

**Medizinische Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**

**EPIGENETISCHE VERÄNDERUNGEN AM PROMOTOR DES FRAGILEN  
HISTIDIN TRIAS (FHIT) – GENS IN MENSCHLICHEN SEBOZYTEN  
UNTER DEM EINFLUSS DER *IN-VITRO* KULTUR**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von: Magdalena Jotzo

geboren am 07.09.1990 in Altdöbern

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Wolfgang Ballhausen

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. Heike Kielstein

2. PD Dr. med. Martina Herwig-Carl (Bonn)

09.07.2019

12.02.2020

## REFERAT

Die *in-vitro* Kultivierung von Zellen stellt sowohl bei der Erforschung von zellbiologischen Grundlagen des Menschen als auch bei der Stammzellforschung die unverzichtbare Basis dar. Mittlerweile gaben jedoch verschiedene Studienergebnisse Anlass, den bedenkenlosen Umgang mit derartigen Zellen zu hinterfragen. Es wurde gezeigt, dass nicht nur immortalisierte Zellen im Laufe der *in-vitro* Kultivierung Mutationen an Tumorsuppressor-Genen wie p53 erwerben können, welche die Tumorgenese begünstigen. Das Fragile Histidin Trias-Gen (FHIT-Gen) kodiert für ein Protein mit Tumorsuppressor-Funktion und zeigt sich sehr häufig in Karzinomzellen verändert, wobei hier bereits in prämaligen Neoplasie-Stadien strukturelle Aberrationen zu finden sind. Seit längerer Zeit ist bekannt, dass, im Rahmen von Alterungsprozessen zunehmende, epigenetische Veränderungen in Form von CpG-Hypermethylierungen an Transkriptions-regulatorischen Promotorsequenzen von Tumorsuppressor-Genen mit einem Verlust der Genexpression einhergehen (*epigenetic silencing*). Dieses Phänomen konnte sowohl bei Zellen *in-vivo* als auch bei *in-vitro* kultivierten Zelllinien beobachtet werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei der mit dem Large T-Antigen immortalisierten Sebozytenlinie SZ95 auf molekulargenetischer Ebene methylierte CpG-Inseln am 5'-Ende des FHIT-Gens zu identifizieren, als Konsequenz die Abnahme der FHIT-Genexpression und als Folge davon die Zunahme von DNA-Doppelstrangbrüchen darzustellen. Es konnte gezeigt werden, dass mit steigender Passagezahl eine zunehmende Methylierung der 33 untersuchten CpG-Dinukleotide innerhalb der Promotorregion ersichtlich war, folglich nahm die FHIT-Genexpression ab. Es kam zu einer damit korrelierenden Anhäufung von DNA-Doppelstrangbrüchen, welche sich als Reparaturfoci anhand von Gamma-H2A.X-spezifizierter Immunfluoreszenz visualisieren ließen. Als experimentell therapeutischer Ansatz wurde die Sebozytenlinie SZ95 bei hoher Passagezahl mit dem demethylierend wirkenden Agens 5-Azacytidin sowie mit Trichostatin A behandelt und mit entsprechenden Methylierungs- und Expressionsanalysen kombiniert. Es konnte eine Abnahme der Methylierung der FHIT-Promotorregion sowie eine Re-Expression von FHIT-Transkripten beobachtet werden. Die vorliegende Arbeit sieht sich als Beitrag zur Aufklärung von unter *in-vitro* Kulturbedingungen auftretenden, epigenetischen Veränderungen an Tumorsuppressor-Genen von immortalisierten Zelllinien. Hieraus lassen sich Parallelschlüsse zu karzinogen entarteten Zellen *in-vivo* ziehen. Da sich das FHIT-Gen in einem Großteil von Talgdrüsenkarzinomen verändert zeigt, könnten FHIT-defiziente SZ95-Sebozyten als Modell für die Erforschung von individualisierten Therapieansätzen dienen.

## INHALTSVERZEICHNIS

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. EINLEITUNG.....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Tumorgenese – Fehlregulation des Zellzyklus.....</b>                                  | <b>1</b>  |
| <b>1.2 Epigenetik und DNA-Methylierung.....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>1.3 Das Fragile Histidin Trias-Gen (FHIT-Gen).....</b>                                    | <b>4</b>  |
| <b>1.4 Talgdrüsenkarzinome.....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>1.5 Zellkulturen als <i>in-vitro</i> Modelle in der humanmedizinischen Forschung.....</b> | <b>6</b>  |
| <b>1.6 Zelluläre Seneszenz bei <i>in-vitro</i> Kulturen.....</b>                             | <b>6</b>  |
| <b>1.7 Untersuchte Zelllinien.....</b>   | <b>7</b>  |
| <b>1.7.1 Sebozyten – Bestandteile der Talgdrüse.....</b>                                     | <b>7</b>  |
| <b>1.7.2 Sebozyten als <i>in-vitro</i> Kultur-Modelle.....</b>                               | <b>7</b>  |
| <b>1.7.3 Sebozytenlinie SZ95 - immortalisierte menschliche Talgdrüsenzelllinie.....</b>      | <b>7</b>  |
| <b>1.7.4 Primäre Fibroblasten (NHDF) und ihre SV40 LT-Ag-transfizierten Derivate.....</b>    | <b>8</b>  |
| <b>1.8 Simian Virus 40 Large-T Antigen und Immortalisierung humaner Primärzellen.....</b>    | <b>8</b>  |
| <b>1.9 Zielstellung – Arbeitshypothese.....</b>  | <b>9</b>  |
| <br>   |           |
| <b>2. MATERIAL UND METHODEN.....</b>   | <b>10</b> |
| <b>2.1 Material.....</b>   | <b>10</b> |
| <b>2.1.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen.....</b>   | <b>10</b> |
| <b>2.1.2 Fertigungskits.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>2.1.3 Materialien für die Zellkultur.....</b>   | <b>12</b> |
| <b>2.1.4 Wachstums- und Differenzierungsmedium für SZ95.....</b>                             | <b>12</b> |
| <b>2.1.5 Wachstums- und Differenzierungsmedium für NHDF.....</b>                             | <b>12</b> |
| <b>2.1.6 Hard- und Software.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>2.1.7 Verbrauchsmaterialien.....</b>  | <b>13</b> |
| <b>2.1.8 Zellen.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>2.1.9 Antikörper.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>2.1.10 Oligonukleotide.....</b>   | <b>14</b> |

|  |           |
|--|-----------|
| <b>2.2 Methoden.....</b>   | <b>15</b> |
| 2.2.1 Kultivierung der Zellen.....   | 15        |
| 2.2.2 Kryokonservierung: Zell-Asservate in Dimethylsulfoxid (DMSO-Stocks).....     | 16        |
| 2.2.3 Auftauen der Zellen.....   | 17        |
| 2.2.4 Beurteilung der Vitalität (Vitalitätstest).....                              | 17        |
| 2.2.5 Präparation genomischer DNA.....   | 18        |
| 2.2.6 Duplex-PCR FHIT Exon 5 / Exon 6 und Aktin.....                               | 18        |
| 2.2.7 <i>In-vitro</i> DNA-Methylierung.....  | 19        |
| 2.2.8 Bisulfit-Behandlung genomischer DNA.....                                     | 19        |
| 2.2.9 Methylierungsspezifische PCR (MSP).....                                      | 21        |
| 2.2.10 Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA).....                        | 21        |
| 2.2.11 Bisulfit-Sequenzierung.....   | 22        |
| 2.2.12 Reverse-Transkriptase-PCR für FHIT und Aktin.....                           | 26        |
| 2.2.13 Behandlung der Sebozytenlinie SZ95 mit 5-Azacytidin und Trichostatin A..... | 27        |
| 2.2.14 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie.....                                  | 27        |
| 2.2.15 Software.....   | 29        |
| 2.2.16 Statistische Auswertung des Methylierungsmusters.....                       | 30        |
| <br>   |           |
| <b>3. ERGEBNISSE.....</b>  | <b>31</b> |
| 3.1 Morphologie und Verhalten der Sebozytenlinie SZ95.....                         | 31        |
| 3.1.1 Wachstumskinetik – Analyse der Wachstumsverläufe.....                        | 33        |
| 3.1.2 Beurteilung der Vitalität mittels Trypanblaufärbung (Vitalitätstest).....    | 34        |
| 3.1.3 Beta-Aktin-Färbung zur Beurteilung der Gesamt-Morphologie der SZ95.....      | 34        |
| 3.1.4 DAPI-Färbung zur Beurteilung der Zellkernmorphologie.....                    | 35        |
| 3.1.5 Verhalten während des Abtrypsinierungs-Vorgangs.....                         | 36        |
| 3.1.6 Morphologie der Fibroblastenzelllinien NHDF und NHDF pFUW LT-Ag.....         | 37        |
| 3.2 Duplex-PCR FHIT Exon 5 und Exon 6 der SZ95-Sebozyten.....                      | 38        |
| 3.3 Methylierungsspezifische PCR (MSP).....  | 39        |
| 3.4 Combined Bisulfit Restriction Analysis (COBRA).....                            | 40        |

|   |    |
|---|----|
| 3.5 SZ95-DNA <i>in-vitro</i> methyliert.....  | 42 |
| 3.6 NHDF- und NHDF pFUW LT-Ag-DNA <i>in-vitro</i> methyliert.....                           | 42 |
| 3.7 Analyse der DNA-Methylierung der Regionen 1 und 2 des FHIT-Gens.....                    | 43 |
| 3.7.1 Bisulfit-Sequenzierung der Sebozytenzelllinie SZ95 (P32 und P67).....                 | 43 |
| 3.7.2 Kontroll-PCR und Sequenzierung.....   | 43 |
| 3.7.3 Auswertung des Methylierungsmusters der Passagen P32 und P67 der SZ95.....            | 44 |
| 3.7.4 FHIT Region 1 und Region 2: Vergleich zwischen SZ95 P32 und SZ95 P67.....             | 44 |
| 3.8 Reverse-Transkriptase PCR.....  | 47 |
| 3.9 Immunfluoreszenz: Histonmodifikation $\gamma$ -H2A.X.....                               | 47 |
| 3.10 Behandlung der SZ95 mit 5-Azacytidin und Trichostatin A.....                           | 49 |
| <br>  |    |
| 4. DISKUSSION.....  | 51 |
| 4.1 Genetische Veränderungen in menschlichen Zellen durch <i>in-vitro</i> Kultivierung..... | 51 |
| 4.1.1 Diskussion von möglichen Noxen im Rahmen der <i>in-vitro</i> Kultivierung.....        | 52 |
| 4.1.2 Noxen, welche <i>in-vivo</i> eine Hypermethylierung von FHIT hervorrufen können.....  | 53 |
| 4.2 Welche Rolle spielt die Immortalisierung der Zellen durch das LT-Antigen?.....          | 54 |
| 4.3 Das FHIT-Gen als Ziel von zellspezifischen und epigenetischen Veränderungen.....        | 56 |
| 4.4 Bedeutung der Hypermethylierung der Region 2 (Intron 1) des FHIT-Gens.....              | 57 |
| 4.5 Hypothese zur Entstehung von Talgdrüsenkarzinomen (TDK).....                            | 58 |
| 4.6 Therapeutische Ansätze.....   | 59 |
| <br>  |    |
| 5. ZUSAMMENFASSUNG.....   | 61 |

|  |             |
|--|-------------|
| <b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>   | <b>62</b>   |
| <b>THESEN.....</b>   | <b>74</b>   |
| <b>ANLAGEN.....</b>  | <b>75</b>   |
| <b>FHIT-Sequenz (Bisulfit-konvertiert): Primersequenzen und CpG-Dinukleotide.....</b>  | <b>75</b>   |
| <b>Region 1 des FHIT-Gens.....</b>   | <b>76</b>   |
| <b>Methylierungsmuster der Region 1 des FHIT-Gens.....</b>   | <b>77</b>   |
| <b>Region 2 des FHIT-Gens.....</b>   | <b>78</b>   |
| <b>Methylierungsmuster der Region 2 (Intron 1) des FHIT-Gens.....</b>  | <b>79</b>   |
| <b>Sequenz FHIT-Gen.....</b>   | <b>80</b>   |
| <br>   |             |
| <b>EIDESSTATTLICHE SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG,<br/>ERKLÄRUNGEN ÜBER BISHERIGE PROMOTIONSVERSUCHE UND<br/>ZUR WAHRHEITSGEMÄSSHEIT DER ANGABEN.....</b> | <b>VII</b>  |
| <br>   |             |
| <b>TABELLARISCHER LEBENS LAUF.....</b>   | <b>VIII</b> |
| <br>   |             |
| <b>DANKSAGUNG.....</b>   | <b>IX</b>   |

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

Standardmaßeinheiten, Enzym- und Genbezeichnungen sowie Eigennamen sind nicht aufgeführt. Lateinische Begriffe und Firmen- sowie Produkteigennamen sind im Abkürzungsverzeichnis und in der weiteren Arbeit *kursiv* hervorgehoben.

|                 |   |
|-----------------|---|
| ADP             | Adenosindiphosphat                                      |
| AK              | Antikörper  |
| AMP             | Adenosinmonophosphat                                    |
| AP3A            | Diadenosin Triphosphat                                  |
| bp              | Basenpaare  |
| BSA             | Bovines Serum Albumin                                   |
| cDNA            | komplementäre DNA                                       |
| COBRA           | Combined Bisulfite Restriction Analysis                 |
| CO <sub>2</sub> | Kohlendioxid  |
| DAPI            | 4', 6-Diamidino-2-phenylindol                           |
| DDW             | doppelt destilliertes, steriles Wasser                  |
| DMEM            | <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>                 |
| DMSO            | Dimethylsulfoxid  |
| DNA             | Desoxyribonukleinsäure                                  |
| dNTPs           | Desoxyribonukleosidtriphosphat                          |
| DTT             | Dithiothreitol  |
| EDTA            | Ethylendiamintetraessigsäure                            |
| EGF             | Epidermaler Wachstumsfaktor                             |
| ESC             | Plattenepithelkarzinom des Ösophagus                    |
| FITC            | Fluoreszein-Isothiocyanat                               |
| FKS             | Fetales Kälberserum                                     |
| HNPCC           | Hereditäres Non-Polypöses Kolorektales Karzinom-Syndrom |
| HSB             | Farbmodell-Parameter H, S und B                         |
| IgG             | Immunglobulin G   |

|           |  |
|-----------|--|
| LB-Medium | <i>Lysogeny-Broth</i> Medium                         |
| LT-Ag     | Large T-Antigen von SV 40                            |
| MB        | Megabasen  |
| MMR       | Mismatch-Repair-System                               |
| MSP       | Methylierungsspezifische PCR                         |
| NCBI      | <i>National Centre for Biotechnology Information</i> |
| NHDF      | Normale Humane Hautfibroblasten                      |
| PBS       | Phosphatgepufferte Kochsalzlösung                    |
| PCR       | Polymerase-Kettenreaktion                            |
| RNA       | Ribonukleinsäure                                     |
| SDS       | Natriumdodecylsulfat                                 |
| Sek       | Sekunden   |
| SV 40     | Simian Virus 40                                      |
| SZ95      | Sebozytenzelllinie SZ95                              |
| TDK       | Talgdrüsenkarzinom                                   |
| TE        | Tris-EDTA Puffer                                     |
| Temp      | Temperatur   |
| TP53      | Tumorsuppressorprotein und –gen 53                   |
| Tris      | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol            |
| TSA       | Trichostatin A                                       |
| UpM       | Umdrehungen pro Minute                               |
| UV        | Ultraviolett   |



# **1. EINLEITUNG**

## **1.1 Tumorgenese – Fehlregulation des Zellzyklus**

Die Tumorgenese beschreibt die Entstehung von malignen Gewebsneubildungen (Neoplasien). Man spricht hingegen von Karzinogenese, wenn es sich bei der Ausgangszelle der Tumorentwicklung um eine Epithelzelle handelt. Tumorzellen unterscheiden sich in vielen Aspekten von normalen Zellen. Die maligne Transformation basiert auf zahlreichen Schritten im Zuge von genetischen Veränderungen. Hier seien als Beispiele die Aktivierung von (Proto-) Onkogenen, der Ausfall von DNA-Reparatur-Genen und der Verlust der Funktion von Tumorsuppressor-Genen genannt [1,2]. Gesunde Zellen zeichnen sich durch einen reguliert ablaufenden Zellzyklus und eine gut funktionierende Antwort auf DNA-Schädigungen aus und gewährleisten dadurch genomische Stabilität [3]. Im Gegensatz dazu weisen Tumorzellen einen fehlregulierten Zellzyklus auf und gewinnen auf diese Art Autonomie: Sie verlieren die Fähigkeit, in den kontrollierten, programmierten Zelltod (Apoptose) einzutreten, wodurch sie Zeichen einer unsterblichen Lebensweise zeigen (Immortalisierung) und somit die zelluläre Seneszenz (Kapitel 1.6) umgehen können. Die Immortalisierung von derartig entarteten Zellen stellt einen essentiellen und sehr früh stattfindenden Schritt im Rahmen von malignen Transformations-Prozessen dar [4]. Es gibt eine Vielzahl an Faktoren, welche bei der malignen Entartung der Zelle eine Rolle spielen: Beispielsweise resultieren Punktmutationen, Deletionen und Insertionen in einer Veränderung der DNA-Sequenz. Als Konsequenz kann dies eine Dysregulation oder einen Verlust der Funktion der entsprechenden Genprodukte nach sich ziehen. Ein besonderes Augenmerk in der heutigen Forschung liegt auf die den Zellzyklus regulierenden Proto-Onkogenen und Tumorsuppressor-Genen. Proto-Onkogene sind natürliche Vorstufen von Onkogenen, welche erst durch schädigende (exogene Umwelt-) Einflüsse zur Tumor-auslösenden Form mutieren. Proto-Onkogene sind in jeder Zelle zu finden und kodieren für Proteine, welche bei der Kontrolle und der Steuerung des Zellzyklus und -wachstums sowie bei Teilungs- und Differenzierungsvorgängen eine wichtige Rolle spielen. Hierzu zählen beispielsweise Wachstumsfaktoren und Transkriptionsfaktoren. Onkogene können auf diesem Wege unkontrolliertes Tumorwachstum initiieren [2]. Durch Tumorsuppressor-Gene erfolgt die Kontrolle der Zellteilung und des kontrollierten, programmierten Zelluntergangs. Beispiele für Tumorsuppressor-Gene sind das Retinoblastom-Gen, das p53-Gen und das Fragile Histidin Trias-Gen (FHIT-Gen). TP53 kommt eine Schlüsselrolle bei den Vorgängen von Zellteilung, Zellwachstum, Zellzyklus-Arrest und Apoptose zu [5]. Durch Noxen wie oxidierende Radikalwirkungen und daraus resultierenden DNA-Schäden im Zellgenom kann TP53 aktiviert werden. Dadurch wird der weitere Zellzyklus-Ablauf arretiert und eine maligne Transformation kann verhindert werden [6]. Es erfolgt entweder die Behebung der DNA-Schäden durch Reparaturmechanismen oder es wird bei Irreparabilität die Apoptose eingeleitet. So schützt sich

der Organismus davor, dass eine in ihrem Erbgut geschädigte Zelle weiter lebt und infolge des Erwerbs weiterer Mutationen zu einem Malignom führt. Aufgrund dieser Tatsache wird TP53 auch als „Wächter des Genoms“ bezeichnet [7]. Schätzungsweise lassen sich TP53-Mutationen in mehr als 50 % aller menschlichen Tumoren finden [5]. Ein für die vorliegende Arbeit entscheidender Mutationsmechanismus stellt das genetische *Silencing* (Supprimierung der Genaktivität) von Tumorsuppressor-Genen dar, welchem eine große Rolle bei der Pathogenese vieler Tumoren zukommt [8]. Es ist bekannt, dass selbst die partielle Inaktivierung der Funktion von Tumorsuppressor-Genen entscheidend zur Tumorgenese beitragen kann [9].

## **1.2 Epigenetik und DNA-Methylierung**

Epigenetische Modifikationen beschreiben Veränderungen der „Verpackung“ des Genoms und somit der Aktivitätsregulation der Genfunktionen, wobei hier die Nukleotidsequenz identisch bleibt und keine Veränderung im Sinne von Mutationsvorgängen erfährt [10]. Derartige Veränderungen sind potentiell reversibel, können jedoch an Tochterzellen weiter vererbt werden. Beispiele posttranslationaler Modifikationen des epigenetischen Codes sind DNA-Methylierungen oder kovalente Modifikationen an Histonen durch beispielsweise Methylierungen, Acetylierungen oder Phosphorylierungen [10,11]. Epigenetische Veränderungen können eine maligne Transformation initiieren [12,13]. DNA-Methylierungen, welche den überwiegenden Anteil an epigenetischen Regulationsmechanismen darstellen, führen zu einer regionalen Hypermethylierung. Das Ausmaß des Methylierungsmusters steigt stochastisch mit dem zunehmenden Alter des Organismus an [14]. Aus physiologischer Sicht spielen DNA-Methylierungen eine essentielle Rolle beim genomischen Imprinting, bei der Inaktivierung des X-Chromosoms und im Rahmen der genomischen Stabilisierung [15-17]. Die gezielte Methylierung von DNA-Abschnitten ist ein für die Evolution unverzichtbarer Prozess und spielt eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Organismus, der Differenzierung von Zellen und im Rahmen von epigenetischen Vorgängen, wobei hier das Methylierungsmuster einer stetigen Dynamik unterliegt [18,19]. Bei der DNA-Methylierung werden Methylgruppen ( $-CH_3$ ) durch DNA-Methyltransferasen auf den 5'-Kohlenstoff des Cytosinrings übertragen, wenn in der DNA-Sequenz auf das Cytosin das Nukleotid Guanin folgt (CpG), also sich folglich das Cytosin innerhalb eines Cytosin-Guanin-Nukleotid-Dimers (5'-CpG-3') befindet [10,17,20,21]. Den DNA-Methyltransferasen wird dabei nicht nur zugeschrieben, bereits bestehende Methylierungsmuster instand zu halten, sondern ebenfalls zu *de novo* Methylierungen befähigt zu sein [22,23]. Die Nukleotidabfolge CG kommt im menschlichen Genom nur zu etwa 20 % vor. Ursache für diese sogenannte *CpG-Suppression* stellt die, im Vergleich gegenüber anderen Basenabfolgen, vierzig mal höhere Mutationsrate dar: Durch spontan stattfindende Desaminierung kann sich aus 5-Methylcytosin die Base

Thymin bilden [10]. DNA-Abschnitte, welche eine hohe CpG-Dinukleotid-Dichte enthalten, werden als CpG-Inseln bezeichnet und befinden sich in den Genbereichen, welche für die regulatorische Steuerung der Genaktivität zuständig sind (Promotor-Regionen), wobei sie auch häufig bis in die Sequenz des ersten Exons und sogar des nachfolgenden Introns reichen [24,25]. CpG-Inseln sind in etwa 40 % aller Promotor-Regionen zu finden [26]. Die Bindung von Transkriptionsfaktoren an die Promotorregion kann an sogenannten TATA- oder GC-Boxen erfolgen. Innerhalb von CpG-Inseln finden sich häufig GC-Boxen: An diesen lagern sich Sp1-Transkriptionsfaktoren an und GC-Boxen werden in CpG-reichen Promotorbereichen sowohl stromaufwärts (*up-*) als auch stromabwärts (*downstream*), relativ gesehen zum Transkriptionsstartpunkt, gefunden [24]. Das menschliche Genom enthält nach neuesten Erkenntnissen rund 30.000 CpG-Inseln, wovon rund 9.000 im Laufe der Entwicklung und im Rahmen von Differenzierungsvorgängen methyliert werden [27]. Durch die von Methyltransferasen generierte Übertragung der Methylgruppe auf die Base Cytosin erfolgt die Supprimierung der Aktivität des entsprechend nachfolgenden Gens (*genetic silencing*). Somit steht die methylierte Form für ein transkriptionell inaktives Gen, da der entsprechende Genabschnitt für Transkriptionsfaktoren unzugänglich und für die RNA-Polymerase nicht ablesbar ist, was im Endeffekt in einer transkriptionellen Repression resultiert [10,22,28-31]. Bei transkriptionell aktiven Genen liegt dieser Bereich in unmethylierter Form vor, sodass unmethylierte CpG-Inseln im regionalen Kontext von Transkriptionsstartpunkten auf den „Normalfall“ hindeuten [22,26,32]. Maligne entartete Zellen weisen sich unter anderem durch veränderte DNA-Methylierungsmuster und einer folglich aberranten Gen-Expression aus, wobei Modifikationen hinsichtlich der DNA-Methylierung als sehr früh stattfindende Prozesse der Tumorgenese angesehen werden [32,33]. Aberranten DNA-Methylierungsmustern wird bereits seit vielen Jahren eine wichtige Rolle bei der Tumorgenese zugeschrieben [34]. Zahlreiche Methylierungs-Analysen von Tumorzellen deuten darauf hin, dass häufig in entarteten Zellen die Cytosine innerhalb der regulatorisch wirkenden Promotor-Region bestimmter Tumorsuppressor-Gene, im Gegensatz zu normalen Zellen, methyliert sind und dadurch die jeweiligen Gene inaktiviert werden, was folglich ein Entartungsrisiko mit sich bringen kann [30]. Es gibt eine Vielzahl von Untersuchungen, welche eine transkriptionelle Repression durch im Rahmen von epigenetischen Prozessen stattfindender Hypermethylierung von CpG-Inseln im Promotorbereich bei sicher bestätigten und vermuteten Tumorsuppressorgenen zeigen [35,36]. Einen Brennpunkt der aktuellen Forschungen stellt der experimentelle Ansatz dar, ein epigenetisch stillgelegtes Tumorsuppressor-Gen wieder reaktivieren zu können (Kapitel 4.6).

### **1.3 Das Fragile Histidin Trias-Gen (FHIT-Gen)**

Der kurze Arm vom menschlichen Chromosom 3 beinhaltet die fragile Region FRA3B, welche sich sehr häufig durch die Einwirkung von Karzinogenen und im Rahmen von malignen Erkrankungen als verändert zeigt [2]. Im Jahre 1996 wurde dem Chromosomenabschnitt 3p14.2 das FHIT-Gen zugeordnet [37]. Das FHIT-Gen kodiert für ein Protein mit Tumorsuppressor-Funktion und umfasst 10 Exons, wobei nur die Exone 5 bis 9 für das Protein kodieren [37-39]. Die genomische DNA des Gens umfasst 1 MB und das Protein ist als Molekül für intrazelluläre Signalübermittlung eine AP3A Diadenosin-Triphosphathydrolase, welche AP3A in ADP und AMP spaltet und in viele Funktionen des intrazellulären Geschehens während des Zellzyklus, beispielsweise bei der Regulation der DNA-Replikation oder bei der Zellantwort auf intrazellulären Stress sowie in zahlreiche, auf dieser Ebene stattfindenden Kontrollmechanismen involviert ist [36,40-44]. Die Inaktivierung der Tumorsuppressor-Funktionen des FHIT-Gens kann in einem Verlust der Apoptose-Fähigkeit und der Möglichkeit, den Zell-Zyklus zu arretieren, resultieren [45]. Die genaue Funktion, welche FHIT bei den expliziten Abläufen von Apoptosevorgängen spielt, ist jedoch noch nicht eindeutig geklärt [46]. Es wird vermutet, dass das FHIT-Protein den Apoptose-Vorgang induziert und dadurch das Wachstum von karzinomatös entarteten Zellen inhibiert [44]. Ein Verlust der FHIT-Expression wurde bereits in zahlreichen prämaligen Läsionen bestätigt, was Veränderungen des FHIT-Gens als sehr früh stattfindende Ereignisse im Rahmen der Karzinogenese darstellt [47,48]. Selbst normale Zellen wiesen zu einem geringen prozentualen Anteil abnormale strukturelle Variationen in der FRA3B-Region auf [49]. Eine Aberration der kodierenden Sequenz des FHIT-Gens zieht einen Allel-spezifischen Verlust der Aktivität des FHIT-Proteins nach sich, infolgedessen geht die Tumorsuppressor-Funktion des Proteins in der betroffenen Zelle um rechnerisch 50 % zurück. Durch die Möglichkeit der gesteigerten Zellproliferation und der verminderten Fähigkeit zur Apoptose steigt das Risiko für Entartung. Umweltkarzinogene können zu FHIT-Läsionen führen, welche bereits als präneoplastisches Stadium der Karzinogenese anzusehen sind [50]. Das FHIT-Gen ist der am häufigsten veränderte Bereich im Großteil aller menschlichen Tumoren [37,38,47,48,51-55]. Zahlreiche Experimente bestätigten, dass eine Promotor-Hypermethylierung des FHIT-Gens im Rahmen des epigenetischen *Silencing* mit der Inaktivierung des FHIT-Gens, beziehungsweise einem Verlust der Genexpression, korreliert [36,46]. Der Verlust der *caretaker*-Funktion des Tumorsuppressor-Proteins FHIT kann zu Doppelstrangbrüchen, zu einer Dysregulation von DNA-Schäden-Reparaturkontrollpunkten, funktionellen Defiziten bei der Reparatur von DNA-Schäden selbst, zu einer verminderten Sensitivität gegenüber Apoptose-Signalen sowie zu genomischer Instabilität führen, was in einer möglichen Initiierung von malignen Transformationsprozessen und in einer Progression von (Prä-) Kanzerosen resultiert [36,39,44,46,47,50,52]. Es wurde eine transkriptionelle Inaktivierung des FHIT-Gens durch Hypermethylierung der CpG-Dinukleotide des Exon 1 und /

oder des Intron 1 festgestellt [36]. Gleichzeitig zeigten Studien, dass eine Re-Expression von FHIT in karzinogen entarteten Zellen einen Arrest der Zellproliferation sowie die Einleitung von Apoptose-Vorgängen bewirken kann [56]. Verschiedene Chaperone (Hitzeschockproteine) sowie mitochondriale Ferredoxine agieren als FHIT-Interaktoren, was impliziert, dass FHIT direkt in die zelluläre Antwort auf (oxidativen) Stress sowie bei der Initiierung von Apoptosevorgängen involviert ist [2]. Das FHIT-Gen spielt eine entscheidende Rolle bei Krebserkrankungen, welche durch Umweltkarzinogene wie beispielsweise Zigarettenrauch verursacht werden [46,57,58] (Kapitel 4.1.2). Die genomische Sequenz des FHIT-Gens im Bereich der Positionen -95 bis +365 mit Bezug auf den Transkriptionsstartpunkt enthält einen CG-Anteil von über 60 %, was diese Region des FHIT-Gens als CpG-Insel definiert [10,36]. Diese Sequenz umfasst drei Sp1-Interaktionsstellen, wobei es sich bei Sp1 um einen GC-Box bindenden Transkriptionsfaktor handelt [36,59]. Die Sequenz des FHIT-Gens findet sich auf Seite 80.

#### **1.4 Talgdrüsenkarzinome**

Talgdrüsenkarzinome (*Adenocarcinoma sebaceum*) sind sehr seltene, vor allem im höheren Lebensalter auftretende, maligne Entartungen von Talgdrüsen. Diese Tumoren können periorbital oder extraorbital lokalisiert sein, wobei sie gehäuft in der periokulären Region zu finden sind [60-62]. Am häufigsten ist das Oberlid des Auges betroffen [63]. An den Augenlidern gehen sie von den Meibomschen Drüsen aus [61,62]. Talgdrüsenkarzinome (TDK) erscheinen als solitäre, zystisch-noduläre Tumoren mit oft jahrelangem Bestehen, sodass es aufgrund der morphologischen Ähnlichkeit zu entzündlichen Vorgängen des Lids häufig zu Verwechslungen kommen kann [61,63]. Das therapeutische Vorgehen beinhaltet die radikale operative Exzision und / oder eine Radiotherapie [61,62]. Talgdrüsenkarzinome treten entweder sporadisch oder als ein phänotypisches Erscheinungsbild im Rahmen des Muir-Torre-Syndroms auf. Das Muir-Torre-Syndrom ist eine Variante des Hereditären Non-Polypösen Kolorektalen Karzinom-Syndroms (HNPCC, Lynch-Syndrom) [64,65] und imponiert als eine autosomal-dominante Erberkrankung, welche durch ein defizientes Mismatch-Repair-System (MMR) sowie durch die Koexistenz von Talgdrüsen-Hauttumoren und einer systemischen viszeralen Malignität definiert ist [66,67]. Die Arbeitsgruppe von Professor Ballhausen beschäftigt sich seit einigen Jahren mit den Pathomechanismen auf genetischer Ebene, welche zu einer malignen Entartung von Talgdrüsen führen können.

### **1.5 Zellkulturen als *in-vitro* Modelle in der humanmedizinischen Forschung**

*In-vitro* Zellkultur-Systeme ermöglichen die Erforschung von zahlreichen grundlegenden, *in-vivo* stattfindenden (patho-) physiologischen Prozessen [68] und stellen gleichzeitig einen sinnvollen Ersatz für Tierversuche dar, wobei außerdem Studien an humanen Zelllinien als repräsentativer zu betrachten sind. Ziel ist es, im Rahmen von *in-vitro* Zellkultursystemen ähnliche Bedingungen zu schaffen, wie sie *in-vivo* vorzufinden sind. Durch konstante äußere Bedingungen und Einflussfaktoren, wie beispielsweise dem Angebot an Nährstoffen, dem pH-Wert oder der Temperatur, können *in-vitro* stattfindende Experimente standardisiert werden [69]. Als Primärkultur bezeichnet man die *in-vitro* Kultur von Zellen, welche direkt von einem Organismus stammen und deren Lebenszeit unter *in-vitro* Kulturbedingungen zeitlich limitiert ist. Ab der ersten Passagierung werden die Zellen als Subkulturen bezeichnet. Mit Beginn der ersten Subkultur spricht man von einer Zelllinie [69]. Durch Leonard Hayflick erfolgte eine Einteilung der Wachstums- und Lebensstadien von adhärennten Zellkulturen in 3 Phasen, wobei sich an die dritte Phase (stationäre Phase) der programmierte Zelltod anschließt (Hayflick-Limit, replikative Seneszenz) [70]. Bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien handelt es sich um adhärennte Zellkulturen (Kapitel 1.7).

### **1.6 Zelluläre Seneszenz bei *in-vitro* Kulturen**

Menschliche, primäre Zellen weisen in Kultur nur eine begrenzte Fähigkeit zur Reproduktion auf: Jede einzelne Zelle einer Population verfügt über das gleiche Verdopplungspotenzial, welches auf etwa 50 Verdopplungen begrenzt ist [70]. In der stationären 3. Phase des Lebensstadiums einer eukaryotischen Zelle in Zellkultur nimmt die Zellteilungsrate so weit ab, bis die Zellteilung vollständig eingestellt wird und das Wachstum stagniert (stationäre Phase). Der Zellzyklus wird irreversibel gestoppt (replikative Seneszenz) [71]. Der wichtigste Grund für die beschränkte Teilungsfähigkeit der Zellen ist die mit jeder Replikationsrunde stattfindende Verkürzung der Telomere (Chromosomenenden). Zudem spielt die Akkumulation schädlicher Substanzen in Form von freien, oxidativ wirkenden Radikalen und der alterungsbedingte, schrittweise Verlust der normalen physiologischen Abläufe eine Rolle. Zelluläre Seneszenz ist aber auch wichtig, um den Beginn einer malignen Transformation zu verhindern: Die meisten Zellen antworten auf potenzielle onkogene Stimuli mit einem Eintritt in die zelluläre Seneszenz und gehen in Apoptose [71]. Der Begriff Apoptose definiert den genetisch programmierten, geordnet ablaufenden Zelluntergang [72]. Dieser Prozess ist für den Organismus überlebenswichtig, da er dadurch den geregelten Ablauf der Zellproliferation sicherstellt. TP53 spielt eine entscheidende Rolle im Rahmen von Seneszenz- und Apoptose-Vorgängen [71]. Tumorzellen haben die Barriere der Onkogen-induzierten Seneszenz (OIS) und der replikativen Seneszenz überwunden [73].

## **1.7 Untersuchte Zelllinien**

### **1.7.1 Sebozyten – Bestandteile der Talgdrüse**

Die Talgdrüse (*Glandula sebacea*) ist eine holokrine und lipidhaltigen Talg (*Sebum*) produzierende Drüse. Sie befindet sich im *Stratum superficiale* der Dermis [74]. Talgdrüsen verfügen über eine genetisch determinierte Morphologie und ein bestimmtes (patho-) physiologisches Verhaltensmuster, welche sich durch verschiedene Faktoren beeinflussen lassen [75]. Als Sebozyten werden die einzelnen Zellen der Talgdrüse bezeichnet. Ihre Hauptfunktion ist die Talg-Synthese, welcher hauptsächlich aus Triglyceriden, Fettsäuren und Zelldetritus besteht und vorrangig zum Schutz und zur Erhaltung des normalen Hautmilieus dient [76]. Die am meisten verbreitete Erkrankung des Talgdrüsen-Follikels ist die Acne vulgaris [77]. Talgdrüsen können in Form von Talgdrüsenkarzinomen maligne entarten (Kapitel 1.4).

### **1.7.2 Sebozyten als *in-vitro* Kultur-Modelle**

*In-vitro* kultivierte Sebozyten menschlichen Ursprungs lassen sich als Modelle nutzen, um auf zellulärer Ebene spezifische Funktionen von (patho-) physiologischen Vorgängen in Talgdrüsen zu untersuchen [77,78]. Im Jahre 1989 wurde das erste *in-vitro* Kultur-Modell von menschlichen Sebozyten etabliert [79]. Es wird bis heute genutzt, um (patho-) physiologische Vorgänge und neue Therapiemethoden von Talgdrüsen-assoziierten Erkrankungen zu erforschen [80]. Hierbei war und ist es entscheidend, dass sich die *in-vitro* kultivierten Sebozyten im Hinblick auf die Morphologie, die Funktion und physiologischen Abläufe in keinster Weise von Sebozyten unter *in-vivo* vorherrschenden Verhältnissen unterscheiden, oder zumindest in einem sehr hohen Maß mit diesen vergleichbar sind. Dieser Aspekt wurde bei der von Prof. Zouboulis und seiner Arbeitsgruppe etablierten Sebozytenlinie SZ95 bestätigt [77,79].

### **1.7.3 Sebozytenlinie SZ95 - immortalisierte menschliche Talgdrüsenzelllinie**

Primäre, native Sebozyten ließen sich in bisherigen Experimenten nur über 3-6 Subkulturen hinweg in der *in-vitro* Kultur halten, bevor sie Vorgänge der Seneszenz einleiteten und abstarben [77,79]. Um diese Problematik zu umgehen, haben Prof. Zouboulis und seine Arbeitsgruppe menschliche Gesichtshaut-Sebozyten, welche von einer 87-jährigen Patientin isoliert wurden, kultiviert und mit dem Simian Virus 40 Large T-Antigen transfiziert [81]. Die so entstandene immortalisierte Zelllinie wurde als SZ95-Zelllinie bezeichnet. Nach Angaben in der Literatur zeigte sich, dass die immortalisierte Sebozytenlinie SZ95 nach einer Passagezeit von über 50 und aufwärts in der Zeitspanne von mehreren Jahren keinerlei Anzeichen von Seneszenz aufwies [81]. Die Sebozytenlinie SZ95 gilt als unerschöpflich vermehrungsfähige

Zelllinie, welche sich nach Angaben in der Literatur in keiner Weise im Hinblick auf den morphologischen Phänotyp oder der funktionellen physiologischen Abläufe von den normalen, humanen Talgdrüsenzellen *in-vivo* unterscheidet [77,81]. Die SZ95 Talgdrüsen-Zelllinie ist durch nationale und internationale Patente geschützt (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH unter der Hinterlegungsnummer DSM ACC2383) [77]. In zahlreichen Studien konnte gezeigt werden, dass SZ95 Sebozyten die Hauptcharakteristika von normalen Sebozyten beibehalten, zum Beispiel den Prozess der Differenzierung mit zunehmendem Zellvolumen und der Lipid-Synthese, das Expressieren von bestimmten Markern, sowie terminalen Differenzierungsvorgängen und schließlich infolgedessen der Zelluntergang durch Apoptose [82]. Bewiesenermaßen behalten diese immortalisierten Sebozyten sämtliche charakteristischen Eigenschaften von menschlichen *in-vivo* Sebozyten bei [77,81,83,84].

#### **1.7.4 Primäre Fibroblasten (NHDF) und deren SV40 LT-Ag-transfizierten Derivate**

In der vorliegenden Arbeit wurde eine primäre Fibroblasten-Zelllinie (Normal Human Dermal Fibroblasts, NHDF) [85] aus der Arbeitsgruppe von Prof. J. Wohlrab / UKK Halle, sowie deren, mit dem Simian Virus 40 transfizierte derivative Zelllinie NHDF 20/01 pFUW LTA<sub>g</sub> zu Vergleichszwecken genutzt [86].

#### **1.8 Simian Virus 40 Large-T Antigen und Immortalisierung humaner Primärzellen**

Da primäre, native Zellen unter *in-vitro* Kulturbedingungen eine limitierte Lebensdauer aufweisen und nach einer gewissen Zeit in Seneszenz gehen, können diese für Forschungszwecke immortalisiert werden, um über längere Zeit in Kultur gehalten werden zu können. Dies kann durch die Transfektion mit viralen Onkogenen, wie beispielsweise dem Large T-Antigen Simian Virus 40 (SV 40), erfolgen [87]. Das Simian Virus 40 gehört zur Gattung der Polyomaviren (DNA-Tumoviren), welche als potentielle Karzinogene diskutiert werden [88,89]. Es wurde erstmals 1960 von Sweet und Hilleman in Nierenzellen von Rhesus-Affen nachgewiesen [90]. Die Interaktionen des LT-Antigens von SV 40 während der DNA-Replikation sowie das daraus resultierende, mögliche onkogene Potential sind Bestandteil vieler intensiver Studien [4,91,92]. SV 40 steht stark im Verdacht, durch neoplastische Transformationen in vielen menschlichen Tumorarten eine kausale Rolle zu spielen und maligne Transformationen zu begünstigen [91,93-96]. Zusätzlich zu einer gesteigerten Wachstums- und Teilungsrate ist das Auftreten von morphologischen Veränderungen in SV 40-transformierten Zellen möglich [97,98]. Die Transfektion einer Zelle mit dem LT-Antigen kann



mit einer Hypermethylierung der Promotor-Regionen von (Tumorsuppressor-) Genen einhergehen [8,99,100].

### **1.9 Zielstellung - Arbeitshypothese**

Die mit dem Large T-Antigen immortalisierte Sebozytenlinie SZ95 zeigte unter standardisierten Kulturbedingungen jenseits von 60 Passagen eine Reduktion der FHIT-Genexpression. Bekannte Mutationsmechanismen, die zur Inaktivierung dieses Gens beitragen, sollten hierzu als mögliche Ursache untersucht werden. Letztendlich sollte mit den durchgeführten Experimenten die Arbeitshypothese bestätigt werden, dass mit zunehmender Anzahl von Zellteilungen unter *in-vitro* Bedingungen epigenetische Veränderungen hervorgerufen werden, welche in einer Hypermethylierung der Transkriptions-regulatorischen Promotorsequenz des FHIT-Gens und somit in seiner Abschaltung resultieren. Mit molekulargenetischen und zellbiologischen Experimenten sollte herausgefunden werden, welche der 33 untersuchten CpG-Dinukleotide am 5'-Ende des FHIT-Gens als Folge einer Hypermethylierung mit dem Verlust der FHIT-Genexpression korrelieren. Die vorliegende Arbeit sieht sich demnach als ein Beitrag zur Aufklärung von epigenetischen Veränderungen an Tumorsuppressor-Genen im Rahmen der *in-vitro* Zellkultur.

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Chemikalien, Puffer und Lösungen**

|   |                                      |
|---|--------------------------------------|
| Aceton  | Sigma Aldrich, USA                   |
| Agarose peqGOLD Universal                     | peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen |
| Ampicillin                                    | Carl Roth GmbH, Karlsruhe            |
| 5-Azacytidin                                  | Sigma-Aldrich, USA                   |
| Betain  | Sigma-Aldrich, USA                   |
| <i>Bst</i> UI                                 | New England BioLabs Inc., USA        |
| Chloroform / Trichlormethan                   | Carl Roth GmbH, Karlsruhe            |
| CutSmart Buffer                               | New England BioLabs Inc., USA        |
| Deoxynucleosid Triphosphat Set                | Roche, Schweiz                       |
| dest. H <sub>2</sub> O (steril, nukleasefrei) | Aqua B. Braun, Melsungen             |
| Dithiothreitol (DTT)                          | Sigma Aldrich, USA                   |
| DNA Loading Dye                               | Thermo Scientific, USA               |
| dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)                | MBI Fermentas, USA                   |
| EDTA  | ICN Biomedicals, USA                 |
| Eisessig                                      | MERCK, Darmstadt                     |
| Ethanol absolut                               | Sigma Aldrich, USA                   |
| Ethidiumbromidlösung Stammlösung              | Carl Roth GmbH, Karlsruhe            |
| Elution Buffer EB                             | Quiagen, Hilden                      |
| Formamid                                      | Carl Roth GmbH, Karlsruhe            |
| Glucose                                       | MERCK, Darmstadt                     |
| Glycerin                                      | Carl Roth GmbH, Karlsruhe            |
| Hexanucleotid Mix                             | Roche, Schweiz                       |
| Isopropanol                                   | Applichem, Darmstadt                 |
| Kaliumacetat                                  | Applichem, Darmstadt                 |
| M23 pUC19 DNA / <i>Msp</i> I ( <i>Hpa</i> II) | Thermo Scientific, USA               |
| Methanol                                      | Sigma Aldrich, USA                   |
| Magnesium-Lösung                              | stratec molecular, Berlin            |

|  |   |
|--|---|
| Natriumacetat-Trihydrat                | MERCK, Darmstadt  |
| Natriumchlorid                         | Carl Roth GmbH, Karlsruhe   |
| Natriumhydroxid                        | MERCK, Darmstadt  |
| NEB Buffer 2                           | New England BioLabs Inc., USA   |
| NH <sub>4</sub> 10x Reaktions-Buffer   | stratec molecular, Berlin   |
| Ladepuffer 6x ALM:                     |   |
| Glycerin                               | Carl Roth GmbH, Karlsruhe   |
| Bromphenolblau                         | Sigma Aldrich, USA  |
| Xylencyanol                            | Sigma Aldrich, USA  |
| LB-Medium / Agar:                      |   |
| Pepton                                 | MERCK, Darmstadt  |
| Hefeextrakt                            | Carl Roth GmbH, Karlsruhe   |
| Agar-Agar                              | Carl Roth GmbH, Karlsruhe   |
| PBS unsteril                           | 10x PBS (pH 7,4): für 1l: 80g NaCl, 2g KCl, 14,2g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2,4g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
| Phenol / Chloroform / Isoamylalkohol   | Carl Roth GmbH, Karlsruhe   |
| PO <sub>4</sub> -DEPC-DDW (0,1%)       | Carl Roth GmbH, Karlsruhe   |
| ProLong Gold antifade Reagenz mit DAPI | Molecular Probes by Life Technologies, USA  |
| Pronase                                | Sigma Aldrich, USA  |
| Ribonuclease Inhibitor                 | Thermo Scientific, USA  |
| Rinderserum-Albumin                    | Sigma Aldrich, USA  |
| RNase                                  | Thermo Scientific, USA  |
| S-Adenosylmethionin (SAM)              | New England BioLabs Inc., USA   |
| SDS (Dodecylsulfat Natriumsalz)        | Carl Roth GmbH, Karlsruhe   |
| SE-Puffer:                             | 75mM NaCl, 24mM EDTA, NaOH (pH = 8)   |
| Natriumchlorid                         | Carl Roth GmbH, Karlsruhe   |
| EDTA                                   | ICN Biomedicals, USA  |
| Natriumhydroxid                        | MERCK, Darmstadt  |
| SssI (CpG) Methylase                   | New England BioLabs Inc., USA   |
| Taq Polymerase                         | Eppendorf, Hamburg  |
| Taq-Polymerase InviTaq                 | stratec molecular, Berlin   |
| TBE- / TE <sup>-4</sup> Puffer:        |   |
| Tris, Borsäure                         | Carl Roth GmbH, Karlsruhe   |
| TRI-Reagenz                            | Applichem, Darmstadt  |

|                |                           |
|----------------|---------------------------|
| Trichostatin A | Sigma Aldrich, USA        |
| Tween® 20      | Carl Roth GmbH, Karlsruhe |

### **2.1.2 Fertigkits**

|   |                        |
|---|------------------------|
| <i>BigDye</i> <sup>TM</sup> Sequenzierungs-Kit      | Thermo Scientific, USA |
| <i>CloneJet</i> <sup>TM</sup> PCR Klonierungs-Kit   | Thermo Scientific, USA |
| <i>innuCONVERT</i> <sup>TM</sup> Bisulfit Basis-Kit | analytikjena, Jena     |
| <i>MasterTaq</i> <sup>TM</sup> -Kit                 | 5 Prime GmbH, Hilden   |
| <i>SuperScript II</i> Reverse Transkriptase         | Invitrogen, USA        |

### **2.1.3 Materialien für die Zellkultur**

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| Dimethylsulfoxid                  | Carl Roth GmbH, Karlsruhe                   |
| Epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) | Sigma Aldrich (1 mg/ml in 10 mM Essigsäure) |
| Fetales Kälberserum (FKS)         | Biochrom AG, Berlin (1h bei 56°C inkubiert) |
| L-Glutamin Lösung                 | Sigma Aldrich, USA                          |
| PBS steril (Pulver)               | Sigma Aldrich, USA                          |
| Penicillin / Streptomycin         | Biochrom, Berlin                            |
| Trypanblau-Lösung (0,4 %)         | Sigma Aldrich, USA                          |
| Trypsin / EDTA-Lösung             | Biochrom GmbH, Berlin                       |

### **2.1.4 Wachstums- und Differenzierungsmedium für SZ95**

|   |                       |
|---|-----------------------|
| DMEM / Ham's F-12 (1:1)   | Biochrom GmbH, Berlin |
| → modifiziert: DMEM/ Ham's F-12 (1:1), 10% FKS, 2,5 % L-Glutamin, 1% Penicillin / Streptomycin, 0,005 % epidermaler Wachstumsfaktor (human EGF) [79,81,101] |                       |

### **2.1.5 Wachstums- und Differenzierungsmedium für NHDF**

|  |  |
|--|--|
| DMEM High Glucose  | Biowest (The Serum Specialist), Frankreich |
| → modifiziert: DMEM, 10% FKS, 2% L-Glutamin, 1% Penicillin / Streptomycin [86] |  |

### 2.1.6 Hard- und Software

|                              |   |
|------------------------------|---|
| <i>BioDoc Analyzer 2.2</i>   | analytikjena, Jena  |
| Kamera-Computer-Programm     | Nikon Camera Elements F3.0  |
| <i>FinchTV</i>               | <a href="https://geospiza.com">https://geospiza.com</a>   |
| <i>BIQ-Analyzer</i>          | <a href="https://biq-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de">https://biq-analyzer.bioinf.mpi-inf.mpg.de</a> |
| <i>Blast</i>                 | <a href="https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast">https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast</a>             |
| <i>(Fiji is just) ImageJ</i> | <a href="https://fiji.sc">https://fiji.sc</a>   |

### 2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Alle in der vorliegenden Arbeit genutzten und den üblichen Laborstandards entsprechenden Verbrauchsmaterialien wurden von den Firmen Carl Roth (Karlsruhe) und Eppendorf Research (Hamburg) erworben und sind im Folgenden nicht explizit aufgeführt. Die Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden von TPP Innovation in plastic (Schweiz) bezogen.

### 2.1.8 Zellen

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien sind wie folgt unter Angabe von Referenz und Herkunft aufgelistet.

| <b>Bezeichnung</b> | <b>Referenz</b>         | <b>Beschreibung</b>                           |
|--------------------|-------------------------|---|
| SZ95               | Zouboulis et al. (1999) | durch LT-Ag immortalisierte Sebozytenlinie    |
| NHDF               | Lu et al. (2012)        | Humane, primäre Fibroblasten                  |
| NHDF pFUW LT- Ag   | Bräuer (2014)           | durch LT-Ag immortalisierte Fibroblastenlinie |

### 2.1.9 Antikörper

| <b>Primär-AK</b>                         | <b>Klon</b>                       | <b>Hersteller</b>             | <b>Verwendung</b> | <b>Verdünnung</b> |
|--|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------|-------------------|
| Kaninchen anti-p-Histone H2A.X           | Polyclonal                        | Santa Cruz Biotechnology, USA | Immunfluoreszenz  | 1:50              |
| Kaninchen anti-beta Aktin                | Polyclonal                        | Abcam, England                | Immunfluoreszenz  | 1:100             |
| <b>Sekundär- AK</b>                      | <b>Hersteller</b>                 |                               | <b>Verwendung</b> | <b>Verdünnung</b> |
| Ziege anti-Kaninchen IgG FITC-konjugiert | Becton Dickinson Biosciences, USA |                               | Immunfluoreszenz  | 1:100             |

### 2.1.10 Oligonukleotide

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primer wurden kommerziell synthetisiert und von Thermo Fisher Scientific (USA) erworben. Das Generieren einiger der Nukleotidsequenzen erfolgte mit Hilfe der Datenbank des *National Centre for Biotechnology Information* (NCBI). Die Referenzen der weiteren Primer sind ebenfalls genannt.

#### **Primer Exon 5 und 6-Analyse sowie Methylierungsanalysen (Referenz: [102])**

| Primerset                            | Nukleotidsequenz  | Annealing-Temp. (°C) | PCR-Produkt (bp)  |
|--------------------------------------|---|----------------------|---|
| FHIT Exon 5                          | F: 5'-tgtaaacgacggccagtgcacaccttgcactaag-3'<br>R: 5'-caggaaacagctatgaccggctggttaggctcagaag-3' | 55                   | 337   |
| FHIT Exon 6                          | F: 5'-tgtaaacgacggccagtacccaaagccagcagcatg-3'<br>R: 5'-caggaaacagctatgacctatgcctcctgtaag-3'   | 58                   | 328   |
| Beta-Aktin                           | F: 5'-tctgaacagactccccatcc-3'<br>R: 5'-tagcacagcctggatagcaa-3'                                | 56                   | 190   |
| FHIT-Promotor methyliert (MSP)       | F: 5'-ttggggcgcgggttgggttttacgc-3'<br>R: 5'-aacctcgtaaacgaaaaatactcg-3'                       | 61                   | 120   |
| FHIT-Promotor unmethyliert (MSP)     | F: 5'-ttgggtgtgggttgggttttatg-3'<br>R: 5'-ccaccaccataaacacacca-3'                             | 63                   | 85  |
| FHIT methyliert unmethyliert (COBRA) | F: 5'-ggggaggttaagttaagtgaatattgtt-3'<br>R: 5'-tacctaattcccccaatatataaacac-3'                 | 58                   | <u>BstUI-Verdau:</u><br>FHIT un-methyliert :<br>247<br><br>FHIT methyliert :<br>191, 38, 18 |

#### **Primer Bisulfidsequenzierung (Referenz: [36])**

| Primer             | Nukleotidsequenz                   | Annealing-Temp. (°C) | PCR-Produkt (bp) |
|--------------------|------------------------------------|----------------------|------------------|
| A: BSGSA_R1_F_U-F  | 5'-gaaaagttaagattgtgcga-3'         | 56                   | 494              |
| B: BSGSA_R1_F_D-R  | 5'-aaacgacgccaccccactaaa-3'        | 56                   | 494              |
| C: BSGSA_R1_N_UF2b | 5'-attgtttttgtggttagtgtttt-3'      | 61                   | 345              |
| D: BSGSA_R1_N_U-R2 | 5'-aaacttacctccccgccctac-3'        | 61                   | 345              |
| E: BSGSA_R2_F_D-F  | 5'-ttcgggttttaggcggttatttagtggg-3' | 62                   | 277              |
| F: BSGSA_R2_F_D-Rb | 5'-atccccaccctaaaccctcgtaaaac-3'   | 62                   | 277 / 253        |
| G: BSGSA_R2_N_D_F2 | 5'-tagtgggtatatttttaggcggcgtt-3'   | 61                   | 253              |

## Primer Reverse-Transkriptase-PCR

| Primer             | Nukleotidsequenz  | Annealing-Temp. (°C) | PCR-Produkt (bp) |
|--------------------|---|----------------------|------------------|
| FHIT (cDNA)        | F: 5'-acctgcgtcctgatgaagtg-3'<br>R: 5'-ttcacagtctgtccggcttc-3'    | 61                   | 133              |
| Beta- Aktin (cDNA) | F: 5'-gaaatcgtgcgtgacattaag-3'<br>R: 5'- ctagaagcatttgcggtggac-3' | 55                   | 511              |

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kultivierung der Zellen

Um humane Zelllinien in Kultur zu halten, sollten ähnliche, standardisierte *in-vitro*-Bedingungen geschaffen werden, wie sie *in-vivo* vorzufinden sind. Dazu wurden Zellen in geeigneten Kulturgefäßen unter Standardbedingungen (37°C, Luftfeuchte bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre und konstantem CO<sub>2</sub>-Gehalt) in einem Brutschrank inkubiert. Als Schutzmaßnahme vor Kontamination wurden sämtliche Manipulationen, die mit einer Öffnung der Zellkulturbehälter einhergingen, unter Laminar-Flow Sterilsicherheitswerkbänken mit turbulenzarmer, kontinuierlich laminarer Verdrängungsströmung durchgeführt. Die Zellen wurden für die Durchführung der Zellkulturarbeiten so kurz wie nötig außerhalb des Brutschrankes belassen.

**Zellmedium und Mediumwechsel:** Die Kultur der SZ95-Sebozytenlinie und der Fibroblasten erfolgte in speziell für diese Zelllinien geeigneten Kulturmedien, welches alle drei bis vier Tage durch frisches, auf 37°C angewärmtes Medium ersetzt wurde. Vor dem Absaugen des alten Mediums wurde die Zellkulturflasche leicht geschüttelt, um Zelltrümmer aufzuschwemmen und diese mit absaugen zu können, wobei die Spitze der Glaspipette an die nicht wachstumsaktive Seitenwand des Kulturgefäßes gehalten wurde. So wurde eine Beschädigung des Zellrasens (*Monolayer*) der adhärennten Zellkulturen verhindert. Bei der täglich unter dem Phasenkontrastmikroskop stattfindenden Kontrolle konnten die Proliferation und das morphologische Bild genauestens beurteilt werden.

**Subkultivierung / Passagierung:** Um ein stetiges Zellwachstum gewährleisten zu können, bedurfte es der Bereitstellung von ausreichend Platz und Nährstoffen. Erreichte die Zellkultur eine Konfluenz von etwa 80 %, so wurde es notwendig, die Zellen in entsprechender Verdünnung in neue Kulturgefäße zu überführen (Passagierung). Hierfür wurden die Zellen durch enzymatische Verdauung seiner Oberflächenrezeptoren aus dem Monolayer herausgelöst, in Suspension gebracht und nach einer sich anschließenden Zellzählung in entsprechender

Verdünnung in neue Kulturgefäße überführt. Im Rahmen des Passagierungsvorganges wurde bei den adhärenen Zellkulturen zuerst das alte Medium abgesaugt. Um noch vorhandene Reste des serumhaltigen Mediums zu entfernen, wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Um anschließend die adhärenen Zellen von der Wachstumsoberfläche zu lösen, wurde Trypsin-EDTA-Lösung auf die Zellen gegeben. Das Enzym Trypsin (Serinprotease) löst durch proteolytische Spaltung der Zell-Matrix- und Zell-Zell-Verbindungen die Zellen von der Kulturgefäß-Oberfläche (*Detachment*) und auch voneinander. EDTA komplexiert das für die Cadherin-vermittelte Zell-Zell-Bindungen und die normale Morphologie benötigte Calcium und Magnesium, wodurch die Zellen voneinander separiert werden. Der gesamte Prozess wurde unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet. Zur Beschleunigung des Vorgangs wurde die Zellkulturflasche bei 37° C für 5-20 Minuten (zelltypabhängig sind längere Inkubations-Zeiten notwendig) im Brutschrank inkubiert, da für Trypsin das Temperatur-Aktivitätsoptimum bei 37° C liegt. Der Trypsinierungsprozess war abgeschlossen, wenn sich alle Zellen abgerundet, von der Unterlage abgehoben und in kugelähnlicher Form in der Trypsinlösung in Suspension befanden. Weiterhin anhaftende Zellen konnten durch ein leichtes Schütteln und Beklopfen der Kulturflasche zusätzlich mechanisch von der Wachstumsoberfläche gelöst werden. Um den Vorgang zu stoppen („Abzulöschen“), wurden 2-3 ml frisches Medium in die Kulturflasche gegeben. Das im Medium enthaltene FKS beinhaltet einen Inhibitor, welcher die Proteinasewirkung des Trypsins unterbindet. Nachdem die Zellsuspension in ein Zentrifugenröhrchen überführt wurde und sich ein erneuter Waschvorgang mit PBS anschloss, ließ sich durch Zentrifugation des Röhrchens bei 1000 UpM für 10 Minuten bei 4° C ein Zellpellet am Boden des Gefäßes erhalten. Das sich über dem Zellpellet befindliche Medium wurde abgesaugt und das Pellet anschließend in 1 ml frischem Medium resuspendiert. Jede Umsetzung der Zellen in ein neues Gefäß bedeutete eine Erhöhung der Anzahl der Subkultivierungen und damit der Passagezahl einer Kultur um plus eins. Folglich entspricht die Anzahl der Subkultivierungen die Summe der Passagen [69].

### **2.2.2 Kryokonservierung: Zell-Asservate in Dimethylsulfoxid (DMSO-Stocks)**

Um Zellen einzufrieren und damit für eventuelle spätere Wieder-In-Kulturnahme über eine lange Lagerzeit konservieren zu können, wurden DMSO-Stocks angefertigt. Um das Vorhandensein unterschiedlicher Passagen der Sebozyten sicher zu stellen, wurden diese im Abstand von 3-5 Passagenzahlen kryokonserviert. Die Zellen wurden in vorgekühltem Einfriermedium eingefroren, welches aus fetalem Kälberserum, versetzt mit 20% DMSO, bestand. Als erster Schritt wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin (Kapitel 2.2.1) abgelöst und nach der sich anschließenden Zentrifugation bei 1000 UpM für 10 min bei 4°C in Vollmedium gewaschen. Nachfolgend wurden die Zellen in eiskaltes Vollmedium resuspendiert und dieses zu gleichen



Teilen mit dem „Einfriermedium“ gemischt. Nach dem Pipettieren in ein Kryo-Tube wurde dieses sofort auf Eis gestellt und anschließend bei -80°C eingefroren.

### **2.2.3 Auftauen der Zellen**

Ebenso wie beim Einfrieren sollte man beim Auftauen der Zellen schonend vorgehen. Die Zellen wurden zügig, aber ohne Überhitzung, aufgetaut. Hierbei sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass das Gefrierschutzmittel DMSO bei Raumtemperatur zelltoxisch wirkt. Der Auftauprozess fand im Wasserbad bei 37°C solange statt, bis das letzte Eisklumpchen vom Eiskern verschwunden war. Anschließend wurden die Zellen unter der sterilen Werkbank durch langsame Zugabe von 10 ml kaltem Vollmedium resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation bei 1000 UpM für 10 min bei 4°C wurde das überstehende Medium abpipettiert. Die Zellen konnten nach Aufnahme in 3-5 ml frischem Medium in eine Kulturflasche ausgesät und zur weiteren Kultivierung in den Brutschrank gestellt werden.

### **2.2.4 Beurteilung der Vitalität (Vitalitätstest)**

Im Rahmen dieses Vorgehens erfolgte stichprobenartig eine Supravitalfärbung der Zellen mit Trypanblau (Benzaminblau). Hierbei handelt es sich um eine Ausschlussfärbung: Trypanblau dringt selektiv nur in abgestorbene Zellen ein.

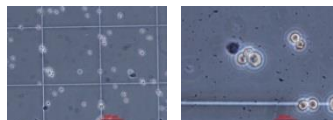


Abbildung 1: Trypanblaufärbung.

$$\% \text{ lebende Zellen} = [\text{ungefärbte Zellen} / (\text{gefärbte} + \text{ungefärbte Zellen})] \times 100$$

Abbildung 2: Formel Vitalitätstest.

### **2.2.5 Präparation genomischer DNA**

Für den Erhalt der genomischen DNA wurden die entsprechenden Zellen geerntet und das durch Zentrifugation bei 1000 UpM für 10 min bei 4° C erhaltene Zellpellet, welches zuvor einem zweimaligen Waschvorgang mit PBS unterzogen wurde, in 100 µl SE-Puffer vollständig

aufgenommen. Als erster Schritt erfolgte die Proteolyse: Zu den Zellen wurden 2 µl Pronase (20 mg / ml) und 2,5 µl 20 % SDS zugegeben, anschließend sorgfältig resuspendiert und die Probe über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Als nächster Schritt erfolgte die Fällung der DNA: Die Zugabe von 1,5 ml einer gesättigten, sterilen NaCl-Lösung (6 M) führte zur Ausfällung der proteinogenen Zelltrümmer. Nach einem 15-sekündigen Vortexvorgang konnten die Zelltrümmer mittels Zentrifugation bei maximaler Umdrehungszahl für 15 min bei Raumtemperatur von der DNA getrennt werden. Anschließend wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Tube überführt und die DNA durch Zugabe von zwei Volumina absolutem Ethanol gefällt. Hierbei wurde das Reaktionsgefäß langsam und kontinuierlich gedreht. Die gefällte DNA konnte mittels eines Glashäkchens aufgefangen und herausgeholt werden und wurde anschließend in einem neuen 1,5 ml Tube kurz in 70 % Ethanol gewaschen. Nach einem kurzen Trockenvorgang wurde die erhaltene DNA in 50 µl sterilem, doppelt destilliertem Wasser gelöst. Abschließend wurden 500 µl TE<sup>-4</sup> zugegeben. Die Konzentration und Reinheit der DNA ließ sich mittels eines Spektralphotometers bestimmen. Als Kontroll-DNA wurden anonymisierte DNA-Proben verwendet.

#### **2.2.6 Duplex-PCR FHIT Exon 5 / Exon 6 und Aktin**

Um Deletionen der Exons 5 und 6 des FHIT-Gens, welche das Epizentrum der fragilen FRA3B-Region überspannen, zu identifizieren, wurde das semiquantitative Verfahren der One-Tube Genomic-Duplex-PCR genutzt [3,102]. Die präparierte, genomische DNA wurde zunächst in TE<sup>-4</sup> Puffer auf 25 ng / µl verdünnt. Je nach Anzahl der Proben wurde das x-fache der Komponenten in ein Tube pipettiert, um einen Mastermix zu erhalten. Für einen Σ = 8,5 µl-Ansatz wurden benötigt: 2,825 µl steriles, nukleasefreies, doppelt destilliertes Wasser; 1,25 µl Taq Master; 1,25 µl Taq Buffer; 0,075 µl dNTPs; 0,5 µl FHIT Primer (je forward und reverse für Exon 5 und Exon 6); 1,0 µl Aktin Primer (je forward und reverse). Als letzten Schritt wurden 0,1 µl Tag-Polymerase hinzugegeben. Nachdem der Mastermix vorsichtig und sorgfältig gemischt wurde, wurde dieser auf die entsprechenden PCR-Caps verteilt. Anschließend wurden in jedes Cap 4 µl verdünnte (25 ng / µl) DNA (insgesamt 100 ng) pipettiert, sodass man am Ende einen 12,5 µl-Reaktionsansatz erhielt. In das Reaktionsgefäß für die Negativ-Kontrolle (*blank*) wurde statt der DNA die entsprechende µl-Menge steriles, doppelt destilliertes Wasser pipettiert. Die PCR-Caps wurden in die entsprechenden Vertiefungen des Thermocyclers gestellt und es galten folgende PCR-Bedingungen: Initiale Denaturierung: 96°C 2 min; Zyklus-Denaturierung: 96°C 30 sek; Annealing: Exon 5: 55°C, Exon 6: 58°C für je 45 sek; Elongation: 72°C 30 sek; 35 Zyklen; finale Elongation: 72°C 2 min; Abkühlung auf 4°C.

### **2.2.7 In-vitro DNA-Methylierung**

Um als Vergleichskontrollen für die MSP und die COBRA (Kapitel 2.2.9 und 2.2.10) methylierte DNA zur Verfügung zu haben, wurde entsprechende Kontroll-DNA mit Hilfe einer CpG-Methylase (*M. SssI*) methyliert. Diese DNA-Methyltransferase methyliert alle Cytosin-Basen innerhalb der doppelsträngigen DNA an der C5-Position des Pyrimidinringes. Hierfür muss sich das Cytosin innerhalb der Erkennungs-Dinukleotidsequenz 5`CpG3´ befinden. Um sowohl methylierte als auch unmethylierte Kontrollen für die DNA-Methylierungsanalysen zur Verfügung zu haben, wurde grundsätzlich ein paralleler Ansatz durchgeführt. Pro 200 µl Reaktionsansatz wurden entsprechend in Reaktionstubes pipettiert: 1.Tube (DNA ohne Enzym, nicht methyliert): x µl DNA (20 µg); x µl TE<sup>-4</sup> Puffer; 2.Tube (DNA mit Enzym, methyliert): x µl DNA (20 µg); 20 µl Puffer 2, 1 µl SAM 200x (Donator der Methylgruppe), 15 µl Sss I (4 U/µl), x µl steriles Aqua dest. Beide Reaktionsgefäße wurden über Nacht bei 37°C auf einem Heizblock inkubiert. Dabei wurde zu Beginn der Inkubation nach etwa 2-3 Stunden zusätzlich 1 µl SAM hinzugegeben, da dieses als Donator der Methylgruppe sehr schnell verbraucht wurde. Am nächsten Tag wurden 100 µl TE<sup>-4</sup> Puffer hinzugegeben, und es erfolgte die Phenol-Chloroform-Aufreinigung der *in-vitro* methylierten DNA und der unmethylierten Kontrolle: Hierfür wurden 300 µl Probe und 300 µl Phenol-Chloroform unter dem Abzug vermennt und kräftig vermischt. Anschließend erfolgte zur besseren Phasentrennung die Zentrifugation für 3 min bei 1300 UpM. Nach einem Überführen der oberen wässrigen Phase in ein neues 1,5 ml Reaktions-Tube wurden 300 µl Chloroform hinzugefügt, und das Gemisch ebenfalls, nachdem es kräftig gevortext wurde, für 3 min bei 1300 UpM zentrifugiert. Um die DNA zu fällen, wurde zunächst erneut die obere, wässrige Phase unter Vermeidung der Interphase abgenommen und in ein neues Tube überführt. Es erfolgte die Zugabe von 30 µl 3M Natriumacetat und 750 µl absolutem Ethanol, um durch eine Alkoholfällung die verbleibenden Phenolreste aus der Lösung zu entfernen. Nach dem Mischen der Probe und einer Zentrifugation bei 1300 UpM für 10 min wurde die DNA mit 100 µl 75 %-igem Ethanol gewaschen, und abschließend für 3 min bei 1300 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet nach einem kurzen Trocknungsvorgang an der Luft in 40 µl 1x TE<sup>-4</sup> Puffer aufgenommen.

### **2.2.8 Bisulfit-Behandlung genomischer DNA**

Um das Methylierungsmuster einer bestimmten Nukleinsäure-Sequenz analysieren zu können, wurde die genomische DNA mit Bisulfit behandelt. Hierfür wurde das *Bisulfite Genomic Sequencing* nach Frommer et al. (1992) [103] angewandt. Hierbei werden unmethylierte und einzeln (nicht innerhalb eines CpG-Dinukleotids) vorliegende Cytosine durch die Behandlung mit Natrium-Bisulfit zu Uracilen deaminiert [103-105]. Die Bisulfit-behandelte DNA besitzt demnach an den entsprechenden Stellen C zu U-Transitionen. Im Gegensatz dazu bleiben 5-

methylierte Cytosine aufgrund der sehr viel langsameren, beziehungsweise nicht ablaufenden Reaktion erhalten. Die Bisulfit-Konvertierung läuft unabhängig voneinander an beiden Einzelsträngen der DNA ab, wodurch am Ende zwei nicht mehr kompatible DNA-Stränge entstehen (Abbildung 3). Um den Methylierungsstatus zu analysieren, wurde der so erhaltene Unterschied in der DNA-Sequenz genutzt und eine Polymerasekettenreaktion mit spezifischen Oligonukleotiden oder ein Verdau mit 5'-CpG-3'-Restriktionsendonukleasen durchgeführt (Kapitel 2.2.9 und 2.2.10) [106]. Bei der PCR werden die Uracile der Template-DNA durch die eingesetzte DNA-Polymerase nachfolgend zu Thyminen korrigiert. In der amplifizierten DNA (PCR-Produkt) sind demnach TG (Thymin-Guanosin-) Dimere zu finden, wo vorher in der unbehandelten DNA CG-Dimere existierten. Bei der Behandlung der DNA mit Natriumhydrogensulfit wurde sich an das Hersteller-Protokoll des Kits für die Behandlung der DNA mit Bisulfit (*analytikjena*) gehalten, das genaue Vorgehen ist diesem zu entnehmen.

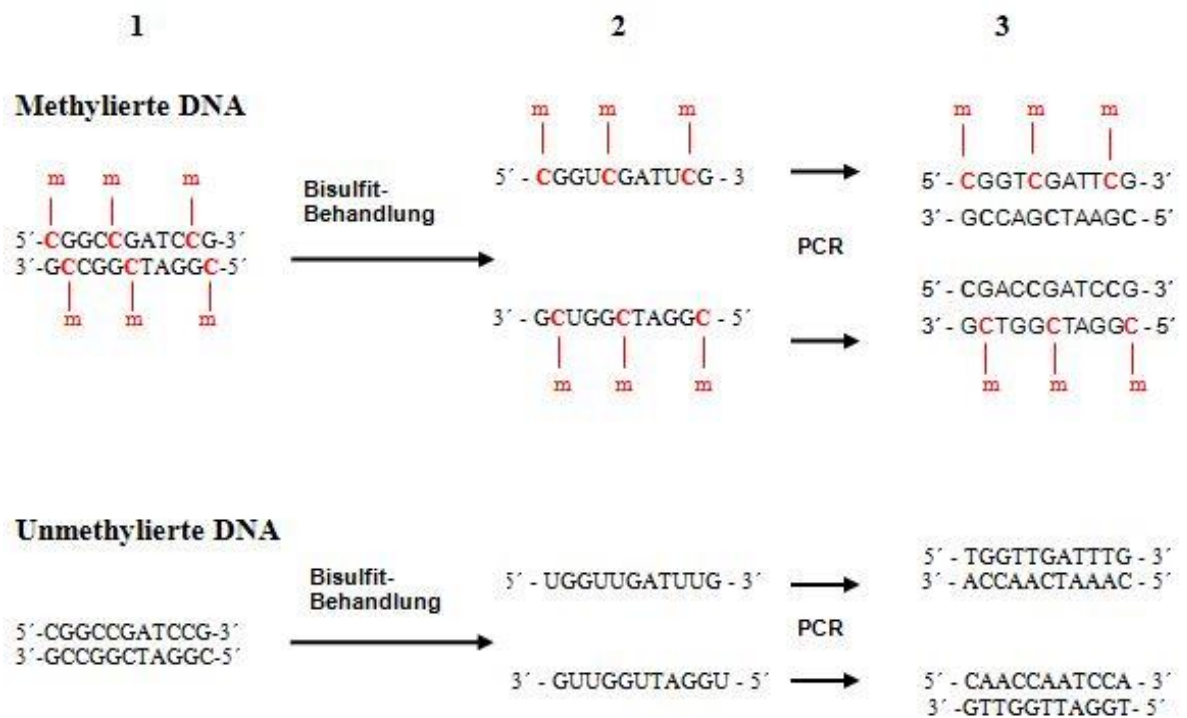


Abbildung 3: **1:** Denaturierungs-Schritt. Anschließend Behandlung mit Bisulfit. **2:** Deaminierung und alkalische Desulfonierung aller unmethylierten Cytosine zu Uracil, während aufgrund der sehr langsamen, beziehungsweise nicht ablaufenden Reaktion alle methylierten Cytosine unverändert erhalten blieben (hier rot dargestellt). Alle einzeln vorliegenden Cytosine wurden in Uracil konvertiert. **3:** Korrektur aller Uracile zu Thyminen bei der PCR durch die DNA-Polymerase.

### **2.2.9 Methylierungsspezifische PCR (MSP)**

Um die methylierten Sequenzen, beziehungsweise eine Hypermethylierung der CpG-reichen Promotor-Region des FHIT-Proteins, zu detektieren, wurde das Verfahren der sensitiven methylierungsspezifischen PCR (MSP) und der Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) genutzt [46,102]. Das Verfahren der PCR-basierten MSP wurde eingesetzt, um qualitativ den Methylierungs-Status der CpG-Inseln von Promotoren spezifischer Gene zu untersuchen. Grundlage dieser Methode ist die primerspezifische Bildung eines PCR-Produktes. Es kommen zwei verschiedene, voneinander unabhängige Primerpaare für die gleiche zu untersuchende Region zum Einsatz: ein Primerpaar, womit nur methylierte DNA amplifiziert wird, und ein Primerpaar, welches spezifisch nur unmethylierte DNA vervielfältigt [26,107]. Um methylierte von unmethylierter DNA unterscheiden zu können, wurde die DNA vorher einer Bisulfit-Behandlung unterzogen (Kapitel 2.2.8). Für einen 25 µl-Ansatz (entsprechend je mit unmethyliertem / methyliertem Primerpaar) wurden folgende Komponenten (jeweils in x-facher Menge für den Mastermix) in ein Cap pipettiert: 2,5 µl 10 x NH<sub>4</sub>-Puffer; 0,25 µl 20 mM dNTPs; 0,75 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>; 2 µl Primermix ; 1 µl Formamid. In die PCR-Reaktionsgefäße wurden anschließend je 4 µl mit Bisulfit behandelte genomische DNA pipettiert und die PCR gestartet. Nach einer 2-minütigen Inkubation bei 68°C wurden 14,5 µl verdünnte Taq-DNA-Polymerase (14 µl doppelt destilliertes Wasser und 0,5 µl Taq-Polymerase) hinzugefügt und das PCR-Programm fortgesetzt. Nachfolgend galten folgende PCR-Bedingungen: Denaturierung: 95°C für 30 sek; Annealing: unmethyliert: 63°C, methyliert: 61°C für je 45 sek; Elongation: 72°C für 45 sek; 39 Zyklen; finale Elongation: 72°C für 4 min; Abkühlung auf 4°C.

### **2.2.10 Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)**

Um semiquantitativ den Methylierungsstatus zu analysieren, wurde das Prinzip der COBRA genutzt [46,102]. Dieses kombiniert die auf einer Konversion mit Bisulfit basierende unterschiedliche Amplifikation im Rahmen einer PCR mit einem sich anschließenden Verdau der erhaltenen PCR-Produkte durch die Restriktionsendonuklease *Bst*UI (ein methylierungssensitives Restriktionsenzym), welche methylierte, CpG-enthaltende Erkennungssequenzen schneidet, da es das Dinukleotid CpG (5'-CGCG-3') in der palindromischen Erkennungssequenz für den Verdau aufweist. Es wurden somit alle PCR-Produkte geschnitten, die ursprünglich von methylierter DNA stammten. Unmethylierte PCR-Produkte wurden nicht geschnitten (Abbildung 4). Neben dem Restriktionsenzym-Ansatz der PCR-Produkte wurde als Kontrolle parallel ein *mock*-Ansatz durchgeführt. Hierfür wurde identisch ein Ansatz für den Verdau angesetzt, welcher jedoch keine Restriktionsendonuklease enthielt. Ein 25 µl-Ansatz für die PCR setzte sich dabei wie folgt zusammen: 2,50 µl NH<sub>4</sub>-

Puffer; 0,25 µl dNTPs (20 mM); 0,75 µl MgCl<sub>2</sub> (50 mM); je 1,00 µl Primer (forward, reverse); 1,00 µl H<sub>2</sub>O. Nachdem der Mastermix entsprechend auf alle PCR-Caps verteilt wurde, erfolgte die Zugabe von 4 µl entsprechend Bisulfit-behandelter DNA. Es galten folgende PCR-Bedingungen: Hot Start-Inkubation: 68°C 2 min, Zugabe der Taq-Polymerase; Denaturierung: 95°C 30 sek; Annealing: 58°C 45 sek; Elongation: 72°C 45 sek; 39 Zyklen; finales Annealing: 58°C 2 min; finale Elongation: 72°C 4 min; Abkühlung auf 4°C. Die genutzten Primer für die PCR-Amplifizierung enthielten keine CpG-Dinukleotide, sodass der Amplifizierungsprozess unabhängig vom Methylierungsstatus ablief.

Um als Kontrolle einen *mock*-Ansatz zur Verfügung zu haben, wurde jeder Ansatz parallel durchgeführt, wobei der *mock*-Ansatz kein Restriktionsenzym enthielt. Es wurden 5 µl PCR-Produkt und 2 µl NEB-Buffer 2 in ein Tube pipettiert, zudem wurden dem Verdau-Ansatz 12 µl doppelt destilliertes Wasser und 1 µl *Bst*UI, und dem *mock*-Ansatz 13 µl doppelt destilliertes Wasser hinzugefügt. Beide Ansätze wurden für 3,5 h bei 60°C inkubiert.

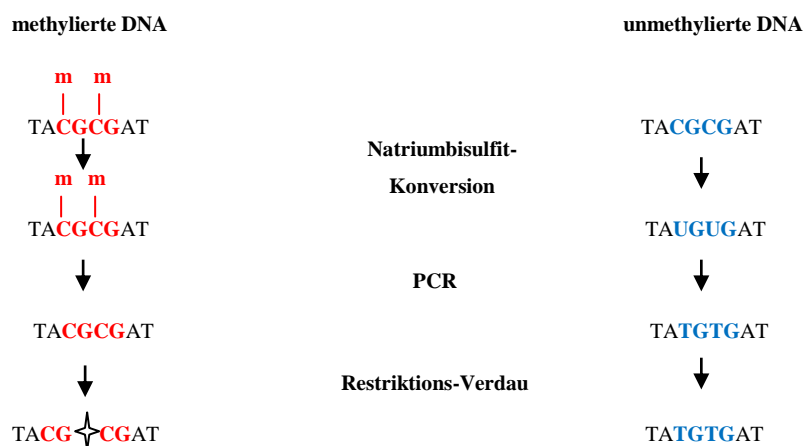


Abbildung 4: Prinzip der COBRA. Die Markierung ✦ symbolisiert die Schnittstelle von *Bst*UI.

### 2.2.11 Bisulfit-Sequenzierung

Die genomische Sequenz des FHIT-Gens von -95 bis +365 Basen relativ gesehen zum Transkriptionsstartpunkt enthält einen CG-Anteil von mehr als 60 %, was diese Region als CpG-Insel definiert [10,36]. Für die Methylierungsanalyse wurde ein Teil dieses Bereiches in zwei Abschnitte geteilt: Region 1 umfasst das 5'-Ende von Exon 1 und Exon 1, während sich der Beginn von Intron 1 als Region 2 darstellt (Seite 75) [36].

**Amplifikation der Bisulfit-behandelten DNA:** Es wurden entsprechende Primersets genutzt, welche eine geringe Anzahl von CpG-Dinukleotiden enthielten [36]. Im Anschluss an die *first* PCR wurde eine Reamplifikation als *nested* PCR durchgeführt. Diese zweite PCR wurde mit jeweils 0,5 µl PCR-Produkt aus der ersten PCR praktiziert, hierbei lagen die Sequenzen beider dafür genutzten Oligonukleotide innerhalb des Amplifikats der *first* PCR (Seite 75). So ließ sich die Spezifität der PCR-Analyse erhöhen und es konnte aus der Bisulfit-behandelten DNA entsprechend genügend Amplifikat für die sich anschließende Sequenzierung gewonnen werden [36].

**First PCR:** Für einen 12,5 µl-Ansatz wurden folgende Komponenten in ein Cap pipettiert: 1,25 µl NH<sub>4</sub> Buffer; 0,375 µl MgCl<sub>2</sub>; 0,125 µl dNTP; 0,5 µl Primer forward; 0,5 µl Primer reverse; 1,0 µl Betain und 2,5 µl mit Bisulfit behandelte genomische DNA. Die Amplifikationsansätze durchliefen im Thermocycler das entsprechende PCR-Programm. Nach einer 2 minütigen Inkubation bei 68°C wurden 6,25 µl verdünnte Taq-DNA-Polymerase (6 µl bidestilliertes Wasser und 0,25 µl Taq-Polymerase) hinzugefügt und das PCR-Programm für Region 1 (Primer A und B) aktiviert: Denaturierung: 95°C 30 sek; Annealing: 56°C 30 sek; Elongation: 72°C 30 sek; 29 Zyklen; finale Elongation: 72°C 7 min; Abkühlung auf 4°C. Für Region 2 (Primer E und F) galten die PCR-Bedingungen: Denaturierung: 95°C 30 sek; Annealing: 62°C 30 sek; Elongation: 72°C 30 sek; 29 Zyklen; finale Elongation: 72°C 7 min; Abkühlung auf 4°C.

**Nested PCR:** Für einen 12,5 µl-Ansatz wurden folgende Komponenten in ein Cap pipettiert: 1,25 µl NH<sub>4</sub> Buffer; 0,375 µl MgCl<sub>2</sub>; 0,125 µl dNTP; 0,5 µl Primer forward; 0,5 µl Primer reverse; 1,0 µl Betain; 0,5 µl Amplifikat aus der *first* PCR und 2,0 µl doppelt destilliertes Wasser. Äquivalent zur *first* PCR wurde mit der Zugabe der Taq-Polymerase verfahren und das PCR-Programm für Region 1 (Primer C und D) und für Region 2 (Primer G und F) wie folgt fortgesetzt: Denaturierung: 95°C 30 sek; Annealing: 61°C 30 sek; Elongation: 72°C 30 sek; 29 Zyklen; finale Elongation: 72°C 7 min; Abkühlung auf 4°C.

**Klonierung:** Aufgrund der Tatsache, dass sich das DNA-Methylierungsmuster in jeder Zelle mit kleinsten Abweichungen unterscheidet und daher nicht für alle Zellen eines Individuums identisch ist, konnten die Amplifikate der PCRs nicht direkt im Anschluss an die Amplifikation nach Sanger et al. (1977) sequenziert werden, sondern die PCR-Produkte mussten zuvor kloniert und anschließend in kompetente *E.coli*-Bakterienzellen transformiert werden. Als Vektor wurde der kommerziell erhältliche Vektor *pJET1.2/blunt* (Seite 25) genutzt, welcher Bestandteil des *CloneJet™ PCR Cloning Kit* ist. Entsprechendes Vorgehen ist dem *sticky-ends*-Protokoll des Herstellers zu entnehmen.

**Transformation:** Als Wirt für die Transformation wurden chemisch kompetente *E.coli*-Bakterien genutzt, welche in der Lage sind, freie DNA aufzunehmen. *Heat-Shock*-Prozedur: Zu den kompetenten Zellen wurden 10 µl der Cloning Reaction gegeben und der Ansatz für 30 min auf Eis gestellt. Es folgte eine Inkubation für 30 Sekunden bei 42°C auf der Wärmeplatte. Der Transformationsansatz wurde nun 2 min auf Eis gestellt und anschließend mit 250 µl SOC-Medium (SOB mit 111 µl 1M Glucose) aufgefüllt. Nach Inkubation für 1h bei 250 UpM und 37° C auf einer Schüttelplattform wurden die Bakterien auf Ampicillin-haltigen (50 µg/ ml) LB-Platten verteilt, da der Vektor über ein Ampicillin-Resistenzgen verfügt. Die LB-Platten wurden dann über Nacht bei 37° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzeln wachsende Kolonien gepickt und erneut in Flüssigkultur über Nacht bei 37° C und 250 UpM inkubiert. Von diesen Kulturen wurden nachfolgend Bakterienstocks (Glycerin-Stocks) angelegt, wobei je 800 µl Bakteriensuspension mit 200 µl Glycerin gemischt wurden, wodurch eine Lagerung der Proben bei -80° C und eine nochmalige Anzüchtung möglich war, falls erneut Material für eine weitere Sequenzierung benötigt wurde. Um Plasmid-DNA aus der Bakterienkultur-Suspension zu gewinnen, wurde diese für 10 min bei 4°C und 500 UpM zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 200 µl einer Lösung bestehend aus 25 mM Tris / HCl (pH = 8); 10 mM EDTA; 50 mM Glucose und 100 µg / ml RNase resuspendiert und in ein 2 ml Gefäß überführt. Es erfolgte die Zugabe und die Resuspension in 400 µl einer zweiten Lösung, bestehend aus 0,2 N NaOH und 20 % SDS, und die Probe wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 300 µl einer dritten Lösung bestehend aus 60 ml 5M Kaliumacetat, 11,5 ml Eisessig und 28,5 ml DDW hinzugegeben und die Probe für mindestens 5 min auf Eis gestellt. Nachdem die Probe nun für 5 min bei 4° C und 1300 UpM zentrifugiert worden war, wurde der Überstand zu 1 ml Isopropanol gegeben, welches zuvor in ein neues 2 ml Gefäß vorgelegt worden war. Das Gemisch wurde für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Zentrifugierungs-Vorgang von 5 min bei 4° C und 1300 UpM wurde der Überstand verworfen, der Probe 1 ml 70 % Ethanol hinzugegeben und das Gemisch erneut zu oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte die Lösung in 50 µl TE<sup>-4</sup> Puffer. Im Anschluss an den Klonierungs- und Transformationsansatz sowie der Präparation von Plasmid-DNA aus der Bakterienkultur wurde eine PCR durchgeführt. Hierfür wurde die Plasmid-DNA mit den *nested* Primern entsprechend des Protokolls der *nested* PCR angesetzt (Seite 23), wobei als Template Plasmid-DNA dem Master-Mix hinzugefügt wurde. Das erhaltene PCR-Produkt wurde als Template für die Sequenzierreaktion genutzt.



**Sequenzierung:** Mittels des *BigDye* Sequenzierungs-Kit und der Sequenzierprimer FHIT *nested* jeweils für Region 1 und Region 2 wurden die Klone von beiden Seiten sequenziert. Ein 10,0 µl Sequenzieransatz setzte sich wie folgt zusammen: 0,5 µl Terminator; 1,5 µl Sequenzierpuffer; 0,64 µl Primer (3,2 µM); 1,0 µl Template (Produkt der FHIT *nested* PCR für Region 1 und Region 2 aus Plasmid-DNA hergestellt) sowie 6,36 µl doppelt destilliertes Wasser. Der Kontrollansatz wies, bis auf 4,0 µl des Kontrollprimers und entsprechend 3,0 µl doppelt destillierten Wassers, die gleichen Komponenten auf. Für jedes Template wurden je zwei Sequenzierreaktionen angesetzt, jeweils einmal mit dem *forward*- und einmal mit dem *reverse*-Primer. Die Proben durchliefen folgendes Cyclerprogramm: Hot Start-Inkubation: 96°C 1 min; Zyklus-Denaturierung: 96°C 10 sek; spezifische Annealing-Temperatur der Primer für 10 sek; Elongation: 60°C 4 min; 19 Zyklen; finale Elongation: 60°C 5 min; Abkühlung auf 4°C.

**Aufreinigung mit Ethanol / EDTA Präzipitation:** Nachdem die Sequenzierreaktionen kurz anzentrifugiert wurden, erfolgte die Zugabe von 30 µl absolutem Ethanol und 2,5 µl einer 125 mM EDTA-Lösung (pH = 8,0), welche zuvor aus 0,5 M EDTA hergestellt wurde. Nach einem kurzen Vortex- und Anzentrifugierungsvorgang wurde die Probe 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 45 min bei 1800 UpM (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und 30 µl 70 % Ethanol wurden hinzugegeben. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min bei 1800 UpM (4°C) wurde der Überstand erneut abgenommen und die erhaltenen Pellets in der Speedvac getrocknet. Die sich nun anschließende Sequenzbestimmung wurde durch den Sequenzierservice der medizinischen Fakultät (Core Facility) übernommen.

Der in dieser Arbeit verwendete Vektor *pJET1.2/blunt* (Abbildung 5) wurde von der Firma *Thermo Scientific* bezogen und ist Bestandteil des *CloneJet™ PCR Cloning Kit*.

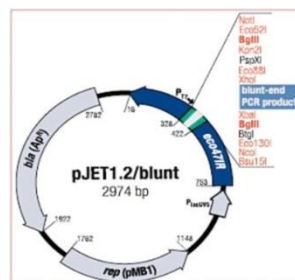


Abbildung 5: Vektor *pJET1.2/blunt*, weitere Informationen zu Sequenz, Aufbau und Eigenschaften sind den Herstellerangaben zu entnehmen (Quelle: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1231>; 23.10.2018)

### **2.2.12 Reverse-Transkriptase-PCR für FHIT und Aktin**

Für die Expressionsanalyse wurde aus zuvor isolierter und anschließend spektralphotometrisch konzentrationsbestimmter RNA ein cDNA-Pool synthetisiert (*Invitrogen*-Herstellerprotokoll *SuperScript™ II*). Dazu wurde 1 µg RNA mit Random Hexamer-Primern revers transkribiert. Zur Quantifizierung wurde der Vergleich zum ubiquitär exprimierten *Housekeeping-Gen* Beta-Aktin genutzt.

**RNA-Isolation:** Nach dem Absaugen des Mediums wurden 1 ml TRI-Reagent™ zu den Zellen gegeben, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend in ein 2 ml Tube überführt. Als nächstes wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben und, nachdem die Probe für 15 sek gevortext wurde, für etwa 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation bei 4°C für 15 min bei 1500 UpM. Nachdem nun die oberste Phase abgezogen und in ein neues Gefäß gegeben wurde, wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben, die Probe sorgfältig gemischt und für erneut etwa 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Probe für 10 min bei 1200 UpM bei 4° C zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das erhaltene Pellet wurde in 1 ml 75 % Ethanol gewaschen, gevortext und das Gemisch für 5 min bei 9500 UpM zentrifugiert, der Überstand abgegossen und für 5-10 min bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wurde das Pellet in 40 µl PO<sub>4</sub>-DEPC-DDW gelöst, für 10 min bei 4° C gelagert, resuspendiert und die Konzentration der RNA konnte spektralphotometrisch bestimmt werden.

**Invitrogen cDNA- Umschreibung:** Für die cDNA Umschreibung wurden folgende Agenzien eingesetzt: 1 µg RNA, als Oligonukleotide 1 µl (10 pmol/ µl) Random Hexamer Primer, 0,5 µl (20 mM) dNTPs und die entsprechende Anzahl an µl von sterilem DDW, um einen insgesamt 12 µl Reaktionsansatz zu erhalten. Dieser wurde für 5 min bei 65° C inkubiert, anschließend kurz auf Eis gestellt und anzentrifugiert. Nachdem 4 µl von 5 x first strand buffer, 2 µl von 0,1 M DTT und 1,0 µl Ribonuclease Inhibitor (40 U/ µl) hinzugegeben wurden, erfolgte eine Inkubation für 2 min bei 42°C. In das Reaktionsgefäß wurde nun 1 µl *Superscript II™* (200 U/µl) hinzugegeben, alles sorgfältig gemischt, die Probe für 50 min bei 42° C und für 15 min bei 70° C inkubiert (Inaktivierung) und anschließend auf Eis gestellt sowie nochmals kurz anzentrifugiert.

Der Ansatz für die FHIT-Expressionsanalyse (25 µl), wobei hierfür selbst erstellte und kommerziell synthetisierte Primer (Anhang Seite 80) verwendet wurden, setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 12,65 µl H<sub>2</sub>O; 2,5 µl 5 x Taq Master; 2,5 µl 10 x Taq Buffer; 0,15 µl 20 mM dNTP; 2 µl Primermix FHIT; 0,2 µl Eppendorf Taq 5U/µl und 5 µl verdünnte cDNA. Es galten folgende PCR-Bedingungen: Initiale Denaturierung: 94°C 2 min; Zyklus-Denaturierung: 94°C 30 sek; Annealing: 61°C 30 sek; Elongation: 72°C 30 sek; 33 Zyklen; finale Elongation: 72°C 10 min; Abkühlung auf 4°C. Der Ansatz für die Aktin-

Expressionsanalyse (12,5 µl) setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen: 6,825 µl H<sub>2</sub>O; 1,25 µl 5 x Taq Master; 1,25 µl 10 x Taq Buffer; 0,075 µl 20 mM dNTP; 1 µl Primermix Aktin; 0,1 µl Eppendorf Taq 5U/µl und 2 µl verdünnte cDNA. Es galten folgende PCR-Bedingungen: Initiale Denaturierung: 95°C 3 min; Zyklus-Denaturierung: 94°C 45 sek; Annealing: 55°C 1 min; Elongation: 72°C 45 sek; 24 Zyklen; finale Elongation: 72°C 3 min; Abkühlung auf 4°C. Die PCR's für FHIT und Aktin waren nicht als Duplex-PCR möglich. Deshalb wurden beide PCR's separat angesetzt und die PCR-Produkte anschließend zusammen für die analytische Gelelektrophorese auf das Gel aufgetragen.

### **2.2.13 Behandlung der Sebozytenlinie SZ95 mit 5-Azacytidin und Trichostatin A**

Initial wurde die Konzentration von dem demethylierend wirksamen Agenz 5-Azacytidin zur Behandlung der Zellen ausgetestet (1–20 µM) und die 1:100 (20 µM) Verdünnung für Trichostatin A (2 mM in 0,5 % Ethanol) vorbereitet. Anschließend wurden die SZ95-Zellen in jeweils einer Petrischale für die genomische DNA- und RNA-Präparation bis zu einer Konfluenz von etwa 80 % kultiviert. Nachfolgend wurden die Zellen für 4 Tage bei täglichem Mediumwechsel (mit regelmäßiger Zugabe von Azacytidin, da dieses eine kurze Halbwertszeit hat) unter folgenden Bedingungen kultiviert: 5 µM Azacytidin, 10 µM Azacytidin, 10 µM Azacytidin und 300 nM Trichostatin A für die letzten 19 Stunden der 4 Tage. Je eine Petrischale wurde unbehandelt gelassen und eine diente als Kontrolle, welche das Lösungsmittel der jeweiligen Substanz in gleicher Menge enthielt. Anschließend wurden bereits weiter oben im Text erläuterte Analysen mit den Zellen durchgeführt (COBRA, Expressionsanalysen).

### **2.2.14 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie**

Bei der Immunfluoreszenzmikroskopie handelt es sich um ein mikroskopisches Verfahren, bei welchem spezifische Antikörper eingesetzt werden, die mit fluoreszierenden Farbstoffen (zum Beispiel *FITC*) markiert und gegen ein bestimmtes Protein gerichtet sind. Die Lokalisierung des untersuchten Antigens, an welchem der Antikörper spezifisch bindet, lässt sich durch den Nachweis des Fluoreszenz-Lichts ermitteln. Um die Spezifität des Sekundär-Antikörpers zu überprüfen, wurde jeweils eine Negativ-Kontrolle mitgeführt. Hierfür wurde in einem Well statt des Primärantikörpers die Phosphat-gepufferte Salzlösung und im Anschluß der Sekundär-Antikörper aufgetragen. Mit dieser Kontrolle war sicherzustellen, dass der Sekundärantikörper keine Hintergrundfärbung, beziehungsweise keine unspezifische Bindung, besaß. Prozedere: Für immunzytochemische Färbungen wurden mit Deckgläschen ausgelegte 24-Wellplatten verwendet. Entsprechende runde Deckgläschen wurden zuvor über 24 Stunden in Natriumhydroxid gelegt, um die Oberfläche anzurauen und ein Anheften der adhären

Zellkulturen zu erleichtern. Anschließend erfolgte eine Desinfektion der Deckgläschen für mindestens 30 Minuten in einer 70 %-igen Ethanollösung. Nach dem Auslegen der Deckgläschen in die Vertiefungen der Wellplatte wurden diese zweimal mit sterilem PBS gespült. Die entsprechende Anzahl an Zellen wurde in den jeweiligen Vertiefungen ausplattiert, wobei meist ein bis zwei Milliliter der Zellsuspensionen in die Wells pipettiert wurden. Es erfolgte die unter standardisierten Bedingungen ablaufende Inkubation der Zellen. Erreichten die Zellen unter einer entsprechenden Kultivierung eine Konfluenz von rund 80-90 %, so wurde das Medium abgesaugt und es erfolgte eine Fixierung der Zellen: nach zweimaligem Waschen mit PBS für je zwei Minuten wurden die Zellen nach Zugabe von 500 µl Methanol / Aceton (7:3) für 20 Minuten bei -20° C gelagert. Nach wiederum zweimaligem Waschen mit PBS für je zwei Minuten erfolgte die Permeabilisierung in 300 µl 0,5 % Tween / 5 % BSA (verdünnt in PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Plattenschüttler. Dieser Schritt der Permeabilisierung war wichtig, um eine Durchlässigkeit sowohl der Zellmembran als auch der Membran des Zellkerns zu gewährleisten, damit Primär- und Sekundär-Antikörper ihr Ziel erreichen können. Nach anschließend zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS für je zwei Minuten erfolgte eine Über-Nacht-Inkubation mit dem primären Antikörper (verdünnt in 1 % BSA in PBS) bei 4°C, welcher in entsprechender, vorher ausgetesteter Verdünnung auf die Zellen aufgetragen wurde, um die optimale Färbungs-Intensität eruierten zu können. Hierfür wurden 200-250 µl Primärantikörper-Lösung zu den Zellen gegeben. Nach der Über-Nacht-Inkubation der Zellen mit dem Primärantikörper wurden die Zellen am Folgetag zweimal für je zwei Minuten mit PBS gewaschen. Dem Waschvorgang schloss sich eine einstündige Inkubation der Zellen mit 200–250 µl Sekundärantikörper-Lösung (verdünnt in 1 % BSA in PBS) an. Die Inkubation mit dem Sekundär-Antikörper erfolgte bei Raumtemperatur auf einem Plattenschüttler unter vor Licht geschützten Bedingungen. Nach einem zweimaligen Waschvorgang mit PBS für je zwei Minuten wurde das Deckgläschen nach einer 180°-Wendung auf einen Objektträger mit einem Tropfen *ProLong Gold antifade reagent with DAPI* gelegt. Das Ergebnis der Färbung wurde jeweils im Phasenkontrast (Durchlicht) und mittels der Fluoreszenz ausgewertet. Grundsätzlich wurde stets gewissenhaft darauf geachtet, dass sowohl die Blenden- und Verstärker-Einstellungen (*Gain*) als auch die Belichtungszeit (*Exposure Time*) identisch waren.

### 2.2.15 Software

Zur Analyse des DNA-Methylierungsmusters wurden die erhaltenen Sequenzen mittels des Sequenzchromatogrammeditors *FinchTV* überprüft und die Qualität beurteilt. In der Abbildung 6 sind Beispielsequenzen dargestellt, durch welche sich die Auswirkung der Behandlung mit Bisulfit in Abhängigkeit des Methylierungsstatus darstellt. Nach Analyse der Qualität der erhaltenen Sequenzen wurde das jeweilige DNA-Methylierungsmuster zum Teil manuell und teilweise mit Hilfe des Programms *BIQ-Analyzer* ausgewertet. Um die Auswertungen der viele Basenpaare umfassenden Sequenzen zu vereinfachen, wurde mit Hilfe des Programms *Blast* die jeweilige Primersequenz als Anhaltspunkt für den Abgleich gesucht.

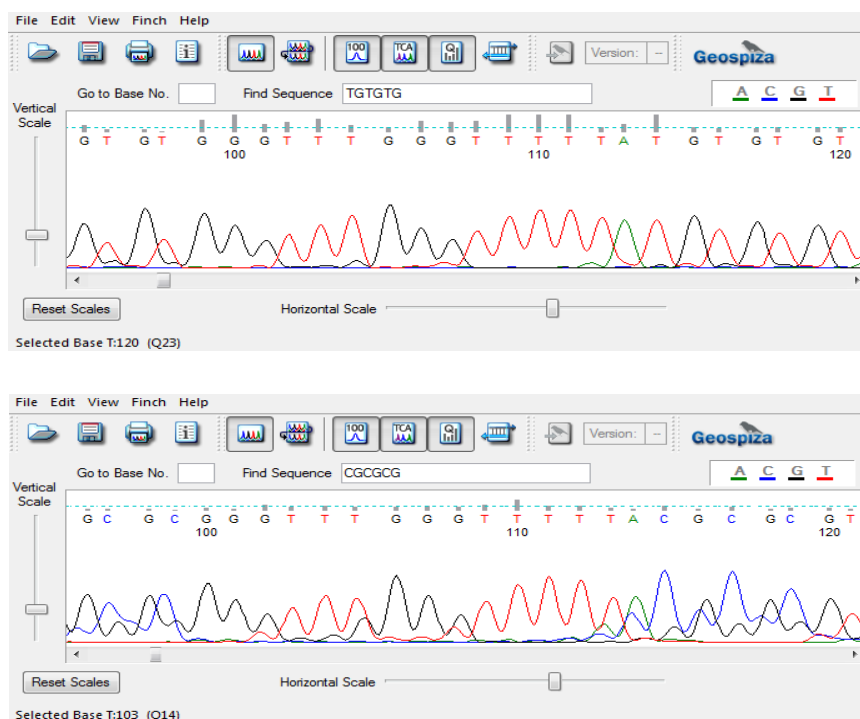


Abbildung 6: Sequenzchromatogramme eines Abschnitts der Region 2 des FHIT-Gens von zwei verschiedenen Klonen. Obere Abbildung: Vorliegen von unmethylierten CpGs eines Klons von der frühen Passagezahl P32 (TG). Untere Abbildung: CpGs liegen in methylierter Form vor (CG) (Passagezahl P67).

Mit Hilfe des Bildbearbeitungs-Programms *ImageJ* können experimentell erhaltene Bilder objektiv ausgewertet werden, beispielsweise lassen sich die Intensitäten einer Färbung messen und so im Vergleich zu anderen Bildern objektiv vergleichen. Dieses Programm wertet die Immunfluoreszenz-Intensitäten mittels des *HSB*-Farbmodells aus: je höher die Intensität der Färbung (in diesem Falle der Grünfärbung), desto höher war der Wert der *Integrated Density*. Für die Vergleichsanalysen der Immunfluoreszenz-Bilder der frühen und späten Passagezahl der SZ95-Sebozyten sowie einiger Bilder der analytischen Gelelektrophorese wurde dementsprechend ein Quotient aus den erhaltenen Werten der *Integrated Density* gebildet.

### 2.2.16 Statistische Auswertung des Methylierungsmusters

Um die experimentell erworbenen Daten hinsichtlich des Methylierungsmusters der Regionen 1 und 2 des FHIT-Gens statistisch auswerten zu können, wurde der Chi-Quadrat ( $\chi^2$ )-Vierfelder-Test verwendet. Hierbei handelt es sich um einen Hypothesentest, bei welchem geprüft wird, ob zwei nominal skalierte Merkmale in je zwei Ausprägungen stochastisch unabhängig sind, beziehungsweise, ob signifikante Unterschiede vorliegen. Die Nullhypothese ( $H_0$ ) geht davon aus, dass beide Merkmale stochastisch unabhängig voneinander sind und kann verworfen werden, wenn sich ein  $\chi^2$ -Wert von  $>3,84$  ergibt. Dieser Wert dient im Rahmen des Unabhängigkeitstestes als Vergleichswert und wird auch als kritischer Wert bezeichnet, wobei hierbei ein Fehlerniveau von 5 % ( $1-\alpha = 0,95$ ) angenommen wird. Ist die errechnete Prüfgröße größer als oder gleich dem kritischen Wert, so kann die Nullhypothese abgelehnt werden und es besteht folglich ein signifikanter Unterschied zwischen den geprüften Merkmalen. Der Vierfelder-Test basiert auf einer 2 x 2 Kontingenztafel, welche die bivalente Häufigkeitsverteilung zweier geprüfter Merkmale darstellt (Abbildungen 7 und 8).

$$\chi^2 = \frac{n \times (a \times d - c \times b)^2}{(a + c) \times (b + d) \times (a + b) \times (c + d)}$$

Abbildung 7: Formel für den  $\chi^2$ -Vierfelder-Test.

| Merkmale     | Ausprägung 1 | Ausprägung 2 | Summe            |
|--------------|--------------|--------------|------------------|
| Ausprägung 1 | A            | B            | a + b            |
| Ausprägung 2 | C            | D            | c + d            |
| Summe        | a + c        | b + d        | Gesamt-Summe (n) |

Abbildung 8: Tabelle  $\chi^2$ -Vierfelder-Test.

### **3. ERGEBNISSE**

#### **3.1 Morphologie und Verhalten der Sebozytenlinie SZ95**

Grundsätzlich durchlaufen Sebozyten eine genetisch determinierte Entwicklung. Kennzeichen dieses terminalen Differenzierungsprozesses ist der Eintritt in den programmierten Zelltod (*Apoptose*) am Ende jeder Zell-Differenzierung [81-83]. Die *in-vitro* kultivierten, mit dem Large T-Antigen transfizierten Sebozyten der Zelllinie SZ95 zeigen die charakteristische Morphologie und typischen Differenzierungs-Muster, wie sie von normalen Sebozyten *in-vivo* beschrieben sind. Das Auftreten von polymorphen Größenunterschieden und unterschiedlichen intrazellulären Strukturen der Sebozytenzellen in der *in-vitro* Kultur liefern Hinweise auf das Vorliegen von unterschiedlichen Stadien im Rahmen der Zellreifung. Hierbei kann die Zellgröße auf das fünf- bis sechsfache ansteigen, was der Zunahme der Zellgröße von untransfizierten Sebozyten im Rahmen ihrer progressiven Differenzierungsvorgänge entspricht [77,79,81-83]. Im Laufe von Differenzierungsvorgängen nimmt das Zellvolumen zu, wobei hier die Zellkern-Zellplasma-Relation abnimmt [79]. Bei der täglich stattfindenden Begutachtung der *in-vitro* Zellkultur unter dem Mikroskop konnte die Anhäufung von feinen Lipid-Tröpfchen im Zytoplasma genauestens begutachtet werden. Die hierdurch bedingte Größenzunahme der Zelle führte letztendlich zu einer spontanen Ruptur der Zellmembran, wodurch der Zellinhalt freigesetzt wurde und die Zelle abstarb. Dieser Prozess ist entscheidend für die holokrinen Sekretionsvorgänge der Talgdrüse [77]. Das Auffinden von Zellkern-Fragmentationen während der terminalen Differenzierung bestätigt, dass es sich hierbei um den genetisch programmierten Zelltod (*Apoptose*) handelt [82].

Die *in-vitro* kultivierten Zellen der Sebozytenlinie SZ95 repräsentieren die charakteristischen, morphologischen Erscheinungen und Differenzierungs-Muster, wie sie von normalen Sebozyten *in-vivo* beschrieben sind [79]. Sowohl in den frühen als auch in den späten Passagen sind alle verschiedenen Differenzierungs- und Reifestadien der Sebozyten ersichtlich. Es lagen keine morphologischen Unterschiede zwischen den unterschiedlichen Passagen vor.

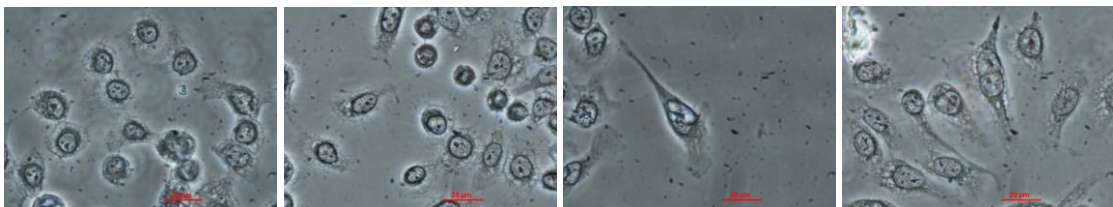


Abbildung 9: Dargestellt sind SZ95-Sebozyten in einem sehr frühen Differenzierungsgrad. Es zeigte sich eine kubisch-isoprismatische oder langgestreckte Zellform (Maßstab: 20 µm).

Beispielhaft sind in Abbildung 9 undifferenzierte Sebozyten der Zelllinie SZ95 im *Monolayer*-Zellverband dargestellt. Es zeigten sich kubisch-isoprismatische oder abgeflacht-langgestreckte Zell-Formen, welche durch einen prominenten, runden Zellkern gekennzeichnet waren [79].

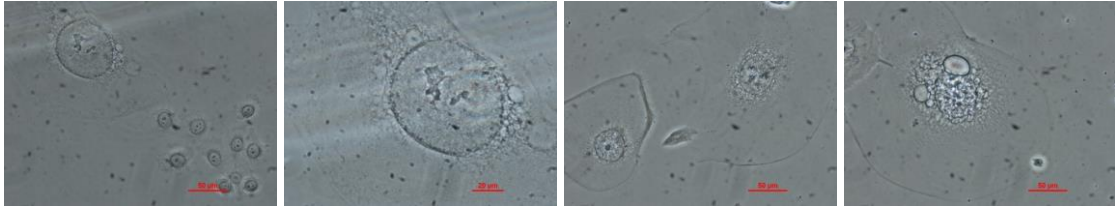


Abbildung 10: Dargestellt sind die Größenunterschiede der SZ95-Sebozyten, welche im Laufe von Differenzierungsvorgängen durchlaufen werden (Maßstab: 50 µm; Bildausschnitt 2. Bild: 20 µm).

Anhand der Abbildung 10 sollen die polymorphen Größenunterschiede der *in-vitro* kultivierten SZ95-Sebozyten veranschaulicht werden, welche den unterschiedlichen Stadien der Zellreifung entsprechen. Im Laufe der Differenzierungsvorgänge konnte die Zellgröße mindestens auf das fünf- bis sechsfache ansteigen. Auch der Zellkern zeigte eine deutliche Größenzunahme und war als große, runde Struktur zu erkennen. Fortgeschritten differenzierte Zelltypen waren durch inhomogen wirkendes, reichlich vorhandenes Zytoplasma gekennzeichnet. Erkennbar war eine deutliche Zunahme des Zellplasma-Zellkern-Verhältnisses, was mit dem Verlust der Prominenz des Zellkerns einherging. Zudem waren in manchen Zellen zirkulär um den Nukleus feine Lipidtröpfchen-Muster oder einzelne Vakuolen erkennbar [77,79,81].

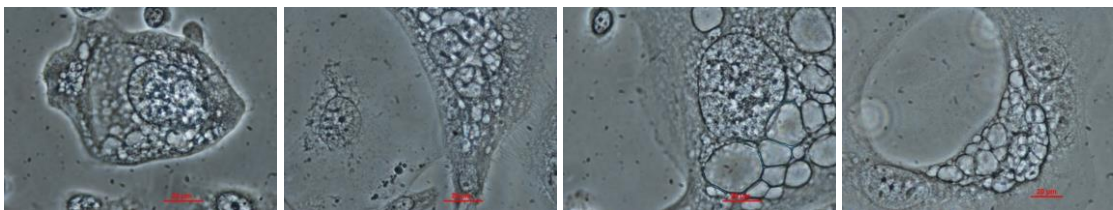


Abbildung 11: Dargestellt sind reife SZ95-Sebozyten, was durch die Anreicherung von Lipidtröpfchen im Zytoplasma erkennbar ist (Maßstab: 20 µm).

Anhand des Auftretens von unterschiedlichen intrazellulären Strukturen ließ sich der Reifungsgrad der Zelle erahnen. In der Abbildung 11 sind reife, voll ausdifferenzierte Sebozyten sichtbar, welche sich durch die Anreicherung von Lipid-Tröpfchen oder großen, mit Lipid gefüllten Vakuolen im Zytoplasma auszeichneten.

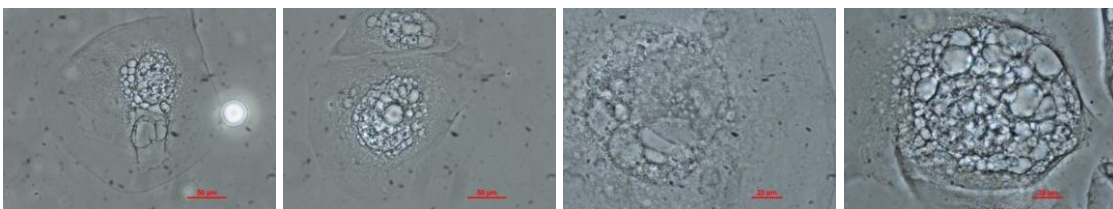


Abbildung 12: Dargestellt ist die weitere Anhäufung von Lipidtröpfchen im Zytoplasma und die pyknotisch wirkenden Zellkerne (nukleäre Degeneration), was den Vorgängen während des terminalen Differenzierungsprozesses entspricht (Maßstab: Bild 1 und 2: 50 µm; Bild 3 und 4: 20 µm).

Mit fortschreitender, terminaler Differenzierung zeigte sich neben der Akkumulation von Lipiden im Zytoplasma ein pyknotisch wirkender, verzerrter, teilweise fragmentierter Zellkern (nukleäre Degeneration, Abbildungen 12 und 13), welcher letztendlich zerfiel und anschließend



die Zellmembran rupturierte, wobei hier im Zellmedium umherschwimmende Zelltrümmer zu beobachten waren (Abbildung 14). Eine Ruptur der Zellmembran resultierte im Tod der Zelle und ist entscheidend für den Ablauf von holokrinen Sekretionsvorgängen [74,79,82]. Zusammenfassend war ersichtlich, dass Differenzierungs- und Reifungs-Prozesse der SZ95-Sebozyten mit denen von *in-vivo* Sebozyten vergleichbar sind [79]. Es zeigten sich keine morphologischen Unterschiede zwischen der frühen und der späten Passage.

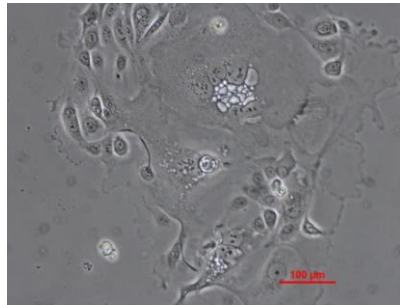


Abbildung 13: Dargestellt ist eine große Kolonie mit zentraler Riesenzelle mit fragmentiertem Zellkern und zahlreichen Lipid-Vakuolen (Maßstab: 100 µm).

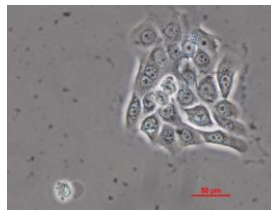


Abbildung 14: Dargestellt ist eine Kolonie der SZ95-Sebozyten. Als Primärkolonie wird die von einer einzelnen Zelle ausgehende räumlich isolierte Kolonie (*Cluster*) bezeichnet. Ersichtlich ist zudem ein im Zellmedium umherschwimmender Zelltrümmer (Maßstab: 50 µm).

### **3.1.1 Wachstumskinetik – Analyse der Wachstumsverläufe**

Das Proliferationsverhalten der SZ95-Sebozyten wurde während der Langzeitkultivierungen beobachtet. Um die Wachstumsrate zu bestimmen, wurde eine Zählung der Zellen in Intervallen von jeweils 2 Tagen durchgeführt. Um das Wachstumsverhalten der unterschiedlichen Passagezahlen der SZ95-Sebozyten miteinander vergleichen zu können, wurden die Zellen jeweils mit einer definierten Zellzahl (Einsaatdichte) ausgesät, denn die ausplattierte Zelldichte hat einen großen Einfluss auf den Wachstumsverlauf. Zu Beginn der Zellzählung lag eine Initialzellzahl von etwa 1.000.000 Zellen vor. Es war erkennbar, dass die SZ95-Sebozytenlinie nach einer etwa fünftägigen lag-Phase die log-Wachstumsphase erreichten. Die stationäre Phase wurde bei einer Zellzahl von etwa fünf bis sechs Millionen Zellen erreicht, da hier vollständige Konfluenz in dem Zellkultur-Gefäß erreicht wurde. Zusammenfassend ließen sich hinsichtlich des Proliferationsverhaltens zwischen der frühen und der späten Passage der SZ95-Sebozyten keine entscheidenden Unterschiede feststellen.

### 3.1.2 Beurteilung der Vitalität mittels Trypanblaufärbung (Vitalitätstest)

Um die Vitalität der SZ95-Zellen einschätzen zu können, wurde parallel zu jeder Zellzählung eine Färbung mit Trypanblau vorgenommen (Kapitel 2.2.4). Es war kein eindeutiger Unterschied der unterschiedlichen Passagezahlen erkennbar (Abbildung 15).

| Passagezahl | Lebende Zellen in % |
|-------------|---------------------|
| 36          | 92,3                |
| 37          | 97,25               |
| 38          | 95,6                |

| Passagezahl | Lebende Zellen in % |
|-------------|---------------------|
| 71          | 98,7                |
| 72          | 92,5                |
| 73          | 95,1                |

Abbildung 15: Tabellarische Darstellung des prozentualen Anteils lebender Zellen der einzelnen frühen und späten Passagen, welche exemplarisch ausgewählt wurden.

### 3.1.3 Beta-Aktin-Färbung zur Beurteilung der Gesamt-Morphologie der SZ95-Zellen

Um Unterschiede in der Zellstruktur und des Zytoskeletts zwischen der frühen und späten Passagen der SZ95-Sebozyten und damit morphologische Veränderungen im Laufe der *in-vitro* Kultur feststellen zu können, wurde eine Färbung mittels Anti-Beta-Aktin-Antikörper vorgenommen (Abbildungen 16 und 17).

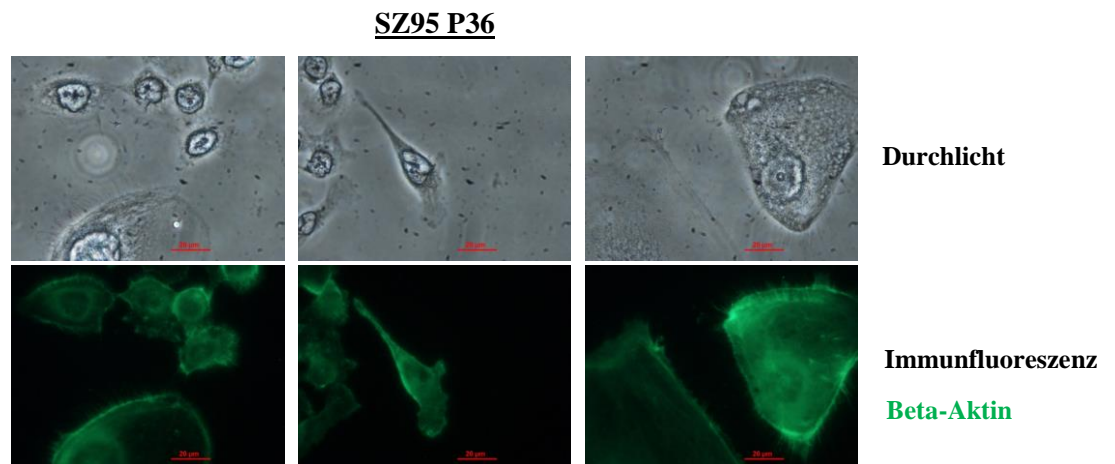


Abbildung 16: Dargestellt ist eine frühe Passage der SZ95-Sebozyten, wobei hier mittels der Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Anti-Beta-Aktin-Antikörper die Zellstruktur verdeutlicht wird (Maßstab: 20 µm).

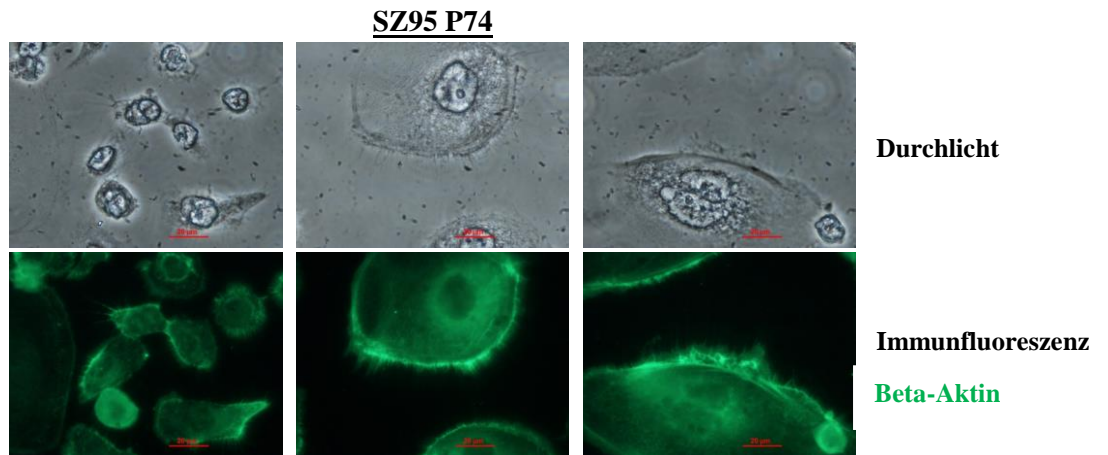


Abbildung 17: Dargestellt ist eine späte Passage (P74) der SZ95-Sebozyten, wobei hier mittels der IF-Färbung mit einem Anti-Beta-Aktin-Antikörper die Zellstruktur verdeutlicht wird (Maßstab: 20 µm).

Es zeigten sich keine morphologischen Unterschiede zwischen den verschiedenen Passagen. Besonders hervorzuheben seien hier die mikrofilamentangereicherten Zellausläufer der Sebozyten, die den inneren Zellcortex, aber auch *leading edges* mit Fokalkontakten, darstellen können. Diese ausgeprägten Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte könnten die Erklärung für die verhältnismäßig lange Einwirkdauer von Trypsin beim Ablösen der Zellen vom Boden der Kulturflasche sein (Kapitel 4.1.1).

### **3.1.4 DAPI-Färbung zur Beurteilung der Zellkernmorphologie**

Durch den Fluoreszenzfarbstoff DAPI lässt sich DNA anfärben. In folgenden Bildern einer frühen und einer späten Passage der SZ95-Sebozyten sind somit die Zellkerne als große, inhomogene, Granula-artig erscheinende, blau-fluoreszierende Strukturen zu erkennen. Es zeigten sich keine morphologischen Unterschiede der jeweiligen, zufällig ausgesuchten Zellpassagen (Abbildungen 18 und 19).

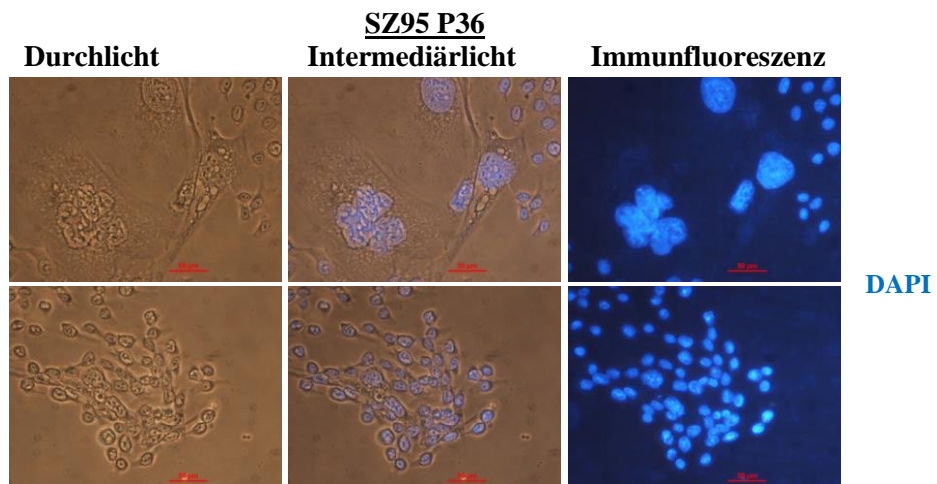


Abbildung 18: SZ95-Sebozyten der Passagezahl P36 nach DAPI-Färbung. Zellkerne sind als granuläre, blau fluoreszierende Strukturen erkennbar (Maßstab: 50 µm).

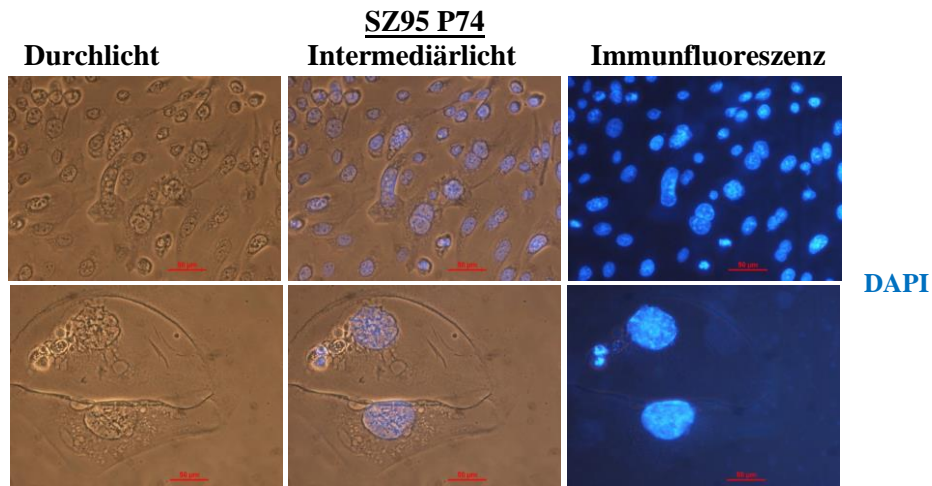


Abbildung 19: SZ95-Sebozyten, hier der Passagezahl P74, wobei nach DAPI-Färbung die Zellkerne als blau fluoreszierende Strukturen erkennbar sind (Maßstab: 50 µm).

### 3.1.5 Verhalten während des Abtrypsinierungs-Vorgangs

Im Vergleich zu anderen adhärennten Zelllinien wurde eine deutlich längere Trypsin-Einwirkzeit benötigt, um die SZ95-Sebozyten enzymatisch von ihrer Wachstumsoberfläche zu lösen. Nach der Zugabe von Trypsin-EDTA zeigte sich nach etwa 2 min Einwirkdauer eine erste Abrundung der Zellen. Nach 5-10 min war eine steigende Anzahl von Zellen, welche im Zellmedium umherflottierten, zu beobachten, und nach etwa 18-20 min waren alle Zellen vollständig von der Wachstumsoberfläche gelöst und schwammen in abgerundeter Form in der Trypsin-EDTA-Lösung umher (Abbildungen 20-22). Eine solche lange Einwirkdauer ist für adhärennte Zellkulturen eher untypisch. Nach erfolgter Passagierung der Zellen wurde der Anheftungsprozess der SZ95-Sebozyten genauestens betrachtet. Nach etwa drei Stunden war die Ausbildung von fransenartigen Zellausläufern zu erkennen, und nach etwa 8-10 Stunden war der Anheftungs-Vorgang vollständig abgeschlossen (Abbildungen 23, 24). Innerhalb der ersten 24 Stunden nach der Subkultivierung sollte jegliche Manipulation an den Zellen vermieden werden, um den initialen Anheftungsprozess der Zellen nicht zu irritieren.

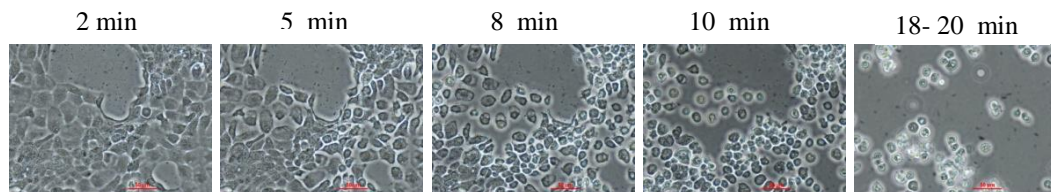


Abbildung 20: Verlauf des Ablösungsvorgangs durch Trypsin-EDTA bei der Sebozytenlinie SZ95.

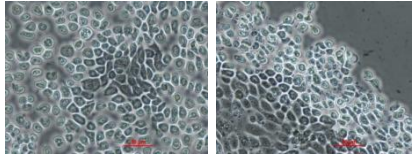


Abbildung 21: Im Zellverband zeigte sich initial eine randbetonte Abrundung der SZ95-Zellen.

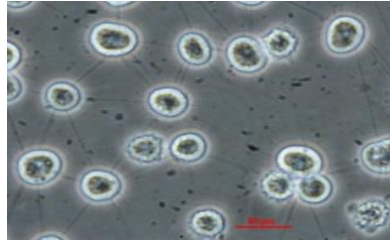


Abbildung 22: Während des Trypsinierungs-Vorganges sichtbare Zell-Zell-Kontakte zwischen den SZ95-Zellen.

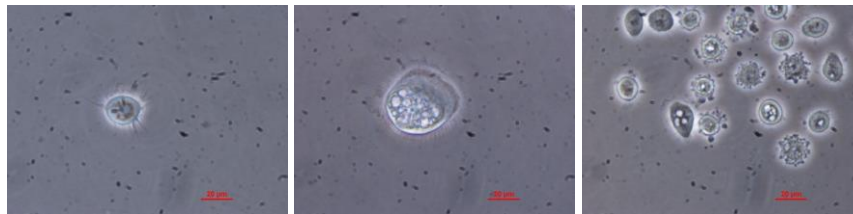


Abbildung 23: Anheftungsvorgang: Nach etwa drei Stunden zeigten sich fransenartige Zellausläufer, welche die SZ95-Sebozyten ausbildeten, um sich nach dem Trypsinierungs-Vorgang wieder an der Wachstumsoberfläche anzuheften (Maßstab: 20 µm).

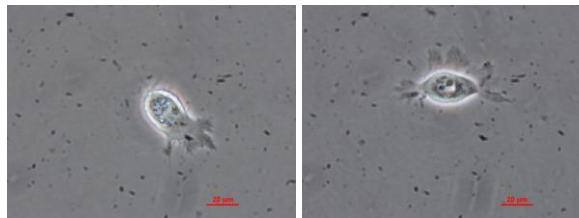


Abbildung 24: Nach etwa 8 bis 10 Stunden waren die Sebozyten wieder vollständig an der Wachstumsoberfläche angeheftet (Maßstab: 20 µm).

### **3.1.6 Morphologie der Fibroblastenzelllinien NHDF und NHDF pFUW LT-Ag**

Äquivalent zur Sebozytenlinie SZ95 wurden entsprechende Experimente an der Fibroblasten-Ausgangszelllinie NHDF und ihren, mit dem LT-Ag transfizierten Derivaten mit der Bezeichnung NHDF pFUW LT-Ag vorgenommen. Die Vergleichsanalysen hinsichtlich des morphologischen Erscheinungsbildes (Färbung mit Aktin / DAPI-Färbung) ergaben keine Unterschiede zwischen der primären Fibroblastenzelllinie NHDF und der mit dem LT-Ag transfizierten Zelllinie NHDF pFUW. Aus Platzgründen sei hier auf ausführlichere Darstellungen verzichtet. Bezüglich Analysen zur Wachstumskinetik sei hier auf frühere

Analysen verwiesen, wobei sich ein eindeutiger Wachstumsvorteil der transfizierten Zelllinie NHDF pFUW im Vergleich zu der unbehandelten Fibroblastenzelllinie feststellen ließ [86].

### **3.2 Duplex-PCR FHIT Exon 5 und Exon 6 der SZ95-Sebozyten**

Um größere genomische Deletionen im Bereich der fragilen FRA3B-Region und der das Epizentrum dieser fragilen Region überspannenden Exons 5 und 6 des FHIT-Gens detektieren zu können, wurde das semiquantitative Verfahren der genomischen Duplex-PCR unter Einbindung des *Housekeeping-Gens* Beta-Aktin durchgeführt [3,102]. Das FHIT-Gen umfasst 10 Exons, wobei nur die Exone 5 bis 9 für das Protein kodieren [37-39]. Für den Nachweis von Exon 5 ergab sich eine Bande von 337 Basenpaaren und das PCR-Produkt für Exon 6 umfasste 328 Basenpaare. Das 190 Basenpaare umfassende PCR-Produkt für Beta-Aktin diente als interne Kontrolle [102,108]. Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 zusammengefasst.

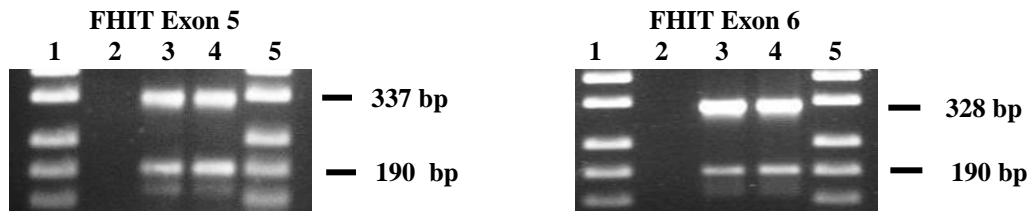


Abbildung 25: Duplex-PCR FHIT Exon 5 / Exon 6 und Aktin bei SZ95 nach Gelelektrophorese. Spuren 1 und 5: Marker M23; Spur 2: blank; Spur 3: SZ95 P32; Spur 4: SZ95 P67. *ImageJ*-Analyse: Quotient der Bandenintensität der jeweiligen FHIT- und Aktin-Banden: Exon 5: 1,2 (P32) und 1,1 (P67). Exon 6: 1,3 (P32) und 1,3 (P67).

Analog zur Sebozytenlinie SZ95 wurden entsprechende Untersuchungen an den Zelllinien NHDF und deren mit dem LT-Ag transfizierten Derivaten NHDF pFUW vorgenommen (Abbildung 26).

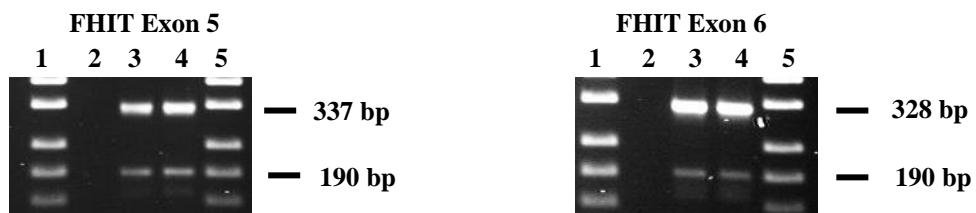


Abbildung 26: Duplex-PCR des Exon 5 / Exon 6 des FHIT-Gens und Aktin bei NHDF P10 und NHDF pFUW LT-Ag P10 nach Gelelektrophorese. Spuren 1 und 5: Marker M23; Spur 2: blank; Spur 3: NHDF-Ausgangszelllinie; Spur 4: NHDF pFUW LT-Ag. *ImageJ*-Analyse: Quotient der Bandenintensität der FHIT- und Aktin-Banden: Exon 5: 1,1 (NHDF) und 1,2 (NHDF pFUW LT-Ag). Exon 6: 1,3 (NHDF) und 1,3 (NHDF pFUW LT-Ag).

Anhand dieser Analysen ist ersichtlich, dass die SZ95-Sebozyten trotz zunehmender Passagezahl an den Exonen 5 und 6 des FHIT-Gens keine Deletionen erfahren haben, was sich in einer Verminderung der Bandenintensitäten der FHIT-Produkte gezeigt hätte. Die

Fibroblastenzelllinien wiesen ebenfalls keine derartigen Veränderungen auf. Da das PCR-Muster dieser Analysen von gesunden Probanden bekannt ist und den hier gezeigten Ergebnissen entspricht, wurde auf eine nochmalige Kontrolle verzichtet (Abbildungen 25, 26).

### **3.3 Methylierungsspezifische PCR (MSP)**

Um den Methylierungsstatus des Promotors des FHIT-Gens zu untersuchen, wurde eine methylierungsspezifische PCR durchgeführt (Kapitel 2.2.9). Als „Normalzustand“ gilt, wenn der Promotor eines Tumorsuppressor-Gens in unmethyliertem Zustand vorliegt [26]. Für die entsprechende unmethylierte Sequenz des FHIT-Gens wurde ein PCR-Produkt mit einer Länge von 85 Basenpaaren erhalten. Das PCR-Produkt des methylierten Abschnitts des FHIT-Gens wies eine Länge von 120 Basenpaaren auf. Bei allen durchgeführten Experimenten wurde stets ein Leerwert (*blank*) mitgeführt, der einen Reaktionsansatz ohne DNA darstellte, um Kontaminationen oder falsch-positive Ergebnisse auszuschließen.

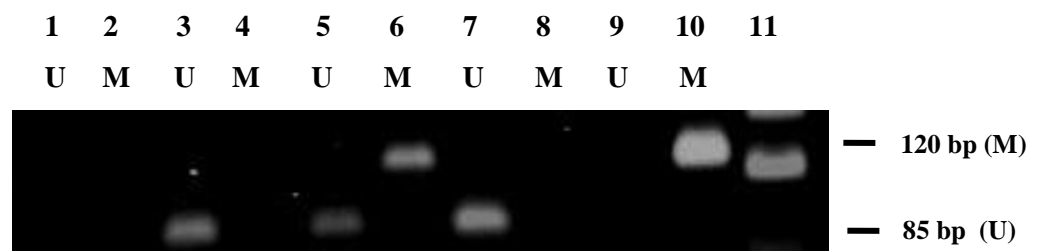


Abbildung 27: MSP der SZ95 nach Gelelektrophorese. Gegenüberstellung einer frühen und einer späten Passage von SZ95-Sebozyten, um den unterschiedlichen Methylierungsstatus zu dokumentieren. Spur 1: blank unmethyliert; Spur 2: blank methyliert; Spur 3: SZ95 P32 (Passage 32) unmethyliert; Spur 4: SZ95 P32 methyliert; Spur 5: SZ95 P67 (Passage P67) unmethyliert; Spur 6: SZ95 P67 methyliert; Spur 7: mock-behandelte Kontroll-DNA unmethyliert; Spur 8: mock-behandelte Kontroll-DNA methyliert; Spur 9: Methylase-behandelte Kontroll-DNA unmethyliert; Spur 10: Methylase-behandelte Kontroll-DNA methyliert; Spur 11: Marker M23. Die hier genutzten Bezeichnungen „methyliert“ (M) beziehungsweise „unmethyliert“ (U) bedeuten, dass die jeweiligen DNA-Proben mit den spezifischen Primern zum Nachweis methylierter (M) beziehungsweise nicht-methylierter (U) FHIT-Promotorsequenzen mittels PCR amplifiziert wurden.

Bei der Gegenüberstellung einer frühen (Passage P32 war die früheste, im Labor verfügbare Passage) und einer späten Passage (hier Passage P67) der SZ95-Sebozyten ist der unterschiedliche Methylierungsstatus deutlich erkennbar (Abbildung 27, Spuren 4 und 6). Während bei der frühen Passage P32 im Rahmen dieses qualitativen Verfahrens der MSP keine methylierte DNA detektierbar war, zeigte die späte Passage P67 in der Population der SZ95-Zellen einen deutlich erkennbaren Anteil eines methylierten Promotorbereichs des FHIT-Gens. Analog zur Sebozytenlinie SZ95 wurden entsprechende Untersuchungen an der Fibroblasten-Ausgangszelllinie NHDF und deren mit dem LT-Ag transfizierten Derivaten namens NHDF pFUW vorgenommen (Abbildung 28). Es wurden hierbei Fibroblasten jeweils der Passage 10

der Ausgangspopulation und der LT-Ag exprimierenden Zelllinie miteinander verglichen, wobei sich unter Einsatz dieser qualitativen Analyse keine methylierten FHIT-Promotorsequenzen in den NHDF-Proben feststellen ließen.

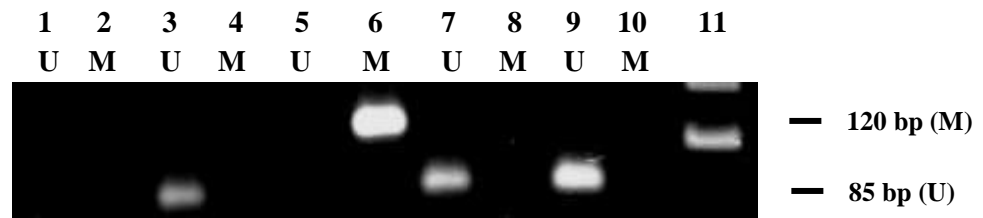


Abbildung 28: MSP der Fibroblastenzelllinien NHDF P10 und NHDF pFUW LT-Ag P10 (Passage 10) nach Gelelektrophorese. Spuren 1: blank unmethyliert; Spur 2: blank methyliert; Spur 3: mock-behandelte Kontroll-DNA unmethyliert; Spur 4: mock-behandelte Kontroll-DNA methyliert; Spur 5: Methylase-behandelte Kontroll-DNA unmethyliert; Spur 6: Methylase-behandelte Kontroll-DNA methyliert; Spur 7: NHDF P10 unmethyliert; Spur 8: NHDF P10 methyliert; Spur 9: NHDF pFUW LT-Ag unmethyliert; Spur 10: NHDF pFUW LT-Ag methyliert; Spur 11: Marker M23. Die hier genutzten Bezeichnungen „methyliert“ (M) beziehungsweise „unmethyliert“ (U) bedeuten, dass die jeweiligen DNA-Proben mit den spezifischen Primern zum Nachweis methylierter (M) beziehungsweise nicht-methylierter (U) FHIT-Promotorsequenzen mittels PCR amplifiziert wurden.

### **3.4 Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)**

Eine weitere Möglichkeit, um den Methylierungsstatus des FHIT-Promotors untersuchen zu können, stellt das semiquantitative Verfahren der COBRA dar (Kapitel 2.2.10). Nach jeweiliger Behandlung der genomischen DNA mit Bisulfit und der PCR-Produkte mit dem Restriktionsenzym *Bst*UI, welches das Palindrom *CGCG* als Erkennungssequenz für die Spaltung der DNA benötigt, wurden die erhaltenen Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Unmethylierte Produkte umfassten eine Länge von 247 Basenpaaren. Methylierte Produkte wurden durch das Restriktionsenzym geschnitten, wobei hier Fragmente von 191, 38 und 18 Basenpaaren entstanden. Unter Einsatz der analytischen gelelektrophoretischen Auftrennung wurde stets nur das obere Fragment von 191 Basenpaaren dargestellt.



Abbildung 29: COBRA von SZ95 der Passagen P36, P44, P59 und P64 nach Gelelektrophorese. Spur 1: Marker M23; Spur 2: blank als Restriktionsansatz ohne PCR-Produkt und ohne *Bst*UI; Spur 3: blank hier mit *Bst*UI; Spur 4: SZ95 P32 ohne *Bst*UI; Spur 5: SZ95 P32 mit *Bst*UI (hier kein Nachweis methylierter Promotorsequenzen); Spuren 6: SZ95 P44 ohne *Bst*UI; Spur 7: SZ95 P44 mit *Bst*UI; Spur 8: SZ95 P59 ohne *Bst*UI; Spur 9: SZ95 P59 mit *Bst*UI; Spur 10: SZ95 P64 ohne *Bst*UI; Spur 11: SZ95 P64 mit *Bst*UI; Spur 12: unbehandelte Kontroll-DNA eines gesunden Probanden ohne *Bst*UI; Spur 13: unbehandelte Kontroll-DNA mit *Bst*UI; Spur 14: mit Methylase behandelte Kontroll-DNA ohne *Bst*UI; Spur 15: mit Methylase behandelte Kontroll-DNA mit *Bst*UI; Spur 16: Marker M23.



Anhand der Bandenverteilung in Abbildung 29 ist ersichtlich, dass im Laufe der Passagen der SZ95 der Anteil an methylierter DNA im Bereich des Promotors des FHIT-Gens zunimmt.

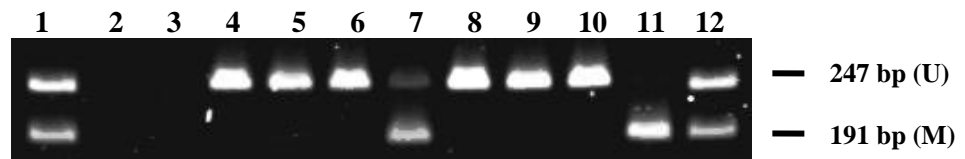


Abbildung 30: COBRA der SZ95 in den Passagen P32 und P67 als Gegenüberstellung einer sehr frühen und noch späteren Passage. Spur 1: Marker M23; Spur 2: blank als Restriktionsansatz ohne PCR-Produkt und ohne *Bst*UI; Spur 3: blank hier mit *Bst*UI; Spur 4: SZ95 P32 ohne *Bst*UI; Spur 5: SZ95 P32 mit *Bst*UI-Verdau (hier noch kein Nachweis methylierter Promotorsequenzen); Spur 6: SZ95 P67 ohne *Bst*UI; Spur 7: SZ95 P67 mit *Bst*UI; Spur 8: unbehandelte Kontroll-DNA ohne *Bst*UI; Spur 9: unbehandelte Kontroll-DNA mit *Bst*UI; Spur 10: mit Methylase behandelte Kontroll-DNA ohne *Bst*UI; Spur 11: mit Methylase behandelte Kontroll-DNA nach *Bst*UI-Verdau; Spur 12: Marker M23.

In Abbildung 30 wurden in den Spuren 4 - 7 die zu diesem Zeitpunkt als früheste und späteste mir zur Verfügung stehende Passage der SZ95-Sebozyten gegenübergestellt. Während in der frühen Passage der untersuchte Promotorbereich des FHIT-Gens in unmethyliertem Zustand vorliegt, kehrt sich das Bild in der späten Passage um: Der Großteil der im DNA-Pool vorliegenden Promotorsequenzen des FHIT-Gens liegt in methyliertem Zustand vor.

Bei der MSP und der COBRA handelt es sich um zwei unterschiedliche Verfahren, um den Methylierungsstatus vom Promotor des FHIT-Gens untersuchen zu können. Durch beide Verfahren konnte gezeigt werden, dass es in Abhängigkeit von der zunehmenden Passagezahl der SZ95-Sebozyten zu einer Methylierung der DNA im Promotorbereich des FHIT-Gens kam.

Analog zur Sebozytenlinie SZ95 wurden entsprechende Experimente an der Fibroblasten-Ausgangszelllinie NHDF und deren mit dem LT-Ag transfizierten Derivaten NHDF pFUW vorgenommen, wobei sich hier, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der methylierungsspezifischen PCR (MSP), keine methylierte DNA am FHIT-Promotor feststellen ließ (Abbildung 31).

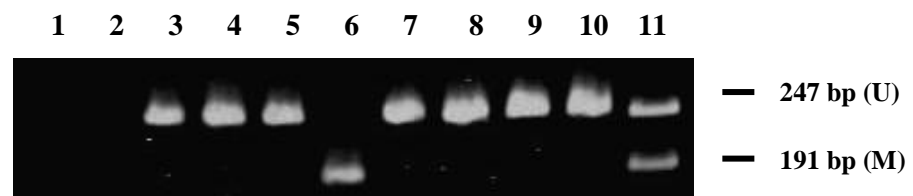


Abbildung 31: COBRA der Fibroblasten nach Gelelektrophorese als Gegenüberstellung der NHDF-Ausgangszelllinie P10 und der mit dem LT-Ag transfizierten Fibroblasten P10. Spuren 1 und 2: blank; Spuren 3 und 4: unbehandelte Kontroll-DNA ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 5 und 6: mit Methylase behandelte Kontroll-DNA ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 7 und 8: NHDF-Ausgangszelllinie ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 9 und 10: NHDF pFUW LT-Ag ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spur 11: M23.

### **3.5 SZ95-DNA *in-vitro* methyliert**

Bereits frühere Studien anderer Arbeitsgruppen hatten zeigen können, dass sich CpG-Inseln *in-vitro* enzymatisch methylieren lassen [22]. Experimentell wurde die DNA einer späten Passage der SZ95-Sebozyten mit einer DNA-Methylase behandelt, um den restlichen Anteil der noch unmethylierten DNA vollständig zu methylieren. Bei Cytosin-DNA-Methyltransferasen (DNA-MTasen) handelt es sich um Enzyme, welche die Methylierung an CpG-Dinukleotiden katalysieren [109]. Exemplarisch sei an dieser Stelle das Bild der analytischen Gelelektrophorese nach dem Prinzip der COBRA dargestellt (Abbildung 32).

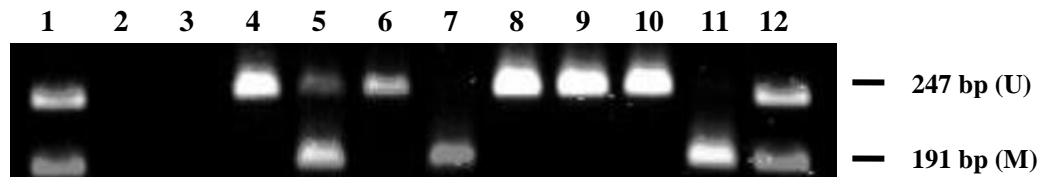


Abbildung 32: COBRA der SZ95-Sebozyten P67 nach Gelelektrophorese. Hier wurden die unbehandelte und die CpG-Methylase behandelte DNA der Passage P67 der SZ95-Sebozyten einander gegenübergestellt. Spur 1: Marker M23; Spuren 2 und 3: blank; Spur 4: SZ95 P67 PCR-Produkt ohne *Bst*UI; Spur 5: SZ95 P67 methylierungsspezifisches Produkt nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 6 und 7: SZ95 P67 *in-vitro* durch Methylase behandelte DNA ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 8 und 9: unbehandelte Kontroll-DNA ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 10 und 11: mit Methylase behandelte Kontroll-DNA ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spur 12: Marker M23.

Anhand des Vergleiches der Spuren 5 und 7 in Abbildung 32 wird ersichtlich, dass sich der Restbestand an unmethylierter DNA (247 bp-Bande) der SZ95-Sebozyten der Passagezahl P67 im Promotorbereich des FHIT-Gens durch die CpG-Methylase *in-vitro* vollständig methylieren ließ. Zudem verdeutlicht diese Abbildung, bezugnehmend auf alle vorhergehenden Abbildungen in diesem Kapitel, dass das Restriktionsenzym *Bst*UI in jedem Fall die vorliegende methylierte DNA mit der Erkennungssequenz komplett geschnitten hat und dass der, bei den hohen Passagezahlen der SZ95-Sebozyten ersichtliche, kleine Restbestand an unverdauter DNA tatsächlich auf einen Restbestand an unmethylierter DNA, und nicht etwa auf eine Aktivitätserschöpfung des Restriktionsenzym, zurück zu führen ist. Ziel dieses kleinen Teilerperimentes war es also, die Ergebnisse der zuvor durchgeführten COBRA-Analysen hinsichtlich des erfolgreich durchgeführten *Bst*UI-Verdaus zu bestätigen.

### **3.6 NHDF- und NHDF pFUW LT-Ag-DNA *in-vitro* methyliert**

In ähnlicher Weise wurden entsprechende Experimente an der Fibroblasten-Ausgangszelllinie NHDF und der transfizierten Derivate NHDF pFUW vorgenommen, wobei sich hier, vergleichbar mit Ergebnissen der Analysen zu der Sebozytenlinie SZ95, die DNA durch den Einsatz der CpG-Methylase vollständig *in-vitro* methylieren ließ (Abbildung 33).



Abbildung 33: COBRA der Fibroblasten nach Gelelektrophorese. Es erfolgte ein Vergleich von unbehandelter und CpG-Methylase behandelte DNA der NHDF-Ausgangszelllinie P10 sowie der NHDF pFUW LT-Ag P10. Spur 1: Marker M23; Spuren 2 und 3: blank; Spur 4: NHDF-Ausgangszelllinie (links) bzw. NHDF pFUW LT-Ag (rechts) ohne *Bst*UI; Spur 5: NHDF-Ausgangszelllinie bzw. NHDF pFUW LT-Ag nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 6 und 7: *in-vitro* durch Methylase behandelte DNA der NHDF-Ausgangszelllinie (links) bzw. NHDF pFUW LT-Ag (rechts) ohne *Bst*UI (Spur 6) bzw. nach *Bst*UI-Verdau (Spur 7); Spuren 8 und 9: unbehandelte Kontroll-DNA ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 10 und 11: mit Methylase behandelte Kontroll-DNA ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spur 12: Marker M23.

### 3.7 Analyse der DNA-Methylierung der Regionen 1 und 2 des FHIT-Gens

#### 3.7.1 Bisulfit-Sequenzierung der Sebozytenlinie SZ95 (P32 und P67)

Funktionelle Domänen Transkriptions-regulatorischer Abschnitte des FHIT-Gens sind bereits in früheren Studien beschrieben worden [36]. Sie umfassen mit ihren CpG-Inseln die Regionen 1 und 2. Eine schematische Darstellung dieses analysierten Abschnitts des FHIT-Gens, unterteilt in Region 1 und 2, sowie die Lage der verwendeten Primer werden auf Seite 75 gezeigt. Die nachfolgende Analyse vergleicht das Methylierungsmuster von 33 CpG-Dinukleotiden innerhalb dieser beiden Regionen zwischen einer frühen (P32) und einer späten Passage (P67) der Sebozytenlinie SZ95.

#### 3.7.2 Kontroll-PCR und Sequenzierung

PCR-Amplifikate der Bisulfit-behandelten genomischen DNA der Regionen 1 und 2 wurden in einen Plasmidvektor kloniert. Nachfolgend isolierte Plasmide wurden mittels eingerückter Primer (*nested primer*) auf Rekombination überprüft (Abbildungen 34, 35). Die Agarose-Gelanalysen zeigen exemplarisch die Ergebnisse der jeweiligen *nested* PCRs von 13 beziehungsweise 15 Klonen im Hinblick auf die frühe und die späte Passagezahl sowie die Regionen 1 und 2.

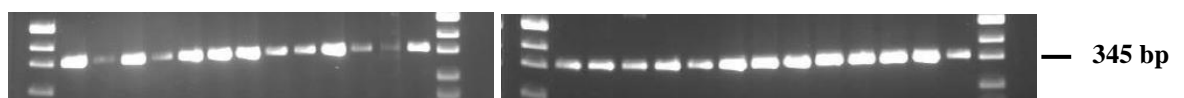


Abbildung 34: Es ist jeweils das Ergebnis der durchgeführten PCR der Region 1 dargestellt, in der linken Abbildung sind die Klone 1-13 der Passage P32 ersichtlich und in der rechten die Klone 1-13 der Passage P67 der Sebozytenlinie SZ95. Die Bande bei 345 bp markiert die Aufnahme des gewünschten Inserts.

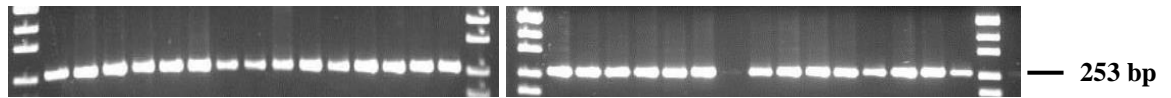


Abbildung 35: Es ist jeweils das Ergebnis der durchgeführten PCR der Region 2 dargestellt, in der linken Abbildung sind die Klone 1-15 der Passage P32 zu sehen und in der rechten die Klone 1-15 der Passage P67 der Sebozytenlinie SZ95. Die Bande bei 253 bp markiert die Aufnahme des gewünschten Inserts.

In den hier exemplarisch dargestellten Abbildungen trugen bis auf eine Ausnahme (SZ95 P67 Region 2 Klon 7 in Abbildung 35, rechts) alle Klone das gewünschte Insert und ließen sich für die sich anschließende Sequenzierung verwenden. Ziel dieser Klonierung war es, sowohl für die frühe als auch die späte Passage eine repräsentative Anzahl von Klonen zu identifizieren, welche das gewünschte Insert in sich trugen. Im Anschluss an diese PCR wurden die jeweiligen Plasmide aufgereinigt und zur *forward* und *reverse* Sequenzierung eingesetzt (Kapitel 2.2.11).

### **3.7.3 Auswertung des Methylierungsmusters der Passagen P32 und P67 der SZ95**

Die durch die Sequenzierung erhaltenen Sequenzchromatogramme wurden mit Hilfe des Sequenzeditors *FinchTV* (Kapitel 2.2.15) und des Programms *BIQ-Analyzer* ausgewertet. Hierbei beruhte die Analyse auf einem Vergleich der Sequenz der analysierten Klone mit der FHIT-Originalsequenz als Referenzsequenz.

### **3.7.4 FHIT Region 1 und Region 2: Vergleich zwischen SZ95 P32 und SZ95 P67**

Es erfolgte die Auswertung des Methylierungsmusters der sich in der zuvor definierten Region 1 und Region 2 des FHIT-Gens befindlichen 33 CpGs, welche durch die Lage der Primersequenzen analysiert wurden. Die Region 1 umfasst 19 CpGs, während in Region 2 14 CpGs zu finden sind. Die jeweilig vorliegenden CpGs der Regionen 1 und 2 wurden durchlaufend nummeriert und sind der schematischen Darstellung auf den Seiten 76 und 78 im Anhang zu entnehmen, wobei hier die CG-Dinukleotide, welche Teil der Primersequenz waren, nicht mit berücksichtigt wurden.

## Region 1 des FHIT-Gens

### SZ95 P32

### SZ95 P67

| CpG | Anzahl methylierter CpGs | CpG | Anzahl methylierter CpGs |
|-----|--------------------------|-----|--------------------------|
| 1   | 0/19                     | 1   | 1/19                     |
| 2   | 0/19                     | 2   | 2/19                     |
| 3   | 0/19                     | 3   | 3/19                     |
| 4   | 0/19                     | 4   | 2/19                     |
| 5   | 0/19                     | 5   | 2/19                     |
| 6   | 0/19                     | 6   | 2/19                     |
| 7   | 0/19                     | 7   | 2/19                     |
| 8   | 0/19                     | 8   | 2/19                     |
| 9   | 0/19                     | 9   | 4/19                     |
| 10  | 0/19                     | 10  | 2/19                     |
| 11  | 1/19                     | 11  | 2/19                     |
| 12  | 0/19                     | 12  | 1/19                     |
| 13  | 0/19                     | 13  | 2/19                     |
| 14  | 0/19                     | 14  | 3/19                     |
| 15  | 0/19                     | 15  | 3/19                     |
| 16  | 0/19                     | 16  | 4/19                     |
| 17  | 0/19                     | 17  | 3/19                     |
| 18  | 0/19                     | 18  | 2/19                     |
| 19  | 0/19                     | 19  | 3/19                     |

**Abbildung 36: Methylierungsmuster der Region 1 der SZ95 P32 im Vergleich zu den SZ95 P67.** In dieser Tabelle ist die Anzahl methylierter CpG-Dinukleotide pro Anzahl auswertbarer Klone dargestellt. Die Ziffern 1 bis 19 bezeichnen die Positionsnummern der CpGs, Details zu ihrer Lage innerhalb der Sequenz des FHIT-Gens sind der Seite 76 zu entnehmen. Die Farbe **Hellblau** kennzeichnet den Methylierungsanteil der CpGs ab mehr als 1%.

## Region 2 des FHIT-Gens

### SZ95 P32

### SZ95 P67

| CpG | Anzahl methylierter CpGs | CpG | Anzahl methylierter CpGs |
|-----|--------------------------|-----|--------------------------|
| 1   | 0/19                     | 1   | 4/19                     |
| 2   | 1/19                     | 2   | 13/19                    |
| 3   | 1/19                     | 3   | 13/19                    |
| 4   | 4/19                     | 4   | 17/19                    |
| 5   | 4/19                     | 5   | 15/19                    |
| 6   | 12/19                    | 6   | 16/19                    |
| 7   | 12/19                    | 7   | 19/19                    |
| 8   | 0/19                     | 8   | 8/19                     |
| 9   | 0/19                     | 9   | 2/19                     |
| 10  | 1/19                     | 10  | 5/19                     |
| 11  | 0/19                     | 11  | 2/19                     |
| 12  | 0/19                     | 12  | 2/19                     |
| 13  | 0/19                     | 13  | 1/19                     |
| 14  | 0/19                     | 14  | 0/19                     |

**Abbildung 37: Methylierungsmuster der Region 2 der SZ95 P32 im Vergleich zu den SZ95 P67.** In dieser Tabelle ist die Anzahl methylierter CpG-Dinukleotide pro Anzahl auswertbarer Klone dargestellt. Die Ziffern 1 bis 14 bezeichnen die Positionsnummern der CpGs, weitere Details sind Seite 78 zu entnehmen. Die unterschiedlichen Farbgrade der Farbe Blau spiegeln den Methylierungsanteil wider: je dunkler der Farbgrad der Farbe Blau, desto höher stellt sich der DNA-Methylierungsgrad des entsprechenden CpG-Dinukleotids dar. Die Farbe **Hellblau** kennzeichnet den Methylierungsanteil der CpGs von 1-35%; **mittelblau** von 36-80% und **dunkelblau** von 81-100%.

Ein Vergleich der Auflistungen in den Abbildungen 36 und 37 zeigt grundsätzlich eine insgesamt geringere DNA-Methylierung der niedrigen Passage P32 im Gegensatz zur höheren Passage P67 der Sebozyten. Hervorzuheben sei hier das CpG Nummer 7 der Region 2: Es zeigte sich bei der Passage P32 zu etwa 63 % und bei Passage P67 zu 100 % methyliert, was dieses CpG-Dinukleotid als das mit Abstand am häufigsten methylierte CpG der untersuchten Regionen 1 und 2 des FHIT-Gens definiert.

Mit Hilfe des Chi-Quadrat-Vierfeldertests (Kapitel 2.2.16) wurde das Methylierungsmuster jeweils der Regionen 1 und 2 und des gesamten FHIT-Gen-Abschnittes, welcher im Hinblick auf die Regionen 1 und 2 untersucht wurde, statistisch ausgewertet und analysiert. Im Rahmen der statistischen Analyse der Regionen 1 und 2 (jeweils getrennt betrachtet) des FHIT-Gens bei der Gegenüberstellung der Passagen P32 und P67 ergab sich für die Region 1 ein Wert von  $\chi^2 = 44,9 > 3,84$  ( $\alpha = 0,05$ ) und für die Region 2 ein Wert von  $\chi^2 = 61,9 > 3,84$  ( $\alpha = 0,05$ ). Somit besteht zwischen den Merkmalen ein signifikanter Unterschied und folglich signifikanter Zusammenhang der Variablen: Das Methylierungsmuster der CpGs jeweils innerhalb der Regionen 1 und 2 des FHIT-Gens ist abhängig von der Höhe der Passagezahl der Sebozyten.

Hinsichtlich der Gesamtmethylierung aller untersuchten CpGs der Regionen 1 und 2 des FHIT-Gens im Hinblick auf den Vergleich zwischen der frühen Passage P32 der Sebozytenzelllinie SZ95 sowie der späten Passage P67 ergab sich im Rahmen der statistischen Auswertung des Methylierungsmusters mit Hilfe des Chi-Quadrat-Tests ein Wert von  $\chi^2 = 190,4 > 3,84$  ( $\alpha = 0,05$ ).

Das Methylierungsmuster der untersuchten CpGs der Regionen 1 und 2 des FHIT-Gens unterscheidet sich signifikant zwischen der frühen Passage P32 und der späten Passage P67 der Sebozytenlinie SZ95 und ist somit abhängig von der Höhe der Passagezahl der Sebozyten, beziehungsweise der Länge der Dauer einer *in-vitro* Kultur der Sebozyten unter standardisierten Kulturbedingungen.

### **3.8 Reverse-Transkriptase PCR**

Für die Expressionsanalyse von FHIT wurde eine Reverse-Transkriptase (RT) PCR durchgeführt und zur Quantifizierung wurde der Vergleich zum ubiquitär exprimierten *Housekeeping*-Gen Beta-Aktin genutzt. Die 133 Basenpaar-Bande steht für FHIT und die 511 Basenpaar-Bande stellt das PCR-Produkt für Beta-Aktin dar.

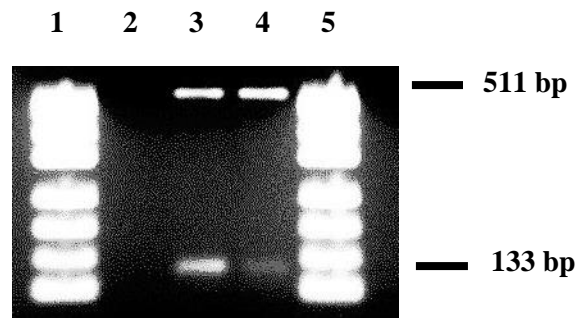


Abbildung 38: Reverse-Transkriptase (RT) PCR nach der Agarose-Gelelektrophorese. Spuren 1 und 5: Marker M23; Spur 2: blank; Spur 3: SZ95 P32; Spur 4: SZ95 P67.

Anhand der Abbildung 38 ist ersichtlich, dass im Laufe der *in-vitro* Kultivierung die Expression des FHIT-Gens auf der Ebene der Transkription abnimmt. Hier sei auf den quantitativen Vergleich gegenüber der Expression des *Housekeeping*-Gens Beta-Aktin hingewiesen. Hinsichtlich der bekannten Tatsache, dass sich die Expression des FHIT-Gens umgekehrt proportional zum Methylierungsstatus verhält [110], konnte dieser Aspekt in Zusammenschau mit den weiter oben aufgeführten Methylierungsanalysen (MSP, COBRA) bestätigt werden.

### **3.9 Immunfluoreszenz: Histonmodifikation $\gamma$ -H2A.X**

Bei Verlust der *caretaker*-Funktion des Tumorsuppressor-Proteins FHIT kann es zu DNA-Doppelstrangbrüchen und genomischer Instabilität kommen [39]. Um diese, in Abhängigkeit von der Zeit, in welcher die SZ95-Sebozyten unter standardisierten *in-vitro* Kulturbedingungen vermehrt wurden, zu zeigen, wurde eine Immunfärbung mit dem anti-Phosphohiston-Gamma-H2A.X-Antikörper durchgeführt. Die phosphorylierte Form  $\gamma$ -H2A.X spielt eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und der Reparatur von Doppelstrangbrüchen durch DNA-Reparatur-Mechanismen [111-114]. Die Auswertung von  $\gamma$ -H2A.X-Foci ist die sensitivste Methode, um DNA-Doppelstrangbrüche zu detektieren [112, 115-122].

### SZ95 P35

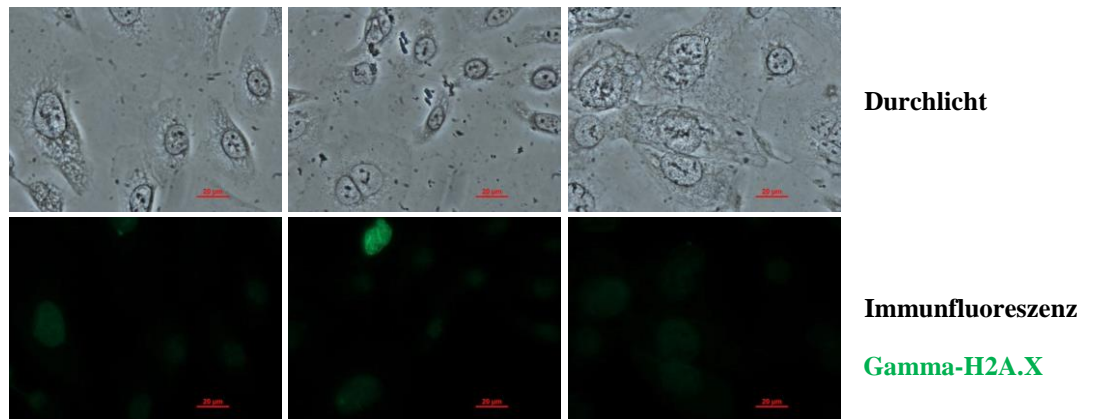


Abbildung 39: Immunzytochemische Färbung von SZ95-Sebozyten der Passagezahl P35 mit dem  $\gamma$ -H2A.X-Antikörper. Es zeigt sich eine schwache detektierbare Fluoreszenz (Maßstab: 20  $\mu$ m)

### SZ95 P73

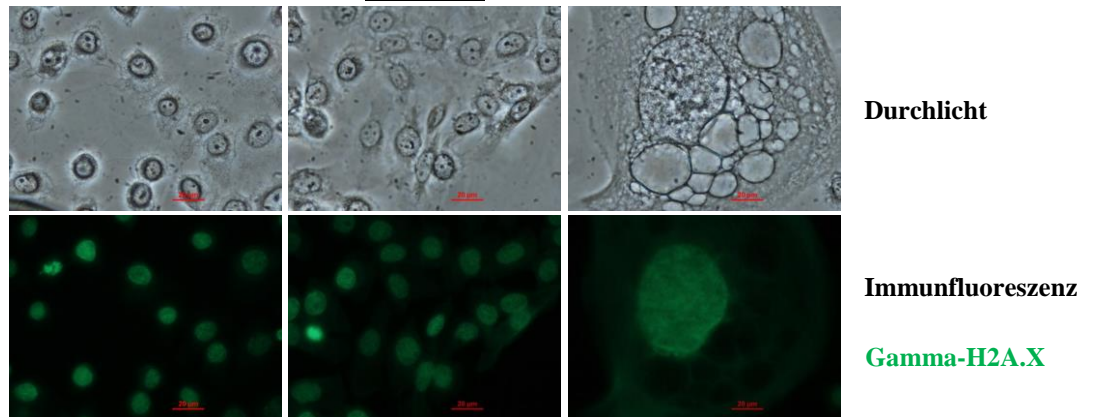


Abbildung 40: Immunzytochemische Färbung von SZ95-Sebozyten der exemplarisch ausgewählten späten Passagezahl P73 mit dem  $\gamma$ -H2A.X-Antikörper. Hier ist eine deutliche Fluoreszenz durch zahlreiche Foci erkennbar (Maßstab: 20  $\mu$ m).

Bei der Betrachtung einer frühen und einer exemplarisch ausgewählten späten Passage zeigt sich eine deutliche Fluoreszenz der späteren Passage der SZ95-Sebozyten, wobei man annehmen kann, dass hierbei die Anzahl der detektierbaren Foci proportional zum Ausmaß der Schädigung der DNA ist [116,123,124]. Während sich bei der hier gezeigten frühen Passage der SZ95-Sebozyten nur sehr wenige Foci detektieren lassen, weist die späte Passage eine starke Fluoreszenz auf (Abbildungen 39 und 40). Im Rahmen der Auswertung der *Integrated Density*-Werte mittels des Programmes *ImageJ* ergab sich ein (Mittelwert-) Quotient von rund 1,8 (Kapitel 2.2.15). Es lässt sich die Aussage treffen, dass es im Laufe der Kultivierung der SZ95-Sebozyten unter standardisierten *in-vitro* Kulturbedingungen vermehrt zu DNA-Doppelstrangbrüchen kam und sich diese mit der Zeit anhäufte.



In gleicher Weise wurden entsprechende Fluoreszenzanalysen auf  $\gamma$ -H2A.X an der Fibroblasten-Ausgangszelllinie NHDF und ihren mit dem LT-Ag transfizierten Derivaten NHDF pFUW durchgeführt, um einen Vergleich hinsichtlich der Frequenz an Doppelstrangbrüchen vorzunehmen. Es zeigten sich diesbezüglich keine Veränderungen: Das Ausmaß an detektierbaren Foci war bei beiden Fibroblastenzelllinien sehr gering. Aus Platzgründen sei hier auf Bild-Darstellungen verzichtet.

### **3.10 Behandlung der SZ95 mit 5-Azacytidin und Trichostatin A**

Einen aktuellen Forschungsansatz von therapeutischer Relevanz stellt der experimentelle Versuch dar, ein epigenetisch stillgelegtes Tumorsuppressor-Gen wieder reaktivieren zu können. Hierfür wurden entsprechende Versuche mit 5-Azacytidin und Trichostatin A durchgeführt. Ausgangspunkt dafür waren Studien, die nach Anwendung von demethylierend wirkenden Agenzien wie 5-Azacytidin und Histon-Deacetylase-Inhibitoren *in-vitro* eine Reexpression von stillgelegten Tumorsuppressor-Genen erzielten [51,125-127]. Um die molekulargenetischen Auswirkungen der Behandlung der Zellen mit demethylierenden Agenzien zu studieren, wurde eine COBRA-Analyse zur Klärung des Methylierungsstatus und im Anschluss daran eine RT-PCR zur Expressionsanalyse durchgeführt.

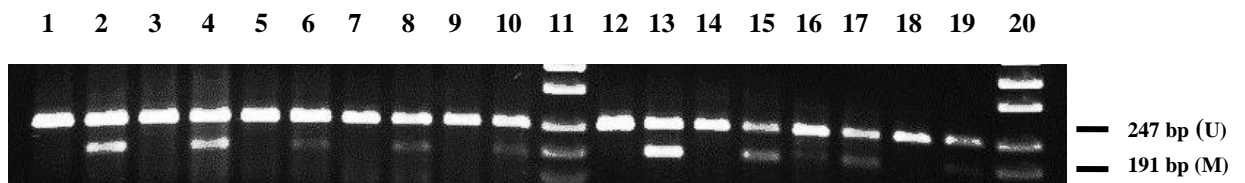


Abbildung 41: COBRA nach der Behandlung der Sebozyten mit 5-Azacytidin und Trichostatin A (TSA). Spuren 1 und 2: unbehandelte SZ95 P37 ohne (Spur 1) bzw. nach (Spur 2) *Bst*UI-Verdau; Spuren 3 und 4: Kontrolle SZ95 P37 PCR-Produkt ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 5 und 6: mit 5  $\mu$ M Azacytidin behandelte SZ95 P37 ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 7 und 8: mit 10  $\mu$ M Azacytidin behandelte SZ95 P37 ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 9 und 10: mit 10  $\mu$ M Azacytidin und 300 nm TSA behandelte SZ95 P37 ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 12 und 13: unbehandelte SZ95 P60 ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 14 und 15: Kontrolle SZ95 P60 ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 16 und 17: mit 10  $\mu$ M Azacytidin behandelte SZ95 P60 ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 18 und 19: mit 10  $\mu$ M Azacytidin und 300 nm TSA behandelte SZ95 P60 ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 11 und 20: Marker M23.

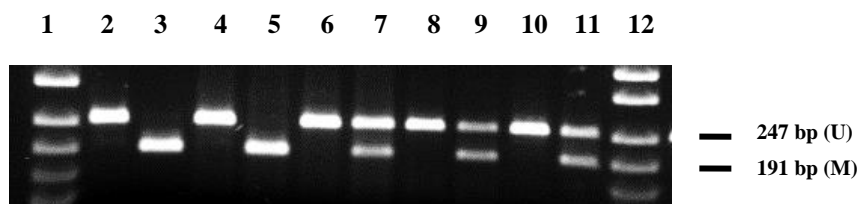


Abbildung 42: COBRA an einer Passage 123 SZ95-Population nach Behandlung mit 5-Azacytidin und Trichostatin A (TSA). Spuren 1 und 12: Marker M23; Spuren 2 und 3: unbehandelte SZ95 P123 ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 4 und 5: Kontrolle SZ95 P123 ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 6 und 7: mit 5 µM Azacytidin behandelte SZ95 P123 ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 8 und 9: mit 10 µM Azacytidin behandelte SZ95 P123 ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau; Spuren 10 und 11: mit 10 µM Azacytidin und 300 nm TSA behandelte SZ95 P123 ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau.

Durch die Ergebnisse in den Abbildungen 41 und 42 wird klar, dass sich durch die Behandlung der SZ95-Zellen mit dem demethylierenden Agens 5-Azacytidin sowie in Kombination mit Trichostatin A bereits methylierte DNA wieder demethylieren ließ: Ein Teil der methylierten DNA, dokumentiert durch die Signalstärke der 191 bp-Bande, wurde durch die Behandlung in die unmethylierte Form umgewandelt, was deutlich wird anhand der zunehmenden Intensität der Bande von 247 bp in Relation zum kleineren methylierungsspezifischen Produkt. Im Anschluss an diese Untersuchungen wurde eine Expressionsanalyse durch Reverse-Transkriptase PCR durchgeführt, um die umgekehrte Proportionalität der FHIT-Expression abhängig vom FHIT-Methylierungsstatus zu verdeutlichen und eine Re-Expression des FHIT-Gens zu bestätigen [110,125].

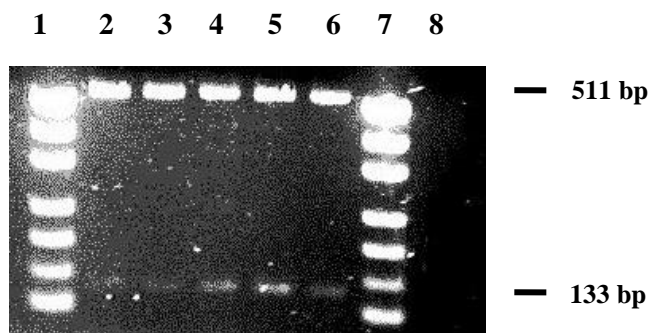


Abbildung 43: Reverse-Transkriptase (RT) PCR nach der Behandlung der Sebozyten mit 5-Azacytidin und Trichostatin A. Spuren 1 und 7: Marker M23; Spur 2: unbehandelte SZ95 P123; Spur 3: Kontrolle SZ95 P123; Spur 4: mit 5 µM Azacytidin behandelte SZ95 P123; Spur 5: mit 10 µM Azacytidin behandelte SZ95 P123; Spur 6: mit 10 µM Azacytidin und 300 nm TSA behandelte SZ95 P123; Spur 8: blank.

Abbildung 43 verdeutlicht die gelungene Re-Expression des FHIT-Gens durch die Behandlung mit 5-Azacytidin. Am stärksten scheint dieser Effekt bei der Behandlung der Zellen mit 10 µM Azacytidin zu sein. Im Rahmen der Betrachtung der Demethylierungs-Effekte der COBRA-Analysen (Abbildungen 41 und 42) scheint die Konzentration von 10 µM Azacytidin sowie in Kombination mit Trichostatin A vergleichsweise ähnliche Wirkungen zu erzielen.

## **4. DISKUSSION**

### **4.1 Genetische Veränderungen in menschlichen Zellen durch *in-vitro* Kultivierung**

Die *in-vitro* Kultivierung von Zellen stellt sowohl bei der Erforschung von zellbiologischen Grundlagen des Menschen als auch bei der Stammzellforschung im Rahmen der Regenerations- und Transplantationsmedizin die unverzichtbare Basis dar. Lange galten *in-vitro* kultivierte (Stamm-) Zellen als unerschöpfliche Quelle für Forschungsmaterial mit therapeutischem Potenzial, wobei angenommen wurde, dass sich hier ausnahmslos nahezu alle Aspekte auf die Situation *in-vivo* übertragen lassen. Mittlerweile gaben jedoch zahlreiche Studienergebnisse Anlass, den bedenkenlosen Umgang mit derartigen Zellen zu hinterfragen. Seit kurzer Zeit ist bekannt, dass pluripotente, unter *in-vitro* Bedingungen kultivierte Stammzellen Mutationen erwerben können, welche die Tumorgenese begünstigen. Es wurden Mutationen im Tumorsuppressor-Gen p53 entdeckt, welche mit laufender Passagierung unter standardisierten Kulturbedingungen innerhalb der Zellpopulation zunahmten [128]. Da TP53 die Regulation von apoptotischen Vorgängen vermittelt und somit entscheidend in den Zellzyklus eingreift, ist es möglich, dass derartige TP53-Mutationen zu einem selektiven Vorteil der so entstandenen Subklone führen. Mutationen, welche einen Selektionsvorteil mit sich bringen, sind die Hauptgründe für die Entstehung von Karzinomen. Dahingehende Genveränderungen können Zellen unter den streng selektiven Bedingungen, wie sie in der *in-vitro* Kultur zu finden sind, einen Wachstumsvorteil geben [22]. Der Großteil aller malignen Tumore ist klonalen Ursprungs, was bedeutet, dass der Tumor aus einer einzelnen Zelle hervorgegangen ist, welche durch die erworbene Mutation über einen Wachstums- und damit Selektionsvorteil verfügte [129]. Da das p53-Gen nicht nur dominant-negativ aktiviert werden kann, sondern für eines von zahlreichen Tumorsuppressor-Genen steht, ergibt sich hier die Frage, inwieweit auch andere tumorsupprimierende Gene unter länger andauernder *in-vitro* Kultur derartige Veränderungen erfahren? Das FHIT-Gen kodiert ebenfalls für ein Protein mit nachgewiesener Tumorsuppressor-Funktion. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass in der Sebozytenlinie SZ95 der Promotor-Bereich des FHIT-Gens unter standardisierten *in-vitro* Kulturbedingungen in Abhängigkeit von der Kulturdauer zunehmende epigenetische Veränderungen im Sinne von DNA-Hypermethylierungen erfuhr. Diese Veränderungen resultierten in einer Inaktivierung des FHIT-Gens, woraufhin sich als eine von mehreren möglichen Folgeerscheinungen das vermehrte Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen zeigte [39], (Kapitel 3.9). Bereits frühere Studien verdeutlichten, dass sich selbst standardisierte *in-vitro* Kulturbedingungen artifiziell auf menschliche Zellen auswirken und einen derartigen Selektions-Stress ausüben können, welcher die Entstehung von Mutationen und malignen Transformationen begünstigen kann [130].

#### **4.1.1 Diskussion von möglichen Noxen im Rahmen der *in-vitro* Kultivierung**

Trotz der standardisierten und optimierten Bedingungen einer *in-vitro* Kultur lassen sich nicht exakt dieselben Bedingungen schaffen, wie sie *in-vivo* vorzufinden sind. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien wurden unter definierten Bedingungen in einem Brutschrank kultiviert, wobei sehr auf die Konstanz der Temperatur (37°C), der Luftfeuchte bei wasserdampfgesättigter Atmosphäre sowie des CO<sub>2</sub>-Partialdrucks in der Luft geachtet wurde. Es wurden sämtliche Manipulationen, die mit einer Öffnung der Zellkulturbehälter einhergingen, nur unter Laminar-Flow Sterilsicherheitswerkbänken durchgeführt, um jegliche Kontaminationen der Zellkultur zu verhindern. Um eine Veränderung der Wachstumsbedingungen zu vermeiden, wurden die Zellen so kurz wie nötig für die Durchführung der Zellkulturarbeiten außerhalb des Brutschrankes belassen. Die Kultur der SZ95-Sebozytenlinie und der Fibroblasten erfolgte in speziell für diese Zelllinien geeigneten synthetischen Kulturmedien. Die Zusammensetzung des Mediums für die SZ95-Sebozytenlinie wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit Bezug auf die definierte Zusammensetzung nur geringfügig modifiziert [79,101] (Seite 12). Aufgrund der Metabolisierung des Kulturmediums war ein in regelmäßigen Zeitabständen durchgeführter Wechsel notwendig, da die darin enthaltenen Inhaltsstoffe verstoffwechselt wurden und weitere beigefügte Komponenten, wie der epidermale Wachstumsfaktor (EGF), bei einer Temperatur von 37° Celsius nur zeitlich begrenzt stabil sind. Es wurde strikt auf regelmäßige Abstände des Mediumwechsels geachtet, da es bei einem sehr geringen Nährstoffangebot oder einem stark sauren Milieu zu einem Selektionsdruck kommen kann, wobei hier Zellen begünstigt werden können, welche sich an die ungünstigen Kulturbedingungen besser angepasst haben. Zur Deckung des Energiebedarfs der proliferierenden Zellen wurde dem Medium L-Glutamin zugesetzt, welches unter *in-vitro* Kulturbedingungen zu Glutamat und Ammoniak zerfallen kann. Ammoniak, welches auch als Abbauprodukt des Zellstoffwechsels anfällt, kann als Zellgift wirken. Dem Wachstums- und Differenzierungsmedium für die SZ95-Sebozyten und für die Fibroblasten wurde anteilig 10% Fetales Kälberserum hinzugefügt. Das aus dem Blut von Rinderfeten gewonnene Serum durchläuft einen Gamma-Bestrahlungsprozess und wird anschließend sterilfiltriert, um jegliche Bakterien, Mykoplasmen oder Viren abzutöten. Jedoch kann eine dennoch bestehende Kontamination nicht mit vollständiger Sicherheit ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund, und um serumeigene Komplementfaktoren zu inaktivieren, wurde das Serum unmittelbar vor dem Einsatz in der Zellkultur für 30 Minuten bei 56°C inkubiert, um potenzielle Kontaminations- und Störfaktoren zu eliminieren. Generell wurden sämtliche Vorkehrungen im Rahmen der Zellkulturarbeiten getroffen, um den kultivierten Zellen bestmögliche und optimiert-standardisierte Kulturbedingungen zu schaffen. Beispielsweise wurden die neu in Kultur genommenen Zellen nach dem Auftauprozess zusätzlich einmal mit frischem Medium gewaschen, um eventuelle Restbestände des zytotoxisch wirksamen DMSO zu entfernen. Im

Zuge der Passagierungsvorgänge wurde Trypsin-EDTA-Lösung verwendet. Grundsätzlich ist darauf zu achten, dass die Zellen nur so lange wie notwendig in der Trypsin-EDTA-Lösung verbleiben, da längere Einwirkzeiten zu einer Schädigung der Zellen führen können [69]. Auch wurde auf einen vollständig ablaufenden Trypsinierungs-Prozess geachtet, da es sonst zu einer unerwünschten Selektion solcher Zellen hätte kommen können, welche sich leichter ablösen lassen. Das sich anschließende „Ablöschen“ mit FKS sowie die darauf folgenden Waschschrte mit PBS sind von entscheidender Bedeutung, um die Trypsin-Wirkung zu stoppen und eventuell noch vorhandene EDTA-Reste zu entfernen, da diese die erneute Anheftung der Zellen verlangsamen sowie den Calcium-Haushalt der *in-vitro* kultivierten Zellen stören können. Um die SZ95-Sebozytenlinie von der Oberfläche der Zellkulturgefäße vollständig abzulösen (*Dissoziation*), bedurfte es einer für adhärenente Zellkulturen untypisch langen Inkubationsdauer (Expositionszeit), welche sich über 18 bis 20 Minuten erstreckte. Als möglichen Grund hierfür könnten die ausgeprägten Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte der Sebozyten in Betracht gezogen werden (Abbildungen 16 und 17). Während des Trypsinierungs-Vorganges standen die SZ95-Sebozyten untereinander über brückenartige Verbindungen in Kontakt, obwohl sie sich bereits in kugelähnlicher Form von der Oberfläche des Kulturgefäßes abgelöst hatten (Abbildung 22). Ob die in der vorliegenden Arbeit für adhärenente Zellkulturen eher untypisch lange Expositionszeit gegenüber Trypsin-EDTA eine entscheidende Rolle spielt und weitreichende, Zellstress-hervorrufende Folgen gehabt haben könnte, ist ungewiss. Inwieweit die den üblichen Laborstandards entsprechenden *in-vitro* Kulturbedingungen epigenetische Veränderungen am FHIT-Gen verursachen können, sollte näher untersucht werden. Es sei anzumerken, dass sich die transfizierten SZ95-Zellen von primären Sebozyten ableiten, welche von einer 87-jährigen Patientin isoliert wurden [79,81]. Es ist unklar, ob jene Zellen bereits vor der Immortalisierung mit dem LT-Ag mögliche Erbgut - verändernden Ereignisse erfahren haben.

#### **4.1.2 Noxen, welche *in-vivo* eine Hypermethylierung von FHIT hervorrufen können**

Veränderungen des FHIT-Gens können durch die Exposition gegenüber zahlreichen Umweltkarzinogenen induziert werden [2]. An dieser Stelle sollen einige diskutiert werden. Besonders sensibel reagiert die FHIT-Genregion auf Umweltkarzinogene wie Zigarettenrauch, Asbest, UV-Licht und onkogene Viren [46,57,58,131-133]. Das Ausmaß von Tabakkonsum korreliert mit einer Methylierung des FHIT-Gens [125]. Veränderungen des FHIT-Gens waren bei Lungentumoren von Rauchern nahezu doppelt so häufig wie von Nichtrauchern [52]. Bei der Untersuchung der FRA3B-Region innerhalb des FHIT-Gens fand sich eine deutlich erhöhte Fragilität der Region bei aktiven Rauchern, im Gegensatz zu Nichtrauchern oder ehemaligen Rauchern. Dieses Phänomen zeigt, dass eine Exposition gegenüber denen im Tabakrauch

enthaltenen Karzinogenen die genomische Instabilität dieser Region erhöhen kann, zugleich aber zeitlich begrenzt und potenziell reversibel ist [134]. Nikotinkonsum stellt nicht nur einen Risikofaktor für Lungen-, sondern ebenfalls für Zervixkarzinome dar. Es wurde ein signifikanter Verlust der FHIT-Expression bei Tabakrauch-assoziierten Zervixkarzinomen im Vergleich zu diesen bei Nichtraucherinnen gefunden [135]. In einer immortalisierten menschlichen Bronchialepithelzelllinie konnte durch die Behandlung mit karzinogen wirkendem Nickel-Sulfat ein Verlust der FHIT-Genexpression gezeigt werden [136]. Veränderungen des FHIT-Gens konnten in, durch das Karzinogen N-Nitrosobisamine-induzierten, Adenokarzinomen der Lunge im Tiermodell festgestellt werden [137]. Die Infektion von onkogenen Viren wie Humanen-Papillom-Viren oder dem Epstein-Barr-Virus führten zu einem FHIT-Verlust in menschlichen Karzinomen [37,138]. Es ist bekannt, dass die Exposition gegenüber UV-Licht zu einer FHIT-Defizienz führen kann [46]. Eine zunehmende Promotor-Hypermethylierung des FHIT-Gens, korrelierend mit einer erniedrigten FHIT-Expressionsrate, konnte bei ehemaligen Tschernobyl-Arbeitern festgestellt werden, welche ionisierender radioaktiver Strahlung ausgesetzt waren, wobei sich hier zudem eine Veränderung von MLH1 mit daraus resultierender Mikrosatelliten-Instabilität zeigte (Kapitel 4.5) [139].

#### **4.2 Welche Rolle spielt die Immortalisierung der Zellen durch das LT-Antigen?**

Die replikative Seneszenz ist eine wichtige zellbiologische Barriere mit tumorsupprimierender Funktion, welche dem Proliferationspotenzial von normalen Zellen eine Grenze setzt und im Rahmen der malignen Transformation, beziehungsweise der Immortalisierung, aktiv umgangen werden muss [73]. Die Immortalisierung von menschlichen Zellen ermöglicht die längerfristige *in-vitro* Kultivierung der im Zuge dieses Prozesses entstandenen Zelllinien und bildet damit die Basis für viele Fragestellungen der Zellforschung. Trotzdem sollte dieser Aspekt kritisch betrachtet werden, da das onkogene Potential des zur Immortalisierung genutzten Simian Virus 40 gravierende Veränderungen in der Zelle verursachen kann. Das Simian Virus 40 gehört zur Gattung der Polyomaviren (DNA-Tumoviren), welche seit langem als mögliche Karzinogene diskutiert werden [88,89]. SV 40 steht stark im Verdacht, durch neoplastische Veränderungen in vielen menschlichen Tumorarten eine kausale Rolle zu spielen und maligne Transformationen zu begünstigen [4,91,93-96]. Diese Vermutung ist vor allem darauf zurück zu führen, dass das Large T-Antigen mit den regulatorisch wirkenden Effektormolekülen der Tumorsuppressor-Gene p53 und des Retinoblastom-Gens physisch interagiert und diese dadurch inaktiviert, wodurch zelluläre Seneszenz- und Apoptose-Vorgänge blockiert werden können [97,140-142]. Durch diese Interaktionen gelingt es den Zellen, die replikative Seneszenz zu umgehen [143,144,145]. Für die Etablierung immortalisierter Zelllinien scheint die Inaktivierung von solchen tumorsupprimierend-wirkenden oder für die terminale Zelldifferenzierung wichtigen

Genen von entscheidender Bedeutung zu sein [146]. Zusätzlich zu einer gesteigerten Wachstums- und Teilungsrate ist das Auftreten von morphologischen Veränderungen in SV 40 transformierten Zellen möglich [97,98]. Es ist bekannt, dass die Transfektion einer Zelle mit dem Large T-Antigen auch mit einer Hypermethylierung der Promotor-Regionen von (Tumorsuppressor-) Genen einhergehen kann [8,99,100]. Bereits vor einiger Zeit wurde eine sporadisch auftretende Methylierung von CpG-Inseln in immortalisierten Zellen entdeckt. Im Rahmen der *in-vitro* Kultivierung kam es zu einer Ausweitung der Hypermethylierung innerhalb der CpG-Inseln, was in einem zunehmenden *Silencing* des betroffenen Gens resultierte [22,30,109,147,148]. Zusammenhängend mit der Umgehung der replikativen Seneszenz-Barriere kam es in der *in-vitro* Kultur mit steigender Passagezahl zu einer Zunahme der Methylierung der CpGs im Promotorbereich, was mit einer ansteigenden Aktivität der DNA-Methyltransferasen oder dem Verlust der DNA-Demethylase-Aktivität begründet wurde. Es sei hier am Rande erwähnt, dass DNA-Demethylasen in Karzinomen häufig in mutierter und somit inaktiver Form vorliegen [22,73,148,149-152]. Es wurde herausgefunden, dass SV40-immortalisierte, *in-vitro* kultivierte Zellderivate, im Gegensatz zu den primären, normalen Zellen, eine *de novo* Methylierung von normalerweise unmethylierten CpG-Dinukleotiden innerhalb von CpG-Inseln sowie eine erhöhte Expression und somit auch gesteigerte Aktivität von DNA-Methyltransferasen zeigten: Beides sind Merkmale, welche an die Eigenschaften von Tumorzellen erinnern und im Rahmen der onkogenen Transformationen eine entscheidende Rolle spielen [30,149]. Beschrieben wurde auch, dass in primären, nicht immortalisierten Zellen infolge von Alterungsprozessen die Enzymaktivität von DNA-Methyltransferasen soweit abnahm, bis das DNA-Methylierungslevel einen kritischen Wert unterschritt und daraufhin Vorgänge der replikativen Seneszenz eingeleitet wurden [30,153]. Im Gegensatz dazu wurde bei SV40-transfizierten Zellen, welche die replikative Seneszenz umgangen haben, das Niveau der Methyltransferasen-Enzymaktivität konstant hoch gehalten, was als Grund für die *de novo* Methylierung im Rahmen der *in-vitro* Kultur angesehen werden kann [30]. Derartige Genveränderungen können Zellen unter den streng selektiven Bedingungen, wie sie in der *in-vitro* Kultur zu finden sind, einen Wachstumsvorteil verschaffen [22]. Generell zeigte sich im Rahmen von langfristigen *in-vitro* Kultivierungsprozessen ein Anstieg der Methylierung von CpG-Inseln, welcher mit einer, in Abhängigkeit von der Dauer der *in-vitro* Kultur, zunehmenden Divergenz vom ursprünglichen *in-vivo* Methylierungsmuster einherging [68,150,151]. Es wurde ein konstantes oder sogar ansteigendes Aktivitätsmuster von DNA-Methyltransferasen beobachtet, wobei diese Eigenschaft maßgeblich in Zusammenhang mit maligne transformiertem Gewebe gebracht wird [12,22,30,109].

### **4.3 Das FHIT-Gen als Ziel von zellspezifischen und epigenetischen Veränderungen**

Das FHIT-Gen spielt als Tumorsuppressor-Gen eine wichtige Rolle. Es scheint zwar ubiquitär exprimiert zu werden, jedoch imponiert es als Gen mit Tumorsuppressor-Funktion vor allem in Organen basierend auf epithelialen Zellstrukturen [37]. Es zeigt sich in vielen Tumorarten verändert und erfährt bereits in sehr frühen Stadien der neoplastischen Transformation strukturelle Veränderungen [51]. Ein Verlust des FHIT-Gens ist assoziiert mit der Progression von Karzinomen verschiedenster Organe [47]. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Vergleichsanalysen zwischen der mit dem LT-Ag immortalisierten Sebozytenlinie SZ95 sowie der primären, als auch mit dem LT-Ag transfizierten Fibroblastenzelllinie ergaben, dass, soweit aus den Analysen ersichtlich, nur die SZ95-Sebozyten epigenetische Veränderungen am Promotorbereich des FHIT-Gens aufwiesen. Die primäre und die transfizierte Fibroblastenzelllinie zeigten, bei relativ niedrigen Passagezahlen im Vergleich zu den hohen Passagezahlen der SZ95-Zellen, keinerlei epigenetische Veränderungen im Sinne eines aberranten Methylierungsmusters im Bereich des FHIT-Promotors. Um jedoch einen exakten Vergleich zwischen der Sebozyten- und den beiden Fibroblastenzelllinien vornehmen zu können, wären Zellen gleicher Kulturdauer notwendig. Da es sich bei der Zelllinie NHDF um primäre Fibroblastenzellen handelt und sich die transfizierten Zellerivate NHDF pFUW LT-Ag nicht vollständig immortalisieren ließen [86], war es nicht möglich, im Rahmen der *in-vitro* Kultur eine vergleichsweise hohe Passagezahl, wie die der SZ95-Sebozyten, zu erreichen. Trotz dessen kann vermutet werden, dass Sebozyten im Hinblick auf Veränderungen des FHIT-Gens sensibel reagieren und derartige Veränderungen als zellspezifisch zu betrachten sind. In Studien wurde gezeigt, dass FHIT-defiziente Knock-Out Mäuse prädisponiert für die Entwicklung von Tumoren epithelialen Ursprungs sind, wobei hier besonders FHIT-negative Talgdrüsenkarzinome präferenziell in periokulären Arealen imponierten und unter der Behandlung mit dem DNA-Methylierungs-induzierenden Karzinogen N-Nitromethylbenzylamine neben diversen Hauttumoren zusätzlich viszerale Tumore entwickelten [2,154,155,156]. An dieser Stelle sei der Verweis bei einer Koexistenz von Talgdrüsenkarzinomen und viszeralen Tumoren auf das Erscheinungsbild des Muir-Torre-Syndroms gegeben und bezüglich der möglichen genetischen Entstehungswege von Talgdrüsenkarzinomen sei an dieser Stelle auf das Kapitel 4.5 verwiesen. Zudem zeigten sich Veränderungen am FHIT-Gen als die häufigsten und am frühesten auftretenden Ereignisse im Rahmen der Lungenkarzinogenese [125]. Vorausgegangene Studien hatten einen Verlust der FHIT-Genexpression einer immortalisierten Bronchialepithelzelllinie zeigen können, welche mit karzinogen wirkendem Nickel-Sulfat behandelt worden war [136]. Zukünftige Studien sollten prüfen, ob *in-vitro* Kulturen von immortalisierten Lungenzelllinien ebenfalls zu epigenetischen Veränderungen im Sinne von Hypermethylierungen am Promotorbereich des FHIT-Gens führen.



#### **4.4 Bedeutung der Hypermethylierung der Region 2 (Intron 1) des FHIT-Gens**

Um die Methylierungsanalyse zu vereinfachen, wurde die untersuchte Region des FHIT-Gens nach entsprechenden Literaturangaben in zwei Regionen unterteilt [36]. Die Methylierungsanalysen der Sebozytenlinie SZ95 ergaben eine, im Vergleich zur Region 1, deutliche Hypermethylierung der Region 2 des FHIT-Gens (Kapitel 3.7.4). So zeigten Sebozyten der frühen Passagezahl P32 zahlreiche CpG-Methylierungen in der Region 2, während sich die Region 1, abgesehen von einer Ausnahme (1/19 Klonen), als unmethyliert darstellte. Eine Hypermethylierung von Region 2 wurde ebenfalls von Tanaka et al. (1998) bei ösophagealen Plattenepithelkarzinomen (ESC), sowie von Cantor et al. (2006) bei diversen Karzinomarten und karzinomatösen Zelllinien festgestellt, wobei zum Großteil methylierte CpGs nur in Region 2 zu finden waren. Ausnahmen bildeten im Rahmen dieser Analysen jeweils nur Zelllinien von primären ESCs sowie eine nicht-kleinzellige Lungenkarzinom-Zelllinie, welche sich sowohl in Region 1 als auch Region 2 als methyliert darstellten [36,51]. Zusammenfassend traten in bisherigen Studien mehr CpG-Methylierungen in Region 2 als in Region 1 auf. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Methylierungsanalysen der Regionen 1 und 2 ergaben, dass SZ95-Sebozyten der hohen Passage (P67) sowohl in Region 1 als auch in Region 2 CpG-Methylierungen aufwiesen (Kapitel 3.7.4). Die Region 2 stellt sich als Anfang des Intron 1 dar (Seite 75). In dieser Abbildung sind ebenfalls mögliche Sp1-Interaktionsstellen (GC-Boxen) gekennzeichnet [36]. Sp1-bindende Elemente, welche in CpG-Inseln der DNA-Sequenz zu finden sind, werden in Zusammenhang mit Schutzmechanismen diskutiert, welche die DNA-Sequenz vor einer *de novo* Methylierung bewahren sollen [36,59]. An diesen Bereichen wurde vor allem in der hohen Passage der Sebozyten SZ95 ein aberrantes Methylierungsmuster festgestellt (Seite 78). Welche Rolle die Hypermethylierung der Region 2 des FHIT-Gens spielt, sollte in weiterführenden Studien näher untersucht werden.

#### **4.5 Hypothese zur Entstehung von Talgdrüsenkarzinomen (TDK)**

Seit längerem ist bekannt, dass Talgdrüsenkarzinome auf unterschiedlichen genetischen Wegen entstehen können. Zum einen kann der Verlust der Gen-Aktivität des FHIT-Gens zu der Entstehung von Talgdrüsenkarzinomen führen. Dieser Aktivitätsverlust kann durch eine strukturelle Aberration des FHIT-Gens, beispielsweise durch eine Deletion von Genbereichen oder durch eine aberrante Hypermethylierung des Promotorbereiches des Gens (*epigenetic silencing*) hervorgerufen werden [102]. Zum anderen kann es aber auch durch Beeinträchtigung des DNA-Mismatch-Repair-Systems, korrelierend mit einer sinkenden Expression der Mismatch-Repair-Gene MLH1 und MSH2, zu einer steigenden genomischen Mutationsbelastung kommen. Hierbei werden häufig Neoplasien menschlicher Sebozyten beobachtet, welche teilweise zusammen mit viszeralen Tumoren im Rahmen des klinischen Erscheinungsbildes des Muir-Torre-Syndroms auftreten [67,157-159]. Ein defizientes MMR-System ist durch eine hochgradige postreplikative Mikrosatelliten-Instabilität gekennzeichnet, da replikative Synthesefehler der DNA-Polymerase nicht korrigiert werden [3,160-162]. Als Mikrosatelliten (*short tandem repeats*) werden kurze, repetitive DNA-Sequenzen bezeichnet, welche meist aus 2-6 Nukleotiden bestehen und sowohl intra- als auch intergenisch vorkommen [163]. Innerhalb der letzten Jahre kam Mikrosatelliten-Sequenzen eine wichtige Rolle als vielfältig einsetzbare genetische Marker zu. Infolge eines Ausfalls von Mismatch-Repair-Genen kann es zu einem deutlichen Instabilitäts-Anstieg dieser im Genom verteilten Repeat-Sequenzen kommen [163], wodurch betroffene Gene auch inaktiviert werden können. Neben diesen Veränderungen in Mikrosatelliten-instabilen Talgdrüsenkarzinomen konnten ähnliche Aspekte in weiteren Tumoren identifiziert werden. Kürzliche Studien zeigten, dass epigenetische Veränderungen des MLH1-Gens eine entscheidende Rolle bei sporadisch auftretenden viszeralen Karzinomen spielen: Aufgrund von einer Hypermethylierung des Promotorbereiches kam es zu einem *Silencing* des MLH1-Gens, was zu einer Mikrosatelliten-Instabilität führte und einen hypermethylierten Phänotyp in Karzinomen begünstigen konnte [164-166]. In Anbetracht dessen stellt sich die Frage, inwieweit Veränderungen im Methylierungsmuster des MLH1-Gens bei den SZ95-Sebozyten auftreten können. Da Talgdrüsenkarzinome sowohl infolge eines Mikrosatelliten-Instabilität-verursachenden, defizienten MMR-Systems, welches auf einer MLH1-Methylierung basieren kann, als auch in Folge einer FHIT-Defizienz mit Mikrosatellitenstabilität entstehen können [63,155,161], wäre eine Kombination aus beiden Entstehungswegen denkbar. Ob diese Kombination eventuell sogar die Aggressivität eines solchen Talgdrüsenkarzinoms erhöhen könnte, sollte im Hinblick auf klinische Aspekte untersucht werden. Eine sehr kürzlich veröffentlichte Studie in einem transgenen Mausmodell zeigte einen weiteren Weg bei der Entstehung von Talgdrüsenkarzinomen auf: In Zellen mit Veränderungen des Gens Lef1 kam es zu der Entwicklung von Hauttumoren, wobei hier vor allem periokuläre Talgdrüsenkarzinome im Vordergrund standen [67,77]. Es wurde

herausgefunden, dass der Transkriptionsfaktor Gata 6 eine entscheidende Rolle bei der Talgdrüsen-Entwicklung sowie bei der Karzinogenese spielt: Er agiert durch seine Verbindung mit dem MMR-System möglicherweise als Tumorsuppressor. Gata 6-mutierte Tumoren zeigten eine verringerte Expression der MMR-Gene, was darauf hindeutet, dass Gata 6 in direktem Zusammenhang mit der Expression der MMR-Gene steht. Die Gata 6-Expression könnte als Marker für die diagnostische Einstufung von Sebozytentumoren dienen und die Verbindung zwischen Gata 6 und dem MMR-System könnte neue Therapie-Optionen aufzeigen [67].

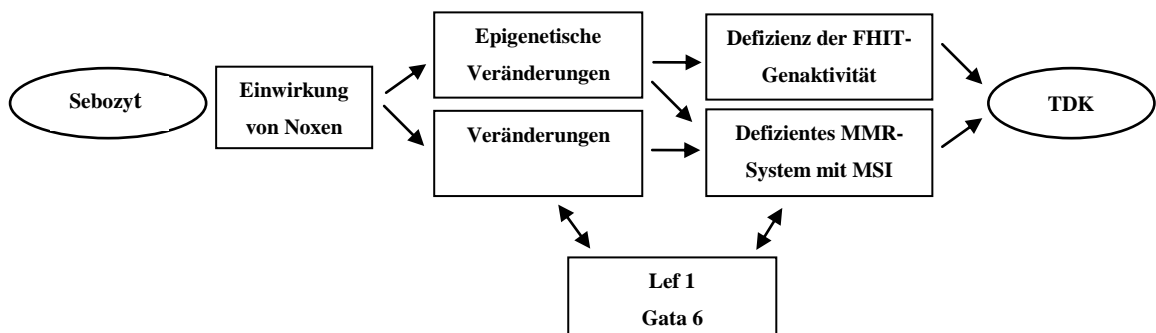


Abbildung 44: Mögliche Entstehungswege von Talgdrüsenkarzinomen (TDK).  
Mismatch-Repair-System (MMR); Mikrosatelliten-Instabilität (MSI).

#### **4.6 Therapeutische Ansätze**

Epigenetische Veränderungen, welche an Prozessen der Karzinogenese beteiligt sind, zeigen sich im Gegensatz zu mutationsbedingten Veränderungen der Nukleotidsequenz als potenziell reversibel [51]. In unabhängigen Studien konnte gezeigt werden, dass sich im Laufe der andauernden *in-vitro* Zellkultur das DNA-Methylierungsmuster von (Tumorsuppressor-) Genen, im Sinne von sich ausweitenden Hypermethylierungen der CpG-Dinukleotide, verändert und es infolgedessen zu gravierenden Folgen auf molekulargenetischer Ebene kommen kann [150,151]. Als Grund hierfür wird eine Hochregulation von DNA-Methyltransferasen sowie einer Herunterregulierung von DNA-Demethylasen angesehen [152]. Ein therapeutischer Ansatz stellt die Inhibierung der Aktivität von DNA-Methyltransferasen dar [167,168]. Bereits seit langer Zeit ist bekannt, dass das demethylierend wirkende Agens 5-Azacytidin die Methylierung von 5'-Cytosin inhibiert, indem die DNA-Methyltransferasen gehemmt werden und sich so nach dem Zufallsprinzip methylierte Cytosine wieder demethylieren lassen [10,146,153,164]. Bei Trichostatin A handelt es sich um einen Histon-Deacetylase-Inhibitor, welcher durch seine zytostatischen Eigenschaften den Zellzyklus arretieren und in (karzinogen entarteten) Zellen Vorgänge der Apoptose einleiten kann, womit Trichostatin A ein

therapeutisches Potential besitzt und sich somit als innovativer Aspekt der heutigen Forschung in der Karzinomtherapie darstellt [13,169-171]. Im Rahmen zahlreicher Analysen ließ sich durch die Behandlung von *in-vitro* kultivierten Zellen mit Azacytidin, zum Teil in Kombination mit Trichostatin A, eine Demethylierung sowie eine damit korrelierende Re-Expression des FHIT-Gens realisieren [51,110,125], was in der vorliegenden Arbeit ebenfalls experimentell bestätigt werden konnte. In wie weit die Kombination mit Trichostatin A einen potenzierenden Effekt beinhaltet, ist unklar. Bisher konnte ein vermehrter Zell-Untergang bei der Anwendung dieser beiden Agenzien im Vergleich zur alleinigen Anwendung von Azacytidin beobachtet werden, während die Anwendung von TSA allein keinen Einfluss auf die Veränderung des Methylierungsmusters oder die Gen-Expression hatte [51]. Im Rahmen der Versuchsreihen in der vorliegenden Arbeit ließen sich keine gravierenden Veränderungen hinsichtlich der Demethylierung und der Re-Expression bei der Kombination von Azacytidin und TSA, im Vergleich zur alleinigen Azacytidin-Anwendung, nachweisen (Abbildungen 41-43). Studien zeigten, dass ein Stopp der *in-vitro* Behandlung von karzinomatös entarteten Zellen mit Azacytidin zu einer Remethylierung des Intron 1 und zu einer erneuten Abnahme der FHIT-mRNA-Expression führte [51], wodurch nach derzeitigem Kenntnisstand das therapeutische Potential von 5-Azacytidin nur als temporär-wirkend eingestuft werden kann. Bei Pyrrol-Imidazol-Polyamiden handelt es sich um DNA-bindende Agenzien, welche als Sequenz-spezifische Antagonisten von CpG-Methylasen fungieren und somit die DNA-Methylierung beispielsweise der MLH1-Promotorregion inhibieren können [164]. Es bleibt zu überlegen, die Wirkung dieser Substanz im Hinblick auf einen demethylierenden Effekt am Promotor des FHIT-Gens zu untersuchen, eventuell könnte zusätzlich eine Kombinationsbehandlung der *in-vitro* kultivierten Zellen mit 5-Azacytidin sowie mit Trichostatin A erwogen werden, um eine *de novo* Methylierung der DNA auf mehreren Ebenen blockieren sowie gleichzeitig die Sensitivität gegenüber Apoptose-Signalen erhöhen zu können. Im Rahmen der Behandlung von Hauttumoren und weiteren Tumoren epithelialen Ursprungs kommen Retinoide zum Einsatz, welche die Zellproliferation inhibieren sowie terminale Differenzierungsvorgänge induzieren und zudem auch als präventive Agenzien bei Tumoren der Haut wirken können [156,172]. Es wurde bewiesen, dass Retinoide inhibitorisch auf die Zellproliferation und die Lipidsynthese von menschlichen, *in-vitro* kultivierten Sebozyten wirken und zudem die Sebozyten-Differenzierung durch Modulation der Keratin-Expression beeinflussen können [78]. Eine weitere Studie zeigte, dass die Hauttumoren-Belastung von FHIT-defizienten Mäusen durch Zink-Supplement signifikant verringert und vorhandene DNA-Schäden reduziert werden konnten, da es bekannt ist, dass Zink-Mangel die Zellproliferation von Epithelzellen begünstigen kann [154]. Um die präventiven und therapeutischen Effekte von Retinoiden und Zink-Supplementation zu untersuchen, sollte eine derartige Behandlung von FHIT-defizienten Zelllinien unter *in-vitro* Kulturbedingungen durchgeführt werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Fragile Histidin Trias-Gen (FHIT-Gen) kodiert für ein Protein mit Tumorsuppressor-Funktion und zeigt sich sehr häufig in Karzinomzellen verändert, wobei hier bereits in prämaligen Neoplasie-Stadien strukturelle Aberrationen zu finden sind. Seit längerer Zeit ist bekannt, dass, im Rahmen von Alterungsprozessen zunehmende, epigenetische Veränderungen im Sinne von Hypermethylierungen am Promotorbereich von Tumorsuppressor-Genen mit einem Verlust der Genexpression einhergehen (*epigenetic silencing*). Dieses Phänomen konnte sowohl bei Zellen *in-vivo* als auch bei *in-vitro* kultivierten Zelllinien beobachtet werden. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, bei der immortalisierten Sebozytenlinie SZ95 auf molekulargenetischer Ebene methylierte CpG-Inseln am 5'-Ende des FHIT-Gens zu identifizieren, als Konsequenz die Abnahme der FHIT-Genexpression und als Folge davon die Zunahme von DNA-Doppelstrangbrüchen darzustellen. In jeweiliger Abhängigkeit von der *in-vitro* Kulturdauer wurden an den SZ95-Zellen Methylierungsanalysen sowie eine Sequenzierung der Promotorregion des FHIT-Gens vorgenommen. Zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen erfolgte eine Gamma-H2A.X-Immunfluoreszenzfärbung. Als experimentell therapeutischer Ansatz wurde die Sebozytenlinie SZ95 bei hoher Passagezahl mit dem demethylierend wirkenden Agens 5-Azacytidin sowie mit Trichostatin A behandelt und mit entsprechenden Methylierungs- und Expressionsanalysen kombiniert. Die Studie zeigte, dass mit steigender Passagezahl eine zunehmende Methylierung der CpG-Dinukleotide innerhalb der Promotorregion ersichtlich war, folglich nahm die FHIT-Genexpression ab. Es kam zu einer damit korrelierenden Anhäufung von DNA-Doppelstrangbrüchen, welche sich als Reparaturfoci anhand von Gamma-H2A.X-spezifisierter Immunfluoreszenz visualisieren ließen. Durch die Behandlung mit 5-Azacytidin und Trichostatin A konnte eine Abnahme der Methylierung der FHIT-Promotorregion sowie eine Re-Expression von FHIT Transkripten beobachtet werden. Die vorliegende Arbeit sieht sich als Beitrag zur Aufklärung von unter *in-vitro* Kulturbedingungen auftretenden, epigenetischen Veränderungen an Tumorsuppressor-Genen von immortalisierten Zelllinien. Hieraus lassen sich Parallelschlüsse zu karzinogen entarteten Zellen *in-vivo* ziehen. Da sich das FHIT-Gen in einem Großteil von Talgdrüsenkarzinomen verändert zeigt, könnten FHIT-defiziente SZ95-Sebozyten als brauchbares Modell für die Erforschung von individualisierten Therapieansätzen dienen.

## LITERATURVERZEICHNIS

1. Knudson, AG (2002). Cancer genetics. *Am. J. Med. Genet.* **111(1)**: 96-102.
2. Pichiorri F, Palumbo T, Suh S, Okamura H, Trapasso F, Ishii H, Osaka S, Huebner K, Croce C (2008). Fhit tumor suppressor: guardian of the preneoplastic genome. *Future Oncol.* **4(6)**: 815-824.
3. Becker K, Goldberg M, Helmbold P, Holbach LM, Loeffler KU, Ballhausen WB (2008). Deletions of BRCA 1/ 2 and p53 R248W gain- of- function mutation suggest impaired homologous recombination repair in fragile histidine triad- negative sebaceous gland carcinoma. *Br. J. Dermatol.* **159**: 1282-1289.
4. Fusenig NE, Breitkreutz D, Boukamp P, Tomakidi P, Stark HJ (1995). Differentiation and tumor progression. *Rec. Res. Cancer Res.* **139**:1-19.
5. Levine AJ (1997). P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* **88**: 323-331.
6. Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ (1989). The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell* **57(7)**: 1083-1093.
7. Lane DP (1992). Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* **358**: 15-60.
8. Toyooka S, Pass HI, Shivapurkar N, Fukuyama Y, Maruyama R, Toyooka KO, Gilcrease M, Farinas A, Minna JD, Gazdar AF (2001). Aberrant Methylation and Simian Virus 40 Tag Sequences in Malignant Mesothelioma. *Cancer Res.* **61**: 5727-5730.
9. Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP (2011). A Continuum Model for Tumour Suppression. *Nature* **476 (7359)**: 163-169.
10. Scharl M, Gessler M, von Eckardstein A (2009). Biochemie und Molekularbiologie des Menschen. Elsevier Urban & Fischer Verlag, München. Seite 434-435.
11. Laird PW (2005). Cancer epigenetics. *Hum. Mol. Genet.* **14**: 65-76.
12. Baylin SB, Makos M, Wu JJ, Yen RW, de Bustros A, Vertino P, Nelkin BD (1991). Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potential consequences for tumor progression. *Cancer Cells* **3(10)**: 383-390.
13. Shankar S, Srivastava RK (2008). Histone deacetylase inhibitors: mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Adv. Exp. Med. Biol.* **615**: 261-298.
14. Jaenisch R, Bird A (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat. Genet.* **33 Suppl**: 245-254.
15. Li E, Beard C, Jaenisch R (1993). Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature* **366**: 362-365.
16. Debrand E, Heard E, Avner P (1998). Cloning and localization of the murine Xpct gene: evidence for complex rearrangements during the evolution of the region around the Xist gene. *Genomics* **3**: 296-303.
17. Bestor TH (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* **9**: 2395-2402.
18. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**: 247-257.
19. Jones PA (2012). Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat. Rev. Genet.* **7**: 484-492.

20. Jeltsch A (2002). Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *Chembiochem.* **3**: 274-293.
21. Plass C (2002). Cancer epigenomics. *Hum. Mol. Genet.* **20**: 2479-2488.
22. Jones PA, Wolkowicz MJ, Rideout WM, Gonzales FA, Marziasz CM, Coetzee GA, Tapscott SJ (1990). De novo methylation of the MyoDi CpG island during the establishment of immortal cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 6117-6121.
23. Bestor TH, Ingram VM (1983). Two DNA methyltransferases from murine erythroleukemia cells: purification, sequence specificity, and mode of interaction with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80(18)**: 5559-5563.
24. Gardiner-Garden M, Frommer M (1987). CpG islands in vertebrate genomes. *J. Mol. Biol.* **196(2)**: 261-282.
25. Singal R, Ginder GD (1999). DNA methylation. *Blood* **93**: 4059-4070.
26. Licchesi JD, Herman JG (2009). Methylation-specific PCR. *Methods Mol. Biol.* **507**: 305-323.
27. Jeziorska DM, Murray RJS, De Gobbi M, Gaentzsch R, Garrick D, Ayyub H, Chen T, Li E, Telenius J, Lynch M, Graham B, Smith AJH, Lund JN, Hughes JR, Higgs DR, Tufarelli C (2017). DNA methylation of intragenic CpG islands depends on their transcriptional activity during differentiation and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **10**: 7526-7535.
28. Ballestar E, Wolffe AP (2001). Methyl- CpG- binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur. J. Biochem.* **268**: 1-6.
29. Wolffe AP, Jones PI, Wade Pa (1999). DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5894-5896.
30. Vertino PM, Issa JP, Pereira-Smith OM, Baylin SB (1994). Stabilization of DNA methyltransferase levels and CpG island hypermethylation precede SV40-induced immortalization of human fibroblasts. *Cell Growth Different.* **5(12)**: 1395-1402.
31. Herman JG, Baylin SB (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* **21**: 2042-2054.
32. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachmann KE, Schuebel K, Hermann JG (2001). Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum. Mol. Genet.* **10**: 687-692.
33. Lahtz C (2010). Ursprünge epigenetischer Veränderungen in tumorartigen neuroendokrinen Zellen. Gießen, Univ., Fak. Der Naturw., Diss, 150 Seiten, 2010.
34. Warnecke PM, Bestor TH (2000). Cytosine methylation and human cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **12**: 68-73
35. Esteller M (2005). Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. *J. Pathol.* **205**: 172-180.
36. Tanaka H, Shimada Y, Harada H, Shinoda M, Hatooka S, Imamura I, Ishizaki K (1998). Methylation of the 5' CpG Island of the FHIT Gene Is Closely Associated with Transcriptional Inactivation in Esophageal Squamous Cell Carcinomas. *Cancer Res.* **58**: 3429-3434.

37. Ohta M, Inoue H, Cotticelli MG, Kastury K, Baffa R, Palazzo J, Saprashvili Z, Mori M, McCue P, Druck T, Croce CM, Huebner K (1996). The FHIT gene, spanning the chromosome 3p14.2 fragile site and renal carcinoma-associated t(3;8) breakpoint, is abnormal in digestive tract cancers. *Cell* **84**: 587-597.
38. Sozzi G, Veronese ML, Negrini M, Baffa R, Cotticelli MG, Inoue H, Tornielli S, Pilotti S, De Gregorio L, Pastorino U, Pierotti MA, Ohta M, Huebner K, Croce CM (1996). The FHIT gene 3p14.2 is abnormal in lung cancer. *Cell* **85**: 17-26.
39. Waters CE, Saldivar JC, Hosseini SA, Huebner K (2014). The FHIT gene product: tumor suppressor and genome “caretaker”. *Cell Mol. Life Sci.* **71**: 4577-4587.
40. Barnes LD, Garrison PN, Saprashvili Z, Guranowski A, Robinson AK, Ingram SW, Croce CM, Ohta M, Huebner K (1996). Fhit, a putative tumor suppressor in humans, is a dinucleoside 5'-P1, P3- triphosphate hydrolase. *Biochem.* **35**: 11529-11535.
41. Lima CD, D'Amico KL, Naday I, Rosenbaum G, Westbrook EM, Hendrickson WA (1997). MAD analysis of FHIT, a putative human tumor suppressor from the HIT protein family. *Struct.* **5**: 763-774.
42. Chaudhuri AR, Khan IA, Prasad V, Robinson AK, Luduena RF, Barnes LD (1999). The tumor suppressor protein Fhit. A novel interaction with tubulin. *J. Biol. Chem.* **274**: 24378-24382.
43. Shi Y, Zou M, Farid NR, Paterson MC (2000). Association of FHIT (fragile histidine triad), a candidate tumor suppressor gene, with the ubiquitin-conjugating enzyme hUBC9. *Biochem. J.* **2**: 443-448.
44. Pekarsky Y, Garrison PN, Palamarchuk A, Zanesi N, Ageilan RI, Huebner K, Barnes LD, Croce CM (2004). Fhit is a physiological target of the protein kinase Src. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 3775-3779.
45. Sard L, Accornero P, Tornielli S, Delia D, Bunone G, Campiglio M, Colombo MP, Gramegna M, Croce CM, Pierotti MA, Sozzi G (1999). The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 8489-8492.
46. Goldberg M, Rummelt C, Laerm A, Helmbold P, Holbach LM, Ballhausen WG (2006). Epigenetic silencing contributes to frequent loss of the fragile histidine triad tumor suppressor in basal cell carcinomas. *Br. J. Dermatol.* **155**: 1154-1158.
47. Huebner K, Croce CM (2003). Cancer and the FRA3B/ FHIT fragile locus: it's a HIT. *Br. J. Cancer* **88**: 1501-1506.
48. Huebner K, Hadaczek P, Saprashvili Z, Druck T, Croce CM (1997). The FHIT gene, a multiple tumor suppressor gene encompassing the carcinogen sensitive chromosome fragile site, FRA3B. *Biochem. Biophys. Acta.* **3**: 65-70.
49. Palumbo E, Tosoni E, Matricardi L, Russo A (2013). Genetic instability of the tumor suppressor gene FHIT in normal human cells. *Gen. Chrom. Cancer* **52**: 832-844.
50. Ishii H, Ozawa K, Furukawa Y (2003). Alteration of the fragile histidine triad gene early in carcinogenesis: an update. *J. Exp. Ther. Oncol.* **3**: 291-296.



51. Cantor JP, Iliopoulos D, Rao AS, Druck T, Semba S, Han SY, McCorkell KA, Lakshman TV, Collins JE, Wachsberger P, Friedberg JS, Huebner K (2006). Epigenetic modulation of endogenous tumor suppressor expression in lung cancer xenografts suppresses tumorigenicity. *Int. J. Cancer*. **120**: 24-31.
52. Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L, Tagliabue E, Pezzella F, Ghirelli C, Tornielli S, Sard L, Huebner K, Pierotti MA, Croce CM, Pilotti S (1998). Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Res*. **58**: 5032-5037.
53. Noguchi T, Müller W, Wirtz HC, Willers R, Gabbert HE (1999). FHIT gene in gastric cancer: association with tumor progression and prognosis. *J. Pathol*. **188**: 378-381.
54. Hadaczek P, Kovatich A, Gronwald J, Lubinski J, Huebner K, McCue PA (1999). Loss or reduction of Fhit expression in renal neoplasias: correlation with histogenic class. *Hum. Pathol*. **30**: 1276-1283.
55. Lee SH, Kim CJ, Park HK, Koh JW, Cho MH, Baek MJ, Lee MS (2001). Characterization of aberrant FHIT transcripts in gastric adenocarcinomas. *Exp. Mol. Med*. **33**: 124-130.
56. Morikawa H, Nakagawa Y, Hashimoto K, Niki M, Egashira Y, Hirata I, Katsu K, Akao Y (2000). Frequent altered expression of fragile histidine triad protein in human colorectal adenomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. **278**: 205-210.
57. Virgilio L, Shuster M, Gollin SM, Veronese ML, Ohta M, Huebner K, Croce Cm (1996). FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 9770-9775.
58. Nelson HH, Wiencke JK, Gunn L, Wain JC, Christiani DC, Kelsey KT (1998). Chromosome 3p14 alterations in lung cancer: evidence that FHIT exon deletion is a target of tobacco carcinogens and asbestos. *Cancer Res*. **58**: 1804-1807.
59. Brandeis M, Frank D, Keshet I, Siegfried Z, Mendelsohn M, Nemes A, Temper V, Razin A, Cedar H (1994). Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature*. **371** (6496): 435-438.
60. Pickford MA, Hogg FJ, Fallowfield ME, Webster MH (1995). Sebaceous carcinoma of the periorbital and extraorbital regions. *Br. J. Plast. Surg* **2**: 93-96.
61. Zürcher M, Hintschich CR, Garner A, Bunce C, Collin JR (1998). Sebaceous carcinoma of the eyelid: a clinicopathological study. *Br. J. Ophthalmol*. **82**: 1049-1055.
62. Bailet JW, Zimmerman MC, Arnstein DP, Wollman JS, Mickel RA (1992). Sebaceous carcinoma of the head and neck. Case report and literature review. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg*. **118**(11): 1245-1249.
63. Conway RM, von Moller A, Ballhausen W, Jünemann A, Holbach LM (2004). Frequency and clinical features of visceral malignancy in a consecutive case series of patients with periocular sebaceous gland carcinoma. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol*. **242**: 674-678.
64. Lynch HT, Lynch PM, Pester J, Fusaro RM (1981). The cancer family syndrome: Rare cutaneous phenotypic linkage of Torre's syndrome. *Arch. Intern. Med*. **5**: 607-611.
65. Hall NR, Williams MA, Murday VA, Newton JA, Bishop DT (1994). Muir-Torre syndrome: a variant of the cancer family syndrome. *J. Med. Genet*. **31**: 627-631.

66. Schwartz RA, Torre DP (1995). The Muir-Torre syndrome: a 25- year retrospect. *J. Am. Acad. Dermatol.* **33**: 90-104.
67. Oulès B, Rognoni E, Hoste E, Goss G, Fiehler R, Natsuga K, Quist S, Mentink R, Donati G, Watt FM (2019). Mutant Lef1 controls Gata6 in sebaceous gland development and cancer. *The EMBO J.* **38**: 1-19.
68. Nestor CE, Ottaviano R, Reinhardt D, Cruickshanks HA, Mjoseng HK, McPherson RC, Lentini A, Thomson JP, Dunican DS, Pennings S, Anderton SM, Benson M, Meehan RR (2015). Rapid reprogramming of epigenetic and transcriptional profiles in mammalian culture Systems. *Gen. Biol.* **16**: 3-17.
69. Schmitz S (2011). *Der Experimentator: Zellkultur*. Springer Spektrum Verlag, Wiesbaden . Seiten 14-18, 28-49, 72-80, 98-100.
70. Hayflick L, Moorhead P (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.* **25**: 585-621.
71. Itahana K, Dimri G, Campisi J (2001). Regulation of cellular senescence by p53. *Eur. J. Biochem.* **268**: 2784-2791.
72. Kerr JF (2002). History of the events leading to the formulation of the apoptosis concept. *Toxicol.* **182**: 471-474.
73. Cruickshanks HA, McBryan T, Nelson DM, Vanderkraats ND, Shah PP, van Tuyn J, Singh Rai T, Brock C, Donahue G, Dunican DS, Drotar ME, Meehan RR, Edwards JR, Berger SL, Adams PD (2013). Senescent cells harbour features of the cancer epigenome. *Nat. Cell Biol.* **15(12)**: 1495-1506.
74. Lüllmann-Rauch R (2015). *Taschenlehrbuch Histologie*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. Seiten 542, 595.
75. Zouboulis CC, Baron JM, Böhm M, Kippenberger S, Kurzen H, Reichrath J, Thielitz A (2008). Frontiers in sebaceous gland biology and pathology. *Exp. Dermatol.* **17**: 542-551.
76. Pappas A, Anthonavage M, Gordon JS (2002). Metabolic fate and selective utilization of major fatty acids in human sebaceous gland. *J. Invest. Dermatol.* **118**: 164-171.
77. Zouboulis CC, Schagen S, Alestas T (2008). The sebocyte culture: a model to study the pathophysiology of the sebaceous gland in seborrhea and acne. *Arch. Dermatol. Res.* **300**: 397-413.
78. Zouboulis CC, Korge B, Akamatsu H, Xia LQ, Schiller S, Gollnick H, Orfanos CE (1991). Effects of 13-cis-retinoic acid, all-trans-retinoic acid, and acitretin on the proliferation, lipid synthesis and keratin expression of cultured human sebocytes in vitro. *J. Invest. Dermatol.* **96(5)**: 792-797.
79. Xia LQ, Zouboulis CC, Detmar M, Mayer- da- Silva A, Stadler R, Orfanos CE (1989). Isolation of human sebaceous glands and cultivation of sebaceous gland- derived cells as an in vitro model. *J. Invest. Dermatol.* **93**: 315-321.
80. Xia LQ, Zouboulis CC, Ju Q (2009). Culture of human sebocytes in vitro. *Dermatoendocrinol.* **1**: 92-95.

81. Zouboulis CC, Seltmann H, Neitzel H, Orfanos CE (1999). Establishment and characterization of an immortalized human sebaceous gland cell line (SZ95). *J. Invest. Dermatol.* **113**: 1011-1020.
82. Wrobel A, Seltmann H, Fimmel S, Müller- Decker K, Tsukada M, Bogdanoff B, Mandt N, Blume- Peytavi U, Orfanos CE, Zouboulis CC (2003). Differentiation and apoptosis in human immortalized sebocytes. *J. Invest. Dermatol.* **120**: 175-181.
83. Zouboulis CC, Xia LQ, Akamatsu H, Seltmann H, Fritsch M, Hornemann S, Rühl R, Chen W, Nau H, Orfanos CE (1998). The human sebocyte culture model provides new insights into development and management of seborrhoea and acne. *Dermatol.* **196**: 21-31.
84. Zouboulis CC (2003). Sebaceous gland in human skin – the fantastic future of a skin appendage. *J. Invest. Dermatol.* **120**: xiv-xv.
85. Lu R, Bian F, Lin J, Su Z, Qu Y, Pflugfelder SC, Li DQ (2012). Identification of human fibroblast cell lines as a feeder layer for human corneal epithelial regeneration. *PLoS ONE* **6**: 38825.
86. Bräuer, R (2014). Immortalisierung primärer humaner mesenchymaler Stromazellen als erster Schritt bei der Aufklärung pathogenetischer Mechanismen der Entstehung von Desmoiden. Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2014.
87. Simmons DT (2000). SV40 large T antigen functions in DNA replication and transformation. *Adv. Virus Res.* **55**: 75-134.
88. Rollison DE, Utaipat U, Ryschkewitsch C, Hou J, Goldthwaite P, Daniel R, Helzlsouer KJ, Burger PC, Shah KV, Major EO (2005). Investigation of human brain tumors for the presence of polyomavirus genome sequences by two independent laboratories. *Int. J. Cancer* **113**: 769-774.
89. Zur Hausen H (2008). Novel human polyomaviruses – re- emergence of a well known virus family as possible human carcinogens. *Int. J. Cancer* **123**: 247-250.
90. Sweet BH, Hilleman MR (1960). The vacuolating virus, S.V. 40. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **105**: 420-427.
91. Stillman B (1989). Initiation of eukaryotic DNA replication in vitro. *Annu. Rev. Cell. Biol.* **5**: 197-245.
92. Garcea RL, Imperiale MJ (2003). Simian Virus 40 Infection of Humans. *J. Virol.* **77**: 5039-5045.
93. Butel JS, Lednicky JA (1999). Cell and molecular biology of simian virus 40: implications for human infections and disease. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**: 119-134.
94. Stahl H, Bauer M, Knippers R (1983). The simian-virus-40 large-tumor antigen in replicating viral chromatin. A salt-resistant protein-DNA interaction. *Eur. J. Biochem.* **134**: 55-61.
95. Stahl H, Knippers R (1983). Simian virus 40 large tumor antigen on replicating viral chromatin: tight binding and localization on the viral genome. *J. Virol.* **47**: 65-76.
96. Shah KV (2006). SV40 and human cancer: a review of recent data. *Int. J. Cancer* **120**: 215-223.

97. Clayton CE, Lovett M, Rigby PW (1982). Functional analysis of a simian virus 40 super T-antigen. *J. Virol.* **3**: 974-982.
98. Shein HM, Enders JF (1962). Transformation induced by simian virus 40 in human renal cell cultures. I. Morphology and growth characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **48**: 1164-1172.
99. Liu L, Zhang J, Bates S, Li JJ, Peehl DM, Rhim JS, Pfeifer GP (2005). A methylation profile of in vitro immortalized cell lines. *Int. J. Oncol.* **26**: 275-285.
100. Suzuki M, Toyooka S, Shivapurkar N, Shigematsu H, Miyajima K, Takashi T, Stastny V, Zem AL, Fujisawa T, Pass HI, Carbone M, Gazdar AF (2005). Aberrant methylation profile of human malignant mesotheliomas and its relationship to SV40 infection. *Oncogene* **24**: 1302-1308.
101. www.google.com >patents: Patent WO2000046353A1: Sebozyten, Sebozyten-Zelllinie und deren Verwendungen.
102. Goldberg M, Rummelt C, Foja S, Holbach LM, Ballhausen WG (2006). Different genetic pathways in the development of periocular sebaceous gland carcinomas in presumptive Muir-Torre syndrome patients. *Hum. Mutat.* **27**: 155-162.
103. Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW, Molloy PL, Paul CL (1992). A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 1827-1831.
104. Mukai F, Hawryluk I, Shapiro R (1970). The mutagenic specificity of sodium bisulfite. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **39**: 983-988.
105. Shapiro R, Braverman B, Louis JB, Servis RE (1973). Nucleic acid reactivity and conformation. II. Reaction of cytosine and uracil with sodium bisulfate. *J. Biol. Chem.* **11**: 4060-4064.
106. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M (1994). High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucl. Ac. Res.* **15**: 2990-2997.
107. Huang Z, Bassil CF, Murphy SK (2013). Methylation-Specific PCR. *Meth. Mol. Biol.* **1049**: 75-82.
108. Foja S, Goldberg M, Schagdarsurengin U, Dammann R, Tannapfel A, Ballhausen WG (2005). Promotor methylation and loss of coding exons of the fragile histidine triad (FHIT) gene in intrahepatic cholangiocarcinomas. *Liv. Int.* **6**: 1202-1208.
109. Issa JP, Vertino PM, Wu J, Sazawal S, Celano P, Nelkin BD, Hamilton SR, Baylin SB (1993). Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression. *J. Natl. Cancer Inst.* **85(15)**: 1235-1240.
110. He D, Zhang YW, Zhang NN, Zhou L, Chen JN, Jiang Y, Shao CK (2015). Aberrant gene promoter methylation of p16, FHIT, CRBP1, WWOX, and DLC-1 in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. *Med. Oncol.* **32 (4)**: 92.
111. Cowell IG, Sunter NJ, Singh PB, Austin CA, Durkacz BW, Tilby MJ (2007).  $\gamma$ H2AX Foci Form Preferentially in Euchromatin after Ionising-Radiation. *PLoS ONE* **2**: 1057.

112. Ismail IH, Hendzel MJ (2008). The  $\gamma$ -H2A.X: Is It Just a Surrogate Marker of Double-Strand Breaks or Much More?. *Environm. A. Mol. Mutagen.* **49**: 73-82.
113. Rogakou EP, Nieves-Neira W, Boon C, Pommier Y, Bonner WM (2000). Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem.* **275**: 9390-9395.
114. Bassing CH, Alt FW (2004). The cellular response to general and programmed DNA double strand breaks. *DNA Rep. (Amst.)* **3 (8/9)**: 781-796.
115. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ (2001). ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. *J. Biol. Chem.* **276**: 42462-42467.
116. Rogakou EP, Pilch DR, Orr AH, Ivanova VS, Bonner WM (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* **273**: 5858-5868.
117. Rogakou EP, Boon C, Redon C, Bonner WM (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell. Biol.* **146**: 906-916.
118. Foster ER, Downs JA (2005). Histone H2A phosphorylation in DNA double-strand break repair. *FEBS J.* **272**: 3231-3240.
119. Celeste A, Petersen S, Romanienko PJ, Fernandez-Capetillo O, Chen HT, Sedelnikova OA, Reina-San-Martin B, Coppola V, Meffre E, Difilippantonio MJ (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science* **296**: 922-927.
120. McManus KJ, Hendzel MJ (2005). ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **16**: 5013-5025.
121. Petrini JH, Stracker TH (2003). The cellular response to DNA double-strand breaks: Defining the sensors and mediators. *Trends Cell. Biol.* **13**: 458-462.
122. Ichijima Y, Sakasai R, Okita N, Asahina K, Mizutani S, Teraoka H (2005). Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **336**: 807-812.
123. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, Bonner WM (2002). Quantitative detection of (125) IdU-induced DNA double-strand breaks with  $\gamma$ -H2AX antibody. *Radiat. Res.* **158**: 486-492.
124. Mantaj J, Jackson PJM, Rahman KM, Thurston DE (2016). Entwicklung Pyrrolbenzodiazepin (PBD)-haltiger Antikörper-Wirkstoff-Konjugate (ADCs) ausgehend von Anthramycin. *Angew. Chem.* **128**: 2-31.
125. Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Maitra A, Lam S, Geradts J, Ashfaq R, Virmani AK, Milchgrub S, Gazdar AF, Minna JD (2001). 5' CpG Island Methylation of the FHIT Gene Is Correlated with Loss of Gene Expression in Lung and Breast Cancer. *Cancer Res.* **61**: 3581-3585.
126. Zhang C, Zhang G, Liu D (2018). Histone deacetylase inhibitors reactivate silenced transgene in vivo. *Gene Ther.* **10**: 1038.

127. Tran HTT, Kim HN, Lee IK, Kim YK, Ahn JS, Yang DH, Lee JJ, Kim HJ (2011). DNA Methylation Changes Following 5-azacytidine Treatment in Patients with Myelodysplastic Syndrome. *J. Korean. Med. Sci.* **26**: 207-213.
128. Merkle FT, Ghosh S, Kamitaki N, Mitchell J, Avior Y, Mello C, Kashin S, Mekhoubad S, Ilic D, Charlton M, Saphier G, Handsaker RE, Genovese G, Bar S, Benvenisty N, McCarroll S, Eggan K (2017). Human pluripotent stem cells recurrently acquire and expand dominant negative P53 mutations. *Nature* **545**: 229-233.
129. Nowell PC (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* **94(4260)**: 23-28.
130. Chandock S (2017). Subclone wars. *Nature* **545**: 160-161.
131. Kuroki T, Tajima Y, Furui J, Kanematsu T (2006). Common fragile genes and digestive tract cancers. *Surg. Today* **36(1)**: 1-5.
132. Pylkkanen L1, Wolff H, Stjernvall T, Tuominen P, Sioris T, Karjalainen A, Anttila S, Husgafvel-Pursiainen K (2002). Reduced Fhit protein expression and loss of heterozygosity at FHIT gene in tumours from smoking and asbestos-exposed lung cancer patients. *Int. J. Oncol.* **20(2)**: 285-290.
133. Sozzi G, Sard L, De Gregorio L, Marchetti A, Musso K, Buttitta F, Tornielli S, Pellegrini S, Veronese ML, Manenti G, Incarbone M, Chella A, Angeletti CA, Pastorino U, Huebner K, Bevilacqua G, Pilotti S, Croce CM, Pierotti MA (1997). Association between cigarette smoking and FHIT gene alterations in lung cancer. *Cancer Res.* **57(11)**: 2121-2123.
134. Stein CK, Glover TW, Palmer JL, Glisson BS (2002). Direct correlation between FRA3B expression and cigarette smoking. *Genes Chrom. Cancer* **3**: 333-340.
135. Holschneider CH, Baldwin RL, Tumber K, Aoyama C, Karlan BY (2005). The fragile histidine triad gene: a molecular link between cigarette smoking and cervical cancer. *Clin. Cancer Res.* **11(16)**: 5756-5763.
136. Ji WD, Chen JK, Lu JC, Wu ZL, Yi F, Feng SM (2006). Alterations of FHIT gene and P16 gene in nickel transformed human bronchial epithelial cells. *Biomed. Environ. Sci.* **(4)**: 277-284.
137. Tsujiuchi T, Sasaki Y, Murata N, Tsutsumi M, Konishi Y, Nakae D (2001). FHIT alterations in lung adenocarcinomas induced by N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine in rats. *Carcinogenesis* **22(12)**: 2017-2022.
138. Wang J, Cheng YW, Wu DW, Chen JT, Chen CY, Chou MC, Lee H (2006). Frequent FHIT gene loss of heterozygosity in human papillomavirus-infected non-smoking female lung cancer in Taiwan. *Cancer Lett.* **235(1)**: 18-25.
139. Chizhikov V, Chikina S, Gasparian A, Zborovskaya I, Steshina E, Ungiadze G, Samsonova M, Chernyaev A, Chuchalin A, Tatosyan A (2002). Molecular follow-up of preneoplastic lesions in bronchial epithelium of former Chernobyl clean-up workers. *Oncogene* **21(15)**: 2398-2405.
140. Bargonetti J, Reynisdottir I, Friedman PN, Prives C (1992). Site specific binding wild- type p53 to cellular DNA is inhibited by SV 40 T antigen and mutant p53. *Genes Dev.* **6**: 1886-1898.
141. Martini F, Corallini A, Balatti V, Sabbioni S, Pancaldi C, Tognon M (2007). Simian virus 40 in humans. *Inf. Ag. Cancer* **2**: 13.

142. Carbone M, Rizzo P, Grimley PM, Procopio A, Mew DJ, Shridhar V, de Bartolomeis A, Esposito V, Giuliano MT, Steinberg SM, Levine AS, Giordano A, Pass HI (1997). Simian virus-40 large-T antigen binds p53 in human mesotheliomas. *Nat. Med.* **3(8)**: 908-912.
143. Shay JW, Pereira-Smith OM, Wright WE (1991). A role for both RB and p53 in the regulation of human cellular senescence. *Exp. Cell. Res.* **196(1)**: 33-39.
144. Shay JW, Wright WE, Werbin H (1991). Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization. *Biochem. Biophys. Acta* **1072(1)**: 1-7.
145. Resnick-Silverman L, Pang Z, Li G, Jha KK, Ozer HL (1991). Retinoblastoma protein and simian virus 40-dependent immortalization of human fibroblasts. *J. Virol.* **65(6)**: 2845-2852.
146. Jones PA, Wolkowicz MJ, Harrington MA, Gonzales F (1990). Methylation and expression of the Myo D1 determination gene. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **326(1235)**: 277-284.
147. Toth M, Lichtenberg U, Doerfler W (1989). Genomic sequencing reveals a 5-methylcytosine-free domain in active promoters and the spreading of preimposed methylation patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86(10)**: 3728-3732.
148. Wilson VL, Jones PA (1983). DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science* **220(4601)**: 1055-1057.
149. Antequera F, Boyes J, Bird A (1990). High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* **62(3)**: 503-514.
150. Bork S, Pfister S, Witt H, Horn P, Korn B, Ho AD, Wagner W (2010). DNA methylation pattern changes upon long-term culture and aging of human mesenchymal stromal cells. *Ag. Cell* **9(1)**: 54-63.
151. Meissner A, Mikkelsen TS, Gu H, Wernig M, Hanna J, Sivachenko A, Zhang X, Bernstein BE, Nusbaum C, Jaffe DB, Gnirke A, Jaenisch R, Lander ES (2008). Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells. *Nature* **454(7205)**: 766-770.
152. Veillard AC, Marks H, Bernardo AS, Jouneau L, Laloë D, Boulanger L, Kaan A, Brochard V, Tosolini M, Pedersen R, Stunnenberg H, Jouneau A (2014). Stable methylation at promoters distinguishes epiblast stem cells from embryonic stem cells and the in vivo epiblasts. *Stem Cells Dev.* **23(17)**: 2014-2029.
153. Holliday R (1986). Strong effects of 5-azacytidine on the in vitro lifespan of human diploid fibroblasts. *Exp. Cell. Res.* **166(2)**: 543-552.
154. Sun J, Shen R, Schrock MS, Liu J, Pan X, Quimby D, Zanesi N, Druck T, Fong LY, Huebner K (2016). Reduction in squamous cell carcinomas in mouse skin by dietary zinc supplementation. *Cancer Med.* **5(8)**: 2032-2042.
155. Fong LY, Fidanza V, Zanesi N, Lock LF, Siracusa LD, Mancini R, Sipsrashvili Z, Ottey M, Martin SE, Druck T, McCue PA, Croce CM, Huebner K (2000). Muir-Torre-like syndrome in Fhit-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **9**: 4742-4747.
156. Koreeda T, Yamanaka E, Yamamichi K, Tashiro S, Tsubura A, Hioki K (1999). Inhibitory effect of retinoid on esophageal carcinogenesis in rats induced by N-nitroso-methylbutylamine in relation to cellular retinoic acid-binding protein. *Anticancer Res.* **19(5B)**: 4139-4143.

157. Xia LQ, Shen W, Ritacca F, Mitri A, Madlensky L, Berk T, Cohen Z, Gallinger S, Bapat B (1996). A truncated hMSH2 transcript occurs as a common variant in the population: implications for genetic diagnosis. *Cancer Res.* **56**: 2289-2292.
158. Kruse R, Rütten A, Lamberti C, Hosseiny- Malayeri HR, Wang Y, Ruelfs C, Jungck M, Mathiak M, Ruzicka T, Hartschuh W, Bisceglia M, Friedl W, Propping P (1998). Muir- Torre phenotype has a frequency of DNA mismatch- repair- gene mutations similar to that in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families defined by the Amsterdam criteria. *Am. J. Hum. Genet.* **63**: 63-70.
159. Reitmair AH, Redston M, Cai JC, Chuang TC, Bjerknes M, Cheng H, Hay K, Gallinger S, Bapat B, Mak TW (1996). Spontaneous intestinal carcinomas and skin neoplasms in Msh2-deficient mice. *Cancer Res.* **56(16)**: 3842-3849.
160. Entius MM, Keller JJ, Drillenburger P, Kuypers KC, Giardiello FM, Offerhaus GJ (2000). Microsatellite instability and expression of hMLH-1 and hMSH-2 sebaceous gland carcinomas as markers for Muir- Torre syndrome. *Clin. Cancer Res.* **6**: 1784-1789.
161. Holbach LM, von Moller A, Decker C, Jünemann AG, Rummelt- Hofmann C, Ballhausen WG (2002). Loss of fragile histidine triad (FHIT) expression and microsatellite instability in periorbital sebaceous gland carcinoma in patients with Muir- Torre syndrome. *Am. J. Ophthalmol.* **134**: 147-148.
162. Honchel R, Halling KC, Schaid DJ, Pittelkow M, Thibodeau SN (1994). Microsatellite instability in Muir- Torre syndrome. *Cancer Res.* **5**: 1159-1163.
163. Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD (1993). Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* **365**: 274-276.
164. Shinohara KI, Yoda N, Takane K, Watanabe T, Fukuyo M, Fujiwara K, Kita K, Nagase H, Nemoto T, Kaneda A (2016). Inhibition of DNA Methylation at the MLH1 Promoter Region Using Pyrrole-Imidazole Polyamide. *ACS Omega* **1 (6)**: 1164-1172.
165. Miyakura Y, Tahara M, Lefor AT, Yasuda Y, Sugano K (2014). Haplotype defined by the MLH1-93G/A polymorphism is associated with MLH1 promoter hypermethylation in sporadic colorectal cancers. *BMC Res. Notes* **7**: 835.
166. Haraldsdottir S, Hampel H, Wu C, Weng DY, Shields PG, Frankel WL, Pan X, Chapelle A, Goldberg RM, Bekaii-Saab T (2016). Patients with colorectal cancer associated with Lynch syndrome and MLH1 promoter hypermethylation have similar prognoses. *Genet. Med.* **18 (9)**: 863-868.
167. Wilson VL, Jones PA (1983). Inhibition of DNA methylation by chemical carcinogens in vitro. *Cell* **32(1)**: 239-246.
168. Jones PA, Taylor SM, Wilson VL (1983). Inhibition of DNA methylation by 5-azacytidine. *Rec. Res. Cancer Res.* **84**: 202-211.
169. Vanhaecke T, Papeleu P, Elaut G, Rogiers V (2004). Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view. *Curr. Med. Chem.* **11(12)**: 1629-1643.
170. Vigushin DM, Ali S, Pace PE, Mirsaidi N, Ito K, Adcock I, Coombes RC (2001). Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. *Clin. Cancer Res.* **7(4)**: 971-976.



171. Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC (2005). Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**: 495-528.

172. Bollag W, Holdener EE (1992). Retinoids in cancer prevention and therapy. *Annu. Oncol.* **3(7)**: 513-526.

## THESEN

- (1) Eine Zellpopulation der Large T-Antigen immortalisierten Sebozytenlinie SZ95 wurde unter standardisierten *in-vitro* Bedingungen mit Passage 31 beginnend über die Dauer von circa 80 Zellteilungen kultiviert.
- (2) Die Vermehrung der Zellen ging mit einer Zunahme epigenetischer Veränderungen im Sinne von CpG-Dinukleotid-Methylierungen in der Promotorregion des Fragilen Histidin Trias (FHIT) Tumorsuppressor-Gens einher.
- (3) Es wurde eine Hypermethylierung an 33 CpG-Dinukleotiden vor allem am 5'-Ende von Intron 1 des FHIT-Gens nachgewiesen.
- (4) In Übereinstimmung mit dem veränderten Methylierungsmuster der Promotorregion wurde eine Abnahme der FHIT-Genexpression festgestellt.
- (5) Mit zunehmender *in-vitro* Kultivierungszeit kam es mit steigender Passagezahl zu einer Anhäufung von DNA-Doppelstrangbrüchen.
- (6) Durch die Behandlung der *in-vitro* kultivierten SZ95-Sebozyten mit 5'-Azacytidin und Trichostatin A wurde eine Abnahme der Methylierung der FHIT-Promotorregion sowie eine Re-Expression von FHIT Transkripten beobachtet.

## ANLAGEN

### FHIT-Sequenz (Bisulfit-konvertiert): Primersequenzen und CpG-Dinukleotide

GAAGGTTTAAGGAATTTAGAAAAGATTTAGAGTGGGGAAATGAAA**CG**AAAAGAAATTTAGTTAGTGGGAAGT**CG**TGAAGGGATAGTTAAA**CGCG**TTTTGGGAGGAAAGA  
AAAAAGTAAAAGTG**CGGT**TATAGTTTTT**CG**TTATA**CG**TGAAAAGAATTATGTTTTTTTTTTAGTTA**GAAAAAGTTAAAGATTGT**CGA****TTTATGTTTTAAATTTTTT  
GTAAGGGGATTTTTATTTAA**ATTTGTTTTTTGTGGTTAGTGTTTTT****CG**TTTTTTGAATTAGGGTTATTGTTATTATGGTTTTTAATTGGTT**CGGCG**TAGG**CG**TATGTTT  
TG**CGCG**TATTGTTTT**CG**TTTTTTGTTTTTAGATAAG**CGGT**TATTTTGGGTTT**CG**TTTTTAT**CG**TGGGGTTTTTTGGGAATTGTAGTTTT**CG**TTTTGTTTTGTT**CGGT**  
ATAGGATTTTTTGTTTTTGTTTT**CGGGTTTTTTTAGGCGGT**TATT**TAGTGGG**TATATTTTTTAGG**CGCGTT**T**CG**GTTT**CGCG**TTTTTTTTTTTTGTTTTTTATTTTTA  
GTTGTTAATATTTTGGAAG**STAGGGG**CG**GGAGGTAAGTTT**AAGTGAATATGTTTTTTGGGG**CGCGGG**TTGGGTTTTTA**CGCGCG**TTAGGTATTATTT**CGGAGTT**  
TAGTGGGGT**CGCG**T**CG**TTT**CG**TTT**CGGGG**CG****TGGGTTTTTTGTTT**CG**AGTATTTTTTT**CGTTTT**CG**AGGGTTTTAGGGTGGGCAT**T**CGGG**TTTTTTAATTTTTAAGTAT**CG**  
ATTTTAGTTTTAATT**CG**TTTTTTTTTTAT**CG**TGTTTATATATTGGGGAAATTGAGGT**CGGG**T**CG**TTAG**CGGG**T**CGGGG****CG**TTATAGTTTTTGGTTTTGGGG  
TGTAGT**CGGT**TATT**CGT**CG****TTTTGGGATGGTT**CG**TTAGTTTTTATAGATAAGTAG**CG**AAAATT**CG**TTTTAATAGTTTGTGTTAAATA**CG**TAGTTTT

**Region 1:** A: BSGSA\_R1\_F\_U\_F B: BSGSA\_R1\_F\_D\_R C: BSGSA\_R1\_N\_U\_F2b D: BSGSA\_R1\_N\_U\_R2

**Region 2:** E: BSGSA\_R2\_F\_D\_F G: BSGSA\_R2\_N\_D\_F2 F: BSGSA\_R2\_F\_D\_Rb

[ Exon 1 ]

[ Beginn Intron 1 ]

**Kursiv**: Vermutlich Sp1- bindende Bereiche (GC- Box- bindender Transkriptionsfaktor), vereinfachend nur die involvierten CGs hervorgehoben [36].



## Methylierungsmuster der Region 1 des FHIT-Gens

### SZ95 P32:

→ Proben mit nicht methylierten CpGs, daher nicht in Grafik aufgeführt:

- SZ95 P32 Klon 2
- SZ95 P32 Klon 3
- SZ95 P32 Klon 4
- SZ95 P32 Klon 5
- SZ95 P32 Klon 6
- SZ95 P32 Klon 7
- SZ95 P32 Klon 8
- SZ95 P32 Klon 9
- SZ95 P32 Klon 10
- SZ95 P32 Klon 11
- SZ95 P32 Klon 12
- SZ95 P32 Klon 14
- SZ95 P32 Klon 15
- SZ95 P32 Klon 16
- SZ95 P32 Klon 17
- SZ95 P32 Klon 18
- SZ95 P32 Klon 19
- SZ95 P32 Klon 20

→ Proben mit methylierten CpGs:

- 1 - SZ95 P32 Klon 1

### SZ95 P67:

→ Proben mit nicht methylierten CpGs,, daher nicht in Grafik aufgeführt:

- SZ95 P67 Klon 8
- SZ95 P67 Klon 9
- SZ95 P67 Klon 10
- SZ95 P67 Klon 11
- SZ95 P67 Klon 22
- SZ95 P67 Klon 38
- SZ95 P67 Klon 40
- SZ95 P67 Klon 46
- SZ95 P67 Klon 50
- SZ95 P67 Klon 53
- SZ95 P67 Klon 55

→ Proben mit methylierten CpGs:

- A- SZ95 P67 Klon 6
- B- SZ95 P67 Klon 12
- C- SZ95 P67 Klon 13
- D- SZ95 P67 Klon 21
- E- SZ95 P67 Klon 24
- F- SZ95 P67 Klon 25
- G- SZ95 P67 Klon 37
- H- SZ95 P67 Klon 58



## Methylierungsmuster der Region 2 (Intron 1) des FHIT-Gens

### SZ95 P32:

→ Proben mit nicht methylierten CpGs, daher nicht in Grafik aufgeführt:

- SZ95 P32 Klon 2
- SZ95 P32 Klon 16
- SZ95 P32 Klon 23
- SZ95 P32 Klon 24
- SZ95 P32 Klon 30

→ Proben mit methylierten CpGs:

- 1 - SZ95 P32 Klon 3
- 2 - SZ95 P32 Klon 5
- 3 - SZ95 P32 Klon 6
- 4 - SZ95 P32 Klon 14
- 5 - SZ95 P32 Klon 12
- 6 - SZ95 P32 Klon 20
- 7 - SZ95 P32 Klon 7
- 8 - SZ95 P32 Klon 19
- 9 - SZ95 P32 Klon 21
- 10 - SZ95 P32 Klon 28
- 11 - SZ95 P32 Klon 18
- 12 - SZ95 P32 Klon 25
- 13 - SZ95 P32 Klon 26
- 14 - SZ95 P32 Klon 27

### SZ95 P67:

→ alle sequenzierten Proben wiesen methylierte CpGs auf:

- A - SZ95 P67 Klon 1
- B - SZ95 P67 Klon 2
- C - SZ95 P67 Klon 3
- D - SZ95 P67 Klon 4
- E - SZ95 P67 Klon 5
- F - SZ95 P67 Klon 6
- G - SZ95 P67 Klon 8
- H - SZ95 P67 Klon 9
- I - SZ95 P67 Klon 10
- J - SZ95 P67 Klon 11
- K - SZ95 P67 Klon 12
- L - SZ95 P67 Klon 13
- M - SZ95 P67 Klon 14
- N - SZ95 P67 Klon 15
- O - SZ95 P67 Klon 16
- P - SZ95 P67 Klon 17
- Q - SZ95 P67 Klon 18
- R - SZ95 P67 Klon 19
- S - SZ95 P67 Klon 20

## Sequenz FHIT-Gen

...cccccttgtaaggggattctcacctcaacttgcttctgtggtcagtgtttcccgccctgaatcaggggtactgtcactatggctttcaattggcccggtaggcgcgatgctctgc  
gcgtattggcctccgctcctgtccccagacaagcggccatcttgggtcccggccctaccgtgggtcttctgggaattgcagTCCCCGCTCTGCTCTGTCCGGTCACAGGACTTTTTGC  
CCTCTGTTCCCGGTCCCTCAGGCGGCCACCCAGTGGGCACACTCCCAGGCGGCGCTCCGGCCCCGCGCTCCCTCCCTCTGCCTTTCATTTCCAGCTGTCAACATCCTGGAAGgtagg [  
...] tgtagCTTTGAAGCTCAGGAAAGAAGAGAAATCCACTGAGAACAGTCTGTAAAGgtaag [...] cctagGTCCGTAGTGCTATCTACATCCAGACGGTGGAAGGGAGAGAAAGAGAAAG  
AAGgtaaa [...] tgtagGTATCCTAGGAATACCTGCCTGCTTAGACCCTCTATAAAAGCTCTGTGCATCCTGCCACTGAGGACTCCGAAGAGGTAGCAGTCTTCTGAAAGgtagg [...] tt  
tagACTTCAACTGTGAGGACATGTCGTTTCAGATTTGGCCAACATCTCATCAAGCCCTCTGTAGTGTTCCTCAAACAGAACTGTCCTTCGCTCTTGTGAATAGGAAACCTGTGGTACCA  
GGACgtatc [...] tacagATGTCCTTGTGTGCCCGCTGCGGCCAGTGGAGCGCTTCCATGACCTGCGTCTCTGATGAAGTGCCCGATTTGTTTCAGACGACCCAGAGAGTCGGGACAGTGG  
TGGAAAAACATTTCCATGGGACCTCTCTCACCTTTTCCATGCAGgtgag [...] tctagGATGGCCCCGAAGCCGGACAGACTGTGAAAGgtgag [...] ttcagCACGTTACAGTCCATGTTT  
TTCCCAGGAAGGCTGGAGACTTTTCACAGGAATGACAGCATCTATGAGGAGgtggg [...] caaagCTCCAGAAACATGACAAGGAGGACTTTTCTGCCTCTTGGAGATCAGAGGAGGAAAT  
GGCAGCAGAAGCCGAGCTCTGCGGGTCTACTTTTCAGTGACACAGgtaaa [...] ttaagATGTTTTTTCAGATCCTGAATTCCAGCAAAAGAGCTATTGCCAACAGTTTGAAGACCGCCC  
CCCGCTCTCCCCAAGAGGAACTGAATCAGCATGAAAATGCAGTTTCTTCATCTCACCATCCTGTATTCTTCAACCAGTGATCCCCACCTCGGTCACTCCAACCTCCCTTAAAATACCT  
AGACCTAAACGGCTCAGACAGGCAGATTTGAGGTTTCCCCTGTCTCCTTATTGCGCAGCCTTATGATTAACCTTCTTCTCTGCTGCAAccctgtgtctcgggtgtattgacttgccat  
gaattaggcaacaaacctattacagttacagttacttttttaaggaattcaatcgttggattggtccacctgcttattttcttcccttttcaaaaaaatgtctacatattgaat  
tatacattaagtggttcatgaaaccctgaaatgtgtagtaaatagggcaa...

### Legende:

EXONS durch Großbuchstaben symbolisiert (translatierter Bereich, untranslatierter Bereich)

Introns (gekürzte Version [...]) durch Kleinbuchstaben dargestellt

flankierende Sequenzabschnitte

Reverse-Transkriptase-PCR Primerset FHIT



**EIDESSTATTLICHE SELBSTSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG,**  
**ERKLÄRUNGEN ÜBER BISHERIGE PROMOTIONSVERSUCHE UND**  
**ZUR WAHRHEITSGEMÄSSHEIT DER ANGABEN**

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig erarbeitet und eigenständig ohne fremde Hilfe verfasst habe. Alle Regeln der guten wissenschaftlichen Praxis wurden eingehalten. Ich habe alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Textstellen als solche gekennzeichnet und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt.

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt wurde und ich mich an keiner anderen Hochschule einem Promotionsverfahren unterzogen habe. Weiterhin versichere ich, mich bisher noch nicht um einen Doktorgrad beworben zu haben. Ich erkläre, die Angaben wahrheitsgemäß gemacht zu haben.

Magdalena Jotzo

Finsterwalde, 12. 06. 2019

## **TABELLARISCHER LEBENS LAUF**

### **Persönliche Daten:**

|              |            |
|--------------|------------|
| Name         | Jotzo      |
| Vorname      | Magdalena  |
| Geburtsdatum | 07.09.1990 |
| Geburtsort   | Altdöbern  |

### **Schulbildung:**

|                       |                                      |
|-----------------------|--------------------------------------|
| 08 / 1997 – 07 / 2003 | Grundschule Nord Finsterwalde        |
| 08 / 2003 – 06 / 2010 | Sängerstadt – Gymnasium Finsterwalde |

### **Medizinstudium:**

|                       |  |
|-----------------------|--|
| 10 / 2010 – 05 / 2017 | Studium der Humanmedizin an der MLU Halle-Wittenberg<br>inklusive Promotionssemester |
|-----------------------|--|

### **Promotionsstudium:**

|                       |   |
|-----------------------|---|
| 06 / 2017 – 08 / 2017 | Fortsetzung der experimentellen Arbeiten für die Dissertation |
|-----------------------|---|

### **Arbeit:**

|                  |   |
|------------------|---|
| 09 / 2017 – dato | Weiterbildung zur Fachärztin für Augenheilkunde |
|------------------|---|

## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen von Herzen bedanken, die zur Entstehung und zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Ich danke der Direktorin des Institutes für Molekulare Medizin, Frau Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld, für die Möglichkeit, diese Arbeit an ihrem Institut durchführen zu dürfen.

Mein ganz besonderer und größter Dank gebührt meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil. Wolfgang Ballhausen, Leiter der Sektion Molekulare Onkologie, für die Bereitstellung des Promotionsthemas, die tägliche Unterstützung, die stetige Hilfsbereitschaft und die vielen hilfreichen Ratschläge sowie die kritische Durchsicht bei der Erstellung des Manuskripts. Ganz besonders möchte ich mich bei ihm für die ausgezeichnete Betreuung bedanken. Des Weiteren danke ich Frau Jana Macho in höchstem Maße für die unverzichtbare Unterstützung bei den Laborarbeiten, ohne die hilfreiche Begleitung wäre diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen. Auch bei Frau Dr. Claudia Humbeck möchte ich mich für die hilfreichen Tipps bei der Arbeit im Labor bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Ich danke von Herzen meinen lieben Eltern, die mir dieses wunderbare Studium ermöglicht haben und mich zu jeder Zeit unterstützen und bestärken.

