

EPIGENETISCHE REGULATION
ENTWICKLUNGSSPEZIFISCHER NEURONALER GENE IN
NEUROBLASTOMZELLEN

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinisch Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Sapuna Mary Kuriakose

aus

Bonn

Bonn, Oktober 2010

Die vorliegende Arbeit wurde mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn am Institut für Pathologie (Direktor: Prof. Dr. Büttner) unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. von Rücker angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. Dr. von Rücker

Prof. Dr. von der Emde

Tag der Promotion: 18. 02. 2011

Erscheinungsjahr: 2011

MEINE DISSERTATION WIDME ICH MEINEM VATER MATHEWS JOSEPH

In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hie und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten vor unseren Augen erstreckt.

Sir Isaac Newton

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

1	Einleitung	1
1.1	Epigenetik	1
1.2	DNA-Methylierug.....	1
1.3	Modifikationen der Histone.....	3
1.3.1	Acetylierung und Deacetylierung von Histonen.....	4
1.3.2	Histondeacetylasen	5
1.3.3	Histondeacetylase-Inhibitoren	6
1.3.4	Depsipeptid als HDAC Inhibitor.....	7
1.3.5	Lysin-Methylierung	7
1.3.6	Histonmethyltransferaseinhibitoren	8
1.3.7	Zusammenspiel von DNA- und Histon-Modifikationen bei der Genregulation.....	9
1.4	Polycomb-proteine als epigenetische Regulatoren	10
1.4.1	Bedeutung der Polycomb-proteine in ES-Zellen	12
1.4.2	Polycomb-proteine und Karzinogenese	13
1.5	Neuroblastom.....	14
1.5.1	Histopathologie	15
1.5.2	Stadieneinteilung.....	15
1.5.3	Prognose.....	16
1.5.4	Molekularbiologie des Neuroblastoms	16
1.5.5	Therapie.....	17
1.6	Neuroblastomzelllinien	18
1.7	Ziele der vorliegenden Arbeit	20
2	Material und Methoden	23
2.1	Chemikalien	23
2.2	Verbrauchsmaterialien	23
2.3	Geräte	23
2.4	Antikörper.....	24

2.5	Kommerzielle Reagenziensysteme	24
2.6	Oligonukleotide	25
2.7	Software	27
2.8	Datenbanken.....	27
2.9	Zellkultur.....	28
2.9.1	Kultivierung von Neuroblastomzellen	28
2.9.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	30
2.9.3	Bestimmung der Zellzahl.....	30
2.9.4	Bestimmung der Zellvitalität mittels des XTT-Tests	31
2.10	Agarosegelelektrophorese	32
2.11	RNA-Isolierung.....	33
2.12	Konzentrationsbestimmung von RNA	34
2.13	RT-PCR (Reverse Transkription - Umschreiben in cDNA).....	34
2.13.1	Realtime-PCR	35
2.14	Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen.....	37
2.14.1	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels	37
	Bicinchoninsäure Assay (BCA)-Assay.....	37
2.14.2	SDS-PAGE.....	38
2.14.3	Proteintransfer durch Westernblot.....	40
2.14.4	Ponceau-Färbung	41
2.14.5	Detektion mit spezifischen Antikörpern	41
2.15	Chromatin-Immunpräzipitation	42
2.15.1	<i>Crosslinking</i>	42
2.15.2	Aufarbeitung des Zelllysats für die Immunpräzipitation	43
2.15.3	Vorinkubation der <i>Dynabeads</i> mit dem Antikörper	43
2.15.4	Immunpräzipitation der Proben	44
2.15.5	<i>Reverse Crosslinking</i> (Rücknahme der Quervernetzung)	45
2.15.6	DNA-Extraktion	45
2.16	Durchflusszytometrie.....	46
2.16.1	Zellzyklusanalyse und Apoptosenachweis mittels	46
	Propidiumiodid am Durchflusszytometer	46

2.16.2	Bestimmung der Apoptoseinduktion mittels Annexin/PI-Färbung.....	47
2.16.3	Bestimmung der Apoptoseinduktion durch Caspase 3.....	49
	Messung am Durchflusszytometer	49
2.17	DNA Extraktion aus Neuroblastomzellen	49
2.18	Bisulfit-Behandlung der DNA.....	51
2.19	Herstellung einer Positivkontrolle mit 100 % methylierter DNA	52
2.20	Quantitative Methylierungs-spezifische PCR (MS-PCR).....	52
2.21	Statistische Auswertung	53
3	Ergebnisse.....	54
3.1	Wachstumshemmende Wirkung von Depsipeptid, ATRA und DZNep auf unterschiedliche Typen von Neuroblastomzellen	54
3.2	Morphologische Veränderung der Zellen unter Einfluss von ATRA, Depsipeptid und DZNep	57
3.3	Veränderung des Zellzyklusprofils durch Depsipeptid, ATRA und DZNep	59
3.4	Induktion der Apoptose durch ATRA, Depsipeptid und DZNep.....	62
3.4.1	Annexin V-Bindung	63
3.4.2	Zunahme des <i>cleaved</i> Caspase 3.....	65
3.5	Pilotstudie mit Depsipeptid zur Expressionsanalyse der embryonal spezifischen Gene in NB-Zellen	67
3.5.1	Basale Expression von NEUROG1, NKX2,2 und OLIG2 in NB-Zellen.....	70
3.6	Regulation der neuronalen Gene NEUROG1, NKX2,2 und OLIG2 unter Depsipeptid, ATRA und DZNep	70
3.7	In vivo Besetzung der Neurog1, NKX2,2 und Olig2 Promotoren durch H3K4me3 und H3K27me3	73
3.8	Veränderung der Histonmodifikationen unter Depsipeptid an Promotoren der neuronalspezifischen Gene.....	76
3.8.1	H3K27me3	76
3.8.2	H3K4me3	77

3.8.3	H3K9ac	78
3.9	Veränderung von Histonmodifikationen an den Promotorregionen	79
	der neuronalspezifischen Gene unter ATRA.....	79
3.9.1	H3K27me3	79
3.9.2	H3K4me3	80
3.9.3	H3K9ac	81
3.10	Veränderung der Histonmodifikationen an den Promotorregion der neuronalspezifischen Gene unter DZNep	82
3.10.1	H3K27me3	82
3.10.2	H3K4me3	83
3.10.3	H3K9ac	84
3.11	Methylierungsstatus am Neurog1-, NKX2,2- und	85
	Olig2-Promotorbereich	85
3.12	Globale Veränderung von EZH2 und H3K27me3	87
	unter Depsipeptid, ATRA und DZNep.	87
3.13	Relative Veränderung der EZH2-Expression unter Einfluss.....	89
	von Depsipeptid, ATRA und DZNep	89
4	Diskussion.....	91
4.1	Molekulare Wirksamkeit der Inhibitoren Depsipeptid, ATRA.....	91
	und DZNep in Neuroblastomzelllinien	91
4.2	Regulation der neurospezifischen Gene unter Depsipeptid	97
4.3	Analyse des Chromatinstatus der drei neurospezifischen Gene	99
4.4	Regulation der neurospezifischen Gene unter ATRA.....	100
4.5	Regulation der neurospezifischen Gene unter DZNep.....	101
4.6	Charakterisierung der drei neurospezifischen Gene <i>Neurog1</i> ,.....	102
	<i>NKX2.2</i> und <i>Olig2</i> im Rahmen von Neuroblastom	102
4.7	Ausblick.....	102
5	Zusammenfassung	103
6	Summary	105
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	107

DANKSAGUNG

LEBENS LAUF

ERKLÄRUNG

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AdoHcy	Adenohomocystein
Apaf-1	<i>apoptotic peptidase activating factor 1</i>
ATRA	All-trans-Retinsäure
BCA	Bicinchoninsäure
Bcl2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BRCA1	<i>Breast cancer 1</i>
ChIP	chromatinimmunpräzipitation
c-myc	<i>myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
Ct	<i>Cycle threshold</i>
Depsi	Depsipeptid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNMT	DNA - Methyltransferase
dsDNA	Doppelstrang Desoxyribonukleinsäure
DZNep	3'-deazaneplanocin A
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EED	<i>embryonic ectoderm development</i>
ENSEMBL	<i>European Bioinformatics Institute (EBI), European Molecular Biology Laboratory (EMBL) und Wellcome Trust Cancer Institute</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EZH1	<i>enhancer of zeste homolog 1</i>
EZH2	<i>enhancer of zeste homolog 2</i>
FKS	Fötales Kälberserum
GATA-4	<i>globin transcription factor 4</i>
GFAP	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
H19	<i>imprinted maternally expressed transcript</i>
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
LSD-1	<i>Lysine specific demethylase 1</i>
MECP 2	<i>Methyl-CpG binding protein 2</i>
MBD1-4	<i>Methyl-CpG-binding domain protein 1-4</i>
MLH1	mutL homolog 1
MS-PCR	Methylspezifische PCR

NB	Neuroblastom
NcoR	<i>Nuclear receptor corepressor</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PRC1	<i>Polycomb repressive complex 1</i>
RARE	Retinoic acid response element
PRC2	<i>Polycomb repressive complex 2</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	<i>Real-time PCR</i>
RUNX-3	<i>Runt-related transcription factor 3</i>
SAH	s-Adenosylhomocystein
SAM	s-Adenosylmethionin
SDS	Natriumdodecylsulfat
Suv39h1	<i>Suppressor of variegation 3-9 homolog 1</i>
Suv39h2	<i>Suppressor of variegation 3-9 homolog 2</i>
Suz12	<i>Suppressor of zeste 12</i>
TE	Tris-EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
UDG	Uracil DNA-Glycosylase

1 Einleitung

1.1 Epigenetik

Trotz Vorliegens identischer genetischer Information unterscheiden sich die Zellen eines multizellulären Organismus in ihrem Phänotyp voneinander. Diese phänotypische Divergenz entsteht durch Veränderungen im Genexpressionsmuster, welchem eine spezifisch gesteuerte Regulation der Genexpression zugrunde liegt. Eine vererbare Variation in der Genexpression, die nicht mit einer Veränderung der DNA-Sequenz, sondern zum Beispiel der Chromatinstruktur einhergeht, wird als epigenetisch bezeichnet.

Epigenetische Mechanismen sind essentiell für viele grundlegende biologische Prozesse wie genomische Prägung, Gametogenese, Zelldifferenzierung sowie Aufrechterhaltung der Zellidentität in spezialisierten ausdifferenzierten Zellen. Störungen in den epigenetischen Kontrollmechanismen führen durch abnormale Aktivierung und Inhibierung von verschiedenen Signalwegen zu Krankheiten wie Krebs.

Gegenwärtig sind die drei molekularen Mechanismen epigenetischer Genregulation DNA-Methylierung, kovalente Histon-Modifikationen und miRNA-Moleküle, die die Chromatinstruktur beeinflussen können, bekannt. Das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag auf der DNA-Methylierung und Histon-Modifikation.

1.2 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist ein wichtiger Regulationsmechanismus, der zusammen mit Histon-Modifikationen und anderen Chromatin-assoziierten Proteinen eine entscheidende Rolle bei der Genrepression spielt. Beim Menschen findet die DNA-Methylierung vornehmlich an Cytosinresten von CpG-Dinukleotiden statt. Hierbei wird eine Methylgruppe von S-adenosyl-L-Methionin auf das C5-Atom des Cytosinrings übertragen. Die Übertragung der Methylgruppen wird von DNA-Methyltransferasen katalysiert (1). Drei unterschiedliche Klassen von DNA-Methyltransferasen spielen bei der Etablierung und Erhaltung des DNA-Methylierungsmusters eine Rolle: DNMT1, DNMT3a und DNMT3b. Die DNA-Methyltransferase DNMT1 hat eine hohe Spezifität gegenüber hemimethylierter DNA und trägt zur Erhaltung der DNA-Methylierung während der DNA-Replikation und -Reparatur bei. DNMT3a und DNMT3b hingegen weisen eine hohe Affinität gegenüber nichtmethylierter DNA auf und werden deshalb als *de novo* Methyltransferasen bezeichnet (2;3). Die Einteilung der Funktion dieser DNMTs ist bisher noch nicht eindeutig geklärt, da es Hinweise darauf gibt, dass DNMT1 auch für *de novo* Methylierungen physiologisch von Bedeutung ist (4).

Aufgrund der Deaminierung von methylierten Cytosinen zu Uracil liegt im menschlichen Genom nur eine geringe Anzahl von CpG-Dinukleotiden vor. Im Genom beobachtet man zwei typische Verteilungsmuster von CpG-Dinukleotiden. Zum einen liegen sie im Genom verstreut vor und sind in 70-80 % der Fälle methyliert (5;6). Diese CpG-Dinukleotide sind vorwiegend in repetitiven Sequenzen wie LINE (*long interspersed transposable elements*) - und SINE (*short interspersed transposable elements*) -Retrotransposon-Elementen sowie in Satellitensequenzen vorzufinden. Im methylierten Zustand tragen sie zur Stabilisierung des Chromatins bei, indem sie die Beweglichkeit von Transposons und homologe Rekombinationsereignisse unterdrücken. Zum anderen kommen CpG-Dinukleotide in einer sehr hohen Dichte in den sogenannten CpG-Inseln vor (7;8). Diese sind vor allem an 5'-Bereichen von Genen zu finden und besetzen somit 60 % der humanen Genpromotoren (9). Der Großteil dieser CpG-Inseln bleiben während der Entwicklung und in Zellen der differenzierten Gewebe unmethyliert (10). Jedoch können einige Promotoren mit CpG-Inseln während der Entwicklung methyliert werden, was zu einer langzeitigen Stilllegung der Zielgene führt. Klassische Beispiele hierfür sind die X-Chromosomale Inaktivierung und das genomische *Imprinting* (11). Ebenso zeigen einige CpG-Inseln eine gewebsspezifische Methylierung im Promotorbereich, welche vorwiegend an entwicklungspezifischen Genen vorkommen (12).

Die Inhibition der Genaktivität durch DNA-Methylierung beruht auf Veränderung der DNA-Protein-Interaktion, wofür zwei Mechanismen bekannt sind: Zum einen verhindern methylierte CpGs die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren wie c-myc (*myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*) und führen dadurch eine Genrepression herbei. Zum anderen können an methylierte Cytosine Methyl-gruppen bindende Proteine wie MeCP2 (*methyl-CpG-binding protein 2*) oder MBD1-4 (*methyl-CpG-binding domain protein 1-4*) binden. Diese wiederum interagieren mit Korepressoren und Histondeacetylasen aus transkriptionshemmenden Proteinkomplexen und bewirken somit eine Genrepression (13).

Im Zuge des menschlichen Lebenszyklus treten zwei Phasen mit starken Methylierungsänderungen auf. Nach der Befruchtung kommt es zu einer Demethylierung der elterlichen Genome, die bis zum Blastocystenstadium andauert. Dabei werden alle Regionen des Genoms mit Ausnahme der geprägten Gene wie H19 (*imprinted maternally expressed transcript*) demethyliert und durch Markierungen ersetzt, welche für den Erwerb der Toti- und Pluripotenz relevant sind. Eine *de novo*-Methylierung findet nach der Implantation im Blastozysten-Stadium statt. Während der Gametogenese findet eine genomweite Demethylierung der primordialen Keimzellen statt. Diese Demethylierung beinhaltet Regionen der *Imprinting*-Gene sowie Einzelkopiegene. Wie weit noch andere Bereiche vom

Genom betroffen sind, ist noch nicht bekannt. Eine *de novo*-Methylierung erfolgt während der Reifung der Gameten (14).

Pathologische Veränderungen der DNA-Methylierung stehen im Zusammenhang mit der Entstehung von Krebs. Ein Krebs-Epigenom ist charakterisiert durch eine genomweite Hypomethylierung sowie durch eine Hypermethylierung der CpG-Inseln in Promotorbereichen (15). Die genomweite Hypomethylierung betrifft repetitive Sequenzen und Retransposons und hat eine genomische Instabilität zur Folge (16;17). Hypermethylierung von CpG-Inseln in Promotorbereichen resultiert beispielsweise in Repression von Tumorsuppressorgenen. Beispiele für Tumorsuppressorgene, die solch einer Repression unterworfen sind, stellen *p16*, *MLH1* (mutL homolog 1) und *BRCA1* (*Breast cancer 1*) dar (18;19).

Die Genprodukte dieser Gene steuern wichtige zelluläre Prozesse wie DNA-Reparatur, Zellzyklus, Zelladhäsion, Apoptose sowie Angiogenese. Überdies kann die DNA-Methylierung durch Promotorhypermethylierung-induzierte Repression von Transkriptionsfaktoren indirekt andere Klassen von Genen reprimieren. Bekannte Beispiele sind die Promoterhypermethylierung von *RUNX-3* (*runt-related transcription factor 3*), *GATA-4* (*globin transcription factor 4*), deren Repressionen in Tumoren des Ösophagus, Kolons sowie Magens eine Inaktivierung von nachfolgenden Signalwegen zur Folge haben (20;21). Des Weiteren weisen Tumorzellen eine aberrante *de novo*-Methylierung von CpG-Inseln in Zielgenen von Polycombproteinen auf (siehe Kapitel 1.4.2).

1.3 Modifikationen der Histone

Die kleinste Einheit des Chromatins ist das Nukleosom, welches aus einem Histon-DNA-Komplex aufgebaut ist. Der Komplex besteht aus 147 bp DNA, die um ein Histon-Octamer gewunden ist. Das Histon-Octamer wird aus jeweils zwei Kopien der Proteine H2A, H2B, H3 und H4 gebildet (22). Die N-terminalen Regionen dieser Histone ragen aus dem Komplex heraus und können posttranslational durch Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitylierung von Aminosäureresten modifiziert werden (Abbildung 1) (23). Diese dynamischen Modifikationen verursachen Veränderungen an der Chromatinstruktur und tragen somit sowohl zur Unterscheidung von Heterochromatin und Euchromatin als auch zur Regulation der Transkription bei. Im Unterschied zur DNA-Methylierung können Histon-Modifikationen sowohl aktivierend als auch reprimierend die Transkription beeinflussen. Der folgende Überblick bezieht sich auf Lysin-Acetylierung und -Methylierung, da diese das Hauptaugenmerk dieser Arbeit bilden.

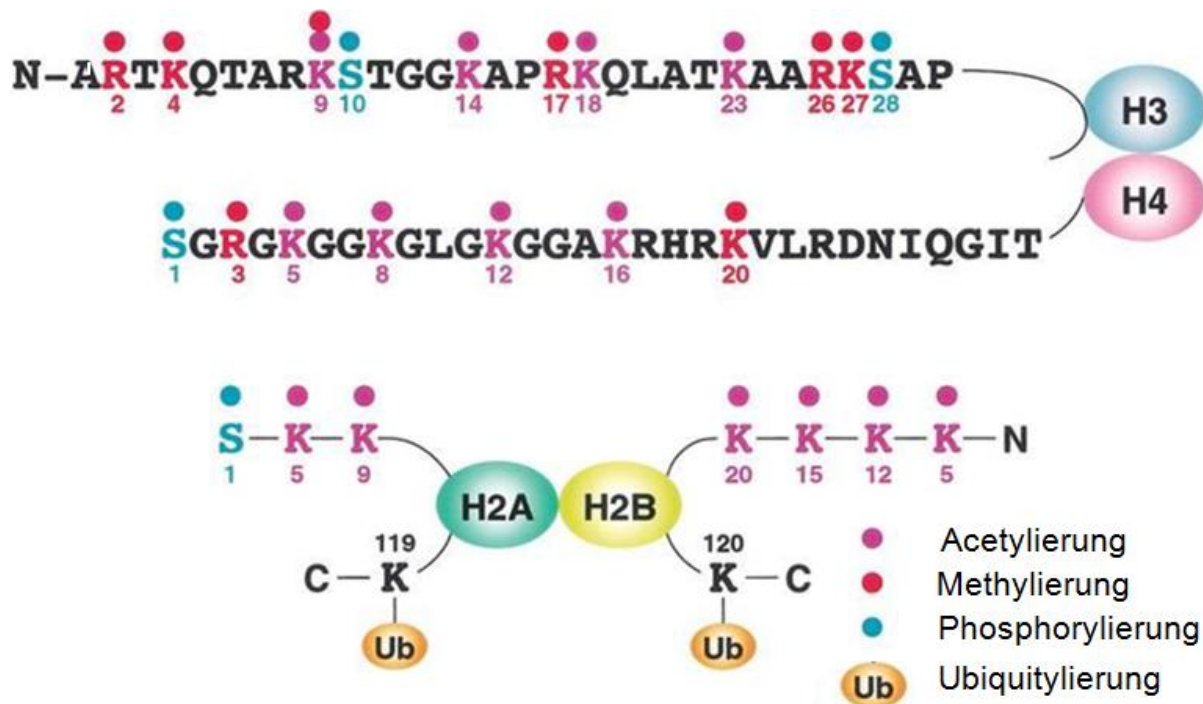


Abbildung 1: Übersicht der post-translationalen Histonmodifikation [modifiziert aus (24)]. Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der N-terminalen Enden der Histone H3, H4, H2A und H2B, die posttranslational modifiziert werden. Acetylierung (purpur), Methylierung (rot), Phosphorylierung (grün), Ubiquitylierung (orange).

1.3.1 Acetylierung und Deacetylierung von Histonen

Die Acetylierung von Histonen findet an verschiedenen Lysinresten statt (Abbildung 1). Acetylierung geht generell mit einer Aktivierung der Transkription einher, wohingegen die Deacetylierung die Transkription inhibiert (23). Für den Acetylierungsstatus einer Zelle ist das dynamische Gleichgewicht zwischen Acetylierung und Deacetylierung von entscheidender Bedeutung. Dieses Gleichgewicht wird von zwei antagonistisch wirkenden Enzymen, den Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) kontrolliert. Histonacetyltransferasen übertragen Acetylgruppen von Acetyl-CoA auf die Lysinreste der Histone. Unter physiologischen Bedingungen liegen die Lysinreste protoniert vor und stehen in starker Wechselwirkung mit der negativ geladenen Phosphatgruppe der DNA. Die Acetylierung reduziert die positive Ladung des Lysins, was zu einer Abstoßung zwischen negativ geladener DNA und Lysinen führt. Dies hat zur Folge, dass das dicht verpackte Chromatin entspiralisiert und damit für Transkriptionsfaktoren zugänglich wird. Zusätzlich zu dieser elektrostatischen Wechselwirkung können acetylierte Lysinreste als spezifische Bindungsstellen für Proteine dienen, welche eine Bromodomäne aufweisen. Solche Domänen kommen in einer Vielzahl von an der Transkriptionregulation beteiligten Transkriptionscofaktoren wie zum Beispiel den HATs, GCN5 und PCAF vor.

Histondeacetylasen wiederum entfernen die Acetylgruppen von Lysinresten, wodurch die Affinität zwischen protonierten Lysinresten und DNA wieder erhöht wird. Dies trägt zur Bildung einer dicht verpackten Chromatinstruktur bei, die schwerer zugänglich für die Transkriptionsmaschinerie ist (25). Sowohl Histonacetylasen als auch Histondeacetylasen werden in Multiprotein-Komplexen zu den jeweiligen Genregionen rekrutiert, die aus sequenzspezifischen Transkriptionsfaktoren und deren Kofaktoren bestehen. Beispiele hierfür bilden einige Kernrezeptoren wie der Schilddrüsenhormonrezeptor und der Retinsäurerezeptor, welche in Abwesenheit von ihren Liganden mit HDACs und Korepressoren wie NcoR oder SMRT zu einem großen Multiproteinkomplex assoziieren und dadurch die Transkription ihrer Zielgene inhibieren (26). Durch die Bindung des Liganden kommt es zur Dissoziation des Komplexes und die Korepressoren werden durch Koaktivatoren wie SRC-1 oder CBP, die Acetylierungen ausüben, ersetzt (27). Ebenso spielen HDACs eine Rolle bei der polycomb-vermittelten Genrepression (28).

1.3.2 **Histondeacetylasen**

Die Familie der humanen HDACs bestehen aus 18 Enzymen, die in vier Klassen unterteilt werden. Zu den Klasse I Histondeacetylasen gehören HDAC 1, 2, 3 und 8, während Klasse II-Deacetylasen weiter in Enzyme der Klassen IIa (HDAC4, 5, 7 und 9) und IIb (HDAC6 und 10) unterteilt werden. Der bislang einzige bekannte Vertreter der Klasse IV ist HDAC11. Alle drei Klassen sind nah miteinander verwandt und benötigen Zn^{2+} als Cofaktor, um Acetylgruppen zu entfernen. Bei den Klasse III Histondeacetylasen handelt es sich um Sirtuine, die homolog zur Sir2-Familie der Hefen sind und in ihrem Katalysemechanismus von Nicotinsäureamid-adenin-dinukleotid (NAD⁺) abhängig sind (29;30). Eine Überexpression von Histondeacetylasen steht im Zusammenhang mit pathologischen Veränderungen wie der Entstehung maligner Tumorerkrankungen (26). Überexpression von Histondeacetylasen führen zu einer Hypoacetylierung der Histone und damit zur Repression von Genen, die an zelluläre Prozesse wie Zellzykluskontrolle und Apoptose beteiligt sind. So ist zum Beispiel an Neuroblastompatienten gezeigt worden, dass eine Überexpression von HDAC8 mit einem fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung korreliert (31). Darüber hinaus zeigten „Microarray-Analysen“, dass multiresistente Neuroblastomzellen eine erhöhte Expression von HDAC1 aufweisen (32). Auch in vielen adulten Krebsarten ist eine Fehlregulation der Histondeacetylasen bekannt (33).

1.3.3 Histondeacetylase-Inhibitoren

HDAC-Inhibitoren blockieren die Aktivität von Histondeacetylasen, indem sie mit der katalytischen Domäne der Enzyme interagieren. Basierend auf ihrer chemischen Struktur werden Histondeacetylase-Inhibitoren in vier unterschiedliche Klassen unterteilt: Hydroxaminsäuren, zyklische Tetrapeptide, aliphatische Säuren sowie Benzamide. Generell verursachen Behandlungen mit HDAC-Inhibitoren eine rapide Akkumulation von hyperacetylierten Histonen, welche mit einer Reexpression inhibierter Gene einhergeht, die in den Tumorzellen die Transkription regulatorischer Proteine aktivieren, die an der Induktion von Zelldifferenzierung, Zellzyklusarrest und Apoptose beteiligt sind. Darüber hinaus werden die Induktion von Immunantworten sowie die Hemmung von Angiogenese als weitere Faktoren der Tumorregression durch Histondeacetylase-Inhibitoren *in vivo* diskutiert. Ein typischer Effekt von HDAC-Inhibitoren in vielen Tumorzellen ist die Induktion des Tumorsuppressorgens p21^{WAF/CIP1}, welches eine entscheidende Rolle beim Wachstumsarrest und Apoptose spielt (34). Auch proapoptotische Gene wie Apaf-1 (*apoptotic peptidase activating factor 1*) und Caspase 9 werden hochreguliert. Entsprechend findet man auch eine Abnahme in der Expression von antiapoptotischen Genen wie Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) und Survivin statt (35). Genomweite Expressionsanalysen mittels Microarray zeigen, dass nur ein Bruchteil (2-5%) des Transkriptoms durch HDAC-Inhibitoren aktiviert oder reprimiert werden (36). Dies zeigt, dass die Genregulation durch Acetylierung und/bzw. Deacetylierung ein sehr spezifischer Prozess ist.

Histondeacetylase-Inhibitoren können auch bei Nicht-Histonproteinen Acetylierungen induzieren und damit direkt mit den Effektorproteinen der Apoptose interagieren. So führt zum Beispiel die Acetylierung von p53 zur Induktion eines Zellzyklusarrestes und zur Apoptose in vielen Tumorentitäten (37). Darüber hinaus sind Histondeacetylase-Inhibitoren durch Interaktion mit Histondeacetylasen in der Lage, Proteinkomplexe zu modulieren, die das Zellschicksal beeinflussen. Chen *et al.*, konnten zeigen, dass HDAC-Inhibitoren das antiapoptotische Protein Serin-Threonin-Kinase-Akt hemmen. Interaktionen von HDAC-Inhibitoren mit Histondeacetylasen führen zur Dissoziation des HDAC/Protein-phosphatase (PP1)- Komplexes. Somit ist PP1 in der Lage, an Akt zu binden und dieses durch Phosphorylierung zu inhibieren und damit die Apoptose auszulösen (38). Derzeitig befindet sich eine Reihe von HDAC-Inhibitoren in klinischen Phase I und II- Studien, in denen sie als Monotherapie oder als Kombination mit anderen Antitumor-Medikamenten gegen verschiedene Tumorentitäten getestet werden (39).

1.3.4 Depsipeptid als HDAC Inhibitor

In der vorliegenden Arbeit wurde als HDAC-inhibitorischer Wirkstoff das cyclische Depsipeptid verwendet, um Antitumor-Eigenschaften sowie die Regulation der embryonal-spezifischen Transkriptionsfaktoren, welche einer polycomb vermittelten Genregulation unterliegen, in Neuroblastomzellen zu untersuchen.

Bei Depsipeptid (FK 228, Romidepsin) handelt es sich um ein natürlich vorkommenden HDI aus der Gruppe der zyklischen Peptide, der aus dem *Chromobacterium violaceum* isoliert wurde (40). Es hat eine hydrophobe Struktur und kann somit die Zellmembran leicht durchdringen. Depsipeptid wird erst nach Eindringen in die Zelle durch intrazelluläres Glutathion aktiviert, welches die Disulfidbindung im Zentrum des Moleküls zu Sulfhydrylgruppen reduziert. Diese wiederum chelatieren Zn^{2+} -Ionen im aktiven Zentrum von Histondeacetylasen und inhibieren somit deren Aktivität.

Depsipeptid inhibiert bereits in nanomolaren Mengen Klasse I und II Histondeacetylasen, wobei es eine stärkere inhibitorische Wirkung gegenüber Klasse I Histondeacetylasen aufweist (41). Für Depsipeptid konnte gezeigt werden, dass es antitumorale Effekte in einer Vielzahl von *in vitro* und *in vivo* Systemen induziert. So zeigte sich zum Beispiel in verschiedenen Krebszellen, dass es durch die Induktion von cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren wie p21^{WAF1/CIP1} and p27^{KIP1} einen Zellzyklusarrest auslöst. Desweiteren ist bekannt, dass Depsipeptid Differenzierung induzieren kann. So führte die Behandlung von Depsipeptid zum Beispiel in den Chondrosarcoma-Zellen zur Differenzierung dieser Zellen. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Depsipeptid in Kombination mit Retinolsäure in akuten promyelocytischen Zellen Differenzierung induziert. Auch apoptotische und anti-angiogenetische Effekte sind für Depsipeptid beschrieben. So führt zum Beispiel die Behandlung von Depsipeptid im Uveamelanomzellen zur Aktivierung des FasL Signalweges (42). Derzeitig befindet sich die Substanz in der Klinik in Phase I und II Studien hämatologischer Tumorerkrankungen sowie solider Tumorentitäten (39).

1.3.5 Lysin-Methylierung

Methylierungen können sowohl an Lysin- als auch an Argininresten stattfinden. Dabei können Argininreste mono-, oder dimethyliert und Lysinreste mono-, di- oder trimethyliert werden. Da im Rahmen dieser Arbeit hauptsächlich die Lysin-Methylierung untersucht wurde, wird im Folgenden auf diese eingegangen. Je nach Position der Lysinreste in Histonen und Grad der Methylierung (mono-, di- oder tri-) übt die Lysin-Methylierung einen unterschiedlichen Effekt auf die Regulation der Transkription aus. So sind Modifikationen wie die Trimethylierung am Lysin 4 von Histon H3 (H3K4me3) und am Lysin 36 von Histon H3

(H3K36me3) an transkriptionell aktiven Genbereichen zu finden, wohingegen Trimethylierung am Lysin 9 von Histon H3 (H3K9me3) und am Lysin 27 von Histon H3 (H3K27me3) in inaktiven Bereichen wie im inaktivierten X-Chromosom vorkommen (23). Lysin-Methylierungen werden von Histonmethyltransferasen durchgeführt, die als Kofaktor S-Adenosylmethionin für die Übertragung der Methylgruppe verwenden. Die enzymatische Aktivität wird meist durch ihre SET-Domäne verliehen. Zu Beginn der Forschung ging man davon aus, dass Methylierungsprozesse irreversibel seien bis im Jahr 2004 das Enzym LSD1 (*Lysin specific Demethylase 1*) entdeckt wurde. LSD1 entfernt Methylreste sowohl von der aktivierenden Histonmodifikation dimethyl-H3K4 als auch von der reprimierenden Histonmodifikation dimethyl-H3K9 und wirkt damit sowohl als Corepressor als auch als Koaktivator der Genregulation (43;44). Seither wurden weitere Methyltransferasen identifiziert, u.a. auch welche, die Methylgruppen aus trimethylierten Lysinresten entfernen. Hierzu gehören vor allem Proteine mit *jumonji*-Domänen.

Im Gegensatz zur Histonacetylierung verändert eine Histon-Methylierung die Ladung der Histon-Schwänze nicht. Dagegen beeinflusst sie die Basizität und Hydrophobizität der Histone und deren Affinität gegenüber Transkriptionsfaktoren. Methylierte Lysinreste werden von Proteinen erkannt, die eine Chromodomäne, WD 40 *repeat* Domäne, Tudordomäne sowie PHD-Domäne aufweisen.

Veränderungen im Histon-Methylierungsmuster spielen eine Rolle bei vielen Krebsarten. Veränderte Methylierungen der Histone H3K9 und H3K27 sind mit einer aberranten Genrepression in vielen Tumorarten assoziiert. Ebenso können Fehlregulationen von Histonmethyltransferasen- sowie demethylasen zur pathologischen Veränderung des Histon-Methylierungsmusters führen und somit zur Deregulation von Genexpression. So ist zum Beispiel EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*), eine H3K27-Methylase, in Mamma- und Prostatakarzinom und G9a (H3K9-Methylase) in Leberkarzinomen hochreguliert.

1.3.6 Histonmethyltransferaseinhibitoren

Deazaneplanocin A als EZH2- (H3K27-Methylase) Inhibitor

Zurzeit werden HDAC- und DNMT-Inhibitoren gehäuft in der Krebstherapie verwendet. Im Gegensatz dazu steckt die Suche nach Inhibitoren gegen Histonmethyltransferasen noch in den Kinderschuhen. Potentielle Angriffspunkte für Medikamente stellen die beiden Histonmodifikationen H3K9me2 und H3K27me3 dar, da sie eine wichtige Rolle bei der transkriptionellen Stilllegung von Tumorsuppressogenen in Tumoren spielen. Bisher sind zwei Histonmethyltransferase-Inhibitoren beschrieben: Chaetocin und BIX-01294. Chaetocin zeigte eine hemmende Wirkung gegen die H3K9-spezifische Methyltransferase Suv39h1

(45). Für BIX-01294 wurde nachgewiesen, dass es die H3K9-spezifische Methyltransferase G9a hemmt (46).

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente kam der Inhibitor DZNep (3-deazaneplanocin A) zur Anwendung. Vor kurzem wurde von Tan *et al.*, gezeigt, dass DZNep in der Lage ist, EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*), eine H3K27-Methylase, selektiv zu inhibieren und damit die reprimierende polycomb-vermittelte Histonmodifikation H3K27me3 zu hemmen. Darüber hinaus konnte es Apoptose in Karzinomzellen induzieren (47).

DZNep ist ein s-Adenosylhomocystein (AdoHcy)-Hydrolase-Inhibitor. Ado Hcy-Hydrolase ist ein wichtiges Enzym im Methylierungsstoffwechsel. Das Substrat der SAH-Hydrolase, s-Adenosylhomocystein (SAH), entsteht im Organismus neben dem methylierten Reaktionsprodukt in S-Adosylmethionin-(SAM)-abhängigen Methylierungsreaktionen. Seine Akkumulation führt zu einer Produkthemmung vieler SAM-abhängiger Methyltransferasen im Sinne einer negativen Rückkopplung. Daher führt eine Inhibition von AdoHcy-Hydrolase durch DZNep zu einer indirekten Hemmung von Methylierungsreaktionen.

1.3.7 **Zusammenspiel von DNA- und Histon-Modifikationen bei der Genregulation**

Histon-Modifikationen und DNA-Methylierung interagieren auf mehreren Ebenen miteinander, um den Genexpressionsstatus zu bestimmen. Zum einen können viele Histonmethyltransferasen DNA-Methyltransferasen zu spezifischen genomischen Regionen rekrutieren, um eine stabile Genrepression hervorzurufen. Ein Beispiel hierfür ist die Heterochromatinisierung von Satellitensequenzen, bei der die Histonmethyltransferasen Suv39h1 und Suv39h2 die Methylierung von H3K9 katalysieren. Diese Enzyme sind auch für die Rekrutierung von DNMT3A und DNMT3B notwendig, um die CpG-Dinukleotide in den Satellitenregionen zu methylieren (48;49). Darüber hinaus können Histonmethyltransferasen sowie Demethylasen die Stabilität der DNA Methyltransferasen regulieren und damit die Genexpression beeinflussen (50). Zum anderen können DNA-Methyltransferasen wiederum über methyl-bindende Proteine Histondeacetylasen rekrutieren, um eine Genrepression und Kondensation des Chromatins zu verursachen (51). Überdies kann die DNA-Methylierung auch eine H3K9-Methylierung direkt durch Effektorproteine wie MECP2 rekrutieren, um einen repressiven Chromatinstatus herbeizuführen (52).

1.4 Polycomb-proteine als epigenetische Regulatoren

Als epigenetische Regulatoren spielen die Proteine der Polycomb-Gruppe sowohl bei der embryonalen Entwicklung als auch im adulten Organismus sowie bei der Karzinogenese eine zentrale Rolle. Polycomb-proteine wurden zuerst bei *Drosophila* als Regulatoren von Homeobox-Genen beschrieben. Homeobox-Gene sind für die Ausbildung der anterior-posterior Körperachse sowohl bei Insekten als auch bei Vertebraten entscheidend. Das Expressionsmuster dieser Gene wird sehr früh in der Entwicklung etabliert und im Zuge der Entwicklung durch Proteine der Polycomb- und der Trithorax-Gruppe über mehrere Zellgenerationen hinweg aufrechterhalten (53). Die Aufgabe der Polycomb-Gruppe besteht darin, das Expressionsmuster von reprimierten Hox-Genen aufrechtzuerhalten, während die Trithorax-Gruppe für den aktiven Zustand der Hox-Gene zuständig ist. Mittlerweile ist bekannt, dass zusätzlich zu den Hox-Genen zahlreiche andere Gene durch die Polycomb-Gruppe kontrolliert werden. Dazu gehören vor allem Transkriptionsfaktoren, die an diversen zellulären Funktionen und entwicklungspezifischen Signalwegen beteiligt sind (54-56).

Biochemische und genetische Studien zeigen, dass an der Genrepression in Vertebraten zwei verschiedene Komplexe der Polycomb-Gruppe, *polycomb repressive complex 1* (PRC1) und *polycomb repressive complex 2* (PRC2) beteiligt sind. In Säugern besteht der Polycomb-Komplex 2 aus den Kernkomponenten EZH2 (*Enhancer of zeste homolog 2*), EED (*embryonic ectoderm development*) sowie SUZ12 (**S**uppressor of **z**este **12**) und ist für die Initiation der Genrepression zuständig. Für die katalytische Aktivität des Komplexes ist EZH2, die SET-Domäne besitzende Histon-Methyltransferase, zuständig. EZH2 katalysiert die Di- und Tri-methylierung von H3K27. Diese Histonmodifikation bewirkt durch die Veränderung der Chromatinstruktur die Repression der Gen-Promotoren (57-59). Für die Rekrutierung der Polycomb-proteine an die jeweilige Genregion wurden mehrere Transkriptionsfaktoren in *Drosophila* identifiziert. In humanen Zellen sind bisher u.a. die Proteine YY1 (*ying und yang 1*), IKAROS sowie PLZF (*promyelocytic leukemia zinc finger protein*) bekannt (58;60). In *Drosophila* binden Polycomb-proteine an sogenannte PREs (*polycomb repressive elements*) im Genom. Bis dato sind noch keine PREs für Säugerzellen bekannt.

Der PRC1-Komplex enthält u.a. folgende Komponenten: BMI1/MEL18, RING1A/RING1B/RNF2 (*ring finger protein*), hPC 1–3 (*Polycomb*) sowie hPH1–3 (*Polyhomeotic*). Er ist für die Aufrechterhaltung der Repression zuständig und wird daher auch als „*maintenance complex*“ bezeichnet. Die spezifische Methylierung von H3K27 ermöglicht die Bindung von PRC1 über die Chromodomäne von HPC an H3K27me3 und wird wahrscheinlich dadurch zu den entsprechenden Genregionen rekrutiert (58;61;62). Des Weiteren enthalten die Ring-Finger-Proteine des Komplexes noch eine intrinsische histon-

modifizierende Aktivität, welche die Ubiquitinierung von Lysin 112 des Histons H2A katalysiert (63). Abbildung 2 zeigt ein Modell zur Polycomb-vermittelten Genregulation.

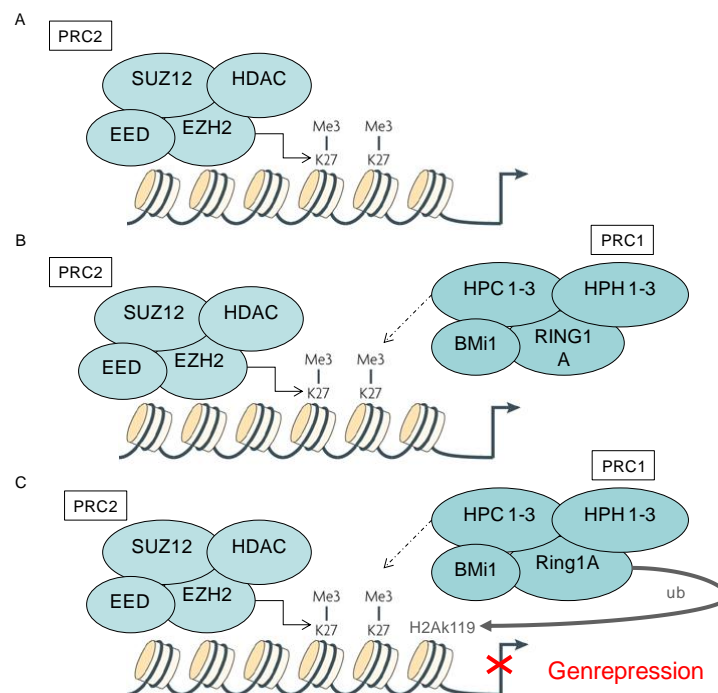


Abbildung 2: schematische Darstellung zur Polycomb vermittelten Genregulation [modifiziert aus (64)]. A. Zunächst bindet PRC2 (Polycomb Komplex 2), welcher über DNA bindende Faktoren rekrutiert wird, an die zu still legende Genregion. EZH2, die katalytische Komponente vom PRC2, vermittelt anschließend die Trimethylierung von H3K27. B. Die spezifische Methylierung von H3K27 ermöglicht die Bindung von PRC1 (Polycomb Komplex 1) vermutlich über die Chromodomäne von HPC 1-3. C. PRC1 ubiquityliert H2AK119 und trägt gemeinsam mit PRC2 zur Kondensation des Chromatins bei. Dabei ist PRC2 für die Initiation der Genrepression, PRC1 für die Aufrechterhaltung der Genrepression zuständig. Suz12 = *suppressor of zeste homologue 12*, EZH2 = *enhancer of zeste homologue 2*, EED = *embryonic ectoderm development*, HDAC = Histondeacetylase, HPC1 - 3 = *human chromodomain protein polycomb 1, 2 und 3*, HPH 1-3 = *human polyhomeotic 1,2 und 3*, BMI1 = *polycomb ring finger oncogene*, Ring 1 A = *ring finger protein 1*.

Neben den beiden oben erwähnten Komplexen sind in den letzten Jahren weitere Polycomb-Komplexe mit unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten identifiziert worden. Diese Diversität zeichnet sich durch Variation in der Zusammensetzung des Komplexes, Vorhandensein von homologen Proteinen oder Proteinisoformen der Polycomb-Gruppe aus. So wurde vor kurzem das Protein EZH1 entdeckt, welches zu EZH2 homolog ist und anstelle von EZH2 im Polycomb Komplex 2 vorkommt. Der EZH1-PRC2 Komplex weist nur eine schwache Aktivität gegenüber H3K27me3 auf, da EZH1-*Knockdown*- Experimente keinen Effekt auf H3K27me3 zeigen. Dieser Komplex ist jedoch in der Lage, das Chromatin zu kondensieren, ohne eine Histonmethylierung durchzuführen.

Für die Aufrechterhaltung und Selbsterneuerung von embryonalen Stammzellen (ES) ist EZH2 entbehrlich, weil EZH1 seinen Verlust kompensiert. So zeigen EZH2- *Knockdown*-Experimente in ES-Zellen, dass EZH1 mit H3K27me3 kolokalisiert und diese Modifikation an entwicklungspezifischen Genen aufrechterhält (65).

Ein weiteres Beispiel für die Komplexdiversität stellt der Polycomb-Komplex PRC3 dar, der sich vom PRC2 durch das Vorkommen anderer EED-Isoformen unterscheidet. Je nach unterschiedlicher Isoform katalysiert dieser Komplex unterschiedliche Histon-Modifikationen wie H3K27 oder H1K27 (66).

In verschiedenen Studien konnte festgestellt werden, dass bei der Aufreinigung der Polycomb-Komplexe auch andere Proteine, die eine Funktion in der Regulation der Genexpression haben, isoliert werden. Darunter sind Proteine, die in der Histon-Modifizierung eine Rolle spielen, wie zum Beispiel die Histondeacetylasen oder DNA Methyltransferasen. So konnte durch Ko-Immunopräzipitation gezeigt werden, dass die PRC2 Komponenten EZH2 und EED Interaktionspartner von allen drei DNA Methyltransferasen ist (67).

Generell weisen Polycomb-regulierte Gene in ihren Promotoren CpG-Inseln auf, die während der Implantation von *de novo*-Methylierung verschont bleiben (68). Folglich bleiben die meisten Polycomb-Zielgene während der Entwicklung unmethyliert. Trotzdem können einige dieser Gene unter gewissen Umständen *de novo* methyliert werden. So konnten Mohn *et al.* nachweisen, dass nach Differenzierung der ES-Zellen in neuronale Vorläuferzellen ein Großteil der Gene mit *de novo* Methylierung Polycomb regulierte Gene sind (69). Der genaue Mechanismus für diesen Prozess ist nicht vollkommen geklärt. Man nimmt an, dass dies durch eine Interaktion zwischen EZH2 und den DNA-Methyltransferasen DNMT3A und 3B ermöglicht wird. Ebenso ist unklar, welche Relevanz diese zusätzliche Repression durch DNA-Methylierung hat. Möglicherweise wird hierdurch eine stabile und dauerhafte Genrepression erreicht, was nicht die Polycomb-Gruppe allein vermitteln kann. Darüber hinaus ist eine Interaktion zwischen HDACs und Polycomb-proteinen bei der Vermittlung der Genrepression beschrieben. In humanen Zellen wurde gezeigt, dass der Polycomb Komplex 2 mit den Histondeacetylasen 1 und 2 interagiert (70).

1.4.1 Bedeutung der Polycomb-proteine in ES-Zellen

Neue Studien belegen, dass die Polycomb-proteine eine bedeutende Funktion bei der Erhaltung der Pluripotenz von embryonalen Stammzellen haben. Durch Inhibition der Expression wichtiger differenzierungsspezifischer Transkriptionsfaktoren, tragen sie zur Aufrechterhaltung der Pluripotenz bei. Polycomb-proteine sind in embryonalen hoch

exprimiert. So ist bekannt, dass embryonale Stammzellen eine hohe Expression an EZH2 aufweisen, welche während der Differenzierung abnimmt. Genomweite Lokalisierungsstudien durch **chromatin immunopräzipitation** (ChIP) in murinen und humanen ES-Zellen zeigen, dass ca. 20 % der Gene in ES-Zellen mit Polycomb-proteinen besetzt sind und die reprimierende Histonmodifikation H3K27me3 aufweisen (54;56). Diese Gene kodieren für Genprodukte, die in Entwicklungsprozessen wie z.B. bei der zellulären Differenzierung, eine wichtige Rolle spielen (Abbildung 3). Neben der reprimierenden H3K27me3-Modifikation ist auch die Trithorax assoziierte aktivierende H3K4me3-Histonmodifikation an diesen Genpromotoren vorzufinden (71). Es wird angenommen, dass die Koexistenz der aktivierenden und reprimierenden Histonmodifikation Gene für eine nachfolgende zelllinien- oder gewebsspezifische Aktivierung oder Deaktivierung bereit hält. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass ein Großteil dieser Targetgene im Verlauf der Differenzierung aktiviert wird und gleichzeitig dabei die repressive H3K27me3-Histonmodifikation verlieren. Demnach verlieren nicht- induzierte Gene in ES-Zellen nach der Differenzierung ihre aktivierende H3K4me3-Histonmodifikation, wohingegen die repressive H3K27me3-Modifikation erhalten bleibt (72). Zusätzlich zu ihrer Rolle in embryonalen Stammzellen sind Polycomb-proteine auch bei der Aufrechterhaltung adulter Stammzellen beteiligt. Bmi1 ist beispielsweise notwendig für die Aufrechterhaltung und Selbsterneuerung von adulten hämatopoietischen und neuronalen Stammzellen, EZH2 für die Muskelvorläuferzellen (73).

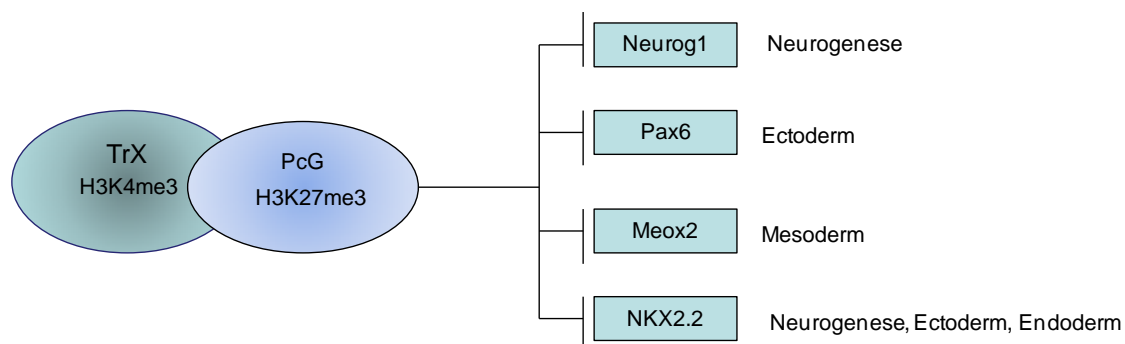


Abbildung 3: Schematischer Überblick über die Regulation der Differenzierungsspezifischen Gene in ES-Zellen [modifiziert nach (74)]. Die Promotoren der entwicklungsspezifischen Gene in ES-Zellen weisen sowohl die trithorax vermittelte aktivierende Histonmodifikation H3K4me3 als auch die Polycomb vermittelte reprimierende Histonmodifikation H3K27me3 auf. TrX = Trithorax, PcG = Polycomb

1.4.2 Polycomb-proteine und Karzinogenese

Den Polycomb-proteinen wird außerdem eine Rolle bei der Entstehung von Krebs zugesprochen. Ein beträchtlicher Anteil der Polycomb-regulierten Gene, insbesondere entwicklungsspezifische Gene, weist in Tumorzellen eine aberrante *de novo*-Methylierung auf. Diese Gene sind in normalen Zellen stillgelegt, ihre DNA jedoch nicht methyliert (75).

Überdies zeigen diese Gene nach Erhaltung der *de novo*-Methylierung eine Abnahme der trimethylierten H3K27-Modifikation an den Promotoren (76). Auf diese Weise scheint die DNA-Methylierung die repressiven Funktionen von Polycomb-proteinen zu ersetzen. Allerdings bleibt noch unklar, was für ein Einfluss die *de novo*-Methylierung in Tumorzellen hat, da die betroffenen Gene sowohl im Normal- als auch im Tumorgewebe konstitutiv reprimiert vorliegen. Es wird angenommen, dass diese Veränderung eine stabile Repression differenzierungsspezifischer Gene hervorruft und damit der Tumorzelle einen selektiven Vorteil verschafft, sich kontinuierlich weiter zu replizieren. Ebenso steht eine veränderte Polycomb-Genexpression mit der Entstehung und Progression verschiedener Tumorarten in Zusammenhang.

So belegen einige Studien, dass SUZ12 in Krebsarten wie Kolonkarzinom und Brustkarzinom hochreguliert ist. Andere Studien zeigen eine Überexpression von EZH2 in Tumoren des Lymphoms, der Brust sowie Prostata. Außerdem wurde eine erhöhte Expression von BMI1 bei Leukämien sowie soliden Tumoren von Brust und Gehirn beschrieben. Ferner ist eine Hochregulation von BMI1 in primären Neuroblastomen vorzufinden (77).

1.5 Neuroblastom

In diesem Kapitel wird auf Neuroblastom näher eingegangen, da die vorliegende Arbeit sich mit epigenetischen Veränderungen in diesem Tumor befasst.

Das Neuroblastom ist eine maligne Krebserkrankung des peripheren (sympathischen) Nervensystems, die meist Säuglinge und Kleinkinder bis zum sechsten Lebensjahr betrifft. Es umfasst ca. 7 % aller kindlichen Krebserkrankungen unter 15 Jahren und ist somit einer der häufigsten extrakraniellen soliden Tumoren im Kindesalter (78). Die Inzidenz liegt durchschnittlich bei 1 zu 100.000 bei Kindern unter 15 Jahren pro Jahr. Das mittlere Diagnosealter beträgt ca. 18 Monate. Etwa 40 % der Kinder erkranken im ersten Lebensjahr während die Inzidenz mit zunehmendem Lebensalter abnehmend ist (79).

Die Erkrankung wurde erstmals 1864 durch Virchow als abdominaler Tumor mit mikroskopischen Merkmalen eines Glioms beschrieben. 1891 zeigte Marchand, dass es sich hierbei um einen Tumor aus undifferenzierten Zellen der Neuralleiste handelt, welche bei der Bildung des sympathischen Nervensystems in einem unreifen Stadium verbleiben (80).

Folglich können Neuroblastome (NB) überall dort auftreten, wo sich sympathisches Nervengewebe befindet. Die Hälfte aller Tumore entsteht im Bereich der Nebennierenrinde; der Rest im Bereich des abdominalen Grenzstranges sowie des thorakalen Grenzstranges.

Über die Ätiologie des NBs ist wenig bekannt. Während die Mehrzahl der Tumore sporadisch auftritt, weist ein Teil (22 %) eine familiäre Disposition infolge von Keimbahnmutationen auf, die einer autosomal-dominanten Vererbung folgt. Genetische Genkopplungsanalysen deuten darauf hin, dass der Genlocus 16p12-13 wahrscheinlich für die Disposition verantwortlich ist. Jedoch ist zum jetzigen Zeitpunkt noch unklar, ob dieser der einzige Genlocus ist oder ob noch andere Loci an der Disposition beteiligt sind (79).

Das Neuroblastom zeichnet sich besonders durch seine enorme klinische und biologische Heterogenität aus, die von einer spontanen Tumorregression über eine Differenzierung in Ganglioneuroblastome und gutartige Ganglioneurome bis hin zu einer äußerst aggressiven Tumorprogression reicht (81).

Mehr als 55 % der Neuroblastome, die Kinder >1 Jahr betreffen, sind bereits bei der Diagnosestellung metastasiert. Bei diesen Patienten ist die Prognose oftmals trotz maximaler Therapie schlecht. Jedoch neigen 10 % der an Neuroblastom erkrankten Kinder, insbesondere Säuglinge, ohne Therapie oder mit minimaler Therapie zur spontanen Regression (82). Die spontane Regression kommt am häufigsten in dem als 4 s bezeichnetem Stadium vor, aber auch in den Stadien 1, 2, 3 und 4 (83). Neuroblastome weisen die höchste Spontanremissionsrate aller menschlichen Malignome auf. Die Differenzierung der Tumore in Ganglioneurome oder Ganglioneuroblastome wird seltener beobachtet als die spontane Regression.

1.5.1 Histopathologie

Histologisch werden drei unterschiedliche Formen von neuroblastischen Tumoren unterschieden: Neuroblastome, Ganglioneuroblastome und Ganglioneurome (Shimada 1999). Neuroblastomzellen bestehen aus kleinen uniformen Zellen mit dichten chromatinreichen Kernen, die von wenig Zytoplasma umgeben sind. (Böcker et al., Urban Verlag). Ganglioneurome sind ausdifferenziert und bestehen aus reifen Ganglienzellen und Schwanzzellen. Ganglioneuroblastome sind partiell differenziert, zeigen sowohl Merkmale eines Neuroblastoms als auch einer Ganglioneuroma.

1.5.2 Stadieneinteilung

Laut INSS (*International Neuroblastoma Staging System*) werden beim Neuroblastom vier klinische Stadien unterschieden. Die Zuordnung zu einem Stadium ist ein wichtiges Kriterium für die Prognose und Therapie des Neuroblastoms nach seiner Diagnose.

Tabelle 1: Stadieneinteilung beim Neuroblastom nach INSS

Stadien	Definition
<u>Stadium 1</u>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tumor ist lokalisiert und auf seinen Ursprungsort begrenzt; 2. komplette makroskopische Resektion (Entfernung); 3. Weder Befall der ipsilateralen noch kontralateralen Lymphknoten.
<u>Stadium 2a</u>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tumor ist auf eine Seite des Körpers begrenzt; 2. inkomplette makroskopische Resektion des Tumors. 3. Kein Befall der Lymphknoten
<u>Stadium 2b</u>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tumor ist auf eine Seite des Körpers begrenzt; 2. komplette oder inkomplette makroskopische Resektion des Tumors; 3. evtl. homolateraler Lymphknotenbefall
<u>Stadium 3</u>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tumor überschreitet die Mitellinie des Körpers; 2. regionaler Lymphknotenbefall beiderseits
<u>Stadium 4</u>	Fernmetastasen in Lymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber und/oder in anderen Organen mit Ausnahme der Stadium 4s Tumoren
<u>Stadium 4s</u>	<ol style="list-style-type: none"> 1. Tumor wie in Stadien 1 oder 2, Fernmetastasen in Leber, Haut und/oder Knochenmark. 2. Vorkommen nur im Säuglingsalter; 3. spontane Rückbildungsrate

1.5.3 Prognose

Die Prognose des NBs richtet sich vor allem nach dem Alter des Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose, dem Stadium des Tumors sowie dem Amplifikationsstatus des Onkogens *MYCN* (*v-myc myelocytomatosis viral related oncogene*).

Für alle Krankheitsstadien zeigen Kinder, die jünger als 1 Jahr alt sind, eine bessere Prognose als Kinder, die älter sind. Patienten mit NB in den Stadien 1, 2 oder 4s ohne *MYCN*-Amplifikation zeigen eine gute Prognose mit einer 5-Jahresüberlebensrate von ca. 95 %. Für Patienten im Stadium 3 sowie für Säuglinge im Stadium 4 ohne *MYCN*-Amplifikation beträgt die 5-Jahresüberlebensrate ca. 75 %. Kinder über 1 Jahr mit einer Erkrankung im Stadium 4 (unabhängig vom *MYCN*-Status), im Stadium 2 oder 3 mit *MYCN*-Amplifikation sowie Säuglinge unter 1 Jahr mit Metastasen und *MYCN*-Amplifikation haben nur eine Langzeitüberlebenswahrscheinlichkeit von 30%.

1.5.4 Molekularbiologie des Neuroblastoms

Obwohl einige Tumore autosomal-rezessiv vererbt werden können, zeigen die meisten Tumore ein sporadisches Auftreten. Diese Tumore gehen mit einer Vielzahl von Chromosomenaberrationen einher. Somatische Veränderungen wie Zugewinn von genetischem Material oder Verlust des genetischen Materials, Polyploidie sowie Aktivierung von Onkogenen steuern zur Entwicklung von NB-Tumoren bei.

So spielt u.a. die *MYCN*-Amplifikation eine wichtige Rolle. Das *MYCN*-Gen liegt in ca. 20 % der Primärtumore amplifiziert vor und korreliert mit fortgeschrittenem Stadium der Erkrankung und rascher Tumorprogression. Auch Säuglinge und Kinder mit NB in den Stadien 1, 2 oder 4s zeigen mit *MYCN*-Amplifikation eine insgesamt schlechte Prognose. Das Genprodukt von *MYCN* ist ein nukleärer Transkriptionsfaktor, dessen Überexpression zu einem unreguliertem Wachstum und Proliferation der Zelle führen kann. Das *MYCN*-Gen befindet sich normalerweise auf dem kurzen Arm vom Chromosom 2 (2p24), lokalisiert liegt es jedoch in Zellen mit einer hohen *MYCN*-Genexpression zusätzlich in Form von sogenannten *double minutes* oder interchromosomal als *homogenously staining regions* vor. Die Proteinexpression von *MYCN* korreliert mit der Überamplifikation, da Tumore mit einer *MYCN*-Amplifikation im Gegensatz zu Tumoren ohne *MYCN*-Amplifikation eine erhöhte Expression an *MYCN*-Protein aufweisen .

In einigen NB-Tumoren wird eine Überexpression von *MYCN* mRNA und Protein ohne vorhandene Überamplifikation des Gens beobachtet. Ob solch eine Überexpression von *MYCN* prognostisch relevant ist, wird noch kontrovers diskutiert (84).

Der Grund, warum *MYCN*-Amplifikation mit einem aggressiven Tumorverhalten korreliert, ist nach derzeitigem Kenntnisstand noch unbekannt.

1.5.5 Therapie

Konventionelle Behandlungsmethoden für NB umfassen Operation, Chemotherapie, Radiotherapie, Biotherapie sowie Observation in einigen vorsichtig ausgesuchten Fällen.

In den letzten Jahren werden zunehmend Therapiemöglichkeiten berücksichtigt, die bestimmte Signalwege, welche zur Pathogenese des Tumors beitragen, angreifen sollen.

Retinoide – ATRA

In vitro Untersuchungen haben gezeigt, dass eine Behandlung mit Retinoiden in NB-Zellen zur Differenzierung führt und das Wachstum der NB-Zellen *in vitro* verlangsamt. Klinische Studien an Hochrisiko-Patienten zeigen, dass eine Behandlung mit 13-cis Retinolsäure nach Knochenmarktransplantation die Überlebensrate signifikant erhöht und mit einer minimalen Toxizität verbunden ist. Retinolsäure ist zum festen Bestandteil der Therapie geworden. Retinoide gehen durch Oxidation aus Retinolen (Vitamin A) hervor. Sie spielen eine essentielle Rolle bei einer Vielzahl biologischer Prozesse durch Regulation der Genexpression. Durch Beeinflussung der Genregulation greifen sie bei der embryonalen Entwicklung, beim Wachstum des Organismus sowie bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und Differenzierung ein. Neben ATRA (all-trans-

Retinsäure) gehören noch 9-cis Retinsäure und 13-cis Retinsäure zur Familie der Retinoide. Retinoide entfalten ihre Aktivität über spezifische nukleäre Liganden-abhängige Rezeptoren, die auch die Funktion eines Transkriptionsfaktors ausüben. Zwei unterschiedliche Rezeptorklassen sind bisher beschrieben: die Retinsäurerezeptoren RAR (*retinoic acid receptor*), und die Retinoid-X-Rezeptoren. Beide Rezeptorklassen kommen in den drei Subtypen α , β und γ vor (85).

Im Folgenden wird näher auf ATRA eingegangen, da dieser Inhibitor im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde. ATRA bindet sich als Ligand an den RAR, der sich wiederum durch Dimerisierung an den RXR bindet. Das RAR/RXR-Heterodimer bindet im Nukleus an spezifische DNA Sequenzen, den sogenannten *Retinoic Acid Response* Elementen (RARE), die sich in bestimmten Promotorsequenzen befinden. Dies führt zur Dekondensation der Chromatinstruktur und somit zur Expression von Genen (86). Da Retinoide in der Lage sind, Differenzierung und Proliferation von Zellen zu beeinflussen, werden diese therapeutisch zur Behandlung von Neuroblastomen angewendet, da die Ausreifung zu einem Ganglioneurom mit dem Verlust der Malignität einhergehen würde. Seeger *et al.* führten die ersten *in vitro* Untersuchungen an Neuroblastomzellen durch und konnten eine Differenzierung und eine Proliferationshemmung der Zellen zeigen (87). Dabei verlängern N-Typ Zellen unter Differenzierung ihre Neuriten, wohingegen S-Typ Zellen Apoptose begehen (88).

Weitere Therapiemöglichkeiten

Eine weitere Therapiemöglichkeit, die zunehmend Anwendung findet, ist die Induktion von Apoptose in NB-Tumoren. Fenretinid, eine Substanz, die eher Apoptose induziert als Differenzierung, befindet sich momentan in den klinischen Studien. NB-Tumore weisen einen hohen Grad an Vaskularisierung auf. Daher werden zurzeit auch Inhibitoren für die Angiogenese getestet. Andere Formen von Therapien sind die Immuntherapie oder gezielte Radiotherapie.

1.6 Neuroblastomzelllinien

Die extrem hohe Heterogenität, die Tumoren aufweisen, ist auch in den Neuroblastomzellen zu finden. Man unterscheidet drei Typen von Zelllinien: neuroblastisch (N-Typ), flach oder substrat-adhärenz (S-Typ) sowie intermediär (I-Typ), ein Phänotyp mit Eigenschaften von N- und S-Typ. Biochemische und Immunhistochemische Studien zeigen, dass die N-Typ-Zellen aus sympathoadrenogenen Vorläufer der Neuralleiste und die S-Typ-Zellen von nicht-neuronalen Vorläuferzellen wie Schwannzellen, Melanozyten sowie glatte Muskelzellen der embryonalen Neuralleiste stammen. Weder N-Typ oder S-Typ Zellen exprimieren Marker,

die charakteristisch für ein spätes Entwicklungsstadium ist. Entsprechend sind Marker wie der trkA Rezeptor für reife Neuronen oder GFAP (*glial fibrillary acidic protein*) oder S100 β -Protein für nicht-neuronale, reife Zellen nicht vorhanden.

1.7 Ziele der vorliegenden Arbeit

Die Regulation der Genaktivität durch epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierung, Histonacetylierung und Histonmethylierung sind essentiell für die Entwicklung und Aufrechterhaltung eines vielzelligen Organismus. Polycombproteine sind wichtige epigenetische Regulatoren. Über die EZH2-vermittelte Trimethylierung von H3K27 sind die Polycombproteine in der Lage Gene über mehrere Zellteilungen hinweg stabil zu reprimieren (siehe Kapitel 1.4).

Genomweite Lokalisierungsstudien durch **chromatin immunopräzipitation** (ChIP) in murinen und humanen ES-Zellen zeigen, dass entwicklungspezifische Gene in ES-Zellen mit Polycomb-proteinen besetzt sind und die polycomb-vermittelte reprimierende Histonmodifikation H3K27me3 aufweisen [siehe Abbildung 3, (54;56)]. Ein Verlust der H3K27me3 Histonmodifikation führt zur Reexpression dieser Gene.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die epigenetische Regulation von entwicklungspezifischen Genen *in vitro* an Neuroblastomzelllinien LAN-1 (N-Typ), SH-SY5Y (N-Typ) und SH-EP (S-Typ) anhand von zwei epigenetisch wirksamen Pharmaka, Depsipeptid und DZNep, sowie einem bereits in der NB-Forschung eingesetzten Differenzierungsagens ATRA zu untersuchen.

Depsipeptid ist ein HDAC-Inhibitor, der eine starke inhibitorische Wirkung gegenüber Histondeacetylasen der Klasse 1 aufweist. Zu dieser Klasse gehören die Histondeacetylasen 1 und 2, welche an der polycomb vermittelten Genrepression beteiligt sind. Über die spezifische Hemmung von Histondeacetylasen aktivieren HDAC-Inhibitoren Gene, deren Produkte Zellzyklusarrest, Apoptose oder eine terminale Differenzierung in den entdifferenzierten Tumorzellen auslösen (89).

All-trans Retinsäure (ein Vitamin A-Derivat) gehört zur Familie der Retinoide. Aus *in vitro* Studien in NB-Zelllinien ist bekannt, dass ATRA über Aktivierung der Retinolsäurerezeptoren die Expression von Genen beeinflusst, welche eine Differenzierung oder Apoptose in den NB-Zelllinien induziert.

DZNep ist ein s-adenosylhomocystein-Inhibitor. Studien aus Mammakarzinom- und Kolonkarzinomzellen zeigen, dass DZNep in der Lage ist, die Histonmethyltransferase EZH2 und die assoziierte Histonmodifikation H3K27me3 zu hemmen.

Mittels molekularbiologischer und epigenetischer Methoden sollten dabei folgende Fragen geklärt werden:

- Wie sind entwicklungspezifische Gene auf Chromatin- und DNA Methylierungsebene in NB-Zellen reguliert?
- Wie beeinflussen Inhibitoren wie Depsipeptid, ATRA und DZNep die Expression dieser Gene sowie deren Regulation auf Chromatin- und DNA-Methylierungsebene
- Wie verändern sich Polycombproteine (EZH2), die die Regulation dieser Gene in embryonalen Stammzellen steuern unter Einfluss der drei Inhibitoren?

Zusätzlich zu diesem Ziel sollte die molekulare Wirksamkeit der drei Inhibitoren in NB-Zellen näher charakterisiert werden. Dabei wurde *in vitro* an bereits oben erwähnten NB-Zelllinien die Fähigkeit der Substanzen, das Wachstum der Tumorzellen zu hemmen, getestet. Mittels zellbiologischer und molekularbiologischer Methoden wurde dabei die Wirksamkeit jedes Inhibitors auf das Proliferationsverhalten, die Fähigkeit zur Auslösung morphologischer Differenzierung, der Apoptose und des Zellzyklusarrestes untersucht. Es sollte zudem festgestellt werden, ob die jeweiligen Substanzen in den drei untersuchten NB-Zelllinien den gleichen Wirkmechanismus zeigen.

2 Material und Methoden

Material

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Applichem	Darmstadt
Invitrogen	Karlsruhe
Merck	Darmstadt
Roth	Mannheim
Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Serva	Heidelberg
PAA	Linz, Österreich
BioRad	München

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße sowie Pipettenspitzen wurden von der Firma Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.3 Geräte

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Geräte und ihre Hersteller

Geräte	Modell	Firma
Blotting-Apparatur	Trans-Blot SD Semi-DryTransfer Cell	BioRad
Brutschrank	IR 1500 Automatic CO ₂ Incubator	Flow Laboratories
Durchflusszytometer	FACS Canto	Beckton Dickinson
Elektrophoresekammer	SUB-Cell GT	BioRad
Geldokumentationssystem	Fuji Film Intelligent Dark Box II densitometer LAS 3000	Fuji Film
Gefrierschränke	Premium NoFrost -20 °C	Liebherr
	GSL 3516 -80°C	Bosch
MPC	<i>magnetic particle concentrator</i>	Invitrogen
Lichtmikroskop	Axiovert 40	Zeiss
Magnet	Magnetic particle concentrator	Invitrogen
Pipettierhilfen	Reference	Eppendorf
	Accu-Jet	Brand
Photometer	Nanodrop ND-1000	PeqLab
	Spectra Thermo	SLT Lab instruments

Real-time PCR System	ABI Prism 7900HT Sequence Detection System	Applied Biosystems
Spannungsgerät	Power PAC 10000	BioRad
Schüttler	Thermomixer Comfort	Eppendorf
Sterile Werkbank	Dual Flow Control System	ICN Biomedicals
Thermocycler	Uno-Thermoblock	Biometra
Vortex	Vortex Genie	Scientific Industries
Ultraschallgerät	Bioruptor UCD-200	Diagenode
Waage	Explorer	Ohaus
Zentrifugen	Z200A	Hermle
	5415 C	Eppendorf
	Mini Spin	Eppendorf
	Universal 30 F	Hettich

2.4 Antikörper

Anti α -tubulin	Sigma Aldrich
Anti-Bmi1	Santa Cruz
Anti-EZH2	Invitrogen
Anti-SUZ12	Cell Signaling
Anti- JMJD3	Cell Signaling
Anti-Histone H3	Abcam
Anti-Trimethyl-Histone H3 (Lys 4)	Diagenode
Anti-Trimethyl-Histone H3 (Lys27)	Diagenode
Anti-Acetyl-Histone H3	Upstate
Anti-Acetyl-Histone H3 (Lys9)	Diagenode
Alexa 488 anti Caspase 3	Cell Signaling
HRP-Konjugiert Ziege-anti-Kaninchen	BioRad
HRP-Konjugiert Ziege-anti-Maus	BioRad
Anti-Kaninchen IgG	Santa Cruz

2.5 Kommerzielle Reagenziensysteme

<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Pierce
<i>EZ4U XTT Assay Kit</i>	Biomedica
<i>EZ DNA Methylation-Gold Kit</i>	Zymo Research
<i>GenomiPhi DNA Amplification Kit</i>	GE Healthcare

<i>PureLink Genomic DNA Kit</i>	Invitrogen
<i>rh Annexin V/FITC Kit</i>	Fa. Bender MedSystems
<i>SuperScriptTM III First-Strand Synthesis Kit</i>	Invitrogen
<i>SYBR GreenERTM qPCR SuperMix for ABI PRISM</i>	Invitrogen
<i>SYBR Green PCR Master Mix</i>	Applied Biosystems
<i>Supersignal West Femto Kit</i>	Pierce

2.6 Oligonukleotide

Alle für diese Arbeit verwendeten Oligonukleotide für Expressionsanalysen mittels *Realtime*-PCR wurden von der Firma Invitrogen bezogen. Die Sequenzen der Oligonukleotide wurden entweder der Literatur entnommen oder mit Hilfe des Programms Universal Probe Library der Firma Roche Applied Science entworfen.

Tabelle 3: Überblick über die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide und ihrer Amplifikatgröße für RT-PCR Analysen.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Amplifikatgröße
<i>EZH2 fwd</i>	ACGGGGATAGAGAATGTGGGTTTA	(90)
<i>EZH2 rev</i>	AGGTGGGCGGCTTTCTTTATCATC	
<i>HPRT fwd</i>	TGACCTTGATTTATTTTGCATACC	112
<i>HPRT rev</i>	CATCTCGAGCAAGACGTTCA	
<i>HOXB1 fwd</i>	GTTAAGAGAAACCCACCCAAGA	93
<i>HOXB1 rev</i>	CAGCTGCCTTGTGGTGAAG	
<i>MEIS 1 fwd</i>	TTCACACTGGCCTTAAAGAGG	97
<i>MEIS 1 rev</i>	CCGTAATGGGGTAGATCGTC	
<i>MEOX2 fwd</i>	GGAAAAGCGACAGCTCAGAC	107
<i>MEOX2 rev</i>	AAGTTCTCTGATTTGCTCTTTGGT	
<i>ONECUT1 fwd</i>	TCTCCACAGTCTCGGACAAGT	106
<i>ONECUT 1 rev</i>	GTGAAGCTACCGCTCACGTT	
<i>Otx1 rev</i>	ACCCATCCGTGGGCTATC	70
<i>Otx1 fwd</i>	TGTGAACGCGTGAAGGTG	
<i>PAX6 rev</i>	TTCAGAGCCCCATATTCGAG	89
<i>PAX6 fwd</i>	GAGCTGATTCACCTCCGCTGT	
<i>SOX6 fwd</i>	GGAGACAGGAGATGAGGCAGT	88
<i>SOX6 rev</i>	GCACCAGGATACACAACACCT	

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Amplifikatgröße
<i>Neurog1 fwd</i>	GCGGATGTCTCTTGGTCTGT	75
<i>Neurog1 rev</i>	AAGGAAAGGCCGTCTAGGG	
<i>Olig2 fwd</i>	AGCTCCTCAAATCGCATCC	70
<i>Olig2 rev</i>	ATAGTCGTCGCAGCTTTTCG	
<i>NKX2.2 fwd</i>	CGAGGGCCTTCAGTACTCC	72
<i>NKX2.2 rev</i>	GGGGACTTGGAGCTTGAGT	

Alle Oligonukleotide für die Analyse der Methylierung am Promotor wurden mit *MethPrimer* entworfen und von der Firma Invitrogen bezogen.

Tabelle 4: Überblick über die eingesetzten Oligonukleotide für Methylierungs-spezifische Analysen am Promotor mittels MS-PCR.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Amplifikatgröße
<i>Neurog1 fwd</i>	AATTTATGTTTCGCGGGAGGTC	118
<i>Neurog1 rev</i>	ACCAACTTAACCCGAACCGA	
<i>NKX2.2 fwd</i>	TTTTTATTTTGTTTTAGAGGGTCGT	134
<i>NKX2.2 rev</i>	AAAACGCAAAAATTAACCACGTA	
<i>Olig2 fwd</i>	TTTTTTTAAGAATTTTTTCGGTTACG	110
<i>Olig2 rev</i>	ACTAATATCATCCGAATAATTCCG	

Für die Chromatin-Immünpräzipitation verwendeten Oligonukleotide wurden mit dem Programm Primer3 Input entworfen und von der Firma Invitrogen bezogen.

Tabelle 5: Überblick über die eingesetzten Oligonukleotide für DNA-Analysen am Promotor mittels Chromatin-Immünpräzipitation.

Bezeichnung	Sequenz (5' - 3')	Amplifikatgröße
<i>Neurog1 fwd</i> (Promotor)	CCTCCCGCGAGCATAAAT	150
<i>Neurog1 rev</i> (Promotor)	GCCTCAGGACCCCTTAAGTA	
<i>NKX2.2 fwd</i> (Promotor)	TCCACTTGACTCCCAAGACC	130
<i>NKX2.2 rev</i> (Promotor)	TCCACTTGACTCCCAAGACC	
<i>Olig2 fwd</i> (Promotor)	ATTAGCCCGGACATCAGCTT	150
<i>Olig2 rev</i> (Promotor)	GCTCGGCCGGTTTTTATAG	

2.7 Software

Primer3 Input	http://frodo.wi.mit.edu/primer3/
MethPrimer	http://www.urogene.org/methprimer/index1.html
Universal Probe Library	http://www.roche-applied-science.com
Assay Design	http://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/ezhome.html
Image Gauge 4.0	Fujifilm ScienceLab
SDS Software	Applied Biosystems
FACS DIVA	Becton Dickinson

2.8 Datenbanken

ENSEMBL	http://www.ensembl.org/index.html
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Transcriptional regulatory element database	http://rulai.cshl.edu/cgibin/TRED/tred.cgi?process=home

Methoden

2.9 Zellkultur

2.9.1 Kultivierung von Neuroblastomzellen

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden drei verschiedene humane, adhärent wachsende Neuroblastom-Zelllinien verwendet. Es handelt sich dabei um die Zelllinien: LAN-1, SH-SY5Y, und SH-EP. Diese wurden freundlicherweise von Dr. Johannes Schulte der Pädiatrischen Onkologie der Universitätsklinik Essen zur Verfügung gestellt. Alle Zellkulturarbeiten mit Neuroblastomzellen fanden ausschließlich unter sterilen Bedingungen statt. Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in einem Inkubator bei 37 °C unter einer 5 % CO₂ Atmosphäre und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95%.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien und ihre Charakteristika sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 6: Charakteristika der untersuchten Neuroblastomzelllinien (91;92). Alle drei Zelllinien entstammen aus Knochenmarksmetastasen von NB-Patienten und weisen ein unterschiedliches tumorigenes Potential auf, was durch die Fähigkeit zur Bildung von Tumoren in Maus ausgedrückt wird. Die N-MYC Amplifikation trägt zu einem wesentlich aggressiveren Verhalten der NB-Zellen bei. +++ hohe Malignität; ++ mäßige Malignität, – keine Malignität.

Zelllinien	LAN-1	SH-SY5Y	SH-EP
Eigenschaften	ähneln neuronalen Vorläuferzellen des sympathoadrenalen Ursprungs		ähneln nicht neuronalen Vorläuferzellen glialen Ursprungs
	kleine, runde Zellen mit kleinen neuriten ähnlichen Fortsätzen		große, flache Zellen ohne Fortsätze
	N-Myc Amplifikation	Keine N-Myc Amplifikation	Keine N-Myc Amplifikation
Malignität	+++	++	-

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

Kulturmedium für die Zelllinien LAN-1 und SH-EP:

RPMI 1640- Medium		(PAA)
Glutamin	0,25 mM	(Fa. Seromed)
Streptomycin/Penicillin G	0,1 mg/ml	(Fa. Gibco)
FKS	10%	(Fa. Gibco)

Kulturmedium für die Zelllinie SH-SY5Y:

Quantum 263-Medium for tumour cells		(PAA)
Streptomycin/Penicillin G	0,1 mg/ml	
FKS		10%

PBS (1x) (ohne Ca²⁺-und Mg²⁺-Ionen) (Fa. Seromed)

Trypsin/EDTA-Lösung:	PAA
Trypsin	0,05%
EDTA	0,02%

In PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺-Ionen

Die Kultivierung von Neuroblastomzellen erfolgte in 75 cm² Gewebekulturflaschen. Um ein Überwachsen und folglich das Sterben der kultivierten Zellen zu verhindern, musste das Kulturmedium regelmäßig gewechselt und die Zellen regelmäßig verdünnt werden. Dabei wurde ein kleiner Teil der Zellen in eine neue Gewebekulturflasche mit frischem Medium überführt und so ein Überwachsen verhindert. Zur Überführung der Zellen in eine neue Gewebekulturflasche wurde aus einer Flasche mit konfluentem Zellrasen das verbrauchte Medium abgesaugt und die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin/EDTA-Lösung versetzt und für 3 Minuten bei 37°C im Brutschrank inkubiert, bis die Zellen vollständig vom Boden des Kulturgefäßes gelöst waren. Trypsin ist ein proteolytisches Enzym, das die Zell-Zell und Zell-Matrix-Verbindungen spaltet. Durch Zugabe eines Überschusses an Medium mit FKS wurde das Trypsin inaktiviert und die Zellen durch ständiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Die so vereinzelt Zellen wurden entweder für die in folgenden Kapiteln beschriebenen Versuche eingesetzt oder weiter kultiviert. Zur Weiterkultivierung wurde ein Fünftel der Zellsuspension in eine neue 75 cm² – Gewebekulturflasche überführt, mit 20 ml frischem Medium versetzt und bei 37 °C mit 5 %

CO₂ mit leicht aufgedrehtem Flaschendeckel bis zum Erreichen eines konfluenten Zellrasens inkubiert. Ein Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle 2-3 Tage. Alle verwendeten Zelllinien wurden regelmäßig auf eventuelle Kontamination von Mykoplasmen getestet.

2.9.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

Einfriermedium:

RPMI-Medium	PAA
Streptomycin/Penicillin G	0,1 mg/ml
FKS	10%
DMSO	10%

Für das Einfrieren wurden die Zellen wie unter Punkt 2.9.1 beschrieben trypsinisiert und das Trypsin mit einem Überschuss an Medium mit FKS inaktiviert. Diese Zellsuspension wurde bei 1500 U/min für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 2,5 ml Kulturmedium resuspendiert. 0,5 ml dieser Zellsuspension (ca. 5×10^6 Zellen) wurden mit 0,5 ml Einfriermedium vermischt und in einem Kryoröhrchen langsam mit einer Abkühlrate von 1°C bei -80°C eingefroren. Beim Einfrierprozess kommt es zur Bildung von Eiskristallen, welche zur irreversiblen Schädigung der Zellen führen kann. Um dies zu verhindern, wird dem sogenannten Einfriermedium 10% DMSO beigefügt. Für eine langfristige Konservierung wurden die Zellen in eine Polystyrolbox überführt und in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert.

Das Auftauen der Zellen erfolgte im Wasserbad bei 37°C. Die aufgetauten Zellen wurden zügig in einer mit 5 ml Kulturmedium beschichteten 25 cm² Kulturflasche in Suspension gebracht und bei 37°C mit 5% CO₂ zur weiteren Verwendung kultiviert.

2.9.3 Bestimmung der Zellzahl

Kova Glasstic Slide 10 mit Raster	Stratagene
Trypan blue	Sigma

Zur Zellzahlbestimmung der lebenden Zellen wurden 100 µl einer Zellsuspension mit 2 µl Trypanblau versetzt. Der Farbstoff Trypanblau färbt tote Zellen an, indem es durch defekte Zellmembranen in das Cytoplasma gelangt. Die Plasmamembran vitaler Zellen dagegen ist impermeabel für diesen Farbstoff. Somit ist eine Unterscheidung im Lichtmikroskop möglich.

8 µl der angefärbten Zellsuspension wurden in einen Plastik-Objektträger (Kova Glasstic Slide 10) mit standardisierten Zählkammern gefüllt und die Zellzahl mehrerer Kleinstquadrate unter dem Lichtmikroskop gezählt. Der Mittelwert der Zählung aus den Kleinstquadraten wurde mit dem Kammerfaktor 90 multipliziert. Diese Zahl ergab die Zellzahl pro 1 µl (= 1mm³) Zellsuspension. Um die Zellzahl pro ml Zellsuspension zu erhalten, wurde anschließend mit dem Faktor 1000 multipliziert.

2.9.4 Bestimmung der Zellvitalität mittels des XTT-Tests

Der nachfolgend beschriebene XTT-Test (EZ4U[®], Biozol) diente dazu, die Vitalität von Neuroblastom-Zelllinien in einer Kultur nach Behandlung mit ATRA, Depsipeptid und Deazaneplanocin A zu bestimmen.

Das Prinzip dieses Tests basiert auf der Fähigkeit der stoffwechselaktiven Zellen das Molekül XTT (2,3-bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxid) durch die Aktivität ihrer mitochondrialen Dehydrogenasen zu einem wasserlöslichen Formazanderivat zu reduzieren. Diese Reaktion geht mit einem Farbumschlag von gelb nach dunkelorange einher, der sich dabei direkt proportional zur Anzahl stoffwechselaktiver Zellen verhält. Die Absorption des gebildeten Formazans wird im Photometer gemessen.

Zur Bestimmung der Zellvitalität wurden die entsprechenden Zellen nach Trypsinierung je nach Proliferationsgeschwindigkeit und Größe in einer Zelldichte von $1 \times 10^3 - 4 \times 10^4$ /100 µl Medium (siehe Tabelle 7) in 96-well-Platten ausgesät und bis zum Erreichen einer Konfluenz von 30% im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert.

Tabelle 7: Eingesetzte Zellzahl für den Zellvitalitätsversuch

Zelllinie	Zellzahl/100µl
LAN-1	3,5 x 10 ⁴ Zellen
SY5Y	2,2 x 10 ⁴ Zellen
SH-EP	6,6 x 10 ³ Zellen

Anschließend wurde das alte Medium abgesaugt und 200 µl der in Medium verdünnten Inhibitor-Lösungen auf die Zellen gegeben. Die eingesetzten Konzentrationen für die jeweiligen Inhibitoren sind der Tabelle 8 zu entnehmen:

Tabelle 8: Eingesetzte Konzentrationen für die jeweiligen Inhibitoren für den Zellvitalitätsversuch

Substanz	Eingesetzter Konzentrationsbereich
ATRA	25 μ M (93)
Depsipeptid	1, 5 nM
Deazaneplanocin A	5 μ M (94)

Die Bestimmung der Zellvitalität erfolgte nach 24, 48 und 72 Stunden. Hierzu wurden in jedes *Well* zu dem bereits vorhandenen Nährmedium 20 μ l der XTT-Farbstofflösung pipettiert. Als Leerwert diente Medium mit 20 μ l Farbstofflösung ohne Zellen. Nach einer Inkubation von 2 h im Brutschrank bei 37°C wurde die Menge des gebildeten Formazans photometrisch im ELISA Reader bei 450 nm gemessen. Für jeden Versuchsansatz wurden sechsfach Bestimmungen durchgeführt. Für die Auswertung wurde nach Abzug der Absorption des Leerwertes von jeder Probe der Mittelwert ermittelt.

2.10 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von DNA-Molekülen unterschiedlicher Größen im elektrischen Feld.

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

5x TBE-Puffer (pH 8.0)	54g Tris-Base 27, 5 g Borsäure 20 ml 0, 5 M EDTA auf 1000 ml H ₂ O
Ethidiumbromid-Stammlösung	10 mg/ml
5x Gelladepuffer	Fermentas
1 Kb plus <i>DNA Ladder</i>	Fermentas
RNase freies Wasser	Invitrogen

Je nach Größe der zu bearbeitenden DNA wurden 1-2% Agarosegele gegossen. Die entsprechende Menge an Agarose wurde eingewogen, in 1 x TBE-Puffer aufgenommen und in einem Mikrowellenherd gekocht, bis die Bestandteile gelöst waren. Durch ständiges Rühren unter fließendem Wasser wurde die Lösung abgekühlt und danach mit Ethidiumbromid (10 μ g/ml) versetzt. Anschließend wurde das Gel in einem mit Kamm bestückten vertikalen Flachbettgelträger gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde der

Gelträger in die Elektrophoresekammer gelegt, der Kamm entfernt und das Gel mit 1 x TBE-Puffer überschichtet. Jeweils 10 µl der Proben wurden mit 2 µl Gelladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Außerdem wurden separat 10 µl des 1 Kb Längenstandards aufgetragen, um die Größe der eingesetzten DNA abschätzen zu können. Die Kammer wurde geschlossen und eine Spannung von 80 V angelegt. Nach 1-2 h wurde das Gel unter UV-Licht fotografiert.

2.11 RNA-Isolierung

Die Isolierung von Gesamt RNA aus behandelten und nicht behandelten Zellen erfolgte mit Hilfe des *Micro to Midi Kits* von Invitrogen.

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

RNase freies Wasser

Wasch Puffer I

Wasch-Puffer II

RNA Lysis Puffer

RNA *Spin Cartridges*

Für die Isolierung der RNA wurde das Medium vollständig aus der Flasche entfernt und die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung wie unter Punkt 2.9.1 beschrieben behandelt. Es folgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 300 x g. Anschließend wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet zweimal mit PBS gewaschen und bei -80 °C eingefroren.

Am Tag der Isolierung wurden die eingefrorenen Zellpellets in 200 µl RNA Lysis Puffer und β-Mercaptoethanol resuspendiert bis das Zellpellet vollständig lysiert war. Zu der Suspension wurde 1 Volumen 70 % ige Ethanol gegeben und gut gemischt. Alkohol fördert die selektive Bindung der RNA an die Membran der RNA Spin Säule. 700 µl der Lösung wurden auf eine RNA Spin Säule gegeben und für 15 Sekunden bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule zum Waschen mit 700 µl Wasch Puffer I beladen und bei 12.000 x g für 15 Sekunden zentrifugiert. Es folgten zwei Waschschrte mit 500 µl Wasch-Puffer II mit jeweiliger Zentrifugation bei 12.000 x g für 15 Sekunden. Anschließend wurde die RNA Spin Säule in ein neues 2 ml Sammelgefäß überführt und zur Entfernung des restlichen Puffers bei 12.000 x g für 1 Minute trocken zentrifugiert. Für die Elution der RNA von der Säule wurde die Säule in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Auf die Mitte der Säule wurden 15 µl RNase freies Wasser gegeben und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einer Zentrifugation bei 12.000 x g für 1 Minute wurden erneut 15 µl RNase

freies Wasser auf die Säule gegeben, 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und zentrifugiert. Die so isolierte RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

2.12 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration der RNA-Proben wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm im Nanodrop ND-1000 bestimmt. Hierfür wurden 2 µl der eluierten RNA-Lösung verwendet. Als Referenzwert diente RNase freies Wasser.

Die Reinheit einer RNA-Probe lässt sich durch Bestimmung des Verhältnisses der Absorption bei 260 und 280 nm bestimmen. Im Idealfall einer reinen RNA-Lösung beträgt das Verhältnis 2,0. Bei einer etwaigen Verunreinigung der RNA-Proben mit Proteinen, ist der OD_{260}/OD_{230} -Wert deutlich kleiner. Für die vorliegenden Untersuchungen wurden RNA-Proben mit einer Ratio OD_{260}/OD_{230} von 1,9 - 2,0 verwendet. Nach der Konzentration- und Reinheitsbestimmung wurde die RNA aliquotiert und bis zum weiteren Gebrauch bei - 80°C aufbewahrt.

2.13 RT-PCR (Reverse Transkription - Umschreiben in cDNA)

Die Reverse Transkription der RNA in cDNA erfolgte mit Hilfe des *SuperScript III First-Strand Synthesis Kit for qRT-PCR* von Invitrogen.

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

2 x RT Reaktionsmix

RT Enzymmix

RNase freies Wasser

Für die cDNA Synthese wurden 1500 ng der Gesamt-RNA in einem Reaktionsansatz von 20 µl verwendet. Der Reaktionsansatz ist in der folgenden Tabelle dargestellt:

Tabelle 9: Reaktionsansatz für die cDNA-Umschreibung (20 µl Gesamtvolumen)

Komponente	Mengenangabe
2x RT Reaktionsmix	10 µl
RT Enzym Mix	2 µl
RNA	1500 ng
RNase freies Wasser	auf 20 µl auffüllen
Endvolumen	20 µl

Die Reaktionsansätze wurden zunächst für 10 Minuten bei 25 °C inkubiert. Im Anschluss fand die Synthese der cDNA aus RNA für 30 Minuten bei 50 °C statt. Dabei entstanden cDNA-RNA-Hybride in einem Verhältnis von 1:1. Es folgte eine Inkubation zur Inaktivierung der Reversen Transkriptase bei 85°C für 5 Minuten. Durch Zugabe von 1 µl *Escherichia coli* RNase H und einer nachfolgenden Inkubation bei 37°C für 20 Minuten wurden die RNA-*Templates* abgebaut. Anschließend wurde die cDNA aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

2.13.1 Realtime-PCR

Die *Realtime*-PCR wurde mit dem SYBR GreenER™ *qPCR SuperMix for ABI PRISM* von Invitrogen am ABI PRISM 7900 *Detection System* von Applied Biosystems durchgeführt. Hierbei wird die Interkalation von SYBR Green in die ds-DNA mittels Fluoreszenzmessung detektiert. Die Zunahme der SYBR Green Fluoreszenz ist proportional zur Menge neusynthetisierter DNA-Moleküle. Für die *Realtime*-PCR verwendeten Primer sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

SYBR GreenER™ <i>qPCR SuperMix for ABI PRISM</i>	Invitrogen
Primer	
RNase freies Wasser	Invitrogen

Ein Reaktionsansatz wurde wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 10: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für eine *Realtime*-PCR.

Komponente	Mengenangabe
<i>QPCR Syber Mix</i>	5 µl
<i>Forward Primer</i> (10 pmol/ µl)	0,5 µl
<i>Reverse Primer</i> (10 pmol/ µl)	0,5 µl
cDNA (30 ng/ µl)	1 µl
RNase freies Wasser	3 µl
Σ	10 µl

Für jede Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung. Je 3,30 µl der cDNA wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt. Zu der vorgelegten cDNA-Probe wurden 29,7 µl des vorab zusammengesetzten Mastermixes (siehe Tabelle 10) gegeben und gut durchmischt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die Ansätze mit jeweils dreimal 10 µl pro Vertiefung in

eine 384 well-Platte pipettiert. Die Platte wurde für 2 Minuten bei 500 x g zentrifugiert und die Messung erfolgte anschließend im ABI PRISM 7900 *Detection System* von Applied Biosystems. Die PCR erfolgte nach dem in Tabelle 11 aufgeführten PCR-Programm.

Tabelle 11: *Realtime-PCR-Temperaturprofil*

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
UDG-Aktivierung	50 °C	2 min	1x
Denaturierung	95 °C	10 min	1x
Denaturierung	95 °C	15 s	40x
Anlagerung/ „Annealing“	55-65 °C	1 min	
Schmelkurvenanalyse	95 °C	15 s	1x
	60 °C	15 s	1x
	95 °C	15 s	1x

Die Inkubation für zwei Minuten bei 50 °C diente zur Aktivierung von Uracil-DNA Glycosylase. Dieses Enzym entfernt Uracilreste von RNA/DNA-Strängen, die aus früheren Reaktionen in den neuen Reaktionsansatz verschleppt worden sein könnten. Am Ende jeder PCR wurde zusätzlich eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, um die Spezifität der PCR-Produkte zu überprüfen. Mittels schrittweisem Temperaturanstieg kommt es zu einer langsamen Denaturierung der DNA-Stränge entsprechend ihrer Schmelzpunkte. Die daraus resultierende Fluoreszenzabnahme wird aufgezeichnet. Aufgrund der Schmelztemperaturen kann man feststellen, ob neben den spezifischen auch unspezifische Produkte oder Primer-Dimere entstanden sind, da Primerdimere beispielsweise bei einer geringeren Schmelztemperatur schmelzen als die spezifischen Produkte. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms ABI Prism 7900 SDS Software (Applied Biosystems). Für jede Probe wurde mit Hilfe des Programms ein Ct-Wert ermittelt. Der Ct-Wert (*Cycle threshold*) gibt die Zykluszahl an, bei der erstmals einen Anstieg des Fluoreszenz-Signals über das Hintergrundrauschen gemessen wird. Ein kleiner Ct-Wert deutet auf eine hohe cDNA-Menge und ein großer Ct-Wert auf eine geringe cDNA Menge in der Probe hin.

Die Auswertung erfolgte mit der $\Delta\Delta\text{Ct}$ Formel:

1. Hierbei wird zunächst die Expression eines Zielgens auf die Expression eines nicht regulierten, konstant exprimierten Referenzgens (*Housekeeping-Gen*) bezogen: Als *Housekeeping-Gen* wurde hier HPRT verwendet.

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} \text{ minus } \text{Ct}_{\text{Referenzgen}}$$

2. Anschließend werden die Ergebnisse der behandelten Zellen auf die Ergebnisse der unbehandelten Kontrollzellen relativiert:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Behandlung}} \text{ minus } \Delta Ct_{\text{Kontrolle}}$$

3. Die Änderung der Expression errechnete sich aus

$$X = 2^{\Delta\Delta Ct}$$

2.14 Herstellung von Proteinextrakten aus Zellen

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

RIPA-Puffer (pH 7.4)	50 mM Tris-HCl
	150 mM NaCl
	1% Triton X-100
	0,5% NaDeoxycholat
	0,1% SDS

Complete EDTA Free: *Protease Inhibitor Cocktail* Tabletten (Roche)

Für die Herstellung von Proteinextrakten wurden die bei -80 °C eingefrorenen Zellpellets jeweils in 200-500 µl RIPA-Puffer, supplementiert mit einer Tablette Complete EDTA free Protease Inhibitor Cocktail, aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend für 20 Minuten auf Eis lysiert. Es folgte eine Ultraschallbehandlung mit dem Bioruptor (Diagenode) für 30 Sekunden bei 4 °C auf höchster Stufe, um die Zellkerne aufzuschließen und die Histone in Lösung zu bringen. Nach der Ultraschallbehandlung wurden die verbleibenden Zellreste für 10 Minuten bei 4 °C und 25.000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand mit den Proteinen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Proteinextraktion schloss sich direkt die Proteinbestimmung an.

2.14.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels

Bicinchoninsäure Assay (BCA)-Assay

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des BCA Protein Assay Kits von Pierce.

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

BCA Puffer A

BCA Puffer B

Albumin Standard (2 mg/ml)

PBS

RIPA-Puffer (pH 7.4)	50 mM Tris-HCl
	150 mM NaCl
	1% Triton X-100
	0,5% NaDeoxycholat
	0,1% SDS

Die BCA-Methode beruht auf der Reduktion von Cu^{2+} - zu Cu^{+} -Ionen durch Proteine in alkalischem Milieu. Die Bicinchoninsäure reagiert mit den entstehenden Cu^{+} -Ionen zu einem purpurfarbenen Farbkomplex. Das Absorptionsmaximum dieses Farbkomplexes liegt bei 562 nm und kann somit photometrisch erfasst werden. Die Absorption ist in einem Bereich von 20 $\mu\text{g/ml}$ – 2000 $\mu\text{g/ml}$ linear. Der Vorteil dieser Methode liegt in der geringen Störanfälligkeit gegenüber verschiedenen Detergenzien.

Zur Konzentrationsbestimmung der Proteinproben wurde zunächst eine Eichkurve von 2000 $\mu\text{g/ml}$ – 25 $\mu\text{g/ml}$ mit BSA in PBS erstellt. Die zu bestimmenden Proben wurden 1:10 mit PBS verdünnt. Als Referenz diente RIPA-Puffer ohne Proteinprobe. Je 10 μl Probe, Puffer und Standard mit 200 μl BCA-Reagenz versetzt und für 30 Minuten bei 37 °C in einem Inkubator inkubiert. Nach dem Abkühlen der Proben auf Raumtemperatur wurde die Absorption bei 562 nm in einem Spektrometer (Spectra Thermo von SLT Lab instruments) gemessen und die Konzentration der unbekanntenen Proteinproben anhand der Eichkurve errechnet.

2.14.2 SDS-PAGE

(Sodiumdodecylsulfat-Polyacryamidgelelektrophorese)

SDS- PAGE ist ein Verfahren, das zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht eingesetzt wird. Die Proteine werden dabei durch Anlegen einer Spannung in einem Trägermaterial aufgetrennt. Diese Trennung ist deshalb möglich, da die Eigenladung des zu untersuchenden Proteins, die die Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld mitbestimmen würde, durch einen Überschuss des anionischen Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) überlagert ist, so dass alle Proteine unabhängig von ihrer Aminosäurezusammensetzung in etwa gleich negativ geladen vorliegen. Als Trägermaterial für Proteine dient in den meisten Fällen das Polyacrylamid, welches durch eine Copolymerisation aus Acrylamid und N, N'-Methylenbisacrylamid entsteht. Um die Polymerisation einzuleiten, ist die Zugabe von Ammoniumpersulfat entscheidend, welches

bei Spaltung mit N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) freie Radikale liefert. Acrylamid ist für die Länge der Polyacrylamid-Kette und Bisacrylamid für den Vernetzungsgrad verantwortlich. Die Porengröße des Gels wird von der Polyacrylamid-Konzentration und deren Vernetzungsgrad bestimmt. Je geringer die Konzentration an Polyacrylamid ist, desto enger sind die Poren.

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

SDS Probenpuffer (Lämmli Puffer) 5x	0,5 M Tris pH 6,8 10 % SDS 25 % Glycerol 0,025 % Bromphenolblau 10 % Mercaptoethanol
Laufpuffer 10x	240 mM Tris, 1900 mM Glycin 1% SDS

Um die Porengröße des Trenngels der jeweils zu analysierenden Proteinprobe anzupassen, wurden für die vorliegenden Untersuchungen zwei unterschiedlich konzentrierte Trenngele gegossen. Für Proteine mit einem Molekulargewicht von 10 – 60 kDa wurden 16% ige und für Proteine mit einem Molekulargewicht von 30 – 120 kDa 10% ige Trenngele verwendet. Die Porengröße des Sammelgels lag bei 5%. Das Trenngel wurde wie in Tabelle 12 aufgeführt zusammen pipettiert und zwischen zwei Glasplatten, die in einer Gelapparatur eingespannt war, eingefüllt.

Dabei wurde darauf geachtet, dass APS und TEMED erst unmittelbar vor dem Gießen des Gels hinzugefügt wurden, um eine vorzeitige Polymerisation des Gels zu verhindern.

Tabelle 12: Zusammensetzung der Trenngele (10 und 16%) sowie des Sammelgels (5%).

Komponente	Trenngel		Sammelgel 5%
	10%	16%	
Dest H ₂ O	2,85 ml	1,45 ml	3,13 ml
30% Acrylamid	2,33 ml	3,73 ml	0,625 ml
Separationpuffer (1,5 M Tris, pH 8,8)	1,75 ml	1,75 ml	1,25 ml
20 % SDS	35 µl	35 µl	50 µl
10 % APS	35 µl	35 µl	25 µl
TEMED	3,5 µl	3,5 µl	5 µl
Endvolumen	5 ml	5 ml	5ml

Um einen perfekten Luftabschluss und die Bildung einer glatten Randzone zu gewährleisten, wurde das Gel mit Isopropanol überschichtet. Nach einer Polymerisationszeit von 20 Minuten wurde das Isopropanol entfernt und die Oberfläche des Trenngels mit dest. H₂O gespült. Anschließend wurde die Sammelgellösung in die Gelkammer auf das Trenngel gegeben und der Kamm für die Proben eingesetzt. Die Polymerisationszeit für das Sammelgel betrug 20 Minuten. Nach erfolgter Polymerisation wurde der Kamm aus dem Gel gezogen, das Gel in den Glasplatten in die Elektrophorese-Kammer eingespannt und mit 1 x SDS-Elektrophoresepuffer versehen.

Für die Auftrennung wurden jeweils 10 bzw. 30 µg Gesamtprotein jeder Probe mit 5-fach konzentriertem Lämmli-puffer versetzt. und für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Die Proben wurden im Anschluss direkt aufs Eis gestellt, um eine Renaturierung der Proteine zu verhindern. In die Geltaschen wurden anschließend 10 µl der Protein-Proben aufgetragen. Zusätzlich zu den Proteinproben wurden ein Molekulargewichtsmarker zur Identifikation sowie zur Bestimmung der Proteingrößen und eine Negativkontrolle, die aus dest. H₂O und Lämmli-puffer bestand, in die Taschen des Gels pipettiert.

Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für 1 Stunde und 10 Minuten. Bei der Auftrennung von Histonen betrug die Laufzeit 2 Stunden.

2.14.3 Proteintransfer durch Westernblot

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

Transferpuffer 10x (pH 8.8)	120 mM Tris 960 mM Glycin
Transferpuffer 1x	1 % 10x Transferpuffer 2 % Methanol (100 %)

Nach Beendigung der SDS-Elektrophorese wurde das Gel vorsichtig aus den Glasplatten gelöst und das Sammelgel entfernt. Der Proteintransfer erfolgte *semi-dry* im *Sandwich*-Verfahren. Zwischen jeweils drei mit 1x Transferpuffer benetzten *Whatmann*-Papieren wurde das Gel luftblasenfrei auf eine mit 1x Transferpuffer benetzte Nitrocellulose Membran gelegt. Für Proteine mit einem hohen Molekulargewicht ab 30 kDa wurde eine Membran mit 0,45 µm und kleinere Proteine bis zu 30 kDa eine Membran mit 0,2 µm verwendet. Der Transfer erfolgte für 45 Minuten bei einer mittleren Stromstärke von 1,5 mA/cm².

2.14.4 Ponceau-Färbung

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

Ponceau-S-Lösung Sigma

Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung der Gele und der Transfereffizienz wurde die Membran nach dem Transfer mit Ponceau angefärbt.

Hierzu wurde die NC-Membran 1 Minute lang mit Ponceau-S-Lösung inkubiert. Dann wurde die Membran mit dest. H₂O solange entfärbt, bis der überschüssige Farbstoff entfernt war und nur noch die Proteinbanden sichtbar wurden.

2.14.5 Detektion mit spezifischen Antikörpern

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

TBS 10x	Tris HCL	50 mM Tris
	NaCl	150 mM

TBST	1x TBS mit 0,025 % Tween
	5 % Magermilchpulver

Probenpuffer	TBST mit 1 % Magermilchpulver
--------------	-------------------------------

Um freie Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren, wurde die Membran nach dem Transfer für 30 Minuten in 5% Magermilchpulver/TBST Lösung behandelt. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper in einer Endkonzentration von 1 µg/ml über Nacht bei 4°C. Die Antikörper wurden jeweils in 1% Milchpulver/TBST-Lösung angesetzt. Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind im Kapitel 2.4 aufgelistet. Die Membran wurde anschließend viermal für je 5 Minuten mit TBST gewaschen, wonach ein Peroxidase gekoppelter Sekundärantikörper, 1:10 000 verdünnt in Probenpuffer, für 1 Stunde hinzugegeben wurde. Die Membran wurde anschließend sechsmal für 5 Minuten mit 1 x TBS gewaschen. Die Visualisierung der Banden erfolgte über eine Chemilumineszenzreaktion mit *ECL Western Blotting Detection Reagents* (Thermo Scientific) nach Angaben des Herstellers. Die Exposition der Membran erfolgte für je nach Intensität einige Sekunden bis zu einigen Minuten. Die Chemilumineszenz wurde durch ein elektronisches Dokumentationssystem (Fuji Film Intelligent Dark Box II) dokumentiert. Verglichen wurde die Bandenintensität der behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen auf demselben Gel.

2.15 Chromatin-Immunpräzipitation

Die Chromatin-Immunpräzipitation ist eine Methode zur Identifikation von Proteinen, die mit bestimmten DNA-Abschnitten im Genom assoziiert sind. Dies erfolgt mit Hilfe eines Antikörpers, der bestimmte Proteine bzw. Modifikationen von Proteinen erkennt. Der erste Schritt ist die Vernetzung von DNA und Proteinen durch eine Formaldehyd-Behandlung. Nach erfolgreicher Vernetzung werden die Zellen lysiert und mit Ultraschall behandelt, um die DNA zu fragmentieren. Es folgt eine Immunpräzipitation der DNA-Protein-Fragmente mit den entsprechenden Antikörpern. Nach Rücknahme der Vernetzung und dem Verdau der Proteine werden anschließend die DNA Fragmente aufgereinigt und mittels PCR analysiert.

2.15.1 *Crosslinking*

Quervernetzung der DNA mit den assoziierten Proteinen

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

Formaldehyd-Lösung 2%

Glycin 1,375 M

SDS-Lysis-Puffer (pH 8.1)	0,1 %SDS
	10 mM EDTA
	50 mM Tris

Für die Chromatin-Immunpräzipitation wurden die Zellen vom Boden der Flasche mit Trypsin gelöst (siehe Kapitel 2.9.1) und einmal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet in 5 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. 4×10^6 Zellen wurden entnommen und bei RT für 3 Minuten und 400 x g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 500 µl PBS aufgenommen. Zur kovalenten Vernetzung der DNA mit Proteinen (*Crosslinking*) wurde Formaldehyd in einer Endkonzentration von 1% auf die Zellen gegeben und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach 10 Minuten wurde die Vernetzungsreaktion durch Zugabe von 100 µl Glycin (1,375M) gestoppt. Die Suspension wurde bei 37 °C für weitere 5 Minuten geschüttelt. Anschließend wurde die Zellsuspension zentrifugiert und das Zellpellet mit 1 ml PBS gewaschen. Es folgte eine weitere Zentrifugation. Nach einem erneuten Waschschrift mit PBS wurden die Zellen in 200 µl SDS-Lysis-Puffer aufgenommen, gut resuspendiert und für 10 Minuten auf Eis lysiert.

2.15.2 Aufarbeitung des Zellysats für die Immunpräzipitation

Um das Chromatin in 200-500 bp große Stücke zu fragmentieren, wurde das Lysat für 40 Minuten in einem Intervall von 30 Sekunden „An/Aus“ im Eiswasser mit dem Bioruptor (Diagnode) beschallt. Dabei wurde alle 5 Minuten das Eiswasser gewechselt, damit keine Temperaturbelastung für die Probe entsteht. Nach der Beschallung wurde das Lysat 10 Minuten bei 4°C und 10.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die DNA-Konzentration mittels eines Nanodrops bestimmt. Als Leerwert diente SDS-Lysis-Puffer. Zur Überprüfung der korrekten Fragmentlänge wurde ein Teil des Lysates direkt der *Reverse Crosslinking* (s. Kapitel 2.15.5) unterzogen. Anschließend wurde mit den Proben wie unter Kapitel beschrieben eine Gelelektrophorese durchgeführt. Nach Überprüfung der korrekten Fragmentlänge wurde ein 1 µg DNA als *Input* bis zur *Reverse Crosslinking* bei -80 °C aufbewahrt. Mit dem Rest der DNA wurde wie folgt verfahren.

2.15.3 Vorinkubation der Dynabeads mit dem Antikörper

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

<i>Dynabead</i> Protein A	Invitrogen
ChIP-Dilution-Puffer (pH 8.1)	0,01 % SDS
	1,1 % Triton X-100
	1,2 mM EDTA
	16,7 mM Tris-HCL
	167 mM NaCL

Vor dem Einsatz in die Immunpräzipitation wurden die mit Protein A beschichteten *Dynabeads* wie folgt behandelt. 10 µl *Dynabeads* pro Probe wurden zum Waschen mit 500 µl ChIP-Dilution-Puffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gemischt. Das *Dynabeads* enthaltene Reaktionsgefäß wurde anschließend in den MPC (*magnetic particle concentrator*) gesetzt. Durch den darin befindlichen Magneten wurden die *Dynabeads* angezogen und an der Wand des Gefäßes festgehalten. Die überstehende Flüssigkeit wurde mit einer Pipette vorsichtig abgenommen. Anschließend wurden die *Dynabeads* in 50 µl Chip-Dilution-Puffer resuspendiert. 1 µg von dem spezifischen Antikörper oder ein Negativkontroll-Antikörper (Kaninchen IgG ohne Spezifität) wurden hinzugegeben und für 1 Stunde bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die *Dynabead*-Antikörper-Komplexe mit 500 µl Chip Dilution Buffer wie bereits im oberen Abschnitt beschrieben gewaschen. Der

Dynabead-Antikörper Komplex wurde anschließend in 10 μ l ChIP-Dilution-Puffer aufgenommen.

2.15.4 Immunpräzipitation der Proben

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

ChIP-Dilution-Puffer	siehe Kapitel 2.15.3
<i>Protease Inhibitor Cocktail</i> Tabletten (Roche)	
<i>Salmon Sperm DNA</i>	Stratagene
IP-Wasch-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA 0,01 % Tween
Dynaelute-Elution-Puffer (pH 7,5)	20 mM Tris 5 mM EDTA 50 mM NaCl 1 % SDS

Für die Immunpräzipitation wurde ein Reaktionsansatz hergestellt, der alle in Tabelle 13 aufgeführten Komponenten enthielt.

Tabelle 13: Zusammensetzung eines Reaktionsansatzes für die Immunpräzipitation

Komponenten	Mengenangabe
Antikörper/Bead Komplex	10 μ l
25x Complete	8 μ l
Salmon Sperm DNA	2 μ l = 2 μ g
DNA	10 μ g
ChIP-Dilution-Puffer	ad 200 μ l

Pro Ansatz wurden 10 μ g DNA der behandelten oder unbehandelten Zellen eingesetzt und mit dem Antikörper/Bead Komplex versetzt. Der Ansatz wurde über Nacht auf einem Schüttler bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Antikörper/Protein Komplex enthaltene Reaktionsgefäß in den MPC gesetzt und der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Es folgten drei Waschschrte mit 500 μ l IP-Wasch-Puffer. Zum Waschen wurde der Komplex mit 500 μ l IP-Wasch-Puffer versetzt und bei RT für 10 Minuten auf einem Schüttler inkubiert und wieder über den MPC getrennt. Beim letzten Waschschrte wurde der Antikörper/Protein-Komplex in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, was die

Hintergrundreaktion reduziert. Für die Elution wurden 110 µl Dynaelute-Elution-Puffer zu Antikörper/Protein-Komplex gegeben und gemischt. Es folgte eine Inkubation für 1 Stunde bei RT auf einem Schüttler, bei der sich die Bindungen zwischen dem Protein A, dem Antikörper und dem Protein/DNA Komplex wieder lösen. Nach der Inkubation wurde das Antikörper/DNA enthaltene Gefäß in den MPC gesetzt und der Überstand ca. 100 µl vorsichtig in ein neues 0,2 ml Reaktionsgefäß überführt.

2.15.5 **Reverse Crosslinking (Rücknahme der Quervernetzung)**

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

5 M NaCl-Lösung

Proteinase K

Für die nachfolgende DNA-Analyse muss die Vernetzung des Protein/DNA Komplexes mithilfe eines Enzymes und unter Hochsalzbedingung wieder rückgängig gemacht werden.

Je 5 µl Proteinase K und 10 µl 5 M NaCl wurden zur 100 µl Probe bzw. Input-DNA gegeben und für 2 Stunden bei 55 °C zum Verdau der Proteine, für 6 Stunden bei 65 °C zur Rücknahme der Quervernetzung und für 2 Stunden bei 75 °C für die Inaktivierung der Proteinase K in einem Thermocycler inkubiert.

2.15.6 **DNA-Extraktion**

Extraktion der DNA, die mit immunpräzipitierten Proteinen assoziiert ist

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

Ethanol (100%)

Präzipitation-Puffer	100 % Ethanol
	7,5 M Ammoniumacetat
	1 % Glycogen

TE-Puffer (pH 8,0)	10 mM Tris-HCl
	1 mM EDTA

Zur Extraktion der DNA wurden die Proben einer Ethanol-Fällung unterzogen. Hierfür wurden die Proben mit 1 ml Präzipitation-Puffer versetzt und gut gemischt. Die Fällung wurde bei -80 °C für 1 Stunde durchgeführt. Nach der Fällung wurden die Ansätze für 3 Minuten bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum Waschen wurden 500 µl eiskaltes Ethanol (100 %) auf die Präzipitate gegeben und die Proben für 3 Minuten bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Das Ethanol

wurde anschließend vorsichtig abgenommen und das Pellet für 30 bis 45 Minuten an der Luft getrocknet. Zum Lösen der DNA wurden die Pellets mit 50 µl TE-Puffer versetzt und gut gemischt. Die so aufgereinigte DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20° C gelagert. Um zu analysieren, ob die isolierte DNA die gesuchten Promotorbereiche enthielten, wurde eine *Realtime*-PCR wie unter Kapitel 2.13.1 beschrieben durchgeführt. Dabei betrug die eingesetzte DNA 1/10 des Reaktionsansatzes. Die für die PCR verwendeten Primer sind der Tabelle 5 zu entnehmen.

2.16 Durchflusszytometrie

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Untersuchungen zur Apoptose (Annexin/PI und Caspase 3) sowie die Experimente zum Zellzyklus wurden mit Hilfe der Technik der Durchflusszytometrie durchgeführt. Anhand dieser Methode können Einzelzellen nach ihrer Größe, Granularität sowie weiterer Fluoreszenzeigenschaften charakterisiert werden. Für die Analyse werden die Zellen einer Zellsuspension mittels Druckluft angesaugt und an einem Laserstrahl vorbeigeleitet. Das auftreffende monochrome Licht der Wellenlänge 488 nm wird von den einzelnen Zellen je nach ihrer Größe, der Struktur ihrer Zellmembran sowie der Art ihrer intrazellulären Bestandteile in unterschiedliche Richtungen gestreut. Gemessen wird das Streulicht meist mit zwei verschiedenen Einstellungen. Die größte Streuung findet im Kleinwinkelbereich (0 - 10°) statt und wird als Vorwärtsstreulicht (*forward light scatter*) bezeichnet. Es gibt Auskunft über die Größe einer Zelle. Je größer das Vorwärtsstreusignal, desto größer ist die vom Laserlicht angestrahlte Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (*side light scatter*) entsteht im 90° Winkel zum ursprünglichen Laserstrahl und ist charakteristisch für die Granularität einer Zelle. Neben der Größe und Granularität der Zelle können darüber hinaus Fluoreszenzen gemessen werden. Bei Anregung fluoreszenzmarkierter Moleküle durch den monochromatischen Laserstrahl gehen diese in einen angeregten Zustand über, aus dem sie unter Emission längerwelliger Strahlung wieder in den Grundzustand zurückfallen. Die emittierte Strahlung wird von einem Photodetektor aufgenommen. Die Intensität der Strahlung ist dabei proportional zur gebundenen Menge an Farbstoffmenge.

2.16.1 Zellzyklusanalyse und Apoptosenachweis mittels

Propidiumiodid am Durchflusszytometer

Der DNA-Gehalt einer Zelle kann Auskunft über die jeweilige Zellzyklus-Phase der Zelle geben. Zellen, die sich in der G₀/G₁-Phase befinden, besitzen einen doppelten Chromosomensatz (2n), der bei Tumorzellen abweichend sein kann. Während der S-Phase

wird dieser Chromosomensatz verdoppelt, so dass am Ende dieser Phase ein tetraploider Chromosomensatz (4n) vorzufinden ist. In der G2/M-Phase bleibt der Gehalt an DNA als tetraploider Satz bestehen, der schließlich in der Mitose auf zwei Tochterzellen verteilt wird. Der jeweilige DNA-Gehalt einer Zelle kann mittels Propidiumiodid-Färbung am Durchflusszytometer gemessen werden. Propidiumiodid interkaliert in die DNA und kann folglich gemessen werden. Da sich dieser Farbstoff sowohl in DNA als auch in RNA einlagern kann, muss für die Darstellung der DNA vorher ein RNase-Verdau durchgeführt werden.

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

PBS

Ethanol absolut

Saponin 3,5 % in PBS gelöst

Propidiumiodid 60 µg/ml PI in PBS

RNASE 2mg/ml

Für die Zellzyklusanalyse wurden 2×10^5 Zellen abtrypsiniert und in ein FACS-Röhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 300 x g für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet aufgewirbelt und mit 300 µl PBS versetzt. Zur Fixierung wurden 700 µl eiskaltes Ethanol während des Mischens hinzugegeben. Die Zellen wurden im Anschluss daran für 1 Stunde bei 4 °C fixiert. Nach der Inkubation wurde erneut bei 300 x g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet aufgewirbelt. Zum Aufschließen der Zellmembran wurden die Zellen mit 1ml PBS und 5 µl Saponin versetzt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschschriffe mit 1 ml PBS. Die aufgewirbelten Zellen wurden in 200 µl PI/PBS () Lösung aufgenommen und mit 50 µl RNase versetzt und für 30 Minuten bei RT inkubiert. Die Messung der Proben erfolgte am Durchflusszytometer.

2.16.2 **Bestimmung der Apoptoseinduktion mittels**

Annexin/PI-Färbung

Lebende Zellen weisen eine asymmetrische Zusammensetzung verschiedener Phospholipide auf der extrazellulären und intrazellulären Seite der Membran auf. Während die extrazelluläre Seite hauptsächlich durch Phosphatidylcholin und Sphingolipiden gekennzeichnet ist, befindet sich auf der intrazellulären Seite vorwiegend Phosphatidylserin.

In der frühen Phase der Apoptose wird das Phosphatidylserin auf die extrazelluläre Seite der Membran transloziert. Diese Translokation von Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran kann durch Annexin, ein Phosphatidylserin bindendes Protein, detektiert werden. Zur Abgrenzung spätapoptotisch / nekrotischer Zellen von lebenden und apoptotischen Zellen wird als zweiter Parameter die Interkalation von Propidiumiodid in die DNA untersucht. PI kann intakte Membranen nicht durchdringen. So zeigen vitale und apoptotische Zellen kein PI-Fluoreszenzsignal. Propidiumiodid kann aufgrund seiner Eigenfluoreszenz gemessen werden und Annexin V wurde mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) gekoppelt.

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

Kulturmedium ohne Phenolrot	(s. Kapitel 2.9.1)
PBS ohne Ca ²⁺ /ohne Mg ²⁺	Fa. Seromed Nr. L 182-01
Trypsin-EDTA (1x)	Fa. Gibco Nr. 45300-019
rh Annexin V/FITC Kit	Fa. Bender MedSystems Nr. BMS306FI
FACS-Röhrchen	Fa. Becton Dickinson Nr. Falcon 352052

Zur Bestimmung der Apoptose mittels Annexin/PI wurden die Neuroblastom-Zellen nach Trypsinierung je nach Zelltyp, Proliferationsgeschwindigkeit und Größe in einer Zelldichte von $1 \times 10^3 - 4 \times 10^4$ in 5 ml Medium und in Flaschen mit 25 cm² Fläche ausgesät. Bis zum Erreichen einer 30% Konfluenz wurden die Flaschen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Es folgte eine Behandlung der Zellen mit ATRA, Deazaneplanocin A und Depsipeptid (Konzentration siehe Tabelle 8) in 10 ml Medium für je 24, 48 und 72h. Im Anschluss wurden sowohl die adhärenenten als auch die abgelösten Zellen, welche sich im Überstand befanden, geerntet. Die abgelösten Zellen wurden bei 200 x g zentrifugiert. Zur Trypsinierung wurden die adhärenenten Zellen mit 2,5 ml Trypsin überschichtet und bei 37°C für 1 Minute inkubiert. Das Trypsin wurde abgestoppt, die Zellen durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und mit den Zellen aus dem Überstand vereinigt. Es folgte eine Zentrifugation der Zellen für 5 Minuten bei 4°C und 200 x g. Der Überstand wurde dekantiert, das Pellet mit einem Vortexer aufgewirbelt und in 200 µl Medium aufgenommen. Es wurden 5 µl Annexin V-FITC und 5 µl PI hinzugegeben. Die Messung der Proben erfolgte am Durchflusszytometer.

Das Prinzip der DNA-Isolierung basiert in erster Linie auf der Freisetzung der DNA durch eine Zelllyse mit anschließender proteolytischen Spaltung der Zellproteine durch die Serinprotease Proteinase K.

Die Bindungsfähigkeit der DNA wird mit 100% igem Ethanol und chaotropen Ionen, meistens Guanidiniumthiocyanat, so eingestellt, daß sie während eines Zentrifugationsschrittes auf die Membran der PureLink Säule gebunden werden kann. Bei der Säule handelt es sich um einen Anionenaustauscher mit Silica-Oberfläche. Zur Beseitigung von verunreinigenden Stoffen wird die DNA in zwei Schritten gewaschen. Anschließend wird die gereinigte DNA mit Extraktionspuffer oder H₂O durch die Verringerung der Salzkonzentration wieder von der Säule eluiert.

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

PureLink Genomic DNA Kit Invitrogen

PureLink Spin Säulen

Proteinase K-Lösung

Wasch-Puffer 1

Wasch-Puffer 2

PureLink Genomic Elution Puffer:

Für die Isolierung der genomischen DNA aus Neuroblastomzellen wurde das in 200 µl PBS resuspendierte Zellpellet mit 20 µl Proteinase K-Lösung und 200 µl Pure Link Lysis Puffer versetzt und für 15 Sekunden gemischt. Nach dem Mischen erfolgte eine Inkubation der Probe für 10 Minuten bei 55 °C in einem Thermoblock bis alle Proteine vollständig verdaut waren. Im nächsten Schritt wurden 200 µl Ethanol (100%) dazugegeben und die Probe erneut für 15 Sekunden gemischt. Die entstandene Suspension wurde vorsichtig auf eine PureLink Säule gegeben und für 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen, die Säule mit 500 µl Wasch-Puffer 1 beladen und die Probe erneut bei 10.000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurde der Durchlauf wiederum verworfen und die Säule mit 500 µl Wasch-Puffer 2 versetzt und für weitere 3 Minuten bei 20.000 x g zentrifugiert. Zum Trocknen der Säule wurde der Durchlauf verworfen und die einminütige Zentrifugation bei 20.000 x g wiederholt. Für die Elution wurden 200 µl vom PureLink Genomic Elution-Puffer auf die Säule gegeben und für 1 Minute bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 20.000 x g für 1 Minute zentrifugiert. Das Eluat wurde bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

2.18 Bisulfit-Behandlung der DNA

Für die Bisulfit-Behandlung der DNA wurde das *EZ DNA Methylation-Gold Kit* von *ZYMO Research* verwendet. Das Prinzip der Bisulfit-Behandlung beruht auf der oxidativen Desaminierung von nicht-methylierten Cytosin in Uracil in Gegenwart einer Natriumbisulfitlösung. Da das Natriumbisulfit mit nicht mit -methylierten Cytosinen reagiert, bleiben diese unverändert. Nach der Bisulfit-Behandlung wird die DNA mittels PCR analysiert. Bei der Replikation wird statt des Uracils eine Thymin Base in die Amplikons eingebaut.

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

EZ DNA Methylation-Gold Kit *ZYMO Research*

CT Conversion Reagenz

M-Dilution Puffer

M-Dissolving Puffer

M-Binding Puffer

M-Wash Puffer

M-Desulphonation Puffer

M-Elution Puffer

Zymo-Spin IC Säulen

Für die Bisulfit-Behandlung wurden 500 ng DNA in einem Endvolumen von 20 µl mit 130 µl CT Conversion Reagenz gemischt, welches die benötigten Komponenten zur Konvertierung der unmethylierten Cytosine enthielt. Nach einer kurzen Denaturierung der DNA bei 95 °C fand die eigentliche CT-Konversion bei 64 °C statt. Hierzu wurde folgendes Temperaturprofil verwendet:

Tabelle 14 : Temperaturprofil der Bisulfit-Behandlung

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	10 min
Ct Konversion	64 °C	2,5 h

Im Anschluss wurde die Probe zusammen mit 660 µl M-Binding-Puffer auf eine Zymo-Spin-Säule gegeben, gut gemischt und bei 10.000 x g für 30 Sekunden zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und die Säule zum Waschen mit 100 µl M-Wasch-Puffer beladen. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 10.000 x g für 30 Sekunden. Anschließend wurden 300 µl M-Desulphonation Puffer zur Desulfonierung auf die Säule gegeben und bei Raumtemperatur für 20 Minuten inkubiert. Nach einer erneuten Zentrifugation bei 10.000 x g

für 30 Sekunden wurde die Säule zum Waschen mit 200 µl M-Wasch-Puffer beladen und für weitere 30 Sekunden zentrifugiert. Es folgte ein weiterer Waschschriff mit 200 µl M-Wash-Puffer. Anschließend wurde die Zymo-Spin Säule auf ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt, mit 10 µl Elution-Puffer versetzt und für 1 Minute bei 10.000 x g zentrifugiert. Die so isolierte Bisulfit-behandelte DNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C aufbewahrt.

2.19 Herstellung einer Positivkontrolle mit 100 % methylierter DNA

Genomische DNA wurde aus Blut extrahiert und anschließend mit dem Enzym Methyltransferase Sss1 inkubiert, um künstlich hergestellte 100 % methylierte Positivkontrolle zu erhalten. S-adenosylmethionin (SAM) diente dabei als Donor für die Methylgruppen. Für die Reaktion wurde 1 µg genomische DNA aus Blut mit 1 U Methyltransferase und 160 µM S-adenosylmethionin für eine Stunde bei 37 °C im Cycler inkubiert. Anschließend wurde eine Bisulfit-Behandlung wie unter Kapitel 2.18 beschrieben durchgeführt.

2.20 Quantitative Methylierungs-spezifische PCR (MS-PCR)

Die quantitative MS-PCR wurde mit dem *Power SYBR Green PCR Mastermix* von Applied Biosystems am ABIPRISM 7900 *Detection System* von Applied Biosystems durchgeführt.

Benötigte Reagenzien, Puffer und Lösungen:

Power SYBR Green PCR Mastermix	Applied Biosystems
Primer zur Amplifikation von bisulfit modifizierter DNA	s. Tabelle 4

Für jede Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung. Je 3,30 µl der bisulfit modifizierten DNA wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen vorgelegt. Zu der vorgelegten DNA-Probe wurden 29,7 µl des vorab zusammengesetzten Mastermixes (siehe Tabelle 15) gegeben und gut durchmischt. Nach einer kurzen Zentrifugation wurden die Ansätze mit jeweils dreimal 10 µl pro Vertiefung in eine 384 *well*-Platte pipettiert. Die Platte wurde für 2 Minuten bei 500 x g zentrifugiert und die Messung erfolgte anschließend im ABI PRISM 7900 *Detection System* von Applied Biosystems. Die PCR erfolgte nach dem in Tabelle 16 aufgeführten Temperaturprofil.

Tabelle 15: Zusammensetzung des Mastermixes für die methylspezifische PCR (Ansatz für eine Vertiefung der 384 Wellplatte. Für jede Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.)

Komponente	Mengenangabe
Mastermix	5 μ l
Forward Primer (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l
Reverse Primer (10 pmol/ μ l)	0,5 μ l
DNA (50 ng/ μ l)	1 μ l
RNAse freies Wasser	3 μ l
Σ	10 μl

Tabelle 16: Realtime-PCR-Temperaturprofil für Methylierungsspezifische PCR

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Denaturierung	95 °C	10 min	1x
Denaturierung	95 °C	15 s	40x
Anlagerung/ „Annealing“	60 °C	1 min	
Schmelzkurvenanalyse	95 °C	15 s	1x
	60 °C	15 s	1x
	95 °C	15 s	1x

Die Auswertung der MS-PCR erfolgte wie unter Kapitel 2.13 beschrieben mit der $\Delta\Delta C_t$ Formel. Als Housekeeping Gen diente β -Actin. Die 100% methylierte DNA wurde auf 1 gesetzt und die restlichen Ansätze entsprechend normiert.

2.21 Statistische Auswertung

Die statistischen Auswertungen wurden mit Hilfe des *Student's T-Test* (Excel, Microsoft Office) durchgeführt. Es wurde eine mögliche statistische Signifikanz der Ergebnisse in Bezug zu entsprechenden Kontrollen ermittelt. Die p-Werte sind in den Diagrammen angegeben.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit kamen drei unterschiedliche Neuroblastomzelllinien zur Verwendung, deren Eigenschaften im Kapitel 2.9.1 (siehe Tabelle 6) dargestellt sind.

I Untersuchungen zur molekularen Wirksamkeit

In Abschnitt 3.1 bis 3.4 wird im Folgenden auf die molekulare Wirksamkeit von Depsipeptid, ATRA und DZNep eingegangen.

3.1 Wachstumsinhibierende Wirkung von Depsipeptid, ATRA und DZNep auf unterschiedliche Typen von Neuroblastomzellen

Im ersten Teil dieser Arbeit sollte die molekulare Wirksamkeit der drei Inhibitoren Depsipeptid, ATRA und DZNep bezüglich der Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Induktion der Apoptose in Neuroblastomzellen untersucht werden.

Zur Untersuchung der antiproliferativen Wirkung von Depsipeptid, ATRA und DZNep wurden die Neuroblastomzelllinien LAN-1 (N-Typ), SH-SY5Y (N-Typ) und SH-EP (S-Typ) 24 Stunden nach der Aussaat für weitere 24, 48 und 72 Stunden mit Medium supplementiert jeweils mit Depsipeptid (1 und 5 nM), ATRA (25 µM), oder Deazaneplanocin A (1 und 5 µM) inkubiert. Anschließend wurde die Vitalität der Zellen anhand des XTT-Assays ermittelt (siehe Kapitel 2.9.4).

Depsipeptid

Die Inkubation mit Depsipeptid (1 und 5 nM) zeigte eine konzentrations- und zeitabhängige Inhibition der Zellproliferation in allen untersuchten Neuroblastomzelllinien (Abbildung 4 A-C). Es ließ sich zudem eine Variation in der Sensitivität der einzelnen Zelllinien auf den Inhibitor beobachten. Mit 1 nM Depsipeptid zeigte die Zelllinie LAN-1 eine geringere Sensitivität als die beiden anderen Zelllinien. Eine Inkubation mit 5 nM Depsipeptid resultierte in eine Abnahme des Zellwachstums auf nahezu 100% bei allen Zelllinien.

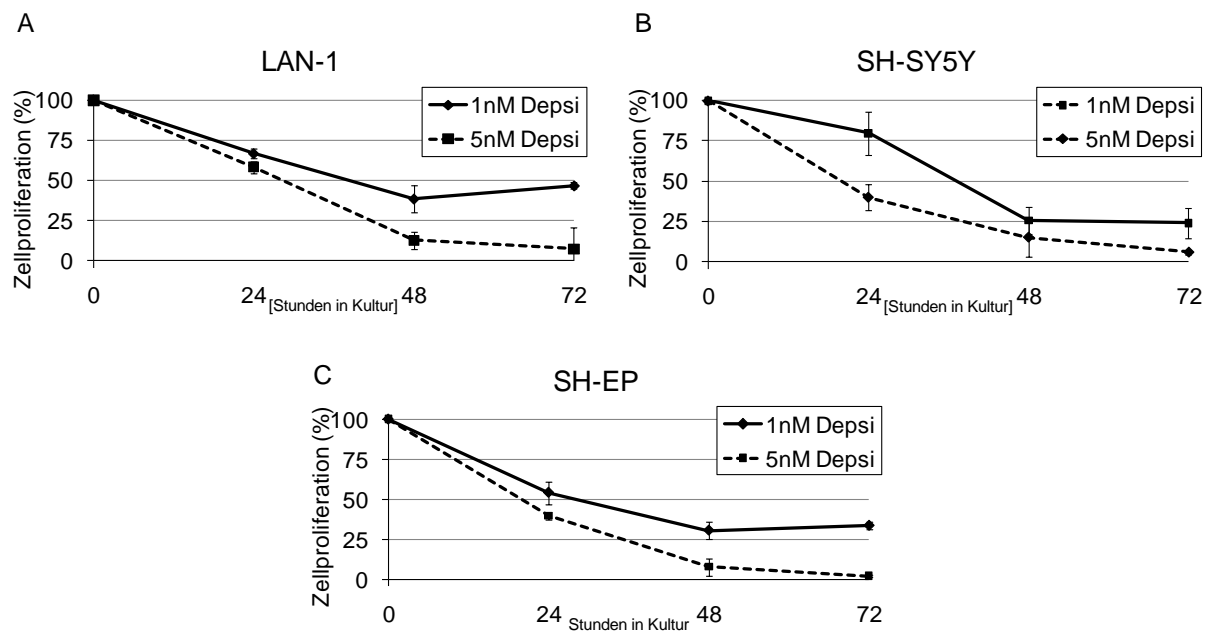


Abbildung 4 A-C: Antiproliferativer Effekt von **Depsipeptid** auf Neuroblastomzelllinien. Die Auswirkungen von 1 und 5 nM Depsipeptid auf das Proliferationsverhalten der NB-Zellen wurden mit Hilfe des XTT-Assays (siehe Kapitel 2.9.4) untersucht. Depsipeptid inhibierte zeit- und dosisabhängig das Wachstum der NB-Zellen (A, B, C). Die Ergebnisse sind in Relation zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle, die gleich 100% gesetzt wurde, angegeben. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert von sechs Replikaten dar. Repräsentatives Ergebnis aus n= 3 Versuchen.

ATRA

In Anlehnung an Schulte *et al.*, wurde für die antiproliferativen Untersuchungen mit ATRA 25 μ M als Konzentration gewählt (95). Wie aus Abbildung 5 ersichtlich, erbrachte eine Inkubation der Neuroblastomzelllinien mit 25 μ M ATRA über einen Zeitraum von 72 Stunden nur einen moderaten antiproliferativen Effekt. Der größte Effekt zeigte sich bei der S-Typ-Zelllinie SH-EP nach 48 Stunden Behandlung mit ATRA, wodurch eine Abnahme der Zellproliferation auf 75% zu beobachten war. Die N-Typ-Zelllinie LAN-1 mit MYCN Amplifikation zeigte einen leichten Wachstumsschub nach 24 Stunden. Nach 72 Stunden sank die Vitalität auf ca. 80% der Kontrolle. Die SH-SY5Y Zelllinie zeigte nach 24 Stunden einen Wachstumsverlust. Das Wachstum kehrte nach 72 Stunden auf das Niveau der Kontrolle zurück.

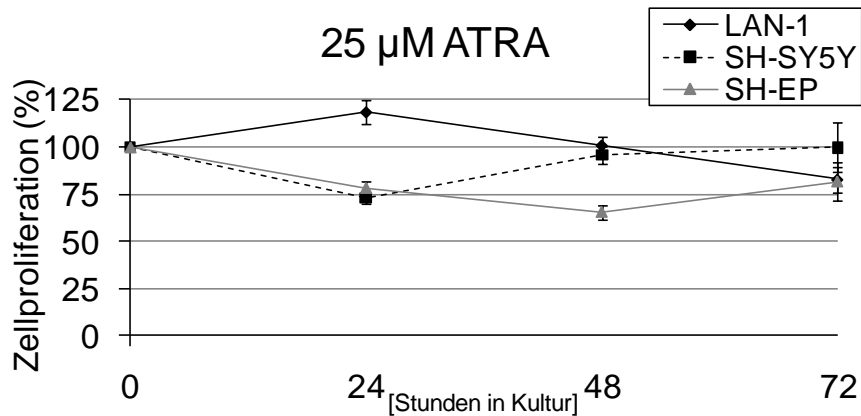


Abbildung 5: Antiproliferativer Effekt von **ATRA** auf Neuroblastomzelllinien. Die Auswirkung von 25 µM ATRA auf das Proliferationsverhalten der NB-Zellen wurde mit Hilfe des XTT-Assays (siehe Kapitel 2.9.4) untersucht. ATRA führte zu einer moderaten Inhibition der Zellproliferation. Die Ergebnisse sind in Relation zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle, die gleich 100% gesetzt wurde, angegeben. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert von sechs Replikaten dar. Repräsentatives Ergebnis aus n = 3 Versuchen. Die einzusetzende Konzentration für ATRA erfolgte in Anlehnung an Schulte *et al.* (93).

DZNep

Für die antiproliferativen Untersuchungen mit DZNep wurden zunächst zwei Konzentrationen 1 µM und 5 µM DZNep an der S-Typ-Zelllinie SH-EP ausgetestet. Mit 1 µM DZNep konnte nur eine Abnahme der Viabilität um 35% erreicht werden (Abbildung 6A). Erst mit 5 µM konnte eine stärkere Abnahme in der Zellproliferation beobachtet werden (Abbildung 6A). Basierend auf diesem Ergebnis wurde die Konzentration 5 µM für die antiproliferativen Untersuchungen der beiden anderen Zelllinien LAN-1 und SH-SY5Y ausgewählt.

DZNep hemmte die Zellproliferation der beiden Zelllinien LAN-1 und SH-SY5Y zeitabhängig (Abbildung 6B und C). Die größte Sensitivität war bei der N-Typ-Zelllinie SH-SY5Y mit der kleinsten Zellgröße zu beobachten (Abbildung 6C).

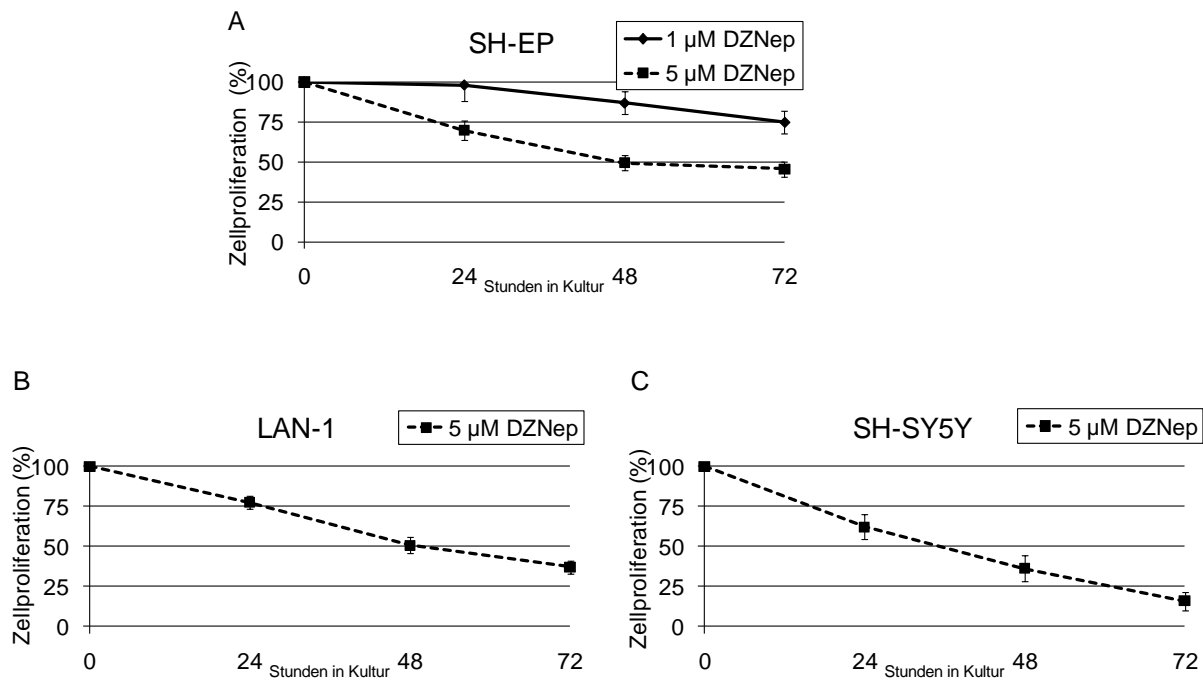


Abbildung 6: Antiproliferativer Effekt von **DZNep** auf Neuroblastomzelllinien. Die Auswirkungen von 1 und 5 µM DZNep auf das Proliferationsverhalten der NB-Zellen wurden mit Hilfe des XTT-Assays (siehe Kapitel 2.9.4) untersucht. DZNep hemmte zeitabhängig die Proliferation der NB-Zellen (A, B und C). Die Ergebnisse sind in Relation zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle, die gleich 100% gesetzt wurde, angegeben. Jeder Datenpunkt stellt den Mittelwert von sechs Replikaten dar. Repräsentatives Ergebnis aus n = 3 Versuchen. Die einzusetzende Konzentration für DZNep erfolgte in Anlehnung an Tan *et al.*, (47).

3.2 Morphologische Veränderung der Zellen unter Einfluss von ATRA, Depsipeptid und DZNep

Depsipeptid

Für die weiteren Untersuchungen wurden 5 nM Depsipeptid verwendet, da mit dieser Konzentration in allen NB-Zelllinien die gleiche antiproliferative Wirkung zu vernehmen war (siehe Kapitel 3.1). Die Inkubation mit 5 nM Depsipeptid führte nur bei der S-Typ-Zelllinie SH-EP zur morphologischen Veränderungen (Abbildung 7A und B). Nach 3 Tagen bildeten sich lange unidirektionale Fortsätze aus. Die Zelllinien LAN-1 und SH-SY5Y wiesen nach Depsipeptid-Behandlung keine morphologischen Veränderungen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen auf.

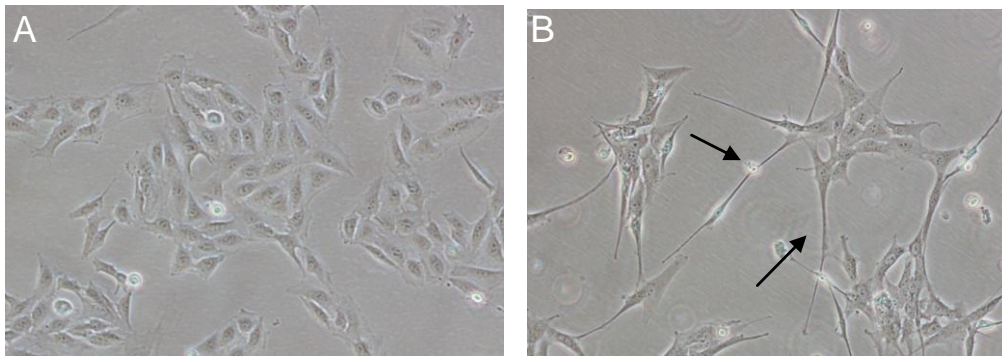


Abbildung 7: Depsipeptid induzierte die Ausbildung von langen Fortsätzen in der S-Typ-Zelllinie SH-EP. A) unbehandelt. B) Lichtmikroskopische Aufnahmen von morphologischen Veränderungen der NB-Zelllinie SH-EP (S-Typ) unter Einfluss von Depsipeptid nach 3-4 Tagen. Pfeile zeigen die beobachteten Veränderungen.

ATRA

Bei LAN-1 Zellen kam es unter Inkubation mit 25 μ M ATRA zur Veränderung der Zellmorphologie. Die behandelten Zellen nahmen eine längliche schlanke Zellform unter Ausbildung von Zellfortsätzen an (Abbildung 8B), wohingegen die unbehandelten Zellen unverändert blieben (Abbildung 8A). Auch bei den SH-SY5Y Zellen wurde eine ähnliche Veränderung der Zellmorphologie unter Behandlung beobachtet (Abbildung 8C, D). Die SH-EP Zellen zeigten keine Veränderung der Morphologie unter Behandlung mit ATRA.

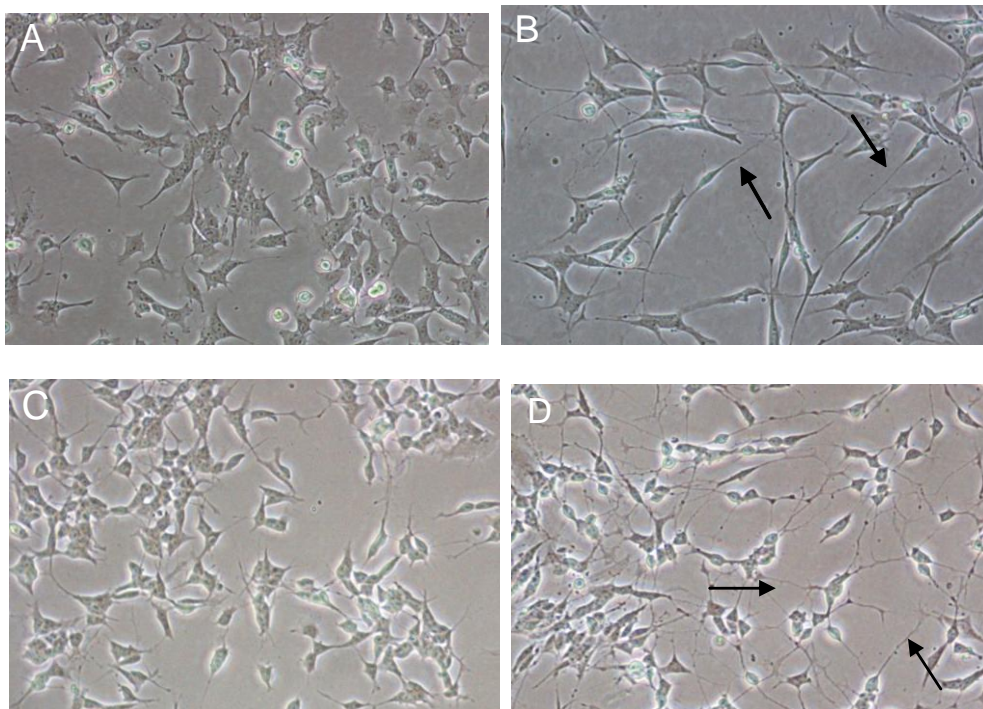


Abbildung 8: Lichtmikroskopische Aufnahmen von morphologischen Veränderungen der N-Typ NB-Zelllinien LAN-1 (A: unbehandelt, B: + ATRA) und SH-SY5Y (C: unbehandelt, D: + ATRA) unter Einfluss von 25 μ M ATRA nach 3 Tagen. ATRA veränderte die Morphologie der N-Typ Zelllinien LAN-1 und SH-SY5Y unter Ausbildung von Zellfortsätzen. Pfeile zeigen die beobachteten Veränderungen.

DZNep

Unter DZNep veränderte sich die Morphologie der untersuchten Zelllinien nicht.

3.3 Veränderung des Zellzyklusprofils durch Depsipeptid,

ATRA und DZNep

Voraussetzung für die normale physiologische Teilung von Zellen ist eine präzise Steuerung des Zellzyklus. Fehlerhafte Regulation von Zellzyklus-kontrollierenden und assoziierten Proteinen spielt bei der Tumorentwicklung eine entscheidende Rolle. Zellzyklusinhibierende Substanzen sind daher vielversprechend für die Tumorthherapie.

Daher wurde der Einfluss von Depsipeptid, ATRA, und Deazaneplanocin A auf die Zellzyklusregulation in Neuroblastomzellen mittels Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 2.16.1) untersucht.

Depsipeptid

Die Inkubation mit 5 nM Depsipeptid für 24 Stunden führte in allen drei Neuroblastomzellen zu einem dosis-abhängigen G2-/M-Arrest (4n DNA-Gehalt) im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abbildung 9 A-C). Parallel hierzu nahm der Anteil an Zellen in der S-Phase (Zellen mit 2-4n DNA-Gehalt) und G0-/G1-Phase (2n DNA-Gehalt) ab. Außerdem kam es zu einem Anstieg der apoptotischen Zellen mit sub2n-DNA (hypodiploid), die als sub-G1 Peak vor der G1-Phase gemessen wurde (siehe Kapitel 2.16.1). Nach 48 und 72 stündiger Behandlung war kein Zellzyklusarrest mehr sichtbar, der Anteil der apoptotischen Zellen nahm zu.

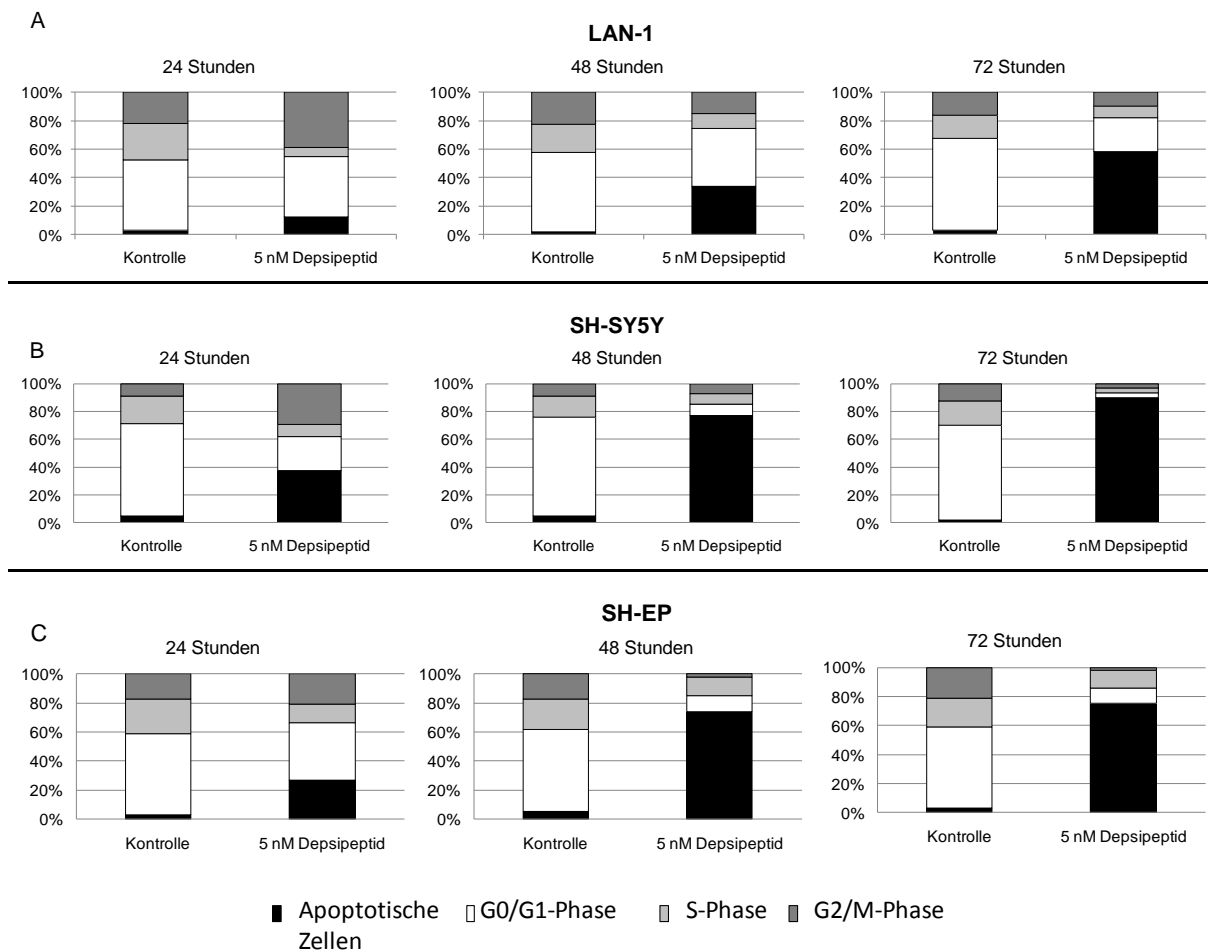


Abbildung 9 A-C: Zellzyklusprofil der NB-Zelllinien LAN-1 (A), SH-SY5Y (B) und SH-EP (C) nach **Depsipeptid** Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle). NB-Zellen wurden für 24, 48 und 72 Stunden mit 5 nM Depsipeptid behandelt und der DNA-Gehalt mittels Propidiumiodid am Durchflusszytometer (siehe Kapitel 2.16.1) bestimmt. Nach 24 stündiger Behandlung akkumulierten die Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus. Der Anteil der Zellen in der G1- und S-Phase nahm ab. Nach 48 und 72 Stunden war keine Arretierung in den einzelnen Phasen mehr sichtbar. Der Anteil apoptotischer Zellen nahm mit der Zeit zu.

ATRA

Die Behandlung der Neuroblastomzellen LAN-1, SH-SY5Y und SH-EP mit 25 μ M ATRA resultierte in einem G0-/G1-Arrest. Während der Zellzyklusarrest in der LAN-1-Zelllinie schon nach 24 Stunden detektierbar war, konnte in der N-Typ-Zelllinie SH-SY5Y und der S-Typ-Zelllinie SH-EP erst ab 48 Stunden eine Arretierung in der G0/G1-Phase vernommen werden. Der Anteil der Zellen in der S- und G2-Phase nahmen nur leicht ab (Abbildung 10A-C). Apoptotische Zellen (subG1-Fraktion) konnten nicht nachgewiesen werden.

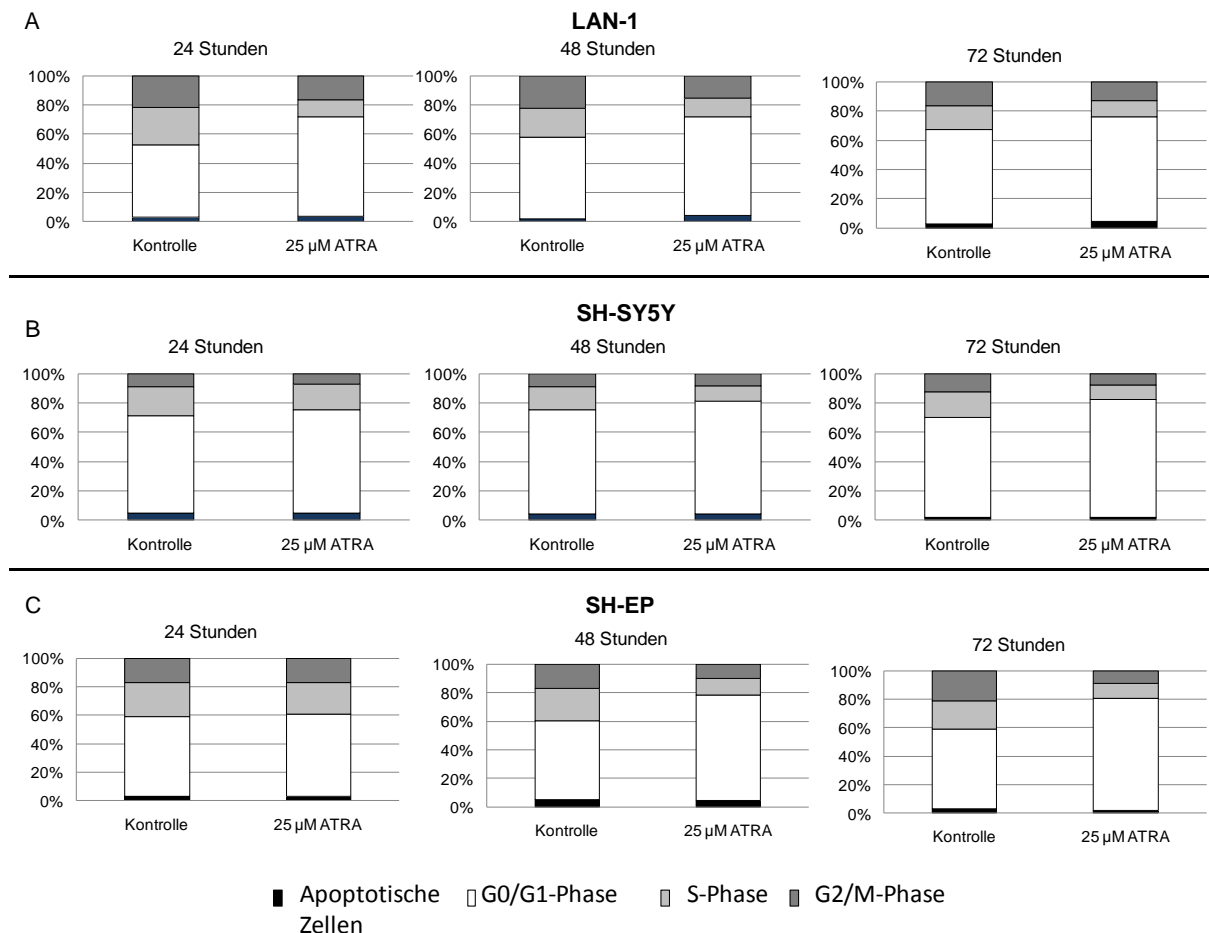


Abbildung 10: Zellzyklusprofil der NB-Zelllinien LAN-1 (A), SH-SY5Y (B) und SH-EP (C) nach **ATRA** Behandlung im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle). NB-Zellen wurden für 24, 48 und 72 Stunden mit ATRA behandelt und der DNA-Gehalt mittels Propidiumiodid am Durchflusszytometer (siehe Kapitel 2. 16.1) bestimmt. ATRA induzierte einen G0-/G1-Arrest sowohl in den N-Typ-Zelllinien (A und B) als auch in der S-Typ-Zelllinie SH-EP (C). Ein Anstieg der Apoptoserate war nicht detektierbar.

DZNep

DZNep induzierte einen G0-/G1 Arrest in den N-Typ Neuroblastomzellen (Abbildung 11A, B). In den SY5Y-Zellen war ein deutlicher Arrest bereits nach 24 Stunden zu detektieren, während dies bei den LAN-1 Zellen erst nach 48 Stunden zu beobachten war. Parallel zur Akkumulation der Zellen in der G0-/G1-Phase (2n DNA-Gehalt) nahm der Anteil der Zellen in der S- und G2-Phase ab. In der S-Typ-Zelllinie SH-EP war ein S-Arrest nach Behandlung mit DZNep zu beobachten (Abbildung 11C). Eine Zunahme der Zellen in der Apoptose konnte ermittelt werden, jedoch war die Apoptoseinduktion nicht so stark wie nach Depsipeptid-Behandlung.

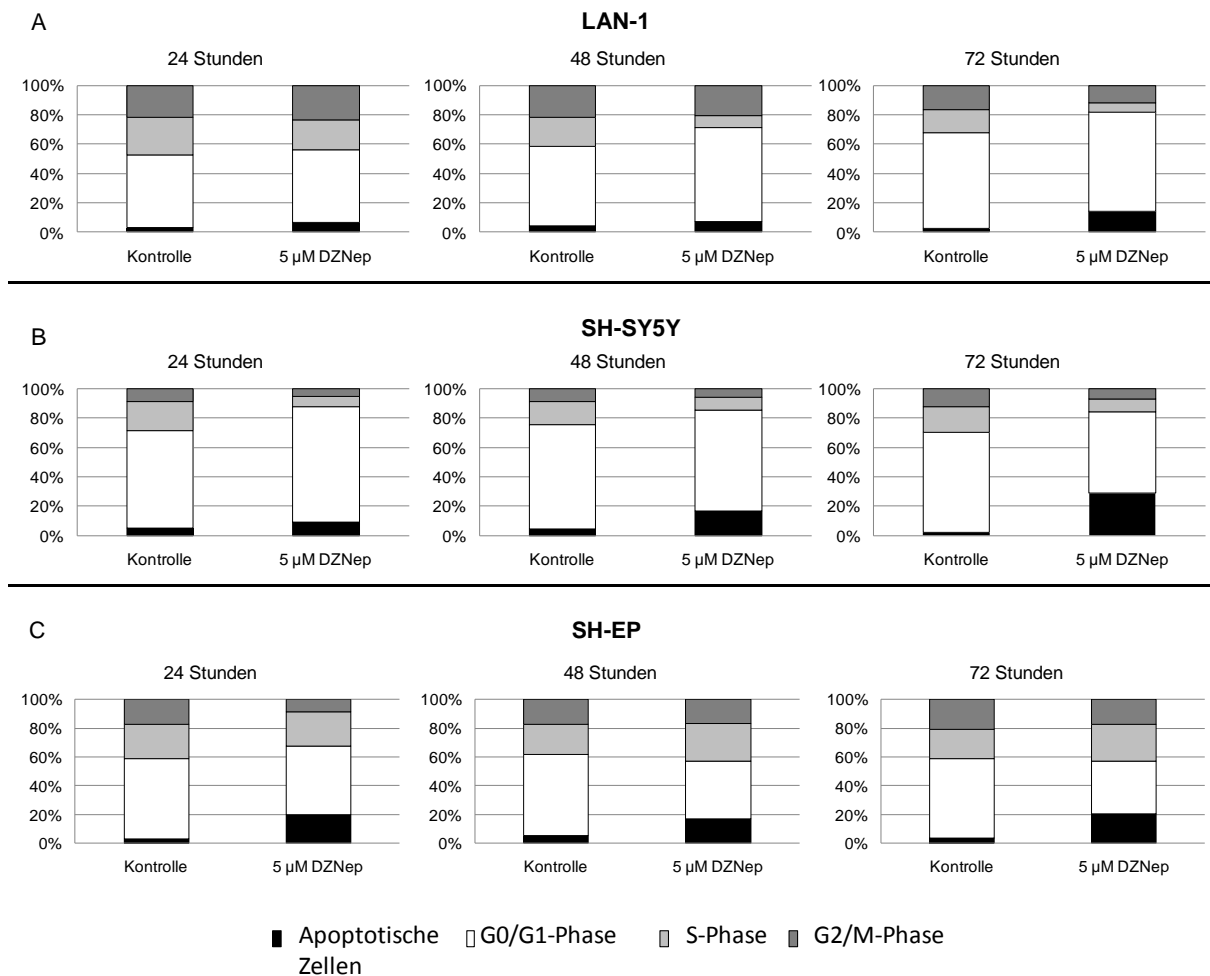


Abbildung 11: Zellzyklusregulation durch **DZNep** in den Zelllinien LAN-1 (A), SH-SY5Y (B) und SH-EP (C) Neuroblastomzellen im Vergleich zu unbehandelten Zelllinien. Die Zelllinien wurden für 24, 48 und 72 Stunden mit DZNep behandelt und der DNA-Gehalt mittels Propidiumiodid durchflusszytometrisch (siehe Kapitel 2.16.1) analysiert. DZNep induzierte einen G0-/G1- Arrest in den N-Typ-Zelllinien sowie einen Arrest in der S-Phase in der S-Typ-Zelllinie SH-EP. Der Anteil der apoptotischen Zellen nahm zeitabhängig zu.

3.4 Induktion der Apoptose durch ATRA, Depsipeptid und DZNep

Apoptose (programmierter Zelltod) ist ein essentieller zellulärer Prozess für die korrekte Entwicklung und Aufrechterhaltung von multizellulären Organismen. Während der Karzinogenese können verschiedene Störungen in der Apoptosemaschinerie entstehen, welche zum unkontrollierten Zellwachstum und zur malignen Progression des Tumors führen können. Die Reinitialisierung des zellulären Apoptoseprogramms ist daher von großem Interesse für die Tumorthherapie.

3.4.1 Annexin V-Bindung

Neuroblastomzellen wurden entweder mit Depsipeptid (5 nM), ATRA (25 μ M), oder DZNep (5 μ M) für 72 Stunden inkubiert und anschließend durch eine Annexin/PI-Färbung am Durchflusszytometer (siehe Kapitel 2.16.2) analysiert.

Depsipeptid

Wie in Abbildung 12A erkennbar, nahm der Anteil der Zellen in der Apoptose nach 72 stündiger Behandlung mit 5 nM Depsipeptid in allen Zelllinien im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Kontrolle) zu. Die Zelllinie LAN-1 (N-Typ mit MYCN Amplifikation) wies mit einem Anteil von ca. 30% apoptotischer Zellen lediglich geringe Apoptosephänomene auf. Mit einem Anteil von 80% und 60% apoptotischer Zellen nach 72 Stunden zeigten die Zelllinien SH-SY5Y (N-Typ) und SH-EP (S-Typ) deutlich höhere Apoptoseraten als die Zelllinie LAN-1 mit MYCN-Amplifikation. .

ATRA

Die ATRA-Behandlung resultierte nicht in einem Anstieg der Anzahl der apoptotischen Zellen in allen NB-Zelllinien (Abbildung 12B).

DZNep

Für die N-Typ-Zelllinie LAN-1 mit MYCN Amplifikation zeigte die DZNep Behandlung nach 72 Stunden nur eine leichte apoptotisch induzierende Wirkung. Hier konnte nur eine Erhöhung der Apoptoserate um ca. 10% beobachtet werden. Die Apoptoserate in der N-Typ Zelllinie SH-SY5Y war mit ca. 20% apoptotischer Zellen etwas höher. Mit einem Anteil von 30% apoptotischer Zellen wies die S-Typ-Zelllinie SH-EP die höchste Apoptoserate auf (Abbildung 12C).

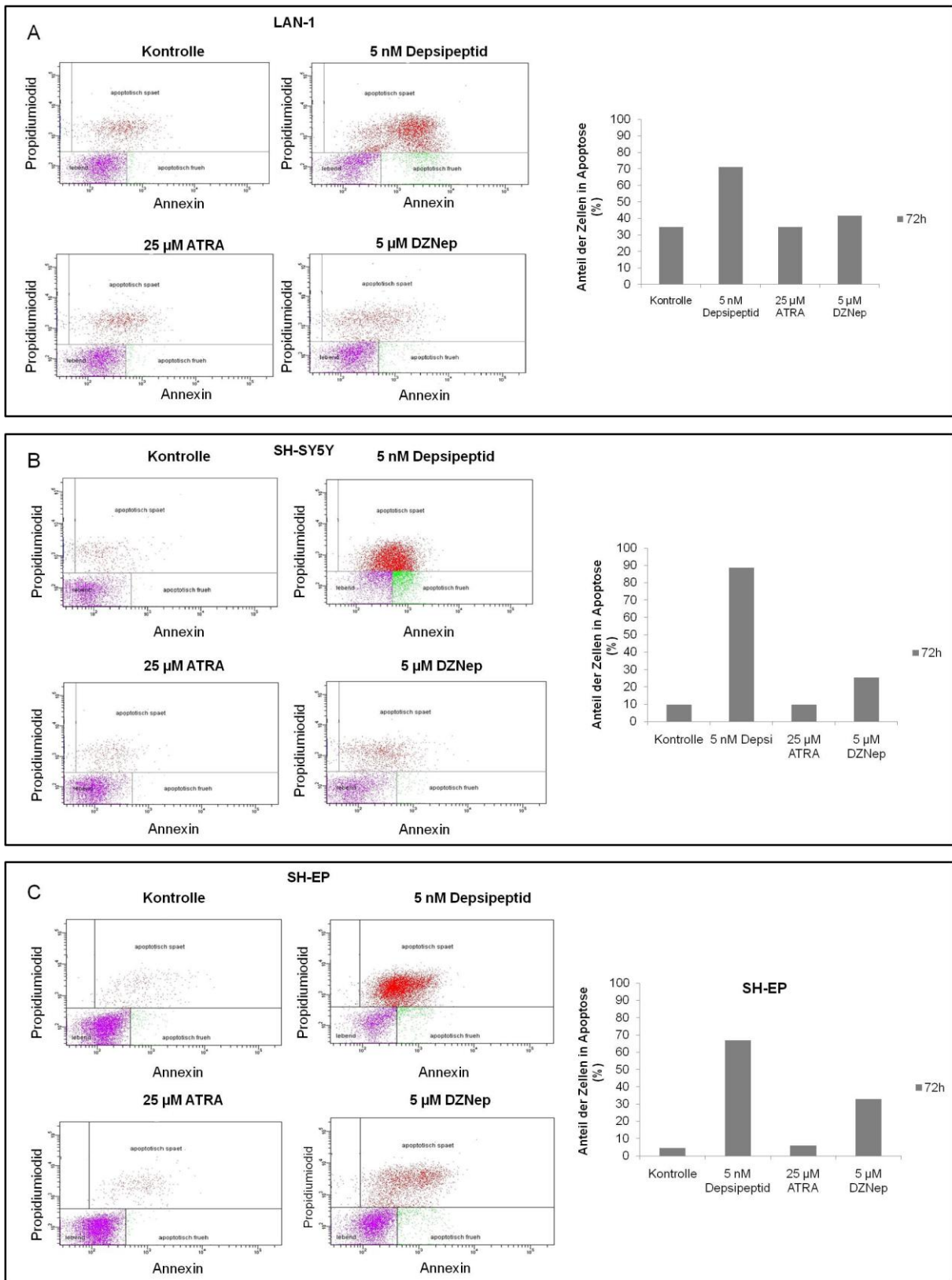


Abbildung 12 A-C: Induktion der Apoptose durch Depsipeptid, ATRA und DZNep in NB-Zellen. **Links:** Dargestellt ist die Annexin-V/PI-Färbung (siehe Kapitel 2.16.2) zum Apoptosenachweis am Durchflusszytometer von Neuroblastomzellen (LAN-1, SY5Y und SH-EP) nach Behandlung mit Depsipeptid (5 nM), ATRA (25 µM) und DZNep (5 µM) für 72 Stunden im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Kontrolle). Die Messergebnisse sind durch ein Kreuz in 4 Quadranten geteilt. Jeder Punkt steht für eine gemessene Zelle. Unten links: vitale Zellen,

welche Annexin und PI-negativ sind; unten rechts: früh-apoptotische Zellen, die Annexin-V positiv und PI-negativ sind; oben links: nekrotische Zellen, an die lediglich PI gebunden hat. Oben rechts: spät-apoptotische Zellen, an die beide Marker gebunden haben. **Rechts:** Diagramme zur besseren Veranschaulichung der links dargestellten Apoptoseinduktion durch Depsi, ATRA und DZNep in NB-Zellen. Der Anteil der Zellen in Apoptose wurde aus der Summe der Anteil der frühapoptotischen und spätapoptotischen Zellen errechnet. Die Inkubation der Neuroblastomzellen mit Depsipeptid zeigte eine Erhöhung der Apoptoserate, wohingegen mit ATRA keine Apoptoseinduktion nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich zu Depsipeptid war nur ein geringer Anstieg der Apoptoserate mit DZNep zu beobachten. Repräsentatives Ergebnis aus 2-3 Versuchen.

3.4.2 Zunahme des *cleaved* Caspase 3

Zusätzlich wurde eine Bestimmung des *cleaved* Caspase 3 nach Behandlung mit Depsipeptid, ATRA und DZNep wie in Kapitel 2.16.3 beschrieben in der N-Typ Zelllinie LAN-1 und SH-EP durchgeführt.

Depsipeptid

Die Zunahme der Caspase 3 Aktivität wurde nach 72 Stunden gemessen. Für Depsipeptid zeigte sich sowohl bei der LAN-1 Zelllinie als auch bei der SH-EP Zelllinie eine Zunahme der Caspase 3 Aktivität. Analog zu der Intensität der gemessenen Rate an Apoptose in der Zellzyklusanalyse (siehe Kapitel 3.3) und den Resultaten der Annexin/PI-Färbung (siehe Kapitel 3.4) zeigte die LAN-1 Zelllinie einen geringeren Anstieg in der Caspase 3 Aktivität als die SH-EP Zelllinie.

ATRA

Die ATRA Behandlung induzierte nur eine leichte Aktivierung der Caspase 3 in beiden Zelllinien.

DZNep

In weitgehender Übereinstimmung mit der gemessenen Apoptoserate in der Zellzyklusanalyse (siehe Kapitel 3.3) und Annexin/PI-Daten (siehe Kapitel 3.4) konnte nur eine geringe Aktivierung der Caspase 3 auch nach DZNep Behandlung in beiden Zelllinien beobachtet werden.

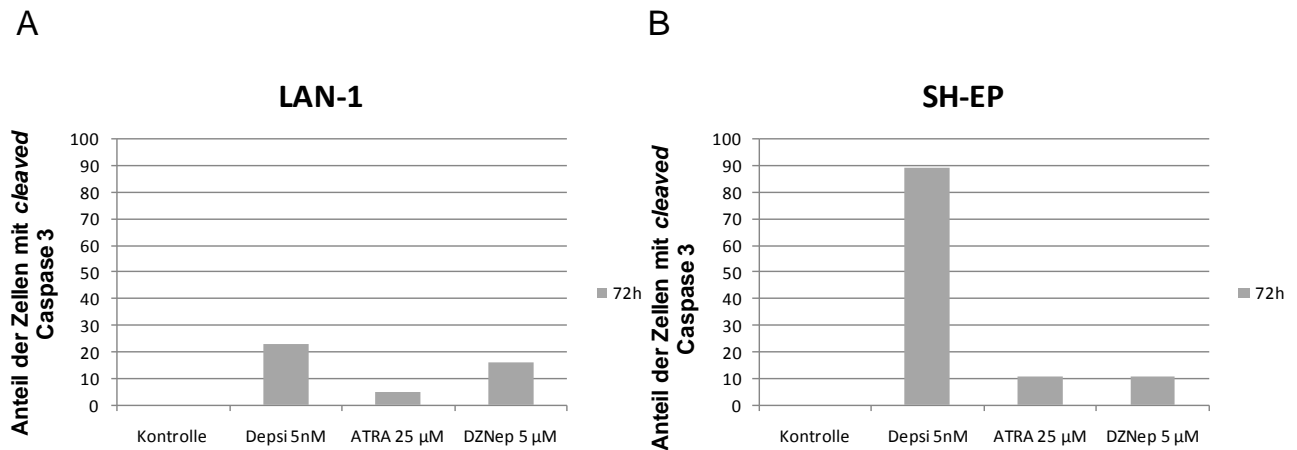


Abbildung 13: Dargestellt ist die Zunahme der Anteil der Zellen mit *cleaved* Caspase 3 nach Behandlung mit Depsipeptid, ATRA und DZNep in den NB-Zelllinien LAN-1 und SH-EP verglichen zu den unbehandelten Kontrollzellen (Kontrolle). NB-Zellen wurden mit 5 nM Depsipeptid, 25 µM ATRA und 5 µM DZNep für 72 Stunden behandelt und anschließend durchflusszytometrisch der Anteil der Zellen mit *cleaved* Caspase 3 (siehe Kapitel 2.16.3) gemessen. Die Depsipeptid-Behandlung erhöhte die Anzahl der Zellen mit *cleaved* Caspase 3. Mit ATRA und DZNep war nur ein leichter Anstieg der Zellen mit *cleaved* Caspase 3 detektierbar.

II Untersuchungen zur Regulation von entwicklungspezifischen Genen

Der zweite Teil dieser Arbeit befasst sich mit der epigenetischen Untersuchung der Regulation von embryonal-spezifischen polycomb-regulierten Genen in NB-Zellen. Die Regulation der embryonal-spezifischen Gene ist entscheidend für die Aufrechterhaltung der Pluripotenz der ES-Zellen. In embryonalen Stammzellen besetzen die Proteine der Polycombgruppe die Promotoren dieser Gene und tragen somit zu deren Repression bei. Es ist bekannt, dass ein Großteil dieser Targetgene im Verlauf der Differenzierung aktiviert wird. Über die Regulation solcher Faktoren ist in NB-Zellen nichts bekannt. Da NB-Tumorzellen typische Stammzeleigenschaften wie Selbsterneuerung und Differenzierungspotential zeigen, sollte hier untersucht werden, ob Inhibitoren, die in NB-Zellen die Entdifferenzierung (= schlecht differenzierter Zustand) aufheben, embryonal spezifische Gene in NB-Zellen aktivieren können. Zur Analyse wurden zehn embryonalspezifische Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren und an der Entwicklung der drei Keimblätter Ectoderm, Endoderm und Mesoderm sowie an der Neurogenese beteiligt sind, ausgewählt (54;56;96). Des Weiteren sind für diese Gene in ES-Zellen gezeigt worden, dass sie einer polycomb vermittelten Regulation unterliegen und bei der Differenzierung der ES-Zellen aktiviert werden (54;56). Die in dieser Arbeit ausgewählten Gene sind in Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Überblick über die zehn differenzierungsspezifischen polycomb regulierten Transkriptionsfaktoren und deren Vorkommen [modifiziert nach (97)].

Genname	Marker für
Hoxb1	Ectoderm
Meis1	
Pax6	
Otx1	
NKX2,2	Ectoderm, Endoderm, Neurogenese
Neurog1	Neurogenese
Olig2	
Onecut1	Mesoderm
Meox2	
Sox6	

3.5 Pilotstudie mit Depsipeptid zur Expressionsanalyse der embryonal spezifischen Gene in NB-Zellen

Zunächst sollte in einer Pilot-Studie mit Depsipeptid die Expression der embryonal-spezifischen Gene untersucht werden. Depsipeptid wurde aufgrund seiner durchschlagenden Wirkung in den NB-Zellen, wie im ersten Teil dieser Arbeit (siehe Kapitel 3.1 – 3.4) bereits gezeigt, gewählt. Bezüglich der Wirkungsweise von HDAC-Inhibitoren nimmt man an, dass sie durch die Hemmung von HDACs zu einer Reexpression von Genen führen, die für eine ausreichende Differenzierung einer Tumorzelle nötig ist. Neben Genen, die an der Apoptose, Zellzyklusregulation und DNA-Reparatur beteiligt sind, gehören hierzu auch Gene, die bei der Differenzierung in spezielle Zellarten eine Rolle spielen. Des Weiteren sind Histondeacetylasen an der Polycomb-vermittelten Genrepression beteiligt. Ferner ist gezeigt worden, dass Histondeacetylase-Inhibitoren *in vitro* die Proteinkonzentration von EZH2 und H3K27me3 verringern können. Dies könnte eine Aktivierung Polycomb-regulierter Gene hervorrufen. Aus diesen Gründen wurde untersucht, ob Depsipeptid als HDAC-Inhibitor die Expression von differenzierungsspezifischen Polycomb-regulierten Transkriptionsfaktoren in NB-Zellen beeinflussen kann.

Die HDACi-Wirksamkeit von Depsipeptid kommt durch Blockierung des aktiven Zentrums von Histondeacetylasen zu Stande, was mit einer Verminderung der Deacetylierung einhergeht. Folglich bewirken Histondeacetylase-Inhibitoren eine gesteigerte Acetylierung der Histone. Vor der Durchführung der Expressionsanalyse mit Depsipeptid wurde deshalb untersucht, ob eine Hemmung der HDACs durch Depsipeptid in allen NB-Zelllinien gewährleistet war.

Zur Überprüfung der Depsipeptid-Wirkung wurden die Zellen mit 5nM Depsipeptid behandelt und acetyliertes Histon H3 mittels Westernblot-Analyse detektiert. Wie aus Abbildung 14 ersichtlich, führte die Behandlung mit 5 nM Depsipeptid für 48 Stunden in allen behandelten Zelllinien im Vergleich zu unbehandelten Zelllinien zu einer Erhöhung der Histon H3-Acetylierung. Der erhöhte Acetylierungsgrad des Histons H3 zeigte, dass Depsipeptid eine Hemmung der HDAC-Aktivität in allen NB-Zellen induzierte.

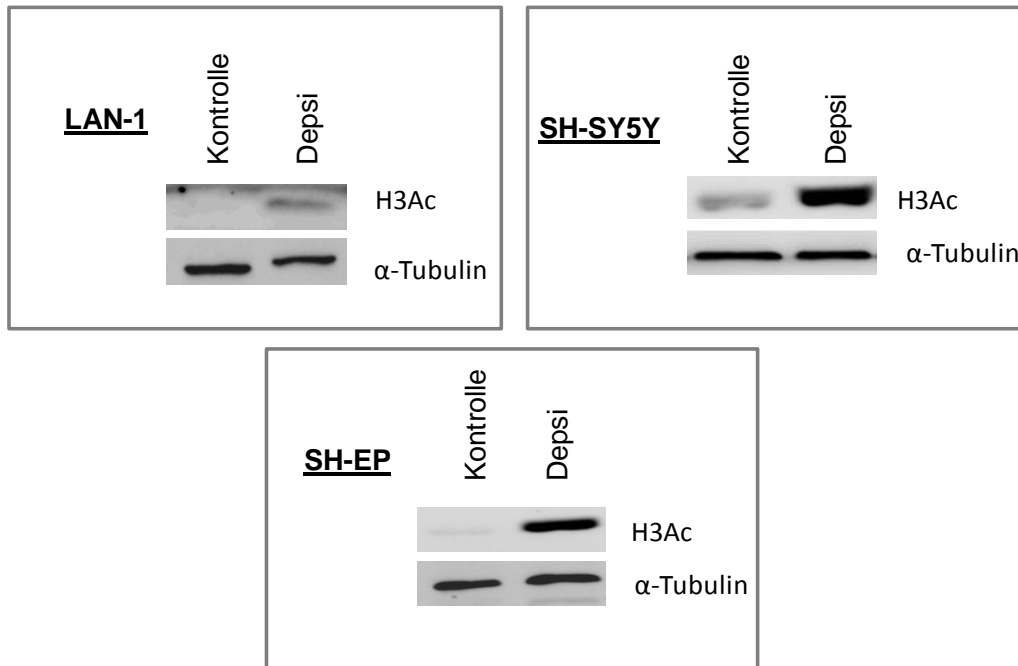


Abbildung 14: Die dargestellte Westernblotanalyse (siehe Kapitel 2.14) zeigt die vermehrte Detektion von acetyliertem Histon H3 nach 48- stündiger Behandlung mit 5 nM Depsipeptid im Vergleich zu unbehandelten NB-Zellen (Kontrolle). α -tubulin diente als Ladungskontrolle. Aufgetragen sind jeweils 30 μ g Protein.

Um festzustellen, wie Depsipeptid die Expression von embryonalspezifischen polycomb-regulierten Zielgenen in NB-Zellen beeinflusst, wurden SH-SY5Y und SH-EP Zellen für 48 Stunden mit und ohne Depsipeptid behandelt und anschließend die mRNA isoliert. Die Überprüfung der Regulation der Gene unter Depsipeptid-Behandlung erfolgte mittels quantitativer RT-PCR (siehe Kapitel 2.13). Zur relativen Bestimmung wurden die Expressionsdaten von den einzelnen Genen auf die Expression des Haushaltgens *HPRT1* abgeglichen. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, ergab die Analyse nach Depsipeptid Behandlung leichte Unterschiede im Expressionsmuster der verschiedenen Zelllinien. Von den untersuchten ectodermalen Marken zeigten beide Zelllinien für *Hoxb1* keine Erhöhung der Expression. Die Expression von *Meis 1* wurde nur in der Zelllinie SH-SY5Y erhöht. Die Gene *OTX1* und *PAX6* dagegen wiesen in beiden Zelllinien eine Aktivierung auf, die unterschiedlich stark war. Für die neuronalen Marker *NEUROG1*, *NKX2,2* und *OLIG2* konnte in beiden Zelllinien eine Aktivierung festgestellt werden, wobei Neurog1 verglichen zu SH-EP

Zellen in SH-SY5Y Zellen weniger stark induziert wurde. Als mesodermaler Marker konnte nur eine signifikante Aktivierung von *ONECUT1* durch Depsipeptid-Behandlung in SH-SY5Y nachgewiesen werden, wohingegen in SH-EP Zellen alle drei Gene eine starke Expression zeigten. Für die weiteren Experimente wurden die drei neurospezifischen Transkriptionsfaktoren Neurog1, *NKX2,2* und *OLIG2* untersucht, da die NB-Zellen aus entarteten Zellen der Neuralleiste entstehen und somit einen neuronalen Ursprung aufweisen. Ausserdem zeigten diese Gene eine vergleichsweise starke Expression in beiden Zelllinien.

Als nächstes wurde untersucht, ob Depsipeptid die Expression von diesen drei Faktoren auch in der aggressiveren Zelllinie LAN-1 verändert. Aus Abbildung 14 wird ersichtlich, dass die Depsipeptid-Behandlung auch in der LAN-1 Zelllinie zu einer Erhöhung der drei neuronalen Gene führte.

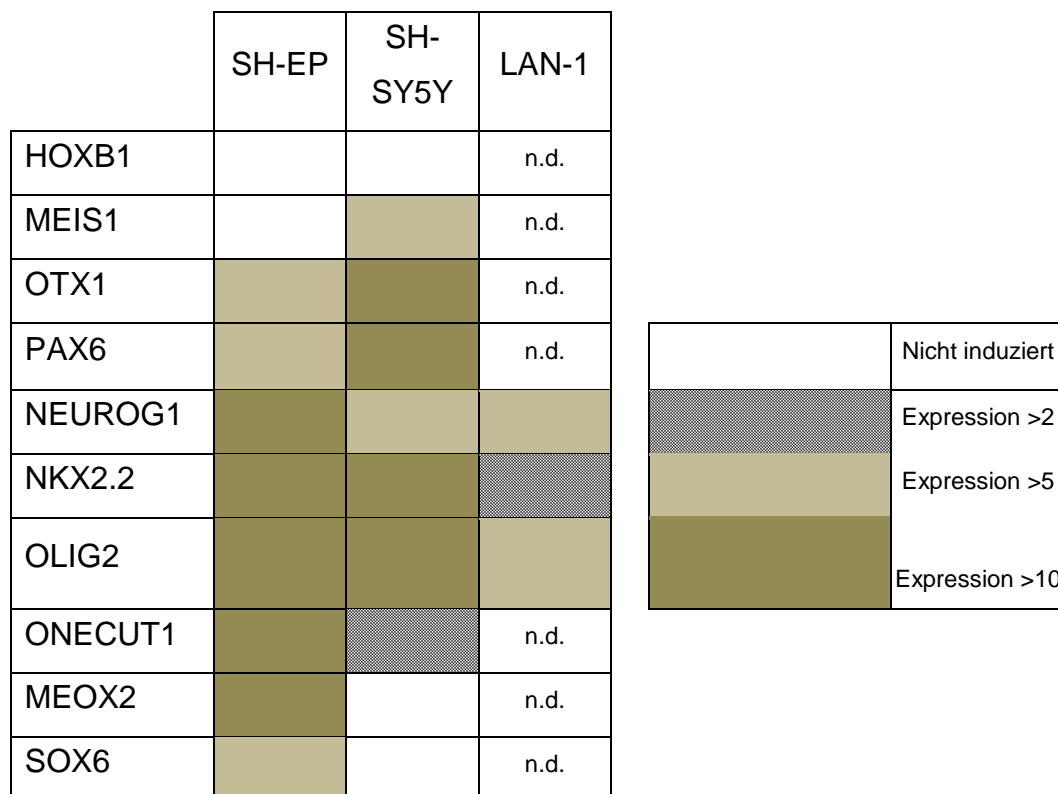


Abbildung 15: Expressionsprofil von Polycomb-spezifischen embryonalen Transkriptionsfaktoren nach Behandlung mit 5 nM Depsipeptid in Neuroblastomzelllinien (SH-SY5Y: N-Typ; SH-EP: S-Typ; LAN-1: N-Typ). Die Expression wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht und zum Haushaltsgen *HPRT1* normalisiert. Die unterschiedlich gefärbten Balken zeigen an, wie stark die Genexpression nach Behandlung war. N.d.: nicht durchgeführt.

3.5.1 Basale Expression von *NEUROG1*, *NKX2,2* und *OLIG2* in NB-Zellen

Als nächstes wurde die basale Expression von *NEUROG1*, *NKX2,2* sowie *OLIG2* in den drei NB-Zellen untersucht. Der Nachweis erfolgte wie in Kapitel 2.13 erläutert mittels der quantitativen RT-PCR. Die Expression der Gene wurde auf das *house keeping*-Gen *HPRT1* relativiert. Da es für Neuroblastomzellen ein unmittelbarer Vergleich zum (krebsfreien, nicht entarteten) Normalzustand fehlt, wurde hier die Expression von *NEUROG1* in der LAN-1-Zelllinie auf 1 gesetzt, da dieses Gen die höchste Expression von allen Genen zeigte und die restlichen Proben wurden darauf normalisiert. Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, war das *Neurog1* Gen am stärksten in LAN-1 exprimiert und in anderen beiden Zelllinien weniger stark exprimiert. Die Gene *NKX2,2* und *OLIG2* zeigten in der LAN-1 Zelllinie im Vergleich zu *Neurog1* eine schwache Expression. In der Zelllinie SH-SY5Y konnten diese Gene nicht detektiert werden. In der SH-EP Zelllinie war eine schwache Expression von *NKX2.2* nachweisbar, wohingegen *Olig2* nicht detektiert werden konnte.

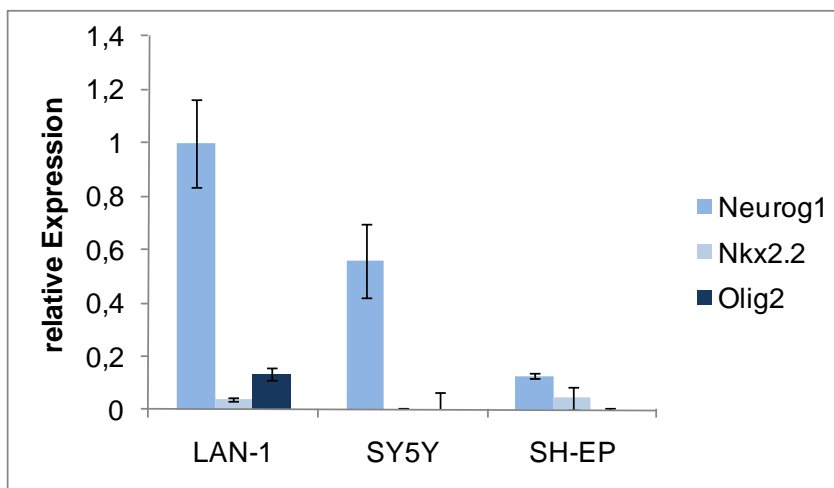


Abbildung 16: basale Expression der neurospezifischen Gene *NEUROG1*, *NKX2,2* sowie *OLIG2* in den Neuroblastomzellen LAN-1, SH-SY5Y und SH-EP, relativ zum Haushaltsgen *HPRT1*. Das mittlere Expressionsniveau des Gens *NEUROG1* aus der LAN-1 Zelllinie wurde als 1 genommen und die übrigen Proben entsprechend normiert.

3.6 Regulation der neuronalen Gene *NEUROG1*, *NKX2,2* und *OLIG2* unter Depsipeptid, ATRA und DZNep

Die Tatsache, dass Depsipeptid in der Lage ist, die neuronalen Gene zu induzieren, ließ die Frage aufkommen, ob ATRA und DZNep deren Expression auch beeinflussen.

Zur besseren Veranschaulichung und zum Vergleich der Expressionsdaten zwischen den einzelnen Zelllinien sind die aus RT-PCR gewonnenen Daten für die neuronalen Gene nach Depsipeptid-Behandlung nochmals in Abbildung 17 dargestellt. Diese Beobachtung konnte für alle drei Zelllinien insgesamt in drei Experimenten nachgewiesen werden.

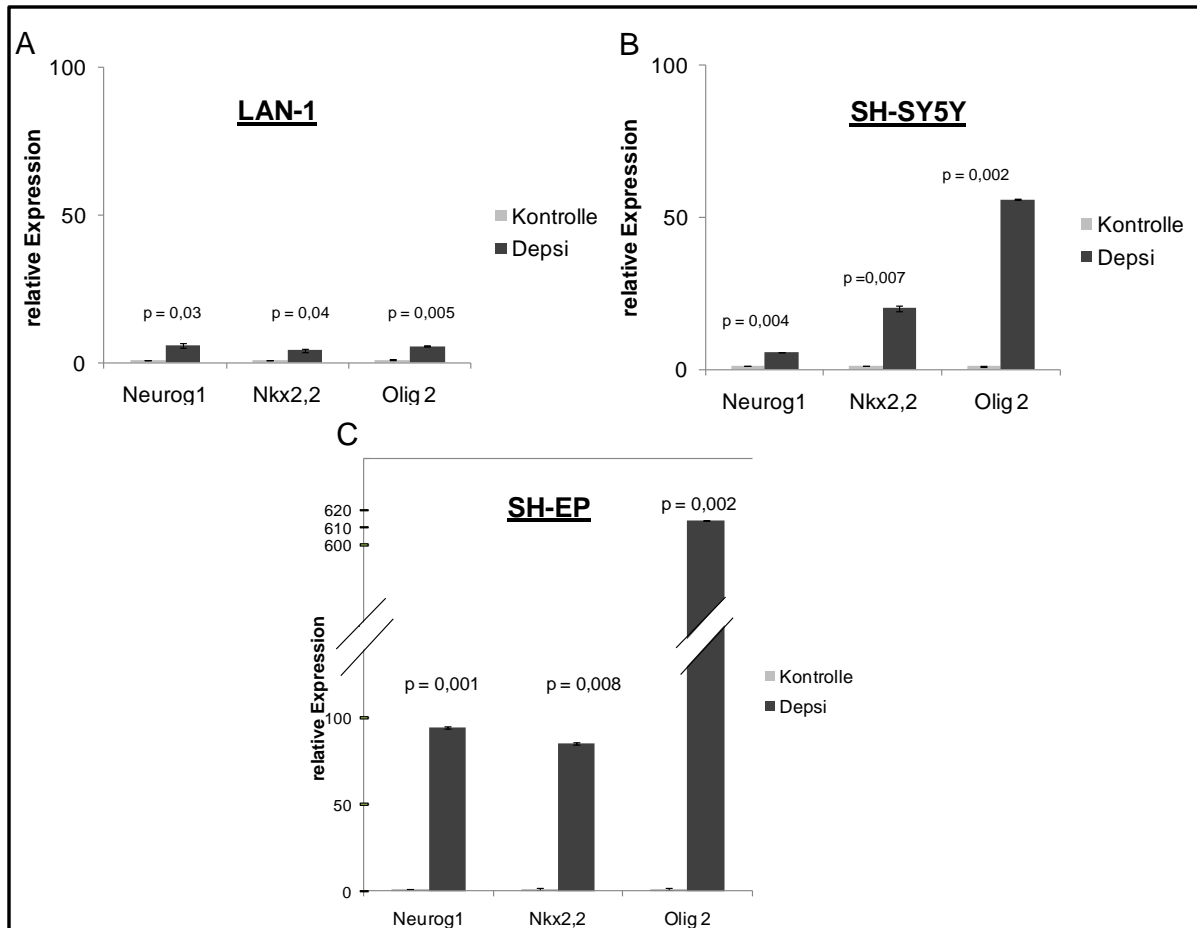


Abbildung 17: Depsipeptid induzierte die Expression von *Neurog1*, *NKX2,2* und *Olig2* nach Behandlung der NB-Zellen mit 5 nM Depsipeptid für 48 Stunden. Die jeweilige Expression wurde mittels RT-PCR (siehe Kapitel 2.13) analysiert. Als Haushaltsgen diente *HPRT1*. Die untersuchten Zelllinien wurden hierbei zu den unbehandelten Zellen (Kontrolle) in Relation gesetzt. In Abbildung C ist ein *Cut-Off* eingefügt, um das Expressionsniveau deutlicher darzustellen. Der p-Wert (Signifikanz) für den Vergleich zwischen Kontrolle zu Depsi-behandelten Zellen ist jeweils über dem entsprechenden Balken angegeben.

ATRA

Behandlungen mit Retinoiden - wie bereits in der Literatur beschrieben – kann eine Differenzierung des unreifen NB-Tumors zum gutartigen Ganglioneurom induzieren. Auch ist bekannt, dass Retinoid-Behandlungen *in vitro* eine neuronale Differenzierung der NB-Zellen bewirken (93). Im Rahmen dieser Arbeit konnte dies auch für die N-Typ-Zelllinien LAN-1 und SH-SY5Y bestätigt werden (siehe Kapitel 3.2). Da im Neuroblastom der Vergleich zum (nicht entarteten, differenzierten) Normalzustand fehlt, werden Retinoid- differenzierte Zellen in *in vitro* Experimenten öfters als (nicht entartete) Normalzellen betrachtet.

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob der durch ATRA induzierte Differenzierungsvorgang mit einer Aktivierung der drei neuronalen Gene *NEUROG1*, *NKX2,2* und *OLIG2* einhergeht. Obwohl die SH-EP-Zellen keine Differenzierung nach ATRA-Behandlung aufwiesen, wurden auch diese für die nachfolgende Analyse verwendet. Zu diesem Zweck wurden Neuroblastomzellen für 48 Stunden mit 25 μ M ATRA behandelt, anschließend die mRNA isoliert und mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die Behandlung wurde für 48 Stunden durchgeführt, da eine beginnende Differenzierung der N-Typ Zelllinien schon zu diesem Zeitpunkt sichtbar war. Die Analyse der Gene wurde zu HPRT1 relativiert. Die Expressionsanalyse ergab für die Zelllinie LAN-1 eine Hochregulation des Gens *OLIG2* und für die Zelllinie SH-SY5Y eine Aktivierung des Gens *Neurog1* (Abbildung 18).

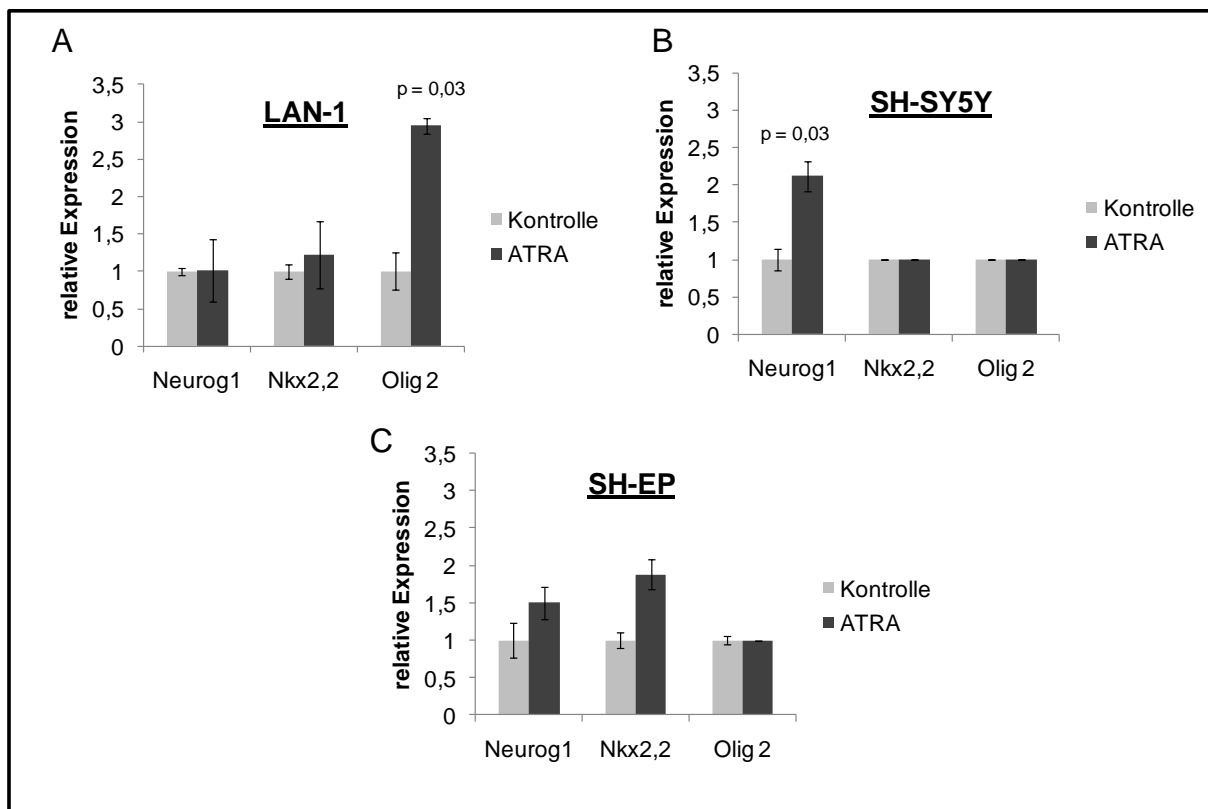


Abbildung 18: Diagramme der Expressionsanalyse der Gene *Neurog1*, *NKX2,2* und *Olig2* mittels quantitativer RT-PCR in Neuroblastomzellen LAN-1, SH-SY5Y sowie SH-EP nach Behandlung mit 25 μ M ATRA für 48 Stunden. Die Expression wurde auf das Haushaltsgen HPRT1 normalisiert. Die unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurden auf 1 gesetzt und die übrigen Proben entsprechend in Relation gesetzt. Die p-Werte sind nur bei den signifikanten Unterschieden angegeben. Die Regulation der Gene durch ATRA war unterschiedlich in allen drei Zelllinien.

Tan *et al.*, konnten zeigen, dass DZNep in Kolon- und Mammakarzinomzellen Polycomb-Target-Gene reaktivieren kann (47). Um zu überprüfen, ob DZNep in NB-Zellen die Polycomb-Target-Gene *NEUROG1*, *NKX2,2* sowie *OLIG2* hochreguliert, wurden Neuroblastomzellen für 72 Stunden mit DZNep behandelt und einer Expressionsanalyse unterzogen. Als Behandlungszeit wurde 72 Stunden gewählt, da die Apoptose erst nach dieser Zeit in allen NB-Zellen am stärksten induziert wurde. Die Ergebnisse der RT-PCR-Analyse sind in Abbildung 19 dargestellt. Für die Zelllinie LAN-1 konnte gezeigt werden, dass es unter DZNep zur signifikanten Abnahme der *NKX2,2* und *Olig2* Expression kam. Die *Neurog1*-Expression zeigte keine Veränderung. In den Zelllinien SH-SY5Y und SH-EP waren keine signifikanten Veränderungen auf der Expressionsebene der drei untersuchten Gene zu beobachten.

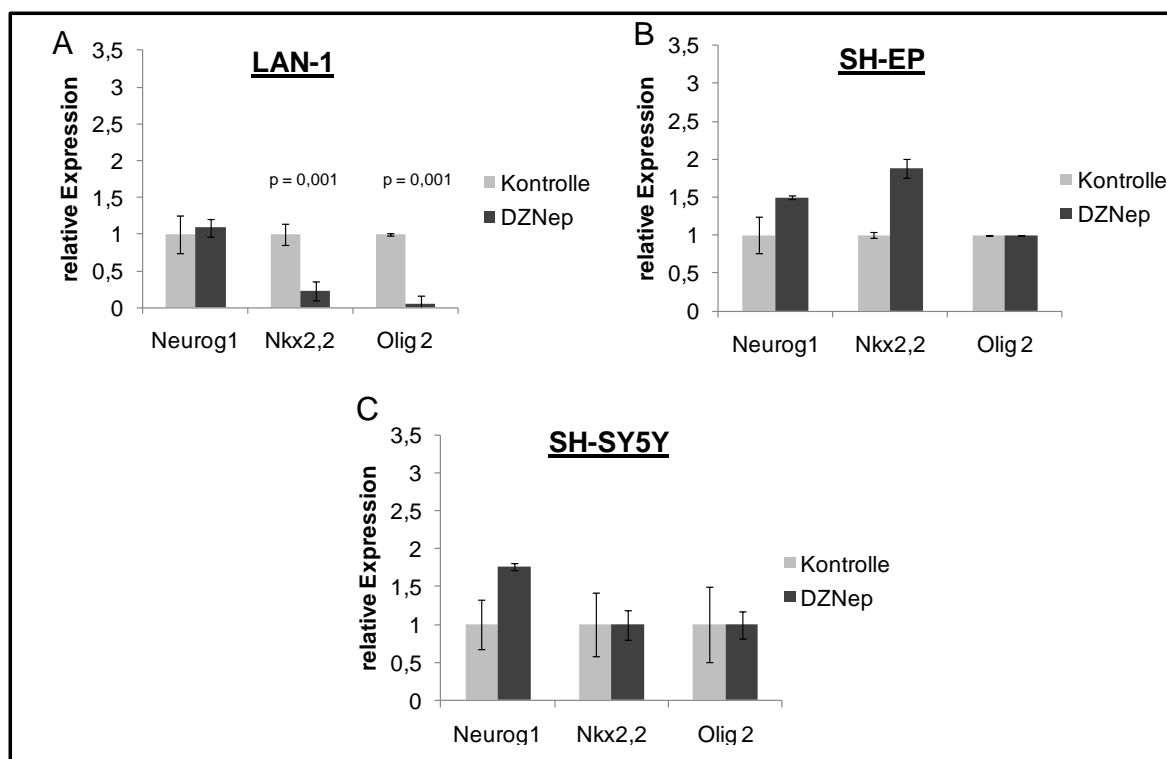


Abbildung 19. Diagramme der relativen Expression der Gene *Neurog1*, *NKX2,2* und *Olig2* in Neuroblastomzellen nach Behandlung mit 5 μ M DZNep für 72 Stunden. Die Expressionsanalyse wurde mittels RT-PCR durchgeführt. Als Haushaltsgen diente HPRT1. Die unbehandelten Zellen (Kontrolle) wurden auf 1 gesetzt und die behandelten Proben entsprechend normiert. Die p-Werte sind nur bei den signifikanten Unterschieden angegeben. DZNep erbrachte keine signifikante Erhöhung der drei Gene.

3.7 In vivo Besetzung der Neurog1, NKX2,2 und Olig2 Promotoren durch H3K4me3 und H3K27me3

Mehrere Studien zeigten, dass sowohl in murinen als auch in humanen ES-Zellen die Promotoren der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Gene sowohl mit der aktivierenden

Histonmodifikation H3K4me3 als auch mit der reprimierenden Histonmodifikation H3K27me3 bivalente Domänen aufweisen (54;71) .

Um zu überprüfen, wie diese Modifikationen an den Promotoren dieser Gene in NB-Zellen verändert sind, wurden unbehandelte NB-Zellen für ein Chromatin-Immunpräzipitations-Experiment (siehe Kapitel 2.15) aufgearbeitet. Die Immunpräzipitation erfolgte mit Antikörpern gegen H3K27me3, H3K4me3 und einem Kontrollantikörper IgG (Negativkontrolle). Die resultierenden ChIPs wurden mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Für die PCR wurden Primer verwendet, welche jeweils einen Bereich aus der Promotorregion der drei Gene amplifizieren (siehe Tabelle 5). Die relative Besetzung von H3K27me3 und H3K4me3 an den jeweiligen Promotoren im Vergleich zur Negativkontrolle IgG ist in Abbildung 20 angegeben. An allen drei Promotoren war im Vergleich zur Negativkontrolle eine hohe Anreicherung von H3K27me3 zu beobachten. H3K4me3 zeigte beim Neurog1-Promotor in allen Zelllinien keinen Unterschied zur Negativkontrolle. An den *NKX2,2*- und *OLIG2*-Promotoren konnte nur in der Zelllinie SH-EP H3K4me3 detektiert werden.

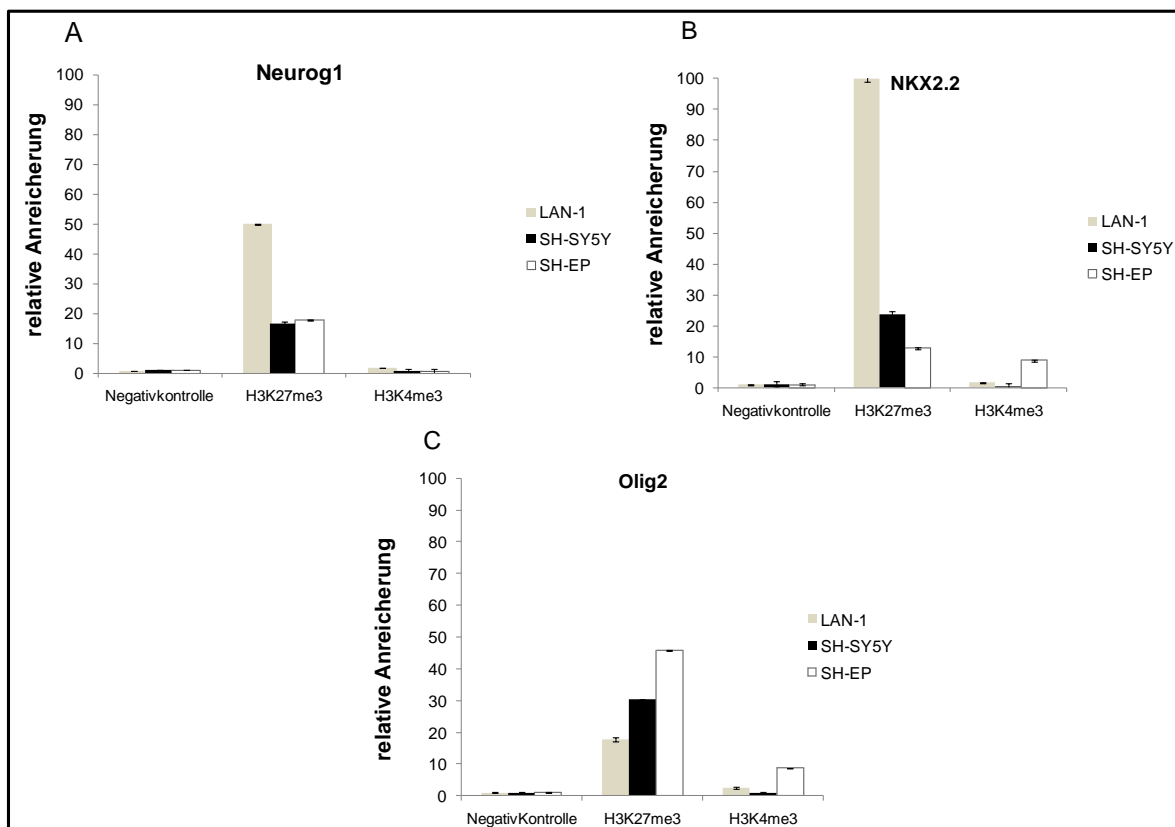


Abbildung 20: Dargestellt ist die relative Anreicherung von H3K27me3 und H3K4me3 an Promotorbereichen von *Neurog1* (A), *NKX2,2* (B) und *Olig2* (C) in NB-Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle (IgG). Mit exponentiell wachsenden NB-Zellen wurde ein ChIP-Assay (siehe Kapitel 2.15) mit den Antikörpern H3K27me3, H3K4me3 durchgeführt. Die präzipitierte DNA wurde anschließend mittels *Realtime*-PCR (siehe Kapitel 2.13) analysiert. An allen Promotobereichen war eine Anreicherung von der polycomb vermittelten Histonmodifikation H3K27me3 zu

beobachten. Eine bivalente Histonmodifikation mit H3K27me3 und H3K4me3 war in der SH-EP Zelllinie am Promotorbereich von *NKX2.2* und *Olig2* detektierbar.

3.8 Veränderung der Histonmodifikationen unter Depsipeptid an Promotoren der neuronalspezifischen Gene

3.8.1 H3K27me3

Aus ES-Zellen ist bekannt, dass Gene, die ursprünglich bivalente Domänen enthielten, nach der Differenzierung entweder verstärkt von H3K27- oder H3K4-Trimethylierung besetzt sind. D.h. bei einer Aktivierung zeigen diese Gene eine Erhöhung von H3K4me3 und bei einer Genrepression eine Erhöhung in H3K27me3 (72). Des Weiteren sind aus Studien mit Histondeacetylaseinhibitoren in Krebszellen bekannt, dass diese die Histonmodifikation EZH2 und H3K27me3 global verändern können (98). Daher war es interessant zu überprüfen, ob die durch Depsipeptid induzierte Aktivierung der Gene mit einer Veränderung der Histonmodifikationen H3K27me3 und H3K4me3 einherging.

Um zu überprüfen, inwieweit sich die Histonmodifikation H3K27me3 am Promotorbereich von den Genen unter Depsipeptid-Behandlung verändert, wurden NB-Zellen mit und ohne Depsipeptid für 48 Stunden behandelt. Danach wurde eine ChIP-Analyse (siehe Kapitel 2.15) mit Antikörpern gegen H3K27me3 und H3K4me3 durchgeführt und mittels PCR die Promotoreregionen von *NEUROG1*, *NKX2,2* und *OLIG2* in allen drei Zelllinien untersucht. Die DNA vor der IP (*Input*) und nach der IP wurde mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die amplifizierte DNA wurde auf anhand des *Inputs* relativiert. Wie in Abbildung 21 zu sehen ist, erbrachte die Inkubation mit Depsipeptid keine signifikante Veränderung der Histonmodifikation H3K27me3 an den Promotorregionen von *NEUROG1*, *NKX2,2* und *OLIG2*. Die Daten zeigten, dass die Aktivierung von *NEUROG1*, *NKX2,2* und *OLIG2* nicht durch eine Abnahme in der Histonmodifikation H3K27me3 bewirkt wurde.

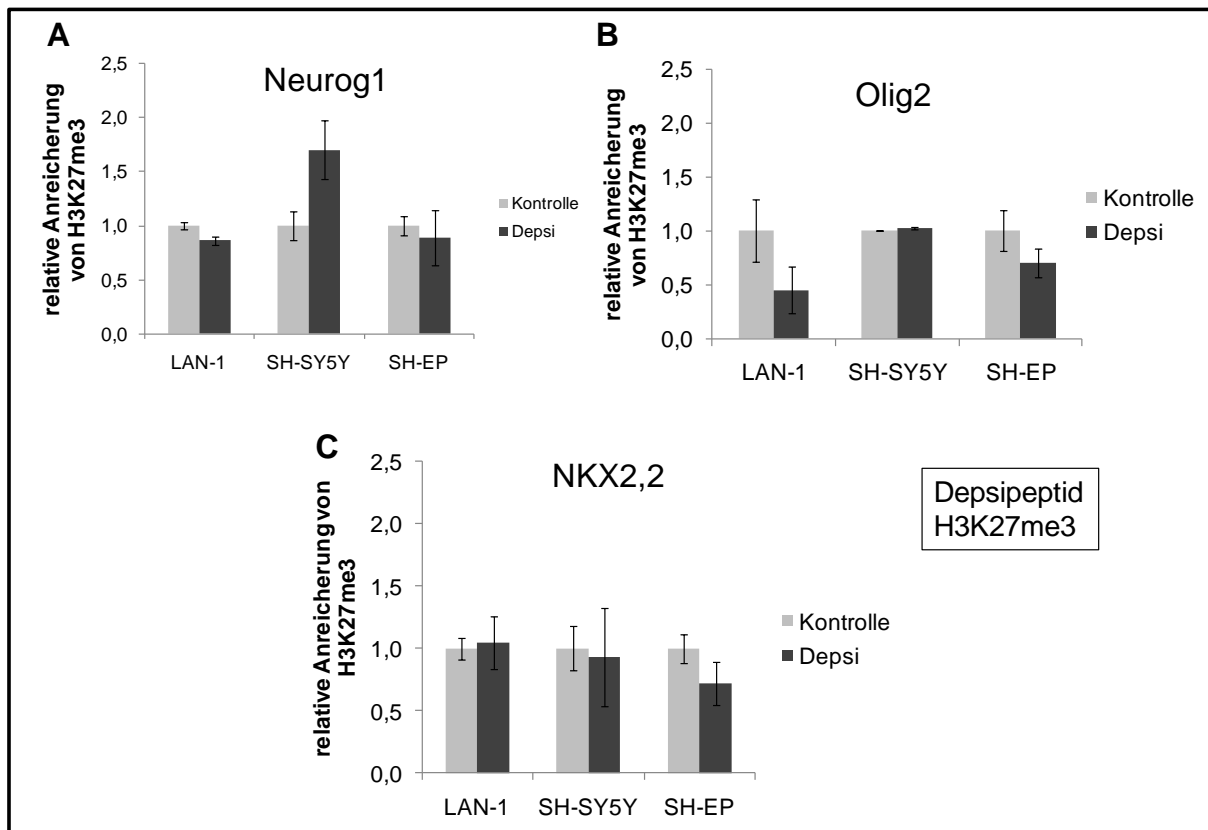


Abbildung 21: Depsipeptid induzierte keine signifikante Veränderung von H3K27me3 am Promotorbereich von *NEUROG1* (A), *NKX2,2* (B) sowie *OLIG2* (C). NB-Zellen wurden für 48 Stunden mit und ohne Depsipeptid kultiviert und anschließend einer ChIP-Analyse (siehe Kapitel 2.15) mit anti-H3K27me3 unterzogen. Mittels quantitativer PCR wurde die Anreicherung von H3K27me3 an den Promotorregionen von *NEUROG1*, *NKX2,2* und *OLIG2* untersucht. Dargestellt ist die relative Anreicherung von H3K27me3 relativ zum *Input*. Die unbehandelte Zelllinie (Kontrolle) wurde auf 1 gesetzt und die behandelten Proben entsprechend normiert.

3.8.2 H3K4me3

Um zu überprüfen, ob Depsipeptid an den Promotorregionen von *NEUROG1*, *NKX2,2* und *OLIG2* eine Veränderung der Histonmodifikation H3K4me3 beeinflusste, wurden die mit Depsipeptid behandelten Zellen einer ChIP-Analyse unterzogen. Die Resultate sind der Abbildung 22 zu entnehmen. Die Ergebnisse der ChIP-Analysen wiesen für *NEUROG1* keine signifikante Erhöhung von H3K4me3 in LAN-1-Zellen auf. Jedoch war in den anderen beiden Zelllinien eine Hochregulation von H3K4me3 am Neurog1-Promotor zu beobachten. Für *NKX2,2* zeigten die Zelllinien LAN-1 und SH-EP keine Induktion von H3K4me3. Nur in SH-SY5Y war am Promotor eine Induktion dieser Gene zu finden. Am *OLIG2* Promotor was keine signifikante Erhöhung von H3K4me3 in LAN-1 zu beobachten. SH-SY5Y- und SH-EP-Zellen wiesen dagegen eine Anreicherung auf. Die Ergebnisse zeigen, dass die Aktivierung der Gene nicht allein durch Erhöhung der Histonmodifikation H3K4me3 hervorgerufen worden sein kann, da sich diese Modifikation nicht an allen Promotorregionen veränderte.

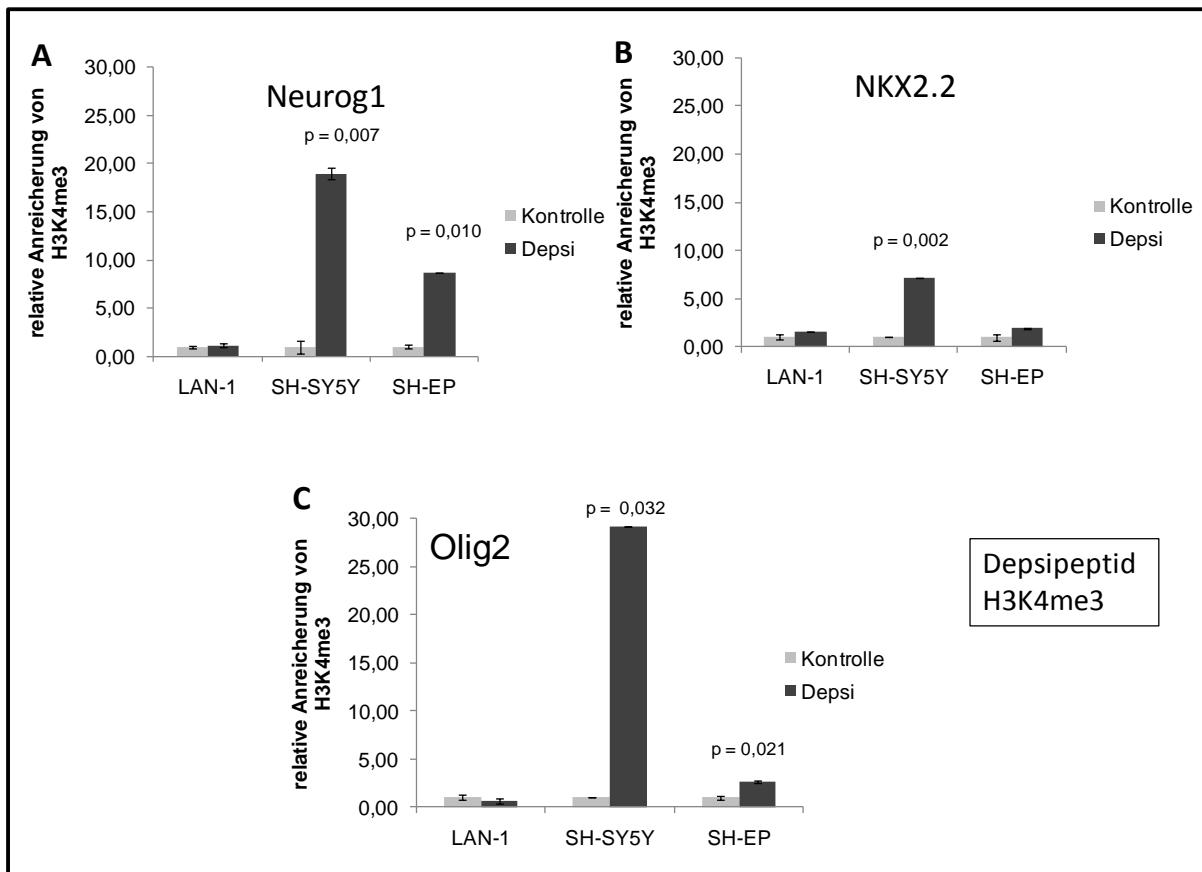


Abbildung 22: Depsipeptid induzierte Erhöhung der H3K4 Trimethylierung am Promotorbereich von *NEUROG1*, *NKX2,2* sowie *OLIG2*. NB-Zellen wurden für 48 Stunden mit und ohne Depsipeptid kultiviert und anschließend einer ChIP-Analyse (siehe Kapitel 2.15) mit anti-H3K4me3 unterzogen. Mittels quantitativer PCR wurde die Anreicherung von H3K4me3 an den Promotorregionen von *NEUROG1*, *NKX2,2* und *OLIG2* untersucht. Gezeigt ist die relative Anreicherung von H3K4me3 in Relation zum *Input*. Die unbehandelte Zelllinie (Kontrolle) wurde als 1 und die restlichen Proben dazu in Relation gesetzt. Die angegebenen p-Werte verdeutlichen, welche Unterschiede signifikant sind.

3.8.3 H3K9ac

Da vorangehende Versuche zeigten, dass weder die Veränderungen in H3K27me3 noch H3K4me3 für die Aktivierung von den Genen verantwortlich sein könnte, wurde als nächstes die Acetylierung an den Promotorbereichen untersucht.

Mittels chIP-Analyse (siehe Kapitel 2.15) wurden die Promotoreregionen von *NEUROG1*, *NKX2,2* und *OLIG2* auf Besetzung von H3K9ac untersucht. Wie in Abbildung 23 zu sehen ist, war an allen Promotorregionen von allen Zelllinien eine signifikante Zunahme von H3K9ac zu vernehmen. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass in NB-Zellen die Aktivierung von Polycomb-regulierten, embryonal-spezifischen Transkriptionsfaktoren durch eine Erhöhung der Acetylierung von H3K9 an den jeweiligen Promotoren hervorgerufen wurde.

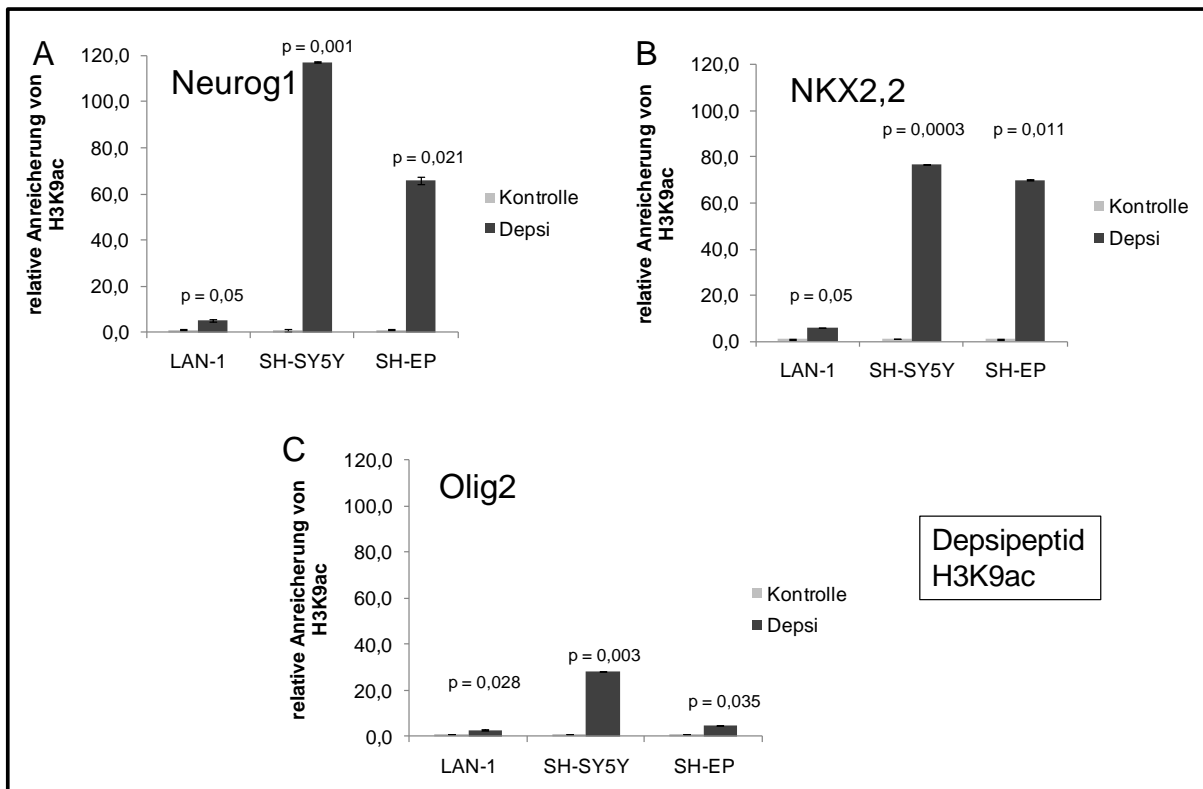


Abbildung 23: Diagramme zur relativen Anreicherung von H3K9ac nach Depsipeptid-Behandlung der Zelllinien LAN-1, SH-SY5Y und SH-EP. Depsipeptid induzierte einen signifikanten Anstieg der H3K9 Acetylierung am Promotorbereich von *Neurog1*, *NKX2,2* sowie *Olig2*. NB-Zellen wurden für 48h Stunden mit und ohne Depsipeptid kultiviert und anschließend einer ChIP-Analyse (siehe Kapitel 2.15) mit anti-H3K9ac unterzogen. Mittels quantitativer PCR wurde die Anreicherung von H3K9ac an den Promotorregionen von *Neurog1*, *NKX2,2* und *Olig2* untersucht. Die angegebenen p-Werte verdeutlichen, welche Unterschiede signifikant sind.

3.9 Veränderung von Histonmodifikationen an den Promotorregionen der neuronalspezifischen Gene unter ATRA

3.9.1 H3K27me3

Um zu untersuchen, ob ATRA H3K27me3 an den Promotorregionen von *Neurog1*, *NKX2,2* und *Olig2* beeinflusste, wurden zu diesem Zweck NB-Zellen mit und ohne 25 µM ATRA behandelt und einer ChIP-Analyse unterzogen. Die immunpräzipitierten Proben wurden anschließend mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Die Diagramme in Abbildung 24 A-C zeigen, dass eine signifikante Abnahme von H3K27me3 nur am Promotorbereich von *Olig2* in der Zelllinie LAN-1 zu vernehmen war.

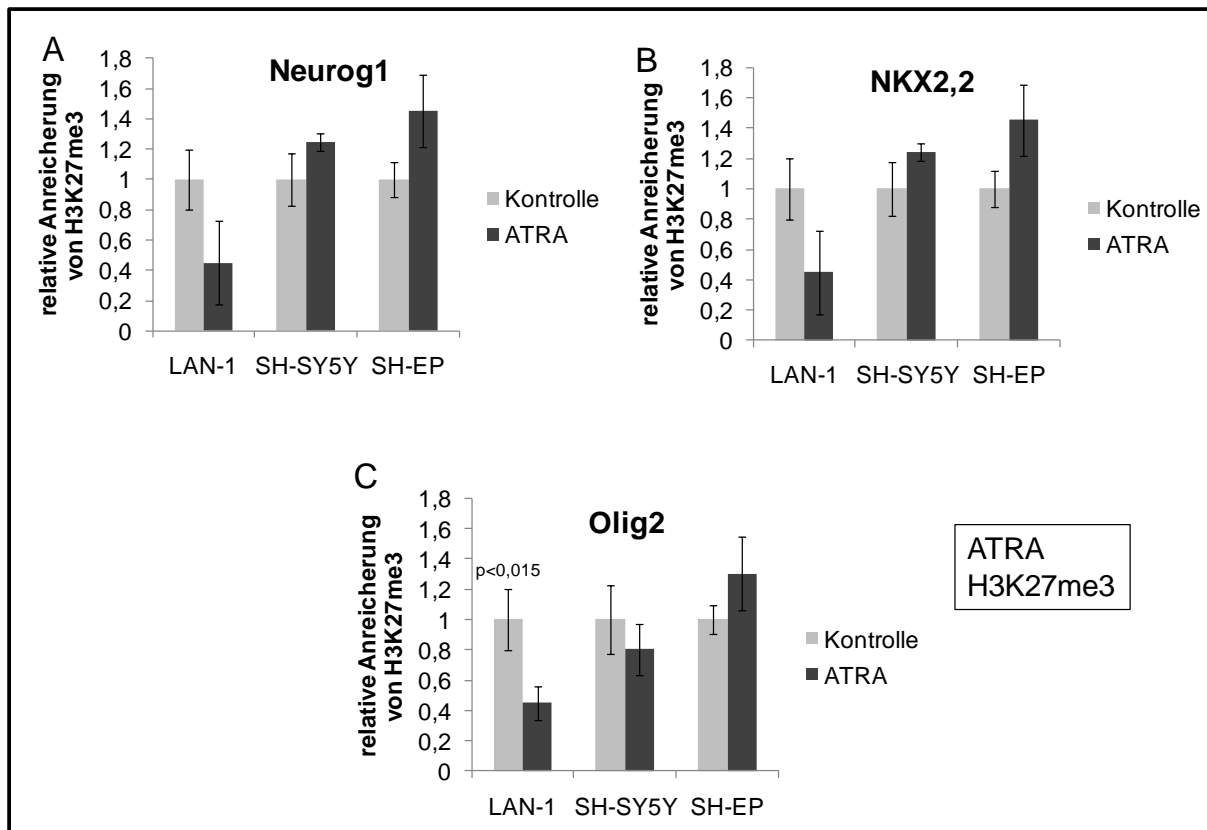


Abbildung 24 A-C: Diagramme zur relativen Anreicherung von H3K27me3 nach ATRA-Behandlung der Zelllinien LAN-1, SH-SY5Y und SH-EP. ATRA induzierte nur eine signifikante Abnahme der H3K27me3 Modifikation am Promotorbereich von *Olig2*. NB-Zellen wurden für 48 Stunden mit und ohne ATRA kultiviert und anschließend einer ChIP-Analyse mit anti-H3K27me3 unterzogen. Mittels quantitativer PCR wurde die Anreicherung von H3K27me3 an den Promotorregionen von *Neurog1*, *NKX2,2* und *Olig2* untersucht. Die angegebenen p-Werte verdeutlichen, welche Unterschiede signifikant sind.

3.9.2 H3K4me3

Im Weiteren wurde der Einfluss von ATRA auf die Histonmodifikation H3K4me3 am Promotorbereich untersucht. Dazu wurden die NB-Zellen mit ATRA behandelt und eine ChIP-Analyse (siehe Kapitel 2.15) mit Antikörper gegen H3K4me3 durchgeführt. Die anschließende RT-PCR-Analyse ergab eine signifikante Erhöhung von H3K4me3 am Promotorbereich von *Neurog1* in SH-SY5Y- und SH-EP-Zellen sowie am *NKX2,2*-Promotor in SH-SY5Y-Zellen. Keiner der Zellen wies eine Zunahme der Trimethylierung von H3K4me3 am *Olig2*-Promotor auf (Abbildung 25 A-C).

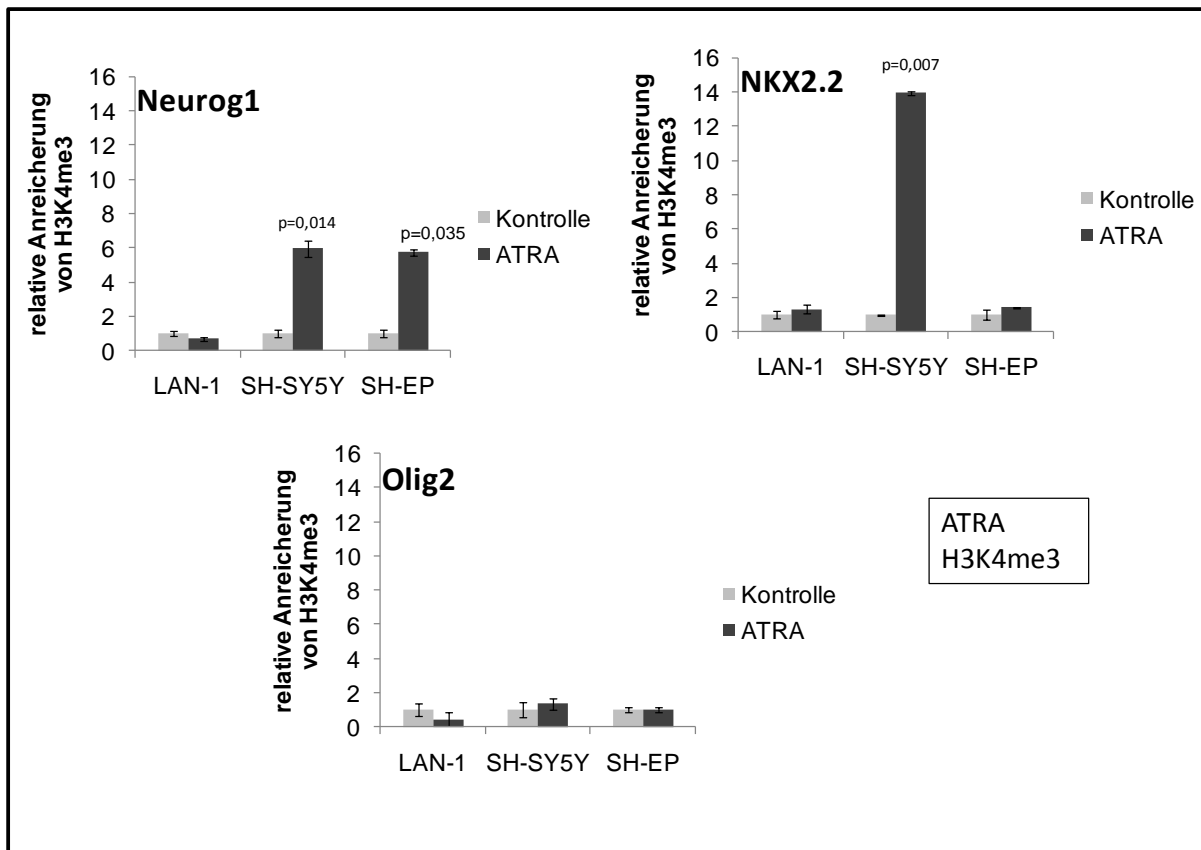


Abbildung 25 A-C: Diagramme zur relativen Anreicherung von H3K4me3 nach ATRA-Behandlung der Zelllinien LAN-1, SH-SY5Y und SH-EP. Die ATRA-Behandlung zeigte eine Zunahme von H3K4me3 Modifikation am Promotorbereich von *Neurog1* und *NKX2,2*. NB-Zellen wurden für 48 Stunden mit und ohne ATRA kultiviert und anschließend einer ChIP-Analyse (siehe Kapitel 2.15) mit anti-H3K4me3 unterzogen. Mittels quantitativer PCR wurde die Anreicherung von H3K4me3 an den Promotorregionen von *Neurog1*, *NKX2,2* und *Olig2* untersucht. Die angegebenen p-Werte verdeutlichen, welche Unterschiede signifikant sind.

3.9.3 H3K9ac

Wie aus Abbildung 26 zu sehen ist, erbrachte die ChIP-Analyse mit dem Antikörper gegen H3K9ac keine signifikanten Veränderungen in der Histonmodifikation H3K9ac an den Promotorbereichen von *Neurog1*, *NKX2,2* sowie *Olig2*.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, dass ATRA eine zelltyp- und gentyp-spezifische Veränderung der Histonmodifikation H3K4me3 zeigte.

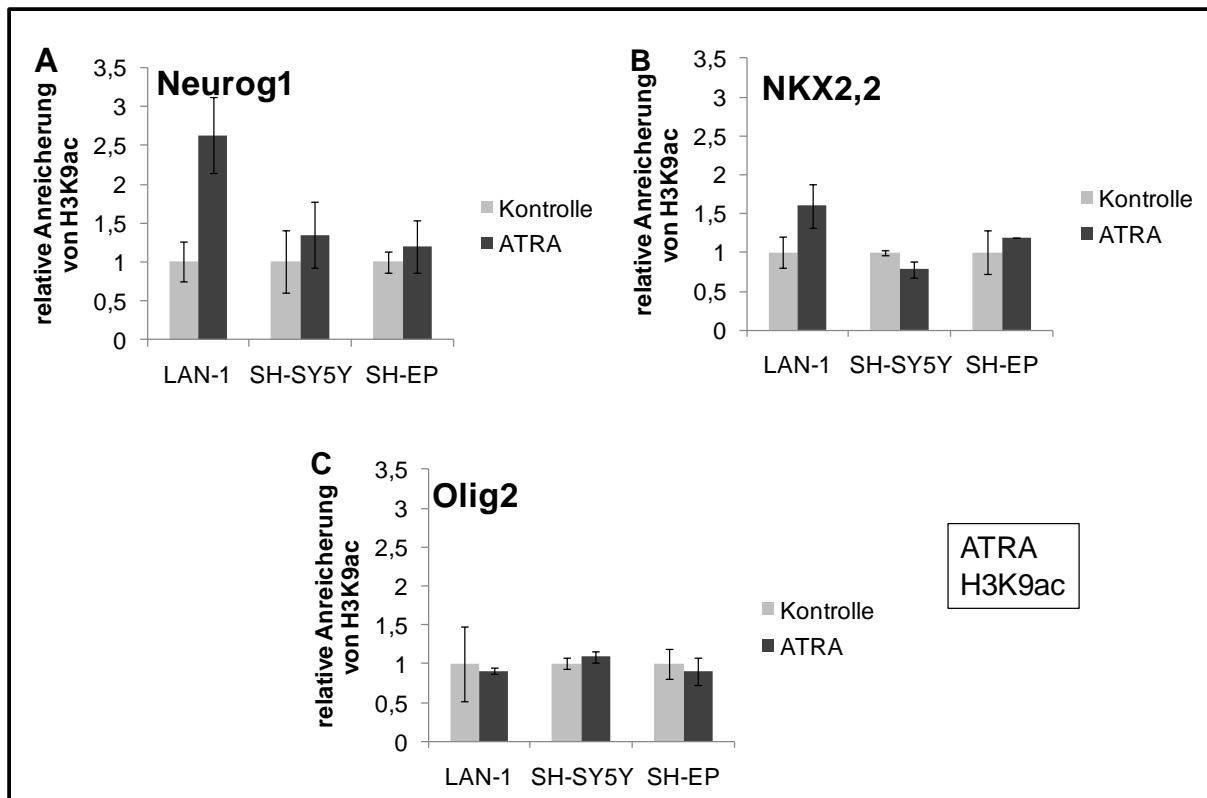


Abbildung 26: Diagramme zur relativen Anreicherung von H3K9ac nach ATRA-Behandlung der Zelllinien LAN-1, SH-SY5Y und SH-EP. ATRA Behandlung erbrachte keine signifikante Veränderung von H3K9ac am Promotorbereich von *Neurog1*, *NKX2,2* sowie *Olig2*. NB-Zellen wurden für 48h Stunden mit und ohne ATRA kultiviert und anschließend einer ChIP-Analyse (siehe Kapitel 2.15) mit anti-H3K9ac unterzogen. Mittels quantitativer PCR wurde die Anreicherung von H3K9ac an den Promotorregionen von *Neurog1*, *NKX2,2* und *Olig2* untersucht.

3.10 Veränderung der Histonmodifikationen an den Promotorregion der neuronalspezifischen Gene unter DZNep

3.10.1 H3K27me3

Tan *et al.*, zeigten, dass DZNep sowohl global als auch promotorspezifisch selektiv die Trimethylierung von H3K27me3 verändern kann (47). Um nachzuweisen, ob solch eine Veränderung an den Genpromotoren in NB-Zellen zu finden ist, wurden ChIP-Analysen durchgeführt. Aus Abbildung 27 ist ersichtlich, dass es unter DZNep-Behandlungen sowohl zur Zunahme als auch zur Abnahme von H3K27me3 kam. So war zum Beispiel eine signifikante Zunahme von H3K27me3 am *Neurog1*- und *Olig2*-Promotor in der Zelllinie LAN-1 nachzuweisen (Abbildung 27A und B). Eine signifikante Abnahme von H3K27me3 war in SH-SY5Y-Zellen an allen Promotoren zu finden. Die SH-EP-Zelllinie zeigte die Abnahme in H3K27me3 nur an den Promotoren *NKX2,2* und *Olig2*.

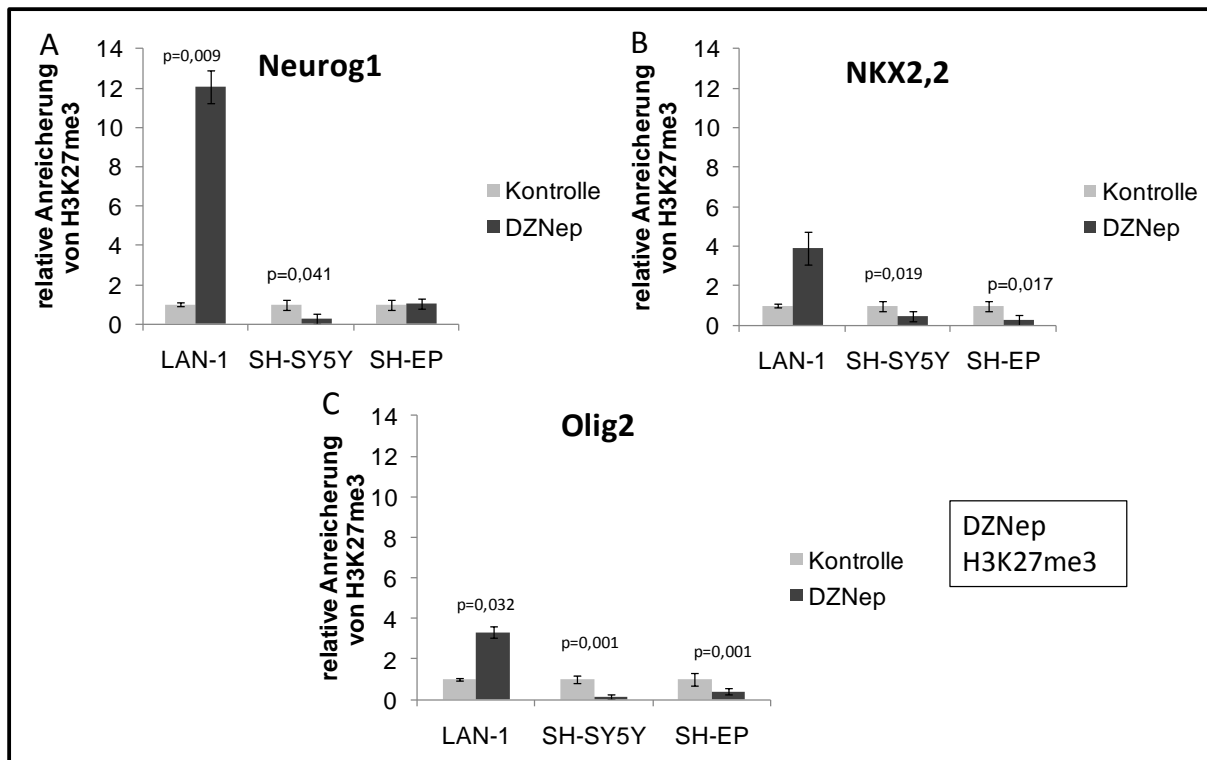


Abbildung 27: Diagramme zur relativen Anreicherung von H3K27me3 nach DZNep-Behandlung in den Zelllinien LAN-1, SH-SY5Y und SH-EP. DZNep induzierte eine signifikante Erhöhung von H3K27me3 an den drei untersuchten Promotoren *Neurog1* und *Olig2* in LAN-1, und eine signifikante Abnahme der H3K27me3-Modifikation an allen Promotorbereichen in SY5Y und an den Promotorbereichen *NKX2,2* und *Olig2* in SH-EP. NB-Zellen wurden für 72 Stunden mit und ohne 5 μ M DZNep kultiviert und anschließend einer ChIP-Analyse (siehe Kapitel 2.15) mit anti-H3K27me3 unterzogen. Mittels quantitativer PCR wurde die Anreicherung von H3K27me3 an den Promotorregionen von *Neurog1*, *NKX2,2* und *Olig2* untersucht. Die angegebenen p-Werte verdeutlichen, welche Unterschiede signifikant sind.

3.10.2 H3K4me3

Die ChIP-Analyse zeigte ausschließlich für die untersuchten SH-SY5Y-Zellen mit einer deutlichen Abnahme der Histonmodifikation H3K4me3 an den Genpromotoren einen signifikanten Unterschied zwischen unbehandelten und DZNep-behandelten Zelllinien. Bei den untersuchten LAN-1 und SH-EP-Zelllinien war dagegen kein Unterschied nachweisbar (Abbildung 28).

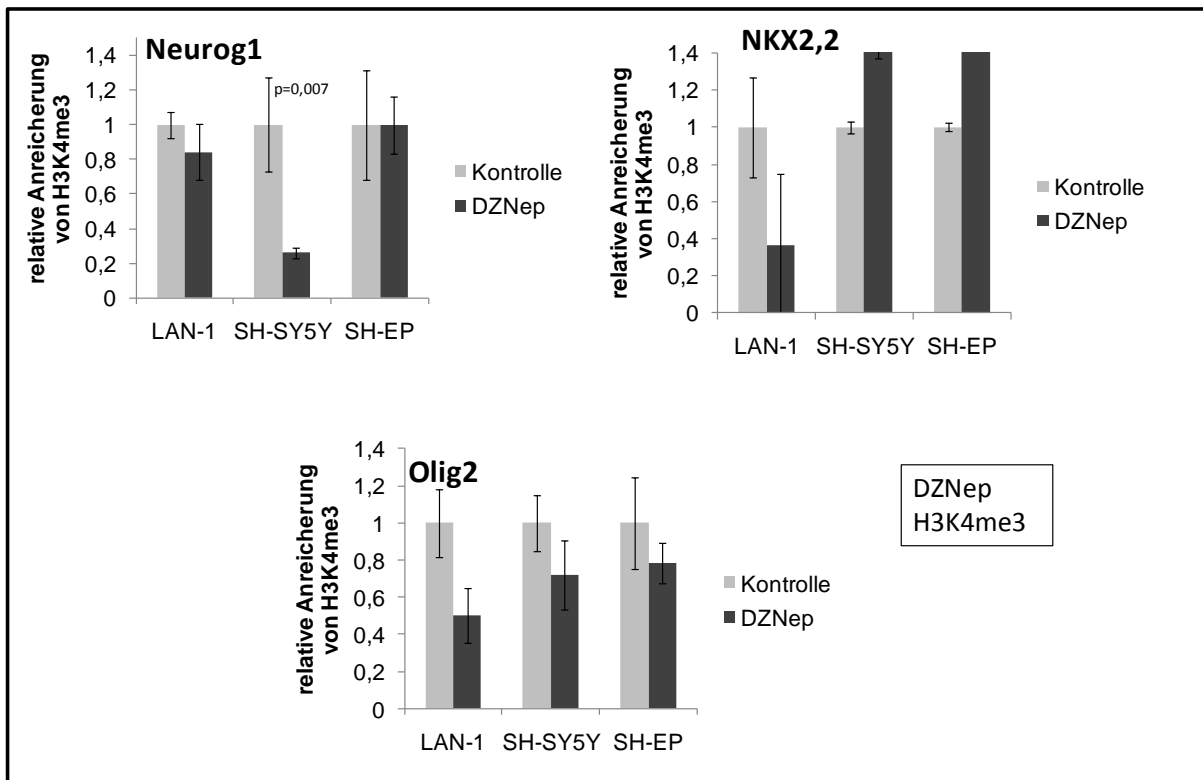


Abbildung 28: Diagramme zur relativen Anreicherung von H3K4me3 nach DZNep-Behandlung in den Zelllinien LAN-1, SH-SY5Y und SH-EP. NB-Zellen wurden für 72h mit und ohne 5 μ M DZNep kultiviert und anschließend einer CHIP-Analyse mit anti-H3K4me3 unterzogen. Mittels quantitativer PCR wurde die Anreicherung von H3K4me3 an den Promotorregionen von *Neurog1*, *NKX2,2* und *Olig2* untersucht. Die angegebenen p-Werte verdeutlichen, welche Unterschiede signifikant sind. DZNep –Behandlung induzierte eine signifikante Abnahme von der aktivierenden Histonmodifikation H3K4me3 am Promotorbereich von *Neurog1* in der N-Typ Zelllinie SH-SY5Y.

3.10.3 H3K9ac

Die Histonmodifikation H3K9ac war nach DZNep-Behandlung am Promotor von *Neurog1* signifikant in der Zelllinie LAN-1 erhöht (Abbildung 29). Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei den SH-SY5Y-Zellen am gleichen Promotor eine signifikante Abnahme dieser Histonmodifikation. Ebenso wies der *Olig2*-Promotor in den LAN-1 Zellen eine Erhöhung von H3K9ac auf. Zusammenfassend zeigen diese Daten zu DZNep, dass DZNep kein selektiver Inhibitor von H3K27me3 ist, da nachgewiesen werden konnte, dass es auch die aktivierende Histonmodifikation H3K4me3 inhibieren kann.

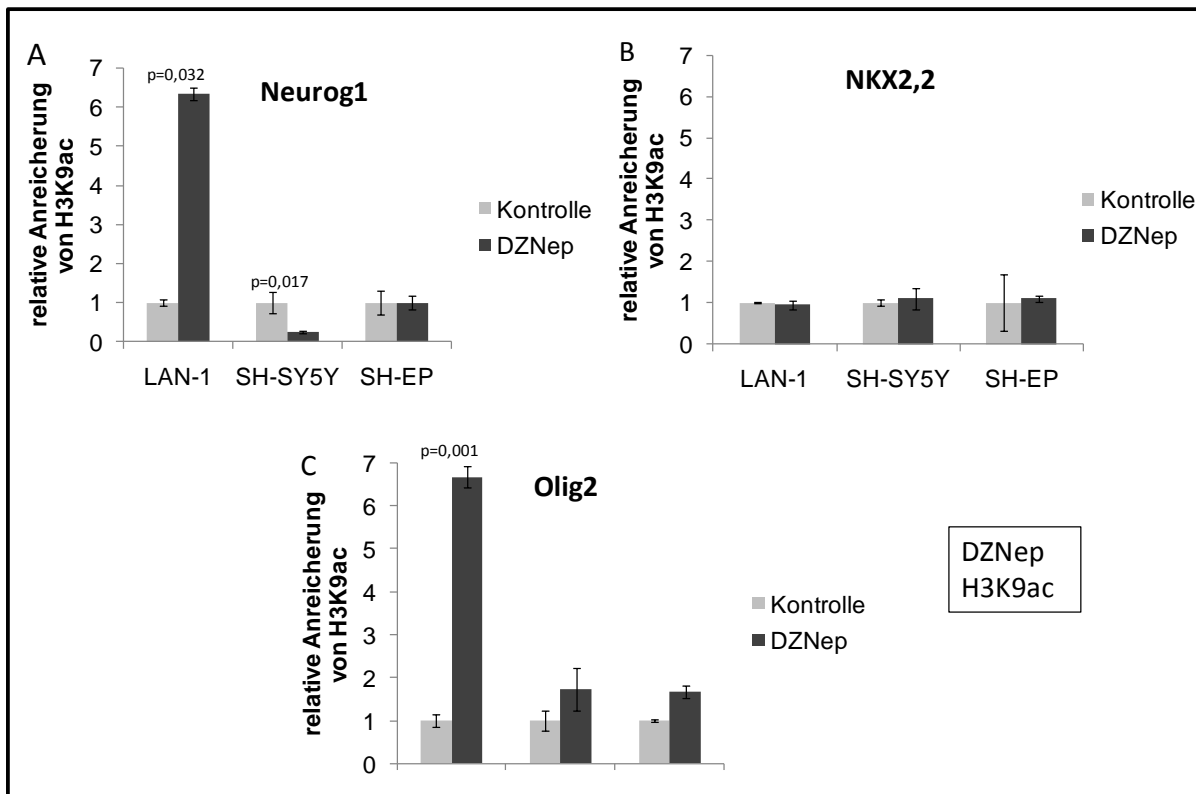


Abbildung 29: Diagramme zur relativen Anreicherung von H3K9ac nach DZNep-Behandlung in den Zelllinien LAN-1, SH-SY5Y und SH-EP. NB-Zellen wurden für 72 Stunden mit und ohne 5 μ M DZNep kultiviert und anschließend einer ChIP-Analyse mit anti-H3K4me3 unterzogen. Mittels quantitativer PCR wurde die Anreicherung von H3K9ac an den Promotorregionen von *Neurog1*, *NKX2,2* und *Olig2* untersucht. p-Werte verdeutlichen, welche Unterschiede signifikant sind. DZNep induzierte eine signifikante Zunahme von H3K9ac an Promotoren in LAN-1 sowie eine signifikante Abnahme in H3K9ac in SH-SY5Y.

3.11 Methylierungsstatus am Neurog1-, NKX2,2- und

Olig2-Promotorbereich

Es ist bekannt, dass die DNA-Methylierung über methyl-bindende Proteine Corepressoren wie Histondeacetylasen rekrutieren, um eine Genrepression und Kondensation des Chromatins zu verursachen (99). Darüber hinaus sind HDACs in Polycomb-Komplexen als Interaktionspartner identifiziert und somit an der Polycomb-vermittelten Genrepression beteiligt. Neueste Untersuchungen zeigen, dass Gene, die in Tumoren eine *de novo* Methylierung aufweisen zum größten Teil Polycomb-regulierte Gene sind. Demzufolge scheint die Polycomb-vermittelte Genrepression die *de novo* DNA-Methylierung in Tumoren zu begünstigen.

Daher stellte sich die Frage, ob die drei im Rahmen dieser Arbeit untersuchten neurospezifischen Gene in den Neuroblastomzellen methyliert waren. Des Weiteren war es interessant zu wissen, ob DZNep aufgrund einer CpG-Insel-Methylierung nicht in der Lage

war, diese Gene trotz Herabregulierung von H3K27me3 zu induzieren, da Miranda *et al.*, in ihrer Arbeit zeigten, dass DZNep entwicklungspezifische Gene ohne CpG-Insel-Methylierung aktivieren kann (100).

Um den Methylierungsstatus der Genpromotoren von *Neurog1*, *NKX2,2* sowie *Olig2* zu bestimmen, wurde aus NB-Zellen genomische DNA (siehe Kapitel 2.17) isoliert und eine Bisulfit-Behandlung (siehe Kapitel 2.18) durchgeführt. Die Bisulfit-modifizierte DNA wurde anschließend mittels quantitativer Methylierungsspezifischer PCR (siehe Kapitel 2.18) analysiert. Als Positivkontrolle diente die vollständig methylierte Ssi-DNA. Aus Abbildung 30 wird ersichtlich, dass die Promotorregion der Gene *NEUROG1*, *NKX2,2* sowie *OLIG2* in allen Zelllinien nicht methyliert vorlag.

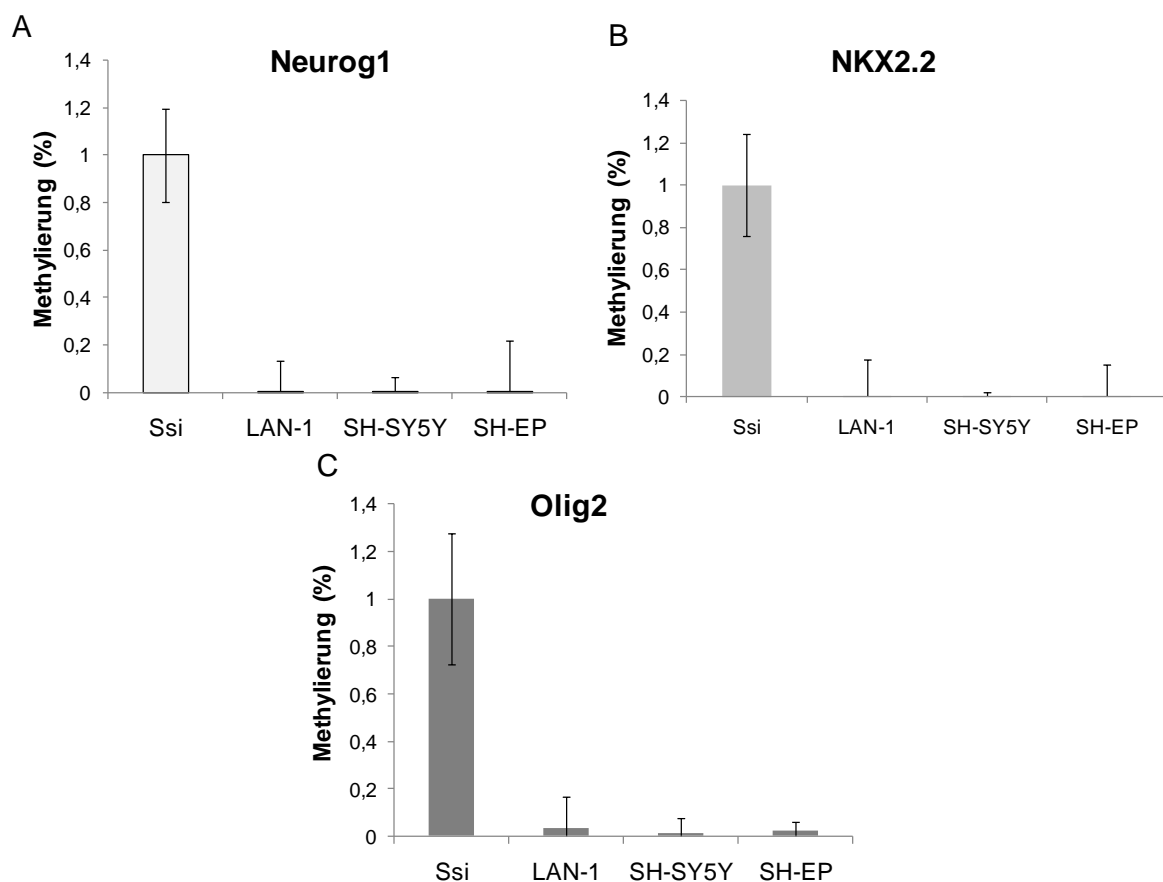


Abbildung 30: Diagramm nach quantitativer methylspezifischer PCR zur Untersuchung des Methylierungsstatus der Promotorbereiche der neurospezifischen Gene *Neurog1*, *NKX2,2* und *Olig2* in den NB-Zelllinien LAN-1, SH-SY5Y und SH-EP. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus 2 unterschiedlichen Versuchen. Die Daten wurden auf β -Aktin relativiert. Die 100% methylierte Ssi DNA wurde auf 1 gesetzt und die restlichen Ansätze entsprechend normiert. Es war keine Methylierung an den Promotorbereichen im Vergleich zur Positivkontrolle (100% methylierte SSI DNA) detektierbar.

3.12 Globale Veränderung von EZH2 und H3K27me3 unter Depsipeptid, ATRA und DZNep.

Depsipeptid

Experimente mit HDAC-Inhibitoren in Tumorarten wie die der Leukämie und des Gallenblasenkarzinoms legen nahe, dass Behandlungen mit HDAC-Inhibitoren zu einem verminderten Proteinspiegel von EZH2 und der assoziierten Histonmodifikation H3K27me3 führen (101;102). Um festzustellen, ob Depsipeptid die EZH2-Proteinkonzentration in Neuroblastomzellen beeinflusst, wurden NB-Zellen für 48 Stunden mit Depsipeptid behandelt und EZH2 und H3K27me3 mittels Westernblot detektiert. Wie aus Abbildung 31A-C ersichtlich, detektierte der Antikörper zwei Isoformen von EZH2. Bei LAN-1 war eine leichte Veränderung von EZH2 zu beobachten, die Histonmodifikation H3K27me3 veränderte sich jedoch nicht (Abbildung 31A). Die Depsipeptid-behandelten Zellen der Zelllinie SH-SY5Y zeigten im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen (Kontrolle) eine verminderte Expression von EZH2. Gleichzeitig war hier auch eine Abnahme von H3K27me3 nach Behandlung zu detektieren (Abbildung 31B). Ebenso war in der SH-EP Zelllinie eine geringe Expression von EZH2 nach Inkubation mit Depsipeptid verglichen mit den unbehandelten Zellen zu vernehmen. Jedoch veränderte sich die Histonmodifikation H3K27me3 hier nicht (Abbildung 31C).

ATRA

Als nächstes sollte überprüft werden, ob der Differenzierungs-induzierende Effekt von ATRA global die Proteinexpression von EZH2 und H3K27me3 beeinflusst. Der Nachweis hierzu erfolgte wiederum mittels einer Westernblot-Analyse. Wie in Abbildung 31A - B zu sehen ist, zeigten die beiden N-Typ-Zelllinien, LAN-1 und SH-SY5Y, die unter ATRA eine Differenzierung zeigten (siehe Kapitel 3.2) keine Veränderung von EZH2 und H3K27me3, während die S-Typ-Zelllinie SH-EP, welche unter ATRA-Einfluss keine Differenzierung zeigte, eine Abnahme in EZH2 und H3K27me3 aufwies (Abbildung 31C).

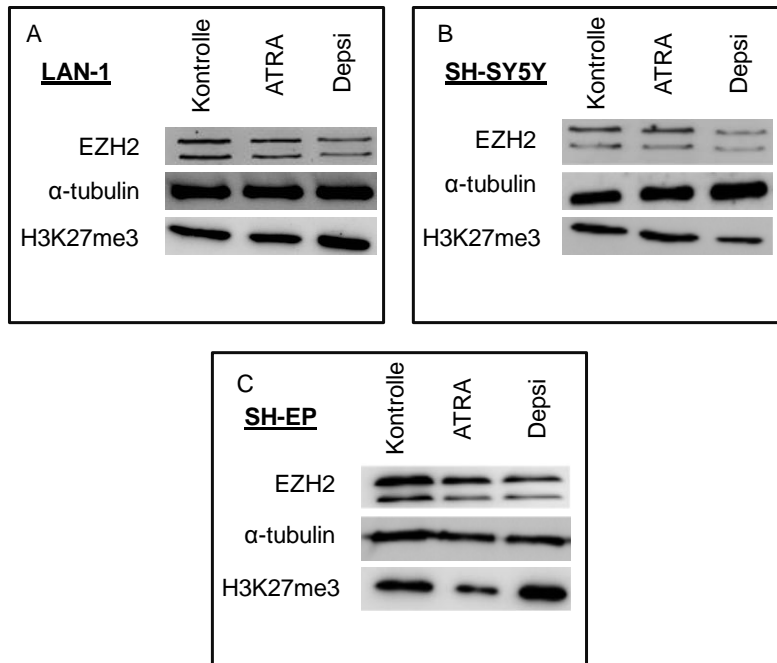
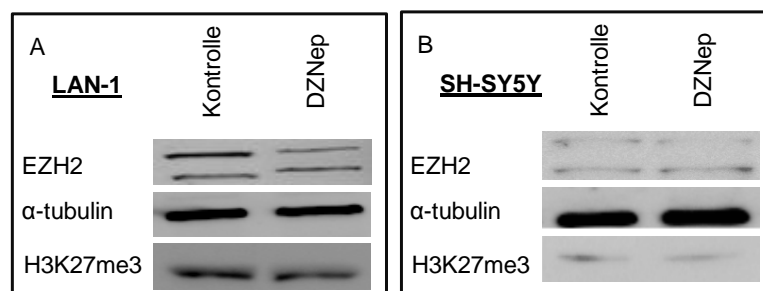


Abbildung 31: Repräsentativer Westernblot der Zelllysate der ATRA und Depsipeptid behandelten NB-Zellen. Der Westernblot zeigt die Veränderung der Expression von EZH2 und H3K27me3 nach 48-stündiger Behandlung mit 25 μ M ATRA und 5 nM Depsipeptid in den Neuroblastomzellen LAN-1 (A), SH-SY5Y (B) und SH-EP (C). Die NB-Zellen wurden von ATRA und Depsipeptid in unterschiedlicher Weise beeinflusst. ATRA induzierte eine Abnahme von EZH2 und H3K27me3 nur in der S-Typ-Zelllinie SH-EP. Eine verminderte Expression sowohl von EZH2 als auch H3K27me3 nach Depsipeptid-Behandlung zeigte sich nur in der N-Typ-Zelllinie SH-SY5Y. α -tubulin diente als Ladekontrolle für gleiche Proteinmengen. Kontrolle: unbehandelte Zelle DZNep

Der Abbildung 32A und B ist zu entnehmen, dass DZNep die beiden Isoformen von EZH2 unterschiedlich beeinflusste. Die Zelllinien LAN-1- und SH-SY5Y-Zellen zeigten eine leichte Abnahme in der oberen Bande von EZH2. Eine Veränderung der Histonmodifikation H3K27me3 war jedoch nicht zu detektieren. Auch die SH-EP-Zellen zeigten eine Verringerung der oberen Bande von EZH2. Im Gegensatz zu den N-Typ-Zellen konnte man hier eine Abnahme der Histonmodifikation H3K27me3 vernehmen.



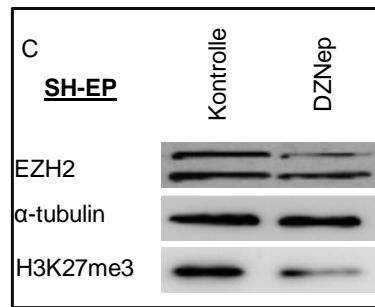


Abbildung 32: A - C. Die Westernblot-Analyse zum Einfluss von 5 μ M DZNep auf EZH2 und der Histonmodifikation H3K27me3 nach 72-stündiger Behandlung der NB-Zellen LAN-1 (A), SH-SY5Y (B) und SH-EP (C). Verglichen mit unbehandelten Zellen (Kontrolle) zeigten die N-Typ-Zellen LAN-1 und SH-SY5Y keine eindeutige Abnahme in EZH2 und H3K27me3. Die S-Typ-Zelllinie SH-EP zeigte dagegen eine verminderte Expression von EZH2 und H3K27me3. α -tubulin Banden dienten als Referenz zur Überprüfung gleichmäßig geladener Proteinmengen. Der EZH2 Antikörper detektierte zwei Isoformen von EZH2.

3.13 Relative Veränderung der EZH2-Expression unter Einfluss von Depsipeptid, ATRA und DZNep

Als nächstes sollte untersucht werden, ob Depsipeptid als HDAC-Inhibitor die Expression von *EZH2* auf der transkriptionellen Ebene beeinflussen kann. Zu diesem Zweck wurde eine quantitative RT-PCR Analyse wie in Kapitel 2.13 beschrieben durchgeführt.

In Abbildung 33 sind die Ergebnisse zur quantitativen RT-PCR nach Abgleich auf die Expression des Haushaltgens HPRT1 dargestellt. Nach Behandlung mit Depsipeptid konnte nur ein signifikanter Unterschied in der *EZH2*-mRNA-Expression in der N-Typ-Zelllinie SH-SY5Y festgestellt werden. Entgegengesetzt zu den Proteinexpressionsdaten (siehe Kapitel 3.12, Abbildung 31 B) zeigte die SH-SY5Y-Zelllinie eine signifikant erhöhte mRNA-Expression von *EZH2*. Die hier beobachtete Diskrepanz könnte auf einen Feedback-Mechanismus zurückzuführen sein. Im Falle einer Abnahme des Proteingehalts von EZH2 wird vermutlich durch einen Feedback-Mechanismus die Expressionsrate von *EZH2* in der Zelle erhöht.

Die ATRA-Behandlung zeigte keinen signifikanten Unterschied in der *EZH2*-mRNA Expression im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen (Abbildung 31 B). Die beobachtete Abnahme der EZH2-Proteinexpression in der SH-EP-Zelllinie (siehe Kapitel 3.12, Abbildung 31C) könnte durch eine posttranslationale Regulation des Proteins durch ATRA hervorgerufen worden sein. Auch für DZNep wurde eine Expressionsanalyse für *EZH2* auf transkriptioneller Ebene durchgeführt. In Abbildung 33 C ist zu erkennen, dass nur in der Zelllinie LAN-1 eine leichte, aber signifikante Erhöhung der Expression von *EZH2* detektierbar war. In der Zelllinie SH-EP war trotz beobachteter Abnahme im Proteingehalt von EZH2 nach DZNep-Behandlung, kein Einfluss auf die *EZH2*-mRNA-Expression zu

vernehmen (siehe Kapitel 3.12, Abbildung 32C). Dies deutet daraufhin, dass DZNep die Expression von EZH2 posttranslational und nicht transkriptional beeinflusst.

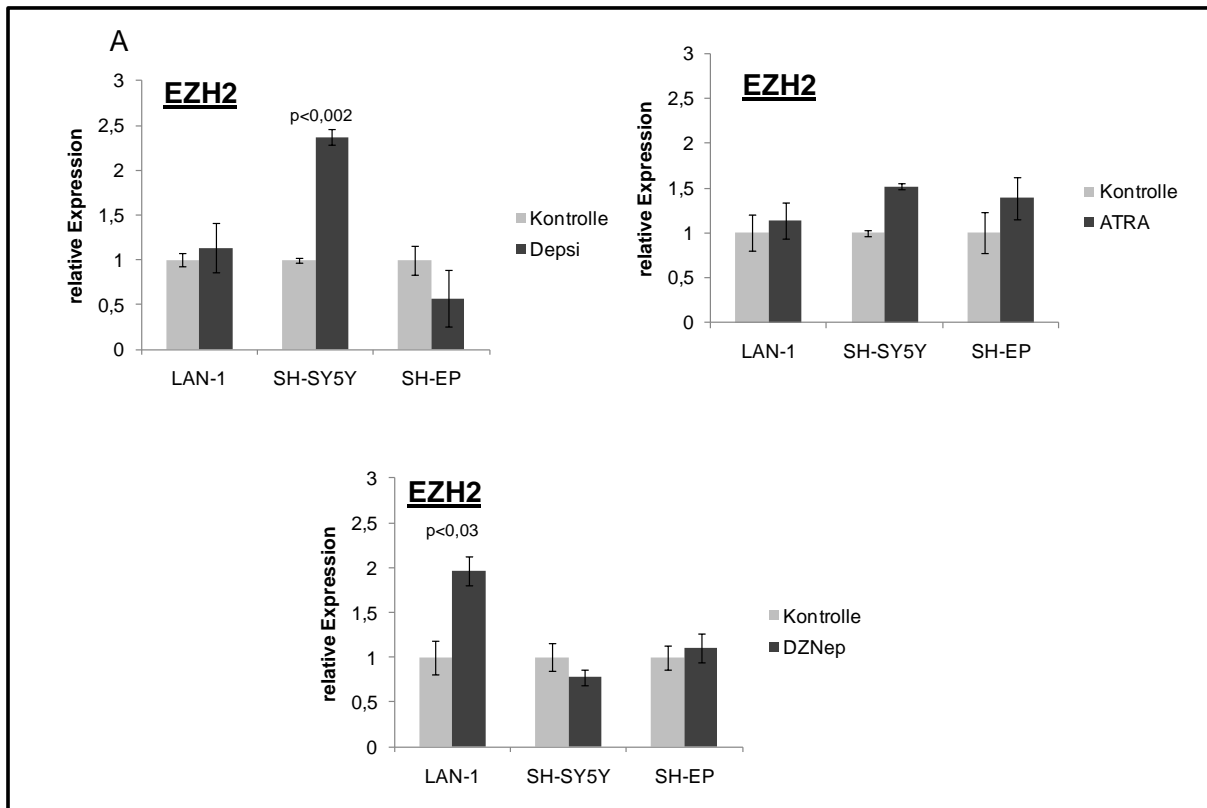


Abbildung 33: *EZH2* Expressionsniveau in NB-Zelllinien nach Behandlung mit 5 nM Depsipeptid, 25 μ M ATRA für 48 Stunden sowie 5 μ M DZNep für 72 Stunden. Das Expressionsniveau der unbehandelten Proben der jeweiligen Zelllinien (Kontrolle) wurde auf 1 gesetzt und die behandelten Proben entsprechend normiert. Als *House-Keeping* Gen wurde *HPRT1* verwendet.

4 Diskussion

I Untersuchungen zur molekularen Wirksamkeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Regulation von polycomb-regulierten entwicklungspezifischen Gene anhand von zwei epigenetisch wirksamen Inhibitoren, Depsipeptid und DZNep sowie dem Differenzierungsagenz ATRA zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurde zuvor die molekulare Wirksamkeit der drei Inhibitoren in drei verschiedenen Neuroblastomzellen näher charakterisiert und miteinander verglichen. Dabei kamen die Zelllinien LAN-1 (N-typ), SH-SY5Y (N-typ) und SH-EP (S-Typ) zur Verwendung. Die N-Typ Zellen sind neuroblastisch, zeigen ein hohes tumorigenes Potential und lassen sich meist *in vitro* durch Inhibitoren zu neuronalen Zellen differenzieren. Des Weiteren weist die LAN-1 Zelllinie eine N-MYC Amplifikation auf, was der Zelllinie im Vergleich zur SH-SY5Y Zelllinie ein höheres Maß an Aggressivität verleiht. Die S-Typ Zellen ähneln den nicht neuronalen Vorläuferzellen wie Schwanzzellen, die eine spezielle Form der Gliazellen sind. In *in vivo*-Mausmodellen zeigen diese Zellen kein tumorigenes Potential.

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition von HDAC mit dem HDAC-Inhibitor Depsipeptid dosis- und zeitabhängig die Proliferation von NB-Zellen im nanomolaren Bereich hemmt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die antiproliferative Wirkung von Depsipeptid auf eine Induktion von Zellzyklusarrest, Apoptose und teilweise Differenzierung zurückzuführen war. Mit ATRA zeigte sich nur eine moderate Inhibition der Proliferation. Die Behandlung ging mit einer morphologischen Veränderung der N-Typ Zellen einher. Es zeigte sich, dass die Wachstumsinhibition und Differenzierung auf eine Induktion des Zellzyklusarrestes bei allen Zelllinien zurückzuführen war. Mit DZNep ließ sich ein zeitabhängiger antiproliferativer Effekt in den Zelllinien nachweisen, welcher auf eine Induktion des Zellzyklusarrestes sowie Apoptose zurückzuführen war.

4.1 Molekulare Wirksamkeit der Inhibitoren Depsipeptid, ATRA und DZNep in Neuroblastomzelllinien

Depsipeptid

Depsipeptid ist ein zyklisches Tetrapeptid, welches in pädiatrischen Tumoren bereits die Phase I der klinischen Prüfungen vollendet hat. Des Weiteren hat die amerikanische FDA (US Food and drug administration) Depsipeptid bereits zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms bei Patienten zugelassen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein konzentrations- und zeitabhängiger antiproliferativer Effekt von Depsipeptid in allen NB-Zellen nachgewiesen werden (siehe Kapitel 3.1). Dabei

ließ sich kein merklicher Unterschied in der Sensitivität zwischen den N- und S-Typ-Zelllinien feststellen. Der beobachtete wachstumshemmende Effekt erwies sich außerdem als unabhängig vom MYCN-Status. Diese Erkenntnisse korrelierten mit den Ergebnissen zu Wachstumshemmungsstudien bei NB-Zelllinien mit anderen HDAC-Inhibitoren wie Natriumbutyrat, SAHA und TSA, die auch eine ähnliche Sensitivität zwischen Zelllinien mit/ohne MYCN-Amplifikation zeigten (103). Des Weiteren bestätigen die Resultate der Depsipeptid-Studien in Neuroblastomzellen von Panicker *et al.* die im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse (104). Ähnliche antiproliferative Effekte nach Depsipeptid-Behandlung sind auch für adulte Tumoren wie dem Hodgkin-Lymphom, Klarzellsarkom, Prostatakarzinom sowie Lungenkarzinom beschrieben (105-108).

Morphologische Veränderungen unter Behandlung von Inhibitoren deuten auch auf eine Entdifferenzierung der Tumorzellen hin. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für die S-Typ-Zelllinie SH-EP eine Veränderung der Morphologie unter Behandlung von Depsipeptid beobachtet werden. Ob diese Differenzierung der in dem Stadium 4S beobachteten Differenzierung ähnelt, bleibt noch zu klären. Eine Veränderung der Morphologie ist bereits mit dem HDAC-Inhibitor Helminthosporium für die NB-Zelllinien gezeigt worden (109).

Eines der häufig beobachteten antitumoralen Phänomene bei der Behandlung von Karzinomzellen mit HDAC-Inhibitoren ist die Induktion eines Zellzyklusarrestes. Dies ist bereits sowohl für viele adulte Tumorarten (110-112) als auch für Neuroblastom beschrieben (113-115). Des Weiteren ist bekannt, dass in malignen Zellen die Exposition mit Depsipeptid sowohl zur Akkumulation von Zellen in der G1/S- als auch in der G2-Phase führt (116).

In den untersuchten NB-Zelllinien der vorliegenden Arbeit konnte sowohl in N-Typ- als auch in S-Typ-Zellen eine Arretierung des Zellzyklus am G2/M-Kontrollpunkt nach 24-stündiger Depsipeptid-Behandlung festgestellt werden (siehe Kapitel 3.3). Dieses Ergebnis korrelierte nicht mit der kürzlich publizierten Studie von Panicker *et al.*, die bei der Untersuchung des Einflusses von Depsipeptid auf NB-Zellen keine Arretierung der Zellen nachweisen konnten (117). Allerdings wurde bei ihren Experimenten eine um ein Vielfaches höhere Konzentration an Depsipeptid für die Behandlung ihrer Zelllinien eingesetzt. Durch die hohe Konzentration wurde wahrscheinlich direkt Apoptose in den Zellen induziert.

Zusätzlich zum Einfluss von Depsipeptid auf den Zellzyklus konnte eine apoptoseinduzierende Wirkung von Depsipeptid in den NB-Zellen nachgewiesen werden. Die apoptoseinduzierende Wirkung konnte anhand der Messung des sub-G1 Peaks als

Ausdruck der apoptotischen DNA-Fragmentierung, siehe Kapitel 3.3), und der Annexin-Färbung (siehe Kapitel 3.4.1) demonstriert werden. Weiterhin konnte eine Zunahme aktivierter Caspase 3 am Beispiel der Zelllinien LAN-1 und SH-EP gezeigt werden, was auch auf eine Initiation der Apoptose deutete. Eine Aktivierung von Caspase 3 nach Exposition mit Depsipeptid wurde auch für die chronische lymphatische Leukämie (118), das Pankreaskarzinom (119) und Osteokarzinom (120) beschrieben.

Die Apoptose-Ergebnisse zeigten, dass die Apoptoseantwort in der LAN-1-Zelllinie mit N-MYC Amplifikation nicht so ausgeprägt war wie in den anderen beiden Zelllinien. Neben NMYC-Amplifikation trägt die Zelllinie LAN-1 eine Mutation im p53 Gen. Panicker *et al.* wiesen in ihren Experimenten nach, dass die Depsipeptid-induzierte Apoptoseantwort in den NB-Zellen weder p53- noch NMYC-amplifikationsabhängig war (104). Allerdings wurde die Zelllinie LAN-1 im Rahmen ihrer Analysen nicht verwendet. Neuroblastome zeichnen sich durch eine große klinische Heterogenität aus, die sich auch in den einzelnen NB-Zelllinien widerspiegelt. Diese Heterogenität wird in unterschiedlichen genomischen Veränderungen wie der einer p53-Mutation oder einer MYCN-Amplifikation deutlich. Tumorzellen des gleichen Phänotyps oder des gleichen Phänotyps mit MYCN-Amplifikation können sich in ihrem Metabolismus sowie ihren Signaltransduktionsmechanismen voneinander unterscheiden, welche durch antineoplastische Pharmaka unterschiedlich beeinflusst werden können. Ob diese Unterschiede für das beobachtete Phänomen verantwortlich sind, bleibt noch zu beantworten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass bei der Interpretation der Ergebnisse die Beachtung biologischer Heterogenität von NB-Tumoren sehr entscheidend ist.

ATRA

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten antiproliferativen Experimente mit ATRA zeigten verglichen zu Depsipeptid lediglich einen mäßigen wachstumsinhibitorischen Effekt in NB-Zellen (siehe Kapitel 3.1). Dabei ließ sich ein phänotypischer Unterschied (N- oder S-Typ) hinsichtlich der Sensitivität feststellen. Während in den N-Typ Zelllinien nur eine Abnahme der Zellviabilität bis zu 20 % zu vernehmen war, sank die Vitalität der S-Typ-Zelllinie auf ca. 35 % zurück.

Ein häufig beschriebenes Phänomen bei der Behandlung mit ATRA ist die neuronale Differenzierung der NB-Zellen unter Ausbildung von Neuriten. Für die in dieser Arbeit untersuchten NB-Zelllinien zeigte sich eine beginnende morphologische Differenzierung der N-Typ Zelllinien LAN-1 und SH-SY5Y unter Ausbildung von Zellfortsätzen (siehe Kapitel 3.2). Die Morphologie der S-Typ-Zelllinie SH-EP veränderte sich jedoch nicht. Ähnliche Ergebnisse zur Veränderung der Morphologie durch ATRA sind in der Literatur beschrieben,

wonach ausschließlich in den N-Typ NB-Zellen eine Induktion der Differenzierung nachweisbar war (93;121). ATRA vermittelt seine Wirkung über die Bindung an spezifischen RAR-Rezeptoren, die wiederum mit RXR-Rezeptoren dimerisieren. Bislang sind jeweils drei Subtypen (α , β und γ) der RAR und RXR-Rezeptoren in verschiedenen Isoformen bekannt. Diese Vielfalt an Rezeptoren spiegelt die hohe Kombinationsmöglichkeit von RAR- und RXR-Rezeptoren wider. Es ist bekannt, dass in den NB-Zelllinien unterschiedliche Retinoid-induzierte Rezeptor-Signalwege für die Differenzierung und Wachstumsinhibition verantwortlich sind (122). So ist gezeigt worden, dass die Proteinkomplexe RXR α -RAR α und RXR α -RAR β an der RA-induzierten Differenzierung beteiligt ist (123). Der Unterschied in der S-Typ-Zelllinie ist demnach wahrscheinlich auf eine Aktivierung unterschiedlicher RAR-RXR-Heterodimere zurückzuführen.

Um zu untersuchen, ob der in den Zellen beobachtete Effekt der Wachstumsinhibition und Veränderung der Morphologie auf einen Zellzyklusarrest zurückzuführen war, wurde der DNA-Gehalt der einzelnen Zelllinien nach ATRA-Behandlung mit Propidiumiodid angefärbt und am Durchflusszytometer analysiert. Für die in dieser Arbeit untersuchten NB-Zelllinien konnte eine Arretierung des Zellzyklus am G1/S-Kontrollpunkt sowohl für die N-Typ Zelllinien LAN-1 und SH-SY5Y als auch für die S-Typ Zelllinie SH-EP demonstriert werden (siehe Kapitel 3.3). Der zeitliche Verlauf des Arrestes unterschied sich in den jeweiligen Zelllinien. Eine Arretierung des Zellzyklus am G1/S-Kontrollpunkt durch ATRA ist auch für adulte Tumorarten beschrieben. Hierzu gehören u.a. Brustkarzinome (124), Leukämien (125) und Pankreaskarzinom (126). Auch für NB-Zellen ist eine Induktion von G1-Arrest nach einer ATRA-Behandlung bekannt, die wahrscheinlich durch eine Aktivierung des cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p27^{Kip1} zustande kommt (127-129).

In der Literatur wird beschrieben, dass eine ATRA-Behandlung in N-Typ-Zelllinien eine Differenzierung und in S-Typ-Zellen eine Apoptose induziert. Tatsächlich aber induzierte in der vorliegenden Arbeit die Zugabe von ATRA weder in den N-Typ- noch in den S-Typ-Zelllinien eine Apoptose (siehe Kapitel 3.3 und 3.4). Dies könnte an der einmaligen Behandlung der Zelllinien und der geringeren Behandlungsdauer von 72 Stunden mit ATRA liegen. In der Literatur wird meist eine mehrmalige Behandlung der Zelllinien über einen längeren Zeitraum beschrieben. Um die Vergleichbarkeit der drei Substanzen Dapsipeptid, ATRA und DZNep zu gewährleisten, wurde hier nur eine einmalige Behandlung für 72 Stunden durchgeführt.

DZNep

Kürzlich publizierte Studien beschreiben antineoplastische und apoptoseinduzierende Wirkungen für DZNep in Colonkarzinomazellen und akut myeloischen Leukämiezellen (47;130). In der vorliegenden Arbeit inhibierte der synthetische Histonmethyltransferase-Inhibitor DZNep zeitabhängig das Wachstum der Neuroblastomzelllinien (siehe Kapitel 3.1). Ein phänotypischer Unterschied konnte nicht festgestellt werden. Die Zelllinien LAN-1 und SH-EP verhielten sich in der Sensitivität ähnlich, während die N-Typ Zelllinie SH-SY5Y eine deutlich höhere Sensitivität aufwies.

Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass der beobachtete wachstumsinhibitorische Effekt von DZNep auf eine Inhibition des Zellzyklus und Induktion der Apoptose beruht (siehe Kapitel 3.3 und 3.4). Zellzyklusmodulierende Effekte durch DZNep konnten bereits für andere Tumorarten wie Brustkarzinom und AM-Leukämie gezeigt werden (131;132). Bei diesen Tumorarten zeigte sich eine Arretierung des Zellzyklus am G2/S Kontrollpunkt. Im Rahmen dieser Arbeit konnte für die N-Typ Zelllinien LAN-1 und SH-SY5Y eine Arretierung des Zellzyklus am G1/S-Kontrollpunkt und für die S-Typ-Zelllinie SH-EP eine Arretierung des Zellzyklus in der S-Phase ermittelt werden. Demzufolge scheinen unterschiedliche Signalwege in N-Typ- und S-Typ-Zelllinien durch DZNep aktiviert zu werden. Der hier zugrunde liegende Mechanismus muss noch geklärt werden.

Die apoptoseinduzierende Wirkung von DZNep konnte im Rahmen dieser Arbeit durch die Messung des subG1-Peak als Ausdruck der apoptotischen DNA Fragmentierung, mit der Annexin/PI-Färbung und der Zunahme der Aktivität der *cleaved* Caspase 3 dargestellt werden (siehe Kapitel 3.3 – 3.4). Bei der Apoptose-Analyse zeigte sich, dass die LAN-1 Zelllinie am geringsten Apoptose induzierte.

Die Untersuchungen zur molekularen Wirksamkeit der drei Inhibitoren zeigen, dass der HDAC-Inhibitor Depsipeptid ein vielversprechendes Therapeutikum für NB sein könnte. Verglichen mit den anderen beiden untersuchten Substanzen ist es in der Lage, bereits im nanomolaren Bereichen Apoptose und Arrest in den analysierten Krebs-Zelllinien zu induzieren.

II Untersuchungen zur Regulation von entwicklungsspezifischen Genen

Als essentielle Regulatoren epigenetischer Prozesse kommen den Polycombproteinen sowohl bei der normalen zellulären Entwicklung als auch bei der Krebsentstehung Schlüsselfunktionen zuteil. Zur Aufrechterhaltung der embryonalen Stammzellen in einem undifferenzierten Zustand (Pluripotenz) werden wichtige entwicklungsspezifische Gene stillgelegt oder auf einem niedrigen Expressionsniveau gehalten. Aus neuesten Untersuchungen geht hervor, dass Polycombproteine bei der Repression dieser entwicklungsspezifischen Gene wie *PAX6* und *NEUROG1* eine wesentliche Rolle spielen. Verschiedene Forschungsgruppen konnten durch ChIP-Chip-Experimente polycomb-vermittelte reprimierende Histonmodifikation H3K27me3 an den Promotoren dieser Gene nachweisen (47;54;56;71). Bei Zellen, die Mutationen / Aberrationen in Polycombgenen aufweisen, scheint die Repression aufgehoben und die meisten dieser Gene wie *PAX 6* und *NEUROG1* wieder exprimiert. Des Weiteren weisen diese Zellen eine erhöhte Neigung zur Differenzierung auf.

Zusätzlich zu der Histonmodifikation H3K27me3 weisen die meisten embryonal-spezifischen Polycombtargetgene die Histonmodifikation H3K4me3 auf, welche durch so genannte Trithorax-Proteine vermittelt wird. Diese bivalente Histonmodifikation reguliert bestimmte Gene, indem sie diese reprimiert oder aktiviert (71). Beispiele für solche Gene sind die neuronalspezifischen Gene *NEUROG1*, *NKX2-2* und *OLIG2*.

Über die Regulation der entwicklungsspezifischen Gene im Neuroblastom ist noch nichts bekannt. Aufgrund dessen und der Nähe dieses Tumors zur embryonalen Entwicklung sollte in der vorliegenden Arbeit die Regulation dieser Gene näher charakterisiert werden.

Zu diesem Zweck wurde anhand von drei Inhibitoren wie Depsipeptid, DZNep und dem Differenzierungsagens ATRA untersucht, ob diese die polycomb-spezifische Histonmodifikation H3K27me3 beeinflussen und welche Rolle dieser Einfluss auf die Regulation der entwicklungsspezifischen Gene im Neuroblastom einnimmt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Promotorbereiche der drei neurospezifischen Gene in den N-Typ-Zelllinien durch die reprimierende Histonmodifikation H3K27me3 besetzt waren. In der S-Typ Zelllinie konnten für die Gene *NKX2.2* und *Olig2* ein bivalenter Chromatinzustand identifiziert werden. Eine Behandlung der Zellen mit dem Histondeacetylase-Inhibitor Depsipeptid führte zu einer deutlichen Aktivierung dieser Gene. Diese Aktivierung ging mit einer Anreicherung der aktivierenden Histonmodifikation H3K9ac an den jeweiligen Promotorbereichen einher. Eine Veränderung der polycomb vermittelten

Histonmodifikation H3K27me3 konnte mit Depsipeptid nicht nachgewiesen werden. ATRA zeigte eine zelltyp-spezifische mäßige Aktivierung der Gene. Diese Aktivierung war an den jeweiligen Promotoren entweder mit einer Zunahme in der aktivierenden Histonmodifikation H3K4me3 oder in der Abnahme der reprimierenden Histonmodifikation H3K27me3 assoziiert. Mit DZNep, ein selektiver Inhibitor von EZH2, ließ sich keine Aktivierung der drei Gene erzielen, obgleich an einigen Promotorregionen eine Abnahme in H3K27me3 nachweisbar war.

4.2 Regulation der neurospezifischen Gene unter Depsipeptid

An der polycomb-vermittelten Repression ist die Beteiligung von HDAC1 und 2 beschrieben (133). Depsipeptid ist ein HDAC-Inhibitor, der spezifisch die Histondeacetylasen der Klasse 1 hemmt, zu der auch HDAC1 und 2 gehören. Es sollte untersucht werden, ob Depsipeptid in der Lage ist, entwicklungspezifische Gene zu aktivieren und ob diese Aktivierung durch eine Veränderung der polycomb-assoziierten Histonmodifikation H3K27me3 einhergeht. Zur Untersuchung der Regulation entwicklungspezifischer Gene in NB-Zellen wurden gestützt auf Literaturrecherchen zehn Transkriptionsfaktoren gewählt, die an ecto-, endo- und mesodermalen sowie an der neuronalen Entwicklung beteiligt sind (siehe Kapitel 3.5.1). Da im Neuroblastom der Vergleich zum (nicht entarteten, kreisfreien) Normalzustand fehlt, wurde die Veränderungen dieser Gene zunächst in einer Pilotstudie unter Depsipeptid in den Zelllinien SH-SY5Y (N-Typ) und SH-EP (S-Typ) untersucht. Depsipeptid wurde für die Pilotstudie gewählt, da dieser Inhibitor im Vergleich zu den anderen beiden Inhibitoren, ATRA und DZNep, die höchste Apoptoserate in den NB-Zellen aufwies. Zuvor wurde zur Überprüfung der Hemmung der HDAC durch Depsipeptid in NB-Zellen eine Westernblot-Analyse mit einem Antikörper gegen H3Ac durchgeführt. Eine eindeutige Erhöhung der Acetylierung konnte in allen Zelllinien festgestellt werden (siehe Kapitel 3.5.1). Ähnliche Ergebnisse zur Erhöhung des acetylierten Zustands von Histon H3 ist auch in anderen Tumorzellarten beschrieben. Hierzu gehören chronisch lymphatische Leukämiezellen (134), Uvea-Melanomzellen (135) und Ösophagus Karzinomzellen (136).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigte nach Depsipeptid-Behandlung eine Aktivierung der Gene *NEUROG1*, *NKX2.2* und *OLIG2* in allen untersuchten NB-Zelllinien (siehe Kapitel 3.5.1). Die Induktion der Gene war jedoch nicht mit einer Abnahme der polycomb-assoziierten Histonmodifikation H3K27me3 assoziiert (siehe Kapitel 3.7.1).

Vielmehr schien die Aktivierung durch eine Erhöhung der Histonmodifikation H3K9ac beeinflusst zu sein, da an allen Promotorregionen eine Anreicherung dieser durch eine Depsipeptid-Behandlung erzielt werden konnte (s. Kapitel 3.7.3). Zusätzlich zur Zunahme der Histonmodifikation H3K9ac konnte eine Erhöhung der aktivierenden Histonmodifikation H3K4me3 beobachtet werden (s. Kapitel 3.7.2). Da diese Modifikation nur an einigen Promotoren nachweisbar war, ließ sich darauf schließen, dass Acetylierung der wichtigste Regulator der Genexpression war.

Die Zunahme der aktivierenden Histonmodifikation H3K4me3 könnte eine indirekte Wirkung von Depsipeptid sein. Nightingale *et al.*, demonstrierten, dass die Histon H3-Acetylierung mit der Histon-H3K4- Methylierung in Wechselwirkung stehen. Sie konnten in ihren Experimenten zeigen, dass Bedingungen, welche die Histonacetylierung in einer Zelle erhöhen wie zum Beispiel durch die Zugabe eines HDAC Inhibitors in einer Anreicherung von H3K4 Methylierung, insbesondere der Di- und Tri- Form der Methylierung, resultiert. Des Weiteren stellten sie fest, dass der Grad der Methylierung vom Ausmaß der Acetylierung abhängig ist (137). Dies erklärt möglicherweise, weshalb die Zelllinie LAN-1 nach einer Depsipeptid-Behandlung keine Veränderung in der H3K4-Methylierung aufwies. Die ChIP-Analysen für die Promotorbereiche der Zelllinie LAN-1 zeigten lediglich eine geringe Erhöhung der Acetylierung (siehe Kapitel 3.7.3). Die Depsipeptid-induzierte Acetylierung war wahrscheinlich nicht stark genug, um die H3K4-Methylierung an den Promotorbereichen auszulösen. Die Induktion von *NEUROG1* nach HDAC-Inhibitor-Behandlung ist von Hirabayashi *et al.*, in neuronalen Vorläuferzellen gezeigt worden. In diesen Zellen war die Induktion auch mit einer erhöhten Acetylierung an H3K9 assoziiert. Zusätzlich zur Acetylierung von H3K9 demonstrierten sie eine Zunahme der Acetylierung an H3K14 (138). Eine Veränderung sowohl der globalen EZH2 Proteinexpression und der assoziierten Histonmodifikation H3K27me3 konnte nur in der Zelllinie SH-SY5Y nach Depsipeptid-Behandlung beobachtet werden (siehe Kapitel 3.11). Trotz Veränderung der globalen H3K27me3 Histonmodifikation konnte an den Promotoren von SH-SY5Y keine Veränderung von H3K27me3 detektiert werden. Shen *et al.*, konnten durch *Knockdown*-Experimente in ES-Zellen zeigen, dass EZH1 mit H3K27me3 kolokalisiert und diese Modifikation an entwicklungspezifischen Genen aufrechterhält (139). Möglicherweise wird auch in den SH-SY5Y Zellen diese Modifikation durch EZH1 an den Promotoren der entwicklungspezifischen Gene aufrechterhalten.

4.3 Analyse des Chromatinstatus der drei neurospezifischen Gene

Untersuchungen an murinen und humanen ES-Zellen zeigen, dass diese Gene in ES-Zellen eine bivalente Konformation bestehend aus H3K27me3 und H3K4me3 an den Promotorbereichen aufweisen (54;71).

Anhand der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Chromatin-Immunpräzipitations-Experimenten konnte an den Promotoren der drei neurospezifischen Gene in den NB-Zelllinien LAN-1, SH-SY5Y und SH-EP eine Anreicherung der polycomb-assoziierten Histonmodifikation H3K27me3 aufgezeigt werden (siehe Kapitel 3.6). Hingegen ließ sich in der S-Typ-Zelllinie SH-EP an den Promotoren von *NKX2.2* und *Olig2* einen bivalenten Chromatinzustand nachweisen (siehe Kapitel 3.6). Somit ließ sich nachweisen, dass die Regulation der neurospezifischen Gene in N-Typ-Zellen nicht der bivalenten Form der Genregulation der ES-Zellen entspricht. Demzufolge schien ein Teil der Gene in der S-Typ-Zelllinie der bivalenten Form der Genregulation der ES-Zellen zu befolgen.

Polycomb regulierte Gene sind in der Regel mit CpG-Insel-Promotoren assoziiert, welche in den ES-Zellen nicht methyliert vorliegen. Die meisten Polycombtargetgene bleiben auch während der Entwicklung unmethyliert. Dennoch können einige dieser Gene unter bestimmten Umständen methyliert werden. Mohn *et al.* zeigten, dass ein Großteil der Polycombtargetgene während der Differenzierung von ES-Zellen in neuronalen Vorläuferzellen eine *de novo* Methylierung erhalten (140). Des Weiteren ist von Gal *et al.*, gezeigt worden, dass eine Vielzahl der polycombtargetgene in adulten Krebszellen eine *de novo* Methylierung aufweisen (141).

Eine Promotormethylierung der Gene *NEUROG1*, *NKX2-2* und *OLIG2* konnte in der vorliegenden Arbeit in keiner der untersuchten NB-Zelllinien nachgewiesen werden. Hirabayashi *et al.* konnten zeigen, dass in späten Entwicklungsstadien der neuronalen Vorläuferzellen und vor einer Differenzierung der Zellen in Astrocyten das *NEUROG1*-Gen durch die Polycombgruppe reprimiert wird. Dabei kam es zu einer Anreicherung von H3K27me3 am Promotorbereich von *NEUROG1* mit einer gleichzeitigen Abnahme der *NEUROG1*-Expression. Ferner zeigten sie, dass der Promotorbereich des Gens nicht methyliert war (142). Damit könnte die Regulation des *NEUROG1*-Gens in NB-Zellen vermutlich der der in späten Stadien befindlichen neuronalen Vorläuferzellen entsprechen.

Da die polycomb assoziierte Histonmodifikation H3K27me3 jedoch auch bei der Stilllegung wichtiger Gene in Tumoren eine Rolle spielen, bleibt hier unklar, ob die beobachtete

H3K27me3 Histonmodifikation an den hier untersuchten Promotorbereichen ein normaler Prozess während der Entwicklung oder ein abnormaler Zustand der malignen Transformation ist.

4.4 Regulation der neurospezifischen Gene unter ATRA

In vitro Studien zeigen, dass ATRA eine neuronale Differenzierung in NB-Zellen hervorruft (93). Da Polycombproteine an Differenzierungsprozessen in ES-Zellen beteiligt ist, sollte geklärt werden, ob der durch ATRA induzierte Differenzierungsprozess in NB-Zellen die polycomb-assoziierte Histonmodifikation H3K27me3 beeinflusst und sich somit auf die Regulation der entwicklungspezifischen Gene im Neuroblastom auswirkt. Der Einfluss von ATRA auf die globale EZH2-Proteinexpression und die polycomb-assoziierte Histonmodifikation H3K27me3 war unterschiedlich in den beiden unter ATRA differenzierten Zelllinien LAN-1 und SH-SY5Y. Während die Zelllinie LAN-1 eine leichte Veränderung der EZH2-Proteinexpression und der Histonmodifikation H3K27me3 zeigte, ließ sich keine Veränderung in der SH-SY5Y Zelllinie nachweisen (s. Kapitel 3.11). Trotz nicht beobachteter Differenzierung unter ATRA konnte in der S-Typ Zelllinie SH-EP eine Veränderung der EZH2 Proteinexpression und H3K27me3 Histonmodifikation festgestellt werden (siehe Kapitel 3.11). Dies deutete darauf hin, dass der durch ATRA induzierte Differenzierungsprozess nicht mit einer Veränderung der polycomb-assoziierten Histonmodifikation einherging. Der Einfluss von ATRA auf die Regulation der drei neurospezifischen Gene fiel auch unterschiedlich in den einzelnen Zelllinien aus. Die N-Typ Zelllinie LAN-1 mit MYCN-Amplifikation wies eine geringe Aktivierung von *OLIG2* auf. Für die zweite N-Typ Zelllinie, SH-SY5Y, ließ sich eine geringe Aktivierung von *NEUROG1* nachweisen. (siehe Kapitel 3.5.3). Die Aktivierung von *OLIG2* in der LAN-1 Zelllinie war mit einer signifikanten Abnahme in H3K27me3 am Promotorbereich assoziiert (siehe Kapitel 3.9.1). Diese Abnahme in H3K27me3 am Promotor korrelierte mit der unter ATRA beobachteten Abnahme der gesamten H3K27me3 Histonmodifikation in der Zelle. Dies zeigte, dass eine Herabregulation von H3K27me3 die Gene zur Aktivierung induzieren kann.

Am *Neurog1* Promotor von SH-SY5Y konnte eine signifikante Anreicherung von H3K4me3 nach Behandlung mit ATRA festgestellt werden (siehe Kapitel 3.8.2). Da solch eine Anreicherung auch am gleichen Promotorbereich in der S-Typ Zelllinie SH-EP zu beobachten war, wo das Gen nicht aktiviert wurde, deutete dies daraufhin, dass für die Aktivierung des Gens H3K4me3 nicht allein von Bedeutung ist. Wu *et al.*, zeigten in neuronalen P19 Zellen, dass die Aktivierung von Neurog1 mit einer stufenweisen Veränderung der Histonmodifikation am Promotor, welche über mehrere Behandlungstage

andauert, einhergeht. So setzte in ihren Zellen erst am zweiten Tag eine Anreicherung von H3K4me₃, die mit längerer Behandlungsdauer zunahm. Zusätzlich zu der Zunahme von H3K4me₃ wiesen sie am dritten Behandlungstag eine langsame Aktivierung von H3K9ac, die so lange fortschritt, bis die gewünschte Erhöhung der Expression erreicht wurde (143). Vermutlich ist der Ausmaß an Aktivierung der aktivierenden Histonmodifikation H3K4me₃ und H3K9ac wichtig für eine Induktion eines Gens.

4.5 Regulation der neurospezifischen Gene unter DZNep

Vor kurzem wurde berichtet, dass DZNep ein selektiver Inhibitor der polycomb vermittelten Histonmodifikation H3K27me₃ ist und somit polycomb spezifische Gene aktivieren kann (47).

In der vorliegenden Arbeit konnte keine eindeutige Veränderung von EZH2 und H3K27me₃ Histonmodifikation in den N-Typ Zelllinien nachgewiesen werden. Eine deutliche Abnahme von EZH2 und H3K27me₃ konnte nur in der S-Typ-Zelllinie SH-EP festgestellt werden (siehe Kapitel 3.11).

Die polycomb spezifischen Gene *NEUROG1*, *NKX2.2* und *OLIG2* wurden unter DZNep nicht aktiviert. Wider Erwartens kam es in der LAN-1 Zelllinie es zu einer Abnahme der Expression der Gene *NKX2.2* und *OLIG2* (siehe Kapitel 3.5.4). An den Promotoren der Gene *NKX2.2* und *OLIG2* konnte eine Zunahme der reprimierenden Histonmodifikation H3K27me₃ nach DZNep-Behandlung detektiert werden (siehe Kapitel 3.9.1). Diese Zunahme könnte möglicherweise der Grund für die Herunterregulierung der Gene sein. Des Weiteren konnte auch eine Hochregulierung der aktivierenden Histonmodifikation H3K9ac am Promotorbereich von *OLIG2* detektiert werden (siehe Kapitel 3.9.3). Trotz Herunterregulierung der Histonmodifikation H3K27me₃ an einigen Promotoren der Zelllinien SH-SY5Y und SH-EP konnte keine Aktivierung der Genexpression festgestellt werden (siehe Kapitel 3.9.1).

Des Weiteren war eine signifikante Abnahme von H3K4me₃ am Promotorbereich von zu beobachten. Diese Ergebnisse zeigten, dass DZNep kein selektiver Inhibitor von EZH2 und der assoziierten Histonmodifikation H3K27me₃ ist. Da es durch die Inhibition von Homocysteinhydrolasen indirekt Methylierungsreaktionen hemmt, ist es möglich dass dabei auch aktivierende Histonmodifikationen gehemmt werden. Des Weiteren können auch weitere reprimierende und aktivierende Histonmodifikationen, die in dieser Arbeit nicht untersucht worden sind, durch DZNep beeinflusst worden sein. Dies würde möglicherweise erklären, warum das Gen *OLIG2* trotz Hochregulierung der Histonmodifikation H3K9ac

herunterreguliert wurde. Dass DZNep kein selektiver Inhibitor von EZH2 ist bereits von Miranda et al., gezeigt worden (144).

4.6 Charakterisierung der drei neurospezifischen Gene *Neurog1*,

NKX2.2 und *Olig2* im Rahmen von Neuroblastom

Neurog1 gehört zur Familie der bHLH (basic-helix-loop-helix-motif) Transkriptionsfaktoren und spielt eine entscheidende Rolle bei der neuronalen Differenzierung und Spezifizierung neuronaler Subtypen. *Neurog1* wird transient in proliferierenden neuronalen Vorläuferzellen exprimiert. Die Expression nimmt ab, wenn sich neuronale Zellen als postmitotische Zellen absondern und in reifere neuronale Subtypen differenzieren. Überexpressionsstudien von *Neurog1* in murinen NB-Zelllinien resultieren in einer Induktion der neuronalen Differenzierung (145). Über die Expression von *Neurog1* im Neuroblastom ist nichts bekannt. In anderen Neuralleistentumoren wie der des Medulloblastoms ist die Expression von *Neurog1* mit einer schlechten Prognose korreliert (146). *NKX2.2* spielt eine wichtige Rolle bei Differenzierungsprozessen. Zum einen ist es zusammen mit *Olig2* an der Reifung und Differenzierung von Oligodendrozyten beteiligt. Zum anderen spielt es eine Rolle bei der Differenzierung von endokrinen Zellen zu insulin produzierenden β -Zellen. In Ewing Sarcoma Tumoren ist das Vorkommen von *NKX2.2* mit einer schlechten Prognose assoziiert. *Olig2* gehört auch zur Familie der BHLH Transkriptionsfaktoren und ist an der Oligodendrocyten Entwicklung beteiligt. Die Expression von *Olig2* ist in vielen Tumorarten wie Lungenkarzinom, Medulloblastom, Oligodendroglioma beschreiben und geht mit einer schlechten Prognose einher. Eine Rolle von *Olig2* an der Wachstumsinhibition ist auch beschrieben. Durch Aktivierung von p27^{KIP1} ist es in der Lage in- Zellen Wachstumsinhibition auszulösen. Über die Rolle von *NKX2.2* und *Olig2* im Neuroblastom ist bislang nichts bekannt.

4.7 Ausblick

Die vorgestellten Ergebnisse zur Regulation der polycomb-regulierten embryonalen Transkriptionsfaktoren in Neuroblastom sind erstmalig in dieser Arbeit gezeigt worden.

Weiterführende Analysen können herangezogen werden, um eine potentielle Relevanz der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Gene für die NB-Erkrankung einzuschätzen. So könnte eine Untersuchung der Gene hinsichtlich ihrer mRNA- und Proteinexpression in NB-Geweben aus verschiedenen Stadien der Erkrankung Aufschluss über die mögliche prognostische Bedeutung dieser Gene geben.

5 Zusammenfassung

Für die Etablierung und Aufrechterhaltung von Entwicklungsabläufen sowohl in sich entwickelnden als auch in adulten Organismen ist die Regelung der Genaktivität durch epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierung, Histonacetylierung und Histonmethylierung essentiell. Auf der epigenetischen Ebene stellen die Proteine der Polycombgruppe wichtige Regulatoren der Genrepression dar. Über die EZH2, eine Komponente des Polycombkomplex 2 (PRC2), -vermittelte Histonmodifikation H3K27me3 sind diese in der Lage, Gene stabil über mehrere Zellteilungen hinweg epigenetisch zu hemmen. In genomweiten Studien wurde nachgewiesen, dass die polycomb-vermittelte Histonmodifikation H3K27me3 in ES-Zellen Promotoren wichtiger entwicklungspezifischer Gene, welche Differenzierungsprozesse ermöglichen, hemmen und somit zur Erhaltung der Pluripotenz beitragen. Eine Entfernung der H3K27me3-Histonmodifikation in diesen Zellen resultiert in einer Reexpression der entwicklungspezifischen Gene. Im Rahmen dieser Arbeit sollte dieser epigenetische Mechanismus an ausgewählten entwicklungspezifischen Genen in der Tumorentität Neuroblastom untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden zwei epigenetisch wirksame Inhibitoren, Depsipeptid, ein HDAC-Inhibitor und DZNep, EZH2-Inhibitor sowie das Differenzierungsagens ATRA verwendet. Zunächst wurde die molekulare Wirksamkeit der drei neoplastischen Substanzen auf N- und S-Typ Neuroblastom-Zelllinien getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die Inhibition der Histondeacetylasen durch Depsipeptid das Zellwachstum der NB-Zellen dosis- und zeitabhängig hemmt. Die antiproliferative Hemmung beruhte dabei auf der Induktion eines Zellzyklusarrestes und der Apoptose. Die ATRA-Behandlung induzierte eine mäßige antiproliferative Hemmung in den NB-Zelllinien und es konnte zudem eine Differenzierung der N-Typ Zelllinien unter ATRA festgestellt werden. Darüber hinaus zeigte sich, dass eine Zellzyklusmodulation an der antiproliferativen Hemmung und Differenzierung der Zellen beteiligt war. Die ATRA-Behandlung induzierte keine Apoptose in den Zellen. Unter dem Einfluss des EZH2-Inhibitors DZNep ließ sich ebenfalls eine antiproliferative Hemmung der NB-Zelllinien feststellen, die auf eine Induktion der Apoptose und Zellzyklusmodulation zurückzuführen war. Die apoptoseinduzierende Wirkung von DZNep war weniger stark ausgeprägt als mit Depsipeptid. Zusammenfassend zeigte sich, dass Depsipeptid die stärkste antiproliferative Wirkung unter den drei Inhibitoren hatte.

Für die Analyse der polycomb-vermittelten, entwicklungs-spezifischen Gene in NB-Zellen wurden in einer Pilot-Studie mit Depsipeptid zehn entwicklungs-spezifische Gene untersucht. Unter dem Einfluss von Depsipeptid zeigte sich dabei unter anderem eine starke Aktivierung der drei neurospezifischen Gene *NEUROG1*, *NKX2-2* und *OLIG2* in den NB-Zelllinien,

welche für weitere Untersuchungen verwendet wurden. Die deutliche Aktivierung der Gene mit Depsipeptid ging jedoch nicht mit einer Veränderung der polycomb-vermittelten Histonmodifikation H3K27me3 einher. Vielmehr war eine deutliche Anreicherung der H3K9-Acetylierung für die Hochregulation der Gene verantwortlich. ATRA zeigte eine Zelltyp-spezifische mäßige Aktivierung der drei Gene. Diese leicht induzierte Aktivierung ging entweder mit einer Erhöhung der aktivierenden Histonmodifikation H3K4me3 oder mit einer Abnahme der polycomb-assoziierten Histonmodifikation H3K27me3 einher. Unter dem Einfluss von DZNep ließ sich trotz Abnahme der polycomb-assoziierten Histonmodifikation H3K27me3 an einigen Promotoren keine Aktivierung dieser Gene feststellen. Des Weiteren zeigte sich, dass DZNep keinen selektiven Inhibitor der EZH2-vermittelten Histonmodifikation H3K27me3 darstellte, da es auch einen herunterregulierenden Einfluss auf die aktivierende Histonmodifikation H3K4me3 hatte. Zusammenfassend konnte festgestellt werden, dass die Depsipeptid-induzierte Acetylierung von H3K9 die polycomb-vermittelte Histonmodifikation H3K27me3 außer Kraft setzen kann, um neuronal spezifische Entwicklungs-PcG-Zielgene zu aktivieren.

6 Summary

The epigenetic regulation of gene expression by DNA methylation, histone acetylation and histone methylation is essential for the establishment and maintenance of developmental processes in both developing and adult organisms. Polycomb group proteins are important epigenetic regulators of gene repression. The enhancer of zeste homolog 2 (*EZH2*) is an integral component of polycomb complex 2, a highly conserved histone methyltransferase which tri-methylates lysine 27 of histone H3. Genome-wide analyses of PcG complex localization in ES cells show that the polycomb-mediated histone modification H3K27me3 occupies the promoters and represses the expression of a large set of differentiation-specific developmental transcriptional factors involved in lineage differentiation. For genes marked in this way, the loss of H3K27me3 has been shown to activate gene expression. The present work analysed this polycomb-mediated epigenetic regulation on selected developmental specific genes in the tumor entity of neuroblastoma by using two epigenetic inhibitors, depsipeptide, an HDAC inhibitor and DZNep, an *EZH2*-inhibitor and the differentiation agent ATRA. In the first part of this work the antiproliferative effect of these inhibitors were investigated in N (neuronal)-type and S (Schwann cell-like)-type neuroblastoma cells. Depsipeptide showed a dose- and time-dependent anti-proliferative effect on NB cells. The antiproliferative effect of depsipeptide was found to be based on the induction of cell cycle arrest and apoptosis. Compared to depsipeptide, ATRA affected cell growth only to a moderate extent in neuroblastoma cell lines. It induced differentiation of the N-type cells. The results demonstrated that a cell cycle modulation was responsible for the antiproliferative effect and also the differentiation observed with ATRA. ATRA treatment did not induce apoptosis in NB cells. The *EZH2*-inhibitor DZNep displayed antiproliferative effect on NB cells that was found to be based on the induction of apoptosis and cell cycle modulation. However DZNep only induced apoptosis to a lesser extent than depsipeptide in NB cells. In summary, depsipeptide showed the strongest antiproliferative effect among all three inhibitors.

For the analysis of polycomb-mediated epigenetic regulation in NB cells, ten developmental specific genes were selected out of the literature. A pilot study was carried out on treatment with depsipeptide to examine possible differences in gene expression. Depsipeptide treatment revealed a strong upregulation of the three neuronal specific genes *NEUROG1*, *NKX2-2* und *OLIG2* amongst other genes in all NB cells. ChIP Analysis at the promoter site of *NEUROG1*, *NKX2-2* und *OLIG2* genes revealed that depsipeptide did not cause any changes in the polycomb-mediated H3K27me3 histone modification. Rather, an enrichment of H3K9 acetylation seemed to upregulate these genes. ATRA, in contrast to depsipeptide, only caused a moderate upregulation of some genes. The ATRA-induced activation occurred

cell-type dependent and was either accompanied by an enrichment of the activating histone modification H3K4me3 or by a downregulation of the repressive histone modification H3K27me3 at the promoter sites. Although a downregulation of the polycomb-mediated histone modification H3K27me3 was observed at some promoter sites DZNep treatment did not activate any genes. Furthermore, the results demonstrate that DZNep is not a selective inhibitor of both EZH2 and its associated histone modification H3K27me3, because other histone modifications like H3K4me3 were also downregulated. All in all, our data suggests that depsipeptide-mediated acetylation of H3K9 overrides polycomb-mediated tri-methylation of H3K27 to induce neuronal specific developmental genes.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Reference List

- (1) Cheng X, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* 2008; 16(3):341-350.
- (2) Chen T, Li E. Establishment and maintenance of DNA methylation patterns in mammals. *Curr Top Microbiol Immunol* 2006; 301:179-201.
- (3) Mortusewicz O, Schermelleh L, Walter J, Cardoso MC, Leonhardt H. Recruitment of DNA methyltransferase I to DNA repair sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(25):8905-8909.
- (4) Cheng X, Blumenthal RM. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure* 2008; 16(3):341-350.
- (5) Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16(1):6-21.
- (6) Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(6):3740-3745.
- (7) Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16(1):6-21.
- (8) Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(6):3740-3745.
- (9) Wang Y, Leung FC. An evaluation of new criteria for CpG islands in the human genome as gene markers. *Bioinformatics* 2004; 20(7):1170-1177.
- (10) Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 2008; 9(6):465-476.
- (11) Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16(1):6-21.
- (12) Illingworth R, Kerr A, Desousa D, Jorgensen H, Ellis P, Stalker J et al. A novel CpG island set identifies tissue-specific methylation at developmental gene loci 3. *PLoS Biol* 2008; 6(1):e22.
- (13) Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; 19(2):187-191.
- (14) Reik W, Dean W, Walter J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 2001; 293(5532):1089-1093.

- (15) Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer 2. *Carcinogenesis* 2010; 31(1):27-36.
- (16) Eden A, Gaudet F, Waghmare A, Jaenisch R. Chromosomal instability and tumors promoted by DNA hypomethylation. *Science* 2003; 300(5618):455.
- (17) Howard G, Eiges R, Gaudet F, Jaenisch R, Eden A. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene* 2008; 27(3):404-408.
- (18) Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006; 7(1):21-33.
- (19) Baylin SB. DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2005; 2 Suppl 1:S4-11.
- (20) Akiyama Y, Watkins N, Suzuki H, Jair KW, van Engeland M, Esteller M et al. GATA-4 and GATA-5 transcription factor genes and potential downstream antitumor target genes are epigenetically silenced in colorectal and gastric cancer 1. *Mol Cell Biol* 2003; 23(23):8429-8439.
- (21) Long C, Yin B, Lu Q, Zhou X, Hu J, Yang Y et al. Promoter hypermethylation of the RUNX3 gene in esophageal squamous cell carcinoma 2. *Cancer Invest* 2007; 25(8):685-690.
- (22) Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997; 389(6648):251-260.
- (23) Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128(4):693-705.
- (24) Zhang Y, Reinberg D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 2001; 15(18):2343-2360.
- (25) Fischle W, Wang Y, Allis CD. Histone and chromatin cross-talk. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15(2):172-183.
- (26) Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer 8. *Mol Oncol* 2007; 1(1):19-25.
- (27) Ryan CM, Harries JC, Kindle KB, Collins HM, Heery DM. Functional interaction of CREB binding protein (CBP) with nuclear transport proteins and modulation by HDAC inhibitors. *Cell Cycle* 2006; 5(18):2146-2152.
- (28) van d, V, Otte AP. Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. *Nat Genet* 1999; 23(4):474-478.

-
- (29) Gray SG, Ekstrom TJ. The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* 2001; 262(2):75-83.
- (30) Ropero S, Esteller M. The role of histone deacetylases (HDACs) in human cancer. *Mol Oncol* 2007; 1(1):19-25.
- (31) Oehme I, Deubzer HE, Lodrini M, Milde T, Witt O. Targeting of HDAC8 and investigational inhibitors in neuroblastoma. *Expert Opin Investig Drugs* 2009; 18(11):1605-1617.
- (32) Keshelava N, Davicioni E, Wan Z, Ji L, Sposto R, Triche TJ et al. Histone deacetylase 1 gene expression and sensitization of multidrug-resistant neuroblastoma cell lines to cytotoxic agents by depsipeptide. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(14):1107-1119.
- (33) Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(3):194-202.
- (34) Burgess AJ, Pavey S, Warrener R, Hunter LJ, Piva TJ, Musgrove EA et al. Up-regulation of p21(WAF1/CIP1) by histone deacetylase inhibitors reduces their cytotoxicity. *Mol Pharmacol* 2001; 60(4):828-837.
- (35) Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Hideshima T et al. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(2):540-545.
- (36) Emanuele S, Lauricella M, Tesoriere G. Histone deacetylase inhibitors: apoptotic effects and clinical implications (Review). *Int J Oncol* 2008; 33(4):637-646.
- (37) Lin HY, Chen CS, Lin SP, Weng JR, Chen CS. Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med Res Rev* 2006; 26(4):397-413.
- (38) Chen CS, Weng SC, Tseng PH, Lin HP, Chen CS. Histone acetylation-independent effect of histone deacetylase inhibitors on Akt through the reshuffling of protein phosphatase 1 complexes. *J Biol Chem* 2005; 280(46):38879-38887.
- (39) Emanuele S, Lauricella M, Tesoriere G. Histone deacetylase inhibitors: apoptotic effects and clinical implications (Review) 2. *Int J Oncol* 2008; 33(4):637-646.
- (40) Ueda H, Nakajima H, Hori Y, Fujita T, Nishimura M, Goto T et al. FR901228, a novel antitumor bicyclic depsipeptide produced by *Chromobacterium violaceum* No. 968. I. Taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties, and antitumor activity. *J Antibiot (Tokyo)* 1994; 47(3):301-310.

- (41) Furumai R, Matsuyama A, Kobashi N, Lee KH, Nishiyama M, Nakajima H et al. FK228 (depsipeptide) as a natural prodrug that inhibits class I histone deacetylases. *Cancer Res* 2002; 62(17):4916-4921.
- (42) Konstantinopoulos PA, Vondoros GP, Papavassiliou AG. FK228 (depsipeptide): a HDAC inhibitor with pleiotropic antitumor activities. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58(5):711-715.
- (43) Metzger E, Wissmann M, Yin N, Muller JM, Schneider R, Peters AH et al. LSD1 demethylates repressive histone marks to promote androgen-receptor-dependent transcription. *Nature* 2005; 437(7057):436-439.
- (44) Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA et al. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell* 2004; 119(7):941-953.
- (45) Isham CR, Tibodeau JD, Jin W, Xu R, Timm MM, Bible KC. Chaetocin: a promising new antimyeloma agent with in vitro and in vivo activity mediated via imposition of oxidative stress. *Blood* 2007; 109(6):2579-2588.
- (46) Quinn AM, Allali-Hassani A, Vedadi M, Simeonov A. A chemiluminescence-based method for identification of histone lysine methyltransferase inhibitors. *Mol Biosyst* 2010; 6(5):782-788.
- (47) Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee PL et al. Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev* 2007; 21(9):1050-1063.
- (48) Lehnertz B, Ueda Y, Derijck AA, Braunschweig U, Perez-Burgos L, Kubicek S et al. Suv39h-mediated histone H3 lysine 9 methylation directs DNA methylation to major satellite repeats at pericentric heterochromatin. *Curr Biol* 2003; 13(14):1192-1200.
- (49) Tachibana M, Matsumura Y, Fukuda M, Kimura H, Shinkai Y. G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *EMBO J* 2008; 27(20):2681-2690.
- (50) Esteve PO, Chin HG, Benner J, Feehery GR, Samaranyake M, Horwitz GA et al. Regulation of DNMT1 stability through SET7-mediated lysine methylation in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(13):5076-5081.
- (51) Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N et al. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 1998; 19(2):187-191.
- (52) Fuks F, Hurd PJ, Wolf D, Nan X, Bird AP, Kouzarides T. The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J Biol Chem* 2003; 278(6):4035-4040.

-
- (53) Lewis EB. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila* 1. *Nature* 1978; 276(5688):565-570.
- (54) Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature* 2006; 441(7091):349-353.
- (55) Bracken AP, Dietrich N, Pasini D, Hansen KH, Helin K. Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions 5. *Genes Dev* 2006; 20(9):1123-1136.
- (56) Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM et al. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 2006; 125(2):301-313.
- (57) Sparmann A, van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(11):846-856.
- (58) Pietersen AM, van Lohuizen M. Stem cell regulation by polycomb repressors: postponing commitment. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20(2):201-207.
- (59) Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* 2007; 128(4):735-745.
- (60) Bracken AP, Helin K. Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(11):773-784.
- (61) Sparmann A, van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(11):846-856.
- (62) Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell* 2007; 128(4):735-745.
- (63) Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins 4. *Cell* 2007; 128(4):735-745.
- (64) Bracken AP, Helin K. Polycomb group proteins: navigators of lineage pathways led astray in cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9(11):773-784.
- (65) Shen X, Liu Y, Hsu YJ, Fujiwara Y, Kim J, Mao X et al. EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell* 2008; 32(4):491-502.
- (66) Kuzmichev A, Jenuwein T, Tempst P, Reinberg D. Different EZH2-containing complexes target methylation of histone H1 or nucleosomal histone H3 3. *Mol Cell* 2004; 14(2):183-193.

- (67) Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C et al. The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 2006; 439(7078):871-874.
- (68) Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A et al. Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 1994; 371(6496):435-438.
- (69) Mohn F, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, Stadler MB et al. Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell* 2008; 30(6):755-766.
- (70) van d, V, Otte AP. Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation. *Nat Genet* 1999; 23(4):474-478.
- (71) Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J et al. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006; 125(2):315-326.
- (72) Pietersen AM, van Lohuizen M. Stem cell regulation by polycomb repressors: postponing commitment 2. *Curr Opin Cell Biol* 2008; 20(2):201-207.
- (73) Rajasekhar VK, Begemann M. Concise review: roles of polycomb group proteins in development and disease: a stem cell perspective. *Stem Cells* 2007; 25(10):2498-2510.
- (74) Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, Kagey MH, Young RA. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev* 2008; 22(6):746-755.
- (75) Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J et al. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet* 2007; 39(2):232-236.
- (76) Gal-Yam EN, Egger G, Iniguez L, Holster H, Einarsson S, Zhang X et al. Frequent switching of Polycomb repressive marks and DNA hypermethylation in the PC3 prostate cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(35):12979-12984.
- (77) Sparmann A, van Lohuizen M. Polycomb silencers control cell fate, development and cancer 1. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(11):846-856.
- (78) Mann JR, Darbyshire PJ, Goodman A, Hill FG, Gornall P, Hockley AD et al. Pediatric oncology and hematology in Birmingham, England. *Pediatr Hematol Oncol* 1999; 16(1):3-7.

-
- (79) Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(3):203-216.
- (80) Nieder ML, Gauderer MW. Recent developments in the management of neuroblastoma. *Prog Pediatr Surg* 1991; 26:124-136.
- (81) Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 2003; 4(8):472-480.
- (82) Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 2003; 4(8):472-480.
- (83) Eklof O, Sandstedt B, Thonell S, Ahstrom L. Spontaneous regression of stage IV neuroblastoma. *Acta Paediatr Scand* 1983; 72(3):473-476.
- (84) Schwab M, Westermann F, Hero B, Berthold F. Neuroblastoma: biology and molecular and chromosomal pathology. *Lancet Oncol* 2003; 4(8):472-480.
- (85) Chambon P. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J* 1996; 10(9):940-954.
- (86) Balmer JE, Blomhoff R. Gene expression regulation by retinoic acid. *J Lipid Res* 2002; 43(11):1773-1808.
- (87) Sidell N, Altman A, Haussler MR, Seeger RC. Effects of retinoic acid (RA) on the growth and phenotypic expression of several human neuroblastoma cell lines. *Exp Cell Res* 1983; 148(1):21-30.
- (88) Voigt A, Zintl F. Effects of retinoic acid on proliferation, apoptosis, cytotoxicity, migration, and invasion of neuroblastoma cells. *Med Pediatr Oncol* 2003; 40(4):205-213.
- (89) Emanuele S, Lauricella M, Tesoriere G. Histone deacetylase inhibitors: apoptotic effects and clinical implications (Review). *Int J Oncol* 2008; 33(4):637-646.
- (90) Nowak K, Kerl K, Fehr D, Kramps C, Gessner C, Killmer K et al. BMI1 is a target gene of E2F-1 and is strongly expressed in primary neuroblastomas. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(6):1745-1754.
- (91) Walton JD, Kattan DR, Thomas SK, Spengler BA, Guo HF, Biedler JL et al. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors 2. *Neoplasia* 2004; 6(6):838-845.
- (92) Walton JD, Kattan DR, Thomas SK, Spengler BA, Guo HF, Biedler JL et al. Characteristics of stem cells from human neuroblastoma cell lines and in tumors. *Neoplasia* 2004; 6(6):838-845.
- (93) Sidell N. Retinoic acid-induced growth inhibition and morphologic differentiation of human neuroblastoma cells in vitro. *J Natl Cancer Inst* 1982; 68(4):589-596.

- (94) Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee PL et al. Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev* 2007; 21(9):1050-1063.
- (95) Schulte JH, Lim S, Schramm A, Friedrichs N, Koster J, Versteeg R et al. Lysine-specific demethylase 1 is strongly expressed in poorly differentiated neuroblastoma: implications for therapy. *Cancer Res* 2009; 69(5):2065-2071.
- (96) Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, Kagey MH, Young RA. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev* 2008; 22(6):746-755.
- (97) Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, Kagey MH, Young RA. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Genes Dev* 2008; 22(6):746-755.
- (98) Fiskus W, Wang Y, Sreekumar A, Buckley KM, Shi H, Jillella A et al. Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* 2009; 114(13):2733-2743.
- (99) Kondo Y, Shen L, Issa JP. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol* 2003; 23(1):206-215.
- (100) Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, Abe M, Kelly TK et al. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(6):1579-1588.
- (101) Yamaguchi J, Sasaki M, Sato Y, Itatsu K, Harada K, Zen Y et al. Histone deacetylase inhibitor (SAHA) and repression of EZH2 synergistically inhibit proliferation of gallbladder carcinoma. *Cancer Sci* 2010; 101(2):355-362.
- (102) Fiskus W, Buckley K, Rao R, Mandawat A, Yang Y, Joshi R et al. Panobinostat treatment depletes EZH2 and DNMT1 levels and enhances decitabine mediated de-repression of JunB and loss of survival of human acute leukemia cells. *Cancer Biol Ther* 2009; 8(10):939-950.
- (103) Muhlethaler-Mottet A, Meier R, Flahaut M, Bourlout KB, Nardou K, Joseph JM et al. Complex molecular mechanisms cooperate to mediate histone deacetylase inhibitors anti-tumour activity in neuroblastoma cells. *Mol Cancer* 2008; 7:55.
- (104) Panicker J, Li Z, McMahon C, Sizer C, Steadman K, Piekarczyk R et al. Romidepsin (FK228/depsipeptide) controls growth and induces apoptosis in neuroblastoma tumor cells. *Cell Cycle* 2010; 9(9):1830-1838.

- (105) Hartlapp I, Pallasch C, Weibert G, Kemkers A, Hummel M, Re D. Depsipeptide induces cell death in Hodgkin lymphoma-derived cell lines. *Leuk Res* 2009; 33(7):929-936.
- (106) Lai MT, Yang CC, Lin TY, Tsai FJ, Chen WC. Depsipeptide (FK228) inhibits growth of human prostate cancer cells. *Urol Oncol* 2008; 26(2):182-189.
- (107) Liu S, Cheng H, Kwan W, Lubieniecka JM, Nielsen TO. Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest, apoptosis, and differentiation in clear cell sarcoma models. *Mol Cancer Ther* 2008; 7(6):1751-1761.
- (108) Vinodhkumar R, Song YS, Devaki T. Romidepsin (depsipeptide) induced cell cycle arrest, apoptosis and histone hyperacetylation in lung carcinoma cells (A549) are associated with increase in p21 and hypophosphorylated retinoblastoma proteins expression. *Biomed Pharmacother* 2008; 62(2):85-93.
- (109) Deubzer HE, Ehemann V, Westermann F, Heinrich R, Mechttersheimer G, Kulozik AE et al. Histone deacetylase inhibitor Helminthosporium carbonum (HC)-toxin suppresses the malignant phenotype of neuroblastoma cells. *Int J Cancer* 2008; 122(8):1891-1900.
- (110) Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007; 26(37):5541-5552.
- (111) Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 2001; 1(3):194-202.
- (112) Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(4):287-299.
- (113) Ouwehand K, de Ruijter AJ, van Bree C, Caron HN, van Kuilenburg AB. Histone deacetylase inhibitor BL1521 induces a G1-phase arrest in neuroblastoma cells through altered expression of cell cycle proteins. *FEBS Lett* 2005; 579(6):1523-1528.
- (114) Tang XX, Robinson ME, Riceberg JS, Kim DY, Kung B, Titus TB et al. Favorable neuroblastoma genes and molecular therapeutics of neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10(17):5837-5844.
- (115) De los SM, Zambrano A, Aranda A. Combined effects of retinoic acid and histone deacetylase inhibitors on human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mol Cancer Ther* 2007; 6(4):1425-1432.
- (116) Konstantinopoulos PA, Vondoros GP, Papavassiliou AG. FK228 (depsipeptide): a HDAC inhibitor with pleiotropic antitumor activities 1. *Cancer Chemother Pharmacol* 2006; 58(5):711-715.

- (117) Panicker J, Li Z, McMahon C, Sizer C, Steadman K, Piekarz R et al. Romidepsin (FK228/depsipeptide) controls growth and induces apoptosis in neuroblastoma tumor cells. *Cell Cycle* 2010; 9(9):1830-1838.
- (118) Aron JL, Parthun MR, Marcucci G, Kitada S, Mone AP, Davis ME et al. Depsipeptide (FR901228) induces histone acetylation and inhibition of histone deacetylase in chronic lymphocytic leukemia cells concurrent with activation of caspase 8-mediated apoptosis and down-regulation of c-FLIP protein. *Blood* 2003; 102(2):652-658.
- (119) Sato N, Ohta T, Kitagawa H, Kayahara M, Ninomiya I, Fushida S et al. FR901228, a novel histone deacetylase inhibitor, induces cell cycle arrest and subsequent apoptosis in refractory human pancreatic cancer cells. *Int J Oncol* 2004; 24(3):679-685.
- (120) Imai T, Adachi S, Nishijo K, Ohgushi M, Okada M, Yasumi T et al. FR901228 induces tumor regression associated with induction of Fas ligand and activation of Fas signaling in human osteosarcoma cells. *Oncogene* 2003; 22(58):9231-9242.
- (121) Voigt A, Zintl F. Effects of retinoic acid on proliferation, apoptosis, cytotoxicity, migration, and invasion of neuroblastoma cells. *Med Pediatr Oncol* 2003; 40(4):205-213.
- (122) Hewson QC, Lova PE, Malcolm AJ, Pearson AD, Redfern CP. Receptor mechanisms mediating differentiation and proliferation effects of retinoids on neuroblastoma cells. *Neurosci Lett* 2000; 279(2):113-116.
- (123) Carpentier A, Balitrand N, Rochette-Egly C, Shroot B, Degos L, Chomienne C. Distinct sensitivity of neuroblastoma cells for retinoid receptor agonists: evidence for functional receptor heterodimers. *Oncogene* 1997; 15(15):1805-1813.
- (124) Mangiarotti R, Danova M, Alberici R, Pellicciari C. All-trans retinoic acid (ATRA)-induced apoptosis is preceded by G1 arrest in human MCF-7 breast cancer cells. *Br J Cancer* 1998; 77(2):186-191.
- (125) Wang JG, Barsky LW, Davicioni E, Weinberg KI, Triche TJ, Zhang XK et al. Retinoic acid induces leukemia cell G1 arrest and transition into differentiation by inhibiting cyclin-dependent kinase-activating kinase binding and phosphorylation of PML/RARalpha. *FASEB J* 2006; 20(12):2142-2144.
- (126) Guo JM, Xiao BX, Lou YR, Wang DH, Yan CH, Zhan L et al. The effects of all-trans-retinoic acid on cell cycle and alkaline phosphatase activity in pancreatic cancer cells. *Med Chem* 2006; 2(5):457-461.
- (127) Matsuo T, Seth P, Thiele CJ. Increased expression of p27Kip1 arrests neuroblastoma cell growth. *Med Pediatr Oncol* 2001; 36(1):97-99.

- (128) Borriello A, Pietra VD, Criscuolo M, Oliva A, Tonini GP, Iolascon A et al. p27Kip1 accumulation is associated with retinoic-induced neuroblastoma differentiation: evidence of a decreased proteasome-dependent degradation. *Oncogene* 2000; 19(1):51-60.
- (129) Matsuo T, Thiele CJ. p27Kip1: a key mediator of retinoic acid induced growth arrest in the SMS-KCNR human neuroblastoma cell line. *Oncogene* 1998; 16(25):3337-3343.
- (130) Fiskus W, Wang Y, Sreekumar A, Buckley KM, Shi H, Jillella A et al. Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* 2009; 114(13):2733-2743.
- (131) Hayden A, Johnson PW, Packham G, Crabb SJ. S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibition by 3-deazaneplanocin A analogues induces anti-cancer effects in breast cancer cell lines and synergy with both histone deacetylase and HER2 inhibition. *Breast Cancer Res Treat* 2010.
- (132) Fiskus W, Wang Y, Sreekumar A, Buckley KM, Shi H, Jillella A et al. Combined epigenetic therapy with the histone methyltransferase EZH2 inhibitor 3-deazaneplanocin A and the histone deacetylase inhibitor panobinostat against human AML cells. *Blood* 2009; 114(13):2733-2743.
- (133) van d, V, Otte AP. Transcriptional repression mediated by the human polycomb-group protein EED involves histone deacetylation 6. *Nat Genet* 1999; 23(4):474-478.
- (134) Aron JL, Parthun MR, Marcucci G, Kitada S, Mone AP, Davis ME et al. Depsipeptide (FR901228) induces histone acetylation and inhibition of histone deacetylase in chronic lymphocytic leukemia cells concurrent with activation of caspase 8-mediated apoptosis and down-regulation of c-FLIP protein. *Blood* 2003; 102(2):652-658.
- (135) Klisovic DD, Katz SE, Effron D, Klisovic MI, Wickham J, Parthun MR et al. Depsipeptide (FR901228) inhibits proliferation and induces apoptosis in primary and metastatic human uveal melanoma cell lines. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44(6):2390-2398.
- (136) Hoshino I, Matsubara H, Hanari N, Mori M, Nishimori T, Yoneyama Y et al. Histone deacetylase inhibitor FK228 activates tumor suppressor Prdx1 with apoptosis induction in esophageal cancer cells. *Clin Cancer Res* 2005; 11(21):7945-7952.
- (137) Nightingale KP, Gendreizig S, White DA, Bradbury C, Hollfelder F, Turner BM. Cross-talk between histone modifications in response to histone deacetylase inhibitors: MLL4 links histone H3 acetylation and histone H3K4 methylation. *J Biol Chem* 2007; 282(7):4408-4416.

- (138) Hirabayashi Y, Suzki N, Tsuboi M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J et al. Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition. *Neuron* 2009; 63(5):600-613.
- (139) Shen X, Liu Y, Hsu YJ, Fujiwara Y, Kim J, Mao X et al. EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell* 2008; 32(4):491-502.
- (140) Mohn F, Weber M, Rebhan M, Roloff TC, Richter J, Stadler MB et al. Lineage-specific polycomb targets and de novo DNA methylation define restriction and potential of neuronal progenitors. *Mol Cell* 2008; 30(6):755-766.
- (141) Gal-Yam EN, Egger G, Iniguez L, Holster H, Einarsson S, Zhang X et al. Frequent switching of Polycomb repressive marks and DNA hypermethylation in the PC3 prostate cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105(35):12979-12984.
- (142) Hirabayashi Y, Suzki N, Tsuboi M, Endo TA, Toyoda T, Shinga J et al. Polycomb limits the neurogenic competence of neural precursor cells to promote astrogenic fate transition. *Neuron* 2009; 63(5):600-613.
- (143) Wu M, Zhang Y, Wu NH, Shen YF. Histone marks and chromatin remodelers on the regulation of neurogenin1 gene in RA induced neuronal differentiation of P19 cells. *J Cell Biochem* 2009; 107(2):264-271.
- (144) Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, Abe M, Kelly TK et al. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol Cancer Ther* 2009; 8(6):1579-1588.
- (145) Kim S, Ghil SH, Kim SS, Myeong HH, Lee YD, Suh-Kim H. Overexpression of neurogenin1 induces neurite outgrowth in F11 neuroblastoma cells. *Exp Mol Med* 2002; 34(6):469-475.
- (146) Rostomily RC, Bermingham-McDonogh O, Berger MS, Tapscott SJ, Reh TA, Olson JM. Expression of neurogenic basic helix-loop-helix genes in primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Res* 1997; 57(16):3526-3531.

DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Professor von Rücker für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, die freundliche Unterstützung und die hilfreichen Anregungen bei den Korrekturen meiner Arbeit.

Ich danke Herrn Professor von der Emde für die Übernahme des Coreferates

Ganz besonders bedanken möchte ich bei Doris Schmidt für die freundliche Aufnahme bei ihr im Labor OPZ, die Überlassung eines Arbeitsplatzes, die ständige Diskussionsbereitschaft, die unermüdliche Hilfe, die Motivation und für die Unterstützung in jeder Hinsicht.

Für die hervorragende Atmosphäre im Labor OPZ möchte ich mich vor allem bei Christine Peigney und Werner Masson danken.

Jörg Ellinger möchte ich für seine ständige Hilfsbereitschaft danken. Er stand bei unzähligen Fragen als geduldiger und verlässlicher Ansprechpartner zur Verfügung.

Marina Gun danke ich für die Durchführung der vielen PCRs und für die vielen freundschaftlichen Gespräche.

Bei Alexandra Breuer bedanke ich mich für die geduldige Durchführung der FACS-Versuche.

Meiner Freundin Boi-Dinh Chung möchte ich für das geduldige Korrekturlesen meiner Arbeit und für die vielen Vorschläge für große und kleine Korrekturen danken.

Ebenso danke ich Sylvia Pinsdorf für das Redigieren meiner Arbeit

Meiner besten Freundin Arththi Immanuel möchte ich für die langjährige wunderbare Freundschaft und die ständige Motivation danken. Friends are angels who lift us to our feet when our wings have trouble remembering how to fly.

Steffanie Büttgen möchte ich für die liebevolle Unterstützung vor allem in der letzten Phase dieser Arbeit danken.

Dem Bruder Alexander möchte ich für seinen Rat und Tat in allen Lebenslagen danken.

Meinen Schwiegereltern möchte ich für die finanzielle Unterstützung danken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern für den familiären Rückhalt, sowie ihre Förderung und Unterstützung von Anbeginn bis zu diesem Ziel und darüber hinaus. Meiner Schwester Soniya möchte ich ganz besonders danken für die ständige Motivation, sie hat am stärksten an mich und jegliches Gelingen geglaubt.

Meinem lieben Ehemann Gemy Kuriakose danke ich für die schöne Zeit außerhalb des Labors.

ERKLÄRUNG

An Eides statt versichere ich, Sapuna Mary Kuriakose, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbst und ohne jede unerlaubte Hilfe angefertigt habe, dass diese oder eine ähnliche Arbeit noch keiner anderen Stelle als Dissertation eingereicht worden ist, dass sie weder vollständig noch auszugsweise veröffentlicht worden ist.

Bonn, 25. Oktober 2010

Sapuna Mary Kuriakose