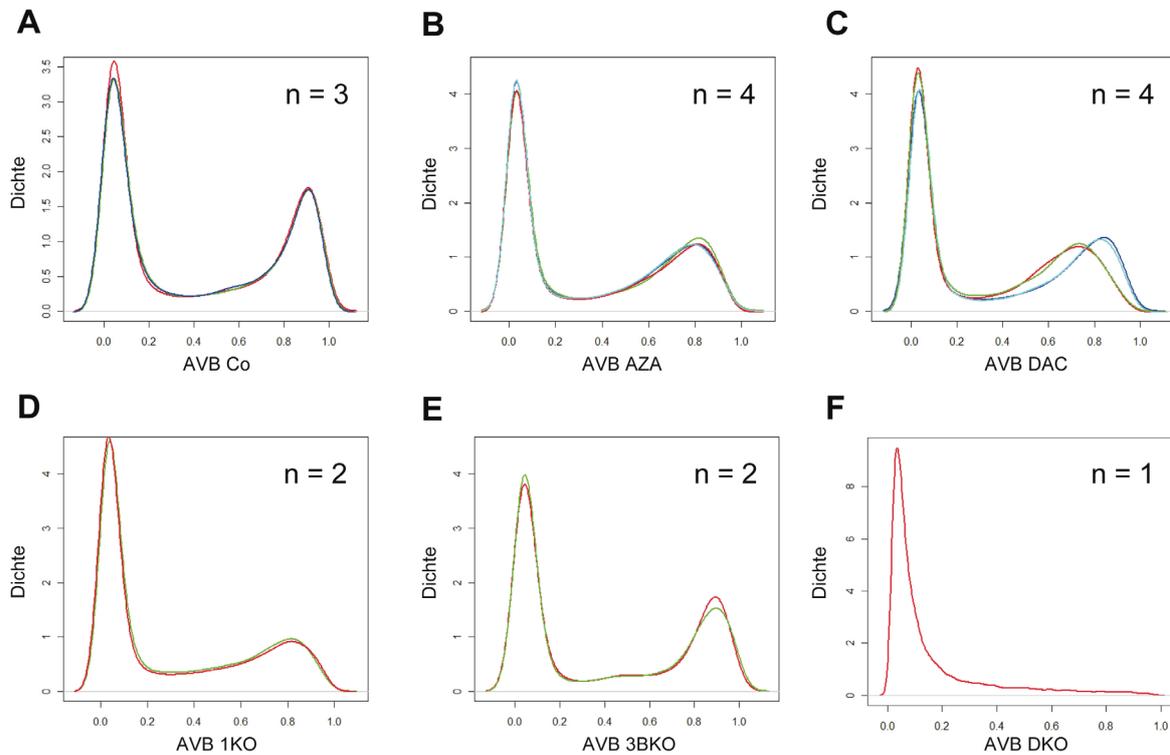


Abbildung 16 Dichteverteilung der Methylierung in den biologischen Replikaten von unbehandelten HCT116-Zellen (A), AZA- (B) und DAC-behandelten Zellen (C) sowie den DNMT-Knockout-Zelllinien 1KO (D), 3BKO (E) und DKO (F). Alle Zellen mit Ausnahme der DKO-Zellen zeigen eine bimodale Verteilung der Methylierung.

Wie bereits in Abbildung 16 zu erkennen war, zeigten die biologischen Replikate der 1KO- und 3BKO-Zellen eine sehr hohe Übereinstimmung in der Dichteverteilung der AVB-Werte. Aus dieser Darstellungsweise lässt sich allerdings nicht entnehmen, ob in den Replikaten identische CGs demethyliert wurden. Aus diesem Grund wurde die Übereinstimmung demethylierter CGs überprüft und im Venn-Diagramm (Abbildung 17) dargestellt. Die Abbildung zeigt deutlich, dass in den biologischen Replikaten der 1KO-Zellen 81 % der insgesamt demethylierten CGs übereinstimmten und in den Replikaten der 3BKO-Zellen 74 % der CGs. Diese hohe Reproduzierbarkeit des Methylierungsmusters in DNMT-Knockout-Zellen zeigt eine hohe locusabhängige Spezifität der DNA-Methylierung.

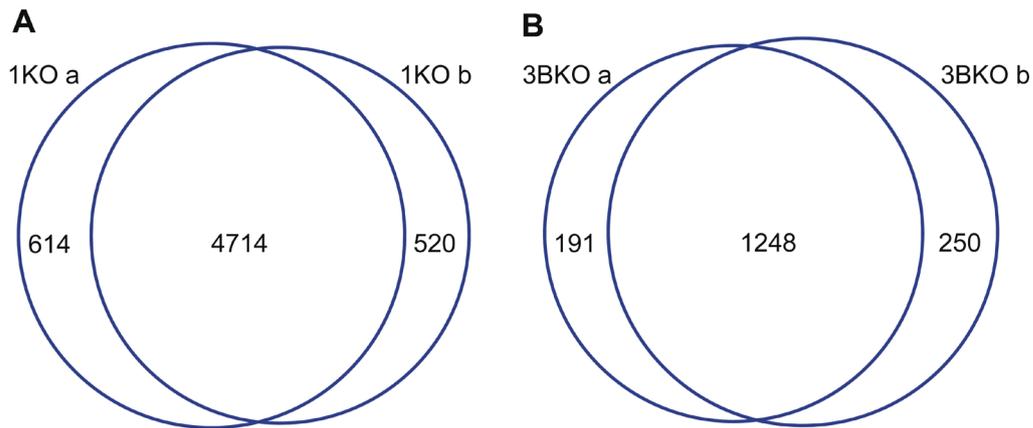


Abbildung 17 Die Methylierungsmuster in DNMT-Knockout-Zellen sind hoch reproduzierbar und spezifisch. Die in 1KO- (**A**) und 3BKO (**B**)-Zellen demethylierten CG-Dinukleotide überlappen innerhalb der biologischen Replikate sehr stark.

Die AZA- und DAC-Behandlungen zeigten ebenfalls eine hohe Übereinstimmung in der Dichteverteilung der AVB-Werte. Zusätzlich deuten die Venn-Diagramme in Abbildung 18 darauf hin, dass es eine Überlappung zwischen den demethylierten CGs der verschiedenen biologischen Replikate sowohl für die AZA-behandelten als auch für die DAC-behandelten Zellen gibt.

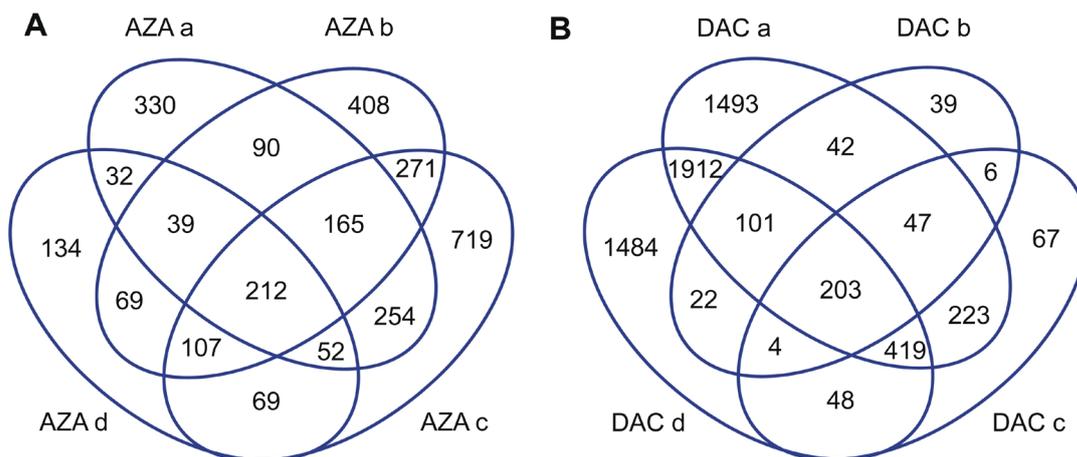


Abbildung 18 Die Methylierungsmuster in Wirkstoff-behandelten Zellen sind reproduzierbar und spezifisch. Die durch AZA-Behandlung (**A**) oder DAC-Behandlung (**B**) demethylierten CGs überlappen in den biologischen Replikaten stärker als durch einen zufälligen Demethylierungsmechanismus zu erwarten wäre.

Um jedoch eine Aussage über die Relevanz dieser Überlappung machen zu können, muss zunächst ausgeschlossen werden, dass diese Überlappung aufgrund der hohen Anzahl an demethylierten CGs zufällig entstehen konnte. Aus diesem Grund wurde die Anzahl der in den biologischen Replikaten demethylierten CGs bestimmt und anschließend auf Grundlage dieser Daten die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der dasselbe CG in allen vier Replikaten demethyliert wird. Dieser Berechnung nach wäre für DAC eine allen Replikaten gemeinsame Demethylierung von drei CGs und für AZA eine gemeinsame Demethylierung von einem CG zu erwarten. Interessanterweise wurden in allen vier AZA-behandelten Replikaten 212 CGs demethyliert und in allen DAC-behandelten Replikaten 203 identische CGs. Die Unterschiede zwischen dem erwarteten und dem beobachteten Überlappung waren hoch signifikant (Binomial-Test, $p < 2 \times 10^{-16}$ für AZA und DAC). Diese unerwartet hohe Übereinstimmung im Demethylierungsmuster der Replikate lässt darauf schließen, dass die Demethylierung durch AZA und DAC nicht nach einem zufälligen Muster geschieht sondern spezifisch ist.

2.1.7.1 Validierung der Infinium Array-Daten mittels 454-Bisulfit-Sequenzierung

Der Scatterplot in Abbildung 19A zeigt die hohe Korrelation der Methylierung der einzelnen CGs in den unbehandelten Kontrollen. Diese hohe technische Reproduzierbarkeit der AVB-Werte validiert bereits grundsätzlich die durch den Array produzierten Daten. Zusätzlich bildet die hohe biologische Reproduzierbarkeit der Replikate die Grundlage für eine hochspezifische und verlässliche Analyse der Azanukleosid-induzierten Demethylierungsmuster. Für folgende Analysen wurden die jeweiligen biologischen Replikate gruppiert (siehe Material und Methoden).

Der Methylierungsstatus von fünf CGs wurde in unbehandelten Kontrollen und AZA- bzw. DAC-behandelten Zellen mit der „454 Deep Bisulfite Sequencing“ Technologie validiert (Abbildung 19B) [196]. Dabei zeigte sich eine hohe Übereinstimmung zwischen Infinium-Daten und Sequenzierungsergebnissen. In Abbildung 19C ist der Methylierungszustand von acht weiteren CGs des FGF12-Amplikons dargestellt. Neben der deutlichen Demethylierung durch AZA und DAC ist eine regionale Korrelation des Methylierungszustandes zu erkennen. Diese Annahme bildet die Grundlage für das Design des Infinium Arrays, denn sie erlaubt durch die Abfrage von nur wenigen CGs auch eine Einschätzung der Methylierung angrenzender Bereiche [195].

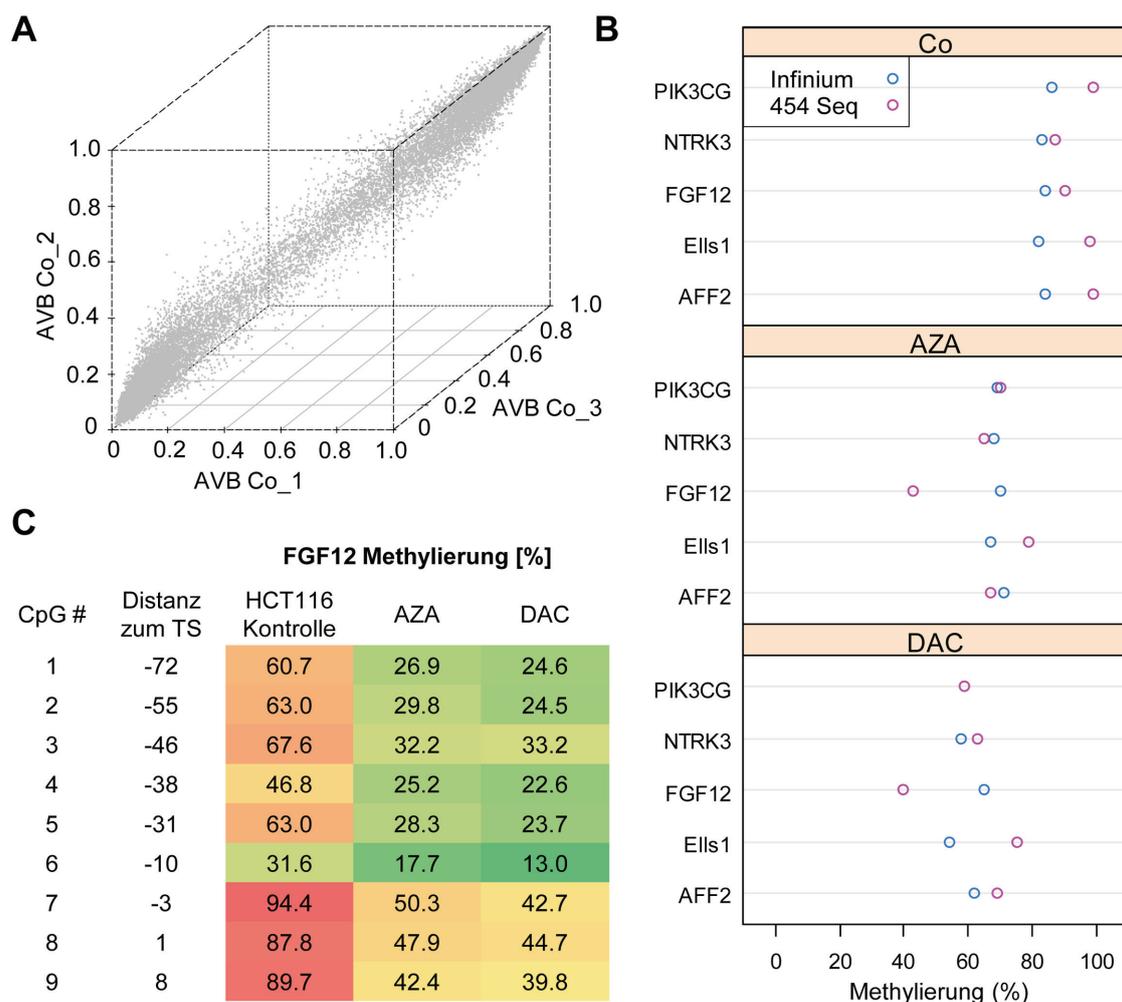


Abbildung 19 Validierung des Infinium-Arrays. **A.** Die hohe Übereinstimmung zwischen den Methylierungsmessungen in drei biologischen Replikaten von unbehandelten HCT116-Zellen im Scatterplot spiegelt die hohe Qualität des Arrays wieder. **B.** Der Infinium-Array wurde anhand von 454-Bisulfit-Sequenzierung ausgewählter Gene validiert. **C.** Die 454-Bisulfit-Sequenzierung des im Array abgefragten CG-Dinukleotids sowie acht weiterer CGs zeigt eine regionale Korrelation der Methylierung von CG-Dinukleotiden.

Als weiterer Validierungsschritt wurden die Infinium-Methylierungsdaten aus unbehandelten HCT116-Zellen mit bereits publizierten Methylierungsdaten von Tumorsuppressorgenen in derselben Zelllinie verglichen [181]. In dieser Studie wurde der Methylierungszustand eines einzelnen CpG-Insel-assoziierten CGs mit Hilfe einer MSP (methylierungsspezifische PCR) bestimmt. Als Ergebnis wird mit dieser Methode allerdings lediglich ein 100 % methylierter bzw. unmethylierter Zustand für den jeweiligen Genpromotor angezeigt. Abbildung 20 zeigt die Methylierung derjenigen Gene an, die auch auf dem Infinium-Array abgefragt wurden und bestätigt den Methylierungszustand von 28 von insgesamt 31 publizierten Genen. Zusätzlich ist die Methylierung derselben

Gene in den AZA-/DAC-behandelten Proben sowie in den untersuchten Knockout-Zelllinien angegeben.

SYMBOL	Methylierung [%]						
	Paz et al. MSP	HCT116 Infinium	AZA Infinium	DAC Infinium	1KO Infinium	3bKO Infinium	DKO Infinium
CXX1	0	30	22	23	21	20	13
RASSF1	0	19	16	15	6	19	6
FHIT	0	14	12	12	14	14	15
HTLF	0	7	4	4	5	4	5
TIMP2	0	4	2	2	1	2	6
SFN	0	4	2	2	3	2	3
PYCARD	100	96	87	87	90	94	8
SEZ6L	100	94	85	81	90	92	11
RUNX3	100	93	83	81	88	94	4
PGR	100	92	85	80	77	89	20
FOLH1	100	90	80	77	74	89	17
SOCS1	100	90	85	85	85	92	15
TP73	100	87	79	75	68	78	50
MGMT	100	87	75	76	63	78	4
CCND2	100	86	81	81	76	85	6
TWIST1	100	86	80	78	60	82	10
TNFRSF10D	100	81	75	72	78	84	7
RBP1	100	80	73	70	79	83	14
CDH13	100	77	71	68	69	76	46
STK11	100	74	62	62	32	66	2
AR	100	74	66	65	51	59	13
SFRP1	100	73	67	66	71	78	44
TNFRSF10A	100	66	61	60	39	66	35
LPHN2	100	64	58	55	57	63	16
HIC1	100	58	45	45	27	35	7
SCGB3A1	100	44	42	41	28	39	6
RARB	100	31	31	28	20	24	3
CHFR	100	26	23	21	23	25	25
ESR1	100	18	11	11	6	9	19
SYK	100	7	3	3	5	5	10
CASP8	100	6	4	4	4	6	6

Abbildung 20 Infinium-Methylierungsdaten stimmen mit publizierten Daten zur Promotormethylierung von Tumorsuppressorgenen überein. Dargestellt sind die mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP) ermittelten Methylierungswerte für verschiedene Tumorsuppressorgene von Paz et al. (2003) sowie im Vergleich dazu die korrespondierenden Mittelwerte CGI-assoziiertes CGs aus der Infinium-Analyse [181].

Zusammenfassend zeigen die Validierungsergebnisse, dass der Infinium-Array das Methylierungsmuster der HCT116-Zellen akkurat und reproduzierbar wiedergibt.

2.1.7.2 Die Stärke der CG-Methylierung nimmt mit zunehmender Entfernung vom Transkriptionsstart ab

Bei der Validierung der Infinium-Daten wurde eine Abnahme der CG-Methylierung mit zunehmender Distanz zum Transkriptionsstart beobachtet (Abbildung 19C). Eine ähnliche Beobachtung wurde bereits in einer kürzlich erschienenen Studie an fetalen Lungenfibroblasten gemacht [197]. Um festzustellen, ob dies ein generelles Phänomen in dem von uns verwendeten HCT116-Modellsystem ist, wurde die CG-Methylierung aller auf dem Array abgefragten CGs in Abhängigkeit von der Entfernung zum Transkriptionsstart analysiert. Abbildung 21A zeigt, dass die Mehrheit der CGs in einem Bereich von 0 bis 100 Basenpaaren vor dem Transkriptionsstart lokalisiert sind. Die Mediane der Boxplots in Abbildung 21B zeigen deutlich, dass die CG-Methylierung mit zunehmendem Abstand zum Transkriptionsstart abnimmt und bestätigt somit die von Lister et al. (2009) publizierten Ergebnisse in der HCT116-Zelllinie.

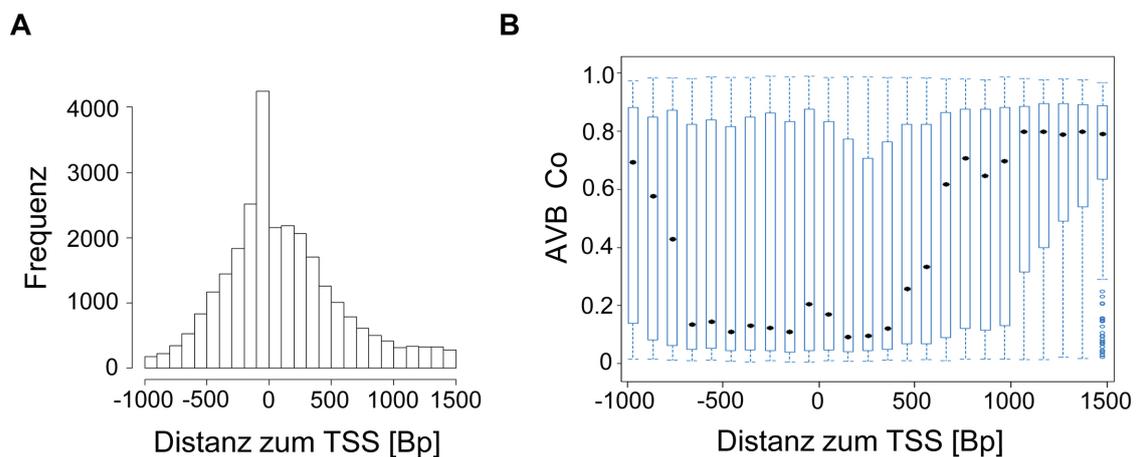


Abbildung 21 Die CG-Methylierung hängt von der Entfernung zum Transkriptionsstart ab. **A.** Verteilung der analysierten CGs in Abhängigkeit von ihrer Entfernung vom Transkriptionsstart (TSS). **B.** Der Boxplot zeigt den Methylierungsstatus der CGs in Abhängigkeit zum Transkriptionsstart. Schwarze Punkte markieren den Median, die Boxen stellen den Quartilsabstand und Whiskers die 2,5 %- und 97,5 %-Quantile dar. Bp, Basenpaare, Co, unbehandelte HCT116-Zellen.

2.1.7.3 DAC demethyliert genassoziierte Promotoren effizienter als AZA

Zur detaillierten Analyse der Azanukleosid-induzierten Demethylierungsmuster wurden HCT116-Zellen mit der bereits etablierten optimalen Wirkstoffkonzentration und Behandlungsdauer zur maximal effektiven Demethylierung behandelt und die DNA mit dem Infinium-Array analysiert (Abbildung 22). Abbildung 22A zeigt die Dichteverteilung

der gruppierten Daten Azanukleosid-behandelter Zellen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Es konnte in allen Proben die bereits erwähnte bimodale Verteilung der AVB-Werte beobachtet werden, wobei sich die Azanukleosid-induzierte Demethylierung graphisch in der Linksverschiebung des stark methylierten Peaks sowie in der Zunahme der Dichte des unmethylierten Peaks widerspiegelt. Trotz der ähnlichen Demethylierungseffizienz beider Wirkstoffe, die auch im Boxplot (Abbildung 22B) deutlich wird, bestätigte ein Wilcoxon-Rangsummentest einen signifikanten Unterschied zwischen den AVB-Werten AZA- und DAC-behandelter Zellen ($p < 2 \times 10^{-16}$). Die Scatterplots in Abbildung 22C und D veranschaulichen, dass DAC, wie bereits in vorangegangenen Assays beobachtet, effizienter demethylierte als AZA: DAC demethylierte 11 % (1487 von 13942) der methylierten CGs, während AZA lediglich 6 % (854 von 13942) demethylierte.

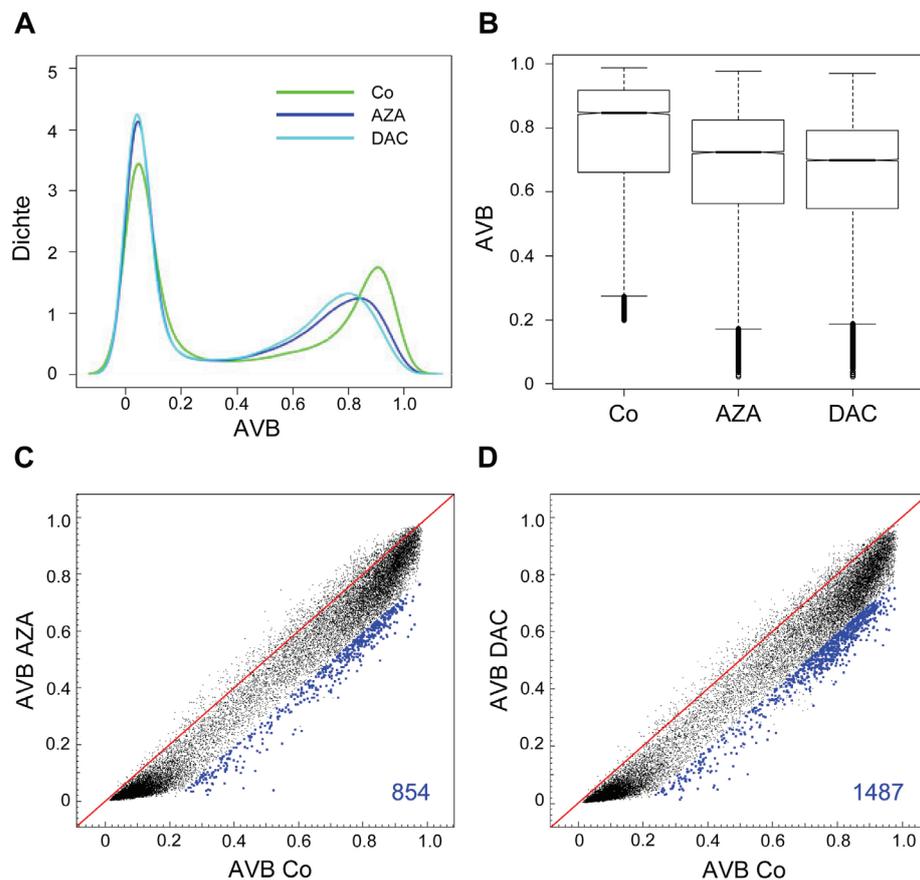


Abbildung 22 Array-basierte Methylierungsanalyse von unbehandelten HCT116-Zellen (Co) und HCT116-Zellen, die für 24 h mit 1 μ M AZA oder DAC behandelt wurden. Biologische Replikate wurden für diese Analysen gruppiert. **A.** Kernel-Dichteverteilung der Methylierungswerte. **B.** Der Boxplot zeigt die Verteilung methylierter CGs in HCT116-Kontrollzellen sowie nach Wirkstoffbehandlung. Die horizontale Linie markiert den Median, die Boxen stellen den Quartilsabstand und Whiskers die 2,5 %- und 97,5 %-Quantile dar. **C, D.** Methylierungsveränderungen in HCT116-Zellen nach Behandlung mit AZA (**C**) oder DAC (**D**). Blaue Punkte und Zahlen stellen demethylierte CG-Dinukleotide ($\Delta \text{Beta} \leq -0.2$) dar.

2.1.7.4 AZA- und DAC-behandelte Zellen zeigen überlappende Demethylierungsmuster

Interessanterweise wurde bei der Analyse der gruppierten Replikate AZA- und DAC-behandelter Zellen eine hohe Übereinstimmung zwischen demethylierten CG-Dinukleotiden festgestellt. Dies wird einerseits in der hohen Korrelation der AVB-Werte beider Behandlungen mit einem Spearmanschen Rangkorrelationskoeffizienten ρ von 0,99 deutlich (Abbildung 23A), andererseits durch das Venn-Diagramm in Abbildung 23B, das die Überlappung der demethylierten CG-Dinukleotide darstellt. Das Diagramm zeigt, dass 648 von 852 (76 %) durch AZA demethylierte CGs auch von DAC demethyliert wurden. Unter der Berücksichtigung, dass beide Wirkstoffe nur einen kleinen Anteil der potenziell zu demethylierenden CGs demethylierten, ist diese große Übereinstimmung höchst aussagekräftig. Dabei ist die beobachtete Anzahl von 648 überlappenden CGs signifikant höher als die Anzahl an CGs, die durch zufällige Demethylierung erwartet werden würde (90 CGs, Binomial-Test, $p < 2 \times 10^{-16}$). Zusammenfassend zeigen die Daten, dass die Azanukleosid-induzierte DNA-Demethylierung hochgradig spezifisch ist.

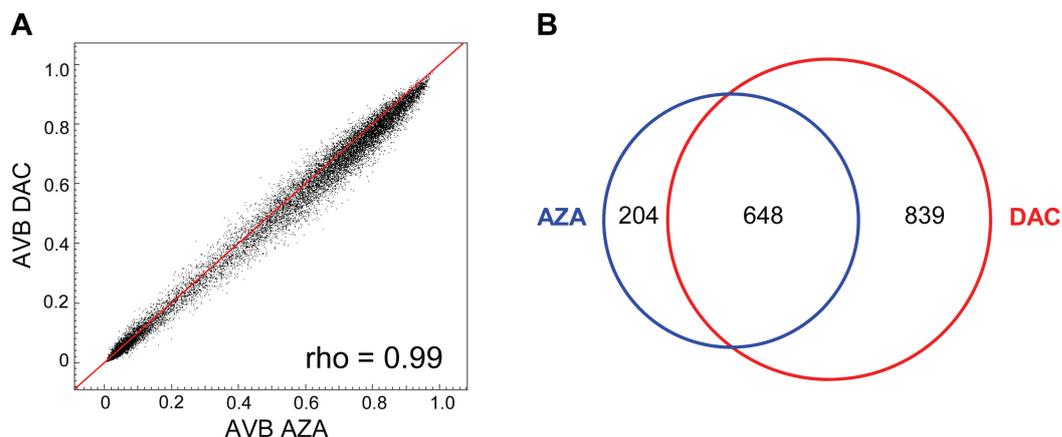


Abbildung 23 AZA- und DAC-induzierte Demethylierungsmuster zeigen eine hohe Ähnlichkeit. **A.** Korrelation zwischen AVB-Werten Wirkstoff-behandelter HCT116-Zellen; ρ , Spearmanscher Rangkorrelationskoeffizient. **B.** Die Venn-Diagramme zeigen überlappende demethylierte CGs in AZA- und DAC-behandelten HCT116-Zellen.

2.1.7.5 DNMT-Knockout-Zelllinien zeigen große Unterschiede im Methylierungsmuster

Um zu untersuchen, inwieweit sich die Wirkstoff-induzierte Inaktivierung der DNMT-Enzyme von der genetischen Inaktivierung spezifischer Methyltransferasen unterscheidet, analysierten wir die Methylierungsmuster der isogenischen HCT116 DNMT-Knockout-Zelllinien 1KO (DNMT1-Knockout), 3BKO (DNMT3B-Knockout) und DKO (DNMT1- und DNMT3B-Knockout). Die Scatterplots in Abbildung 24 zeigen deutlich, dass die größte

Anzahl an CG-Dinukleotiden (11941, 85 % aller methylierten CGs) in DKO-Zellen demethyliert wurde. DNMT1-Knockout-Zellen zeigten im Vergleich eine weniger effiziente Demethylierung von 5276 CGs (36%) und DNMT3B-Knockout-Zellen wiesen mit 1448 CGs (12%) die geringste Demethylierungseffizienz auf. Interessanterweise konnte in 3BKO-Zellen auch eine unerwartete Hypermethylierung von 436 CGs beobachtet werden.

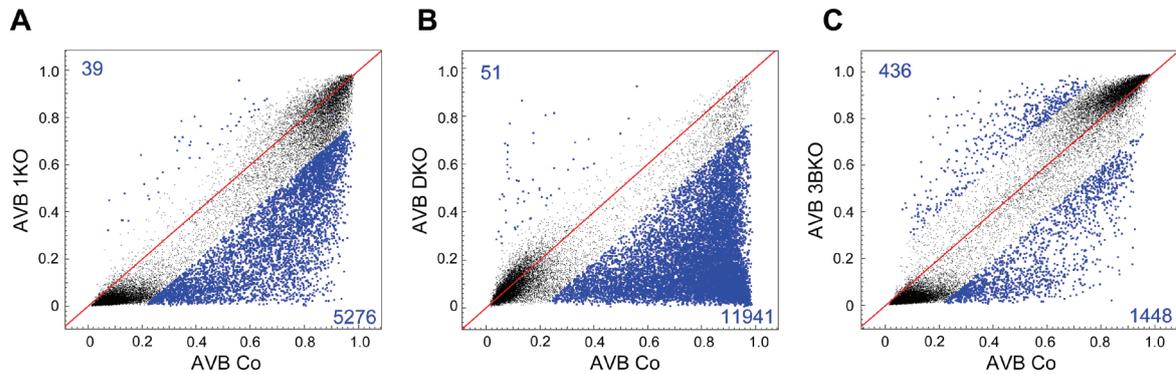


Abbildung 24 Array-basierte genomweite Methylierungsanalyse von HCT116-Zellen (Co) sowie isogenischen Knockout-Zelllinien mit (A) inaktiviertem DNMT1-Enzym (1KO), (B) inaktiviertem DNMT3B-Enzym (3BKO) oder (C) einer Inaktivierung beider Methyltransferasen (DKO). Biologische Replikate wurden für diese Analysen gruppiert. Blaue Punkte und Zahlen stellen demethylierte oder hypermethylierte CG-Dinukleotide (Δ Beta ≤ -0.2 oder ≥ 0.2) dar.

Wie bereits bei den Wirkstoff-behandelten Zellen beobachtet wurde, zeigten auch die 1KO- und 3BKO-Zellen eine bimodale Dichteverteilung der Methylierungswerte (Abbildung 25A). Die CG-Demethylierung in DKO-Zellen war allerdings so stark, dass der stark methylierte CGs repräsentierende Peak vollkommen verschwand, so dass eine unimodale Dichteverteilung entstand.

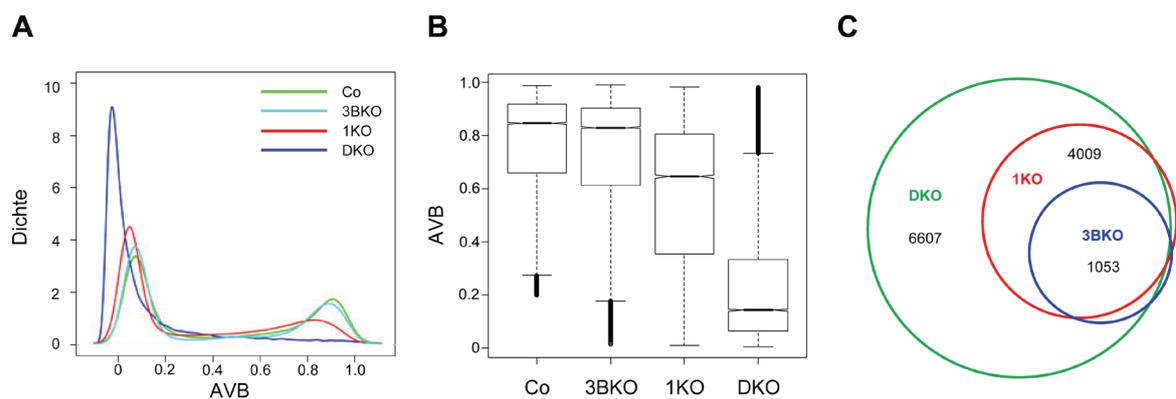


Abbildung 25 Array-basierte genomweite Methylierungsanalyse in HCT116-Zellen (Co) und isogenischen Knockout-Zelllinien. A. Kernel Dichteverteilung der Methylierung für HCT116- und DNMT-Knockout-Zellen. B. Der Boxplot zeigt die Verteilung methylierter CGs in HCT116- und DNMT-Knockout-Zellen. Die horizontale Linie markiert den Median, die Boxen stellen den Quartilsabstand und Whiskers die 2,5 %- und 97,5 %-Quantile dar. C. Das Venn-Diagramm verbildlicht die Überlappung zwischen demethylierten CGs in den DNMT-Knockout-Zelllinien.

Die großen Unterschiede in der Demethylierungseffizienz zwischen den Knockout-Zellen sind ebenfalls deutlich im Boxplot (Abbildung 25B) erkennbar. Alle Unterschiede im Methylierungsgrad zwischen DNMT-Knockout-Zelllinien und zu den Kontrollzellen waren hochsignifikant (Wilcoxon Rangsummentest, $p < 2 \times 10^{-16}$). Interessanterweise waren 1130 (78 %) der in 3BKO-Zellen demethylierten CGs auch in 1KO-Zellen demethyliert (Abbildung 25C). Diese Tatsache ist deshalb interessant, da diese überlappenden CGs offensichtlich die Aktivität beider Enzyme für die Aufrechterhaltung ihres Methylierungsstatus benötigen. Wie erwartet, waren fast alle CGs (96 %), die in einer der Einzel-Knockout-Zellen demethyliert waren, auch in Zellen demethyliert, die weder DNMT1 noch DNMT3B besaßen. Zusätzlich zu den in 1KO- und 3BKO-Zellen demethylierten CGs zeigten die DKO-Zellen jedoch eine große Anzahl an CGs, die ausschließlich in den Doppel-Knockout-Zellen demethyliert wurden. Diese Beobachtung deutet auf einen synergistischen Effekt auf die lokusspezifische Demethylierung beim gemeinsamen Verlust von DNMT1 und DNMT3B hin, was mit einer vorangegangenen Studie in Übereinstimmung steht [76].

2.1.7.6 Azanukleosid-behandelte Zellen unterscheiden sich im Demethylierungsmuster von DNMT-Knockout-Zellen

Zum ersten Vergleich der globalen DNA-Methylierung von Wirkstoff-behandelten Zellen und DNMT-Knockout-Zellen wurde sowohl die genomische Methylierung in den verschiedenen Zellen anhand micellarer kapillarelektrophoretischer Analysemethoden (CE) ermittelt, als auch die mittlere genspezifische Methylierung mit Array-basierten Methoden (Abbildung 26).

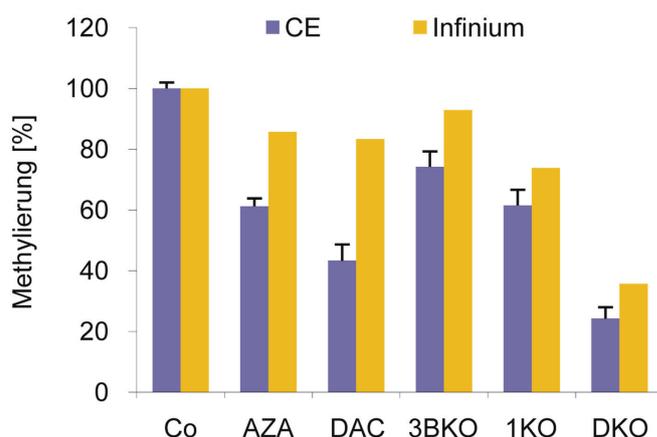


Abbildung 26 Gesamtgenomische und genspezifische Methylierung in unbehandelten HCT116-Zellen (Co), Wirkstoff-behandelten HCT116-Zellen (1 μ M AZA oder DAC für 24 h) sowie DNMT-Knockout-Zelllinien. Die relative mittlere Methylierung des Gesamtgenoms wurde mittels micellarer Kapillarelektrophorese (CE) ermittelt, die relative mittlere genspezifische Methylierung wurde anhand der Daten des Infinium-Arrays berechnet.

Dabei stellte sich heraus, dass die durch die CE-Analyse bestimmte globale DNA-Methylierung der Knockout-Zelllinien sowie der AZA- und DAC-behandelten Zellen im Verhältnis die mittleren Methylierungswerte des Infinium-Arrays widerspiegelt (Abbildung 26). Im Unterschied zur Infinium-Methylierungsanalyse erfasst die CE-Analyse auch die Methylierung von nicht-genassoziierten CGs, wie etwa von repetitiven Elementen, die einen Großteil der methylierten Cytosine im Gesamtgenom enthalten [198]. Interessanterweise war der Grad der Demethylierung der gesamtgenomischen DNA für alle Proben höher als die genspezifische Demethylierung. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass CGs in repetitiven Elementen effizienter demethyliert wurden als genassoziierte CGs, was besonders deutlich in Azanukleosid-behandelten Zellen beobachtet werden konnte.

Die Array-basierte Methylierungsanalyse zeigte, dass mehr als 75 % der CGs in DKO-Zellen weniger als 20 % methyliert waren, während alle anderen Knockout-Zelllinien und auch die Azanukleosid-behandelten Zellen eine höhere Methylierung aufwiesen (Abbildung 27A). Um die Effizienz der Demethylierung detaillierter zu vergleichen, wurde der Delta Beta (DB)-Wert berechnet, indem der AVB der behandelten bzw. der Knockout-Zelllinien vom AVB der unbehandelten Zellen abgezogen wurde (siehe Material und Methoden). DKO-Zellen zeigten mit einem Delta Beta-Median von -0,55 die stärkste Demethylierung (Abbildung 27B); Für 1KO- und 3BKO-Zellen wurden Delta Beta-Mediane von -0,33 bzw. -0.30 berechnet. Für AZA und DAC wurde eine signifikant geringere Demethylierungseffizienz berechnet (Wilcoxon Rangsummentest, $p < 2 \times 10^{-16}$) als für die DNMT-Knockout-Zellen.

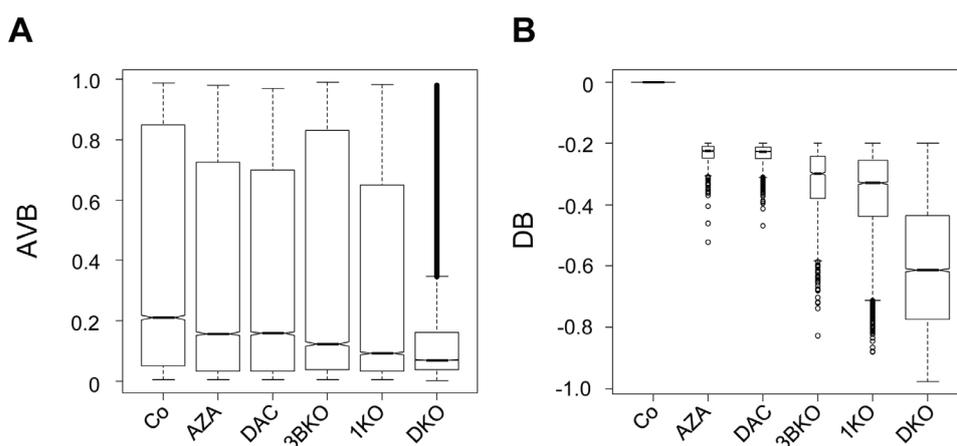


Abbildung 27 Array-basierter Vergleich von Wirkstoff-induzierter Demethylierung und DNMT-Knockout-induzierter Demethylierung. Die Boxplots zeigen die Verteilung der Methylierungswerte (**A**) bzw. die Effizienz der Demethylierung durch Berechnung der Delta Beta (DB)-Werte (**B**) für die verschiedenen Zellen. Dabei ist die Breite jeder Box proportional zu der Anzahl demethylierter CGs. Die horizontale Linie markiert den Median, die Boxen stellen den Quartilsabstand und Whiskers die 2,5 %- und 97,5 %-Quantile dar.

Die Clusteranalyse in Abbildung 28 zeigt die euklidischen Distanzen zwischen den Methylierungsprofilen der einzelnen Proben, und verdeutlicht graphisch die Ähnlichkeit der Azanukleosid-behandelten Zellen untereinander, aber auch die große Distanz des DKO-Methylierungsprofils zu allen anderen Proben, die durch die starke Demethylierung von 85% aller methylierten CGs entstand.

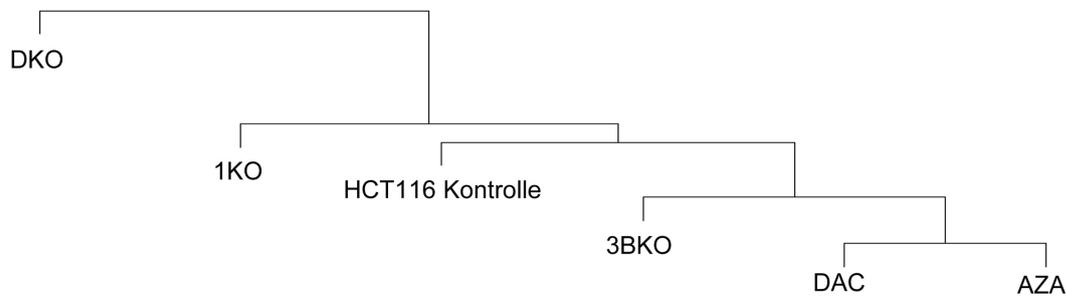


Abbildung 28 Hierarchische Clusteranalyse unbehandelter HCT116-Kontrollzellen, Wirkstoff-behandelter HCT116-Zellen sowie isogenerischer DNMT-Knockout-Zellen. AVB-Werte wurden hierarchisch unter Verwendung euklidischer Distanzen und eines agglomerierenden Algorithmus (Average Linkage) geclustert. Die Topologie wird durch Bootstrap-Werte von 100 % für alle Verzweigungen unterstützt (1000 Iterationen).

Der direkte Vergleich der Methylierungsmuster von Wirkstoff-behandelten Zellen mit DNMT-Knockout-Zellen zeigte, dass 92 % der CGs, die durch AZA demethyliert worden waren und 90 % der DAC-demethylierten CGs ebenfalls in DKO-Zellen demethyliert waren (Abbildung 29A). Dieser Überschneidungsbereich war hingegen zwischen Wirkstoff-behandelten Zellen und 1KO- bzw. 3BKO-Zellen vergleichsweise gering (Abbildung 29B, C).

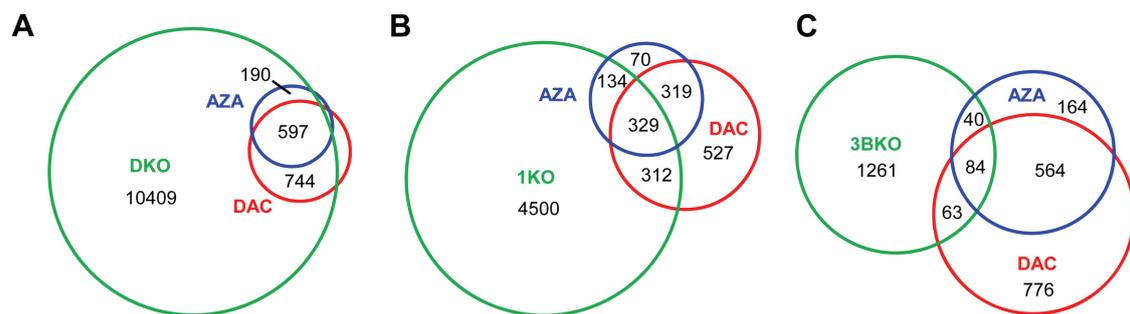


Abbildung 29 Überlappung demethylierter CG-Dinukleotide zwischen Wirkstoff-behandelten Zellen und DNMT-Knockout-Zellen. Venn-Diagramme verbildlichen gemeinsam demethylierte CGs in AZA- bzw. DAC-behandelten HCT116-Zellen und DKO- (A), 1KO- (B) und 3BKO-Zellen (C).

Allerdings muss bei dieser großen Anzahl an demethylierten CGs die Möglichkeit einer zufälligen Überlappung von demethylierten CGs zwischen Azanukleosid-behandelten Zellen und DNMT-Knockout-Zelllinien berücksichtigt werden. Um die Wahrscheinlichkeit

einer zufälligen Überlappung einzuschätzen, wurde für jede Kombination von Wirkstoff-behandelten Zellen und DNMT-Knockout-Zellen die erwartete Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der die demethylierten CGs in beiden Gruppen überlappen. Diese Wahrscheinlichkeit wurde anschließend mit der beobachteten Überlappung verglichen. Dabei stellte sich heraus, dass die Überlappung von Azanukleosid-demethylierten CGs mit CGs, die auch in 3BKO-Zellen demethyliert waren, sich nicht signifikant von einer zufälligen Überlappung aufgrund der hohen Anzahl insgesamt demethylierter CGs unterschied. Der Vergleich mit 1KO- und DKO-Zellen zeigte allerdings, dass die in diesen Zellen demethylierten CGs signifikant stärker mit den durch AZA/DAC-Behandlung demethylierten CGs übereinstimmten, als durch zufällige Demethylierung zu erwarten war. (Binomial-Test, $p = 3,63 \times 10^{-8}$ für den Vergleich von 1KO mit AZA/DAC, $p = 0,0096$ für den Vergleich von DKO mit AZA/DAC). Dabei zeigte die Azanukleosid-induzierte Demethylierung die höchste Ähnlichkeit mit dem Demethylierungsmuster in 1KO-Zellen. Trotz gewisser Ähnlichkeiten in den Methylierungsmustern gibt es dennoch sichtbare Unterschiede zwischen dem durch AZA-/DAC-Behandlung entstandenen Demethylierungsmuster und dem Methylierungsmuster der DNMT-Knockout-Zelllinien.

2.1.7.7 Die Demethylierungseffizienz ist abhängig vom Methylierungsgrad der CG-Dinukleotide

Um den Mechanismus der Demethylierung näher zu charakterisieren, überprüften wir, ob der Methylierungsgrad der CG-Dinukleotide einen Einfluss auf die Effizienz der Demethylierung hatte. Dazu wurden die CGs nach ihrem Methylierungsgrad in zehn Intervalle gruppiert und anschließend analysiert, in welchem Ausmaß die GCs in dem jeweiligen Intervall demethyliert wurden (Abbildung 30). Dabei nimmt der für jedes Intervall maximal mögliche Delta Beta-Wert mit den dem Intervall zugeordneten Methylierungswerten zu, d.h., im Intervall 1 (AVB 0-0,1) wird eine 100-prozentige Demethylierung durch einen Delta Beta-Wert zwischen 0 und -0,1 angezeigt, im Intervall 10 (AVB 0,9-1) durch einen Delta Beta-Wert zwischen -0,9 und -1.

Die Ergebnisse zeigten die stärkste durch Azanukleoside induzierte Demethylierung in den Methylierungsintervallen von 10-50 % (Abbildung 30A). DNMT-Knockout-Zellen zeigten ein weniger einheitliches Muster (Abbildung 30B): während die Demethylierung in 3BKO-Zellen im Bereich von 10-30 % CG-Methylierung am effektivsten war, zeigten 1KO-Zellen die effizienteste Demethylierung im Methylierungsbereich von 10-50%. In DKO-Zellen wurden alle CGs unabhängig von ihrem ursprünglichen Methylierungsgrad gleich gut demethyliert, wie aus der gleichmäßig zunehmenden Distanz der Delta Beta-Mediane zur Null-Linie ersichtlich ist.

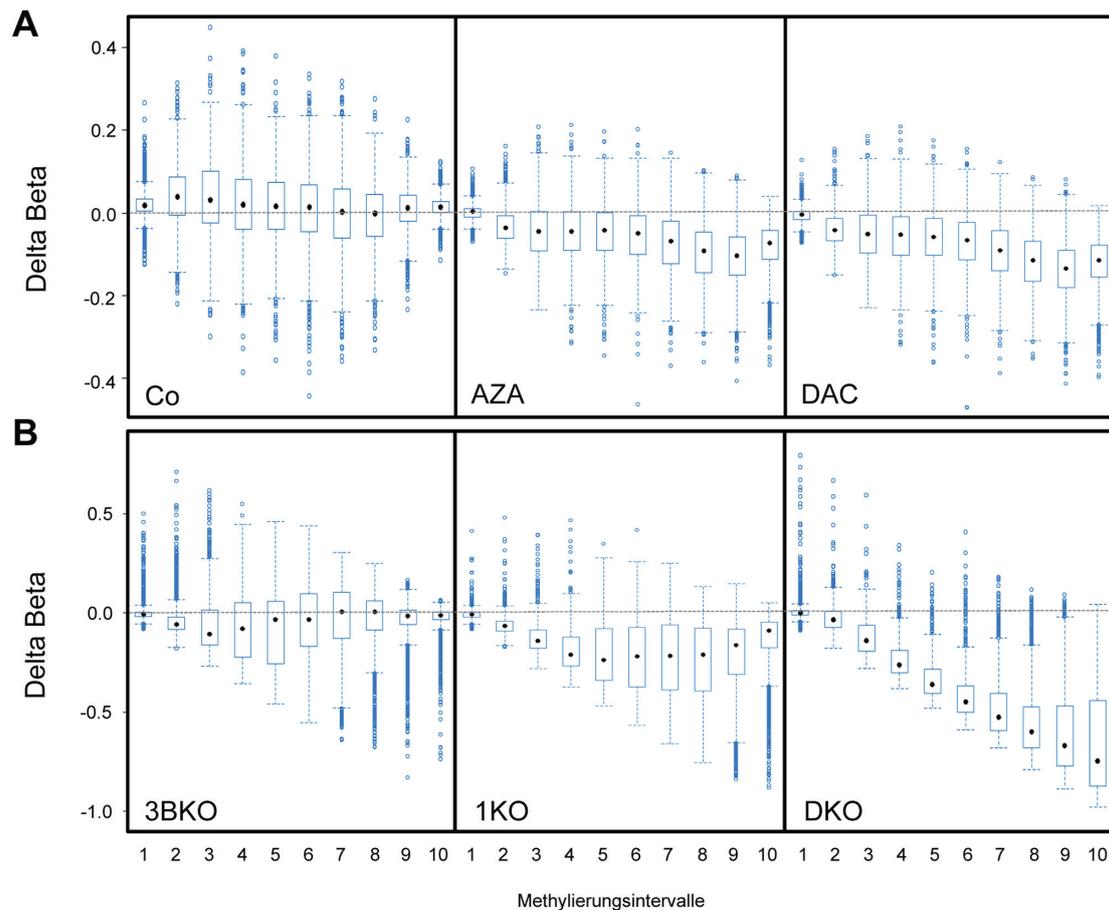


Abbildung 30 Die Demethylierungseffizienz hängt vom Methylierungsgrad der CG-Dinukleotide ab. **A.** Die Boxplots zeigen die Demethylierungseffizienz in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus in unbehandelten HCT116-Zellen (Co) und Wirkstoff-behandelten Zellen sowie **(B)** DNMT-Knockout-Zelllinien. Die relativen Methylierungswerte (0-100 % Methylierung) wurden in Intervalle von jeweils 10 % unterteilt. Schwarze Punkte markieren den Median, die Boxen stellen den Quartilsabstand und Whiskers die 2,5 %- und 97,5 %-Quantile dar.

2.1.7.8 CG-Dinukleotide in CpG-Inseln sind resistenter gegen Demethylierung als CG-Dinukleotide außerhalb von CpG-Inseln

Um die Abhängigkeit der Demethylierungseffizienz von der spezifischen Lokalisation der CGs näher zu untersuchen, wurde zwischen CpG-Insel (CGI)-assoziierten und nicht-CGI-assoziierten CGs unterschieden. In der Dichteverteilung (Abbildung 31, siehe auch Anhang 2 und 3) wird deutlich, dass nicht-CGI-assoziierte CGs in HCT116-Kontrollzellen vergleichsweise stark methyliert waren, während CGI-assoziierte CGs einen unmethylierten und einen stark methylierten Peak bildeten. Interessanterweise zeigte sich bei der Analyse der Wirkstoff-behandelten Zellen, dass AZA und DAC einen höheren Anteil von CGs demethylierten, die außerhalb von CpG-Inseln lagen. Dabei demethylierte

AZA 1,2 % (219 von 20006) CG-Dinukleotide in CGIs, aber 8,4 % (633 von 7572) CGs außerhalb von CGIs; DAC demethylierte 2,4 % (474 von 20006) der CG-Dinukleotide in CGIs, aber 13,4 % (1013 von 7572) CGs außerhalb von CGIs (Abbildung 31A, Boxplots im Anhang 2 und 3).

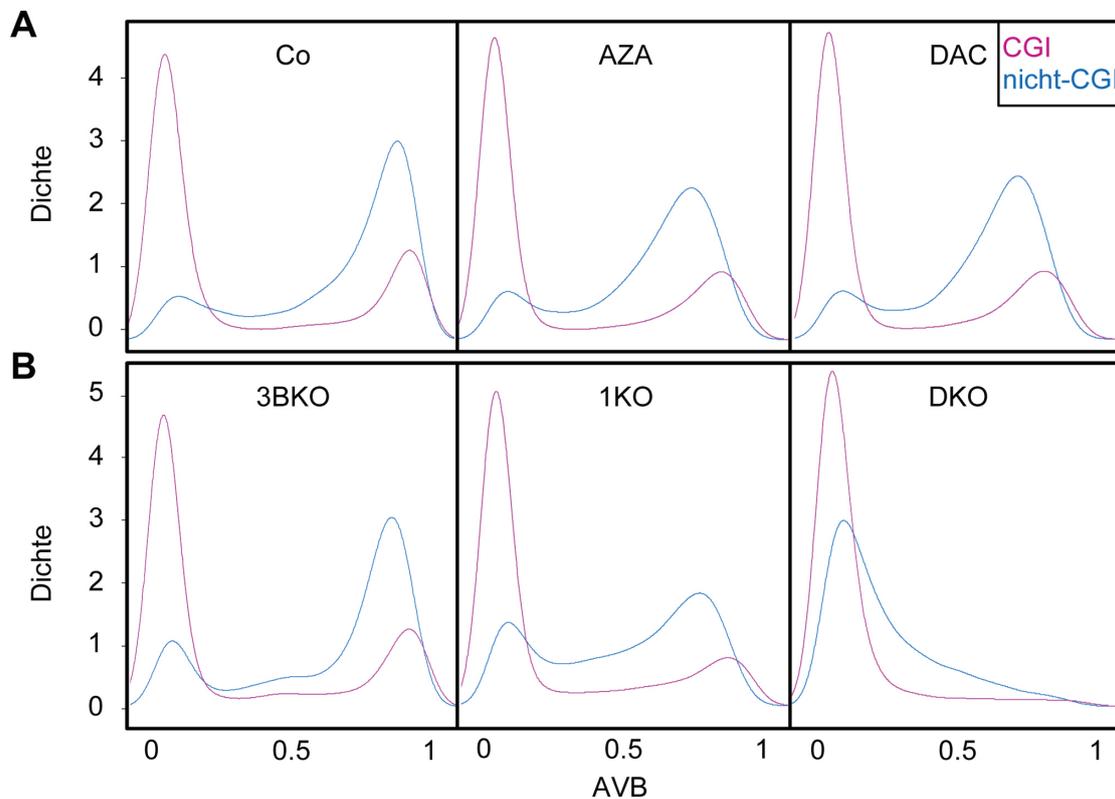


Abbildung 31 CGs außerhalb von CpG-Inseln werden leichter demethyliert. Kernel Dichteverteilung der Methylierungswerte für (A) unbehandelte HCT116-Zellen (Co) und Wirkstoff-behandelte Zellen sowie (B) DNMT-Knockout-Zelllinien. CGI, mit CpG-Insel assoziierte CGs; nicht-CGI, nicht mit CpG-Inseln assoziierte CGs.

Daraus lässt sich schließen, dass AZA und DAC vorzugsweise CGs außerhalb von CGIs demethylieren (Exakter Test nach Fisher, $p < 2 \times 10^{-16}$). Dass diese CGs nicht aufgrund ihrer Assoziation mit CGIs sondern aufgrund ihrer vergleichsweise stärkeren Methylierung präferenziell demethyliert wurden, konnte durch die vorangegangene Analyse ausgeschlossen werden (vgl. Abbildung 30A). Außerdem konnte gezeigt werden, dass DAC einen höheren Anteil an CGI-assoziierten CGs demethylierte als AZA (Chi-Quadrat Test: $X^2 = 94.7$, FG = 1, $p < 2 \times 10^{-16}$). Im Gegensatz zu Azanukleosid-behandelten Zellen zeigte sich in DKO-Zellen eine fast vollständige Demethylierung von CGs innerhalb von CGIs (Abbildung 31B, Anhang 2 und 3). Dieser Effekt wurde auch von Paz et al. (2003) in einer Analyse ausgewählter Kandidatengene beobachtet [181]. Ein Trend zur Demethylierung von CGI-assoziierten CGs war auch in 1KO-Zellen zu beobachten,

wohingegen CGIs in 3BKO-Zellen kaum demethyliert wurden. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Unterschiede zwischen Wirkstoff-induzierter Demethylierung und Demethylierungsmustern, die durch das Fehlen spezifischer Methyltransferasen hervorgerufen werden. Andererseits lassen die Daten auch funktionelle Unterschiede zwischen den verschiedenen Methyltransferasen erkennen.

2.1.7.9 PRC2-Komponenten sind an hypermethylierten Promotoren angereichert

Im Folgenden fragten wir uns, ob neben der direkten DNA-Sequenzumgebung des zu demethylierenden CGs auch Histonmodifikationen einen Einfluss auf die Demethylierungseffizienz haben könnten. Da wir bereits CpG-Insel-abhängige Unterschiede in der Demethylierungseffizienz festgestellt hatten, wurde zunächst untersucht, ob die PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2)-Komponenten SUZ12, EED und die von EZH2 vermittelte Trimethylierung von H3K27 unterschiedlich stark mit CGI- bzw. nicht-CGI-assoziierten Genen assoziiert waren [199]. Die Daten zur genomweiten Assoziation der Proteine EED und SUZ12 sowie die Anwesenheit der PRC2 vermittelten H3K27-Trimethylierung wurden in embryonalen Stammzellen anhand von ChIP-Experimenten ermittelt [200]. Die Beobachtung, dass sich der Chromatinstatus zwischen embryonalen Zellen und Krebszellen kaum unterscheidet [199, 201] rechtfertigen eine Übertragung der Daten auf die in dieser Studie benutzte Zelllinie. Bei der Analyse stellte sich heraus, dass die PRC2-Komponenten EED und SUZ12 sowie die Methylierung von H3K27 vorzugsweise mit Genen, die eine CpG-Insel aufweisen, assoziiert waren (Abbildung 32A). In Übereinstimmung mit publizierten Daten [199] gab es innerhalb dieser Gengruppe eine weitere deutliche Präferenz für Gene mit hypermethylierter CpG-Insel (Abbildung 32B).

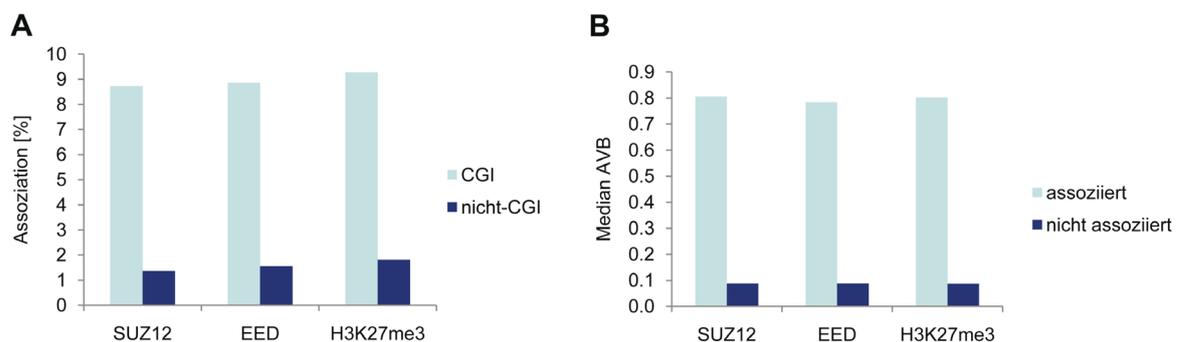


Abbildung 32 PRC2-Komponenten sind an hypermethylierten, CpG-Insel (CGI)-assoziierten Genpromotoren angereichert. **A.** Relative Assoziation von Genen mit Komponenten des PRC2-Komplexes in Abhängigkeit von der Anwesenheit einer CpG-Insel. **B.** Mittlerer Methylierungsstatus von CpG-Insel-assoziierten Genpromotoren in Abhängigkeit von der Assoziation mit Komponenten des PRC2-Komplexes.

Diese in unbehandelten HCT116-Zellen hypermethylierten und CGI-assoziierten Gene wurden anschließend daraufhin überprüft, ob die Assoziation mit einer repressiven Histonmodifikation einen Einfluss auf die Demethylierungseffizienz der genassoziierten CGs hatte. Für diese Analyse wurden die auf dem Infinium-Array abgefragten CGI-assoziierten Gene in zwei Gruppen unterteilt: 1.) PRC2-assoziierte Gene, die mit den Komponenten SUZ12, EED sowie H3K27me3 assoziiert waren, und 2.) nicht PRC2-assoziierte Gene, die diese Kriterien nicht erfüllten.

Zunächst wurde der Median der Methylierung in beiden Gruppen für unbehandelte HCT116-Zellen, Wirkstoff-behandelte Zellen und DNMT-Knockout-Zellen analysiert. Abbildung 33A zeigt, dass PRC2-assoziierte Gene in allen Zellen bis auf die DKO-Zelllinie stark methyliert waren. Weitere Analysen zeigten interessanterweise, dass die Gene, die mit PRC2-Komponenten assoziiert waren, in Azanukleosid-behandelten Zellen sowie 1KO- und 3BKO-Zellen weniger effizient demethyliert wurden als nicht-PRC2-assoziierte Gene (Abbildung 33B). Dieses Muster unterschied sich allerdings deutlich für DKO-Zellen: Abbildung 33B zeigt, dass eine Assoziation mit PRC2-Komponenten eine Demethylierung dieser Gene in DKO-Zellen sogar signifikant begünstigte.

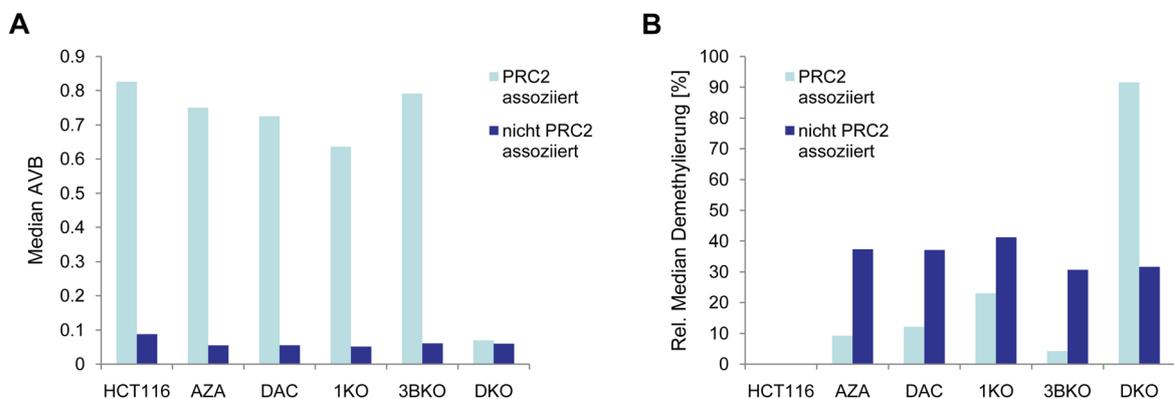


Abbildung 33 Mit PRC2-Komponenten assoziierte Gene werden weniger effizient demethyliert. **A.** Median AVB von Genen mit CpG-Insel in unbehandelten HCT116-Zellen, Wirkstoff-behandelten Zellen und DNMT-Knockout-Zellen in Abhängigkeit von der Assoziation mit den PRC2-Komponenten EED, SUZ12 sowie H3K27me3. **B.** Relative Demethylierung derselben Gene in den untersuchten Zelllinien.

2.1.7.10 Krebs-assoziierte Gene werden am effizientesten durch kombinierten Knockout von DNMT1 und DNMT3B demethyliert

Um die Wirksamkeit von Azanukleosiden bezüglich der Demethylierung von krebsassoziierten Genen einzuschätzen, wurde die Demethylierungseffizienz von AZA und DAC für ausgewählte Genpromotoren mit Methylierungsmustern in DNMT-Knockout-Zelllinien verglichen. Dazu wurden Gene des „GoldenGate Methylation Cancer Panel I“ verwendet, das insgesamt 807 von Illumina ausgewählte Gene umfasst, die mit Krebs assoziiert sind [202]. Von diesen 807 Genen waren 784 Gene (repräsentiert durch 2125 CGs) auf der Infinium-Plattform vorhanden. Die Analyse der Methylierungsdaten zeigte, dass krebsassoziierte Gene in unbehandelten HCT116-Zellen stärker methyliert waren als nicht-Krebs-assoziierte Gene (Abbildung 34). Interessanterweise wurde die Methylierung Krebs-assoziiierter CGs im Vergleich besonders stark in DNMT1-Knockout-Zellen und sogar noch effizienter in DKO-Zellen reduziert.

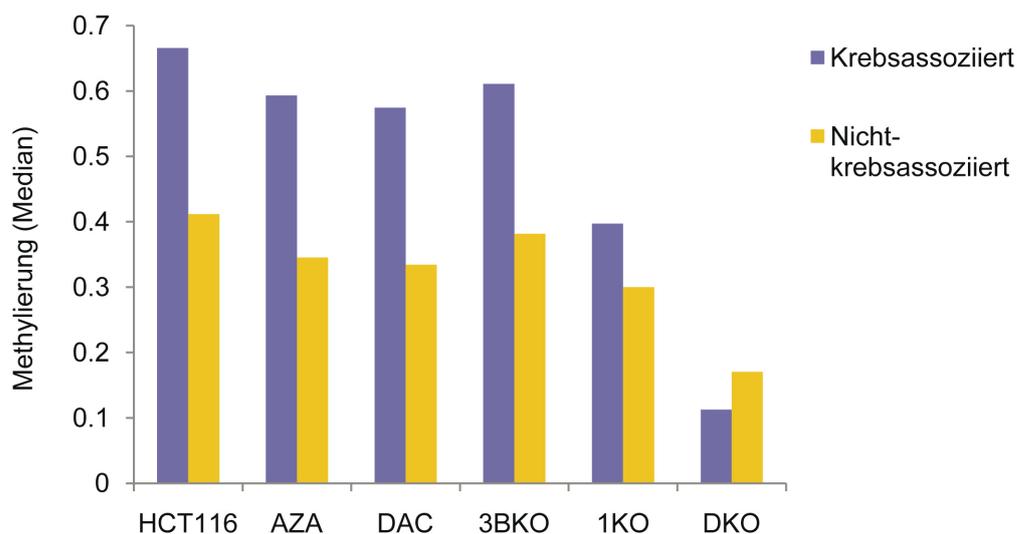


Abbildung 34 Krebsassoziierte Gene werden in DKO-Zellen präferenziell demethyliert. Median der Methylierung von krebsassoziierten und nicht-krebsassoziierten Genen in unbehandelten HCT116-Zellen, Wirkstoff-behandelten Zellen und DNMT-Knockout-Zellen. Daten wurden mittels Infinium-Array generiert. Krebsassoziierte Gene wurden anhand des GoldenGate Cancer Panel I (Illumina) identifiziert.

Die Heat-Map in Abbildung 35A zeigt eine detaillierte Ansicht der 2125 auf dem Infinium-Array abgefragten krebsassoziierten CGs. 906 dieser CGs waren in unbehandelten HCT116-Zellen hypermethyliert ($AVB \geq 0,8$). Interessanterweise demethylierten AZA und DAC diese hypermethylierten krebsassoziierten CGs mit ähnlicher Effizienz. Im Vergleich zu den Azanukleosid-behandelten Zellen zeigten jedoch DKO-Zellen eine erheblich höhere Demethylierungseffizienz für diese CGs. Die Demethylierungseffizienz für Krebs-

assoziierten Gene war in DNMT1- bzw. DNMT3B-Knockout-Zellen hingegen eher gering; der Knockout von DNMT3B führte sogar zu einer geringeren Demethylierung der Zielgene als eine Behandlung mit AZA oder DAC. Ähnliche Ergebnisse wurden für 25 Tumorsuppressorgene beobachtet, die in HCT116-Zellen hypermethyliert sind (Abbildung 35B) [181, 203]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Entwicklung spezifischer DNMT-Inhibitoren die epigenetische Krebstherapie verbessern kann.

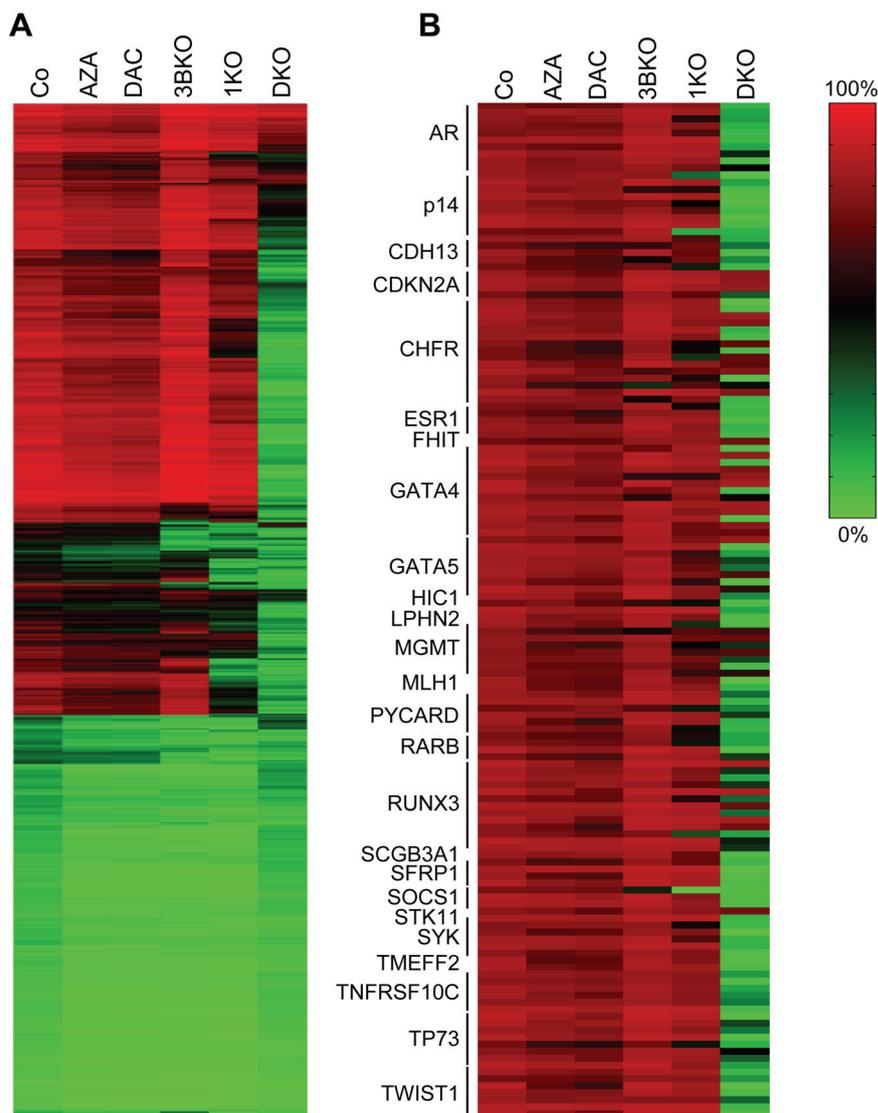


Abbildung 35 Krebsassoziierte Tumorsuppressorgene werden in DKO-Zellen präferenziell demethyliert. Heat-Map der CG-Methylierung in (A) krebsassoziierten Genen (GoldenGate Cancer Panel I, Illumina) und (B) Tumorsuppressorgenen in Wirkstoff-behandelten HCT116-Zellen und DNMT-Knockout-Zellen.

2.2 Identifizierung zellulärer Signalwege, die von Azacytidin moduliert werden

Zur Optimierung der Wirkungsweise von Azanukleosiden in der epigenetischen Therapie ist die Maximierung der Demethylierungseffizienz bei gleichzeitiger Minimierung der zytotoxischen Nebenwirkungen für den Patienten erforderlich. Die Grundlage für diese Maßnahmen bildet das genaue Verständnis der Wirkungsweise dieser Wirkstoffe. Dazu gehört neben der Charakterisierung und Optimierung der DNA-Demethylierung auch die Identifizierung von Signalwegen, die an der metabolischen Umwandlung der Wirkstoffe in der Zelle beteiligt sind und die DNA-Demethylierung bzw. Toxizität der Azanukleoside vermitteln. In dieser Dissertation wurden anhand eines genomweiten RNAi-Screenings sowie der Analyse von AZA-modulierten Signalwegen auf RNA-Ebene zytotoxizitätsvermittelnde Faktoren identifiziert und außerdem die Rolle von GADD45A in der AZA-vermittelten DNA-Demethylierung analysiert.

2.2.1 Identifizierung Zytotoxizitäts-vermittelnder Faktoren durch genomweites RNAi-Screening

Um zelluläre Faktoren zu identifizieren, die die zytotoxischen Eigenschaften von AZA vermitteln, wurde ein genomweites Hochdurchsatz-RNAi-Screening in Zusammenarbeit mit Dr. Dominique Kranz (Abteilung Prof. Boutros, DKFZ) durchgeführt. Für diesen Assay wurde die HEK293-Zelllinie verwendet, die aufgrund ihrer einfachen Kultivierung und hohen Transfizierbarkeit Vorteile gegenüber HCT116-Zellen aufweist. Die adhärent wachsende HEK293-Zelllinie wurde durch die Transformation humaner embryonaler Nierenzellen mit Adenoviren-DNA bereits im Jahr 1977 generiert [204] und eignet sich aufgrund ihrer Sensibilität gegenüber AZA als Modellsystem für die Identifizierung zytotoxizitätsvermittelnder Faktoren. Ziel des Screenings war es, durch den Knockdown von Zielgenen verschiedene Signalwege zu beeinträchtigen und auf diese Weise den AZA-induzierten zytotoxischen Phänotyp abzumildern.

2.2.1.1 Etablierung des Assays und optimaler Versuchsbedingungen

Zunächst wurde ein für Hochdurchsatz-Screeningverfahren geeigneter Vitalitätsassay etabliert. Aufgrund hoher Sensitivität und leichter Applizierbarkeit wurde der CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega) ausgewählt und im 384-Well Format für die Screeningbedingungen optimiert. In diesem Assay erzeugt die Spaltung eines Substrates mit Hilfe zellulären ATPs ein Lumineszenz-Signal das proportional zu der Anzahl lebender Zellen ist. Weiterhin wurden geeignete Positiv- und Negativkontrollen, die optimale Zellanzahl und Behandlungsdauer, sowie die IC80-Konzentration für AZA in dem verwendeten Zellsystem bestimmt (Abbildung 36). Unter der Annahme, dass durch den

Knockdown von Zytotoxizitäts-vermittelnden Faktoren die Vitalität der Zellen gesteigert wird, erlaubte eine 80-prozentige Verminderung der Vitalität durch AZA-Behandlung eine hohe Bandbreite an positiven Ausleseergebnissen und somit eine eindeutige Identifizierung von relevanten Faktoren. Für die verwendete HEK293-Zelllinie wurde eine IC80-Konzentration von 100 μ M AZA ermittelt (Abbildung 36).

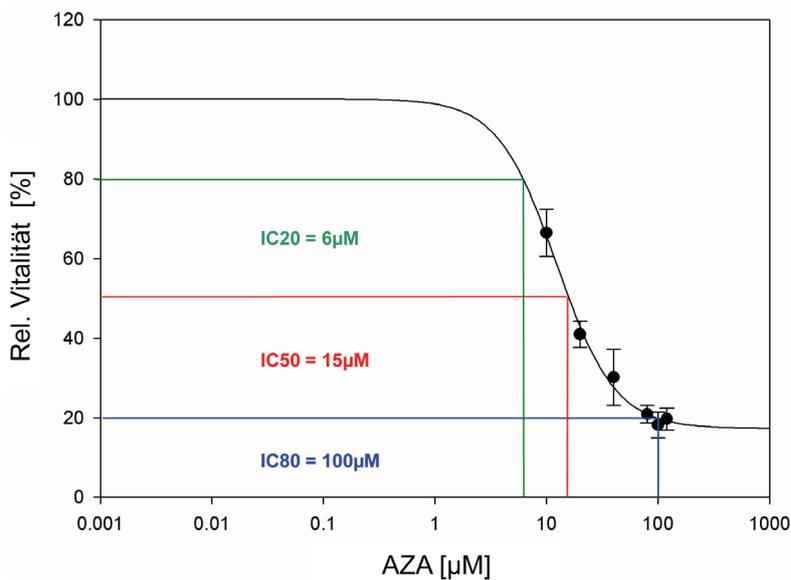


Abbildung 36 Ermittlung der optimalen Wirkstoffkonzentration für das RNAi-Screening. Die Vitalität von HEK293-Zellen wurde 96 h nach Transfektion mit Rluc siRNA (Negativkontrolle) und 48 h Inkubationsdauer mit den angegebenen Wirkstoffkonzentrationen im 384-Well-Format mit dem CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega) bestimmt. Jede Messung wurde in Quadruplikaten durchgeführt.

Als geeignete Kontrollen wurden folgende siRNAs ausgewählt: 1.) siUBC (Ubiquitin-C) als Positivkontrolle, die nach der optimierten Behandlungsdauer von 96 h einen fast vollständigen Zelltod bewirkt und 2.) siRluc als Negativkontrolle; dies ist eine unspezifische, gegen die Renilla-Luziferase-mRNA gerichtete siRNA, die keinen Einfluss auf die Vitalität der Zellen hat. Der optimierte Versuchsablauf sowie ein Beispiel für die Anordnung der Proben auf den 384-Well Mikrotiterplatten sind in Abbildung 37 schematisch dargestellt.

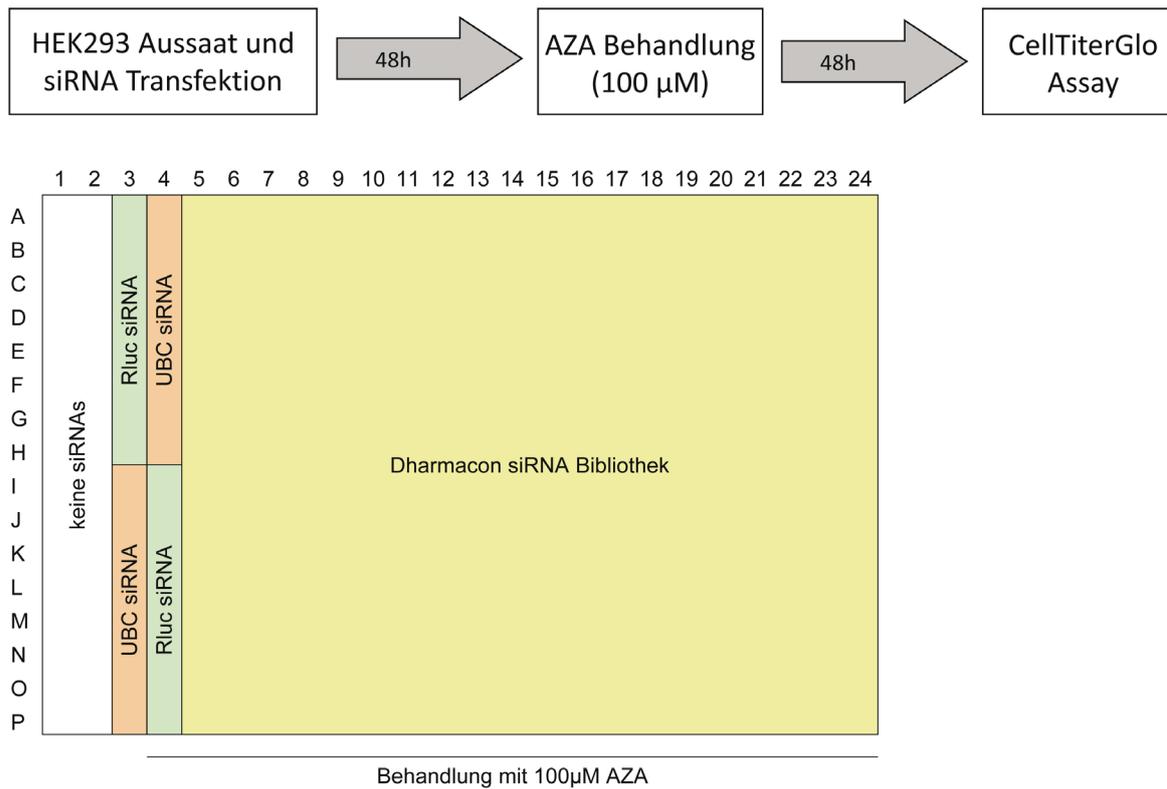


Abbildung 37 Schematische Darstellung des Versuchsablaufs im RNAi-Screening sowie der Belegung der 384-Well Mikrotiterplatten. UBC, Ubiquitin C; Rluc, Renilla-Luziferase.

Abbildung 38 zeigt die Morphologie der HEK293-Zellen nach der Transfektion mit Kontroll-siRNAs und Wirkstoffbehandlung.

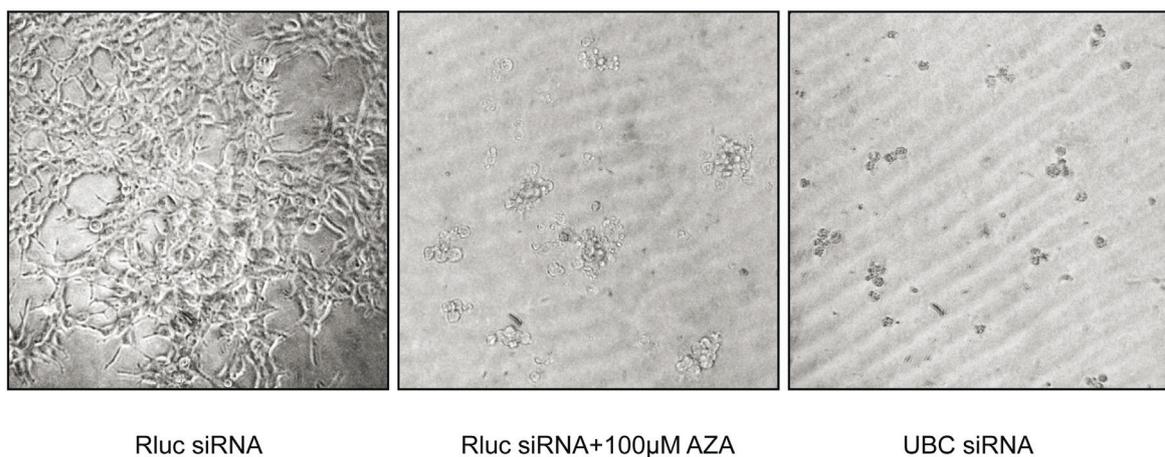


Abbildung 38 Morphologie der HEK293-Zellen 96 h nach siRNA-Transfektion mit Positiv- (UBC) oder Negativkontrollen (Rluc) sowie 48 h nach Behandlung Rluc-transfizierter Zellen mit der IC80-Konzentration des Wirkstoffes. UBC, Ubiquitin C; Rluc, Renilla-Luziferase.

2.2.1.2 Pilot-RNAi-Screen

Um die Eignung der etablierten Versuchsbedingungen für ein erfolgreiches Screening im genomweiten Maßstab zu prüfen, wurde zunächst ein Pilot-Screen durchgeführt. Dazu wurde ein siRNA-Set zum Knockdown von 720 Protein-Kinasen in Duplikaten gewählt. Protein-Kinasen spielen eine Schlüsselrolle in der Regulierung wichtiger zellulärer Funktionen, indem sie die Aktivität, Lokalisierung und Funktion vieler Proteine steuern. Der Knockdown von Kinasen kann z.B. die Fehlregulation von Zellzyklus, Transkription und Apoptose sowie verschiedener weiterer Signaltransduktionswege hervorrufen und ermöglicht durch die Analyse eines breiten Spektrums an zellulären Phänotypen eine Optimierung der Screen-Bedingungen.

Zur Bewertung der Assayqualität wird in Hochdurchsatz-Screens der Z'-Faktor berechnet [205]. Je weiter die Signale der Positiv- und Negativkontrollen voneinander separiert sind und je geringer die Standardabweichung innerhalb der jeweiligen Kontrollgruppe ist, desto höher ist der Wert des dimensionslosen Z'-Faktors, der zwischen -1 und 1 liegt, wobei ein Wert von 1 einen idealen Assay beschreibt. Für den durchgeführten Pilot-Screen wurde ein Z'-Faktor von 0,75 für das erste Replikat und 0,74 für das zweite Replikat berechnet, was einer exzellenten Assayqualität entspricht. Nach statistischer Normalisierung der normalverteilten Daten wurde für jede Probe der Z-Score berechnet. Dieser gibt die Distanz des Signals der jeweiligen Probe zum Mittelwert aller gemessenen Signale in Standardabweichungen an. Ein Z-Score, der größer als 3 bzw. kleiner als -3 ist, beschreibt eine 99,85-prozentige Wahrscheinlichkeit, dass die entsprechende siRNA bei einer Wiederholung des Assays eine Zellvitalität verursacht, die höher bzw. niedriger als der Mittelwert ist. In Abbildung 39 ist der mittlere Z-Score für die Duplikate jeder Probe graphisch dargestellt.

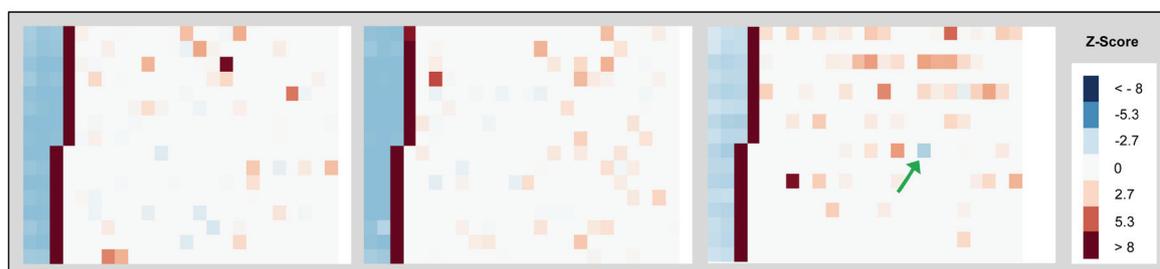


Abbildung 39 Graphische Darstellung der mittleren Z-Score-Werte aus zwei Replikaten für die im Pilot Screen getesteten siRNAs des Kinase-Sets. Eine dunkelrote Färbung zeigt diejenigen Zellen an, die sensibler als erwartet gegenüber AZA reagierten, blaugefärbte Wells kennzeichnen Zellen, die durch den Knockdown der entsprechenden siRNA gegenüber der AZA-Behandlung resistent wurden. Der grüne Pfeil markiert die Position des siRNA-Pools gegen die Uridin-Cytidin Kinase 2.

Dabei sind neben den rotgefärbten Positiv- und blaugefärbten Negativkontrollen auch einige Proben zu erkennen, die eine vom Mittelwert abweichende Vitalität zeigten. Als resistenzsteigernde siRNA mit einem Z-Score vom -3,34 (gekennzeichnet in Abbildung 39) wurde in diesem Screening bereits die Uridin-Cytidin Kinase 2 als Hit identifiziert. Dieses Enzym katalysiert die Phosphorylierung von Uridin oder Cytidin zu Uridin- bzw. Cytidin-Monophosphat und könnte auch im Azanukleosid-Stoffwechsel eine Rolle spielen. Zusammenfassend bestätigten die Ergebnisse Pilot-Screens, dass die etablierten Versuchsbedingungen für ein genomweites Screening geeignet waren.

2.2.1.3 Genomweites Hochdurchsatz-RNAi-Screening

Zum genomweiten Screening wurde eine RNAi-Bibliothek von Thermo Fisher Scientific (Dharmacon) verwendet, die für jedes Zielgen einen Pool aus vier verschiedenen siRNAs beinhaltet. Dies erhöht einerseits die Knockdown-Effizienz, andererseits aber auch das Auftreten von unspezifischen Nebeneffekten (Off-Target-Effekte) auf die Zellphysiologie. Die siRNA-Pools wurden auf 62 Mikrotiterplatten im 384-well Format gespottet und im Duplikat transfiziert. Transfektion, AZA-Behandlung und Vitalitätsmessungen wurden nach dem im Pilot-Screen etablierten Schema durchgeführt. Insgesamt wurden im Vitalitätsassay mehr als 52000 Signale ausgelesen. Die AZA-Behandlung führte dabei zu einer Reduktion der Vitalität um 80 %, der Knockdown von UBC zu einer Reduktion um 98 %. Die Pearson-Korrelation der Z-Scores der Duplikate lag bei 0,95 (Abbildung 40).

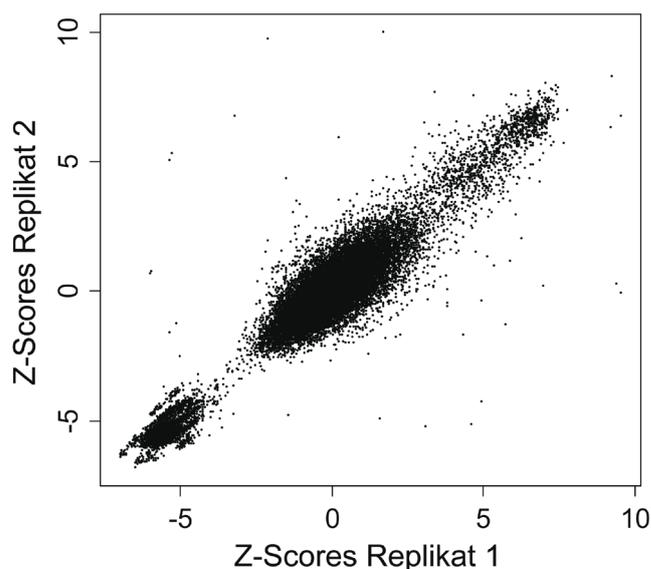


Abbildung 40 Hohe Korrelation der biologischen Replikate im RNAi-Screen. Der Scatter-Plot der Z-Scores beider Replikate sowie die Berechnung der Korrelation wurden in R durchgeführt. Der Korrelationskoeffizient (Pearson) beträgt 0,95.

Mit Z'-Faktoren von 0,51 bzw. 0,54 für die jeweiligen Replikate war die Qualität des Screens als sehr gut einzuschätzen. Dies ist auch erkennbar an der guten Separierung von Positiv- und Negativkontrollen der normalisierten Proben in Abbildung 41.

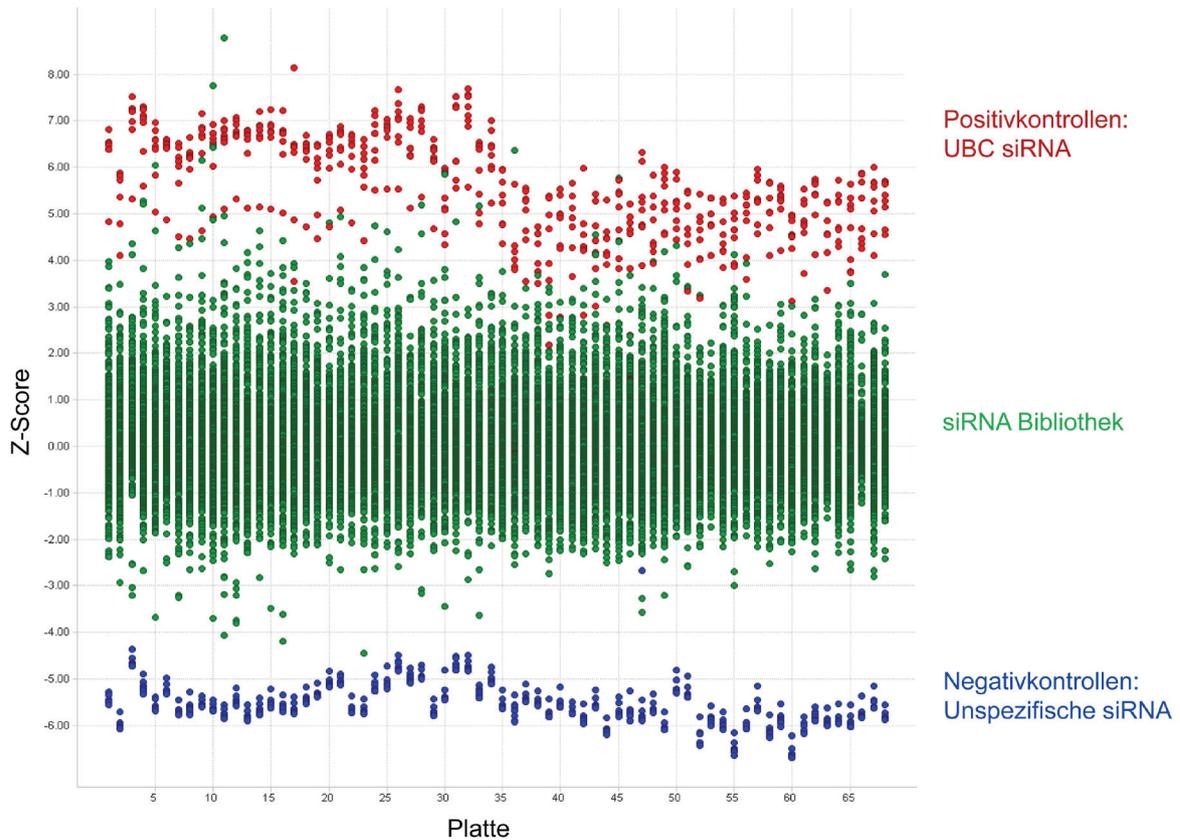


Abbildung 41 Verteilung der mittleren Z-Scores für die einzelnen Platten der siRNA-Library. Die Darstellung wurde mit dem Programm Spotfire (TIBCO Software Inc.) generiert und erlaubt eine Abschätzung von Streuung und Separierung der Kontrollen von den zu analysierenden Proben.

Insgesamt wurden 21 siRNAs identifiziert, die zu einer signifikanten Resistenz der Zellen gegenüber AZA führten ($Z\text{-Score} < -3$) und 12 siRNAs, die den zytotoxischen Effekt signifikant verstärkten ($Z\text{-Score} > 5$). Da der RNAi-Screen zur Identifizierung von Resistenzfaktoren konzipiert worden war, war die Bandbreite der Vitalitätssignale zur Identifizierung von sensibilisierenden Faktoren nur gering (0 – 20% Vitalität). Aus diesem Grund wurden stringenter Kriterien angewandt und nur Proben mit Z-Scores größer als 5 als signifikanter Hit interpretiert (Abbildung 42).

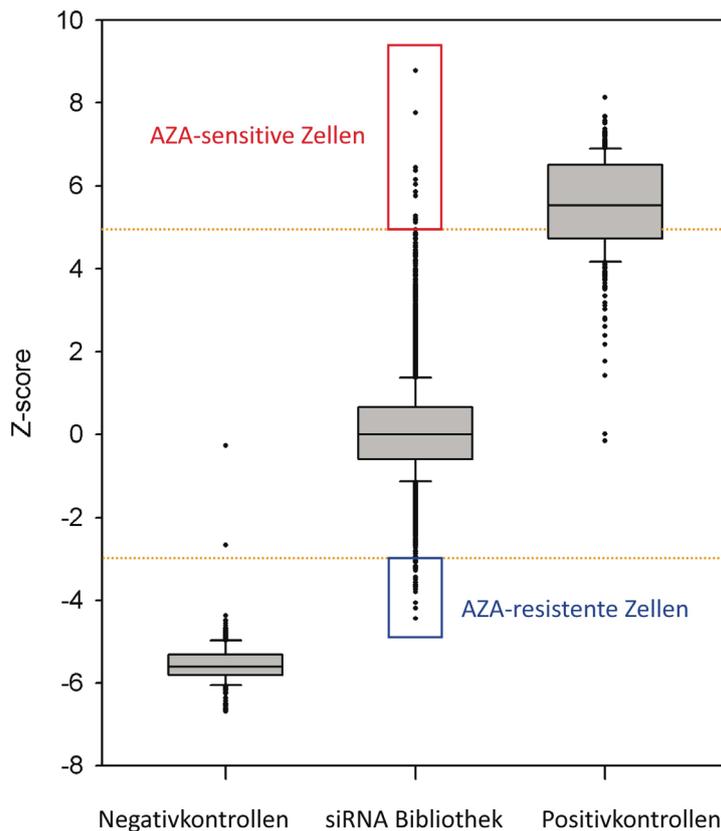


Abbildung 42 Kennzeichnung der signifikanten Hits im Boxplot. Die durch farbige Boxen markierten Hits wurden zur Screen-Validierung ausgewählt.

2.2.1.4 Hit-Validierung des genomweiten RNAi-Screens

Zur Validierung von im RNAi-Screen ermittelten Kandidaten wurden alle siRNAs ausgewählt, deren Transfektion entweder die Resistenz gegenüber AZA erhöhte (Z-Scores $< -1,5$), oder die Sensibilität gegenüber AZA verstärkte (Z-Scores $> 3,5$). Zusätzlich wurden siRNAs zur Validierung ausgewählt, die gegen funktionell vielversprechende Kandidaten gerichtet waren (z.B. gegen Enzyme aus dem Nukleotidstoffwechsel oder Membran-Transportproteine), aber weniger signifikante Z-Scores zeigten. Für einige sensibilisierende Hits war bereits durch vorangegangene RNAi-Screens an HEK293-Zellen bekannt, dass der Knockdown der Zielgene an sich schon zu einer Verringerung der Zellvitalität führte. Diese Kandidaten wurden von der Validierung ausgeschlossen. Im Anhang 4 sind alle für die Validierung ausgewählten Hits sowie die zugehörigen Z-Scores angegeben. Die entsprechenden siRNA-Pools wurden, soweit vorhanden, aus der im Screen verwendeten Dharmacon-siRNA-Bibliothek ausgewählt und in Quadruplikaten in HEK293- und HCT116-Zellen validiert. Dabei wurden die Auswirkungen der siRNAs sowohl mit als auch ohne AZA-Behandlung in der

jeweiligen IC80-Konzentration analysiert, um auszuschließen, dass der siRNA-Knockdown selbst einen Effekt auf die Überlebensfähigkeit der Zellen hatte. Dies war für insgesamt 11 siRNAs der Fall, die daraufhin als mögliche Kandidaten verworfen wurden. Abbildung 43 zeigt alle siRNAs, deren Effekt auf die Vitalität in einer der beiden Zelllinien validiert werden konnte. Insgesamt wurden 56 % der resistenzverursachenden siRNAs und 39 % der sensibilisierenden siRNAs validiert.

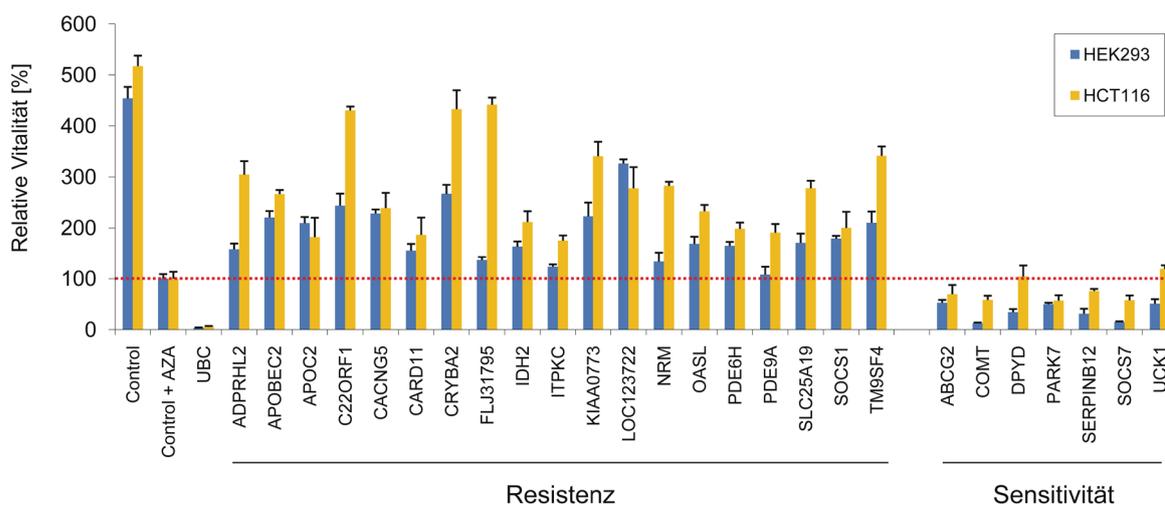


Abbildung 43 Validierung der Hits im Vitalitätsassay. Die im RNAi-Screen verwendeten siRNA-Pools wurden nach dem im Screen angewendeten Schema in HCT116- und HEK293-Zellen transfiziert und anschließend mit den zelllinienspezifischen IC80-Wirkstoffkonzentrationen (AZA) behandelt (HCT116, 5µM; HEK293, 100 µM). Die Vitalität wurde anhand des CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assays (Promega) bestimmt. Alle Messungen wurden in Quadruplikaten durchgeführt, die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen. Die rote Linie kennzeichnet die zu erwartende Vitalität in Kontroll-siRNA transfizierten Zellen nach AZA-Behandlung.

Da die Zytotoxizität von AZA mit einer Aktivierung von apoptotischen Signalwegen verbunden ist (siehe Abbildung 9), wurde der Caspase-Glo[®] 3/7 Assay ausgewählt, um zu überprüfen, ob der programmierte Zelltod in den AZA-resistenten Zellen abgeschwächt bzw. in den AZA-sensiblen Zellen erhöht wurde. Abbildung 44 zeigt, dass sich diese Vermutung für einen Großteil der Kandidaten bestätigte.

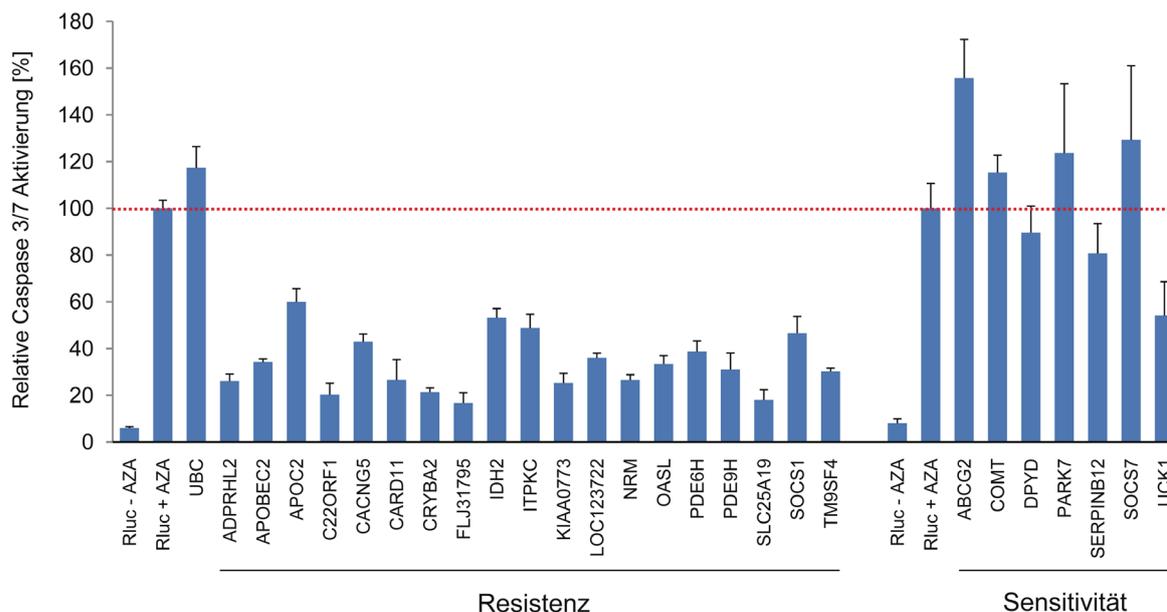


Abbildung 44 Validierung der Hits im Apoptose-Assay. Die im RNAi-Screen verwendeten siRNA-Pools wurden nach dem im Screen angewendeten Schema in HCT116-Zellen transfiziert und anschließend mit der IC80-Wirkstoffkonzentration (5 μ M AZA) behandelt. Die Stärke der Apoptose wurde anhand des Caspase-Glo[®] 3/7 Assays (Promega) bestimmt und auf die Zellanzahl anhand des CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assays (Promega) normalisiert. Alle Messungen wurden in Quadruplikaten durchgeführt, die Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen. Die rote Linie kennzeichnet die zu erwartende apoptotische Antwort in Kontroll-siRNA transfizierten Zellen nach AZA-Behandlung.

2.2.1.5 Zielgen-Validierung ausgewählter Hits

Eine Auswahl von Phänotyp-modifizierenden siRNAs wurde im Folgenden auf ihre Zielgenspezifität getestet. Ausgewählt wurden dazu im Proliferations-Assay und/oder Apoptose-Assay hochstringent validierte Zielgene, deren Knockdown entweder einen stark veränderten Phänotyp in beiden Assays und beiden Zelllinien verursachte, oder weniger stringent validierte Zielgene, die einen modifizierten Phänotyp in wenigstens einer Zelllinie bzw. einem Assay zeigten, jedoch eine potenzielle Rolle im Azanukleosid-Metabolismus spielen könnten. Zur Zielgen-Validierung wurden die Hits wenn möglich durch spezifische Hemmstoffe inhibiert oder überexprimiert. Außerdem wurde der im Screen beobachtete Phänotyp durch den Knockdown des Zielgens mit vier unterschiedlichen, gegen dieselbe Ziel-mRNA gerichteten aber nicht gepoolten siRNAs, erneut überprüft. Erst wenn durch den Knockdown mit jeder einzelnen siRNA ein vergleichbarer Effekt auf den Phänotyp erzielt wird, wie durch das im Screen verwendete Gemisch aus vier siRNAs, kann davon ausgegangen werden, dass wirklich der Knockdown der Zielgen-mRNA zu dem gezeigten Phänotyp führte und keine

unspezifischen (Off-Target) Effekte involviert waren. In Tabelle 1 sind die ausgewählten Hits, ihre Funktion sowie die jeweilige Strategie zur Zielgen-Validierung angegeben.

Tabelle 1 Ausgewählte Hits zur Zielgenvalidierung. Es sind für jedes Zielgen die jeweilige Gen-Identifikation (Gen-ID), die Strategie zur Zielgenvalidierung und die physiologische Funktion angegeben.

Gen-ID	Gen-Name	Funktion	Strategie zur Zielgen-Validierung
APOBEC2	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 2	Cytidin Deaminase Aktivität	siRNA-knockdown
TM9SF4	Transmembrane 9 superfamily protein member 4	Funktion unbekannt	siRNA-knockdown
C22ORF1	Metallophosphoesterase domain containing 1	Hydrolase Aktivität (Esterbindungen)	siRNA-knockdown
ABCG2	ATP-binding cassette sub-family G member 2	Nukleotid Efflux	Inhibierung mit FTC
COMT	Catechol-O-methyltransferase	Methylgruppen-Transfer von S-Adenosylmethionin zu Catecholaminen	siRNA-knockdown
DPYD	Dihydropyrimidin Dehydrogenase	Pyrimidin-Metabolismus, reduziert Uracil und Thymin	Inhibierung mit CDHP siRNA-knockdown
UCK1	Uridin-Cytidin Kinase 1	Phosphorylierung von Uridin und Cytidin zu UMP bzw. CMP	Inhibierung mit CPEU/CPEC siRNA-knockdown Überexpression

Leider konnte keiner der ausgewählten Hits eindeutig validiert werden, was vermutlich darauf zurückgeführt werden kann, dass die beobachteten Phänotypen teilweise durch Off-Target-Effekte verursacht worden waren. Die Validierungsergebnisse für alle in Tabelle 1 aufgeführten Zielgene sind ausführlich im Anhang 5 dargestellt.

2.2.2 GADD45A ist für die Azanukleosid-induzierte DNA-Demethylierung nicht erforderlich

Es wird allgemein angenommen, dass die Azanukleosid-induzierte DNA-Demethylierung auf die Inaktivierung der Methyltransferasen zurückzuführen ist und auf diese Weise ein passiver, replikationsabhängiger Demethylierungsmechanismus eingeleitet wird [157]. Die zuvor beobachtete Induktion von GADD45A nach AZA-Behandlung (Abbildung 10) könnte jedoch bedeuten, dass neben der passiven Demethylierung auch aktive Demethylierungsmechanismen eine Rolle spielen [86]. Um diese Hypothese näher zu untersuchen, wurden HCT116-Zellen, in denen die GADD45A mRNA durch RNAi um 90 % reduziert worden war, mit AZA oder DAC behandelt und die Demethylierungseffizienz der C1S2 (Chromosom 1 Satellit 2) Region mittels COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) charakterisiert. Die Methylierung dieses repetitiven Sequenzbereiches korreliert stark mit der globalen DNA-Methylierung der Zelle. Abbildung 45A zeigt, dass der Knockdown von GADD45A keinen Einfluss auf die Demethylierungseffizienz der Azanukleoside hatte.

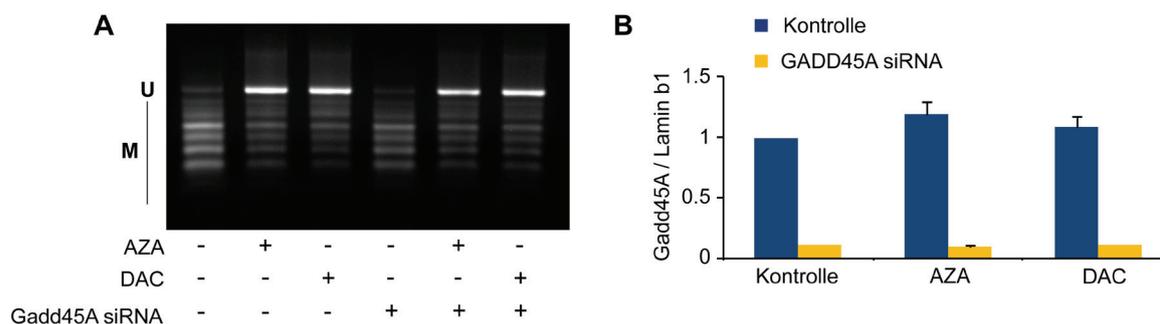


Abbildung 45 GADD45A hat keinen Einfluss auf Azanukleosid-induzierte Demethylierung. **A.** C1S2 COBRA in HCT116-Zellen nach Behandlung mit 2 μ M AZA oder 0,5 μ M DAC für 24 h in Kombination mit GADD45A Knockdown, soweit angegeben. U, unmethyliert; M, methyliert. **B.** Die Knockdown-Effizienz für GADD45A in den für die COBRA Analyse verwendeten Zellen wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit STABW.

Der Knockdown von GADD45B sowie ein Doppelknockdown von GADD45A und GADD45B führten zu demselben Ergebnis (siehe Anhang 6). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass GADD45A nicht zur Azanukleosid-induzierten globalen Demethylierung beiträgt. Weiterhin ist aus Abbildung 45 ersichtlich, dass die GADD45 siRNA-Transfektion keinen Einfluss auf die Methylierung unbehandelter HCT116-Zellen hatte. Barreto et al. (2007) hatten jedoch gezeigt, dass ein GADD45A-Knockdown zu globaler Hypermethylierung führte [86]. Um diese Diskrepanz aufzuklären, wurde im Folgenden die Rolle von GADD45A in der Modulation von DNA-Methylierungsmustern näher untersucht.

2.2.2.1 GADD45 Knockdown induziert keine globale DNA-Hypermethylierung

Das vorangegangene Experiment war an HCT116-Zellen durchgeführt worden, bei der von Barreto et al. (2007) verwendeten Zelllinie handelte es sich allerdings um RKO-Zellen [86]. Aus diesem Grund wurde der GADD45-Knockdown an RKO-Zellen desselben Stammes, der in der Publikation verwendet worden war, mit demselben Assay (C1S2 COBRA) wiederholt (Abbildung 46A). Überraschenderweise zeigte sich, dass die Satellitenregion dieser Zelllinie bereits hypermethyliert war und somit durch den Knockdown von GADD45 keine weitere Zunahme der Methylierung erreicht werden konnte. Diese Beobachtung ist insofern verwunderlich, da die unbehandelte RKO-Kontrolle von Barreto et al. demethyliert war (Abbildung 46B) [86]. Auch die CE-Analyse in Abbildung 46C zeigte keine Verminderung der globalen DNA-Methylierung nach GADD45 Knockdown.

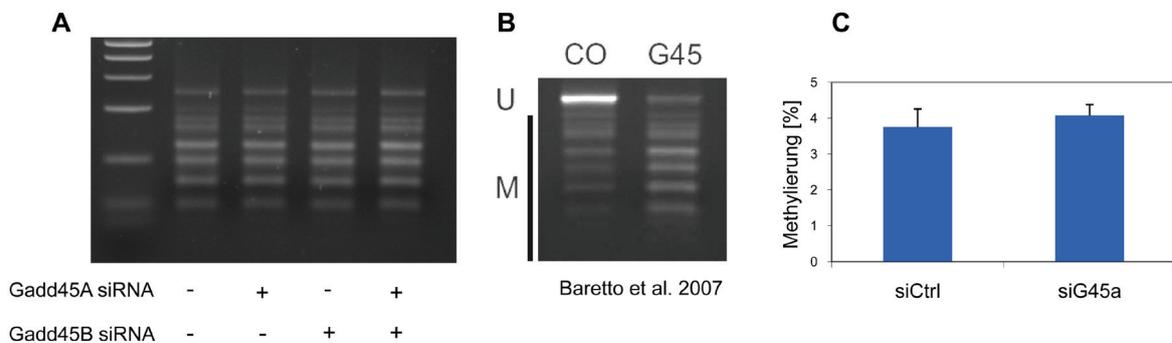


Abbildung 46 Der Knockdown von GADD45 induziert keine globale DNA-Hypermethylierung in RKO-Zellen. **A.** COBRA Analyse 48 h nach GADD45A und/oder GADD45B siRNA-Knockdown. **B.** COBRA Analyse derselben Zellen aus Barreto et al. (2007), Co, Kontrolle; G45, GADD45A **C.** Globale Methylierungsanalyse mittels Micellarer Kapillarelektrophorese in RKO Kontrollzellen (siCtrl) und Zellen mit reduzierter GADD45a-Expression; siG45a, GADD45A siRNA; U, unmethyliert; M, methyliert.

2.2.2.2 Die Überexpression von humanem GADD45A führt nicht zu globaler DNA-Demethylierung

Da eine DNA-Hypermethylierung nach GADD45A-Knockdown nicht bestätigt werden konnte, wurde im Folgenden die globale DNA-Demethylierung nach GADD45A-Überexpression, die von Barreto et al. (2007) publiziert worden war, überprüft [86]. Der C1S2 COBRA Assay in Abbildung 47 zeigt jedoch, dass die Überexpression von humanem GADD45A keine DNA-Demethylierung induziert. Interessanterweise führte die Überexpression von GADD45A cDNA aus *Xenopus tropicalis* (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von G. Barreto) zu einer deutlichen DNA-Demethylierung.

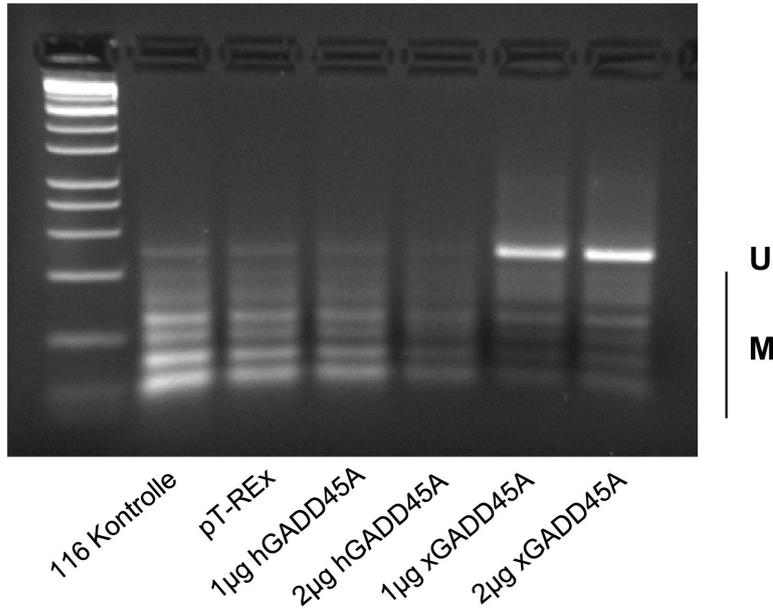


Abbildung 47 Die Überexpression von *Xenopus*-GADD45A führt zu globaler DNA-Demethylierung. HCT116-Zellen wurden mit leerem Vektor (pT-Rex), bzw. mit 1 oder 2 µg humanem (hGADD45A) oder *Xenopus* (xGADD45A) GADD45A transfiziert und nach 48 h mittels C1S2 COBRA analysiert; U, unmethyliert; M, methyliert.

Die demethylierende Aktivität von xGADD45A war nicht nur auf repetitive Satellitenregionen begrenzt, sondern auch im Promotorbereich des in HCT116-Zellen hypermethylierten Gens APM2 nachweisbar (Abbildung 48). Das humane GADD45A-Protein führte hingegen zu keiner messbaren Demethylierung des AMP2 Promotors.

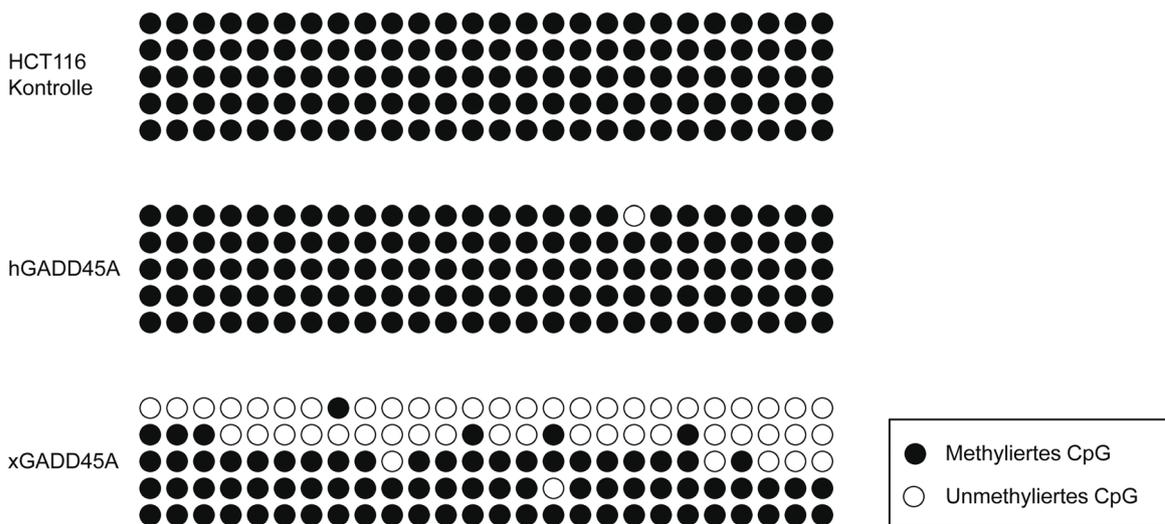


Abbildung 48 *Xenopus*-GADD45A induziert globale DNA-Demethylierung. HCT116-Zellen wurden mit humanem (hGADD45A) oder *Xenopus* (xGADD45A) GADD45A transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 48 h wurde die DNA extrahiert und Bisulfit-sequenziert. Dabei entspricht jede Zeile in der Darstellung einem sequenzierten Klon und jeder Kreis einem CG-Dinukleotid.

2.2.2.3 Die Überexpression von *Xenopus*-GADD45A inaktiviert DNMT1

Um einen passiven Demethylierungsmechanismus durch Inaktivierung von Methyltransferasen auszuschließen, wurde die DNMT1-Proteinexpression nach GADD45-Transfektion mittels Western Blot überprüft. Überraschenderweise stellte sich heraus, dass die DNMT1-Enzyme in den mit xGADD45A transfizierten und demethylierten Zellen stark reduziert waren (Abbildung 49). Diese Beobachtung spricht für eine passive Demethylierung und gegen einen aktiven Mechanismus, der von Barreto et al. postuliert worden war [86].

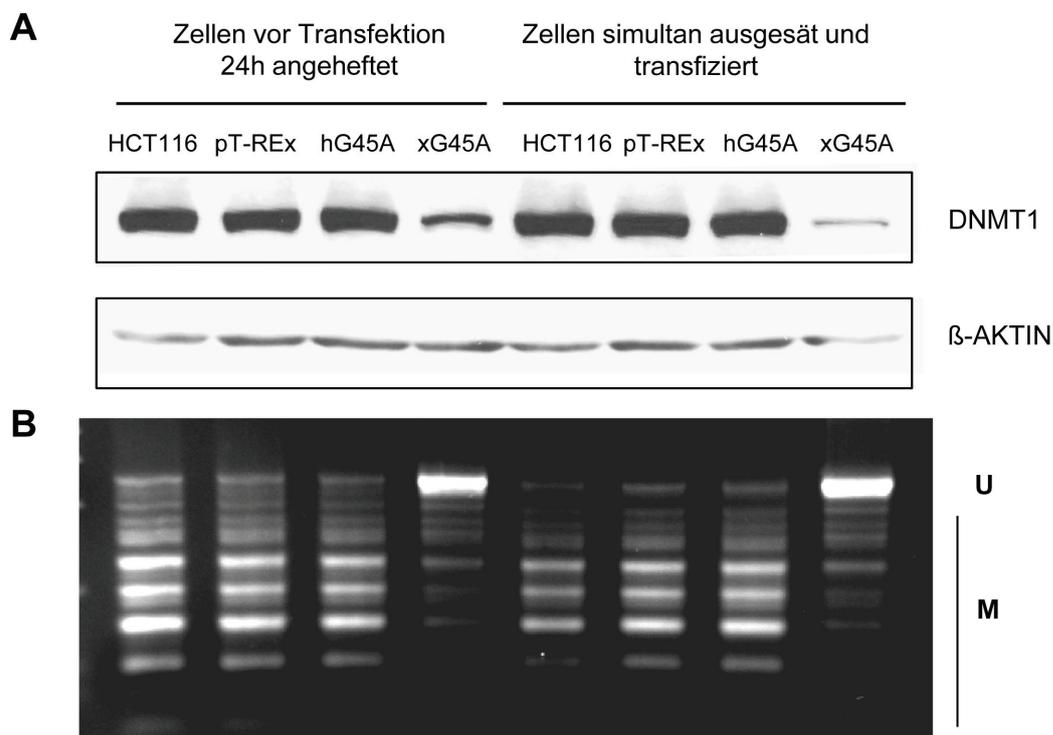


Abbildung 49 xGADD45A Überexpression induziert DNMT1-Trapping. **A.** Die GADD45A Protein Expression wurde in HCT116-Zellen nach 2 x 48 h Transfektion mit humanen und *Xenopus*-GADD45A-Konstrukten sowie einem leeren Kontrollvektor (pT-REx) mittels Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente β-AKTIN. **B.** Eine C1S2 COBRA Analyse derselben Zellen verifiziert eine mit der DNMT1-Inaktivierung einhergehende DNA-Demethylierung für xGADD45A transfizierte Zellen; U, unmethyliert; M, methyliert.

2.2.2.4 Die demethylierende Aktivität stammt nicht von *Xenopus*-GADD45A

Zu unserer Überraschung war die stetig beobachtete demethylierende Aktivität des *Xenopus* GADD45A-Konstruktes nach Retransformation des Plasmids nicht mehr vorhanden, obwohl die DNA-Sequenz keine Mutationen aufwies. Um zu kontrollieren, ob die demethylierende Aktivität wirklich von der Plasmid-DNA stammte, wurden folgende

Kontrollen durchgeführt: 1.) die Original-DNA wurde mit dem QIAquick PCR Purification[®] Kit (Qiagen) aufgereinigt und in neuem Puffer eluiert; 2.) die Original-DNA wurde mit Benzonase vollständig verdaut. Anschließend wurden sowohl die Original-DNA als auch die Kontrollen in jeweils zwei Ansätzen (mit oder ohne Transfektionsreagenz) transfiziert und die Demethylierungsaktivität mittels COBRA Assay analysiert (Abbildung 50). Während die Original-DNA wie erwartet zu einer Demethylierung der C1S2 Region führte, war die Demethylierungsaktivität durch die Aufreinigung der Plasmid-DNA verloren gegangen, obwohl die DNA nach der Aufreinigung vollkommen intakt war (Kontrolle Abbildung 50B). Die Probe, die die vollständig mit Benzonase verdaute Plasmid-DNA enthielt (Kontrolle Abbildung 50B), führte unerwartet ebenfalls zu einer starken Demethylierung. Dabei war die Demethylierungsaktivität unabhängig von der Zugabe des Transfektionsreagenz, d.h., ein Eindringen der DNA in die Zelle war für eine erfolgreiche Demethylierung nicht notwendig.

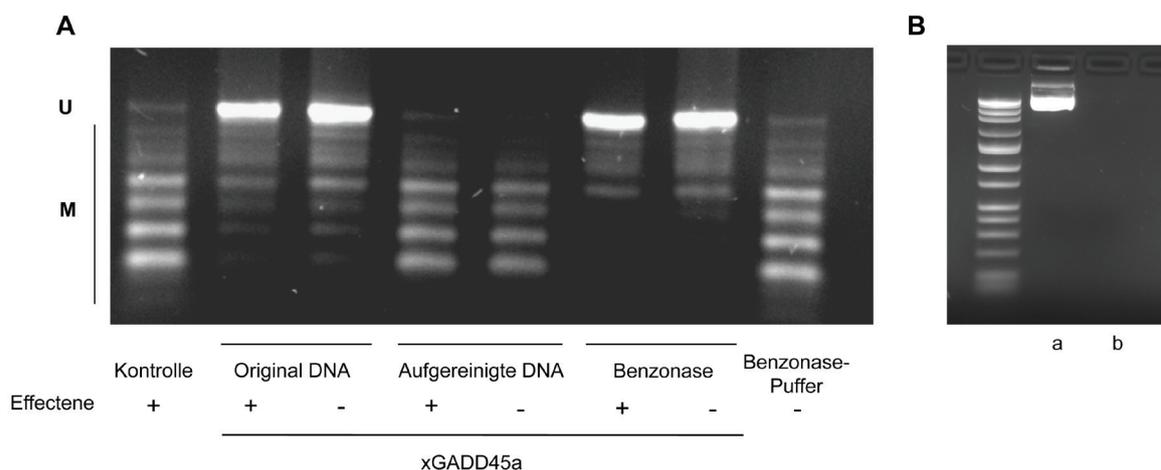


Abbildung 50 Die demethylierende Aktivität befindet sich im Puffer der *Xenopus*-GADD45A-DNA. **A.** Die DNA-Demethylierung wurde in HCT116-Zellen nach 48-stündiger Transfektion mit verschieden behandelter xGADD45A-DNA sowie Transfektionsreagenz (Effectene[®], Qiagen) wie angegeben mittels C1S2 COBRA analysiert. **B.** Kontrolle der Integrität von aufgereinigter GADD45A-Plasmid-DNA (a) sowie der vollständig mit Benzonase verdaute DNA (b) auf einem 1-prozentigen Agarose-Gel.

Diese Ergebnisse zeigen, dass nicht die Überexpression von xGADD45A zur DNA-Demethylierung führte, sondern eine unbekannte Substanz im Puffer der Original-xGADD45A-DNA. Diese Substanz verhielt sich in den verwendeten Assays wie Azacytidin oder Decitabin und führte über einen passiven Demethylierungsmechanismus, ausgelöst durch die Inaktivierung von DNMT1, zur globalen DNA-Demethylierung.

2.2.3 Die Demethylierung von tRNAs spielt eine Rolle in der Azacytidin-vermittelten Zytotoxizität

Die vorangegangenen Analysen zur Azanukleosid-vermittelten Zytotoxizität haben gezeigt, dass die durch Azacytidin-induzierte Toxizität die Demethylierungseffizienz dieses Wirkstoffes in HCT116-Zellen verringert. Dieser Effekt könnte auch in der klinischen Anwendung dieses Wirkstoffes eine Rolle spielen. Aus diesem Grund wurden die Auswirkungen einer Behandlung mit AZA und DAC auf die metabolische Aktivität leukämischer Zelllinien untersucht, die ein Modell für die klinische Anwendung von AZA und DAC in der epigenetischen Krebstherapie darstellen. Anhand einer Messung der metabolischen Aktivität der Zellen anhand des CellTiter-Blue® Cell Viability Assays (Promega) konnte eindeutig festgestellt werden, dass AZA auch in den nicht-adhären wachsenden leukämischen Zelllinien K562, ML-1 und HL-60 zytotoxischer ist als DAC (Abbildung 51).

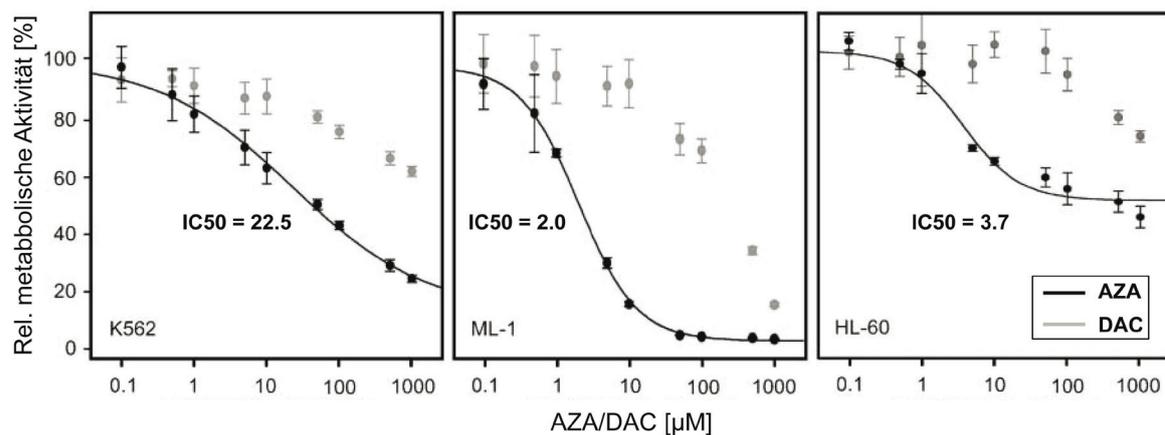


Abbildung 51 AZA inhibiert die metabolische Aktivität in leukämischen Zelllinien stärker als DAC. Die metabolische Aktivität wurde nach 24 h Inkubationsdauer mit den angegebenen Wirkstoffkonzentrationen mit dem CellTiter-Blue Assay (Promega) bestimmt. Die Dosis-Wirkungs-Kurve wurde nur für sigmoidal verteilte Werte berechnet. Jede Messung wurde in Triplikaten durchgeführt.

Vitalitätsmessungen des National Cancer Institute (NCI) an insgesamt 55 adhären wachsenden Krebszelllinien bestätigen außerdem, dass die beobachtete höhere Zytotoxizität von AZA gegenüber DAC ein generelles Phänomen ist. Im Rahmen des „NCI-60 DTP Human Tumor Cell Line Screens“ wurde der Einfluss von Wirkstoffen auf Krebszelllinien aus Lunge, Darm, Gehirn, Ovarien, Brust, Prostata und Niere sowie auf leukämische Zelllinien untersucht. Als Vitalitätsssay wurde der Sulforhodamin B Assay verwendet, der den Proteingehalt der Zellen als lineares Maß für die Zellanzahl misst. Die Ergebnisse dieser Analysen lassen sich anhand des NCI COMPARE-Programms direkt

vergleichen (<http://dtp.nci.nih.gov/compare/>). Abbildung 52 zeigt, dass 51 der 55 untersuchten Zelllinien sensibler gegenüber AZA waren.

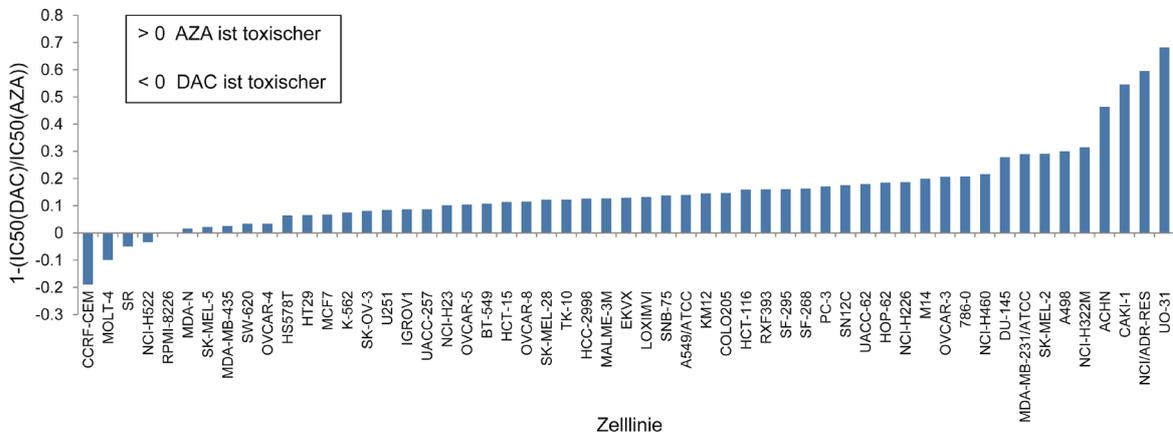


Abbildung 52 AZA ist zytotoxischer als DAC. Das Zytotoxizitätsverhältnis für die verschiedenen Zelllinien wurde anhand veröffentlichter IC50-Werte des National Cancer Institute (NCI) berechnet. Diese wurden unter Verwendung des Sulforhodamin B-Assays ermittelt.

Wir vermuteten, dass der Einbau von AZA in die RNA zu der AZA-vermittelten Zytotoxizität beiträgt. Genau wie der Einbau von AZA in die DNA eine kovalente Bindung und damit einhergehende Inaktivierung von DNA-Methyltransferasen auslöst, könnte der Einbau in die RNA zu einer Inaktivierung von RNA-Methyltransferasen führen. Das Enzym DNMT2 wurde aufgrund seiner tRNA-methylierenden Eigenschaft als RNA-Methyltransferase identifiziert [60, 206] und stellt somit einen geeigneten Kandidaten zur Überprüfung dieser Hypothese dar. DNMT2 wird, wie Abbildung 53 zeigt, auch in HCT116-Zellen deutlich exprimiert, was auf eine aktive Funktion in dieser Zelllinie hinweist.

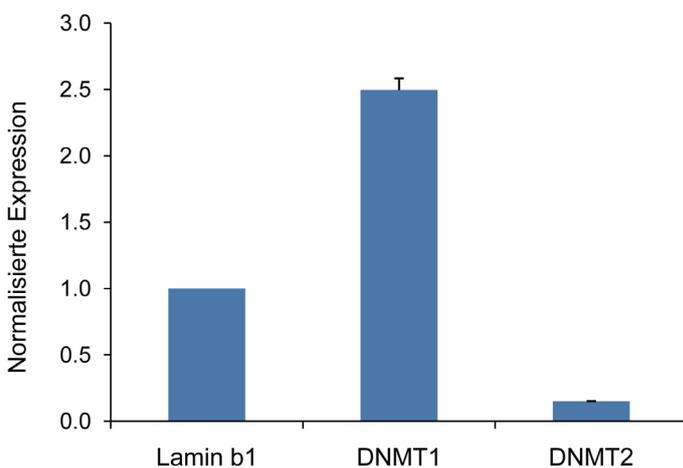


Abbildung 53 DNMT2-Expression in HCT116-Zellen. Die Expression der DNMT2-mRNA wurde mittels qRT-PCR ermittelt. Als Referenzgen wurde GAPDH verwendet, die relative Expression von DNMT1 sowie des Haushaltsgens Lamin b1 sind als Expressionsreferenz ebenfalls dargestellt. Alle Expressionswerte sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit STABW.

Schäfer et al. (2009) zeigten, dass eine Behandlung mit AZA, aber nicht mit DAC, zu einer Reduktion der tRNA-Methylierung an DNMT2-Zielsequenzen führt [59]. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass der Einbau von AZA in die RNA eine Inaktivierung von DNMT2 verursachen kann. Abbildung 54 zeigt außerdem, dass die Reduktion der tRNA Methylierung an Position C38 von tRNA^{Asp} (ermittelt durch tRNA-454-Bisulfit-Sequenzierung von M. Schaefer [59]) sogar schon von sehr geringen AZA-Konzentrationen (0,1-0,5 µM) verursacht wird, die auf DNA-Ebene noch keine Demethylierung auslösen.

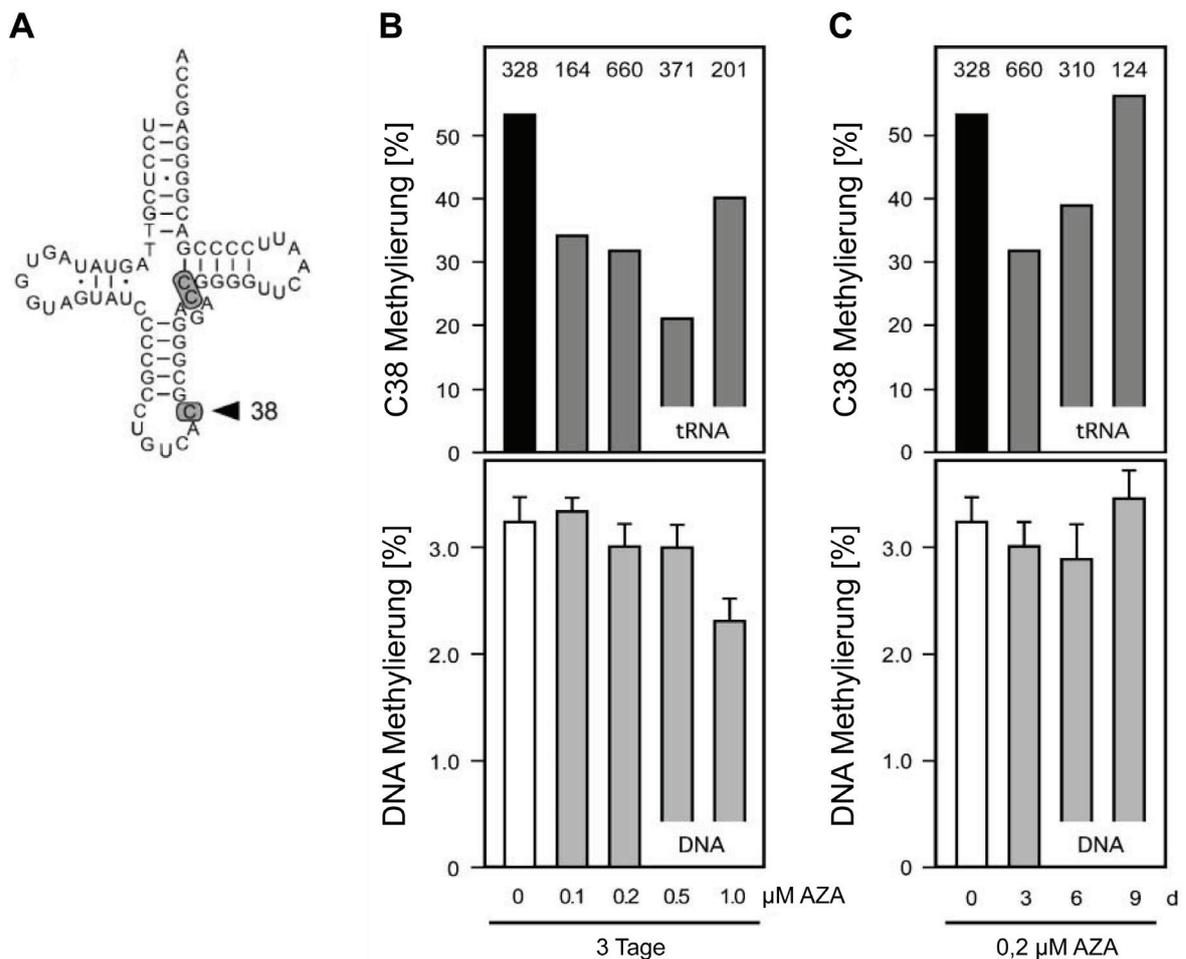


Abbildung 54 AZA induziert tRNA Demethylierung in DNMT2 Zielsequenzen. **A**. Sequenz und Struktur von tRNA^{Asp}. Methylierte Cytosine sind Grau unterlegt, der Pfeil markiert das durch DNMT2 methylierte Cytosin. **B**, **C**. Vergleich AZA-induzierter tRNA^{Asp} Demethylierung und globaler DNA-Demethylierung in HL-60 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen AZA-Konzentrationen für drei Tage (**B**) oder 0,2 µM AZA für einen Zeitraum von neun Tagen (**C**). Dabei wurden die Zellen alle drei Tage gesplittet und erneut mit AZA behandelt. Die tRNA Methylierung wurde von Schäfer et al. (2009) mittels 454 Bisulfit Sequenzierung bestimmt, die globale DNA-Methylierung durch Kapillarelektrophorese. Kapillarelektrophoretische Analysen wurden mindestens dreifach wiederholt, die Balken stellen Mittelwerte mit Standardabweichungen dar. Die Zahlen oberhalb der Balken für tRNA-Analysen geben die Anzahl der ausgewerteten 454-Sequenzen wieder.

3 DISKUSSION

Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Krebstherapie ist ein detailliertes Verständnis der Wirkungsweise der verwendeten Wirkstoffe. Die genaue Wirkungsweise der am weitesten entwickelten Wirkstoffe in der epigenetischen Krebstherapie, 5-Azacytidin (AZA) und 5-Aza-2'-Deoxycytidin (DAC), ist bis heute nicht vollständig verstanden, was eine optimierte Anwendung dieser Wirkstoffe verhindert. In dieser Studie wurde die epigenetische Wirkungsweise von AZA und DAC im Zellkulturmodell charakterisiert und mit nicht-epigenetischen Effekten beider Wirkstoffe in Verbindung gebracht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Demethylierungseffizienz von AZA und DAC unterschiedlich ist und außerdem von verschiedenen Faktoren abhängt. Zu diesen Faktoren zählen:

1.) Wirkstoff-induzierte Zytotoxizität, 2.) zelltypspezifische resistenzverursachende bzw. sensibilisierende Faktoren, 3.) die Methylierungsaktivität inhibierter DNMTs und 4.) der DNA-Sequenzkontext sowie die Chromatinumgebung methylierter CGs.

3.1 Azacytidin-induzierte Zytotoxizität verhindert eine effiziente DNA-Demethylierung

Die beobachteten Unterschiede in der Demethylierungseffizienz beider Wirkstoffe lassen sich durch verschiedenartige Wirkmechanismen von AZA und DAC erklären, die sich auf unterschiedliche metabolische Umwandlungswege der Stoffe innerhalb der Zelle zurückführen lassen. In dieser Studie wurde gezeigt, dass beide Wirkstoffe unterschiedlich starke zytotoxische Effekte auf die Zelle ausüben, die sich indirekt auf die Effizienz der DNA-Demethylierung auswirken. Diese zytotoxischen Effekte lassen sich differenzieren in (a) zytotoxische Effekte, die durch gemeinsame metabolische Wege beider Wirkstoffe entstehen und (b) zytotoxische Effekte, die allein durch AZA ausgelöst werden.

Sowohl durch AZA- als auch durch DAC-Behandlung wurde die Induktion von γ H2AX als ein Marker für DNA-Reparatur-assoziierte DNA-Doppelstrangbrüche ausgelöst. Dieser Effekt entsteht durch den Einbau beider Wirkstoffe in die DNA, der verschiedene zytotoxische Reaktionen auslösen kann: Es wird vermutet, dass aufgrund der vergleichsweise hohen Instabilität des modifizierten Pyrimidinringes von Azanukleosiden eine hydrolytische Spaltung der Moleküle innerhalb der DNA zu einer Schädigung des DNA-Stranges führen kann [155]. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass die Bildung von DNA-Protein-Addukten zwischen Azanukleosiden und Methyltransferasen der hauptsächliche Grund für die Auslösung von DNA-Reparatur-Mechanismen ist [170]. Dieses Modell wird

durch die in dieser Studie nachgewiesene Verminderung von DNMT1 und DNMT3B im Zytoplasma unterstützt, die auf den Abbau der DNA-Protein-Addukte im Verlauf der DNA-Reparatur zurückgeführt werden kann. Es ist bekannt, dass Schäden in der DNA Auswirkungen auf den Zellzyklus haben können [207]. Eine Verlangsamung der Zellteilung ermöglicht eine sofortige Reparatur des Schadens, wodurch eine permanente Schädigung der DNA verhindert werden kann. Die Vermutung, dass dieser Mechanismus auch den beobachteten G2-Arrest im Zellzyklus bewirken könnte, wird durch eine Studie von Jiemjit et al. (2008) bestärkt, die eine Induktion des zellzykluskontrollierenden Proteins p21 durch DAC-ausgelöste DNA-Schädigung beschreibt [208]. Die Induktion von γ H2AX sowie der G2-Arrest im Zellzyklus waren interessanterweise für AZA stärker ausgeprägt als für DAC, obwohl DAC effizienter in die DNA eingebaut wird [149, 152]. Diese Beobachtung lässt den Schluss zu, dass nicht der Einbau in die DNA die erhöhte Zytotoxizität von AZA erklären kann, sondern weitere AZA-spezifische metabolische Modifikationswege eine Rolle spielen müssen.

Neben den zytotoxischen Effekten, die durch beide Wirkstoffe induziert wurden, verursachte die Behandlung mit AZA die Induktion zusätzlicher zytotoxischer Marker. So wurde zum Beispiel die verstärkte Expression des Genotoxizitätsmarkers GADD45A ausschließlich durch die Behandlung mit AZA ausgelöst. Die GADD45A-Expression wird insbesondere durch Stress induziert und spielt eine Rolle in der Regulation der biologischen Stressantwort [209]. Die alleinige Induktion dieses Markers durch AZA bestätigt, dass AZA zusätzlich zu dem Schaden, der durch den Einbau in die DNA entsteht, weitere intrazelluläre Stressreaktionen auslöst, die nach DAC-Behandlung nicht auftreten. Zusätzlich wurde nach AZA-Behandlung in der FACS-Analyse ein erhöhter Zelltod festgestellt, der mit einer Auslösung apoptotischer Signalwege korrelierte. Die Einleitung von Apoptose wurde ebenfalls nur nach der Behandlung mit hohen AZA-Konzentrationen beobachtet; die Behandlung mit äquimolaren Konzentrationen an DAC induzierte keine apoptotische Zellantwort. Es wurde allerdings gezeigt, dass die Einleitung apoptotischer Signalwege in anderen Zelllinien auch durch DAC-Behandlung verursacht werden kann [149].

Ein weiterer Parameter, der eine wichtige Rolle in der AZA-vermittelten Zytotoxizität spielt, ist der Einbau von etwa 65-90 % der AZA-Moleküle in die RNA [152]. Dort kommt es zu einer Störung der Proteintranslation [152] und weiteren Auswirkungen auf die zelluläre Physiologie, die im weiteren Verlauf der Diskussion näher diskutiert werden (siehe 3.4.3).

Interessanterweise wurde in Langzeit-Behandlungen mit AZA und DAC eine Umkehrung der Zytotoxizität beider Wirkstoffe festgestellt. In Koloniebildungs-Assays, die sich über

einen Zeitraum von 13 Tagen erstreckten, aber auch in Experimenten, in denen leukämische Zellen kontinuierlich über 9 Tage mit AZA oder DAC behandelt wurden (Daten nicht gezeigt), wurde deutlich, dass DAC-behandelte Zellen in stärkerem Maße starben als AZA-behandelte Zellen. Die Gründe für dieses Phänomen sind unbekannt. Es gibt jedoch verschiedene Faktoren, die die Zytotoxizität von DAC erhöhen bzw. die zytotoxischen Eigenschaften von AZA verringern könnten: zum Beispiel könnte die geringere Stabilität von AZA zu einer Reduktion der intrazellulären Wirkstoffkonzentration und somit auch der toxischen Eigenschaften führen [150], oder die kontinuierliche Schädigung der DNA durch den fortwährenden Einbau von DAC die Zytotoxizität verstärken [184]. Andererseits könnte es ebenso im Verlauf der Behandlung zu einer Selektion resistenter Zellklone kommen, die für AZA erfolgreicher verläuft als für DAC. Als weitere Erklärung könnte die höhere Demethylierungseffizienz von DAC herangezogen werden, die nach kontinuierlicher Inkubation mit dem Wirkstoff zu einer Reexpression von Tumorsuppressorgenen führt und somit die Zellvitalität vermindert. Die Aufklärung dieser Hypothesen wurde in dieser Studie nicht weiter verfolgt, dennoch bestätigt allein die Beobachtung einer inkubationszeitabhängigen Änderung des Zytotoxizitätsprofils von AZA und DAC, dass eindeutige Unterschiede im Wirkmechanismus von AZA und DAC vorliegen.

In dieser Studie wurden neben Unterschieden im Zytotoxizitätsprofil von AZA und DAC auch Unterschiede in der Effizienz der DNA-Demethylierung in HCT116-Zellen festgestellt. Dabei korrelierte die durch AZA-Behandlung induzierte Zytotoxizität direkt mit einer verringerten Demethylierungseffizienz. Diese kann auf die geringere Einbaurate der Wirkstoffe in die DNA zurückgeführt werden, die wiederum durch die zytotoxizitätsbedingte Verlangsamung der Zellteilung verursacht wurde. Durch diesen Vorgang wurde die kovalente Bindung von DNA-Methyltransferasen an die DNA und somit der Abbau dieser Enzyme vermindert. Diese Ergebnisse erklären die beobachtete geringere Demethylierungseffizienz nach Behandlung mit zytotoxischen Wirkstoffkonzentrationen.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurden zur genomweiten Analyse der Demethylierungseffizienz Konzentrationen von 1 μM für AZA und DAC verwendet, die durch eine Minimierung der zytotoxischen Effekte eine maximal mögliche DNA-Demethylierung bewirkten. Der gemeinsame Mechanismus der DNA-Demethylierung erklärt die hohe Übereinstimmung der durch AZA- oder DAC-Behandlung verursachten Demethylierungsmuster in der genomweiten Analyse genassoziierter CG-Dinukleotide. DAC zeigte zwar erwartungsgemäß eine höhere Demethylierungseffizienz, allerdings wurden nur etwa 1,5-Mal mehr CGs durch DAC demethyliert als durch AZA. Zieht man in Betracht, dass

nur etwa 10-35 % der AZA-Moleküle in die DNA eingebaut werden, würde man unter der Voraussetzung, dass die Einbaurate von Azanukleosiden in die DNA in diesem nicht-toxischen Konzentrationsbereich proportional zur eingesetzten Molekülanzahl ist, bei äquimolarer Behandlung eine deutlich höhere Demethylierungseffizienz für DAC erwarten. Bei einer näheren Betrachtung der biologischen Replikate der DAC-Behandlung zeigte sich jedoch, dass zwei der vier Replikate wie erwartet eine etwa 4- bis 5-fach höhere Anzahl an demethylierten CG-Dinukleotiden aufwiesen als die AZA-behandelten Zellen. Zwei weitere Replikate zeigten allerdings eine ähnliche Demethylierungseffizienz wie die AZA-behandelten Replikate. Dieser Unterschied ist möglicherweise auf einen schlechteren physiologischen Zustand der Zellen in den schwächer demethylierten Replikaten zurückzuführen, der durch verkürzte Wachstumszeiten der Zellen vor der Aussaat zur Behandlung verursacht worden war. Dadurch reagierten diese Zellen empfindlicher auf die Behandlung und starben vermehrt. Diese Unterschiede in der Effizienz wirkten sich in der Gruppierung der biologischen Replikate auf die mittlere Demethylierungseffizienz der DAC-behandelten Proben aus und erklären somit den geringen Unterschied in der Anzahl demethylierter CGs zwischen den gruppierten AZA- und DAC-Replikaten.

Interessanterweise wirkte sich die Verringerung der Zellvitalität, die vermutlich zu der verminderten Demethylierungseffizienz in den DAC-behandelten Zellen führte, nicht auf die Demethylierungseffizienz der parallel mit AZA-behandelten Proben aus. Der Grund für diese Unterschiede in der Sensibilität könnte sein, dass die Zytotoxizität, die durch den effizienteren Einbau der DAC-Moleküle in die DNA ausgelöst wird, bereits sensibilisierte Zellen in besonderem Maße beeinträchtigt. Diese Beobachtungen zeigen, dass neben der Wirkstoffkonzentration auch der physiologische Zustand der Zellen einen Einfluss auf die Effizienz der Demethylierung haben kann. Dabei scheint die Vitalität der Zellen zum Zeitpunkt der Behandlung die Demethylierungseffizienz von DAC stärker zu verringern als die von AZA. Dies sollte bei zukünftigen Experimenten berücksichtigt werden.

Zusammengefasst lässt sich die geringere Demethylierungseffizienz von AZA im Vergleich zu DAC durch seine Ribonukleotidstruktur erklären: diese führt zu einer geringeren Einbaurate von AZA-Molekülen in die DNA und erhöht gleichzeitig den zytotoxischen Effekt des Wirkstoffes durch die Störung des RNA-Metabolismus. Diese AZA-spezifischen zytotoxischen Effekte wirken sich zusätzlich negativ auf die DNA-Einbaurate aus und verringern bei Behandlung mit hohen AZA-Konzentrationen die Effizienz der DNA-Demethylierung (Abbildung 55).

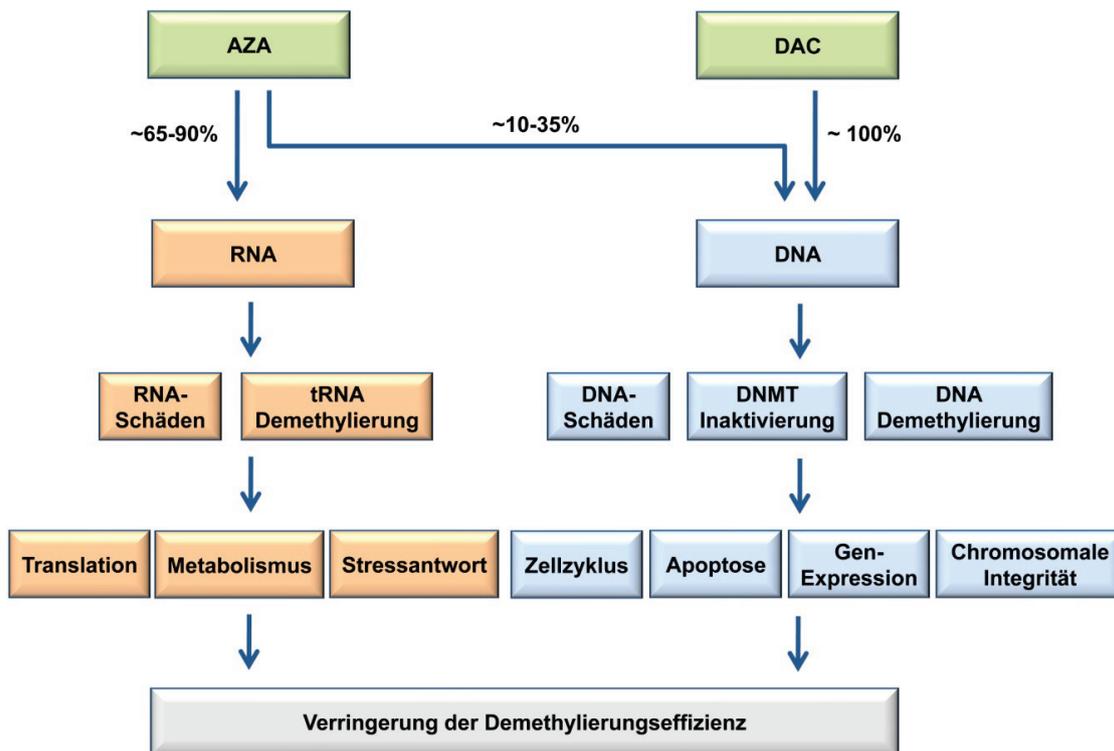


Abbildung 55 Auswirkungen der Inkorporierung von Azanucleosiden in die DNA und RNA. Der Einbau von Azanucleosiden in die DNA führt zu einer Schädigung und Demethylierung der DNA. Dieser Vorgang löst wiederum funktionelle Störungen des Zellmetabolismus aus, die sich negativ auf die Demethylierungseffizienz der Wirkstoffe auswirken. Der Einbau von AZA in die RNA führt zu einer weiteren Erhöhung der Zytotoxizität durch die Störung des zellulären RNA-Metabolismus, was die DNA-Demethylierungseffizienz zusätzlich verringert.

Basierend auf diese Ergebnisse ist für AZA die Etablierung einer optimalen Konzentration für maximale Demethylierung notwendig, während DAC über einen vergleichsweise großen Konzentrationsbereich (1-10 μM) effizient demethyliert. Zusätzlich zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass zur Erreichung der maximalen DNA-Demethylierung neben der Wirkstoffkonzentration auch die Vitalität der Zellen und der Behandlungszeitraum eine Rolle spielte. Dabei wurde die maximale Demethylierung nach etwa 24 Stunden erreicht und blieb daraufhin weitgehend konstant. Diese Beobachtung steht im Einklang mit anderen Studien, die ebenfalls zeigten, dass die Methylierungsmuster in demethylierten Zellen über mehrere Tage erhalten bleiben können [210].

Die unterschiedliche Demethylierungseffizienz von AZA und DAC ist auch für die klinische Applikation der Wirkstoffe von Relevanz, denn die Etablierung optimaler Wirkstoffdosen und Behandlungszeiträume bildet die Grundlage für eine erfolgreiche Therapie. Außerdem bleibt zu untersuchen, ob und in welchem Maße zusätzlich zu der demethylierenden Wirkung auch die zytotoxischen Effekte der Wirkstoffe bei einer klinischen Antwort des Patienten eine Rolle spielen.

3.2 Wirkstoff-induzierte Demethylierungsmuster unterscheiden sich von Methylierungsmustern in DNMT-Knockout Zellen

Zur detaillierten Charakterisierung der Azanukleosid-induzierter DNA-Demethylierungsmuster wurden genomweite Infinium-Methylierungsarrays verwendet. Die hohe Auflösung dieser Arrays sowie die genaue Reproduzierbarkeit der Daten ermöglichten eine detaillierte Analyse des Methylierungszustandes von mehr als 27000 CGs pro Probe, die etwa 14000 genassoziierte Promotorregionen repräsentieren [195]. Durch den genomweiten Vergleich von Azanukleosid-induzierter Demethylierung mit Methylierungsmustern, die durch den spezifischen Knockout von DNMTs entstehen, konnte die Azanukleosid-induzierte Inaktivierung von DNMTs näher charakterisiert werden.

Eine interessante Beobachtung zeigte sich bereits beim Vergleich der Demethylierungsmuster zwischen verschiedenen DNMT-Knockout Zellen: Dabei wurde ein synergistischer Effekt des DNMT1- und DNMT3B-Doppelknockouts auf die Demethylierung festgestellt. Der gleichzeitige Knockout beider Enzyme in DKO-Zellen führte zu einer mehr als doppelt so starken Demethylierung, als durch die Addition der Einzelknockout-Effekte auf die Methylierung zu erwarten war. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass beide Enzyme den Ausfall des jeweils anderen Enzyms zu einem großen Teil kompensieren können, was auf eine funktionelle Ähnlichkeit von DNMT1 und DNMT3B hinweist. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Resultaten, die vorher an ausgewählten Kandidatengenomen in Krebs- und Mäusestammzellen mit inaktivierten DNMTs beobachtet wurden [76, 77]. Die daraus resultierende Annahme, dass DNMT1 und DNMT3B gemeinsam für die Erhaltungsmethylierung in HCT116-Zellen zuständig sind, wird auch durch die hohe Ähnlichkeit der Demethylierungsmuster in 1KO- und 3BKO-Zellen unterstützt: in 1KO-Zellen waren fast 80 % der CGs, die auch in 3BKO-Zellen demethyliert waren, ebenfalls demethyliert. Diese Tatsache lässt darauf schließen, dass DNMT1 die Funktion von DNMT3B in 3BKO-Zellen zu einem großen Teil übernehmen kann. In 1KO-Zellen konnte DNMT3B die Funktion von DNMT1 jedoch weniger effizient kompensieren, eine Gruppe von etwa 4000 CGs, die durch den Knockout von DNMT1 demethyliert worden war, konnte nicht ersatzweise durch DNMT3B methyliert werden. Dafür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: 1.) diese CGs wurden mit geringerer Effizienz oder gar nicht durch DNMT3B demethyliert, oder 2.) die Anzahl an DNMT3B-Molekülen innerhalb einer Zelle war zu gering, um die Aktivität von DNMT1 vollständig zu kompensieren. Zusammengefasst bedeutet dies, dass etwa 2/3 der methylierten, genassoziierten CGs sowohl durch DNMT1 als auch durch DNMT3B methyliert werden konnten, und ca. 1/3 der CGs ausschließlich DNMT1-Zielgene waren.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Array-Analyse, dass DNMT3B in HCT116-Zellen eine wichtige Rolle in der Erhaltungsmethylierung genassoziierter CGs spielt. Diese Beobachtung wird durch *in vitro*-Methylierungsassays mit rekombinanten DNMT3A und DNMT3B-Enzymen unterstützt, die eine ähnliche Methylierungsaktivität für unmethylierte und hemimethylierte DNA zeigten [57]. Inwieweit sich die methylierungserhaltende Funktion von DNMT3B auch auf andere Zelltypen übertragen lässt, ist bislang nicht untersucht worden. Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass DNMT3B bei verschiedenen Krebsarten überexprimiert wird und die erhöhte Aktivität mit einer Hypomethylierung bestimmter Genregionen korreliert [211, 212]. Diese Beobachtung impliziert, dass dieses Enzym auch in vielen anderen Krebsarten eine ähnliche Funktion ausüben kann. In Anbetracht der in dieser Studie beobachteten Zielgen-Spezifität dieser Methyltransferase könnte DNMT3B eine wichtige Rolle in der Etablierung tumorspezifischer Methylierungsmuster spielen. Diese Vermutung steht im Einklang mit einer anderen Studie, die eine Etablierung genspezifischer *de novo*-Methylierungsmuster nach DNMT3B-Überexpression in Mäusen beschreibt [213].

Eine zusätzliche interessante Beobachtung zeigte sich bei näherer Betrachtung der Effekte des DNMT3B-Knockouts auf die genspezifische Methylierung. Neben einer Gruppe von demethylierten CGs wurde eine relativ hohe Anzahl an hypermethylierten CGs beobachtet. Diese Hypermethylierung kann verschiedene Ursachen haben: eine zufällige Hypermethylierung dieser Loci könnte zu einem selektiven Vorteil dieser Klone innerhalb der DNMT3B-Knockout Zelllinie geführt haben, was zu einer Anreicherung der hypermethylierten Klone führte. Allerdings konnte anhand einer Gene Ontologie-Analyse keine signifikant angereicherte Gengruppe identifiziert werden, deren Funktion diese Hypothese bestätigen würde (Anhang 7). Eine weitere Erklärungsmöglichkeit könnte sein, dass das Fehlen des DNMT3B-Enzyms durch ein anderes Enzym der DNMT-Familie "überkompensiert" worden sein könnte. Es ist z.B. bekannt, dass DNMT3A und DNMT3B das Fehlen des jeweils anderen Enzyms in Mäusen teilweise kompensieren können [71]. Trotzdem gibt es auch Hinweise auf Unterschiede in der Zielgenspezifität und dem Methylierungsmechanismus der DNMT3-Enzyme [72, 74]. Im Falle einer abweichenden Zielgenspezifität von DNMT3A könnte die Kompensation des DNMT3B-Knockouts durch dieses Enzym zu einer *de novo*-Methylierung zusätzlicher Genregionen führen.

Es wird angenommen, dass eine Behandlung mit AZA und DAC zu einer Inaktivierung der zum Zeitpunkt der Behandlung aktiven DNA-Methyltransferasen führt. Dementsprechend sollten die Enzymmengen trotz unterschiedlich starker Expression der verschiedenen Methyltransferasen durch Azanukleosidbehandlung in HCT116-Zellen im gleichen

Verhältnis verringert werden. Trotzdem zeigten die Wirkstoff-induzierten Demethylierungsmuster keinen intermediären Phänotyp der Demethylierungsmuster von 1KO- und 3BKO-Zellen, sondern eine höhere Ähnlichkeit zu dem Methylierungsmuster in Zellen mit inaktiviertem DNMT1-Enzym. Dies könnte bedeuten, dass DNMT1 in HCT116-Zellen verhältnismäßig stärker inaktiviert wurde als DNMT3B. Ein Grund dafür könnte die verstärkte Aktivität dieses Enzyms während der Replikation sein: durch die Assoziation mit der Replikationsgabel könnte DNMT1 während der Methylierung des neu-synthetisierten Tochterstranges direkt an die frisch inkorporierten Azanukleoside binden und auf diese Weise einen Großteil der Wirkstoffe inaktivieren. Diese Hypothese könnte auch die weniger starke Verringerung der DNMT3B-Enzyme im Vergleich zu DNMT1 im Western Blot erklären (Abbildung 13). Die Beobachtung, dass ein Großteil der durch AZA- und DAC-Behandlung demethylierten CGs auch in DKO-Zellen demethyliert wurde, ist aufgrund der hohen Anzahl demethylierter CGs in DKO-Zellen weniger relevant als die Überlappung mit dem 1KO-Methylierungsmuster.

3.3 DNA-Sequenzkontext und Chromatinumgebung beeinflussen die Demethylierungseffizienz

Bei der Analyse biologischer Replikate von AZA- bzw. DAC-behandelten HCT116-Zellen zeigte sich bereits eine sehr hohe Reproduzierbarkeit der Demethylierungsmuster. Trotz leichter Unterschiede in der Demethylierungseffizienz zwischen den Replikaten überlappten die demethylierten CGs viel stärker (~50-Mal stärker für DAC und ~200-Mal stärker für AZA) als durch eine zufällige Demethylierung von genomischer DNA zu erwarten war. Diese hohe Übereinstimmung im Demethylierungsmuster der Replikate lässt darauf schließen, dass die Demethylierung durch AZA und DAC nicht nach einem zufälligen Muster geschah, sondern spezifisch war. Ähnliche Beobachtungen im direkten Vergleich der Azanukleosid-induzierten Demethylierungsmuster mit demethylierten CGs in DNMT-Knockout Zelllinien unterstreichen die Hypothese, dass spezifische CGs durch Azanukleoside und in DNMT-Knockout Zelllinien demethyliert wurden.

Bei der näheren Analyse des Demethylierungsmechanismus stellte sich heraus, dass die Effizienz der Demethylierung nicht nur von dem eingesetzten Wirkstoff oder der Spezifität der jeweils inaktivierten Methyltransferase abhing, sondern auch von dem DNA-Sequenzkontext des zu demethylierenden CG-Dinukleotids. Dabei hing die Effizienz der Demethylierung einerseits vom Methylierungsgrad der CG-Dinukleotide ab und andererseits von deren Lokalisation innerhalb oder außerhalb von CpG-Inseln (CGIs). In der Regel wurden CGs außerhalb von CGIs durch Azanukleosid-Behandlung oder DNMT-

Knockout stärker demethyliert als diejenigen CGs, die mit CpG-Inseln assoziiert waren. Ein Grund dafür könnte die höhere Dichte der methylierten CGs in CGIs sein. Diese könnten eine Rekrutierung von Methyl-CG-bindenden Proteinen bewirken, die über verschiedene Mechanismen eine Aufrechterhaltung der Methylierung unterstützen. Es sind drei verschiedene Proteinfamilien bekannt, die methylierte DNA in Säugetieren binden können [214]: die erste Familie besteht aus Proteinen, die eine Bindedomäne für methylierte DNA (methyl-CpG binding Domain, MBD) besitzen. Zu ihr zählen die Enzyme MBD1, MBD2, MBD4 und MeCP2. Die Enzyme UHRF1 und UHRF2 bilden die zweite Familie und zeichnen sich durch eine SET- und Ring Finger-assoziierte Domäne (SRA) aus [215]. Die dritte Familie besteht aus den drei Zink-Finger Proteinen Kaiso, ZBTB4 und ZBTB38. Für einige dieser Proteine (z.B. MeCP2 und MBD1) wurde sogar gezeigt, dass sie methylierte Cytosine mit sequenzabhängiger Spezifität binden können [214] und dass die Affinität einiger Methylcytosin-bindender Proteine in DNA-Sequenzen mit multiplen Methylcytosinen erhöht ist [216]. Die Bindung dieser Proteine an methylierte DNA wird generell mit der Etablierung eines inaktiven Chromatinzustandes und einer Repression der Transkription in Verbindung gebracht [217]. Dazu interagieren die methylbindenden Enzyme mit einer Reihe anderer Proteine wie z.B. Histon Deacetylasen, Histon Methyltransferasen und DNMTs [105, 217, 218] und gewährleisten auf diese Weise die Aufrechterhaltung des Methylierungsstatus.

Zur Stabilisierung des inaktiven Zustandes trägt außerdem die Bindung von Proteinen aus der Polycomb Gruppe (PcG) bei. Dabei vermittelt das Enzym EZH2 zunächst die repressive H3K27-Trimethylierung des Lysins 27 im Histon 3 (6-9) und ermöglicht somit die Bindung weiterer Proteinkomplexe, die zu der Etablierung eines repressiven Chromatinstatus beitragen (6-8). Das EZH2-Enzym bildet zusammen mit den Proteinen EED und SUZ12 den PRC2-Komplex, der in Verbindung mit dem PRC1-Komplex eine stabile Vererbung des inaktiven Genzustands ermöglicht. Es ist außerdem bekannt, dass Proteine des Polycomb-Komplexes Methyltransferasen spezifisch an bestimmte Gene heranziehen können und somit eine Methylierung dieser Regionen induzieren [91]. Weiterhin wird gibt es Hinweise darauf, dass die spezifische Bindung von Komponenten des PRC2-Komplexes die Hypermethylierung bestimmter Genpromotoren in der Krebsentstehung durch die Rekrutierung von DNA-Methyltransferasen induzieren kann [199, 201, 219]. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung waren diejenigen Gene, die im Infinium-Array dieser Dissertation eine stark methylierte Promotorregion zeigten, überdurchschnittlich häufig mit Komponenten des PRC2-Komplexes assoziiert. Interessanterweise verhinderte die Assoziation mit Komponenten des PRC2-Komplexes sogar eine effiziente Demethylierung dieser CGs. Diese Beobachtung deutet darauf hin,

dass der Zustand des Chromatins in stark methylierten Regionen eine schnelle Neumethylierung von CGs, z.B. durch die Bindung von DNMTs, bewirken kann. Das Modell in Abbildung 56 verbildlicht diesen Vorgang.

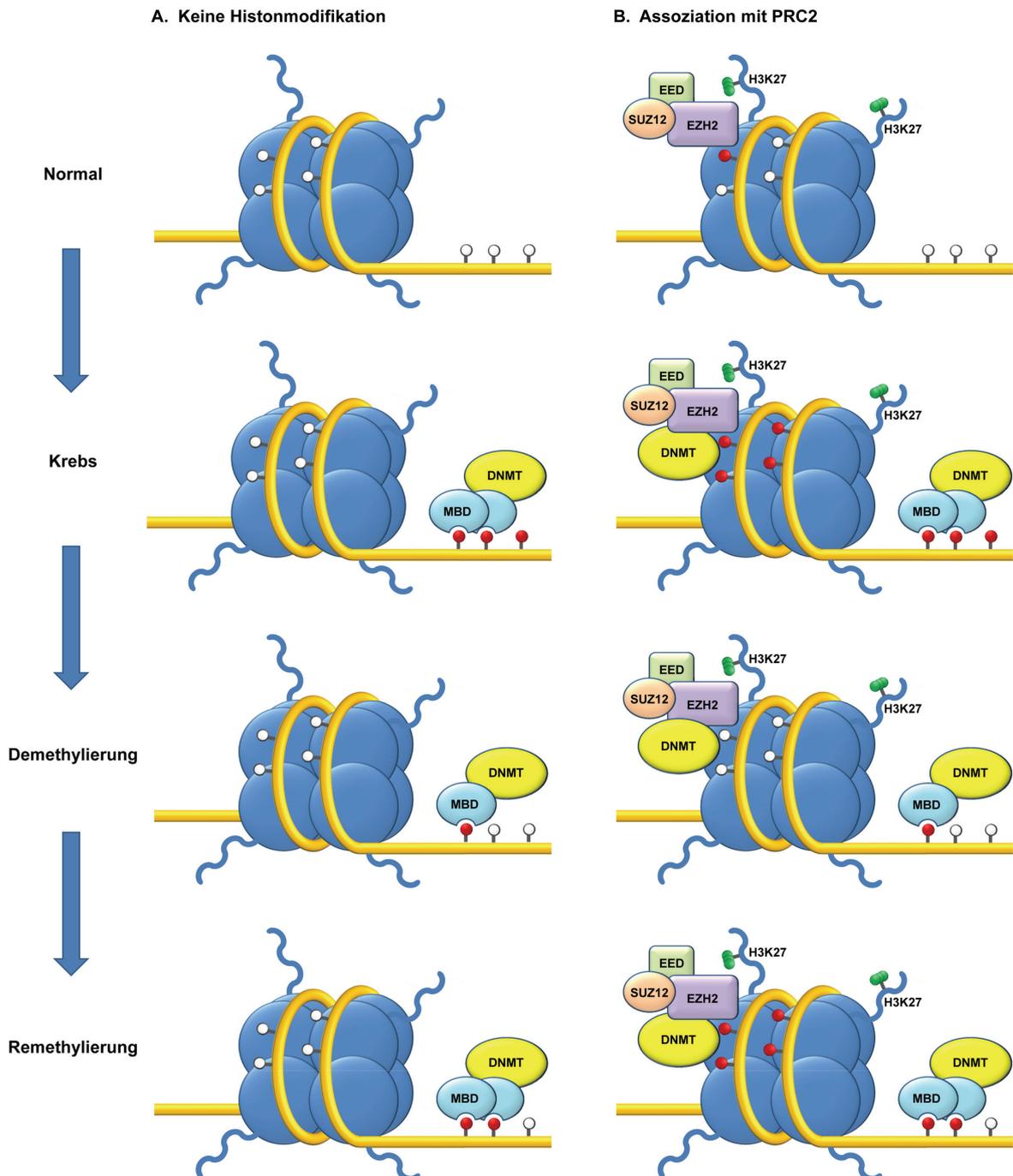


Abbildung 56 Die DNA-Demethylierungseffizienz wird von der Chromatinumgebung beeinflusst. Die Promotorregionen von mit PRC2-Komponenten assoziierten Genen werden in Krebs häufig hypermethyliert. Dies geschieht vermutlich durch eine verstärkte Bindung von DNA-Methyltransferasen (DNMTs). Die Rekrutierung von DNMTs könnte eine schnelle Neumethylierung dieser Gene nach chemischer oder genetischer Inaktivierung der Methyltransferasen bewirken. Auch die sequenzspezifische Bindung von Proteinen an methylierte Cytosine könnte durch eine Rekrutierung von DNMT1 die schnelle Neumethylierung dieser Regionen fördern.

In DKO-Zellen wurde bezogen auf die Demethylierungseffizienz keine Präferenz für einen bestimmten Sequenzkontext bzw. Methylierungsgrad beobachtet; dementsprechend konnte in diesen Zellen auch kein Zusammenhang zwischen der Assoziation mit PRC2-Komponenten und einer verminderten Demethylierungseffizienz festgestellt werden. Die Effizienz der Demethylierung war in DKO-Zellen für PRC2-assoziierte Gene sogar relativ hoch. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass langzeitkultivierte DNMT-Knockout Zellen höchstwahrscheinlich nicht nur ein stark verändertes Methylierungsmuster aufweisen, sondern auch Veränderungen in ihrer Chromatinstruktur erfahren haben, was die vergleichsweise unspezifische DNA-Demethylierung in DKO-Zellen erklären könnte.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse einen deutlichen Zusammenhang zwischen Chromatinstatus und Demethylierungseffizienz in HCT116-Zellen, was die beobachteten regionsabhängigen Unterschiede in der DNA-Demethylierung erklären würde. Auch die nicht-zufällige Überlappung der Demethylierungsmuster in Azanukleosid-behandelten HCT116-Zellen und DNMT-Knockout Zellen könnte durch eine weniger schnelle Neumethylierung dieser Regionen erklärt werden, die durch einen andersartigen Chromatinzustand dieser Regionen verursacht werden könnte.

Diese Ergebnisse liefern wichtige Ansätze zur Optimierung der epigenetischen Therapie: Eine Kombination von DNMT-Inhibitoren mit chromatinmodulierenden Wirkstoffen könnte demnach die demethylierende Wirkung von AZA oder DAC verstärken bzw. den demethylierten Zustand von Genen aufrecht erhalten. Zum Beispiel gibt es Hinweise darauf, dass nach transienter DNA-Demethylierung und Reaktivierung von Genen häufig eine Neumethylierung und erneute Repression der Transkription zu beobachten ist [77]. Auch in Patienten wurden demethylierte Gene kurze Zeit nach der Wirkstoffbehandlung wieder neu methyliert [174]. Diese schnelle Neumethylierung von Genen könnte auf die Erhaltung eines unveränderten Chromatinzustandes zurückgeführt werden, der die Methyltransferasen an die zu methylierenden Regionen dirigiert und auf diese Weise die Effizienz der Therapie verringert. Die Kombination von DNMT- und HDAC-Inhibitoren zur Behandlung von Krebs führte im Zellkultursystem zu einer verstärkten Expression hypermethylierter Tumorsuppressorgene [220]. In frühen klinischen Studien werden aktuell verschiedene Kombinationen von DNMT- und HDAC-Inhibitoren getestet. Allerdings lässt sich noch nicht eindeutig sagen, ob diese Kombinationen erfolgreicher sind, als die alleinige Verabreichung von AZA oder DAC [221].

Eine weitere Therapieoption liegt in der Inhibierung von PRC2-Komponenten zur Verringerung der H3K27-Trimethylierung. Diese Histonmodifikation korrelierte in dieser Studie stark mit einer verringerten Demethylierungseffizienz. Der Wirkstoff

3-Deazaneplanocin A (DZNep) wäre ein möglicher Kandidat für eine Kombinations-therapie. Im Zellkultursystem wurde bereits gezeigt, dass eine Behandlung mit diesem Wirkstoff die Methylierung von H3K27 sowie H4K20 verhindert und in Krebszellen stillgelegte Gene wieder aktivieren kann [222].

Die gezeigten Ergebnisse lassen vermuten, dass die Kombination aus DNA-Demethylierung und einer aktivierenden Veränderung der Chromatiumgebung zu einer effizienteren und länger andauernden DNA-Demethylierung in der epigenetischen Therapie führen kann.

3.4 Identifizierung zellulärer Signalwege, die von Azacytidin moduliert werden

3.4.1 Charakterisierung resistenzmodulierender Faktoren für Azanukleoside

Die Ergebnisse klinischer Studien zeigen, dass nicht alle epigenetisch therapierten Patienten in gleichem Maße auf die Wirkstoffe ansprechen [172]. Die spezifischen Ursachen dieser differenziellen Auswirkungen sind bislang weitgehend unbekannt, es ist jedoch anzunehmen, dass interindividuelle Unterschiede in der physiologischen Zellantwort auf AZA oder DAC existieren und die Toxizität und/oder die DNA-Demethylierungseffizienz der Wirkstoffe entweder erhöhen oder vermindern.

Es wurden bereits verschiedene resistenzvermittelnde Faktoren für Azanukleoside identifiziert. Zu diesem Zweck wurden in der Vergangenheit häufig resistente Zellen durch Langzeitbehandlung mit dem zu untersuchenden Wirkstoff selektiert und anschließend charakterisiert [182]. Dabei ist interessant, dass eine Resistenz gegenüber DAC nicht unbedingt auch eine Resistenz gegen AZA-Behandlung oder umgekehrt bedeutet. An einer leukämischen Zelllinie wurde z.B. gezeigt, dass DAC-resistente Zellen sensibel gegenüber AZA waren, wohingegen AZA-resistente Zellen gleichzeitig resistent gegen DAC waren [223]. Qin et al. (2009) zeigten ebenfalls, dass keine Korrelation zwischen einer Resistenz gegen AZA und einer Resistenz gegenüber DAC besteht [182]. Dies ist auch für die klinische Anwendung von großer Bedeutung, da die Therapie von Patienten, die eine Resistenz gegen AZA entwickeln, oft erfolgreich mit DAC fortgesetzt werden kann [173]. Eine Resistenz gegen Azanukleoside kann zum Beispiel durch einen verringerten Transport der Wirkstoffe in die Zelle bzw. einen erhöhten Transport der Wirkstoffe aus der Zelle heraus durch zelltypabhängige unterschiedliche Expression von Transportproteinen entstehen. Es wurde z.B. gezeigt, dass die Überexpression des konzentrativen Nukleosidtransporters CNT1 die Demethylierungseffizienz von AZA

erhöhte [224]. Andererseits korrelierte eine verringerte Expression der equilibrativen Nukleosidtransporter ENT1 und ENT2 mit einer Resistenz gegenüber DAC [182].

Als weiterer resistenzmodulierender Mechanismus kann eine veränderte Expression von Enzymen, die am Metabolismus oder Katabolismus der Wirkstoffe beteiligt sind, die Sensibilität gegenüber AZA oder DAC erhöhen bzw. vermindern. Die Resistenz gegenüber DAC kann zum Beispiel mit einer verringerten Expression der Deoxycytidin-Kinase einhergehen, die die Monophosphorylierung von DAC katalysiert und den limitierenden Schritt für den Einbau des Wirkstoffes in die DNA darstellt [182]. Weiterhin wurde in leukämischen Zellen beobachtet, dass die Resistenz gegenüber AZA mit einer verminderten Aktivität des analogen Enzyms im AZA-Metabolismus, der Uridin-Cytidin-Kinase, korrelierte [162]. Allerdings konnte eine phosphorylierende Aktivität gegenüber AZA bislang *in vitro* nicht nachgewiesen werden [154]. Die Überexpression des Enzyms Cytidin Deaminase wurde ebenfalls mit einer resistenzmodulierenden Wirkung in Verbindung gebracht [182, 225]. Die Cytidin Deaminase deaminiert AZA und DAC zu 5-Aza-Uridin bzw. 5-Aza-2'-Deoxyuridin. Während die erhöhte Expression der Cytidin Deaminase in DAC-behandelten Krebszellen und Patienten eine Resistenz gegenüber dem Wirkstoff bewirkte [140, 225], korrelierte eine stärkere Expression dieses Enzyms in AZA-behandelten *E. coli*-Zellen mit einer Erhöhung der Toxizität [226]. Dieser Unterschied zwischen beiden Wirkstoffen kann dadurch erklärt werden, dass die deaminierte Form von DAC inaktiv ist [227], während die deaminierte Form von AZA nach Phosphorylierung zu 5-Aza-UTP in die RNA eingebaut werden kann. Dort hemmt 5-Aza-Uracil durch eine erhöhte Instabilität des Pyrimidinringes die Proteinsynthese weit effektiver als Azacytidin [226]. Diese Beobachtungen unterstreichen zusätzlich die unterschiedliche Wirkungsweise von AZA und DAC und liefern eine weitere Erklärung für die erhöhte Toxizität dieses Wirkstoffes. Während eine Resistenz gegenüber DAC direkt mit einer verminderten DNA-Demethylierung und somit einem verminderten Einbau in die DNA korreliert [182], sind die Mechanismen zur Entstehung von Resistenzen gegenüber AZA bis heute nicht ausreichend charakterisiert worden.

Das genomweite Hochdurchsatz RNAi-Screening stellt eine moderne und effiziente Methode zur Identifizierung von resistenzmodulierenden Faktoren dar [228]. Interessanterweise wurde in dem in dieser Studie durchgeführten RNAi-Screen mehrere Enzyme des Nukleotidstoffwechsels sowie Nukleotid-Transporter als signifikante Hits identifiziert. Darunter befand sich auch das vielversprechende Enzym Uridin-Cytidin-Kinase, dessen resistenzmodulierende Eigenschaft bereits vermutet wurde. Allerdings konnte die Uridin-Cytidin-Kinase als Resistenz-Modifikator in nachfolgenden Versuchen

nur mit dem im RNAi-Screen verwendeten siRNA-Pool validiert werden. Andere siRNAs, die gegen dasselbe Zielgen gerichtet waren, führten jedoch nicht zu einem vergleichbaren Phänotyp. Zusätzlich zeigte weder die Hemmung der Enzymaktivität mit verschiedenen Inhibitoren noch die Überexpression eine eindeutige Modifikation des durch AZA-Behandlung verursachten Phänotyps. Auch die resistenzmodulierende Funktion sechs weiterer validierter Hits konnte unter Verwendung spezifischer Inhibitoren bzw. nicht-gepoolter siRNAs nicht eindeutig verifiziert werden. Von den insgesamt vier verschiedenen, gegen dasselbe Zielgen gerichteten siRNAs, führten nur eine oder zwei siRNAs pro Hit zu einem ähnlichen Phänotyp, wie er im RNAi-Screen oder in der Validierung mit siRNA-Pools beobachtet worden war. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die durch den RNAi-Screen identifizierten Hits durch unspezifische (Off-Target) Effekte verursacht wurden und der AZA-sensibilisierende bzw. -resistente Phänotyp nicht durch den Knockdown des eigentlichen siRNA-Zielgens entstand. Aus Zeitgründen wurden in dieser Studie keine weiteren Hits validiert, dennoch besteht die Möglichkeit, dass sich unter den mit den siRNA-Pools validierten Hits AZA-resistenzmodifizierende Kandidaten befinden. Zusätzlich zu diesem RNAi-Screen werden weitere Screenings notwendig sein, um die Wirkungsweise von Azanukleosiden besser zu verstehen. Dabei könnte die Verwendung von siRNA-Bibliotheken, die keine siRNA-Pools sondern mehrere, gegen dasselbe Zielgen gerichtete siRNAs getrennt abfragen, von Vorteil sein, um Off-Target-Effekte zu minimieren bzw. besser zu identifizieren. Ein vergleichendes RNAi-Screening von AZA- und DAC-behandelten Zellen würde außerdem eine effizientere Identifizierung von AZA-spezifischen Resistenzfaktoren ermöglichen, da unerwünschte sekundäre Effekte auf die Vitalität auf diese Weise einfacher identifiziert werden können. Diese entstehen z.B. durch eine verminderte Zellteilungsrate, die durch die Transfektion bestimmter siRNAs ausgelöst werden kann. Dadurch werden weniger Azanukleosid-Moleküle metabolisiert, was wiederum eine indirekte Resistenz gegen AZA bzw. DAC erzeugt.

Zusammengefasst bilden die in diesem RNAi-Screen identifizierten signifikanten Hits, die in dieser Studie nicht näher analysiert wurden, eine mögliche Grundlage zur Identifizierung von AZA-resistenzmodifizierenden Kandidaten und außerdem eine Vergleichsbasis für zukünftige Screens. Die etablierten Screening-Bedingungen bilden außerdem eine wichtige Grundlage zur weiteren Optimierung von Hochdurchsatz-Screening-Verfahren, die die Identifikation von Azanukleosid-Resistenzmodifikatoren zum Ziel haben.

3.4.2 GADD45A hat keinen Einfluss auf die globale DNA-Methylierung

Als ein möglicher Faktor zur Erhöhung der Demethylierungseffizienz von AZA wurde in dieser Studie das als „aktive Demethylase“ bezeichnete Protein GADD45A untersucht, da dessen Expression nach AZA-Behandlung erhöht war. Nach eingehender Analyse stellte sich jedoch heraus, dass GADD45A keinen Einfluss auf die globale DNA-Methylierung hatte: Trotz Verwendung identischer Zelllinien und Expressionsvektoren führte weder der Knockdown des Proteins zu einer DNA-Hypermethylierung noch induzierte die Überexpression des humanen GADD45A-Proteins eine globale Demethylierung, wie von Barreto et al. (2007) beobachtet worden war [86]. Stattdessen stellte sich heraus, dass die demethylierende Eigenschaft des *Xenopus*-GADD45A-Konstruktes von Barreto et al. (2007) nicht auf die Aktivität des Proteins, sondern auf eine sich im Puffer befindende demethylierende Substanz zurückzuführen war. Auch in anderen Studien konnten keine Methylierungsveränderungen nach der Überexpression von GADD45A im Zellkultursystem [87] oder in GADD45A-Knockout-Mäusen beobachtet werden [88]. Somit kann auch ein positiver Einfluss der GADD45-Expression auf die Demethylierungseffizienz von AZA ausgeschlossen werden.

3.4.3 Die AZA-induzierte Demethylierung von tRNAs erhöht die Toxizität des Wirkstoffes

Neben der Identifizierung von Faktoren, die eine Resistenz gegenüber AZA bzw. DAC verursachen, ist die Charakterisierung von Signalwegen, die zu einer Erhöhung der Zytotoxizität dieser Wirkstoffe führen, ebenfalls von großer Wichtigkeit für das Verständnis der Wirkungsweise von Azanukleosiden. Dies ist insbesondere für die Behandlung mit AZA relevant, da in den in dieser Studie verwendeten Assays stets eine höhere Zytotoxizität für AZA als für DAC beobachtet wurde. Dass diese Beobachtung kein zelltypspezifisches Phänomen ist, bestätigen Proliferations-Assays des NCI (National Cancer Institute, USA) an verschiedenen mit AZA und DAC behandelten Krebszelllinien, in denen 51 von 55 Zelllinien eine höhere Sensibilität gegenüber AZA zeigten. Dass die höhere Zytotoxizität von AZA auch von klinischer Relevanz sein kann, zeigen indirekt die Ergebnisse der in dieser Studie durchgeführten Assays zur Bestimmung der metabolischen Aktivität in leukämischen Zelllinien. In diesem Modellsystem für die epigenetische Krebstherapie induzierte AZA ebenfalls eine weit höhere Zytotoxizität als DAC. Wie bereits zu Beginn der Diskussion erwähnt, wird die AZA-spezifische Toxizität nicht durch den Einbau des Wirkstoffes in die DNA verursacht. Es ist somit wahrscheinlich, dass der Einbau von AZA in die RNA zusätzliche Signalwege aktiviert, die zu den zytotoxischen Nebenwirkungen dieses Wirkstoffes auf die zelluläre Physiologie

beitragen. Während die Inkorporierung von Azanukleosiden in die DNA von der Replikation abhängig ist, ist der Einbau in die RNA abhängig von der transkriptionellen Aktivität der Zellen und somit weitestgehend unabhängig vom Zellteilungszyklus. In der RNA wurden nach Behandlung mit AZA in verschiedenen Zelllinien etwa 65-90 % der AZA-Moleküle nachgewiesen [152], die dort zu einer Störung der Proteintranslation führten [152]. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Signifikanz der AZA-induzierten Signalwege auf RNA-Ebene.

Bisherige Studien konnten zwar zeigen, dass der Einbau von AZA in die RNA Auswirkungen auf die Effizienz der Proteinsynthese hat [152], der genaue Mechanismus dieses Vorganges ist bislang allerdings nicht eindeutig aufgeklärt worden. Nach den Ergebnissen aktueller Studien führt die Behandlung mit AZA zu einer Demethylierung von tRNAs [59]. Bei den demethylierten Zielsequenzen handelte es sich interessanterweise um Cytosine, die durch die RNA-Methyltransferase DNMT2 methyliert werden [60]. Da der katalytische Mechanismus der RNA-Methylierung durch DNMT2 mit dem Mechanismus der DNA-Methylierung übereinzustimmen scheint [206], wäre es möglich, dass eine Behandlung mit Azanukleosiden die DNMT2-Enzyme auf RNA-Ebene in ähnlicher Weise deaktiviert wie DNMT1, DNMT3A und DNMT3B auf DNA-Ebene.

Die funktionelle Bedeutung der tRNA-Methylierung liegt in der Regulierung der Stabilisierung und Faltung von tRNAs [61, 229, 230]. Dabei kann das Fehlen bestimmter Modifikationen den Abbau von tRNAs durch bislang nicht vollständig verstandene Mechanismen verursachen [231, 232]. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass tRNAs nach der Auslösung von zellulärem Stress durch Hitzeschock oder UV-Strahlung von Ribonukleasen geschnitten werden, was zu einer Hemmung der Proteintranslation führt [233]. Aktuelle Analysen in unserem Labor weisen außerdem darauf hin, dass eine nicht vorhandene Methylierung an DNMT2-Zielsequenzen die ribonukleolytische Spaltung von tRNAs unter zellulären Stressbedingungen erleichtern kann (unpublizierte Daten). Eine Hemmung der Proteintranslation durch AZA-induzierte tRNA-Demethylierung könnte neben den Effekten, die durch AZA-induzierte Schädigung der DNA entstehen, zu der beobachteten Verringerung der metabolischen Aktivität in AZA-behandelten Zellen beitragen. Die in dieser Dissertation vorgestellten Ergebnisse zeigen außerdem, dass tRNAs sensibler auf AZA-induzierte Demethylierung reagieren als DNA-Sequenzen, und somit auch geringe Wirkstoffkonzentrationen ($< 0,5 \mu\text{M}$) den RNA-Metabolismus beeinflussen können. Inwieweit sich eine Störung der zellulären Stressantwort durch den Einbau von AZA in die RNA im Rahmen der epigenetischen Therapie auf Patienten auswirkt, bleibt zu untersuchen. Dabei muss zusätzlich die zellzyklusunabhängige

Aktivität von AZA auf RNA-Ebene berücksichtigt werden, die nicht nur sich schnell teilende Krebszellen betrifft, sondern möglicherweise jede mit dem Wirkstoff in Kontakt kommende Körperzelle. Aufgrund der hohen Sensitivität könnte die RNA-Demethylierung jedoch auch als früher Biomarker für ein positives Ansprechen auf die epigenetische Therapie verwendet werden. Die Auswirkungen von AZA auf den RNA-Metabolismus sollten in zukünftigen Studien im Detail analysiert werden, um potenzielle Auswirkungen auf Patienten in der epigenetischen Krebstherapie einschätzen zu können.

3.5 Array-basierte Analysen befürworten die Entwicklung spezifischer DNMT-Inhibitoren zur Optimierung der epigenetischen Krebstherapie

Die durch die Ergebnisse der genomweiten Methylierungsanalyse unterstützte Theorie einer nicht-zufälligen Demethylierung wirft die Frage auf, inwieweit die Demethylierung der eigentlichen Zielgene der epigenetischen Therapie von den beschriebenen Faktoren beeinflusst wird. Zu diesem Zweck wurde die Demethylierung krebsassoziierter Gene und insbesondere von Tumorsuppressorgenen unter Verwendung des Infinium-Arrays analysiert. Die Gruppe der krebsassozierten Gene umfasste verschiedene funktionelle Klassen, wie z.B. DNA Reparatur, Differenzierung, Kontrolle des Zellzyklus, und Apoptose [202]. Bei der Analyse der Methylierungsdaten stellte sich zunächst heraus, dass krebsassoziierte Gene in HCT116-Zellen in der Regel stärker methyliert waren als nicht-krebsassoziierte Gene. Dieses Ergebnis steht mit der Hypothese im Einklang, dass die Stilllegung von Zellteilungs- bzw. Zelltod-regulierenden Genen durch Hypermethylierung im Verlauf der Tumorgenese zu einem selektiven Vorteil dieser Zellen führt [112]. Hypermethylierte krebsassoziierte CGs wurden durch die Behandlung mit AZA oder DAC in dieser Studie jedoch in gleichem Maße demethyliert wie nicht-krebsassoziierte Gene. Auffällig war dabei die geringe Effizienz der Azanukleosid-induzierten Demethylierung für krebsassoziierte CGs im Vergleich zu 1KO- und DKO-Zellen. Die in dieser Studie durchgeführten Experimente deuten darauf hin, dass die Demethylierungseffizienz von AZA und DAC nur schwer zu steigern ist. Während eine Erhöhung der Wirkstoffkonzentrationen die Zytotoxizität steigert und somit die Effizienz verringert, führt eine Langzeitbehandlung mit weniger toxischen Wirkstoffkonzentrationen zu einer Selektion von Klonen, die nicht nur gegenüber der Toxizität des Wirkstoffes, sondern auch gegenüber Azanukleosid-induzierter DNA-Demethylierung resistent sind [182]. Zur Steigerung der Demethylierungseffizienz kommen folgende Strategien in Frage: 1.) Die Reduktion der zytotoxischen Eigenschaften von Azanukleosiden, 2.) die Erhöhung der Spezifität von AZA und DAC für krebsassoziierte Zielsequenzen und 3.) die Entwicklung neuer Wirkstoffe.

Ein vielversprechender Ansatz zur Optimierung der epigenetischen Therapie ergab sich aus der Analyse der DNMT-Knockout Zellen: interessanterweise führte der Knockout von DNMT1 dazu, dass krebsassoziierte CGs in HCT116-Zellen im Verhältnis effizienter demethyliert wurden als nicht-krebsassoziierte Gene. In DKO-Zellen, die weder DNMT1 noch DNMT3B besaßen, war diese Präferenz zur Demethylierung von krebsassoziierten Genen noch viel deutlicher ausgeprägt. Die signifikant höhere Demethylierungseffizienz der DKO-Zellen bezog sich sowohl auf krebsassoziierte CGs als auch auf die Untergruppe der Tumorsuppressorgene und kann auf den synergistischen Effekt des DNMT-Doppelknockouts zurückgeführt werden. Diese Ergebnisse sind aus zwei Gründen interessant, denn sie zeigen 1.) dass der gemeinsame Knockout von DNMT1 und DNMT3B zu einer erheblich stärkeren Demethylierung von krebsassoziierten Genen führte als die Behandlung mit AZA oder DAC und 2.) dass krebsassoziierte Gene in 1KO- und DKO-Zellen unerwarteter Weise mit einer erhöhten Präferenz demethyliert wurden, was einen großen Vorteil für die epigenetische Therapie bedeuten würde. Eine Erklärung für die erleichterte Demethylierung von krebsassoziierten Genen könnte sein, dass epigenetische Mutationen, die z.B. durch die fehlerhafte Expression epigenetischer Modulatoren während der Krebsentwicklung entstehen, weniger gut stabilisiert werden als das natürliche Epigenom, das durch evolutiv konservierte Mechanismen etabliert und stabilisiert wird.

Die mit geringerer Zytotoxizität gepaarte höhere Demethylierungseffizienz des Doppelknockouts von DNMT1 und DNMT3B unterstützt die Folgerung, dass eine spezifische Inhibierung beider Enzyme zur Erhöhung der Demethylierungseffizienz in der epigenetischen Therapie in Betracht gezogen werden sollte. Es wurden bereits *in vitro* spezifische Inhibitoren für DNMT1 und DNMT3B identifiziert [234], inwieweit diese Hemmstoffe auch *in vivo* einsetzbar sind, muss allerdings noch überprüft werden.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass die durch Azanukleosid-Behandlung oder DNMT-Knockout hervorgerufene DNA-Demethylierung kein zufälliger Prozess ist. Die Effizienz der Demethylierung scheint hingegen direkt von der Chromatinumgebung beeinflusst zu werden. Während die Demethylierungseffizienz von AZA und DAC trotz optimierter Konzentration vergleichsweise gering ist, bewirkt der spezifische Knockout von DNMT1 und DNMT3B eine starke Demethylierung krebsassoziierten Gene und bietet sich somit als alternative Strategie zur Steigerung der Effizienz epigenetischer Therapien an.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Material

4.1.1 Inhibitoren

Substanz	Lösungsmittel	Molekulargewicht	Konzentration der Stammlösung	Bezugsquelle
5-Azacytidin	UltraPure H ₂ O	244,2	5 mM	Sigma
5-Aza-2'-Deoxycytidin	UltraPure H ₂ O	228,2	5 mM	Calbiochem
Cyclopentenylcytosine (NSC: 375575)	DMSO	239,0	50 mM	NCI
Cyclopentenyluracil (NSC: 375574)	DMSO	240,0	50 mM	NCI
Fumitremorgin C	DMSO	379,5	5 mM	Sigma
5-Chloro-2,4-Dihydropyridin	DMSO	145,5	50 mM	TCI UK

Die Stammlösungen der verschiedenen Wirkstoffe wurden bei -80°C gelagert.

4.1.2 Expressions-Klone

cDNA	Vektor	Resistenz	Promotor
xGADD45A	pRKW2	Ampicillin	CMV
xGADD45A_cds	Gateway [®] pT-REx [™] -dest30	Ampicillin/Neomycin	CMV
hGADD45A	Gateway [®] pT-REx [™] -dest30	Ampicillin/Neomycin	CMV
xGADD45A_cds	Gateway [®] pT-REx [™] -dest30	Ampicillin/Neomycin	CMV
UCK1	Gateway [®] pT-REx [™] -dest30	Ampicillin/Neomycin	CMV
EGFP	pEGFP-N1	Kanamycin/Neomycin	CMV

4.1.3 siRNAs

Alle siRNAs wurden von Thermo Fisher Scientific (Dharmacon) bezogen.

Zielgen	Katalog-Nummer	Zielgen	Katalog-Nummer
APOBEC2	D-019944-01	UCK1	D-004062-01
	D-019944-03		D-004062-03
	D-019944-17		D-004062-05
	D-019944-18		D-004062-07
COMT	D-009520-01	DPYD	D-008376-01
	D-009520-04		D-008376-02
	D-009520-19		D-008376-04
	D-009520-20		D-008376-18
DPYD	D-008376-01	UBC	D-019408-01
	D-008376-04		D-019408-02
	D-008376-18		D-019408-03
	D-008376-02		D-019408-04
MPPED	D-017688-01	GADD45A	J-003893-07
	D-017688-02		J-003893-08
	D-017688-03		J-003893-09
	D-017688-04		J-003893-10
TM9SF4	D-020769-01	GADD45B	J-003894-07
	D-020769-02		J-003894-08
	D-020769-03		J-003894-09
	D-020769-04		J-003894-10
Rluc	P-002070-01		
siGENOME [®] siRNA Library-Protein Kinases			G-003505
siGENOME [®] siRNA Library-Genome			G-005000

4.1.4 Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller
Agar	Fluka
Agarose	Roth
Rotiphorese Acrylamidlösung 30 %	Roth
Ammoniumacetat	Sigma
Ammoniumpersulfat	Sigma
Ampicillin Natriumsalz	Sigma
β -Mercaptoethanol	Sigma
Bodipy FL EDA [®]	Molecular Probes
Borsäure	Fluka
Bradford Potein Assay	Bio-Rad
Bromphenolblau	Merck
Calciumchlorid	Fisher Chemikals
Coulter [®] Clenz [®]	Beckman Coulter
Coulter [®] Isoton [®] II Diluent	Beckman Coulter
Deoxynukleotid-Mix (25 mM je DNTP)	Stratagene
DEPC	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
ECL Chemilumineszenz-Lösung	Perkin-Elmer
EDC	Sigma
Ethanol	Riedel de Haen
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Roth
Formaldehyd	J.T. Baker
Glycerol	J.T. Baker
Glycin	AppliChem
Glykogen	Arcos Organics
Hefeextrakt	AppliChem
HEPES	Sigma
Hydrochinon	Sigma
Igepal CA-630	Sigma
Isopropanol	Merck

Kristallviolett	Sigma
Methanol	Merck
Milchpulver	Roth
Mineralöl	Sigma
Natriumchlorid	Merck
Natriumdeoxycholat	Sigma
Natriumhydrogenphosphat	Fluka
Natriumhydroxid-Perlen	Appllichem
Natriumhydroxid-Lsg. (1 mol/l)	J.T. Baker
Natriumpyrosulfit	Sigma
Propidiumiodid-Lösung	Roth
Rinder-Serum-Albumin (10 mg/ml)	New England Biolabs
Saccharose	Merck
Sodiumdodecylphosphat (SDS)	Merck
TEMED	Serva
Tris-HCl	Merck
TritonX 100	Gerbu
Trizma/Tris	Appllichem
Tryptone	AppliChem
UltraPure H ₂ O	Gibco
2-Mercaptoethanol	Sigma

4.1.5 Antikörper

Bezeichnung	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
GADD45a (H-165)	Kaninchen	1:500	Santa Cruz
DNMT1 (C-17)	Ziege	1:500	Santa Cruz
DNMT3B (N-19)	Ziege	1:500	Santa Cruz
Caspase-3 (IMG-144-A)	Maus	1:1000	Imgenex
b-Aktin (ab8226)	Maus	1:10000	Abcam
Anti-phospho-Histone H2A.X (Ser139), clone JBW301	Maus	1:1000	Millipore

4.1.6 Geräte

Bezeichnung	Hersteller
Analysewaage	Sartorius
Mithras Multimode Microplate Reader LB 940	Berthold Technologies
Tecan Microplate Reader	Tecan
Brutschrank	Heraeus
Eismaschine	Scotsman
FACSCanto™ II	Becton Dickinson
Gefrierschrank	Liebherr, Heraeus
Gel-Dokumentation	Herolab
Gelelektrophoresekammern	BioRad
Kühlschrank	Liebherr
LightCycler® 480	Roche
Magnetrührer	Heidolph
Mikroskop Axiovert 40 CFL	Zeiss
Mikrowellengerät	Bosch
P/ACE™ MDQ Molecular Characterization System	Beckman Coulter
PCR-Maschine	Biozym
Photometer	Eppendorf
SDS-PAGE-Elektrophoresekammer	BioRad
Sterilbank	Heraeus
Spannungsquellen	Stratagene, Consort
Tank-Blot System	BioRad
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge	Eppendorf
Transilluminator	HeroLab
Überkopfschüttler	Heidolph
Wasserbad	Julabo, Haake
Vortex	Heidolph
Z1-Zellzähler	Beckman Coulter
Vakuumzentrifuge	Thermo Electron Corporation
Zentrifugen 5804/5804R/5415	Eppendorf
pH-Meter	Sartorius
Ultraschallbad	VWR
UV Crosslinker 1800	Stratagene
Schüttelinkubator	New Brunswick Scientific
Sonifier	Heinemann

Thermostatschrank	Aqua Lytic
Horizontal-Schüttler	Heidolph
Pipetierhilfe	Hirschmann Laborgeräte
Multipette plus	Eppendorf
Mehrkanalpipetten (8- und 12-Kanal)	Biohit, CAPP
Gelkammern	Bio-Rad

4.1.7 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Einwegskalpelle	Feather
FACS-Röhrchen	BD-Biosciences
Zentrifugenröhrchen 15 ml	Nerbe Plus
Zentrifugenröhrchen 50 ml	Nerbe Plus
Filterpapier 3 MM	Whatman
Einwegspritzen	BD-Biosciences / Terumo
Glasflaschen	Fisher Scientific GmbH
Gewebeband	Tesa AG
Untersuchungshandschuhe	Meditrade
Labortücher	Kimberly-Clark
Nitrozellulose Transfermembran 0,2 µM	Whatman
Nitrilhandschuhe	Microflex
PCR-Tubes	Steinbrenner
Reaktionsgefäße	Steinbrenner
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plastikküvetten	Greiner
RealTime PCR Platten	Roche
RealTime PCR Folie	Roche
Röntgenfilme (Super RX)	Fujifilm
Sterilfilter	Sartorius
UV-Plastikküvetten	Eppendorf
Parafilm	Pechiney
Combitips Plus	Eppendorf
Dialysekassetten	Thermo Scientific
LightCycler 480 Sealing Foil	Roche
384er PCR-Platten für LC480	Steinbrenner

4.1.8 Zellkulturmaterialien

Bezeichnung	Hersteller
Accutase™	Sigma
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	Promega
Caspase-Glo® 3/7 Assay	Promega
CellTiter-Blue® Cell Viability Assay	Promega
Dulbecco's-PBS	Gibco
Fetales-Kälber-Serum (FBS), Charge 41Q8387K	Invitrogen
L-Glutamin (200 mM)	Gibco
McCoy's 5A Medium	Gibco
DMEM Medium	Gibco
RPMI 1640 Medium	PAA
Effectene® Transfektions-Reagenz	Qiagen
DharmaFECT® 1, 4	Dharmacon
100 x Penicillin G/Streptomycin	Gibco
Hygromycin (50 mg/ml)	PAA
15 ml Reaktionsgefäße	BD-Biosciences
50 ml Reaktionsgefäße	BD-Biosciences
Serologische Pipetten (5, 10, 25, 50 ml)	Sarstedt
Trypsin-EDTA-Lösung	Gibco
Zellkulturplatten 6-well	Greiner
Zellkulturplatten 96-well transparent, weiß	Greiner
Zellkulturplatten 385-well, transparent, weiß	Greiner
Zellkulturschalen Ø 10 cm	BD-Biosciences
Zellkulturflaschen adhärente Zellen	Greiner
Zellkulturflaschen Suspensionszellen	Greiner

4.1.9 Enzyme und molekularbiologische Materialien

Bezeichnung	Hersteller
Alkaline Phosphatase, shrimp	Roche
Benzonase Nuklease	Novagen
BstU I	New England Biolabs
One Shot® ccdB Survival™-T1R Cells	Invitrogen

Complete™ Protease Inhibitor Cocktail	Roche
DirectLoad™ Wide Range DNA Marker	Sigma
DNeasy Blood & Tissue® Kit	Qiagen
DTT	Invitrogen
EcoRI	New England Biolabs
EpiTect® Kit	Qiagen
Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix	Invitrogen
Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix	Invitrogen
Gel loading Buffer II	Ambion
GoldenGate® Methylierungchip	Illumina
Infinium® Methylierungchip	Illumina
Hexamer-Primer (50ng/µl)	Invitrogen
Hinf I	New England Biolabs
HiSpeed® Plasmid Midi Kit	Qiagen
HyperLadder™ I	BioLine
Infinium® Methylierungchip	Illumina
Mikrokokken Nuklease 200 U	Sigma
Mix RT	Invitrogen
Phosphodiesterase Typ II 10 U	Calbiochem
Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix	Finnzymes
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction® Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification® Kit	Qiagen
QIAshredder®	Qiagen
QuantiFast™ SYBR®Green PCR Kit	Qiagen
Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Assay Kit	Invitrogen
QuantiTect® Kit	Qiagen
Rapid DNA Ligation Kit	Roche
Rapid DNA Ligation Kit	Roche
ReddyMix™ 10x	ABgene
RNase A	Sigma
RNase Out (40 U/µl)	Invitrogen
RNase, DNase free	Sigma
RNase-Free DNase Set	Qiagen

RNeasy® Kit	Qiagen
Superscript® III Reverse Transkriptase	Invitrogen
Thermoprime Plus® Polymerase	ABgene
TOPO TA Cloning® Kit	Invitrogen
Western Lightning®	Perkin Elmer

4.1.10 Lösungen

Name	Zusammensetzung
Blockpuffer (Immuno-Blotting)	5 % Magermilchpulver in 1x PBS
Bodipy-Lösung (je Einzelprobe)	0,3 mg Bodipy 33 µl HEPES-Puffer
CE-Trennpuffer	75 mM SDS 17 mM Kaliumphosphat-Puffer (pH 9,0) 15% (v/v) Methanol
EDC-Lösung (je Einzelprobe)	11.2 mg EDC 32,5 µl HEPES-Puffer
HEPES-Puffer	0,8 M HEPES in ddH ₂ O, (pH 6.5)
6x Ladepuffer	30% Glycerol 2 mg/ml Orange G 2% 1x TBE
MN/SPD-Lösung	2.5 mU/µl Kalbs-Milz-Phosphodiesterase 150 mU/µl Microkokken Nuklease
MN/SPD Verdau-Puffer	250 mM HEPES 100 mM CaCl ₂ · 2 ddH ₂ O pH 6,0 (eingestellt mit NaOH-Lösung)
10 x TBE-Puffer	0,89 M Tris 0,89 M Borsäure 20 mM EDTA pH 8,3

Transferpuffer	25 mM Borsäure (pH 8.8) 2 mM EDTA (pH 8.0) auf 1 l auffüllen mit ddH ₂ O 1 mM DTT frisch dazugeben
10 x Tris-Glycin Laufpuffer	30.3 g Tris 144 g Glycin 10 g SDS auf 1 l auffüllen mit ddH ₂ O
10 x PBS	80 g NaCl ₂ 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ 2,4 g KH ₂ PO ₄ auf 1 l auffüllen mit ddH ₂ O
Probenpuffer (6x Laemmli-Puffer)	2 ml 2 M Tris HCl pH 6,83 2,06 g SDS 7,2 ml Glycerol 1 ml β-Mercaptoethanol 2,4 mg Bromphenolblau auf 20 ml mit ddH ₂ O auffüllen
Ponceau S Lösung	0,1% Ponceau S in 5% Essigsäure
RIPA-Puffer	PBS (pH 7.4) 0,1 % SDS 0,5 % Igepal-630 0,5 % Natriumdeoxycholat 1 mM DTT Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
TE-Puffer	1 mM Tris 0,1 mM EDTA pH 8,0 (eingestellt mit HCl)

4.1.11 Primer

4.1.11.1 qRT-PCR-Primer

Name	Sequenz	Annealing-Temperatur	Länge des Amplikons (Bp)
GAPDH for GAPDH rev	ATTCCACCCATGGCAAATTC TCTCGCTCCTGGAAGATGGT	60	94
LaminB1 for LaminB1 rev	CTGAAATGTTTGCATCGAAGA GCCTCCCATTGGTTGATCC	60	89
UCK1_for_Roche UCK1_rev_Roche	AAGAGTTCTCCGGGACGTG CATCGGCATACTTCTTTGTGC	60	119
DPYD_for_NCI DPYD_rev_NCI	CAAGACTGGGATGGACAGAGT GCGCTGTTCCAGATAAGGTC	60	120
TM9SF4_for_NCI TM9SF4_rev_NCI	CTATTCAGTCCCTTCTGCC ATGAGAACCTGGAAAGGGGT	60	108
APOBEC2_for_NCI APOBEC2_rev_NCI	AAAGAGCTGATTGAGCTGCC CTCCCGGAACTGTACTCCAC	60	104
COMT_for_NCI COMT_rev_NCI	CATGGTCTCCTCGACCACT TCACGTTGTCAGCCAGTAGC	60	107

4.1.11.2 COBRA-Primer

Name	Sequenz	Annealing-Temperatur	Länge des Amplikons (Bp)
C1S2_for C1S2_rev	ATGGAATTTTTATGAAATTGAAATG CATTCCATTAATAATTCCATTC	51	240
APM2_for APM2_rev	TGTAGGATTTGAAGTAATAGGTG CCAACATAACCTCCTTAAAAAACTCC	58	314

4.1.11.3 454-Primer

Folgende Primersequenzen wurden für die 454-Bisulfit-Sequenzierung verwendet. Adaptersequenzen sind in blau dargestellt, Probenspezifische Barcodes in grün.

Name	Sequenz	Länge des Amplikons (Bp)
PIK3CG_cont_for	GCCTCCCTCGCGCCATCAGGAGATGTTAAAATAGGAAATGTATTTTTG	219
PIK3CG_cont_rev	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACAAATTCAAACCTACCCAA	
PIK3CG_AZA_for	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTTGTAAAATAGGAAATGTATTTTTG	219
PIK3CG_AZA_rev	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGAGACAAATTCAAACCTACCCAA	
PIK3CG_DAC_for	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCACATGTTAAAATAGGAAATGTATTTTTG	219
PIK3CG_DAC_rev	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGTGACAAATTCAAACCTACCCAA	
Ells1_cont_for	GCCTCCCTCGCGCCATCAGGAGATTTATATTGAGTGTAGTGATTGTGTG	221
Ells1_cont_rev	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACTTAAAACTTTTTCCAAAACCTC	
Ells1_AZA_for	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTTTTTATATTGAGTGTAGTGATTGTGTG	221
Ells1_AZA_rev	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGAGACTTAAAACTTTTTCCAAAACCTC	
Ells1_DAC_for	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCACATTTATATTGAGTGTAGTGATTGTGTG	221
Ells1_DAC_rev	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGTGACTTAAAACTTTTTCCAAAACCTC	
AFF2_cont_for	GCCTCCCTCGCGCCATCAGGAGAGAGATTGGGATTTGGAGTAGTAGTG	210
AFF2_cont_rev	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCCAAAAATAACTAAAACAAATAAAA	
AFF2_AZA_for	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTGAGATTGGGATTTGGAGTAGTAGTG	210
AFF2_AZA_rev	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGAGCCAAAAATAACTAAAACAAATAAAA	
AFF2_DAC_for	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCACAGAGATTGGGATTTGGAGTAGTAGTG	210
AFF2_DAC_rev	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGTGCCAAAAATAACTAAAACAAATAAAA	
FGF12_cont_for	GCCTCCCTCGCGCCATCAGGAGATTTTTTAGTTGGGATAATTGAGGAT	206
FGF12_cont_rev	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCTAACAAATCATCCCACCTTACTCTCT	
FGF12_AZA_for	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTTTTTTTAGTTGGGATAATTGAGGAT	206
FGF12_AZA_rev	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGAGTAACAAATCATCCCACCTTACTCTCT	
FGF12_DAC_for	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCACATTTTTTAGTTGGGATAATTGAGGAT	206
FGF12_DAC_rev	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGTGTAACAAATCATCCCACCTTACTCTCT	
HTRK3_cont_for	GCCTCCCTCGCGCCATCAGGAGAGAGGGGAAGAGGTTTTTAT	198
HTRK3_cont_rev	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTCTCACCCAACCAAATATAATTTCTAAC	
HTRK3_AZA_for	GCCTCCCTCGCGCCATCAGTCTGAGGGGAAGAGGTTTTTAT	198
HTRK3_AZA_rev	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGAGAGACCCAACCAAATATAATTTCTAAC	
HTRK3_DAC_for	GCCTCCCTCGCGCCATCAGCACAGAGGGGAAGAGGTTTTTAT	198
HTRK3_DAC_rev	GCCTTGCCAGCCCGCTCAGTGTGACCCAACCAAATATAATTTCTAAC	

4.2 Methoden

4.2.1 Allgemeine Labortechniken

4.2.1.1 Extraktion genomischer DNA

Zur Extraktion genomischer DNA wurden $1-5 \times 10^6$ Zellen verwendet. Suspensionszellen wurden für 5 Minuten bei 100 x g zentrifugiert, mit PBS gewaschen und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Adhärente Zellen wurden nach Abnahme des Mediums mit PBS gewaschen, anschließend in PBS mit einem Zellschaber von der Wachstumsfläche gelöst, für 5 Minuten bei 100 x g zentrifugiert und ebenfalls in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Isolation der DNA wurde unter Verwendung des DNeasy® Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben inklusive des optionalen RNase-Verdau durchgeführt. Zur Elution der DNA wurde TE-Puffer (pH = 8,0) verwendet. Für kapillarelektrophoretische Untersuchungen wurde die DNA in UltraPure H₂O eluiert. Die isolierte DNA wurde bei -20 °C gelagert.

4.2.1.2 Messung der DNA- und RNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA wurde photometrisch bestimmt. Eine Absorption (OD₂₆₀) von 1 entsprach dabei einer DNA-Konzentration von 50 ng/µl doppelsträngiger DNA, bzw. 40 ng/µl an RNA-Molekülen.

4.2.1.3 Auftrennung und Visualisierung von DNA

Zur Visualisierung der DNA wurde diese mit einem Ladepuffer versetzt (ReddyMix™, ABgene) und anschließend elektrophoretisch je nach Fragmentgröße in 0,8- bis 3-prozentigen Agarosegelen aufgetrennt. Die Agarose wurde in TBE-Puffer aufgeköcht und nach dem Abkühlen zur späteren Visualisierung der DNA mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Zur elektrophoretischen Auftrennung wurde eine Spannung von etwa 3-5 Volt/cm verwendet. Anschließend wurde die DNA unter UV-Licht visualisiert und zur späteren Analyse fotografiert.

4.2.1.4 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Zur weiteren Verwendung, wie z.B. für Klonierungszwecke oder für COBRA-Analysen wurde die DNA-Bande mit der erwarteten Fragmentgröße unter UV-Licht ausgeschnitten und in ein Reaktionsgefäß überführt.

4.2.1.5 Aufreinigung von DNA

Zur Aufreinigung der DNA aus Agarosegelen wurde das QIAquick Gel Extraction[®] Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben verwendet. PCR-amplifizierte DNA wurde wenn nötig nach Angaben des Herstellers mit dem QIAquick PCR Purification[®] Kit (Qiagen) aufgereinigt.

4.2.1.6 Deaminierung von DNA

Für Methylierungsanalysen wurden 1 µg DNA unter Verwendung des EpiTect[®] Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben mit geringfügigen Veränderungen deaminiert und aufgereinigt. Anschließend wurde die deaminierte DNA in 30 µl TE eluiert.

4.2.1.7 Restriktionsverdau von DNA mit Endonukleasen

Zum Restriktionsverdau wurden 1-5 µg DNA mit 20-40 U des Restriktionsenzym unter den vom Hersteller empfohlenen Puffer- und Temperaturbedingungen für mindestens 3 Stunden inkubiert und anschließend auf einem Agarose-Gel visualisiert.

4.2.1.8 Präparation von RNA

Zur Extraktion genomischer RNA wurden $0,5-5 \times 10^6$ Zellen verwendet. Adhärente Zellen wurden nach Abnahme des Mediums mit kaltem PSB gewaschen, anschließend in kaltem PBS mit einem Zellschaber von der Wachstumsfläche gelöst, für 5 Minuten bei $100 \times g$ zentrifugiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Isolation der RNA wurde unter Verwendung des RNeasy[®] Kits (Qiagen) und der QIAshredder[®] (Qiagen) nach Herstellerangaben inklusive des optionalen DNase-Verdaus durchgeführt. Die Qualität der RNA wurde anschließend durch die Auftrennung in einem 1-prozentigen Agarosegel überprüft. Dazu wurde ca. 1 µg RNA mit 5 µl RNA-Ladepuffer (Ambion) versetzt. Die isolierte RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

4.2.1.9 cDNA Synthese

Die cDNA Synthese wurde mit 5 µg, höchstens jedoch 11 µl, RNA unter Verwendung des SuperScript[®] III First-Strand Synthesis Systems für RT-PCR (Invitrogen) und Hexamer-Primern (Invitrogen) nach Herstellerangaben durchgeführt.

4.2.1.10 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Genomische DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert. Dazu wurde das Thermoprime-Plus Taq-Polymerase-System benutzt. Der PCR-Ansatz wurde nach folgenden Angaben auf Eis pipettiert.

Reaktionsansatz:

DNA-Lösung (ca. 30 ng)	x	µl
ReddyMix™ (10x)	2	µl
Forward Primer (10 mM)	2	µl
Reverse Primer (10 mM)	2	µl
dNTPs (10 mM)	2	µl
ddH ₂ O	x	µl
Thermoprime	0.5	µl
Gesamtvolumen	20	µl

Zur PCR-Amplifikation von deaminierter DNA wurde ein Hot-Start durchgeführt. Dabei wurde die Polymerase erst nach Denaturierung der DNA in den Reaktionsansatz pipettiert. Für PCR-Standardanwendungen wurde folgendes Programm benutzt:

Denaturierung	95 °C	3 min	} 30-35x
Denaturierung	95 °C	30 s	
Annealing	50-60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	30-60 s	
Elongation	72 °C	5 min	
Kühlung	4 °C		

4.2.1.11 Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Zur RealTime-Analyse wurden 0,5-1 µl cDNA mit den Komponenten des QuantiFast™ SYBR®Green PCR Kits (Qiagen) sowie 1 pmol/µl an entsprechenden Primern versetzt und in einem Gesamtvolumen von 10 µl im 384-Well-Format im LightCycler 480 (Roche) analysiert. Als Referenzgen wurde Lamin b1 oder GAPDH verwendet. Zur Amplifikation wurde die cDNA zunächst 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und anschließend in 40 Zyklen (15 s bei 95 °C, 60 s bei 60 °C) amplifiziert. Dabei fanden Primeranlagerung und

Elongation in einem einzigen Schritt bei 60 °C statt. Die Berechnung der Primereffizienzen sowie die Analyse der Schmelzkurven und die relative Quantifizierung wurden mit der LightCycler Software (Version 1.5.0) durchgeführt. Folgende QuantiTect® Primer Assays (Qiagen) wurden verwendet: DNMT1 (Hs_DNMT1_1_SG, NM_001379), DNMT3B (Hs_DNMT3B_1_SG, NM_006892, NM_175848-50), DNMT2 (Hs_TRDMT1_1_SG, QT00049896) und GADD45A (Hs_GADD45A_1_SG, NM_001924).

4.2.1.12 Präparation von Zelllysaten

Zur Analyse der Proteinexpression wurden die Zelllysate folgendermaßen präpariert: 1-10 x 10⁶ adhärent wachsende Zellen wurden zunächst mit kaltem PBS gewaschen und anschließend auf Eis in PBS mit dem Zellschaber von der Wachstumsfläche abgelöst. Die Zellen wurden daraufhin zentrifugiert und als Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Je nach Zellanzahl wurden die Pellets in 100-300 µl RIPA-Puffer aufgenommen, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 4 °C für 30 min rotiert. Daraufhin wurden die Zelllysate bei maximaler Drehzahl für weitere 30 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.2.1.13 Proteinbestimmung nach der Bradford-Methode

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration im Zelllysate wurde der Bradford-Assay verwendet. Mit diesem Verfahren wird die Proteinkonzentration durch Messung der Absorption bei 595 nm bestimmt. Dieses Absorptionsmaximum entsteht durch die Bindung von Proteinen an den in der Bradford-Lösung enthaltenen Farbstoff Coomassie-Brilliant Blau G250, dessen Absorptionsmaximum sich durch die Bindung von Proteinen von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Der Bradford-Assay wurde folgendermaßen angesetzt:

1 µl Proteinlösung
799 µl PBS
200 µl Bradford-Reagenz (Biorad)

Nach einer Inkubationszeit von ca. 5 Minuten wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Durch die Erstellung einer Eichgeraden mit Absorptionmessungen bekannter Konzentrationen an Rinder-Serum-Albumin (BSA) wurde die Konzentration der Proteinlysate ermittelt.

4.2.1.14 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Dafür werden die Proteine zunächst mit verschiedenen Substanzen inkubiert, die eine Denaturierung (β -Mercaptoethanol) sowie einen Ladungsausgleich (Sodiumdodecylsulfat, SDS) bewirken. Somit werden die Proteine während der Gelelektrophorese ausschließlich aufgrund ihrer Größe und unabhängig von ihrer jeweiligen Ladung aufgetrennt. Zur elektrophoretischen Auftrennung wird eine Polyacrylamid-Gelmatrix verwendet, die aus zwei unterschiedlich konzentrierten Gelen besteht: dabei dient ein niedrig konzentriertes Sammelgel (5 % Acrylamid) zunächst der einheitlichen Ausrichtung der Proteine, während das höher konzentrierte Trenngel (5-15 % Acrylamid) der größenabhängigen Auftrennung der Proteine dient. Dabei richtet sich die Konzentration des Trenngels nach dem Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins. Die Zusammensetzung der Lösungen zur Herstellung von SDS-Polyacrylamid-Gelen richtete sich nach Maniatis et al. (1982) [235]. In dieser Studie wurden zur Analyse von Caspase-3, DNMT1 und DNMT3B 10-prozentige Gele verwendet, zur Analyse von GADD45A und γ H2AX 12- bzw. 15-prozentige Gele. 100-400 μ g an Proteinlysaten wurden nach einer Denaturierung für 5 min bei 95 °C in Laemmli SDS-Puffer bei maximaler Drehzahl kurz abzentrifugiert und in gleichen Mengen auf das Gel in einer mit Tris-Glycin-Puffer befüllten Kammer aufgetragen. Als Größenmarker wurde der PageRuler (Fermentas) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei einer Gelgröße von 14 cm x 8.5 cm bei 30 mA für ca. 1-1,5 Stunden. Anschließend wurden die im Trenngel aufgetrennten Proteine im Immunoblotting-Verfahren auf eine Nitrozellulose-Membran überführt.

4.2.1.15 Immunoblotting (Western-Blot)

Im Western Blot wurden die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Trenngel auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Dazu wurde ein mit eisgekühltem Transfer-Puffer befülltes Tank-Blot-System (Bio-Rad) verwendet. In diesem Puffer wurde das Trenngel zunächst für mindestens 5 min equilibriert und anschließend in die Transfereinheit, bestehend aus einer Halterung mit Elektrophorese-Schwämmen, Filterpapieren und der Nitrozellulose-Membran transferiert. Diese wurde in einer Schale mit Transferpuffer in folgender Reihenfolge aufgebaut: Anode \rightarrow Schwamm \rightarrow Filterpapier \rightarrow Nitrozellulosemembran \rightarrow Polyacrylamidgel \rightarrow Filterpapier \rightarrow Schwamm \rightarrow Kathode. Der Transfer erfolgte für jeweils 5 min bei 100, 200 und 300 mA und anschließend für 60 min bei 400 mA. Anschließend wurde die Effizienz des Transfers sowie die Proteinmenge

anhand einer Ponceau-S-Färbung kontrolliert. Die Membran wurde anschließend in 15 ml Blocklösung für eine Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C auf einem Horizontalschüttler inkubiert, um die offenen Bindestellen der Nitrozellulose-Membran zu blockieren. Anschließend wurde die Membran mit dem Erstantikörper (verdünnt in den angegebenen Konzentrationen in Blocklösung, siehe Material und Methoden) wenn möglich über Nacht bei 4 °C oder für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Nach einem 3 x 10-minütigen Waschschrift wurde dann der Peroxidase-gekoppelte Zweitantikörper in Blocklösung auf die Membran gegeben und eine weitere Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Wiederum erfolgte ein Waschvorgang von 3 x 10 min in Blocklösung, ein anschließender Waschschrift für 10 min in PBS und eine kurze Inkubation in Wasser. Die enzymatische Aktivität des Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers erfolgte über eine ECL (Enhanced Chemiluminescence)-Reaktion nach den Angaben des Herstellers (Western Lightning[®], Perkin Elmer) unter Verwendung von Röntgenfilmen.

4.2.2 Techniken für Methylierungsuntersuchungen

4.2.2.1 Micellare Kapillar-Elektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenz (CE-LIF)

Genomweite Methylierungsanalysen wurden mittels micellarer elektrokinetischer Kapillar-Elektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenz (CE-LIF) durchgeführt. Dazu wird die DNA zunächst in Einzelnukleotide verdaut, die anschließend mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Bodipy FL EDA, Molecular Probes) gekoppelt werden. Dieser ermöglicht nach einer kapillarelektrophoretischen Auftrennung der Nukleotide eine Detektion durch laserinduzierte Fluoreszenz [236]. Die micellare elektrokinetische Kapillar-Elektrophorese ermöglicht eine Auftrennung ungeladener Moleküle durch Wechselwirkung mit Micellen, die in einem SDS-haltigen Puffer gebildet werden. Dabei interagieren die Nukleotide mit stärkeren lipophilen Eigenschaften stärker mit den Micellen, wodurch sie in der Kapillare langsamer wandern und somit später detektiert werden. Diese Methode ermöglicht eine saubere Auftrennung der Nukleotide Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin sowie von Methylcytosin-Molekülen, die sich in der Kapillare mit einer geringeren Geschwindigkeit bewegen als Cytosin. Die Kapillar-Elektrophorese wurde mit dem P/ACE[™] MDQ Molecular Characterization System (Beckman Coulter) durchgeführt. Die Auftrennung erfolgte in Kieselglas-Kapillaren mit einer Gesamtlänge von etwa 64 cm und einem Innendurchmesser von 50 µm. Es wurde ein Proben-Injektionsdruck von 20 p.s.i bei 25 °C und eine Spannung von 20 kV verwendet. Für die Detektion der fluoreszenzmarkierten Nukleotide bei einer Wellenlänge von 510 nm wurde ein Laser mit einer

Anregungswellenlänge von 488 nm verwendet. Die Elektropherogramme wurden anschließend mit der 32 Karat Software, Version 7.0 (Beckman Coulter), ausgewertet.

Die Proben wurden folgendermaßen für die Kapillar-Elektrophorese vorbereitet:

1) Enzymatische Hydrolyse der DNA

- 5 µg genomischer DNA wurden mit angelegtem Vakuum einrotiert
- die trockene DNA wurde anschließend in 5 µl UltraPure H₂O gelöst
- Zugabe von 5 µl der Verdaulösung und Inkubation für 4 Stunden bei 37°C

Verdaulösung:

1 µl MN/SPD Verdau-Puffer

5 µl MN/SPD-Lösung

MN/SPD-Lösung:

2.5 mU/µl Kalbs-Milz-Phosphodiesterase

150 mU/µl Microkokken Nuklease

MN/SPD Verdau-Puffer:

250 mM HEPES

100 mM CaCl₂ · 2 H₂O

pH= 6.0 (eingestellt mit NaOH-Lösung)

2) Derivatisierung der Nukleotide

- Zugabe des Bodipy-Farbstoffes, EDC und HEPES-Puffer
- Inkubation für 25 Stunden bei 25 °C in einem Thermomixer (800 rpm)
- Lichtgeschützte Lagerung bei -20 °C
- Zur CE-Messung wurden die Proben in einem Volumen von 500 µl 1:100 in UltraPure H₂O verdünnt

Derivatisierungsansatz:

Nukleotidlösung 10 µl

Bodipy-Lösung 15 µl

EDC-Lösung 15 µl

HEPES-Puffer 10 µl

Gesamtvolumen 50 µl

Lösungen:

HEPES-Puffer: 0,8 M HEPES in UltraPure H₂O, pH=6,5

Bodipy-Lösung: 0,3 mg Bodipy in 33 µl 0,8 M HEPES-Lösung

EDC-Lösung: 11,2 mg EDC in 32.5 µl 0,8 M HEPES-Lösung

4.2.2.2 COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis)

Anhand einer COBRA [193] kann der Methylierungszustand ausgewählter CGs innerhalb einer festgelegten DNA Sequenz abgeschätzt werden. Dazu wird zunächst die DNA unter Verwendung des EpiTect[®] Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben einer Bisulfit-Konvertierung unterzogen: die Behandlung mit Bisulfit unter bestimmten chemischen Bedingungen resultiert in einer Deaminierung unmodifizierter Cytosine zu Uracil, während Methylcytosine in ihrem ursprünglichen Zustand verbleiben. Die PCR-Amplifikation ausgewählter Zielsequenzen durch spezifische Primer, die ausschließlich an die deaminierte DNA-Sequenz binden, führt zu einer Anreicherung der Zielsequenz sowie zu einer Konvertierung der Uracil-Basen zu Thymin. Anschließend wird das gewünschte PCR-Produkt gelelektrophoretisch isoliert, aufgereinigt und mittels Restriktionsverdau verdaut. Das Restriktionsenzym wird dazu so gewählt, dass seine Erkennungssequenz mindestens ein CG-Dinukleotid enthält; dies gewährleistet eine Identifizierung methylierter Sequenzbereiche durch den endonukleolytischen Verdau der Originalsequenz, da die Restriktionsschnittstellen nur im Falle einer Methylierung der genomischen Sequenz erhalten bleiben. Nach elektrophoretischer Auftrennung des Restriktionsverdaus im 3-prozentigen Agarosegel kann die Methylierung der Originalsequenz über die Anzahl und die Intensität der verdauten Gelbanden zu der unverdauten Bande abgeschätzt werden. In dieser Studie wurde die COBRA-Methode zur Methylierungsanalyse des APM2-Gens (verdaut mit BstU I) und der C1S2-Satellitenregion (verdaut mit Hinf I) verwendet.

4.2.2.3 Bisulfit-Sequenzierung

Die Bisulfit-Sequenzierung ist die genaueste Methode zur Detektion von 5-Methylcytosin, da sie die Methylierung jedes Cytosins in der gewählten Zielsequenz zuverlässig misst. Zur Bisulfit-Sequenzierung wurde die genomische DNA zunächst, wie bereits beschrieben, deaminiert und die Zielsequenz spezifisch über eine PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden daraufhin unter Verwendung des TOPO-TA Cloning Kits (Invitrogen) nach Herstellerangaben in kompetente *E. coli* Bakterienzellen transformiert. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde nach Verifizierung des Inserts durch Restriktionsverdau mit EcoRI durch die Firma GATC (Konstanz) sequenziert und am

Computer ausgewertet. Bei der Bisulfit-Sequenzierung muss allerdings berücksichtigt werden, dass jede Sequenzierreaktion nur jeweils ein Epiallel aus der gesamten Population repräsentiert. Deshalb ist die Analyse von mindestens fünf verschiedenen Klonen für eine statistisch verwertbare Aussage notwendig.

4.2.2.4 454-Bisulfit-Sequenzierung

Die 454-Next-Generation-Sequenzierungstechnologie basiert auf einem Pyrosequenzierungs-System, das die parallele Sequenzierung von 400-600 Megabasen pro Lauf erlaubt. Dazu werden Adapter-ligierte DNA-Fragmente in einer Wasser-in-Öl-Emulsion an kleine DNA-Capture-Beads immobilisiert und über eine PCR millionenfach amplifiziert. Anschließend werden die DNA-gebundenen Beads einzeln in die Wells einer Picotiterplatte verteilt. Während der anschließenden Pyrosequenzierung werden die verschiedenen Nukleotide nacheinander über die offenen Wells gespült. Dabei erzeugt der Einbau eines passenden Nukleotids durch die DNA-Polymerase über eine Enzymkaskade Licht aus anorganischem Pyrophosphat (PPi), wobei die Stärke des erzeugten Lichtsignals proportional zu der Anzahl der eingebauten Nukleotide ist. Diese Methode kann sowohl zur Sequenzierung ganzer Genome, aber auch zur Analyse eines Gemisches aus PCR-Produkten verwendet werden. Sie erlaubt somit die gleichzeitige Analyse von mehreren hundert Epiallelen und bietet eine statistisch weit aussagekräftigere Analyse des Methylierungszustandes ausgewählter Zielsequenzen als die klassische Bisulfit-Sequenzierung. Die 454-Bisulfit-Sequenzierung wurde wie von Taylor et al. (2007) beschrieben durchgeführt [196]. Dazu wurde die genomische DNA zunächst deaminiert und mit sequenzspezifischen Primern amplifiziert. Diese Primer enthielten neben der zu dem Ziel-Gen komplementären Sequenz außerdem eine 454-spezifische Adaptersequenz sowie eine probenspezifische Erkennungssequenz, die eine Zuordnung der sequenzierten Fragmente zu der jeweiligen Probe erlaubt. Die 454-Sequenzierung wurde von der DKFZ Genomics and Proteomics Core Facility durchgeführt. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in Abschnitt 4.1.11.3 aufgeführt.

4.2.2.5 Array-basierte Untersuchung genspezifischer Methylierung

Array-basierte genspezifische DNA-Methylierungsanalysen wurden mit der Infinium HumanMethylation 27 Bead-Chip Technologie (Illumina) nach Herstellerangaben durchgeführt. In diesem Verfahren wurde zunächst Bisulfit-behandelte DNA genomweit amplifiziert und anschließend an den Bead-Chip hybridisiert. DNA-Oligomere, die mit zwei

unterschiedlichen Bead-Typen pro Locus verbunden sind, binden entweder den unmethylierten oder den methylierten Zustand und erlauben im Falle einer perfekten Basenpaarung eine Einzelbasenverlängerung mit markierten Nukleotiden, die anschließend detektiert werden. Der Methylierungsstatus eines bestimmten Cytosins errechnet sich aus dem Verhältnis der Signale von methylierten und unmethylierten Beads, und wird als AVB (Average Beta) angegeben. Dabei entspricht ein AVB-Wert von 1 einem vollständig methylierten und ein AVB-Wert von 0 einem vollständig unmethylierten Zustand. Zur Berechnung der AVB-Werte wurden die Rohdaten für beide Kanäle (rot und grün) separat Quantil-normalisiert. Die mittleren AVB-Werte für Gruppen biologischer Replikate wurden auf Bead-Ebene berechnet, DB (Delta Beta)-Werte wurden durch Subtraktion der AVB-Werte von behandelten bzw. Knockout-Zellen und Kontroll-Zellen ermittelt. Alle Methylierungsdaten können in der ArrayExpress Datenbank (www.ebi.ac.uk/arrayexpress) abgerufen werden. Die Array-Daten wurden mit der BeadStudio Software, Version 3.1.3.9 (Illumina) sowie dem implementierten Methylierungs-Modul und mit R, Version 2.10.1 (R Development Core Team, 2009) ausgewertet. In dieser Studie wurden CGs mit einem AVB-Wert $\leq 0,2$ als unmethyliert und CGs mit einem AVB-Wert $> 0,2$ als methyliert eingestuft. Ein Delta Beta (DB)-Wert $\leq -0,2$ charakterisiert eine signifikante Demethylierung und ein DB-Wert $\geq 0,2$ eine signifikante Hypermethylierung des jeweiligen CG-Dinukleotids. Diese Schwellenwerte wurden auf der Basis publizierter Daten zur Detektionsgrenze des Infinium-Arrays festgelegt [195].

Hierarchische Clusteranalysen wurden unter Verwendung euklidischer Distanzen und eines agglomerierenden Algorithmus (Average Linkage) durchgeführt. Die Richtigkeit der Topologie des Dendrogramms wurde anhand von Bootstrap-Analysen mit 1000 Iterationen überprüft. Die Datengenerierung mit Infinium-Arrays wurde in der DKFZ Genomics and Proteomics Core Facility (GPCF) durchgeführt, die Rohdaten wurden von Oliver Heil (GPCF) normalisiert.

4.2.3 Zellkulturtechniken

4.2.3.1 Allgemeine Zellkulturbedingungen

Alle verwendeten Zellen wurden in einem Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert und unter einer S2-Sterilbank gesplittet bzw. behandelt. Es wurden stets steril verpackte Zellkulturmaterialien verwendet. Die verwendeten Medien sowie das PBS wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37 °C erwärmt.

4.2.3.2 Kultivierung adhärent wachsender Zellen

Adhärent wachsenden Zellen wurden in oberflächenbehandelten Zellkulturflaschen mit Wachstumsflächen von 25 cm² kultiviert. Die Zelllinien HCT116, 3BKO und DKO wurden in McCoy's 5A Medium mit 5 % L-Glutamin und 10 % FCS in Kultur gehalten, das Medium der 1KO-Zellen enthielt zusätzlich 50 µg/ml Hygromycin (PAA). RKO-, MCF7- und HEK293-Zellen wurden in DMEM-Medium mit 10 % FCS kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen vor Erreichen vollständiger Konfluenz (ca. alle 3-4 Tage) mit PBS gewaschen und für ca. 2-5 Minuten mit 1 ml Trypsin EDTA-Lösung oder für ca. 10 Minuten mit 2 ml Accutase™-Lösung bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach Zugabe von frischem Medium wurden die Zellen durch mehrfaches pipettieren vereinzelt und in Verdünnungen von 1:10 sowie 1:20 (ca. 1x10⁶ und 0,5 x10⁶ Zellen) in neue Zellkulturflaschen mit dem entsprechenden Medium gegeben.

4.2.3.3 Kultivierung von Suspensionszellen

Die leukämischen Zelllinien HL-60, K562 und ML-1 wurden in RPMI 1640-Medium mit 2 mM L-Glutamin und 10 % FCS in unbehandelten Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² kultiviert. Alle 3-4 Tage wurden die Zellen mit Medium in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt und für 3 Minuten bei 100 x g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen 1:10 und 1:20 (ca. 1x10⁶ und 0,5 x10⁶ Zellen) in Medium verdünnt und in neue Zellkulturflaschen überführt.

4.2.3.4 Bestimmung der Zellanzahl

Zur Bestimmung der Zellanzahl wurden etwa 0,5-1x10⁶ Zellen 1:100 in isotonischer Lösung (Beckman Coulter) verdünnt und unter Verwendung eines Z1-Zellcounters (Beckman Coulter) gezählt. Dabei wurde eine untere Ausschlussgröße von 5 µm gewählt.

4.2.3.5 Vorbereitung von Zellen zur Behandlung

Zur Behandlung mit Wirkstoffen, für Transfektionsexperimente oder für Proliferationsassays wurden Zellen, die eine Konfluenz von etwa 80-90% erreicht hatten, zunächst mit PBS gewaschen, anschließend mit 2 ml Accutase™ für 10 min bei 37 °C inkubiert und nach Vereinzeln gezählt. Anschließend wurde die benötigte Zellanzahl in dem entsprechenden Medium sowie Assay-abhängigen Format ausgesät.

4.2.3.6 Wirkstoff-Behandlung von Zellen

Vor der Wirkstoff-Behandlung wurden adhärent wachsende Zellen und Suspensionszellen nach der Aussaat in der Regel zunächst für 24 h inkubiert, um eine Anheftung adhärenter Zellen zu ermöglichen bzw. Aussaat-bedingte zelluläre Stressreaktionen zu reduzieren. Anschließend wurden die Wirkstoffe in unterschiedlichen Konzentrationen in frischem Medium auf die Zellen gegeben und für den jeweils angegebenen Zeitraum inkubiert.

4.2.3.7 Transiente siRNA-Transfektion

Transiente siRNA-Transfektionen wurden je nach Readout entweder im 6-Well- oder im 384-Well-Format durchgeführt. Im 384-Well-Format wurden die Zellen revers transfiziert, d.h., die Zellen wurden in Wells mit bereits vorgelegter siRNA und Transfektionsreagenz (DharmaFECT[®] 1 oder 4) pipettiert. Dabei wurden 2000 Zellen pro Well in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 20-50 nM siRNA und 1:1000 verdünntem Transfektionsreagenz transfiziert. Im 6-Well-Format wurde entweder zu Vergleichszwecken dieselbe Transfektionsmethode (angepasst auf 2 ml Gesamtvolumen) angewandt, oder eine Transfektion mit 20-100 nM Dharmacon siRNAs sowie DharmaFECT[®] 1 oder 4 nach Herstellerangaben. Dazu wurden 2×10^5 Zellen nach Aussaat zunächst für 24 Stunden inkubiert und anschließend transfiziert. Die Ernte der Zellen bzw. der Readout fand 48-96 Stunden nach Transfektion statt.

4.2.3.8 Transiente DNA-Transfektion

Transiente DNA-Transfektionen wurden entweder im 6-Well- oder im 96-Well-Format durchgeführt. Im 6-Well-Format wurden 2×10^5 Zellen ausgesät und nach einer Inkubationszeit von 24 h mit 1-2 µg DNA und 25-50 µl Effectene[®] Transfektionsreagenz (Qiagen) nach Herstellerangaben transfiziert (DNA:Effectene[®] = 1:25). Im 96-well-Format wurden 1×10^4 Zellen mit 200 ng DNA und 5 µl Transfektionsreagenz transfiziert. Die Ernte der Zellen bzw. der Readout fand 48 Stunden nach Transfektion statt.

4.2.3.9 Ernte von Zellen

Vor der Ernte wurden adhärenente Zellen mit PBS gewaschen, anschließend in PBS mit einem Zellschaber von der Wachstumsfläche gelöst und für 5 Minuten bei 100 x g zentrifugiert. Leukämische Zellen wurden im Medium zentrifugiert und anschließend mit PBS gewaschen. Zellen, die für Protein- oder RNA-Extraktionen vorgesehen waren, wurden mit kaltem PBS gewaschen sowie während des gesamten Erntevorganges wenn

möglich auf Eis gelagert. Nach Abnahme des Überstandes wurden die Zellpellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

4.2.3.10 Vitalitäts-Assays

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurde der CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay (Promega) oder der CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (Promega) verwendet. Während der CellTiter-Blue[®]-Assay die metabolische Aktivität der Zellen anhand der Reduktion des blauen Farbstoffes Resazurin zu einem pinkfarbenen und fluoreszierenden Farbstoff (Resorufin) misst, misst der CellTiter-Glo[®]-Assay den ATP-Gehalt der Zellen. Beide Assays wurden nach Herstellerangaben im 96- oder 384-Well-Format angewendet. Dabei wurden im 96-Well Format 0,8-1x10⁵ Zellen und im 384-Well Format 2000-3000 Zellen ausgesät und nach einer Behandlungszeit von 24-96 Stunden analysiert.

4.2.3.11 Koloniebildungs-Assay

Anhand eines Koloniebildungs-Assays wird die Fähigkeit von Zellen zur Koloniebildung gemessen. Dazu wurden 500 HCT116-Zellen in einer Zellkulturschale mit 10 cm Durchmesser ausgesät und nach Wirkstoffbehandlung mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen (0-1000 µM AZA oder DAC) in Triplikaten bis zum Auftreten sichtbarer Kolonien inkubiert (ca. 2 Wochen). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 30 Minuten in 10-prozentiger Paraformaldehydlösung in PBS fixiert und anschließend erneut mit PBS gewaschen. Daraufhin wurden die Zellen mit 0,1 % Kristallviolett in PBS gefärbt und nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei Raumtemperatur mit ddH₂O gespült. Nach dem Trocknen und Auszählen von Kolonien mit einem Durchmesser von > 1 mm wurde die relative Koloniezahl in behandelten Zellen im Verhältnis zur Anzahl an Kolonien in unbehandelten Kontroll-Proben berechnet.

4.2.3.12 Bestimmung von IC₅₀-Konzentrationen

Zur Bestimmung der IC₅₀-Konzentrationen von Wirkstoffen wurden die zu analysierenden Zellen im 96- oder 384-Well Format oder in Petrischalen mit einem Durchmesser von 10 cm ausgesät und mit mindestens acht verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen in Triplikaten (96-Well, Petrischale) oder Quadruplikaten (384-Well) behandelt. Zuvor wurde für jede Zelllinie und jede Behandlung die optimale Zellanzahl zur Aussaat bestimmt. Diese sollte bis zum Behandlungsende keine vollständige Konfluenz in den Wells mit den am stärksten proliferierenden Zellen bewirken, bzw. eine gut auswertbare Koloniebildung ermöglichen. Die metabolische Aktivität bzw. die Vitalität der Zellen wurde anschließend

unter Verwendung zellbasierter Assays gemessen und IC₅₀-Werte mit der Software SigmaPlot, Version 10.0 (Systat) berechnet.

4.2.3.13 Apoptose-Assay

Die Auslösung von Apoptose wurde in zellbasierten Assays anhand des Caspase-Glo[®] 3/7 Assays (Promega) bestimmt. Dieser sensitive Assay misst die Aktivität der Effektorcaspasen 3 und 7 anhand der Spaltung eines Substrats, das wiederum ein messbares Lumineszenzsignal verursacht. Der Assay wurde nach Herstellerangaben im 384-Well-Format durchgeführt. Anschließend wurde die Stärke des apoptotischen Lumineszenzsignals unter Verwendung des CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assays (Promega) in parallel behandelten Zellen auf die Zellanzahl normalisiert.

4.2.3.14 Genomweites Hochdurchsatz-RNAi-Screening

Für den RNAi-Pilot-Screen sowie den genomweiten Screen wurden HEK293-Zellen verwendet. Die siRNA-Bibliotheken wurden von Thermo Fisher Scientific bezogen und beinhalten für jedes Zielgen vier verschiedene, gepoolte siRNAs, die an unterschiedliche Regionen der Gensequenz binden. Für das Pilot-RNAi-Screening wurde ein Set aus 720 Protein-Kinasen ausgewählt. Die siRNA-Bibliothek für das genomweite RNAi-Screening enthielt siRNA-Pools gegen alle annotierten Gene, die sich zum Zeitpunkt der Erstellung der Bibliothek in der NCBI RefSeq Datenbank befanden (ca. 18000 Gene). Als Positivkontrolle wurde eine siRNA gegen Ubiquitin C (UBC) verwendet, als Negativkontrolle diente eine gegen die Sequenz der Renilla-Luziferase gerichtete siRNA, die im humanen Genom keine Zielsequenz besitzt. Im 384-Well-Format wurden pro Well 2000 HEK293-Zellen ausgesät und in einem Gesamtvolumen von 50 µl revers mit 50 nM siRNAs und DharmaFECT[®] 1 Transfektionsreagenz transfiziert (siehe Transiente siRNA-Transfektion, Abschnitt 4.2.3.8). Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden bei 37 °C wurden pro Well 10 µl 5-Azacytidin in einer Konzentration von 600 µM (Endkonzentration 100 µM) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von weiteren 48 Stunden wurde die Zellvitalität anhand des CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assays (Promega) bestimmt. Die Rohdaten wurden anschließend mit der CellHTS2 Software [237] normalisiert und ausgewertet. Die RNAi-Screens wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Dominique Kranz im Labor von Prof. Michael Boutros (DKFZ) durchgeführt und ausgewertet. Anfängliche Etablierungsarbeiten wurden von Dr. Florian Fuchs, ebenfalls aus der Abteilung von Prof. Michael Boutros, unterstützt.

4.2.3.15 Durchflusszytometrische Analyse (FACS)

Die FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting)-Analyse fluoreszenzgefärbter Zellkerne dient der Charakterisierung des Zellzyklusprofils einer Zellpopulation. Sie basiert auf dem proportionalen Verhältnis zwischen dem Fluoreszenzsignal einer Zelle und der Menge ihrer genomischen DNA. Auf diese Weise können ruhende Zellen, die sich in der G1-Phase des Zellzyklus befinden und einen einfachen Chromosomensatz aufweisen, von Zellen mit doppeltem Chromosomensatz, der die G2-Phase des Zellzyklus charakterisiert, unterschieden werden. Replizierende Zellen erzeugen ein intermediäres Fluoreszenzsignal in der FACS-Analyse. Für die Durchflusszytometrische Analyse wurden 1×10^6 Zellen mit unterschiedlichen Wirkstoffkonzentrationen für 24, 48 und 72 Stunden behandelt und anschließend in einem 15 ml Zentrifugenröhrchen für 5 Minuten bei 1100 rpm zentrifugiert. Nach Verwerfung des Mediums wurden die Zellen in 100 μ l PBS vereinzelt und tropfenweise zur Fixierung in 5 ml eiskaltes Ethanol (-20 °C) gegeben. Anschließend wurde die Suspension für 60 Minuten bei 4 °C inkubiert und erneut zentrifugiert (5 Minuten bei 1100 rpm). Nach Verwerfung des Überstandes wurden die fixierten Zellen in 400 μ l Propidiumiodidlösung (50 μ g/ml Propidiumiodid und 50 μ g/ml RNase A in PBS) aufgenommen und für 45 Minuten bei 37 °C lichtgeschützt inkubiert. Die durchflusszytometrische Analyse wurde anschließend mit einem FACSCanto II FACS-Gerät (Becton Dickinson) durchgeführt. Dabei wurden pro Probe 10 000 Zählereignisse unter Verwendung der FACSDiva Software (Becton Dickinson) analysiert.

5 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

%	Prozent
°C	Grad Celsius
AZA	5-Azacytidin, Azacytidin
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	komplementäre Deoxyribonukleinsäure
CDP	Cytidindiphosphat
CE	Kapillarelektrophorese
CE-LIF	Kapillarelektrophorese mit laserinduzierter Fluoreszenz
cm	Zentimeter
CMP	Cytidinmonophosphat
COBRA	Combined Bisulfite Restriction Analysis
CpG/CG	Cytosin-Phosphor-Guanosin
CTP	Cytidintriphosphat
Cyd	Cytidin
DAC	5-Aza-2'-Deoxycytidin, Decitabin
dCDP	Desoxy-Cytidindiphosphat
dCMP	Desoxy-Cytidinmonophosphat
dCTP	Desoxy-Cytidintriphosphat
dCyd	Desoxycytidin
ddH ₂ O	Doppelt-destilliertes Wasser
DEPC	Diethyl-Pyrocarbonat
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dUrd	Deoxyuridin
EDC	N(3-Dimethylaminopropyl)N-Ethylcarboimid
EDTA	Ethylendiamintetracetat
et al.	et alii
FBS	Fetales Rinderserum
FDA	US Food and Drug Administration
g	Gravitation
G	Guanosin
HEPES	N(2Hydroxyethyl)piperazin-N'(2Ethanesulfonicacid)
Konz.	Konzentration
LINE	Long interspered nuclear elements
M	Molar
mA	Milliampere
MG	Molekulargewicht
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA

mV	Millivolt
NEB	New England Biolabs
ng	Nanogramm
nM	Nanomolar
OD _x	Optische Dichte bei der Wellenlänge x
p.s.i	pressure per sqare inch
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S2	Satelliten 2-Sequenz
STABW	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris (Hydroxylmethyl)-Aminomethan
U	units
Urd	Uridin
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
x	Wiederholungen
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

6 REFERENZEN

1. Waddington, C.H., The epigenotype. *Endeavour* 1942. 1(18).
2. Holliday, R., Epigenetics: an overview. *Dev Genet*, 1994. 15(6): p. 453-7.
3. Morgan, H.D., et al., Epigenetic reprogramming in mammals. *Hum Mol Genet*, 2005. 14 Spec No 1: p. R47-58.
4. Bird, A., DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, 2002. 16(1): p. 6-21.
5. Chow, J.C. and C.J. Brown, Forming facultative heterochromatin: silencing of an X chromosome in mammalian females. *Cell Mol Life Sci*, 2003. 60(12): p. 2586-603.
6. Murphy, S.K. and R.L. Jirtle, Imprinting evolution and the price of silence. *Bioessays*, 2003. 25(6): p. 577-88.
7. Okamoto, I., et al., Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. *Science*, 2004. 303(5658): p. 644-9.
8. Ehrlich, M., Expression of various genes is controlled by DNA methylation during mammalian development. *J Cell Biochem*, 2003. 88(5): p. 899-910.
9. Li, E., Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*, 2002. 3(9): p. 662-73.
10. Meehan, R.R. and I. Stancheva, DNA methylation and control of gene expression in vertebrate development. *Essays Biochem*, 2001. 37: p. 59-70.
11. Hermann, A., H. Gowher, and A. Jeltsch, Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci*, 2004. 61(19-20): p. 2571-87.
12. Chen, W.G., et al., Derepression of BDNF transcription involves calcium-dependent phosphorylation of MeCP2. *Science*, 2003. 302(5646): p. 885-9.
13. Martinowich, K., et al., DNA methylation-related chromatin remodeling in activity-dependent BDNF gene regulation. *Science*, 2003. 302(5646): p. 890-3.
14. Nan, X. and A. Bird, The biological functions of the methyl-CpG-binding protein MeCP2 and its implication in Rett syndrome. *Brain Dev*, 2001. 23 Suppl 1: p. S32-7.
15. Fitzpatrick, D.R. and C.B. Wilson, Methylation and demethylation in the regulation of genes, cells, and responses in the immune system. *Clin Immunol*, 2003. 109(1): p. 37-45.
16. Franklin, T.B. and I.M. Mansuy, Epigenetic inheritance in mammals: Evidence for the impact of adverse environmental effects. *Neurobiol Dis*, 2009.
17. Suzuki, M.M. and A. Bird, DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet*, 2008. 9(6): p. 465-76.
18. Wang, Y., et al., Linking covalent histone modifications to epigenetics: the rigidity and plasticity of the marks. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2004. 69: p. 161-9.
19. Kornberg, R.D., Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science*, 1974. 184(139): p. 868-71.
20. Kouzarides, T., Chromatin modifications and their function. *Cell*, 2007. 128(4): p. 693-705.
21. Strahl, B.D. and C.D. Allis, The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000. 403(6765): p. 41-5.
22. Schones, D.E. and K. Zhao, Genome-wide approaches to studying chromatin modifications. *Nat Rev Genet*, 2008. 9(3): p. 179-91.
23. Bernstein, B.E., et al., A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell*, 2006. 125(2): p. 315-26.
24. Jenuwein, T. and C.D. Allis, Translating the histone code. *Science*, 2001. 293(5532): p. 1074-80.
25. Ehrlich, M., et al., Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res*, 1982. 10(8): p. 2709-21.
26. Eckhardt, F., et al., DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet*, 2006. 38(12): p. 1378-85.
27. Walsh, C.P., J.R. Chaillet, and T.H. Bestor, Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet*, 1998. 20(2): p. 116-7.
28. Yoder, J.A., C.P. Walsh, and T.H. Bestor, Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet*, 1997. 13(8): p. 335-40.
29. Gama-Sosa, M.A., et al., Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals. *Biochim Biophys Acta*, 1983. 740(2): p. 212-9.

30. Takai, D. and P.A. Jones, Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(6): p. 3740-5.
31. Jones, P.A. and S.B. Baylin, The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*, 2002. 3(6): p. 415-28.
32. Holliday, R. and J.E. Pugh, DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 1975. 187(4173): p. 226-32.
33. Venter, J.C., et al., The sequence of the human genome. *Science*, 2001. 291(5507): p. 1304-51.
34. Lander, E.S., et al., Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 2001. 409(6822): p. 860-921.
35. Cross, S.H. and A.P. Bird, CpG islands and genes. *Curr Opin Genet Dev*, 1995. 5(3): p. 309-14.
36. Riggs, A.D., X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenet Cell Genet*, 1975. 14(1): p. 9-25.
37. Brueckner, B. and F. Lyko, DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci*, 2004. 25(11): p. 551-4.
38. Rountree, M.R., K.E. Bachman, and S.B. Baylin, DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet*, 2000. 25(3): p. 269-77.
39. Chuang, L.S., et al., Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science*, 1997. 277(5334): p. 1996-2000.
40. Robertson, K.D., et al., DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet*, 2000. 25(3): p. 338-42.
41. Pradhan, S. and G.D. Kim, The retinoblastoma gene product interacts with maintenance human DNA (cytosine-5) methyltransferase and modulates its activity. *EMBO J*, 2002. 21(4): p. 779-88.
42. Fuks, F., et al., The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(9): p. 2305-12.
43. Kimura, H. and K. Shiota, Methyl-CpG-binding protein, MeCP2, is a target molecule for maintenance DNA methyltransferase, Dnmt1. *J Biol Chem*, 2003. 278(7): p. 4806-12.
44. Tatematsu, K.I., T. Yamazaki, and F. Ishikawa, MBD2-MBD3 complex binds to hemimethylated DNA and forms a complex containing DNMT1 at the replication foci in late S phase. *Genes Cells*, 2000. 5(8): p. 677-88.
45. Kim, G.D., et al., Co-operation and communication between the human maintenance and de novo DNA (cytosine-5) methyltransferases. *EMBO J*, 2002. 21(15): p. 4183-95.
46. Fatemi, M., et al., The activity of the murine DNA methyltransferase Dnmt1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J Mol Biol*, 2001. 309(5): p. 1189-99.
47. Flynn, J., J.F. Glickman, and N.O. Reich, Murine DNA cytosine-C5 methyltransferase: pre-steady- and steady-state kinetic analysis with regulatory DNA sequences. *Biochemistry*, 1996. 35(23): p. 7308-15.
48. Pradhan, S., et al., Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem*, 1999. 274(46): p. 33002-10.
49. Bestor, T.H., Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain. *EMBO J*, 1992. 11(7): p. 2611-7.
50. Leonhardt, H., et al., A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*, 1992. 71(5): p. 865-73.
51. Zhang, W., et al., Comparison of global DNA methylation profiles in replicative versus premature senescence. *Life Sci*, 2008. 83(13-14): p. 475-80.
52. Li, E., T.H. Bestor, and R. Jaenisch, Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 1992. 69(6): p. 915-26.
53. Chen, T., et al., Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat Genet*, 2007. 39(3): p. 391-6.
54. Schaefer, M. and F. Lyko, Solving the Dnmt2 enigma. *Chromosoma*, 2010. 119(1): p. 35-40.
55. Gutierrez, A. and R.J. Sommer, Evolution of dnmt-2 and mbd-2-like genes in the free-living nematodes *Pristionchus pacificus*, *Caenorhabditis elegans* and *Caenorhabditis briggsae*. *Nucleic Acids Res*, 2004. 32(21): p. 6388-96.

56. Hermann, A., S. Schmitt, and A. Jeltsch, The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J Biol Chem*, 2003. 278(34): p. 31717-21.
57. Okano, M., S. Xie, and E. Li, Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet*, 1998. 19(3): p. 219-20.
58. Goll, M.G. and T.H. Bestor, Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem*, 2005. 74: p. 481-514.
59. Schaefer, M., et al., Azacytidine inhibits RNA methylation at DNMT2 target sites in human cancer cell lines. *Cancer Res*, 2009. 69(20): p. 8127-32.
60. Goll, M.G., et al., Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 2006. 311(5759): p. 395-8.
61. Helm, M., Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic Acids Res*, 2006. 34(2): p. 721-33.
62. Pascual, J., et al., Structure of the PHD zinc finger from human Williams-Beuren syndrome transcription factor. *J Mol Biol*, 2000. 304(5): p. 723-9.
63. Qiu, C., et al., The PWWP domain of mammalian DNA methyltransferase Dnmt3b defines a new family of DNA-binding folds. *Nat Struct Biol*, 2002. 9(3): p. 217-24.
64. Ge, Y.Z., et al., Chromatin targeting of de novo DNA methyltransferases by the PWWP domain. *J Biol Chem*, 2004. 279(24): p. 25447-54.
65. Gowher, H. and A. Jeltsch, Enzymatic properties of recombinant Dnmt3a DNA methyltransferase from mouse: the enzyme modifies DNA in a non-processive manner and also methylates non-CpG [correction of non-CpA] sites. *J Mol Biol*, 2001. 309(5): p. 1201-8.
66. Yokochi, T. and K.D. Robertson, Preferential methylation of unmethylated DNA by Mammalian de novo DNA methyltransferase Dnmt3a. *J Biol Chem*, 2002. 277(14): p. 11735-45.
67. Aapola, U., et al., Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics*, 2000. 65(3): p. 293-8.
68. Hata, K., et al., Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, 2002. 129(8): p. 1983-93.
69. Chedin, F., M.R. Lieber, and C.L. Hsieh, The DNA methyltransferase-like protein DNMT3L stimulates de novo methylation by Dnmt3a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(26): p. 16916-21.
70. Bourc'his, D., et al., Dnmt3L and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*, 2001. 294(5551): p. 2536-9.
71. Okano, M., et al., DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 1999. 99(3): p. 247-57.
72. Chen, T., et al., Establishment and maintenance of genomic methylation patterns in mouse embryonic stem cells by Dnmt3a and Dnmt3b. *Mol Cell Biol*, 2003. 23(16): p. 5594-605.
73. Hansen, R.S., et al., The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(25): p. 14412-7.
74. Xu, G.L., et al., Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature*, 1999. 402(6758): p. 187-91.
75. Gowher, H. and A. Jeltsch, Molecular enzymology of the catalytic domains of the Dnmt3a and Dnmt3b DNA methyltransferases. *J Biol Chem*, 2002. 277(23): p. 20409-14.
76. Rhee, I., et al., DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature*, 2002. 416(6880): p. 552-6.
77. Liang, G., et al., Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol*, 2002. 22(2): p. 480-91.
78. Ramsahoye, B.H., et al., Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. 97(10): p. 5237-42.
79. Suetake, I., et al., Distinct enzymatic properties of recombinant mouse DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b. *J Biochem*, 2003. 133(6): p. 737-44.
80. Tada, M., et al., Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somatic nucleus in hybrid cells. *EMBO J*, 1997. 16(21): p. 6510-20.
81. Reik, W. and J. Walter, Evolution of imprinting mechanisms: the battle of the sexes begins in the zygote. *Nat Genet*, 2001. 27(3): p. 255-6.
82. Zhu, J.K., Epigenome sequencing comes of age. *Cell*, 2008. 133(3): p. 395-7.

83. Kangaspeska, S., et al., Transient cyclical methylation of promoter DNA. *Nature*, 2008. 452(7183): p. 112-5.
84. Metivier, R., et al., Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter. *Nature*, 2008. 452(7183): p. 45-50.
85. Rai, K., et al., DNA demethylation in zebrafish involves the coupling of a deaminase, a glycosylase, and gadd45. *Cell*, 2008. 135(7): p. 1201-12.
86. Barreto, G., et al., Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature*, 2007. 445(7128): p. 671-5.
87. Jin, S.G., C. Guo, and G.P. Pfeifer, GADD45A does not promote DNA demethylation. *PLoS Genet*, 2008. 4(3): p. e1000013.
88. Engel, N., et al., Conserved DNA methylation in Gadd45a(-/-) mice. *Epigenetics*, 2009. 4(2): p. 98-9.
89. Carlson, L.L., A.W. Page, and T.H. Bestor, Properties and localization of DNA methyltransferase in preimplantation mouse embryos: implications for genomic imprinting. *Genes Dev*, 1992. 6(12B): p. 2536-41.
90. Gopalakrishnan, S., et al., A novel DNMT3B splice variant expressed in tumor and pluripotent cells modulates genomic DNA methylation patterns and displays altered DNA binding. *Mol Cancer Res*, 2009. 7(10): p. 1622-34.
91. Vire, E., et al., The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*, 2006. 439(7078): p. 871-4.
92. Thomson, J.P., et al., CpG islands influence chromatin structure via the CpG-binding protein Cfp1. *Nature*, 2010. 464(7291): p. 1082-6.
93. Blackledge, N.P., et al., CpG islands recruit a histone H3 lysine 36 demethylase. *Mol Cell*, 2010. 38(2): p. 179-90.
94. Ooi, S.K., et al., DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. *Nature*, 2007. 448(7154): p. 714-7.
95. Brandeis, M., et al., Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature*, 1994. 371(6496): p. 435-8.
96. Macleod, D., et al., Sp1 sites in the mouse aprt gene promoter are required to prevent methylation of the CpG island. *Genes Dev*, 1994. 8(19): p. 2282-92.
97. Appanah, R., et al., An unmethylated 3' promoter-proximal region is required for efficient transcription initiation. *PLoS Genet*, 2007. 3(2): p. e27.
98. Zemach, A., et al., Genome-Wide Evolutionary Analysis of Eukaryotic DNA Methylation. *Science*, 2010.
99. Hellman, A. and A. Chess, Gene body-specific methylation on the active X chromosome. *Science*, 2007. 315(5815): p. 1141-3.
100. Zilberman, D., et al., Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat Genet*, 2007. 39(1): p. 61-9.
101. Feng, S., et al., Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010. 107(19): p. 8689-94.
102. Becker, P.B., S. Ruppert, and G. Schutz, Genomic footprinting reveals cell type-specific DNA binding of ubiquitous factors. *Cell*, 1987. 51(3): p. 435-43.
103. Tate, P.H. and A.P. Bird, Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*, 1993. 3(2): p. 226-31.
104. Bird, A.P. and A.P. Wolffe, Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell*, 1999. 99(5): p. 451-4.
105. Jones, P.L., et al., Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet*, 1998. 19(2): p. 187-91.
106. Wild, L. and J.M. Flanagan, Genome-wide hypomethylation in cancer may be a passive consequence of transformation. *Biochim Biophys Acta*, 2010.
107. Tran, R.K., et al., DNA methylation profiling identifies CG methylation clusters in Arabidopsis genes. *Curr Biol*, 2005. 15(2): p. 154-9.
108. Mutskov, V. and G. Felsenfeld, Silencing of transgene transcription precedes methylation of promoter DNA and histone H3 lysine 9. *EMBO J*, 2004. 23(1): p. 138-49.
109. Oyer, J.A., et al., Aberrant epigenetic silencing is triggered by a transient reduction in gene expression. *PLoS One*, 2009. 4(3): p. e4832.
110. Chan, T.L., et al., Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet*, 2006. 38(10): p. 1178-83.

111. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature*, 1983. 301(5895): p. 89-92.
112. Jones, P.A. and S.B. Baylin, The epigenomics of cancer. *Cell*, 2007. 128(4): p. 683-92.
113. Herman, J.G. and S.B. Baylin, Promoter-region hypermethylation and gene silencing in human cancer. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2000. 249: p. 35-54.
114. Riggs, A.D. and P.A. Jones, 5-methylcytosine, gene regulation, and cancer. *Adv Cancer Res*, 1983. 40: p. 1-30.
115. Feinberg, A.P. and B. Tycko, The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(2): p. 143-53.
116. Ehrlich, M., DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene*, 2002. 21(35): p. 5400-13.
117. Cadieux, B., et al., Genome-wide hypomethylation in human glioblastomas associated with specific copy number alteration, methylenetetrahydrofolate reductase allele status, and increased proliferation. *Cancer Res*, 2006. 66(17): p. 8469-76.
118. McCabe, M.T., J.C. Brandes, and P.M. Vertino, Cancer DNA methylation: molecular mechanisms and clinical implications. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(12): p. 3927-37.
119. Bracken, A.P., et al., EZH2 is downstream of the pRB-E2F pathway, essential for proliferation and amplified in cancer. *EMBO J*, 2003. 22(20): p. 5323-35.
120. Varambally, S., et al., The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*, 2002. 419(6907): p. 624-9.
121. Fraga, M.F., et al., Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet*, 2005. 37(4): p. 391-400.
122. Egger, G., et al., Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 2004. 429(6990): p. 457-63.
123. Monneret, C., Histone deacetylase inhibitors for epigenetic therapy of cancer. *Anticancer Drugs*, 2007. 18(4): p. 363-70.
124. Mann, B.S., et al., FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist*, 2007. 12(10): p. 1247-52.
125. Campas-Moya, C., Romidepsin for the treatment of cutaneous T-cell lymphoma. *Drugs Today (Barc)*, 2009. 45(11): p. 787-95.
126. Segura-Pacheco, B., et al., Reactivation of tumor suppressor genes by the cardiovascular drugs hydralazine and procainamide and their potential use in cancer therapy. *Clin Cancer Res*, 2003. 9(5): p. 1596-603.
127. Fang, M.Z., et al., Tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits DNA methyltransferase and reactivates methylation-silenced genes in cancer cell lines. *Cancer Res*, 2003. 63(22): p. 7563-70.
128. Brueckner, B., et al., Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases. *Cancer Res*, 2005. 65(14): p. 6305-11.
129. Cornacchia, E., et al., Hydralazine and procainamide inhibit T cell DNA methylation and induce autoreactivity. *J Immunol*, 1988. 140(7): p. 2197-200.
130. Villar-Garea, A., et al., Procaine is a DNA-demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells. *Cancer Res*, 2003. 63(16): p. 4984-9.
131. Sorm, F., et al., 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia*, 1964. 20(4): p. 202-3.
132. Sorm, F. and J. Vesely, Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine against leukemic and hemopoietic tissues in AKR mice. *Neoplasma*, 1968. 15(4): p. 339-43.
133. Jones, P.A. and S.M. Taylor, Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*, 1980. 20(1): p. 85-93.
134. Cheng, J.C., et al., Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell*, 2004. 6(2): p. 151-8.
135. Zhou, L., et al., Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *J Mol Biol*, 2002. 321(4): p. 591-9.
136. Cihak, A. and F. Sorm, Biochemical Effects and Metabolic Transformations of 5-Azacytidine in *Escherichia coli*. *Collection Czech. Chem. Commun*, 1965(30): p. 2091-2102.
137. Pliml, J. and F. Sorm, Synthesis of 2-deoxy-d-ribofuranosyl-5-azacytosine. *Coll Czech Chem Commun*, 1964(29): p. 2576-2577.
138. Santini, V., H.M. Kantarjian, and J.P. Issa, Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications. *Ann Intern Med*, 2001. 134(7): p. 573-86.

139. Von Hoff, D.D., M. Slavik, and F.M. Muggia, 5-Azacytidine. A new anticancer drug with effectiveness in acute myelogenous leukemia. *Ann Intern Med*, 1976. 85(2): p. 237-45.
140. Onetto, N., et al., In vitro biochemical tests to evaluate the response to therapy of acute leukemia with cytosine arabinoside or 5-AZA-2'-deoxycytidine. *Semin Oncol*, 1987. 14(2 Suppl 1): p. 231-7.
141. Constantinides, P.G., P.A. Jones, and W. Gevers, Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature*, 1977. 267(5609): p. 364-6.
142. Taylor, S.M. and P.A. Jones, Multiple new phenotypes induced in 10T1/2 and 3T3 cells treated with 5-azacytidine. *Cell*, 1979. 17(4): p. 771-9.
143. Santi, D.V., A. Norment, and C.E. Garrett, Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. 81(22): p. 6993-7.
144. Silverman, L.R., et al., Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*, 2002. 20(10): p. 2429-40.
145. Wijermans, P., et al., 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. *J Clin Oncol*, 2000. 18(5): p. 956-62.
146. Issa, J.P. and H.M. Kantarjian, Targeting DNA methylation. *Clin Cancer Res*, 2009. 15(12): p. 3938-46.
147. Corey, S.J., et al., Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat Rev Cancer*, 2007. 7(2): p. 118-29.
148. Fenaux, P., et al., Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*, 2010. 28(4): p. 562-9.
149. Hollenbach, P.W., et al., A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS One*, 2010. 5(2): p. e9001.
150. Stresemann, C. and F. Lyko, Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacitidine and decitabine. *Int J Cancer*, 2008. 123(1): p. 8-13.
151. Stresemann, C., et al., Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res*, 2006. 66(5): p. 2794-800.
152. Li, L.H., et al., Cytotoxicity and mode of action of 5-azacytidine on L1210 leukemia. *Cancer Res*, 1970. 30(11): p. 2760-9.
153. Momparler, R.L. and G.A. Fischer, Mammalian deoxynucleoside kinase. I. Deoxycytidine kinase: purification, properties, and kinetic studies with cytosine arabinoside. *J Biol Chem*, 1968. 243(16): p. 4298-304.
154. Van Rompay, A.R., et al., Phosphorylation of uridine and cytidine nucleoside analogs by two human uridine-cytidine kinases. *Mol Pharmacol*, 2001. 59(5): p. 1181-6.
155. Cihak, A., Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes. *Oncology*, 1974. 30(5): p. 405-22.
156. Schermelleh, L., et al., Trapped in action: direct visualization of DNA methyltransferase activity in living cells. *Nat Methods*, 2005. 2(10): p. 751-6.
157. Creusot, F., G. Acs, and J.K. Christman, Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J Biol Chem*, 1982. 257(4): p. 2041-8.
158. Gius, D., et al., Distinct effects on gene expression of chemical and genetic manipulation of the cancer epigenome revealed by a multimodality approach. *Cancer Cell*, 2004. 6(4): p. 361-71.
159. Schuebel, K.E., et al., Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer. *PLoS Genet*, 2007. 3(9): p. 1709-23.
160. Komashko, V.M. and P.J. Farnham, 5-azacytidine treatment reorganizes genomic histone modification patterns. *Epigenetics*, 2010. 5(3).
161. Glover, A.B. and B. Leyland-Jones, Biochemistry of azacitidine: a review. *Cancer Treat Rep*, 1987. 71(10): p. 959-64.
162. Cihak, A., J.W. Weiss, and H.C. Pitot, Characterization of polyribosomes and maturation of ribosomal RNA in hepatoma cells treated with 5-azacytidine. *Cancer Res*, 1974. 34(11): p. 3003-9.
163. Reichman, M. and S. Penman, The mechanism of inhibition of protein synthesis by 5-azacytidine in HeLa cells. *Biochim Biophys Acta*, 1973. 324(2): p. 282-9.

164. Lu, L.J. and K. Randerath, Effects of 5-azacytidine on transfer RNA methyltransferases. *Cancer Res*, 1979. 39(3): p. 940-9.
165. Feinberg, A.P., Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*, 2007. 447(7143): p. 433-40.
166. Toyota, M., et al., Aberrant methylation of the Cyclooxygenase 2 CpG island in colorectal tumors. *Cancer Res*, 2000. 60(15): p. 4044-8.
167. Devereux, T.R., et al., DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Res*, 1999. 59(24): p. 6087-90.
168. Wolff, E.M., et al., Hypomethylation of a LINE-1 promoter activates an alternate transcript of the MET oncogene in bladders with cancer. *PLoS Genet*, 2010. 6(4): p. e1000917.
169. Weber, B., et al., Demethylation of a LINE-1 antisense promoter in the cMet locus impairs Met signalling through induction of illegitimate transcription. *Oncogene*, 2010. In press.
170. Juttermann, R., E. Li, and R. Jaenisch, Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994. 91(25): p. 11797-801.
171. Ghoshal, K., et al., 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. *Mol Cell Biol*, 2005. 25(11): p. 4727-41.
172. Issa, J.P., DNA methylation as a therapeutic target in cancer. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(6): p. 1634-7.
173. Borthakur, G., et al., Activity of decitabine in patients with myelodysplastic syndrome previously treated with azacitidine. *Leuk Lymphoma*, 2008. 49(4): p. 690-5.
174. Stresemann, C., et al., Azacitidine causes complex DNA methylation responses in myeloid leukemia. *Mol Cancer Ther*, 2008. 7(9): p. 2998-3005.
175. Mund, C., et al., Characterization of DNA demethylation effects induced by 5-Aza-2'-deoxycytidine in patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer Res*, 2005. 65(16): p. 7086-90.
176. Issa, J.P., et al., Phase II study of low-dose decitabine in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to imatinib mesylate. *J Clin Oncol*, 2005. 23(17): p. 3948-56.
177. Soriano, A.O., et al., Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood*, 2007. 110(7): p. 2302-8.
178. Gore, S.D., et al., Combined DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibition in the treatment of myeloid neoplasms. *Cancer Res*, 2006. 66(12): p. 6361-9.
179. Martin, M.G., et al., A phase II study of 5-day intravenous azacitidine in patients with myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol*, 2009. 84(9): p. 560-4.
180. Yang, A.S., et al., DNA methylation changes after 5-aza-2'-deoxycytidine therapy in patients with leukemia. *Cancer Res*, 2006. 66(10): p. 5495-503.
181. Paz, M.F., et al., Genetic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in colon cancer cells deficient in DNA methyltransferases. *Hum Mol Genet*, 2003. 12(17): p. 2209-19.
182. Qin, T., et al., Mechanisms of resistance to 5-aza-2'-deoxycytidine in human cancer cell lines. *Blood*, 2009. 113(3): p. 659-67.
183. Liang, G., et al., Analysis of gene induction in human fibroblasts and bladder cancer cells exposed to the methylation inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res*, 2002. 62(4): p. 961-6.
184. Pali, S.S., et al., DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Mol Cell Biol*, 2008. 28(2): p. 752-71.
185. Egger, G., et al., Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. 103(38): p. 14080-5.
186. Rhee, I., et al., CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature*, 2000. 404(6781): p. 1003-7.
187. Bender, C.M., M.M. Pao, and P.A. Jones, Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Res*, 1998. 58(1): p. 95-101.
188. Momparler, R.L., et al., Cell cycle effects and cellular pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1984. 13(3): p. 191-4.

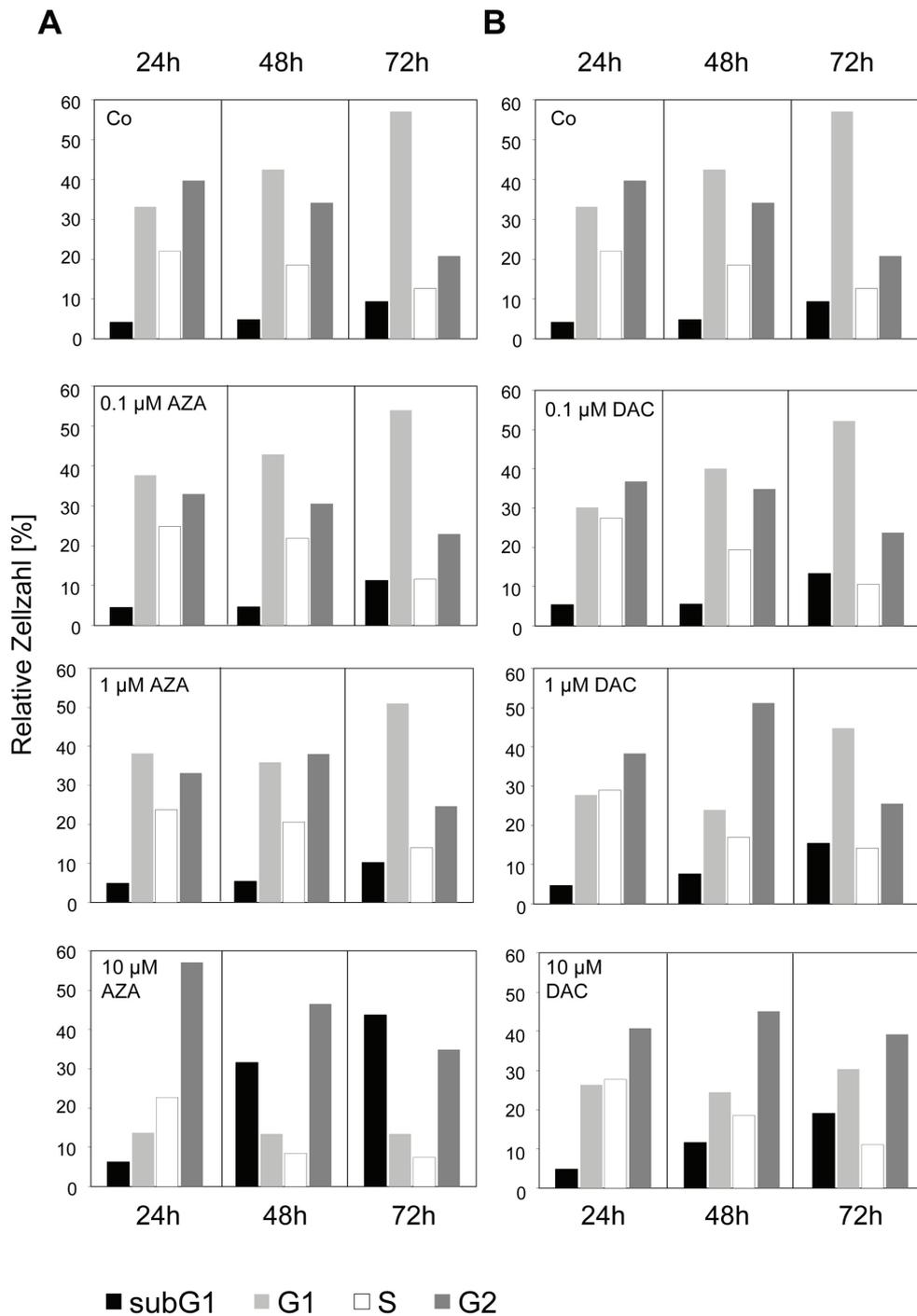
189. Taylor, R.C., S.P. Cullen, and S.J. Martin, Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2008. 9(3): p. 231-41.
190. Rogakou, E.P., et al., DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 1998. 273(10): p. 5858-68.
191. Burma, S., et al., ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J Biol Chem*, 2001. 276(45): p. 42462-7.
192. Fornace, A.J., Jr., et al., Mammalian genes coordinately regulated by growth arrest signals and DNA-damaging agents. *Mol Cell Biol*, 1989. 9(10): p. 4196-203.
193. Xiong, Z. and P.W. Laird, COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res*, 1997. 25(12): p. 2532-4.
194. Christman, J.K., 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, 2002. 21(35): p. 5483-95.
195. Bibikova, M., et al., Genome-wide DNA methylation profiling using Infinium[®] assay. *Epigenomics*, 2009. 1(1): p. 177-200.
196. Taylor, K.H., et al., Ultradeep bisulfite sequencing analysis of DNA methylation patterns in multiple gene promoters by 454 sequencing. *Cancer Res*, 2007. 67(18): p. 8511-8.
197. Lister, R., et al., Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 2009. 462(7271): p. 315-22.
198. Weisenberger, D.J., et al., Analysis of repetitive element DNA methylation by MethyLight. *Nucleic Acids Res*, 2005. 33(21): p. 6823-36.
199. Schlesinger, Y., et al., Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet*, 2007. 39(2): p. 232-6.
200. Lee, T.I., et al., Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*, 2006. 125(2): p. 301-13.
201. Ohm, J.E., et al., A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat Genet*, 2007. 39(2): p. 237-42.
202. Bibikova, M., et al., High-throughput DNA methylation profiling using universal bead arrays. *Genome Res*, 2006. 16(3): p. 383-93.
203. Esteller, M., Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005. 45: p. 629-56.
204. Graham, F.L., et al., Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 1977. 36(1): p. 59-74.
205. Zhang, J.H., T.D. Chung, and K.R. Oldenburg, A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen*, 1999. 4(2): p. 67-73.
206. Jurkowski, T.P., et al., Human DNMT2 methylates tRNA(Asp) molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism. *RNA*, 2008. 14(8): p. 1663-70.
207. Hartwell, L.H. and M.B. Kastan, Cell cycle control and cancer. *Science*, 1994. 266(5192): p. 1821-8.
208. Jiemjit, A., et al., p21(WAF1/CIP1) induction by 5-azacytosine nucleosides requires DNA damage. *Oncogene*, 2008. 27(25): p. 3615-23.
209. Hollander, M.C. and A.J. Fornace, Jr., Genomic instability, centrosome amplification, cell cycle checkpoints and Gadd45a. *Oncogene*, 2002. 21(40): p. 6228-33.
210. Velicescu, M., et al., Cell division is required for de novo methylation of CpG islands in bladder cancer cells. *Cancer Res*, 2002. 62(8): p. 2378-84.
211. Robertson, K.D., et al., The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors. *Nucleic Acids Res*, 1999. 27(11): p. 2291-8.
212. Roll, J.D., et al., DNMT3b overexpression contributes to a hypermethylator phenotype in human breast cancer cell lines. *Mol Cancer*, 2008. 7: p. 15.
213. Linhart, H.G., et al., Dnmt3b promotes tumorigenesis in vivo by gene-specific de novo methylation and transcriptional silencing. *Genes Dev*, 2007. 21(23): p. 3110-22.
214. Sasai, N., M. Nakao, and P.A. Defossez, Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Res*, 2010.
215. Meilinger, D., et al., Np95 interacts with de novo DNA methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b, and mediates epigenetic silencing of the viral CMV promoter in embryonic stem cells. *EMBO Rep*, 2009. 10(11): p. 1259-64.
216. Clouaire, T., et al., Recruitment of MBD1 to target genes requires sequence-specific interaction of the MBD domain with methylated DNA. *Nucleic Acids Res*, 2010.

217. Bogdanovic, O. and G.J. Veenstra, DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*, 2009. 118(5): p. 549-65.
218. Matarazzo, M.R., et al., Multiple binding of methyl-CpG and polycomb proteins in long-term gene silencing events. *J Cell Physiol*, 2007. 210(3): p. 711-9.
219. Widschwendter, M., et al., Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet*, 2007. 39(2): p. 157-8.
220. Cameron, E.E., et al., Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet*, 1999. 21(1): p. 103-7.
221. Griffiths, E.A. and S.D. Gore, DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol*, 2008. 45(1): p. 23-30.
222. Miranda, T.B., et al., DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol Cancer Ther*, 2009. 8(6): p. 1579-88.
223. Vesely, J., A. Cihak, and F. Sorm, Characteristics of mouse leukemic cells resistant to 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res*, 1968. 28(10): p. 1995-2000.
224. Rius, M., et al., Human concentrative nucleoside transporter 1-mediated uptake of 5-azacytidine enhances DNA demethylation. *Mol Cancer Ther*, 2009. 8(1): p. 225-31.
225. Momparler, R.L. and J. Laliberte, Induction of cytidine deaminase in HL-60 myeloid leukemic cells by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Leuk Res*, 1990. 14(9): p. 751-4.
226. Daskocil, J. and F. Sorm, The effects of 5-azacytidine and 5-azauridine on protein synthesis in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1970. 38(4): p. 569-74.
227. Laliberte, J., V.E. Marquez, and R.L. Momparler, Potent inhibitors for the deamination of cytosine arabinoside and 5-aza-2'-deoxycytidine by human cytidine deaminase. *Cancer Chemother Pharmacol*, 1992. 30(1): p. 7-11.
228. Boutros, M. and J. Ahringer, The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nat Rev Genet*, 2008. 9(7): p. 554-66.
229. Motorin, Y. and M. Helm, tRNA Stabilization by Modified Nucleotides. *Biochemistry*, 2010.
230. Motorin, Y., F. Lyko, and M. Helm, 5-methylcytosine in RNA: detection, enzymatic formation and biological functions. *Nucleic Acids Res*, 2010. 38(5): p. 1415-30.
231. Chernyakov, I., et al., Degradation of several hypomodified mature tRNA species in *Saccharomyces cerevisiae* is mediated by Met22 and the 5'-3' exonucleases Rat1 and Xrn1. *Genes Dev*, 2008. 22(10): p. 1369-80.
232. Kadaba, S., et al., Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA^{Met} in *S. cerevisiae*. *Genes Dev*, 2004. 18(11): p. 1227-40.
233. Yamasaki, S., et al., Angiogenin cleaves tRNA and promotes stress-induced translational repression. *J Cell Biol*, 2009. 185(1): p. 35-42.
234. Kuck, D., et al., Novel and selective DNA methyltransferase inhibitors: Docking-based virtual screening and experimental evaluation. *Bioorg Med Chem*, 2010. 18(2): p. 822-9.
235. Maniatis, T., et al., Molecular cloning : a laboratory manual / T. Maniatis, E.F. Fritsch, J. Sambrook. Manual for genetic engineering. 1982, Cold Spring Harbor, N.Y. :: Cold Spring Harbor Laboratory.
236. Stach, D., et al., Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels. *Nucleic Acids Res*, 2003. 31(2): p. E2.
237. Boutros, M., L.P. Bras, and W. Huber, Analysis of cell-based RNAi screens. *Genome Biol*, 2006. 7(7): p. R66.
238. Liao, W., et al., APOBEC-2, a cardiac- and skeletal muscle-specific member of the cytidine deaminase supergene family. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999. 260(2): p. 398-404.
239. Sharom, F.J., ABC multidrug transporters: structure, function and role in chemoresistance. *Pharmacogenomics*, 2008. 9(1): p. 105-27.
240. Allegra, C.J., Dihydropyrimidine dehydrogenase activity: prognostic partner of 5-fluorouracil? *Clin Cancer Res*, 1999. 5(8): p. 1947-9.
241. Van Rompay, A.R., M. Johansson, and A. Karlsson, Phosphorylation of nucleosides and nucleoside analogs by mammalian nucleoside monophosphate kinases. *Pharmacol Ther*, 2000. 87(2-3): p. 189-98.
242. Schimmel, K.J., H. Gelderblom, and H.J. Guchelaar, Cyclopentenyl cytosine (CPEC): an overview of its in vitro and in vivo activity. *Curr Cancer Drug Targets*, 2007. 7(5): p. 504-9.

7 ANHANG

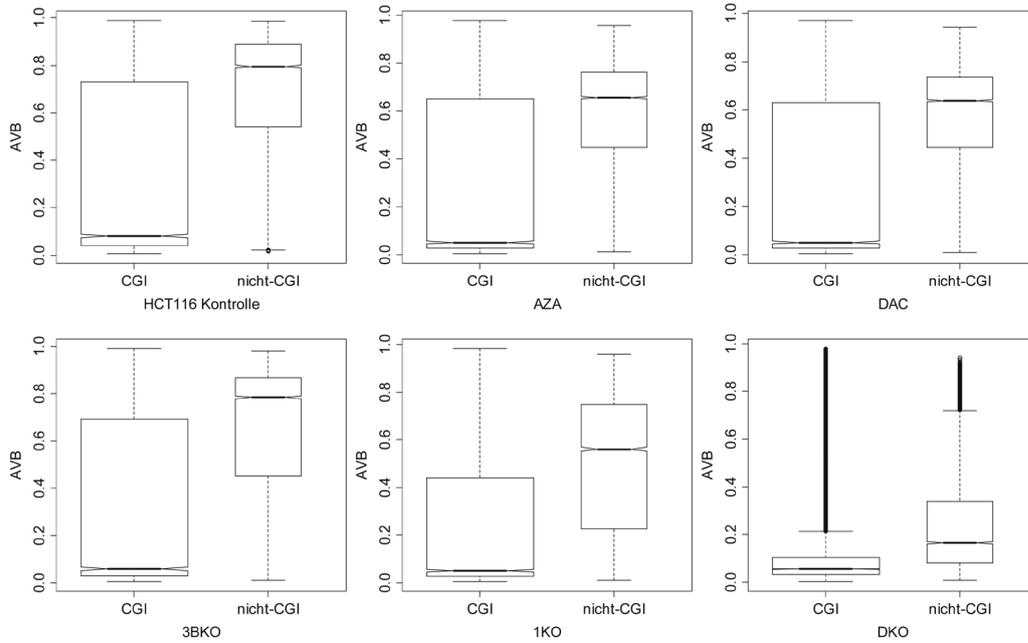
Anhang 1

FACS-Analyse nach Behandlung mit den angegebenen Konzentrationen an AZA (A) oder DAC (B) für 24, 48 und 72 h.



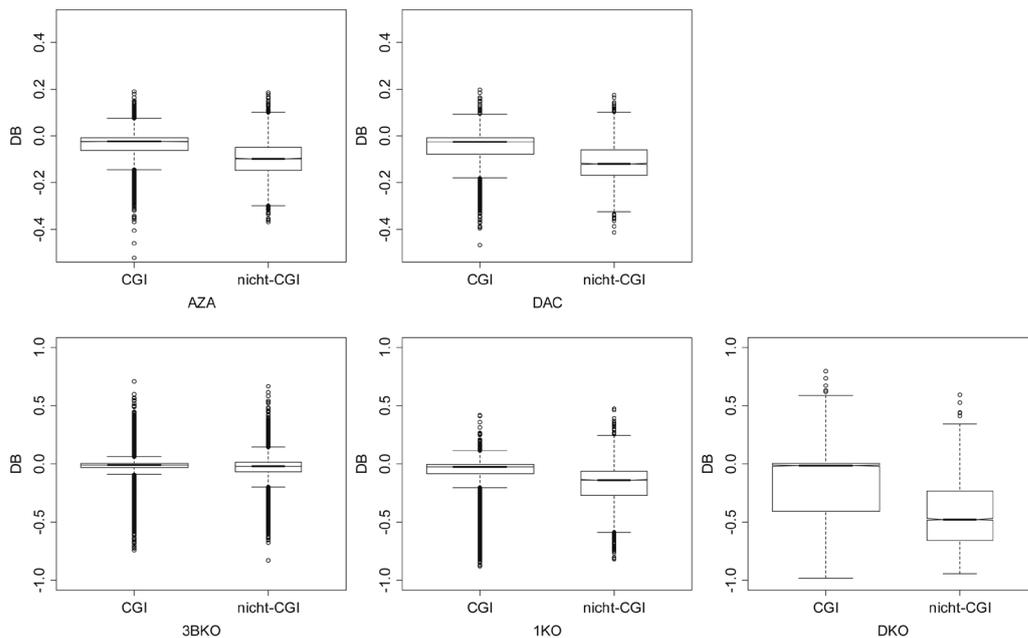
Anhang 2

Die Boxplots zeigen die Methylierung (AVB) in unbehandelten HCT116-Kontrollzellen, Wirkstoff-behandelten Zellen sowie DNMT-Knockout-Zellen in Abhängigkeit von der CG-Lokalisation in CpG-Inseln (CGIs) oder außerhalb von CGIs.



Anhang 3

Die Boxplots zeigen die Demethylierung (Delta Beta, DB) in unbehandelten HCT116-Kontrollzellen, Wirkstoff-behandelten Zellen sowie DNMT-Knockout-Zellen in Abhängigkeit von der CG-Lokalisation in CGIs oder außerhalb von CGIs.



Anhang 4 Ausgewählte Zielgene zur Hit-Validierung

Z-Score	Gen-ID	Accession	V	Z-Score	Gen-ID	Accession	V
-4.44	C22ORF1	NM_001585	x	8.78	PP	M-013134-01	
-4.19	CRYBA2	NM_005209	x	7.76	UBC	M-019408-00	
-4.06	PDE9A	NM_002606	x	6.44	UBD	M-008266-01	
-3.8	DOCK2	NM_004946		6.37	CASC1	NM_018272	
-3.74	GTF2F2	NM_004128		6.15	SAH	NM_005622	
-3.69	APOBEC2	NM_006789	x	6.04	SON	M-012983-00	
-3.67	TCEB2	NM_007108		5.76	SERPINB12	NM_080474	x
-3.64	CACNG5	NM_014404	x	5.27	CDH2	NM_001792	
-3.62	WWP1	NM_007013		5.22	CENPA	NM_001809	
-3.57	FLJ31795	NM_144609	x	5.19	DDX48	M-020762-00	
-3.49	PGRMC2	NM_006320		5.17	DKK3	M-018352-00	
-3.44	NRM	NM_007243	x	5.12	SC4MOL	NM_006745	
-3.28	LOC123722	XM_058721	x	4.95	PPAN	NM_020230	
-3.24	ID3	NM_002167		4.94	PARK7	NM_007262	x
-3.21	FLJ31196	NM_152908		4.86	COMT	NM_000754	x
-3.2	TRIB2	NM_021643		4.81	ITSN2	NM_006277	
-3.2	APOC2	NM_000483	x	4.72	LOC124446	XM_378175	
-3.19	NKIRAS1	NM_020345		4.63	SOCS7	XM_371052	x
-3.17	KIAA0773	NM_014690	x	4.61	POLR2H	NM_006232	
-3.08	TM9SF4	NM_014742	x	4.57	JMJD2A	NM_014663	
-3.06	OASL	NM_003733	x	4.55	TATDN1	NM_032026	
-2.94	PDE6H	NM_006205	x	3.53	ABCG2	NM_004827	x
-2.93	ITPKC	NM_025194	x	1.94	DPYD	NM_000110	x
-2.8	PRIM2A	NM_000947		1.7	UCK1	NM_031432	x
-2.66	ADPRHL2	NM_017825	x				
-2.65	GADD45GIP1	NM_052850					
-2.62	PIP5K3	NM_015040					
-2.62	IDH2	NM_002168	x				
-2.54	SOCS1	NM_003745	x				
-2.52	UGP2	NM_006759					
-2.5	CARD11	NM_032415	x				
-2.02	NME6	NM_005793					
-2	CDA	NM_001785					
-1.95	ATM	NM_138293					
-1.95	SLC25A19	NM_021734	x				
-1.48	CTPS	NM_001905					

V, Validiert; x, validiert in Quadruplikaten mit RNAi-Screen-identischen siRNA-Pools, rotmarkierte signifikante Hits wurden nicht weiter validiert, da der siRNA-Knockdown zum Zelltod führte, blaumarkierte Hits konnten nicht validiert werden, da keine siRNAs aus der ursprünglichen Library mehr vorhanden waren.

Anhang 5 Zielgen-Validierung ausgewählter Hits

Insgesamt wurden sieben validierte Hits aus dem RNAi-Screen zur Zielgen-Validierung ausgewählt. Die Ergebnisse für jedes Zielgen werden im folgenden Abschnitt vorgestellt und diskutiert.

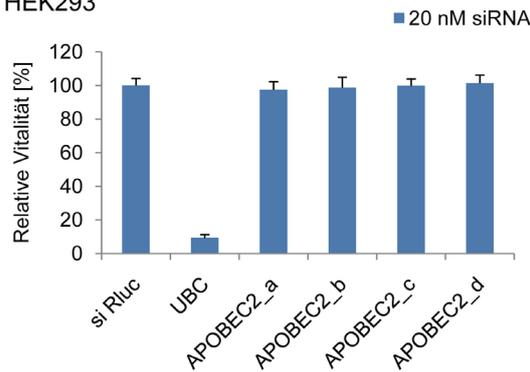
APOBEC2

APOBEC2 wird in dieselbe Unterfamilie eingeordnet wie die Cytidin Deaminase APOBEC1 und besitzt ebenfalls eine Cytidin Deaminase Aktivität, die eine Umwandlung von Cytidin in Uracil bewirkt [238]. Analog könnte von diesem Enzym auch Azacytidin zu dem für RNA toxischeren Molekül 5-Azauracil deaminiert werden. Der Knockdown von APOBEC2 mit siRNA-Pools steigerte die Vitalität AZA-behandelter Zellen um 266 % (HCT116) bzw. 221 % (HEK293) (siehe Abbildung 43). Der spezifische Knockdown des Zielgens durch vier verschiedene siRNAs führte jedoch in keiner der beiden Zelllinien zu einer ähnlichen Resistenz (Abbildung A1A, B). Dieses Ergebnis weist auf einen unspezifischen Effekt (Off-Target) des siRNA-Pools hin, der nicht durch den Knockdown des Zielgens entstand, sondern durch unspezifische Bindung einer im Pool enthaltenen siRNA an unbekannte Zielgene.

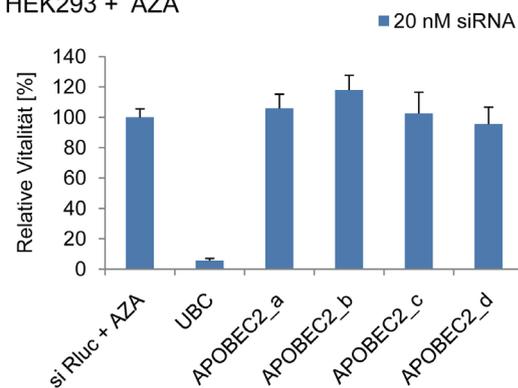
Da die einzeln zu erwerbenden siRNAs nicht unbedingt den siRNAs entsprechen, die in den kommerziell erhältlichen Pools enthalten sind, wurde außerdem die Knockdown-Effizienz des ursprünglich im Screen verwendeten Pools (Pool 1) mit der Effizienz eines aus den einzeln erworbenen siRNAs gemischten Pools verglichen (Abbildung A1C). Die quantitative RT-PCR Analyse zeigt, dass APOBEC2 in HCT116-Zellen nicht exprimiert wird. Bei nicht messbarer Expression ist ein Effekt des APOBEC2-Knockdowns auf die Zellvitalität nicht zu erwarten, was wiederum die Annahme eines unspezifischen Effektes des ursprünglichen siRNA-Pools bestätigt.

A

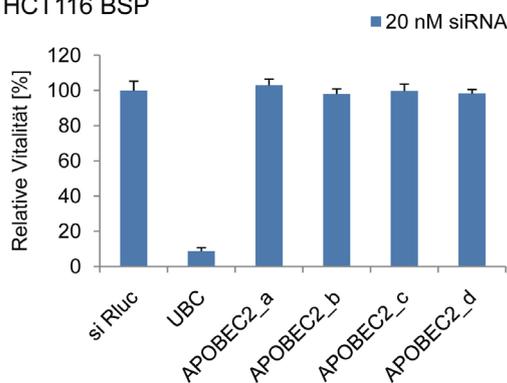
HEK293



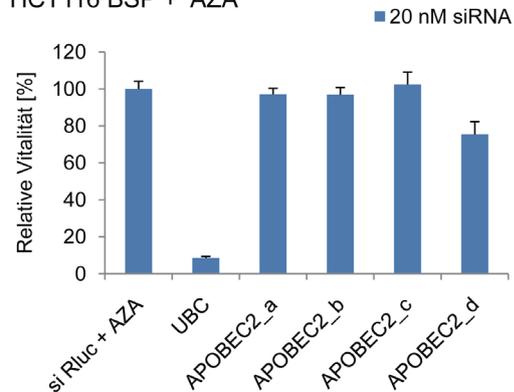
HEK293 + AZA

**B**

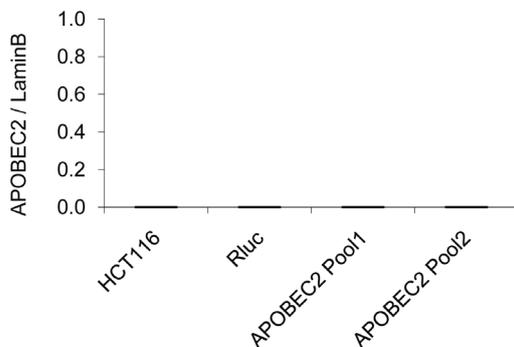
HCT116 BSP



HCT116 BSP + AZA

**C**

HCT116 BSP

**Abbildung A1**

Zielgen-Validierung von APOBEC2. **A.** Relative Vitalität unbehandelter oder AZA-behandelter HEK293-Zellen (100 μ M AZA für 48 h) nach APOBEC2 Knockdown mit vier verschiedenen, gegen dasselbe Zielgen gerichteten siRNAs, sowie Kontroll-siRNAs. **B.** Relative Vitalität unbehandelter oder AZA-behandelter HCT116-Zellen (10 μ M AZA für 48 h) nach APOBEC2 Knockdown mit vier verschiedenen, gegen dasselbe Zielgen gerichteten siRNAs, sowie Kontroll-siRNAs. UBC, Positivkontrolle; Rluc, Negativkontrolle. **C.** APOBEC2-mRNA-Expression in unbehandelten HCT116-Zellen und Zellen, die für 48 h mit Kontroll-siRNAs oder APOBEC2-siRNAs transfiziert worden waren. Pool1 entspricht dem im genomweiten siRNA-Screen verwendeten siRNA-Pool und Pool2 einem Gemisch aus einzeln erworbenen siRNAs gegen APOBEC2. Die Expression des APOBEC2-Gens wurde mittels qRT-PCR gemessen. Als Referenzgen wurde Lamin b1 verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit Standardabweichungen.

TM9SF4

Die Funktion des Transmembranmoleküls TM9SF4 ist unbekannt. Aufgrund der starken Resistenz gegenüber AZA-induzierter Zytotoxizität, die der Knockdown dieser Zielgene allerdings hervorrief, wurde eine weitere Validierung vorgenommen. Die im Screen verwendeten siRNA-Pools führten zu einer Steigerung der Vitalität von 341 % (HCT116) bzw. 210 % (HEK293). Dieser Effekt war bei Verwendung vier verschiedener spezifischer siRNAs allerdings nur für eine einzige siRNA (TM9SF4_a) in HEK293-Zellen nachweisbar, was ebenfalls auf einen unspezifischen Effekt des ursprünglichen siRNA-Pools hindeutet (Abbildung A2A, B).

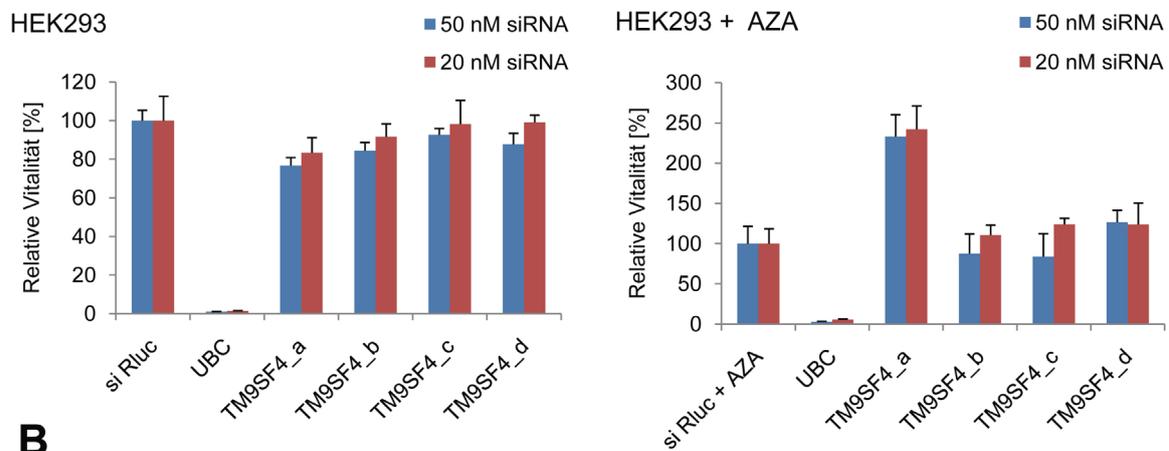
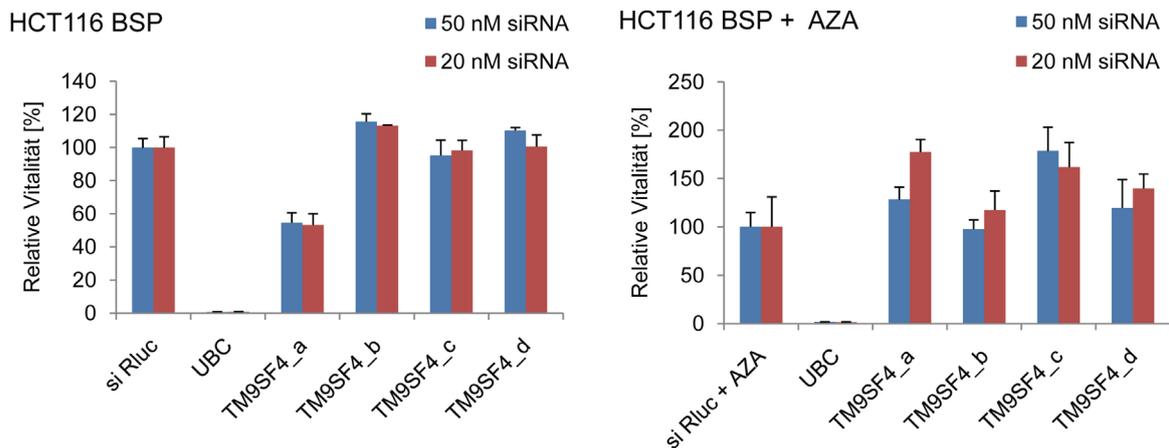
A**B**

Abbildung A2 Zielgen-Validierung von TM9SF4. **A.** Relative Vitalität unbehandelter oder AZA-behandelter HEK293-Zellen (100 μ M AZA für 48 h) nach TM9SF4 Knockdown mit vier verschiedenen, gegen dasselbe Zielgen gerichteten siRNAs, sowie Kontroll-siRNAs. **B.** Relative Vitalität unbehandelter oder AZA-behandelter HCT116-Zellen (10 μ M AZA für 48 h) nach TM9SF4 Knockdown mit vier verschiedenen, gegen dasselbe Zielgen gerichteten siRNAs, sowie Kontroll-siRNAs. UBC, Positivkontrolle; Rluc, Negativkontrolle.

Die qRT-PCR-Analyse zeigt, dass die erhöhte Resistenz nach dem Knockdown von TM9SF4_a nicht mit einer erhöhten Knockdown-Effizienz korrelierte und unterstützt somit die Annahme des Off-Target-Effekts (Abbildung A3).

HCT116 BSP

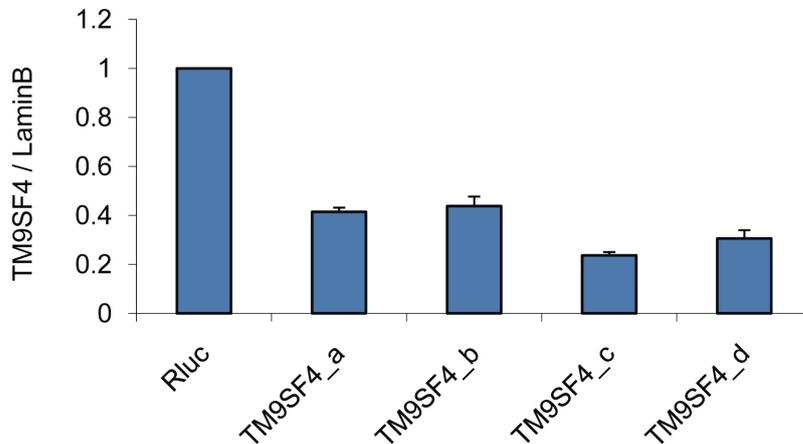


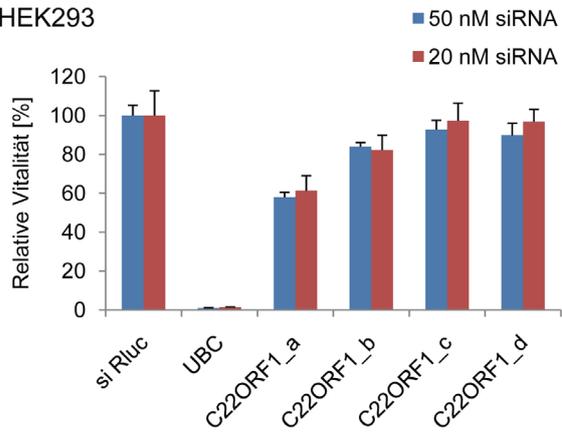
Abbildung A3 TM9SF4-mRNA-Expression in HCT116-Zellen, die für 48 h mit Kontroll-siRNAs oder vier verschiedenen TM9SF4-siRNAs transfiziert worden waren. Die Expression des TM9SF4-Gens wurde mittels qRT-PCR gemessen. Als Referenzgen wurde Lamin b1 verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit Standardabweichungen.

C22ORF1

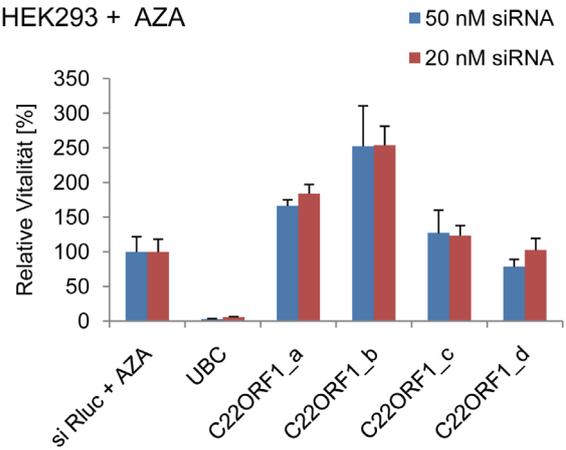
Die Funktion des Proteins C22ORF1 ist ebenfalls unbekannt, allerdings enthält es eine Metallophosphoesterase-Domäne die eine Hydrolase-Aktivität besitzt und könnte somit auch in den Nukleotidstoffwechsel involviert sein. Aufgrund einer Steigerung der Zellvitalität nach AZA-Behandlung um 430 % (HCT116), bzw. 244 % (HEK293) wurde dieses Protein als möglicher Resistenzfaktor näher validiert. (Abbildung A4A und A4B zeigen, dass zwei der spezifischen siRNAs (C22ORF1_a und C22ORF1_b) in beiden Zelllinien eine Resistenz gegen AZA bewirkten. Aufgrund von Schwierigkeiten im spezifischen Primerdesign konnte die Knockdowneffizienz allerdings nicht mit dem Phänotyp korreliert werden. Da es für dieses Protein verschiedene Spleißprodukte gibt, wäre es möglich, dass nur der Knockdown bestimmter Spleißvarianten die Resistenz gegen AZA vermittelt. Eine Verminderung der Apoptose um etwa 80 % (siehe Abbildung 44) nach Knockdown von C22ORF1 unterstützt die Hypothese, dass C22ORF1 ein möglicher Resistenzfaktor gegen AZA-vermittelte Zytotoxizität ist.

A

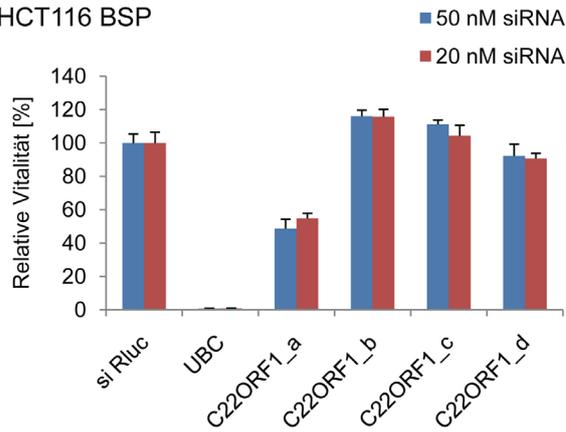
HEK293



HEK293 + AZA

**B**

HCT116 BSP



HCT116 BSP + AZA

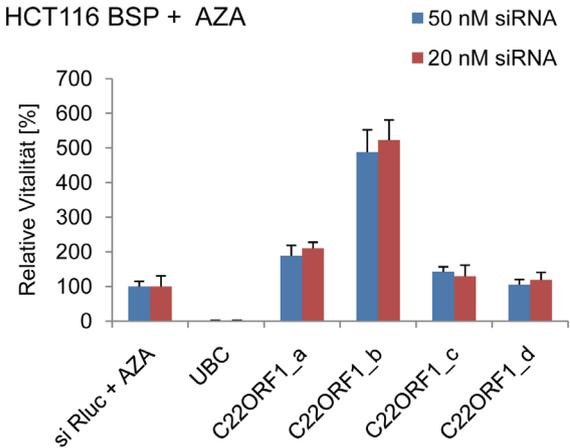


Abbildung A4 Zielgen-Validierung von C22ORF1. **A.** Relative Vitalität unbehandelter oder AZA-behandelter HEK293-Zellen (100 µM AZA für 48 h) nach C22ORF1-Knockdown mit vier verschiedenen, gegen dasselbe Zielgen gerichteten siRNAs, sowie Kontroll-siRNAs. **B.** Relative Vitalität unbehandelter oder AZA-behandelter HCT116-Zellen (10 µM AZA für 48 h) nach C22ORF1-Knockdown mit vier verschiedenen, gegen dasselbe Zielgen gerichteten siRNAs, sowie Kontroll-siRNAs. UBC, Positivkontrolle; Rluc, Negativkontrolle.

ABCG2

Die siRNA-Screen Validierung zeigte, dass der Knockdown des ABCG2-Transporters die Zellvitalität um 31 % (HCT116) bzw. 67 % (HEK293) verringerte (Abbildung 43). ABCG2-Proteine transportieren sowohl endogene metabolische Produkte aus der Zelle heraus als auch eine Reihe toxischer Fremdstoffe wie etwa Chemotherapeutika [239] und könnten auch für den Efflux-Transport von Nukleotiden verantwortlich sein. Der Knockdown dieses Transporters könnte zu einer Akkumulation von AZA innerhalb der Zelle führen, was die Verfügbarkeit erhöhen und somit die beobachtete erhöhte Toxizität erklären würde. Der ABCG2-Transporter kann in seiner Funktion spezifisch durch Fumitremorgin C (FTC) inhibiert werden. Zur Validierung der Screening-Ergebnisse sollte die Inhibition des Transporters in Kombination mit AZA einen ähnlichen Effekt auf die Zellvitalität haben, wie durch den Knockdown beobachtet wurde. Abbildung A5 zeigt jedoch, dass verschiedene nichttoxische Konzentrationen des Inhibitors in HCT116- und HEK293-Zellen die Sensibilität gegenüber AZA nicht erhöhten. ABCG2 wurde deshalb als Modulator AZA-induzierter Zytotoxizität nicht weiter untersucht.

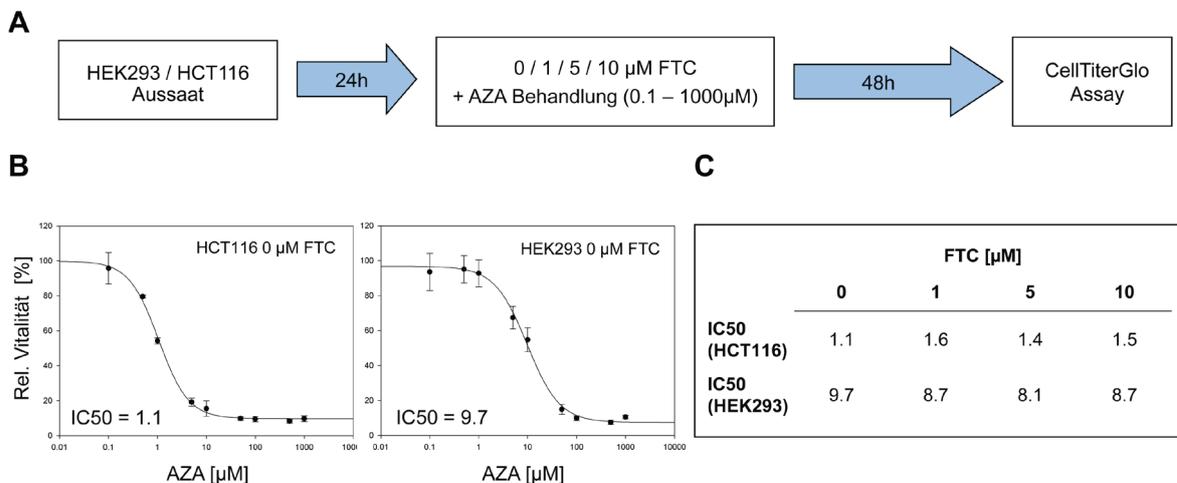
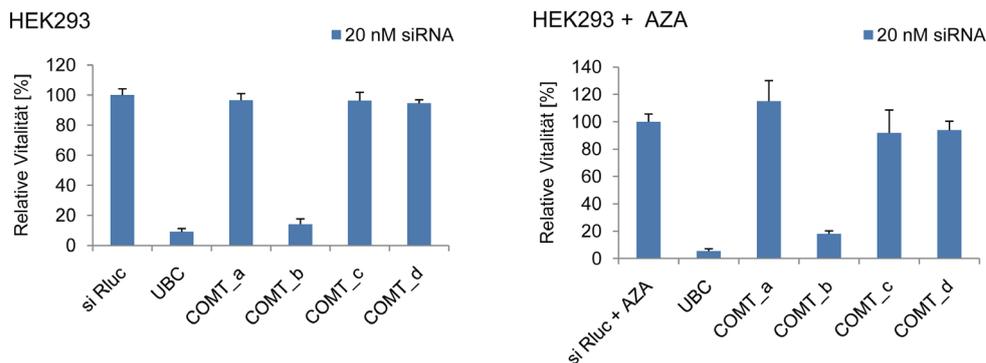


Abbildung A5 Inhibition von ABCG2 mit Fumitremorgin C. **A.** Schema des Inhibitions-Assays. **B.** Dosis-Wirkungs-Kurve und IC₅₀-Konzentrationen in AZA-behandelten HCT116- und HEK293-Zellen. **C.** IC₅₀-Konzentrationen in HCT116- und HEK293-Zellen nach kombinierter Behandlung mit AZA und verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors Fumitremorgin C (FTC).

COMT

Der Knockdown der Catechol-O-Methyltransferase COMT führte in der RNAi-Screen-Validierung zu einer Verringerung der Vitalität um 42 % (HCT116) bzw. 87 % (HEK293) (siehe Abbildung 43). Dieses Enzym methyliert mit Hilfe des Methyl donors S-Adenosylmethionin (SAM) verschiedene Catecholamine und neuroaktive Arzneistoffe und inaktiviert sie auf diese Weise. Da derselbe Methyl donor von DNMTs zur DNA-Methylierung verwendet wird, könnte sich eine Beeinflussung der SAM-abhängigen zellulären Reaktionen durch den Knockdown von COMT auch auf die DNA-Methylierung auswirken, was dieses Enzym zu einem interessanten Kandidaten für weitere Validierung machte. In der Zielgen-Validierung erhöhte jedoch nur eine einzige der vier verschiedenen siRNAs die Sensibilität gegenüber AZA (COMT_c) (Abbildung A6A, B). Eine weitere siRNA (COMT_b) verringerte die Vitalität der Zellen bereits ohne AZA-Behandlung. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der beobachtete Phänotyp durch Off-Target-Effekte verursacht wurde.

A



B

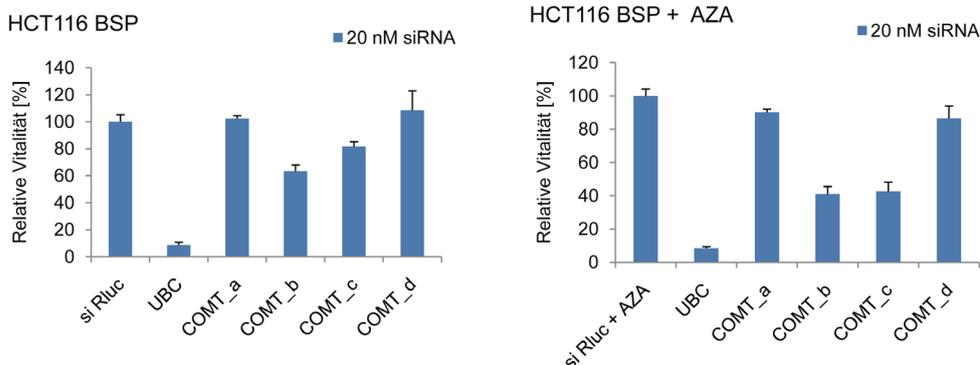


Abbildung A6 Zielgen-Validierung von COMT. **A.** Relative Vitalität un behandelter oder AZA-behandelter HEK293-Zellen (100 µM AZA für 48 h) nach COMT Knockdown mit vier verschiedenen, gegen dasselbe Zielgen gerichteten siRNAs, sowie Kontroll-siRNAs. **B.** Relative Vitalität un behandelter oder AZA-behandelter HCT116-Zellen (10 µM AZA für 48 h) nach COMT Knockdown mit vier verschiedenen, gegen dasselbe Zielgen gerichteten siRNAs, sowie Kontroll-siRNAs. UBC, Positivkontrolle; Rluc, Negativkontrolle.

DPYD

Die Dihydropyrimidin Dehydrogenase (DPYD) ist für den Abbau von Thymin und Uracil notwendig. Es wurde gezeigt, dass auch der therapeutische Wirkstoff 5-Fluorouracil (5-FU) von diesem Enzym metabolisiert wird und eine reduzierte DPYD-Expression die Toxizität von 5-FU erhöhte [240]. Da Azacytidin durch das Enzym Cytidin-Deaminase hydrolytisch zu 5-Azauridin deaminiert werden kann [226], ist es theoretisch möglich, dass Azanukleoside ebenfalls über diesen Weg abgebaut werden und somit ihre zytotoxische Wirkung verlieren. Eine Blockierung dieses metabolischen Weges durch den Knockdown von DPYD würde somit zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber AZA führen. Durch Kombination von AZA-Behandlung und DPYD Knockdown in der siRNA-Screen Validierung wurde diese Hypothese durch die Verringerung der Vitalität um 66 % in HEK293-Zellen bestätigt. Zur Zielgen-Validierung wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt: Zum Einen die spezifische Inhibierung von DPYD durch 5-chloro-2,4-dihydroxypyridine (CDHP), zum Anderen der spezifische Knockdown des Zielgens durch vier verschiedene siRNAs.

Zur selektiven Inhibierung von DPYD wurden HCT116- und HEK293-Zellen nach dem in Abbildung A7A gezeigten Schema behandelt und die IC50-Werte nach AZA-Behandlung in Kombination mit zwei verschiedenen Konzentrationen des Hemmstoffes bestimmt (Abbildungen A7B und C). Zuvor wurde überprüft, dass die verwendeten CDHP-Konzentrationen die Vitalität der Zellen nicht beeinflussten (Daten nicht gezeigt). Während HCT116-Zellen mit steigender CDHP-Konzentration sensibler gegenüber AZA wurden, zeigte sich für HEK293-Zellen eine maximale Sensibilität gegenüber AZA bei 50 μ M CDHP, die bei höheren Konzentrationen an CDHP (100 μ M) nicht mehr nachweisbar war (Abbildung A7C). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Hemmung der Dihydropyrimidin Dehydrogenase zu einer Sensibilisierung beider Zelllinien gegenüber AZA führte und bestätigen somit die Ergebnisse des siRNA-Screens.

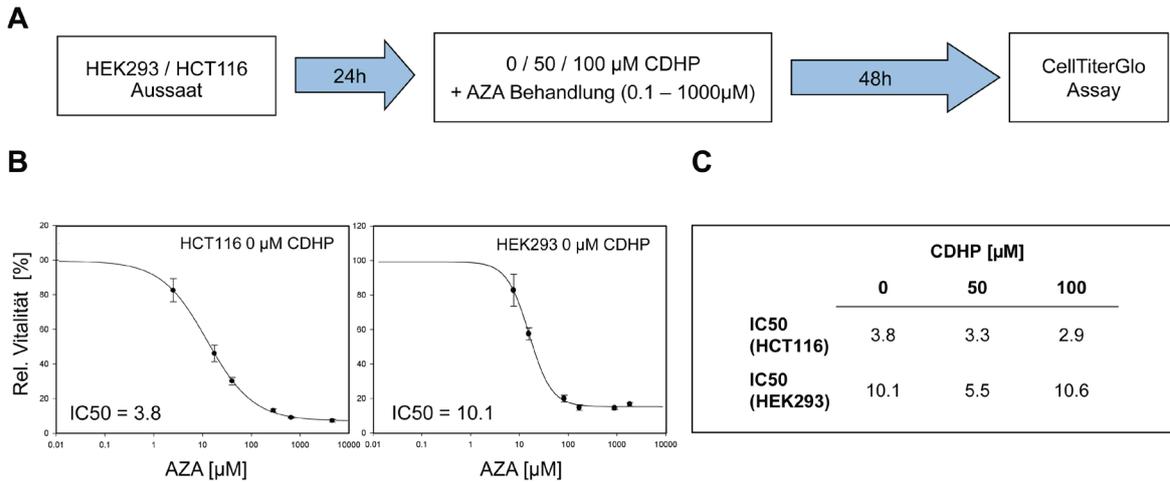
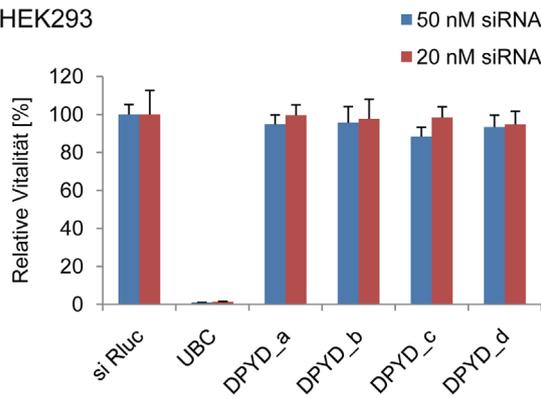


Abbildung A7 Inhibition von DPYD mit 5-chloro-2,4-dihydroxypyridine (CDHP). **A.** Schema des Inhibitions-Assays. **B.** Dosis-Wirkungs-Kurve und IC₅₀-Konzentrationen in AZA-behandelten HCT116- und HEK293-Zellen. **C.** IC₅₀-Konzentrationen in HCT116- und HEK293-Zellen nach kombinierter Behandlung mit AZA und verschiedenen nicht-toxischen Konzentrationen des Inhibitors CDHP.

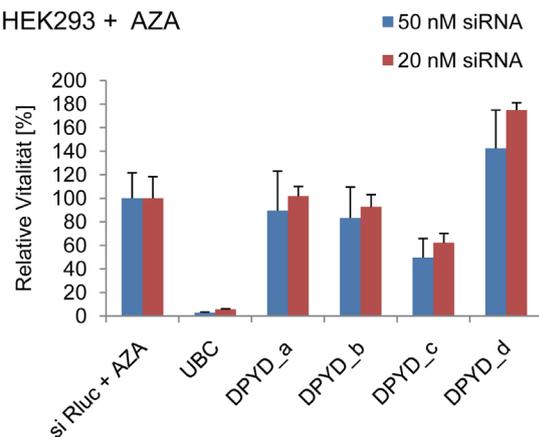
Weiterhin wurde das Zielgen durch spezifischen siRNA-Knockdown validiert. Abbildungen A8A und A8B zeigen, dass nur eine der siRNAs (DPYD_c) in HCT116- und HEK293-Zellen zu einer Verminderung der Zellvitalität führte, während DPYD_d die Vitalität nach AZA-Behandlung sogar erhöhte. Die Transfektion mit DPYD_c allein ohne anschließende AZA-Behandlung verringerte in HCT116-Zellen jedoch bereits die Vitalität (Abbildung A8B), was auf einen Off-Target-Effekt hindeuten könnte. Andererseits zeigt die AZA-sensibilisierende siRNA DPYD_c in der qRT-PCR Analyse die beste Knockdown-Effizienz und die vitalitätssteigernde siRNA DPYD_d die geringste (Abbildung A8C), was eine gewisse Korrelation von Knockdown-Effizienz und AZA-Sensibilität andeutet. Zusammengefasst lassen die Ergebnisse die Vermutung zu, dass die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase einen Einfluss auf die Resistenz gegenüber AZA haben kann.

A

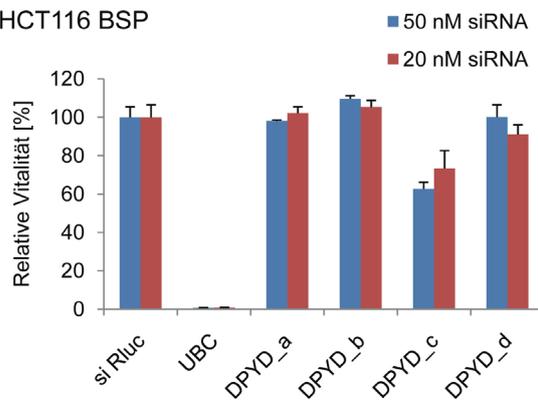
HEK293



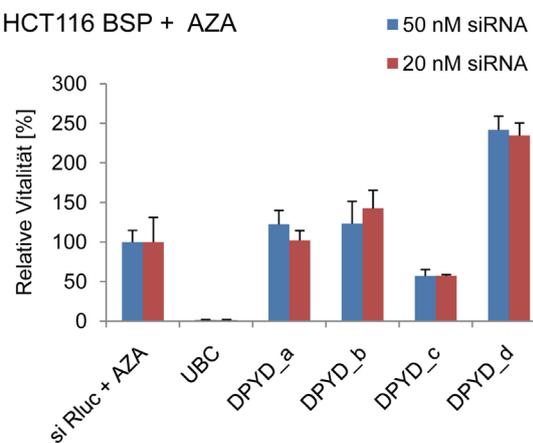
HEK293 + AZA

**B**

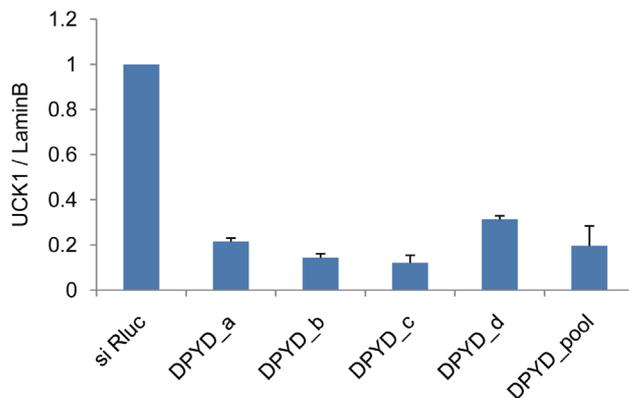
HCT116 BSP



HCT116 BSP + AZA

**C**

HCT116 BSP

**Abbildung A8**

Zielgen-Validierung von DPYD. **A.** Relative Vitalität un behandelter oder AZA-behandelter HEK293-Zellen (100µM AZA für 48 h) nach DPYD-Knockdown mit vier verschiedenen, gegen dasselbe Zielgen gerichteten siRNAs, sowie Kontroll-siRNAs. **B.** Relative Vitalität un behandelter oder AZA-behandelter HCT116-Zellen (10µM AZA für 48 h) nach DPYD-Knockdown mit vier verschiedenen, gegen dasselbe Zielgen gerichteten siRNAs, sowie Kontroll-siRNAs. UBC, Positivkontrolle; Rluc, Negativkontrolle. **C.** DPYD-mRNA-Expression in HCT116-Zellen, die für 48 h mit Kontroll-siRNAs, vier verschiedenen DPYD-siRNAs, oder einem Pool aus diesen siRNAs transfiziert worden waren. Die Expression des DPYD-Gens wurde mittels qRT-PCR gemessen. Als Referenzen wurde Lamin b1 verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit Standardabweichungen.

UCK1

Der Knockdown der Uridin Cytidin Kinase (UCK1) führte in der siRNA-Screen-Validierung zu einer Verringerung der Vitalität um 49 % in HEK293-Zellen (siehe Abbildung 43). Das Enzym UCK1 spielt eine wichtige Rolle im Pyrimidin-Metabolismus, wo es die Phosphorylierung von Uridin oder Cytidin zu Uridin-Monophosphat bzw. Cytidin-Monophosphat katalysiert. Es wurde bereits *in vitro* gezeigt, dass dieses Enzym verschiedene Cytidin-Analoga phosphorylieren kann [154, 241], eine Aktivität gegenüber AZA wurde in derselben Studie allerdings nicht nachgewiesen. Dennoch kommt UCK1 als möglicher Faktor in Frage, der die zelluläre Verfügbarkeit von AZA regulieren könnte, indem er eine für den Einbau in die replizierende DNA notwendige Modifikation katalysiert. Zur Validierung von UCK1 als mögliches Zielgen wurden drei unterschiedliche Ansätze verfolgt: 1.) spezifische Inhibierung des Enzyms durch CPEU bzw. CPEC; 2.) spezifischer siRNA-knockdown; 3.) Überexpression von UCK1.

Cyclopentenyl-Cytosin (CPEC) und Cyclopentenyl-Uracil (CPEU) zeigen eine inhibierende Wirkung auf die Aktivität von UCK1 [242]. Allerdings ist die Hemmung des Enzyms nicht spezifisch, CPEC inhibiert z.B. zusätzlich die CTP Synthetase [242], ein Enzym, das die Konvertierung von CTP zu UTP katalysiert. Bevor beide Inhibitoren mit AZA zur Behandlung der Zellen kombiniert wurden, wurde eine mögliche Zytotoxizität der verwendeten Konzentrationen von CPEC und CPEU überprüft. Dabei zeigte sich, dass bereits geringe CPEC-Konzentrationen (50 nM) die Vitalität der Zellen verringerten. Eine durch den Inhibitor verursachte Verringerung der Zellteilungsrate kann aufgrund des reduzierten Einbaus von AZA in die DNA einen indirekten Einfluss auf die Resistenz gegenüber AZA ausüben. Abbildung A9 zeigt, dass eine UCK1-Inhibition die Vitalität von HEK293-Zellen nach AZA-Behandlung verringerte, in HCT116-Zellen aber geringfügig erhöhte. In Anbetracht der Zytotoxizität von CPEC sollten die IC50-Werte aller Inhibitor-Behandlungen die zu einer Reduktion der Zellvitalität führten, mit Vorsicht betrachtet werden. In HEK293-Zellen, die mit 50 nM CPEC behandelt wurden, konnte allerdings keine Reduktion der Vitalität durch den Inhibitor festgestellt werden; diese Zellen wurden, wie nach den Validierungsergebnissen des Screens erwartet, sensibler gegenüber AZA.

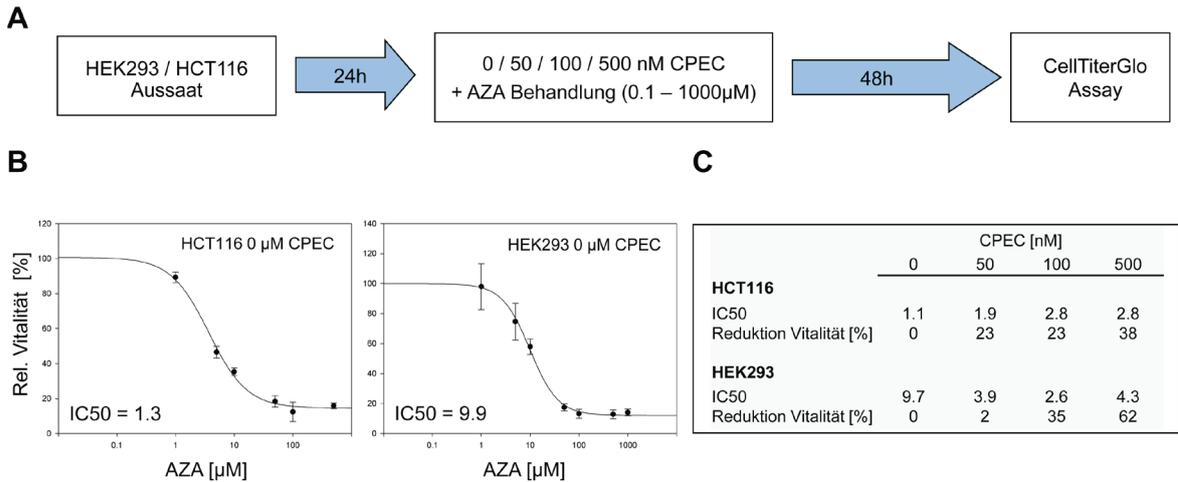


Abbildung A9 Inhibition von UCK1 mit Cyclopentenyl-Cytosin (CPEC). **A.** Schema des Inhibitions-Assays. **B.** Dosis-Wirkungs-Kurve und IC50-Konzentrationen in AZA-behandelten HCT116- und HEK293-Zellen. **C.** IC50-Konzentrationen sowie relative Reduktion der Vitalität durch die Inhibitor-Behandlung (ohne AZA) in HCT116- und HEK293-Zellen nach kombinierter Behandlung mit AZA und verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors CPEC.

Im Gegensatz zu CPEC zeigte CPEU in den verwendeten Konzentrationen keine negativen Auswirkungen auf die Zellvitalität. Die in Abbildung A10 dargestellten Ergebnisse zeigen interessanterweise genau den entgegengesetzten Effekt auf die Vitalität AZA-behandelter Zellen: mit zunehmender Konzentration des Inhibitors stieg die Resistenz gegenüber AZA sowohl in HCT116- als auch in HEK293-Zellen stark an. Dies widerspricht den RNAi-Ergebnissen und könnte auf die bereits erwähnten Unterschiede in der Spezifität der Inhibitoren zurückzuführen sein.

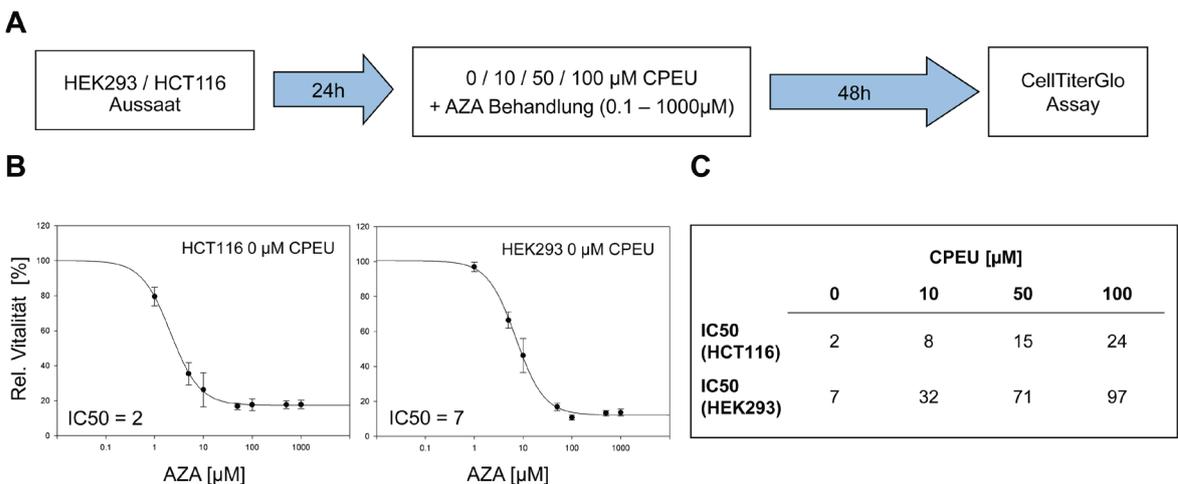
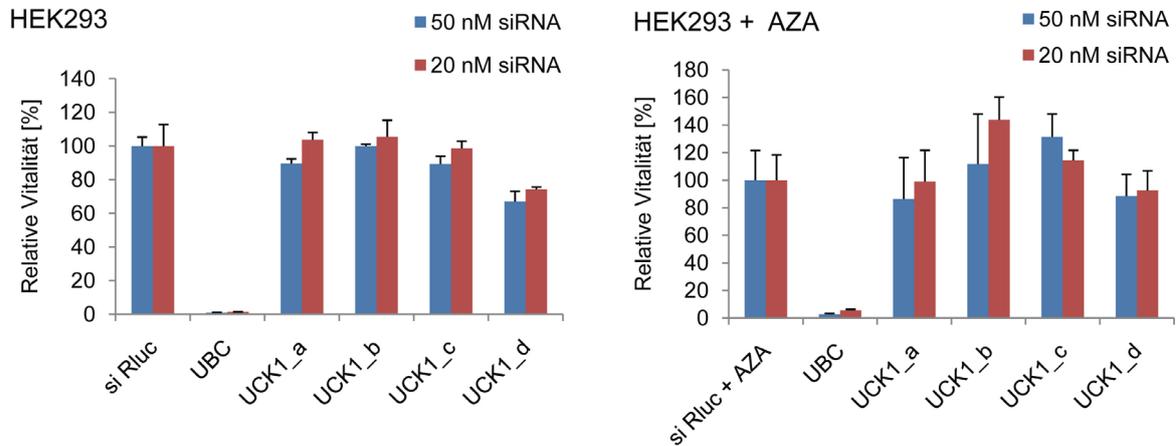


Abbildung A10 Inhibition von UCK1 mit Cyclopentenyl-Uracil (CPEU). **A.** Schema des Inhibitions-Assays. **B.** Dosis-Wirkungs-Kurve und IC50-Konzentrationen in AZA-behandelten HCT116- und HEK293-Zellen. **C.** IC50-Konzentrationen in HCT116- und HEK293-Zellen nach kombinierter Behandlung mit AZA und verschiedenen nicht-toxischen Konzentrationen des Inhibitors CPEU.

Die Ergebnisse der Zielgen-Validierung durch spezifische siRNAs sind in Abbildung A11 dargestellt.

A



B

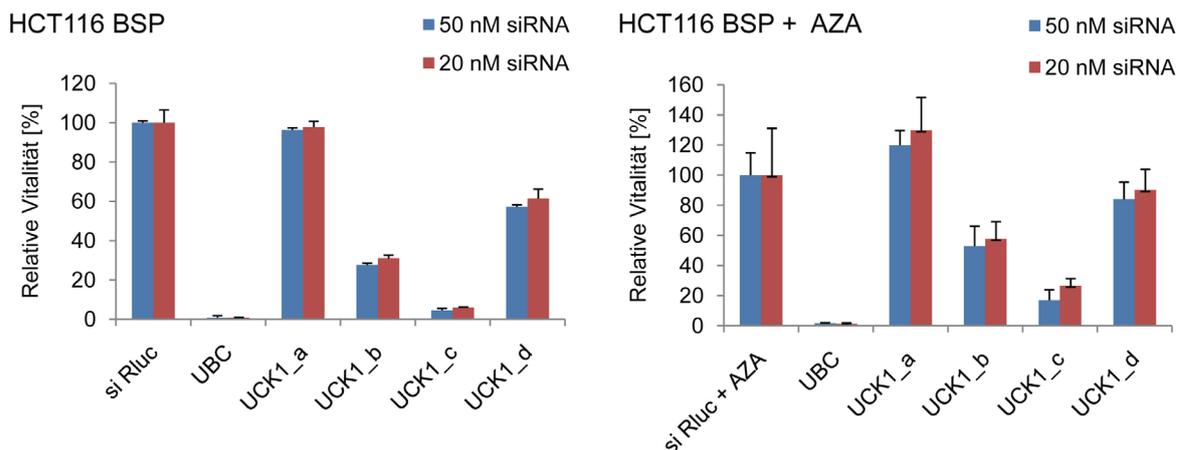


Abbildung A11 Zielgen-Validierung von UCK1. **A.** Relative Vitalität un behandelter oder AZA-behandelter HEK293-Zellen (100 μ M AZA für 48 h) nach UCK-Knockdown mit vier verschiedenen, gegen dasselbe Zielgen gerichteten siRNAs, sowie Kontroll-siRNAs. **B.** Relative Vitalität un behandelter oder AZA-behandelter HCT116-Zellen (10 μ M AZA für 48 h) nach UCK-Knockdown mit vier verschiedenen, gegen dasselbe Zielgen gerichteten siRNAs, sowie Kontroll-siRNAs. UBC, Positivkontrolle; Rluc, Negativkontrolle. **C.** UCK1-mRNA-Expression in un behandelten HCT116-Zellen und Zellen, die für 48 h mit Kontroll-siRNAs, vier verschiedenen UCK1-siRNAs, oder einem Pool aus diesen siRNAs transfiziert worden waren. Die Expression des UCK1-Gens wurde mittels qRT-PCR gemessen. Als Referenzgen wurde Lamin b1 verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit Standardabweichungen.

Keine der siRNAs führte nach Transfektion zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber AZA. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Knockdown-Effizienz der verwendeten siRNAs mit maximal 50 % nur gering war (Abbildung A12).

HCT116 BSP

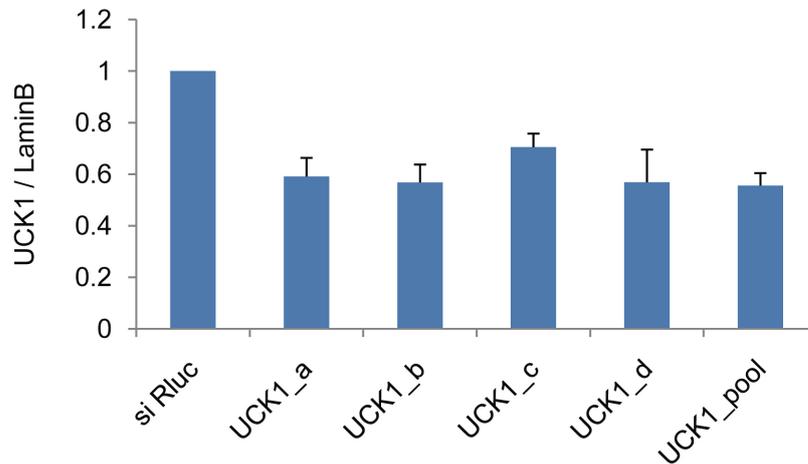


Abbildung A12 Zielgen-Validierung von UCK1. UCK1-mRNA-Expression in HCT116-Zellen, die für 48 h mit Kontroll-siRNAs, vier verschiedenen UCK1-siRNAs, oder einem Pool aus diesen siRNAs transfiziert worden waren. Die Expression des UCK1-Gens wurde mittels qRT-PCR gemessen. Als Referenzgen wurde Lamin b1 verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit Standardabweichungen.

Als weiterer Ansatz zur Validierung der Uridin Cytidin Kinase 1 wurde der Effekt der Überexpression des Enzyms auf die Zellvitalität nach AZA-Behandlung analysiert. Basierend auf die Ergebnisse des siRNA-Screens sollte eine gesteigerte Enzymaktivität die Resistenz der Zellen gegenüber AZA erhöhen. Die enzymatische Aktivität des überexprimierten Proteins wurde *in vitro* nachgewiesen [154]. Zunächst wurden die Bedingungen für eine optimale Transfektionseffizienz etabliert und anschließend die Stärke der Überexpression über einen Zeitraum von insgesamt 72 Stunden analysiert (Abbildung A13). Die Ergebnisse zeigen eine hocheffiziente Überexpression von UCK1.

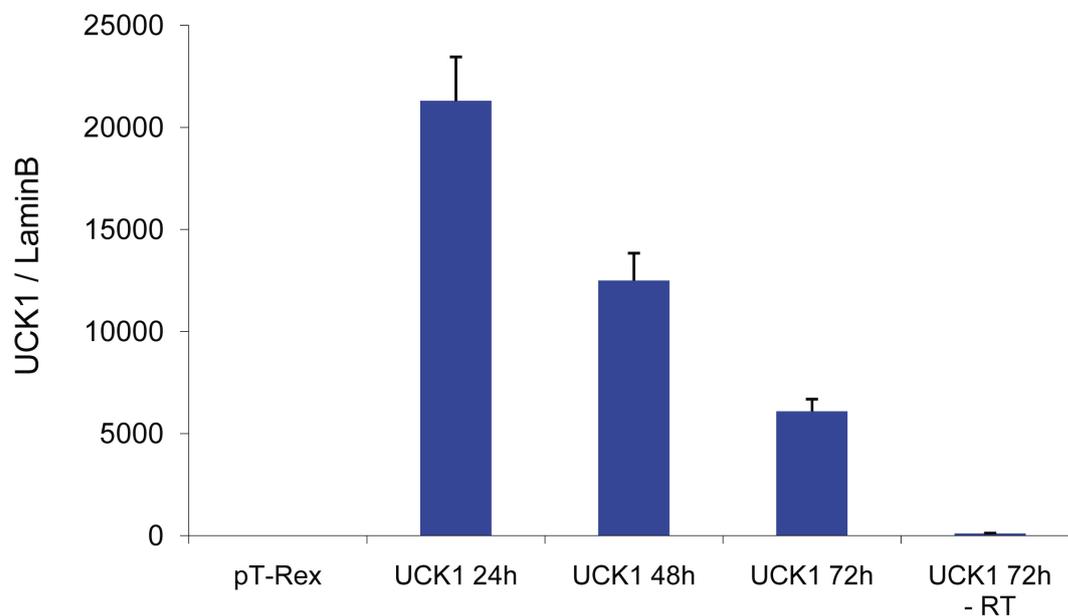


Abbildung A13 Etablierung der optimalen Transfektionsdauer. **C.** Die UCK1-mRNA-Expression wurde in mittels qRT-PCR in HCT116 Zellen 24, 48 und 72 h nach Transfektion der UCK1 cDNA gemessen. Als Referenzgen wurde Lamin b1 verwendet. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit Standardabweichungen. pT-Rex, Kontroll-Vektor; RT, Reverse Transkriptase.

Anschließend wurden UCK1-überexprimierende Zellen mit verschiedenen AZA-Konzentrationen behandelt wie in Abbildung A14A beschrieben und anschließend die IC₅₀-Konzentrationen bestimmt. Abbildungen A14B und C zeigen deutlich, dass die Überexpression von UCK1 weder in HCT116- noch in HEK293-Zellen eine Resistenz gegenüber AZA vermittelte.

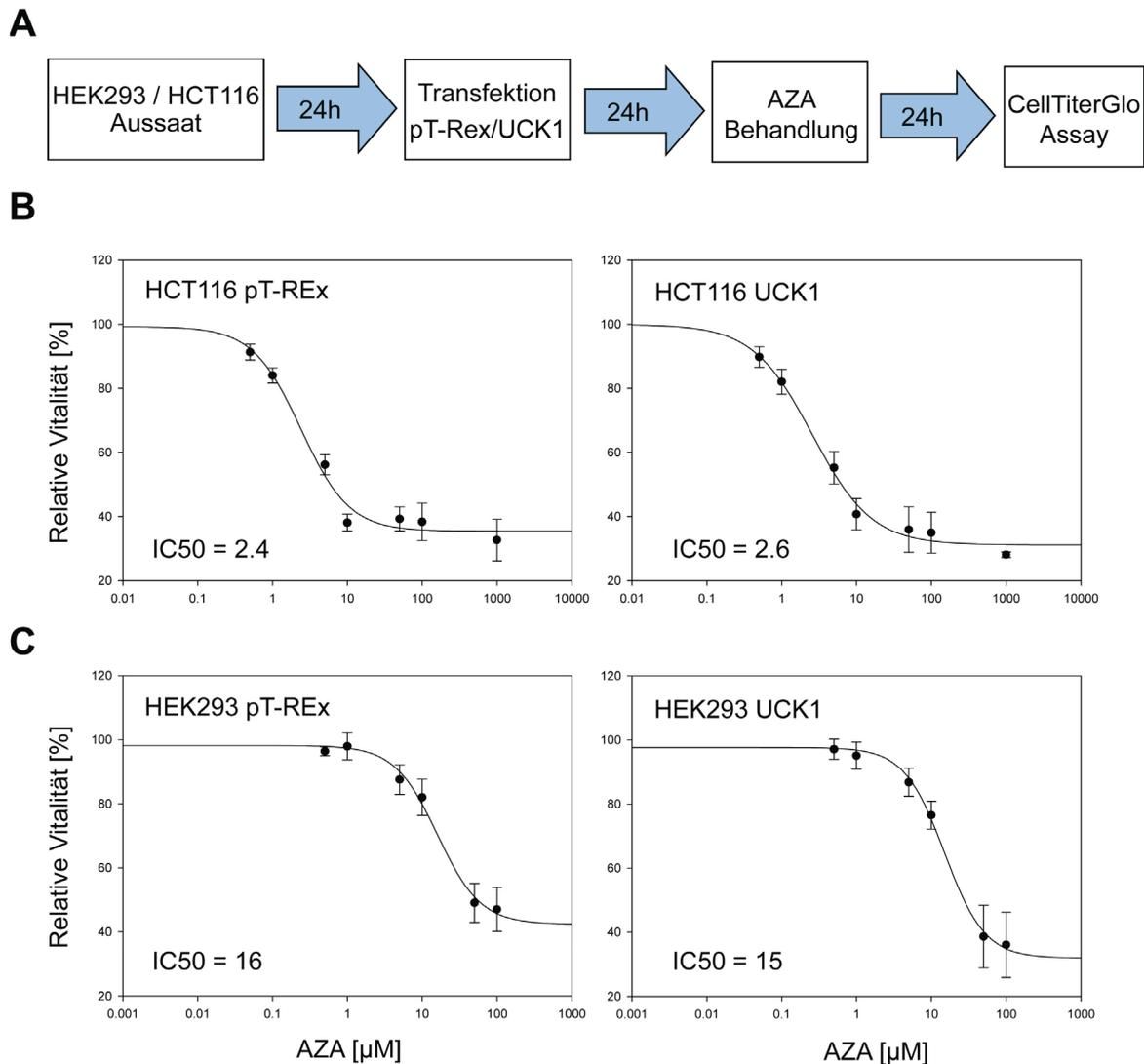
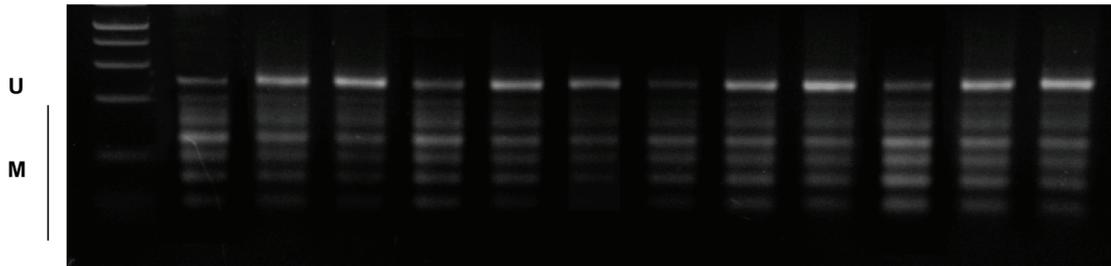


Abbildung A14 Auswirkungen der UCK1-Überexpression auf die Sensitivität von HCT116- und HEK293-Zellen gegenüber AZA. **A.** Schema des Überexpressions-Assays. **B., C.** IC₅₀-Konzentrationen nach Überexpression von UCK1 oder eines Kontroll-Vektors (pT-REx) in mit verschiedenen AZA-Konzentrationen behandelten (**B**) HCT116-Zellen und (**C**) HEK293-Zellen. Dargestellt sind Mittelwerte aus Triplikaten mit Standardabweichung.

Anhang 6

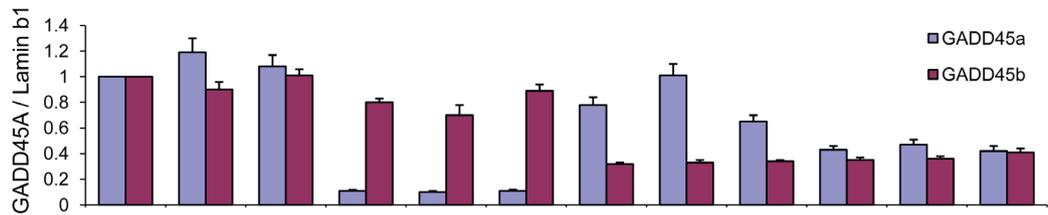
GADD45A hat keinen Einfluss auf Azanukleosid-induzierte Demethylierung. **A.** C1S2 COBRA in HCT116-Zellen nach Behandlung mit 2 µM AZA oder 0,5 µM DAC für 24 h in Kombination mit GADD45A- und/oder GADD45B-Knockdown, soweit angegeben. U, unmethyliert; M, methyliert. **B.** Die Knockdown-Effizienz für GADD45A und GADD45B in den für die COBRA Analyse verwendeten Zellen wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei Experimenten mit Standardabweichungen.

A



AZA	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
DAC	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+
GADD45a siRNA	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
GADD45b siRNA	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+

B



Anhang 7 Gen-Ontologie (GO)-Analyse von CGs, die in Zellen mit inaktiviertem DNMT3B-Enzym hypermethyliert wurden.

Unterrepräsentierte Gene

GO-Accession	Hypermethyliert in 3BKO-Zellen	Gene auf Infinium-Array	p-Wert	Gen-Ontologie
GO:0043170	108	4790	0.318	Metabolischer Prozess (Makromoleküle)
GO:0019538	47	2498	0.318	Metabolischer Prozess (Proteine)
GO:0044260	44	2372	0.318	Zellulärer metabolischer Prozess (Makromoleküle)
GO:0044267	44	2328	0.318	Zellulärer metabolischer Prozess (Proteine)
GO:0044238	136	5550	0.318	Primärer metabolischer Prozess
GO:0044237	133	5526	0.318	Zellulärer metabolischer Prozess
GO:0043233	7	707	0.318	Organellen-Lumen
GO:0031974	7	707	0.318	Membran-eingeschlossenes Lumen

Überrepräsentierte Gene

GO-Accession	Hypermethyliert in 3BKO-Zellen	Gene auf Infinium-Array	p-Wert	Gen-Ontologie
GO:0005882	8	77	0.318	Intermediäres Filament
GO:0045111	8	77	0.318	Intermediäres Filament (Zytoskelett)
GO:0003836	2	3	0.318	Beta-Galactosid alpha-2,3-Sialyltransferase Aktivität
GO:0051882	2	3	0.318	Mitochondriale Depolarisierung
GO:0051900	2	3	0.318	Regulation mitochondrialer Depolarisierung
GO:0002208	3	10	0.318	Somatisch Diversifizierung von Immunglobulinen während der Immunantwort
GO:0002204	3	10	0.318	Somatisch Diversifizierung von Immunglobulin-Genen während der Immunantwort
GO:0045190	3	10	0.318	Isotypen-Switching
GO:0002381	3	10	0.318	Immunglobulin-Produktion während der Immunantwort

Insgesamt waren 12126 Gene der auf dem Infinium-Array vorhandenen Gene GO-annotiert und 359 der in 3BKO-Zellen hypermethylierten Gene.

DANKSAGUNG

Ich möchte mich von ganzem Herzen bei all den Leuten bedanken, die mich während dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Besonders danke ich Frank Lyko für die Möglichkeit, meine Dissertation in diesem Labor anzufertigen und die sehr gute wissenschaftliche Ausbildung.

Bodo Brückner danke ich für die beste Betreuung, die man sich nur wünschen kann, die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, aber auch für das tolle Arbeitsklima und die gute Laune, die Du immer ins Labor gebracht hast.

Weiterhin danke ich Peter Angel und Sylvia Erhardt für wissenschaftliche Diskussionen im Rahmen der Ph.D.-Betreuung sowie Peter Angel für die Übernahme der Gutachterschaft.

Ich danke Michael Boutros und Dominique Kranz für die gute Zusammenarbeit beim RNAi-Screen sowie Bernd Korn und Oliver Heil von der Genomics and Proteomics Core Facility für den Service bezüglich der Infinium-Methylierungsanalysen.

*

Ein besonderer Dank gilt meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, ohne die ich nie so weit gekommen wäre! Außerdem danke ich von ganzem Herzen Omi, Oma und Opa für ihre Unterstützung während dieser Zeit. Danke, dass Ihr immer für mich da seid!

Ich danke Ricardo für unzählige wunderschöne Wochenenden in Hannover, in denen ich auch mal auf andere Gedanken kommen konnte. Du hast mir auch in schwierigen Zeiten immer wieder neue Kraft gegeben. Te quiero!

Außerdem möchte ich mich bei meinen Freunden bedanken, die immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten und für mich da waren.

Melli, Tobias und Bodo danke ich sehr für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

*

Ein großer Dank gilt natürlich auch meinen Kollegen, nicht nur für die unzähligen wissenschaftlichen Diskussionen und Ihre Unterstützung im Labor, sondern auch für die vielen schönen Kaffeepausen und Wein-Abende jenseits der Wissenschaft, an die ich immer wieder gern zurückdenken werde!