

Ophthalmologe

<https://doi.org/10.1007/s00347-022-01593-8>

Eingegangen: 10. September 2021

Überarbeitet: 5. Januar 2022

Angenommen: 1. Februar 2022

© Der/die Autor(en) 2022, korrigierte Publikation 2022



# Epigenetische Veränderungen am Promotor des fragilen Histidin-Trias(*FHIT*)-Gens in menschlichen Sebozyten unter dem Einfluss der In-vitro-Kultur

Magdalena Jotzo<sup>1,2</sup> · Christos C. Zouboulis<sup>3</sup> · Wolfgang G. Ballhausen<sup>4</sup><sup>1</sup> Institut für Molekulare Medizin, Medizinische Fakultät, MLU Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland<sup>2</sup> Augentagesklinik Cottbus, Cottbus, Deutschland<sup>3</sup> Hochschulklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Immunologisches Zentrum, Städtisches Klinikum Dessau, Medizinische Hochschule Brandenburg Theodor Fontane, Dessau, Deutschland<sup>4</sup> Institut für Molekulare Medizin, Sektion Molekulare Onkologie, MLU Halle-Wittenberg, Halle (Saale), Deutschland

## Zusammenfassung

**Hintergrund:** Fehlt die Tumorsuppressorfunktion des fragilen Histidin-Trias(*FHIT*)-Genprodukts, so können Talgdrüsenkarzinome entstehen.**Fragestellung:** Am Modell der Sebozytenlinie SZ95 sollten methylierte CpG-Inseln am 5'-Ende des *FHIT*-Gens identifiziert, die Abnahme der Genexpression und die Zunahme von DNA-Doppelstrang(ds)-Brüchen untersucht werden.**Material und Methoden:** Methylierungs-, Immunfluoreszenzanalysen, Promotorsequenzierung sowie Behandlung der SZ95-Zellen mit 5-Azacytidin/Trichostatin A (TSA).**Ergebnisse:** Die Kultivierung der Sebozyten verlief mit einer zunehmenden Methylierung der CpGs, einer Abnahme der *FHIT*-Genexpression sowie Anhäufung von DNA-ds-Brüchen. Die Behandlung mit 5-Azacytidin/TSA zeigte eine Abnahme der DNA-Methylierung sowie Re-Expression von *FHIT*-Transkripten.**Diskussion:** Durch In-vitro-Zellkultur werden epigenetische Veränderungen im zellulären Genom hervorgerufen. Es folgt eine positive Selektion von Sebozyten mit epigenetischer Inaktivierung des *FHIT*-Genorts.

## Schlüsselwörter

Tumorsuppressorgen · Fragiles Histidin-Trias-Gen · Epigenetik · DNA-Methylierung · In-vitro-Kultivierung

## Erstautor



**Dr. med.**  
**Magdalena Jotzo**  
MLU Halle-Wittenberg,  
Halle (Saale)



QR-Code scannen &amp; Beitrag online lesen

Periokuläre Talgdrüsenkarzinome von Muir-Torre-Syndrom-Patienten zeigen gehäuft einen Verlust der Tumorsuppressorfunktion des fragilen Histidin-Trias(*FHIT*)-Gens. Verantwortlich dafür sind genomische Deletionen oder eine Hypermethylierung der Promotorregion dieses Gens in den Tumorproben der Patienten. In der vorliegenden Studie haben wir eine menschliche Sebozytenlinie über viele Passagen in vitro kultiviert, um sie auf frühe präneoplastische Veränderungen am *FHIT*-Genort zu un-

tersuchen. Unsere Daten dokumentieren die Abschaltung der Transkription als Folge einer Blockade der Promotorregion durch aberrante Methylierung, wie sie auch in Patientenproben nachweisbar war. Hieraus lassen sich Ansätze eines experimentellen Therapieansatzes ableiten.

### Talgdrüsenkarzinome – genetische Entstehungswege

Talgdrüsenkarzinome (TDK) sind eher seltene, v.a. im höheren Lebensalter sporadisch auftretende, maligne Entartungen von Talgdrüsen. Diese Tumoren können periorbital, meist das Oberlid betreffend [3], oder extraorbital lokalisiert sein [19, 23]. An den Augenlidern gehen sie von den Meibom-Drüsen aus [30]. TDK entstehen auf unterschiedlichen genetischen Wegen [8]. Als extrakolonische Manifestation sind sie bei Patienten mit einem hereditären nichtpolypösen Kolonkarzinom (HNPCC) zu finden [24]. Malignome von HNPCC-Patienten sind durch ein defektes Mismatch-Repair-System (MMR; postreplikatives Basenfehlpaarungsreparatursystem) gekennzeichnet [24]. Tumoren dieser Patienten zeigen eine hochgradige Mikrosatelliteninstabilität (MSI) als Folge der Inaktivierung eines der beiden prominenten MMR-Gene *MSH2* und *MLH1* [24]. Das Auftreten eines viszeralen Tumors in Kombination mit einem TDK wird als Muir-Torres-Syndrom (MRTES) bezeichnet [5]. In Übereinstimmung mit Daten von Knock-out-Mäusen, bei denen das fragile Histidin-Trias(*FHIT*)-Gen gezielt in der Keimbahn ausgeschaltet worden war [6], gelang es uns, in den periokulären TDK von MRTES-Patienten gehäuft eine alternative genetische Signatur nachzuweisen. Diese war durch Mikrosatellitenstabilität und einen Verlust der Expression des Tumorsuppressorgens *FHIT* [11, 15, 28] charakterisiert. Diese Patienten zeigten eine Ausschaltung des *FHIT*-Gens in ihren TDK, die entweder durch genomische Deletionen innerhalb der konstitutiv fragilen *FRA3B*-Region [13, 14] oder eine epigenetische Inaktivierung der *FHIT*-Promotorregion infolge Hypermethylierung von CpG-Inseln verursacht war [8, 9, 27].

### Das *FHIT*-Gen – ein Tumorsuppressorgen

Das *FHIT*-Gen ist in der konstitutiv fragilen Chromosomenregion *FRA3B* im Bereich 3p14.2 lokalisiert und kodiert für ein Protein mit Tumorsuppressorfunktion [13, 14]. Bedingt durch Replikationsstress kann es in der *FRA3B/FHIT*-Region zu DNA-Doppelstrangbrüchen (DDSB) kommen [12],

die durch ungenaue Reparaturmechanismen zu genomischen Deletionsereignissen im *FHIT*-Gen führen können [13–15]. Der *FHIT*-Genort zeigt sich sehr häufig in Karzinomzellen verändert, wobei bereits in prämaligen Neoplasiestadien und sogar normalen menschlichen Zellen strukturelle Aberrationen in Abhängigkeit vom Zelltyp zu finden sind [13–15, 22]. Der Verlust von *FHIT* mündet in eine globale präneoplastische genomische Instabilität, die u.a. mit einer zunehmenden Anzahl von DDSB korreliert und in Form von  $\gamma$ H2A.X-Reparatur-Foci dokumentiert werden kann. Neben diesem genetischen Mechanismus der funktionellen Inaktivierung sind aber auch epigenetische Veränderungen in Form von CpG-Hypermethylierungen an Transkriptions-regulatorischen Promotorsequenzen des *FHIT*-Gens nachgewiesen worden [9, 27]. Dieses Phänomen des „epigenetic silencing“ konnte im Rahmen von Alterungsprozessen sowohl bei Zellen in vivo als auch bei in vitro kultivierten Zelllinien beobachtet werden und führt ebenfalls generell zur funktionellen Deletion von Tumorsuppressorgen.

Ziel der Studie war es zu prüfen, ob die mit dem Large-T-Antigen immortalisierte Sebozytenlinie SZ95 [29] im Rahmen einer prolongierten Kultivierung präneoplastische Veränderungen am *FHIT*-Genort in Übereinstimmung mit dem Knock-out-Mausmodell und den MRTES-Patienten erwerben würde. Dazu wurden molekulargenetische Verfahren eingesetzt, die zwischen einer genomischen Deletion und methylierten CpG-Inseln im Transkriptions-regulierenden 5'-Ende des *FHIT*-Gens unterscheiden und als Folge davon die Zunahme von DNA-Doppelstrang(ds)-Brüchen dokumentieren sollten. Abschließend sollten Pilotexperimente zeigen, ob durch den Einsatz demethylierender Agenzien eine Re-Expression von *FHIT*-Transkripten möglich ist.

### Methodik

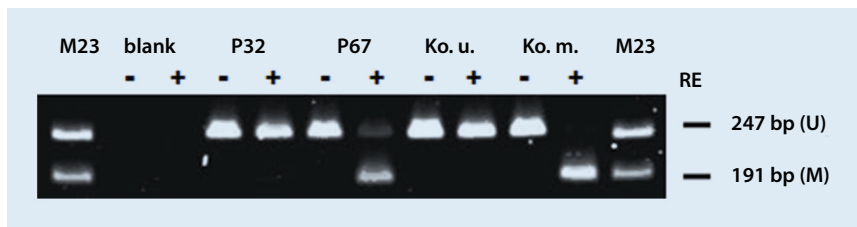
Die Experimente dieser Studie erfolgten im Rahmen einer medizinischen Doktorarbeit, die unter Referenz [18] publiziert ist. Dieser Dissertation können alle verfahrenstechnischen Details einschließlich der eingesetzten Primersequenzen entnommen

werden, die hier aus Platzgründen nicht im Einzelnen aufgeführt werden können.

Die *Kultur* der immortalisierten SZ95-Sebozytenlinie erfolgte in geeigneten Kulturgefäßen unter Standardbedingungen in einem Brutschrank in einem speziell für diese Zelllinie vorgegebenen Kulturmedium. In jeweiliger Abhängigkeit von der In-vitro-Kulturdauer wurden an den SZ95-Zellen Methylierungsanalysen in Form von methylierungsspezifischer PCR (MSP) und Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA) durchgeführt. Mithilfe einer CpG-Methylase (*M. SssI*) methylierte Kontroll-DNA diente als Vergleichskontrolle.

Um eine Hypermethylierung der CpG-reichen Promotorregion des *FHIT*-Proteins zu detektieren, wurde das Verfahren der sensitiven *methylierungsspezifischen PCR (MSP)* [8, 9] genutzt. Sie basiert auf der primerspezifischen Synthese eines PCR-Produktes [19]. Um methylierte von unmethylierter DNA unterscheiden zu können, wurde die DNA vorher einer *Bisulfit-Behandlung* unterzogen („bisulfite genomic sequencing“ nach Frommer et al. (1992) [7]). Details zur Durchführung dieser Analysen finden sich in [18] auf den S. 19–21.

Um semiquantitativ den Methylierungsstatus zu analysieren, wurde das Prinzip der *Combined Bisulfite Restriction Analysis (COBRA)* genutzt [8, 9]. Dieses kombiniert die auf einer Konversion mit Bisulfit basierende selektive PCR-Amplifikation mit einem 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 werden somit alle PCR-Produkte geschnitten, die ursprünglich von methylierter DNA stammten. Unmethylierte PCR-Produkte werden nicht geschnitten. Neben dem Restriktionsenzymansatz der PCR-Produkte wurde als Kontrolle parallel ein *mock*-Ansatz durchgeführt. Hierfür wurde ein identischer Ansatz für den Verdau angesetzt, welcher jedoch keine Restriktionsendonuklease enthält. Genaue Angaben hierzu finden sich in [18] auf S. 21–22.



**Abb. 1** ▲ Methylierungsanalyse (Combined Bisulfite Restriction Analysis): Es werden eine frühe (P32) und eine späte Passage (P67) der unter standardisierten In-vitro-Kulturbedingungen vermehrten SZ95-Sebozyten einander gegenübergestellt. Während sich in der frühen Passage 32 im untersuchten Promotorbereich des *FHIT*-Gens keine methylierte DNA nachweisen lässt, kehrt sich das Bild in der späteren Passage 67 um: Der Großteil der im DNA-Pool vorliegenden Promotorsequenzen des *FHIT*-Gens liegt in methyliertem Zustand vor, was deutlich wird anhand der Intensität der 191 bp-Bande. M23 Marker M23, *blank* Restriktionsansatz ohne PCR-Produkt, *RE* Verdau durch das methylierungs-sensitiven Restriktionsenzym *Bst*UI, + Zugabe des Restriktionsenzym, – keine Zugabe des Restriktionsenzym, *SZ95 P32/P67* SZ95-Sebozyten der jeweiligen Passagezahl, *Ko. u.* unbehandelte Kontroll-DNA, *Ko. m.* mit Methylase behandelte Kontroll-DNA, 247 bp (U) 247-Basenpaar-Bande: unmethyliert-spezifisches PCR-Produkt, 191 bp (M) 191-Basenpaar-Bande: methyliert-spezifisches PCR-Produkt

Es wurde eine *Bisulfite-Sequenzierung* der Promotorregion des *FHIT*-Gens vorgenommen. Zunächst erfolgte die Amplifikation der Bisulfite-behandelten DNA. Es wurden entsprechende Primersets genutzt, welche eine geringe Anzahl von CpG-Dinukleotiden enthielten [27]. 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“. Detaillierte Angaben hierzu sind in [18] auf S. 22–23 nachzulesen.

Als Vektor für die *Klonierung* wurde der kommerziell erhältliche Vektor *pJET1.2/blunt* genutzt, welcher Bestandteil des *CloneJet™ PCR Cloning Kit* ist. Entsprechendes Vorgehen ist dem Sticky-ends-Protokoll des Herstellers zu entnehmen. Im Anschluss an den Klonierungs- und Transformationsansatz sowie der Präparation von Plasmid-DNA aus der Bakterienkultur erfolgte eine PCR. Hierfür wurde die Plasmid-DNA mit den „nested“ Primern dem Protokoll entsprechend angesetzt, wobei Plasmid-DNA dem Master-Mix als Matrize hinzugefügt wurde. Das erhaltene PCR-Produkt wurde als Template für die Sequenzierreaktion genutzt. Mittels des *BigDye*-Sequenzierungs-Kits und der Sequenzierprimer *FHIT nested* wurden die Klone auf beiden DNA-Strängen sequenziert. Auch hierzu finden sich genaue Angaben in [18] auf S. 23–25.

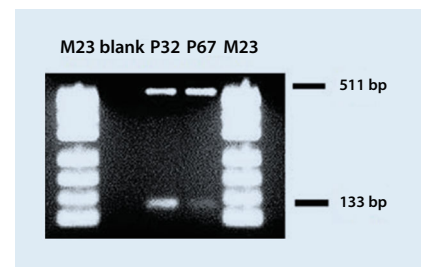
Reverse-Transkriptase-PCR für *FHIT* und Aktin: Für die *Expressionsanalyse* wurde aus zuvor isolierter RNA ein cDNA-Pool synthetisiert (*Invitrogen*-Herstellerprotokoll *SuperScript™ II*). Dazu wurde 1 µg RNA mit Random-Hexamer-Primern revers transkribiert. Zur Quantifizierung erfolgte der Vergleich zum ubiquitär exprimierten *Housekeeping-Gen* Beta-Aktin (s. [18] auf S. 26–27).

*Behandlung der Sebozytenlinie SZ95 mit 5-Azacytidin und Trichostatin A:* Initial wurde die Konzentration der demethylierenden Substanz 5-Azacytidin zur Behandlung der Zellen ausgetestet und die Verdünnung für Trichostatin A vorbereitet. SZ95-Zellen wurden in jeweils einer Petri-Schale für die Präparation genomischer DNA und RNA kultiviert. Mit diesem Zellmaterial wurden die weiter oben erwähnten Versuche wie COBRA und Expressionsanalysen durchgeführt (Details s. [18] auf S. 27).

Zum Nachweis von DNA-Doppelstrangbrüchen erfolgte eine  $\gamma$ -H2A.X-spezifische *Immunfluoreszenzfärbung* [28]. Das Ergebnis der Färbung wurde jeweils im Phasenkontrast (Durchlicht) und mittels der Fluoreszenz ausgewertet (s. [18] auf S. 27–28).

## Ergebnisse

Die Studie zeigte, dass mit steigender Passagezahl eine zunehmende Methylierung der 33 untersuchten CpG-Dinukleotid-Positionen innerhalb der Promotorregion ersichtlich war (■ Abb. 1), folglich nahm die



**Abb. 2** ▲ Reverse-Transkriptase(RT)-PCR-Produkte nach Agarose-Gelelektrophorese. M23 Marker M23, *blank* Ansatz ohne RT-Produkt, *SZ95 P32/P67* SZ95-Sebozyten der jeweiligen Passagezahl

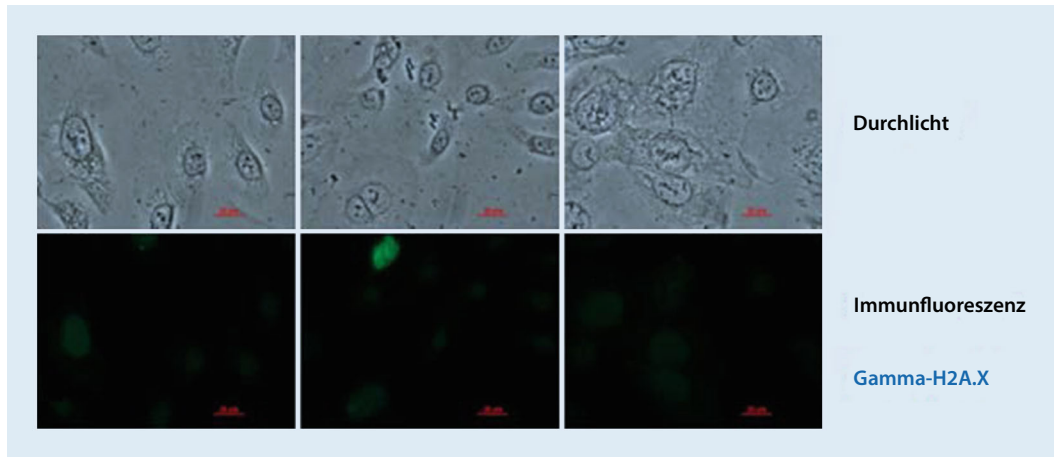
*FHIT*-Genexpression ab. Es kam zu einer damit korrelierenden Anhäufung von DNA-Doppelstrangbrüchen, welche sich als Reparatur-Foci anhand von  $\gamma$ -H2A.X-spezifischer Immunfluoreszenz visualisieren ließen. Als experimentell therapeutischer Ansatz wurde die Sebozytenlinie SZ95 bei hoher Passagezahl mit dem demethylierenden Agens 5-Azacytidin sowie mit Trichostatin A behandelt und mit entsprechenden Methylierungs- und Expressionsanalysen (Reverse-Transkriptase-PCR) kombiniert.

## Reverse-Transkriptase-PCR

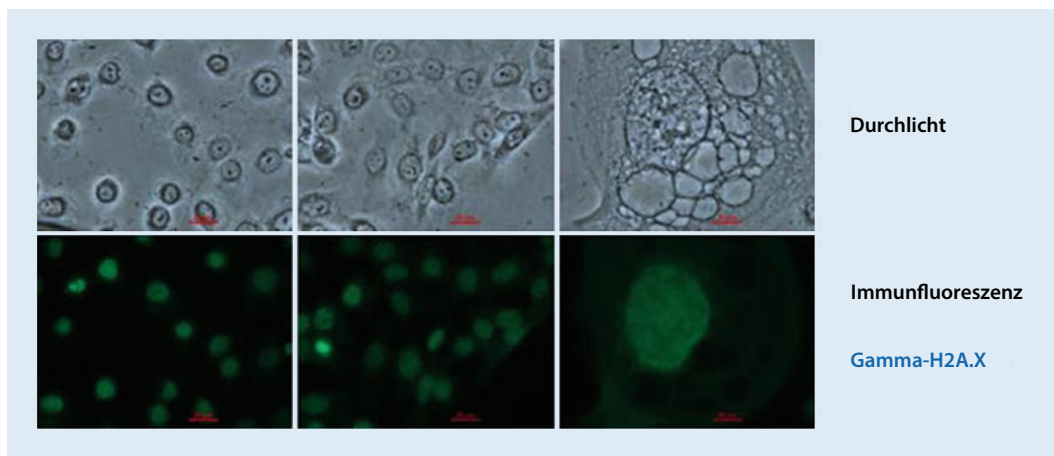
Für die Expressionsanalyse von *FHIT* wurde eine Reverse-Transkriptase(RT)-PCR durchgeführt, und zur Quantifizierung wurde der Vergleich zum ubiquitär exprimierten *Housekeeping-Gen* Beta-Aktin genutzt. Die 133 Basenpaar(bp)-Bande steht für *FHIT*, und die 511 bp-Bande stellt das PCR-Produkt für Beta-Aktin dar (■ Abb. 2).

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

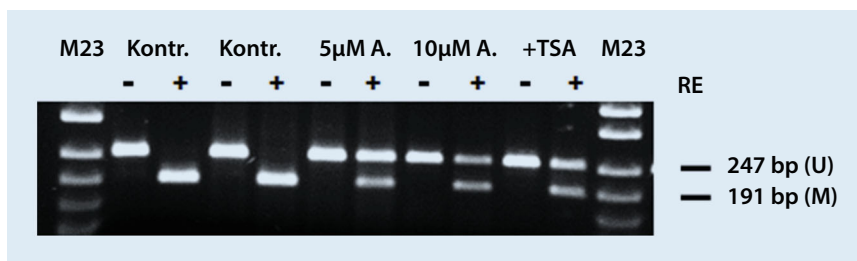
Bei Verlust der *caretaker*-Funktion des Tumorsuppressorproteins FHIT kann es zu DNA-Doppelstrangbrüchen und genomischer Instabilität kommen [28]. Um diese in Abhängigkeit von der Zeit, in welcher die SZ95-Sebozyten unter standardisierten In-vitro-Kulturbedingungen vermehrt wurden, zu dokumentieren, wurde eine Immunfärbung mit dem Anti-



**Abb. 3** ◀ Immunzytochemische Färbung von SZ95-Sebozyten der Passagezahl P35 mit dem  $\gamma$ -H2A.X-Antikörper. Es zeigt sich eine schwache detektierbare FITC-Fluoreszenz (Maßstab: 20  $\mu$ m)



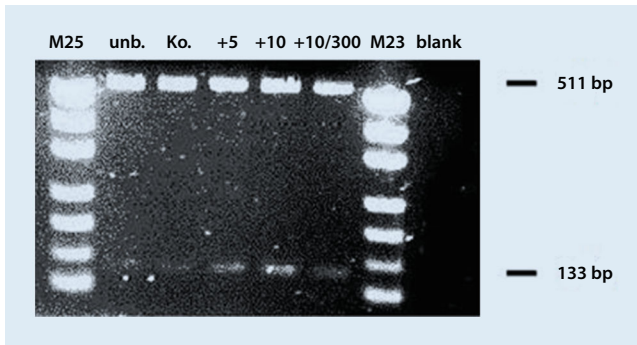
**Abb. 4** ◀ Immunzytochemische Färbung von SZ95-Sebozyten der exemplarisch ausgewählten späten Passagezahl P73 mit dem  $\gamma$ -H2A.X-Antikörper. Hier ist eine deutliche Fluoreszenz durch zahlreiche Foci erkennbar (Maßstab: 20  $\mu$ m)



**Abb. 5** ▲ Methylierungsanalyse (Combined Bisulfite Restriction Analysis): Als experimentell-therapeutischer Ansatz sollte die Re-Expression von *FHIT* geprüft werden. Dazu wurden Zellen hoher Passage mit dem demethylierenden Agens 5-Azacytidin und dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A behandelt. Auswirkungen wurden durch Analyse des Methylierungsstatus geprüft. Das gelelektrophoretische Ergebnis verdeutlicht, dass sich durch die Behandlung der Sebozyten bereits methylierte DNA zum Teil wieder demethylieren ließ. M23 Marker M23, SZ95 P123 SZ95-Sebozyten der Passagezahl 123, Kontr. Kontroll-DNA SZ95, RE Verdau durch das methylierungssensitive Restriktionsenzym *Bst*UI, + Zugabe des Restriktionsenzym, – keine Zugabe des Restriktionsenzym, 5  $\mu$ M A. mit 5  $\mu$ M Azacytidin behandelte SZ95 P123 ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau, 10  $\mu$ M A. mit 10  $\mu$ M Azacytidin behandelte SZ95 P123 ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau, +TSA mit 10  $\mu$ M Azacytidin und 300 nm Trichostatin A behandelte SZ95 P123 ohne bzw. nach *Bst*UI-Verdau, 247 bp (U) unmethyliert-spezifisches PCR-Produkt, 191 bp (M) methyliert-spezifisches PCR-Produkt

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-Reparaturmechanismen [4]. Die Auswertung von  $\gamma$ -H2A.X-Foci ist die sensitivste Methode, um DNA-Doppelstrangbrüche zu detektieren [16]. ■ **Abb. 3** und **4** zeigen repräsentative Ergebnisse.

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 [25]. 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 (■ **Abb. 3** und **4**). Es lässt sich feststellen, dass es im Laufe der Kultivierung der Sebozyten vermehrt zu DNA-



**Abb. 6** ▲ Reverse-Transkriptase(RT)-PCR nach der Behandlung der Sebozyten mit 5-Azacytidin und Trichostatin A. M23 Marker M23, SZ95 P123 SZ95-Sebozyten der Passage 123, *unb.* unbehandelte, SZ95 P123 *Kontr.* Kontroll-DNA SZ95 P123, +5 mit 5  $\mu$ M Azacytidin behandelte SZ95 P123, +10 mit 10  $\mu$ M Azacytidin behandelte SZ95 P123, +10/300 mit 10  $\mu$ M Azacytidin und 300 nM Trichostatin A behandelte SZ95 P12, *blank* Ansatz ohne PCR-Produkt

Doppelstrangbrüchen kam und diese mit der Zeit zunahmen.

### Experimentell-therapeutischer Ansatz

Durch die Behandlung mit 5-Azacytidin und dem Histon-Deacetylase-Inhibitor Trichostatin A konnten eine Abnahme der Methylierung der *FHIT*-Promotorregion (▣ Abb. 5) sowie eine Re-Expression von *FHIT*-Transkripten beobachtet werden (▣ Abb. 6).

Durch die Ergebnisse in der ▣ Abb. 5 wird klar, dass sich durch die Behandlung der SZ95-Zellen mit der demethylierenden Substanz 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 (M), wurde durch die Behandlung in die unmethylierte Form umgewandelt, was deutlich wird anhand der zunehmenden Intensität der Bande von 247 bp (U) in Relation zum kleineren methylierungsspezifischen Produkt (M). Im Anschluss an diese Untersuchungen wurde eine Expressionsanalyse durch Reverse-Transkriptase-PCR durchgeführt, um die umgekehrte Proportionalität der *FHIT*-Expression abhängig von seinem Promotor-Methylierungsstatus zu verdeutlichen und eine Re-Expression des *FHIT*-Gens zu bestätigen [10].

Die ▣ Abb. 6 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  $\mu$ M Azacytidin zu sein. Bei

der Betrachtung der Demethylierungseffekte der COBRA-Analyse (▣ Abb. 5) ergibt die Konzentration von 10  $\mu$ M Azacytidin vergleichsweise ähnliche Wirkungen wie in Kombination mit Trichostatin A.

### Diskussion

#### Epigenetische Inaktivierung von *FHIT* als früher Schritt in der Tumorgenese von Sebozyten

Zwei Aspekte mit klinischer Relevanz sollten als Fazit dieser Studie besonders hervorgehoben werden. Zum einen hat diese Analyse gezeigt, dass der den Promotor des *FHIT*-Gens inaktivierende Methylierungsmechanismus, der in TDK-Zellen von MRTES-Patienten bereits zuvor von uns beschrieben worden war, sich in der Sebozytenpopulation im Zuge der prolongierten In-vitro-Kultur bestätigen und durchsetzen konnte. Dieser Befund stützt sich auf 2 unabhängige Kultivierungsansätze der SZ95-Zellen. Darüber hinaus ergab die parallele Kultivierung menschlicher Vorhautfibroblasten auch bei sehr hohen Passagenzahlen keinerlei Hinweise auf eine aberrante Hypermethylierung des *FHIT*-Genpromotors. Somit könnte dieser Methylierungsprozess des *FHIT*-Gens zelltypspezifisch gesteuert sein oder aber auch zelltypabhängig klonale Wachstumsvorteile mit sich bringen. Es ist anzunehmen, dass zunächst eine genomweite Hypermethylierung stattfindet, die nach dem Zufallsprinzip zur Inaktivierung verschiedener Tumorsuppressorgene führt. Trifft dieser epigenetische Inaktivierungsvorgang in Sebo-

zyten auf das *FHIT*-Gen, so werden Folgeprozesse initiiert, in deren Verlauf diese Zellen zunehmend Mutationen akquirieren, die zusätzliche Wachstumsvorteile und letztlich eine positive Selektion beinhalten [2]. Eine von mehreren möglichen Folgeerscheinungen des Verlustes der Tumorsuppression von *FHIT* führt, wie bereits früher beobachtet [28], zu einem vermehrten Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen (s. ▣ Abb. 3 und 4) und somit zu einer Störung der genomischen Integrität.

Beispiele für nachfolgende Mutationen, die vorgeschädigte Sebozyten weiter entarten lassen, ist die Ausschaltung der *BRCA1/2*-Gene, die essenzielle molekulare Bausteine für die Präzisionsreparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen durch homologe Rekombination liefern. Aber auch spezielle dominant-negative Mutationen an p53, des „Wächters des Genoms“, wurden in TDK nachgewiesen. Sie führen zu einer tolerierten Akkumulation multipler genetischer Veränderungen im zellulären Genom infolge inaktiver Überwachungsmechanismen, die Reparaturfehler sowie eine gestörte Apoptose- und Zellzykluskontrolle einschließen [1].

#### Genetische Veränderungen in menschlichen Zellen durch In-vitro-Kultivierung

Als zweiter wichtiger Aspekt dieser Untersuchungen sei auf die latente Instabilität des zellulären Genoms aus genetischer und epigenetischer Sicht hingewiesen. Zellen in definierten synthetischen Medien stellen kein starres biologisches System dar. Lange galten in vitro kultivierte (Stamm-)Zellen als unerschöpfliche Quelle für Forschungsmaterial mit therapeutischem Potenzial in der regenerativen Medizin, wobei angenommen wurde, dass sich hier ausnahmslos alle zellbiologischen Aspekte auf die Situation in vivo übertragen lassen. Mittlerweile gaben jedoch zahlreiche Studienergebnisse Anlass, den bedenkenlosen Umgang mit derartigen Zellen zu hinterfragen. Aufmerksamkeit erregte zuletzt der Befund, dass pluripotente, unter In-vitro-Bedingungen kultivierte (immortalisierte) Stammzellen Mutationen im Tumorsuppressorgen p53 in Form einzelner Basenaustausche erwerben können, welche die Tumorgenese be-

günstigen [2, 20]. So konnte durch serielle Mutationsanalysen bestätigt werden, dass der Anteil der Zellen mit einer Basensubstitution im Tumorsuppressorgen p53 mit laufender Passagierung unter standardisierten Wachstumsbedingungen innerhalb der Population zunahm [20]. 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 [2]. Genetische Veränderungen, welche einen Selektionsvorteil mit sich bringen, sind die Hauptgründe für die Entstehung von Malignomen. Dahingehende Genmutationen können Zellen unter den streng selektiven Bedingungen, wie sie in der In-vitro-Kultur zu finden sind, einen Wachstumsvorteil geben [17]. Der Großteil aller malignen Tumoren 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 [21]. Da das p53-Gen nicht nur dominant-negativ aktiviert werden kann, sondern stellvertretend für eines von zahlreichen klassischen Tumorsuppressorgenen steht, ergibt sich hier die Frage, inwieweit auch andere tumorsupprimierende Gene unter länger andauernder In-vitro-Kultur derartige Veränderungen erfahren [17]? Bereits frühere Studien verdeutlichten, dass sich selbst standardisierte In-vitro-Kulturbedingungen artifiziell auf menschliche Zellen auswirken und einen derartigen Selektionsstress ausüben können, welcher die Entstehung von Mutationen und malignen Transformationen begünstigen kann [2, 17]. Unsere Daten bestätigen in dem hier präsentierten In-vitro-Modell einer Sebozytenlinie, dass die Abschaltung des FHIT-Gens in Übereinstimmung mit Untersuchungen an Knockout-Mäusen [6] ein sehr frühes und spezifisches Ereignis in der Tumorgenese von TDK ist. Bemerkenswerterweise erfolgte in Zellkultur die Inaktivierung von FHIT durch den epigenetischen Mechanismus der Promotor-Methylierung, dem jedoch durch Einsatz demethylierender Substanzen therapeutisch entgegengewirkt werden konnte.

## Ausblick

Die Studie sieht sich als Beitrag zur Aufklärung der Tumorgenese von Talgdrüsenkarzinomen. Da sich das FHIT-Gen in einem Großteil von Talgdrüsenkarzinomen verändert zeigt, könnten FHIT-defiziente SZ95-Sebozyten als geeignetes präklinisches Modell für die Erforschung von individualisierten Therapieansätzen dienen [26].

### Fazit für die Praxis

**Talgdrüsenkarzinome treten am häufigsten am Oberlid als solitäre, noduläre Tumoren mit oft jahrelangem Bestehen in Erscheinung. Da morphologische Ähnlichkeiten zu chronisch entzündlichen Vorgängen des Lids bestehen, sind feingewebliche Untersuchungen zur Differenzialdiagnose indiziert. Ein diagnostiziertes TDK sollte mit Blick auf ein Muir-Torre-Syndrom ein internistisches Screening auf mögliche synchrone oder metachrone Neoplasien veranlassen.**

### Korrespondenzadresse



#### Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. habil.

#### Wolfgang G. Ballhausen

Institut für Molekulare Medizin, Sektion Molekulare Onkologie, MLU Halle-Wittenberg Kurt-Mothes Str. 3a, 06120 Halle (Saale), Deutschland  
wolfgang.ballhausen@medizin.uni-halle.de

**Funding.** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

## Einhaltung ethischer Richtlinien

**Interessenkonflikt.** M. Jotzo, C.C. Zouboulis und W.G. Ballhausen geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Für diesen Beitrag wurden von den Autoren keine Studien an Menschen oder Tieren durchgeführt. Für die aufgeführten Studien gelten die jeweils dort angegebenen ethischen Richtlinien.

**Open Access.** Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden.

Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen.

Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

## Literatur

1. Becker K, Goldberg M, Helmbold P, Holbach LM, Loeffler KU, Ballhausen WG (2008) Deletions of BRCA1/2 and p53 R248W gain-of-function mutation suggest impaired homologous recombination repair in fragile histidine triad-negative sebaceous gland carcinomas. *Br J Dermatol* 159:1282–1289
2. Chanock S (2017) Subclone wars. *Nature* 545:160–161
3. Conway RM, von Moller A, Ballhausen W, Jünnemann 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* 42:674–678
4. Cowell IG, Sunter NJ, Singh PB, Austin CA, Durkacz BW, Tilby MJ (2007)  $\gamma$ H2AX foci form preferentially in euchromatin after ionizing radiation. *Plos One* 2:1057–64
5. Finan MC, Connolly SM (1984) Sebaceous gland tumors and systemic disease: a clinicopathologic analysis. *Medicine* 63:232–242
6. Fong LY, Fidanza V, Zanesi N, Lock LF, Siracusa LD, Mancini R, Siprashvili 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* 97:4742–4747
7. 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
8. 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
9. 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
10. 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
11. Holbach LM, von Moller A, Decker C, Jünnemann AGM, Rummelt-Hofmann C, Ballhausen WG (2002) Loss of fragile histidine triad (FHIT) expression and microsatellite instability in periocular sebaceous gland carcinoma in patients with Muir-Torre syndrome. *Am J Ophthalmol* 134:147–148
  12. Hosseini SA, Horton S, Saldivar JC, Miuma S, Stampfer MR, Heerema NA, Huebner K (2013) Common chromosome fragile sites in human and murine epithelial cells and FHIT/FRA3B loss-induced global genome instability. *Genes Chromosomes Cancer* 52:1017–1029
  13. Huebner K, Croce CM (2003) Cancer and the FRA3B/ FHIT fragile locus: it's a HIT. *Br J Cancer* 88:1501–1506
  14. Huebner K, Hadaczek P, Siprashvili 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* 1332:65–70
  15. 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
  16. Ismail IH, Hendzel MJ (2008) The  $\gamma$ -H2A.X: is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? *Environ Mol Mutagen* 49:73–82
  17. 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
  18. Jotzo M (2019) Epigenetische Veränderungen am Promotor des Fragilen Histidin Trias (FHIT) – Gens in menschlichen Sebozyten unter dem Einfluss der in-vitro Kultur. Martin-Luther Universität, Med. Fakultät, Halle (Dissertation)
  19. Licchesi JD, Herman JG (2009) Methylation-specific PCR. *Methods Mol Biol* 507:305–323
  20. Merkle FT, Ghosh S, Kamitaki N, Mitchell J, Avior Y, Mello C, Kashin S, Mekhoubad S, Illic 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
  21. Nowell PC (1976) The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194:23–8
  22. Palumbo E, Tosoni E, Matricardi L, Russo A (2013) Genetic instability of the tumor suppressor gene FHIT in normal human cells. *Genes Chromosomes Cancer* 52:832–844
  23. Pickford MA, Hogg FJ, Fallowfield ME, Webster MH (1995) Sebaceous carcinoma of the periorbital and extraorbital regions. *Br J Plast Surg* 48:93–6
  24. Ponti G, Losi L, Pedroni M, Lucci-Cordisco E, Di Gregorio C, Pellacani G, Seidenari S (2006) Value of MLH1 and MSH2 mutations in the appearance of Muir-Torre syndrome phenotype in HNPCC patients presenting sebaceous gland tumors or keratoacanthomas. *J Invest Dermatol* 126:2302–2307
  25. 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
  26. Rokohl AC, Koch KR, Mor JM, Loreck N, Schlaak M, Mauch C, Bechrakis NE, Mohi A, Kakkassery V, Heindl LM (2020) Personalized medicine in the treatment of periocular tumors: targeted treatment and use of immune checkpoint inhibitors. *Ophthalmologie* 117:521–527

## Epigenetic changes in the promoter of the fragile histidine triad (FHIT) gene in human sebocytes under the influence of in vitro culture

**Background:** Due to the lack of tumor suppressor function of the fragile histidine triad (FHIT) gene product, sebaceous gland carcinomas can develop.

**Objective:** The model of the sebocyte cell line SZ95 was used to identify methylated CpG islands at the 5'-end of the FHIT gene and the decrease of gene expression as well as the increase of double-stranded (ds) DNA breaks were examined.

**Material and methods:** Methylation, immunofluorescence analysis, promotor sequencing and treatment of SZ95 cells with 5-azacytidine/trichostatin A (TSA).

**Results:** The cultivation was accompanied by an increasing methylation of the CpG islands, a decrease of the FHIT gene expression and an accumulation of ds-DNA breaks. Treatment with 5-azacytidine/TSA showed a decrease in DNA methylation and a re-expression of FHIT transcripts.

**Discussion:** Epigenetic changes in the cellular genome are caused by in vitro cell culture. Consequently, a positive selection of sebocytes with an epigenetically inactivated FHIT locus occurs.

### Keywords

Tumor suppressor gene · Fragile histidine triad gene · Epigenetics · DNA methylation · In vitro cultivation

27. Tanaka H, Shimada Y, Harada H, Shinoda M, Hatoooka 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
28. 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
29. 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
30. 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