

# **Untersuchungen zur epigenetischen Regulation der humanen *Cancer-Testis* MAGE-A Gene**

Dissertation

Zur Erlangung der Würde des Doktors der Naturwissenschaften  
des Fachbereichs Biologie, der Fakultät für Mathematik,  
Informatik und Naturwissenschaften,  
der Universität Hamburg

vorgelegt von

**Josefine Tadewaldt**

aus Löbau

Hamburg 2012

1. Dissertationsgutachter:

Herr Prof. Dr. Klaus Pantel  
Institut für Tumorbiologie  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Martinistr. 52  
20246 Hamburg

2. Dissertationsgutachter:

Herr Prof. Dr. Udo Wienand  
Biozentrum Klein Flottbek - Molekularbiologie  
Ohnhorststr. 18  
22609 Hamburg

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Herrn Professor Dr. K. Pantel  
Weitere Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. U. Wienand

Tag der Disputation: 02. März 2012

Hamburg, den 17. Februar 2012



Professor Dr. J. Fromm  
Vorsitzender des Promotionsausschusses

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass ich bisher keine Promotionsversuche unternommen habe. Des Weiteren versichere ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und keine anderen als die darin angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Von mir im Rahmen dieser Dissertation nicht durchgeführte Arbeiten sind entsprechend gekennzeichnet.

Josefine Tadewaldt

Hamburg, den 03.Januar 2012

**Für Emma und Thomas**

## **Danksagung**

Ich möchte mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. Klaus Pantel bedanken, der mir die Gelegenheit gab diese Arbeit in seinem Institut anzufertigen.

Herrn Prof. Dr. Udo Wienand danke ich für seine Bereitschaft, diese Dissertation als Vertreter des Fachbereiches Biologie zu begutachten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Bettina, die mich in der Anfangsphase intensiv in die Methoden eingelernt hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Besondere Anerkennung gebührt ihr, da sie für die Ausführung der radioaktiven Arbeiten während meiner Schwangerschaft zuständig war. Durch ihre Unterstützung in Teilbereichen meines Projektes hat sie zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein großer Dank geht auch an die übrigen Mitarbeiter des Institutes, die für die freundliche Arbeitsatmosphäre und die tatkräftige Unterstützung im Laboralltag sorgten. Stellvertretend seien hier Antje, Carina, Conny, Roswitha, Christin und Caro genannt.

Ganz herzlich möchte ich mich bei Michaela für das kritische Lesen und Korrigieren dieser Arbeit sowie die unermüdliche Hilfsbereitschaft bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gebührt meinem Freund Thomas. Ich weiß, was ich an dir habe! Und nicht zu vergessen unser Sonnenschein Emma, die mit ihrem Lächeln und ihrer bezaubernden Art unser Leben tiefgründig verändert hat.

Mein letzter und wohl wichtigster Dank geht an meine Familie, die mir in den letzten Jahren immer wieder Mut zugesprochen haben niemals aufzugeben.

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Krebserkrankungen und die Entstehung sowie Metastasierung von Tumoren.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Krebserkrankungen.....	1
1.1.2 Karzinogenese .....	1
1.1.3 Metastasierung und Relevanz der mikrometastatischen Zelllinien .....	2
<b>1.2 Tumorimmunologie .....</b>	<b>4</b>
<b>1.3 Cancer-Testis Antigene (CTA) .....</b>	<b>4</b>
1.3.1 Die MAGE ( <i>melanoma-associated antigen</i> )-Antigenfamilie.....	5
1.3.2 BORIS ( <i>Brother of the Regulator of Imprinted Sites</i> ) .....	9
<b>1.4 Die basale Transkription eukaryotischer Gene .....</b>	<b>13</b>
1.4.1 Die basale Transkriptionsmaschinerie .....	13
1.4.2 Regulatorische Transkriptionsfaktoren.....	15
1.4.3 Die Ets-Familie der Transkriptionsfaktoren .....	16
1.4.4 Die Familie der Sp-Faktoren.....	18
<b>1.5 Epigenetik .....</b>	<b>20</b>
<b>1.6 DNA-Methylierung.....</b>	<b>20</b>
1.6.1 DNA-Methylierung in normalen Zellen .....	20
1.6.2 DNA-Methylierung in Tumoren .....	21
<b>1.7 Chromatin-Remodelling und Histonmodifikationen .....</b>	<b>22</b>
1.7.1 Histon Methyltransferasen .....	23
1.7.2 Histonacetyltransferasen (HAT).....	24
1.7.3 Histondeacetylasen (HDAC).....	25
<b>1.8 Strategien zur Induktion reprimierter Gene.....</b>	<b>25</b>
<b>1.9 Ziele der Arbeit.....</b>	<b>30</b>
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>32</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>32</b>
2.1.1 Chemikalien.....	32
2.1.2 Zellkulturmaterialien .....	34
2.1.3 Komplettierte Medien für die Zellkulturen.....	34
2.1.4 Bakteriennährmedien .....	35
2.1.5 Lösungen und Puffer.....	35
2.1.6 Enzyme und Reaktionspuffer.....	36
2.1.7 Kits.....	36
2.1.8 Vektoren, Expressions- und Reporterplasmide.....	37

2.1.9	Antikörper .....	38
2.1.10	Primer .....	39
2.1.11	Standardmarker .....	42
2.1.12	Eukaryotische Zellen.....	42
2.1.13	Bakterienstämme .....	43
2.1.14	Radioaktivität.....	43
2.1.15	Verbrauchsmaterialien .....	43
2.1.16	Geräte.....	44
2.1.17	Software .....	45
<b>2.2</b>	<b>Methoden .....</b>	<b>46</b>
2.2.1	Zellkulturmethoden.....	46
2.2.2	Molekularbiologische Methoden .....	50
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden .....	62
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>74</b>
<b>3.1</b>	<b>BORIS-Expression in verschiedenen Krebszelllinien vor und nach Behandlung mit Aza und/oder TSA .....</b>	<b>74</b>
<b>3.2</b>	<b>BORIS- und MAGE-A1-, -A2-, -A3- und -A12-Expression in den mikrometastatischen Zelllinien vor und nach Behandlung mit Aza .....</b>	<b>76</b>
<b>3.3</b>	<b>Regulation des MAGE-A1-Promotors durch Transkriptionsfaktoren und epigenetische Faktoren.....</b>	<b>77</b>
3.3.1	Die MBD1v1-vermittelte Repression des MAGE-A1-Promotors kann nicht durch Sp1 aufgehoben werden.....	78
3.3.2	Sp1 inhibiert die BORIS-vermittelte Aktivierung des MAGE-A1-Promotors in der mikrometastatischen Zelllinie des Brustkarzinoms (BCM1) .....	80
<b>3.4</b>	<b>Studien über die MAGE-A mRNA-Expression .....</b>	<b>83</b>
<b>3.5</b>	<b>Hemmung der exogenen BORIS- sowie endogenen MAGE-A1-Expression mit BORIS-spezifischer shRNA.....</b>	<b>87</b>
<b>3.6</b>	<b>Untersuchungen zum Einfluss des Demethylierungsmittels Aza und dem exogenem BORIS-Protein auf das DNA-Methylierungsmuster des MAGE-A1- und -A2-Promotors .....</b>	<b>88</b>
<b>3.7</b>	<b><i>in vivo</i> Untersuchungen der an den MAGE-A1-Promotor gebundenen Histone .....</b>	<b>91</b>
<b>3.8</b>	<b>Herstellung der rekombinanten Proteine BORIS und Sp1 .....</b>	<b>94</b>
<b>3.9</b>	<b><i>In vitro</i> Interaktionsstudien der rekombinanten Proteine mit dem MAGE-A1-Promotor .....</b>	<b>95</b>
3.9.1	Nachweis der Proteine Ets-1 und Sp1 im Zellkern-Extrakt der mikrometastatischen Zelllinien LCM1 und PCE1 .....	96
3.9.2	<i>In vitro</i> Bindung der rekombinanten Proteine BORIS und Sp1 an die	



MAGE-A1 Promotorregion .....	97
3.9.3 BORIS kann nach Bindung an den MAGE-A1-Promotor durch die Sp1 Konsensussequenz kompetiert werden .....	98
3.9.4 BORIS und Sp1 konkurrieren möglicherweise um dieselbe Bindungsstelle innerhalb des MAGE-A1 Gens .....	99
<b>3.10 Identifizierung von Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors Sp1     und BORIS .....</b>	<b>102</b>
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>104</b>
4.1 Genexpression von MAGE-A und BORIS in verschiedenen Krebszelllinien und mikrometastatischen Zelllinien .....	105
4.2 Regulation der MAGE-A-Genexpression durch Transkriptionsfaktoren und epigenetische Faktoren.....	108
4.3 Funktionelle Untersuchungen zur Involvierung von BORIS in die Regulation von MAGE-A1 .....	110
4.4 Untersuchungen der Änderungen des DNA-Methylierungsmusters durch BORIS oder Aza .....	113
4.5 Einfluss von BORIS auf die Modifikationen der am MAGE-A1-Promotor gebundenen Histone .....	114
4.6 Allgemeine Schlussfolgerung.....	115
4.7 Ausblick .....	115
<b>5 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>118</b>

## Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigenpräsentierende Zelle
Aza	5-Aza-2'-deoxycytidin
bp	Basenpaare
BORIS	<i><u>B</u>rother <u>o</u>f the <u>R</u>egulator of <u>I</u>mprinted <u>S</u>ites</i>
BSA	Rinderserumalbumin
ca.	circa
cDNA	<i>complementary</i> DNA
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CIAP	<i>calf intestine alkaline phosphatase</i>
CTA	<i><u>C</u>ancer-<u>T</u>estis <u>A</u>ntigene</i>
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
DBD	<u>D</u> NA- <u>B</u> indungs <u>d</u> omäne
del	Deletion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferas
dNTP	Desoxy-Nukleotid-Triphosphat
dsRNA	doppelsträngige Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
DTZ	<u>d</u> isseminierte <u>T</u> umor <u>z</u> elle
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor ( <i><u>e</u>pidermal <u>g</u>roth <u>f</u>actor</i> )
EGFR	epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor ( <i><u>e</u>pidermal <u>g</u>roth <u>f</u>actor <u>r</u>eceptor</i> )
EMSA	<i><u>E</u>lectrophoretic <u>M</u>obility <u>S</u>hift <u>A</u>ssay</i>
EST	<i>Expressed Sequence Tags</i>
FCS	Fötales Kälberserum
FGF	Fibroblasten Wachstumsfaktor ( <i><u>f</u>ibroblast <u>g</u>rowth <u>f</u>actor</i> )
For	<i>forward</i>
g	Gramm/ Erdbeschleunigung
GTF	generelle Transkriptionsfaktoren ( <i><u>g</u>enerell <u>t</u>ranscription <u>f</u>actors</i> )
h	Stunde

---

HDAC	Histondeacetylase
HDACI	Histondeacetylase-Inhibitor
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N`-2
HKT	Histon-Lysin-Methyl-Transferasen
HLT	Helix-Loop-Helix
HMT	Histon Methyltransferase
HTH	Helix-Turn-Helix
ICR	<i>Imprinting Control Region</i>
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani
M	Molar
mA	Milliampere
MAGE	<i>Melanoma-associated antigen</i>
MBD	Methyl-CpG-Bindungsdomäne
MHD	<i>MAGE homolgy domain</i>
min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mut	Mutante
NAD	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NE	Zellkern-Extrakt (nuclear extract)
ng	Nanogramm
NLS	nukleares Lokalisationssignal
nm	Nanometer
NP-40	Nonidet P-40
nt	Nukleotid
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
OD	optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PRMT	Protein-Arginin-Methyl-Transferasen
qRT-PCR	quantitative <i>realtime</i> PCR

Rev	<i>reverse</i>
RKI	Robert-Koch Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehung pro Minute
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RTF	regulatorischer Transkriptionsfaktor ( <i>regulatory transcription factors</i> )
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
SAM	<u>S</u> -Adenosylmethionin
Sc	Spermatozyten
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
sec	Sekunde
shRNA	<i>small hairpin RNA</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SG	Spermatogonien
TAE	Tris-Acetat EDTA Elektrophorese Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-Ethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TK	Thymidinkinase
TRD	Transkriptions-Repressordomäne
tRNA	Transfer Ribonukleinsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	t-Octylphenoxypolyethoxy-Ethanol
TSA	Trichostatin A
TSG	Tumorsuppressorgen
TSP	Tumorsuppressorprotein
U	<i>Units</i>
UKE	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
UV-Licht	ultraviolettes Licht
V	Volt
v.a.	vor allem
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen

WB	Western Blot
wt	Wildtyp
z. B.	zum Beispiel
ZF	Zink-Finger

## Zusammenfassung

Während der Karzinogenese spielen epigenetische Veränderungen eine zentrale Rolle, die durch eine Vielzahl verschiedener Faktoren gesteuert werden. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf der Regulation der *Cancer-Testis* Antigenfamilie MAGE-A, die häufig in verschiedenen Tumorentitäten exprimiert wird. Aufgrund ihrer Tumorspezifität könnten sie für die antitumorale Immuntherapie relevant sein. Jedoch ist der genaue Regulationsmechanismus der MAGE-A Gene bisher noch nicht vollständig geklärt. So könnte neben der DNA-Methylierung auch ein direkter Einfluss des *Cancer-Testis* Antigens BORIS auf die Änderung des Methylierungsmusters vorliegen. Daher wurde in der vorliegenden Arbeit die Rolle von BORIS zusammen mit Transkriptionsfaktoren sowie epigenetischen Faktoren auf die Expression der tumorassoziierten MAGE-A Antigene (A1, A2, A3 und A12) untersucht. Außerdem sollte zum besseren Verständnis geklärt werden, ob BORIS Einfluss auf die epigenetischen Mechanismen der DNA-Methylierung und der Histonmodifizierungen an den MAGE-A-Promotoren nehmen kann.

Zunächst wurde die Expression von BORIS und/oder MAGE-A in verschiedenen Krebszelllinien (Brust, Prostata, Leukämie, Leber und Kolon) und den mikrometastatischen Zelllinien (Brust-, Lungen- sowie Prostatakarzinom) mittels semiquantitativer RT-PCR untersucht. Dabei zeigte sich, dass die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte BORIS-Expression nicht mit den durch Wischnewski et al. durchgeführten MAGE-A-Expressionsanalysen korrelierte [1]. Somit kann ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression der MAGE-A Gene und dem BORIS Gen ausgeschlossen werden. Jedoch muss erwähnt werden, dass bei der Expression der MAGE-A Gene in den BORIS-negativen Zelllinien nicht alle BORIS-Splicevarianten berücksichtigt wurden. Nach Zugabe des DNA-Demethylierungsmittels 5-Aza-2'-deoxycytidin (Aza) und/oder des Histondeacetylase-Inhibitors Trichostatin A (TSA) kam es auch in den zuvor negativen Zelllinien sowohl zu einer BORIS- als auch zu einer MAGE-A-Expression. Dies lässt auf eine Inhibierung der Expression durch Hypermethylierung der Promotorregionen schließen.

In den folgenden transienten Transfektionsstudien wurden MAGE-A-negative Zelllinien sowohl mit Reporter- als auch mit verschiedenen Expressionsplasmiden transfiziert, um den regulatorischen Einfluss von BORIS zusammen mit weiteren Faktoren auf die MAGE-A Genexpression zu ermitteln. Dabei zeigte sich, dass die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp1 die MAGE-A-Expression in der Brustkrebszelllinie und den mikrometastatischen Zelllinien heraufregulieren konnten. Jedoch blieb es beiden Faktoren versagt, die MBD1v1-vermittelte Repression aufzuheben. Vielmehr war BORIS

in der Lage die hypermethylierten MAGE-A-Promotoren zu stimulieren, was sich in einer gesteigerten MAGE-A-Aktivität widerspiegelte. Eine gemeinsame Überexpression des Transkriptionsfaktors Sp1 und BORIS konnte die BORIS-vermittelte MAGE-A-Expression nicht weiter stimulieren. Stattdessen wurde ein reprimierender Effekt beobachtet. Um die molekulare Ursache für die Repression der BORIS-vermittelten MAGE-A Aktivierung durch Sp1 zu ergründen, wurden EMSAs (*electro mobility shift assay*) durchgeführt. Die Tatsache, dass beide Proteine an die potentiell gleiche Bindungsstelle *upstream* des unmethylierten MAGE-A1-Promotors binden, unterstreicht die Bedeutung der Beobachtung.

Als weitere potentielle Mechanismen der entgleisten Regulation der MAGE-A Gene durch BORIS wurde die Promotormethylierung sowie Aspekte der Chromatinstruktur untersucht. Mit Hilfe der Methoden der Bisulfit-Sequenzierung und der Chromatin-Immunpräzipitation wurde gezeigt, dass BORIS keinen direkten molekularen Einfluss auf die epigenetischen Mechanismen der DNA-Methylierung und die Modifikationen der am MAGE-A1-Promotor gebundenen Histone hat. Hinsichtlich dieser Ergebnisse kommt BORIS im Rahmen dieser Arbeit nicht als potentielles Demethylierungagens in Frage.

Im Zuge durchgeführter Protein-Protein-Interaktionsstudien konnten auch molekulare Zusammenhänge mit dem TATA-Box-bindenden Protein (TBP) und den Transkriptionsfaktoren sowie epigenetischen Faktoren bezüglich der Aktivierung der MAGE-A-Promotoren aufgedeckt werden. Durch diese Methode gelang es, eine direkte Interaktion von Sp1 mit Ets-1, MBD1v1 als auch der N-terminalen Domäne des TBP nachzuweisen. Ferner konnte erstmals in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die C-terminale, evolutionär konservierte Domäne des TBP mit BORIS und MBD2b interagiert.

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, dass BORIS in den verschiedenen Tumorentitäten eine Rolle in der MAGE-A Aktivierung spielt. Eine direkte Einflussnahme auf das DNA-Methylierungsmuster der Promotoren und die Histonmodifikationen wurde nicht beobachtet. Vielmehr sind Wechselwirkungen mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und dem basalen Transkriptionsapparat wahrscheinlich entscheidend, um die MAGE-A Gene im Verlauf der Karzinogenese zu regulieren.

# 1 Einleitung

## 1.1 Krebserkrankungen und die Entstehung sowie Metastasierung von Tumoren

### 1.1.1 Krebserkrankungen

In den westlichen Industrieländern ist Krebs neben Herz- und Kreislauferkrankungen eine der Haupttodesursachen. Die aktuellen Veröffentlichungen des Robert-Koch Instituts (RKI) weisen für das Jahr 2006 426.800 Krebsneuerkrankungen sowie 210.930 Krebstote aus [2]. Für 2010 wurden bereits 450.000 Krebsneuerkrankungen prognostiziert, wobei bei Männern das Prostatakarzinom und bei Frauen das Mammakarzinom am häufigsten auftreten. Die häufigsten Todesfälle bei Männern sind bösartige Tumore der Lunge, des Darms und der männlichen Prostata-drüse. Im Vergleich dazu stellen die weibliche Brustdrüse, der Darm und die Lunge die häufigste Todesursache bei Frauen dar [2].

### 1.1.2 Karzinogenese

Die Karzinogenese ist ein komplexer mehrstufiger Prozess, wobei es zur Anhäufung verschiedener genetischer Defekte in zuvor normalen Körperzellen kommt. Die genetischen Veränderungen zerstören das Gleichgewicht, das zwischen der Zellteilung, der Proliferation und dem programmierten Zelltod (Apoptose) vorliegt. Als Folge tritt eine abnormal gesteigerte Proliferation auf und resultiert im Tumorwachstum. Die dabei beobachteten genetischen Veränderungen reichen von Punktmutationen bis hin zum Chromosomenverlust. Durch Mutationen sind vor allem tumorassoziierte Gene betroffen. Im Wesentlichen handelt es sich hierbei um Protoonkogene, wie dem Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR (*epidermal growth factor receptor*), die für das normale Zellwachstum benötigt werden und Tumorsuppressorgene, wie p53, die im Verlauf der Karzinogenese ihre Funktion verlieren.

Der Verlauf der Karzinogenese ist ein langwieriger Prozess und durchläuft aus heutiger Sicht ein Mehrstufenmodell [3]. Dennoch wird heute auch das Dreistufenmodell, bestehend aus der Initiation, der Promotion und der Progression, allgemein akzeptiert. Wobei anzumerken ist, dass in diesem Modell nur die Tumorentstehung, nicht aber die Ursachen erläutert werden.

In der Initiationsphase erfolgt eine irreversible Schädigung des genetischen Materials, wobei Tumorsuppressorgene inaktiviert und Onkogene aktiviert werden. Die potentiell entstandenen Tumorzellen unterscheiden sich phänotypisch nicht von den umliegenden normalen Zellen.

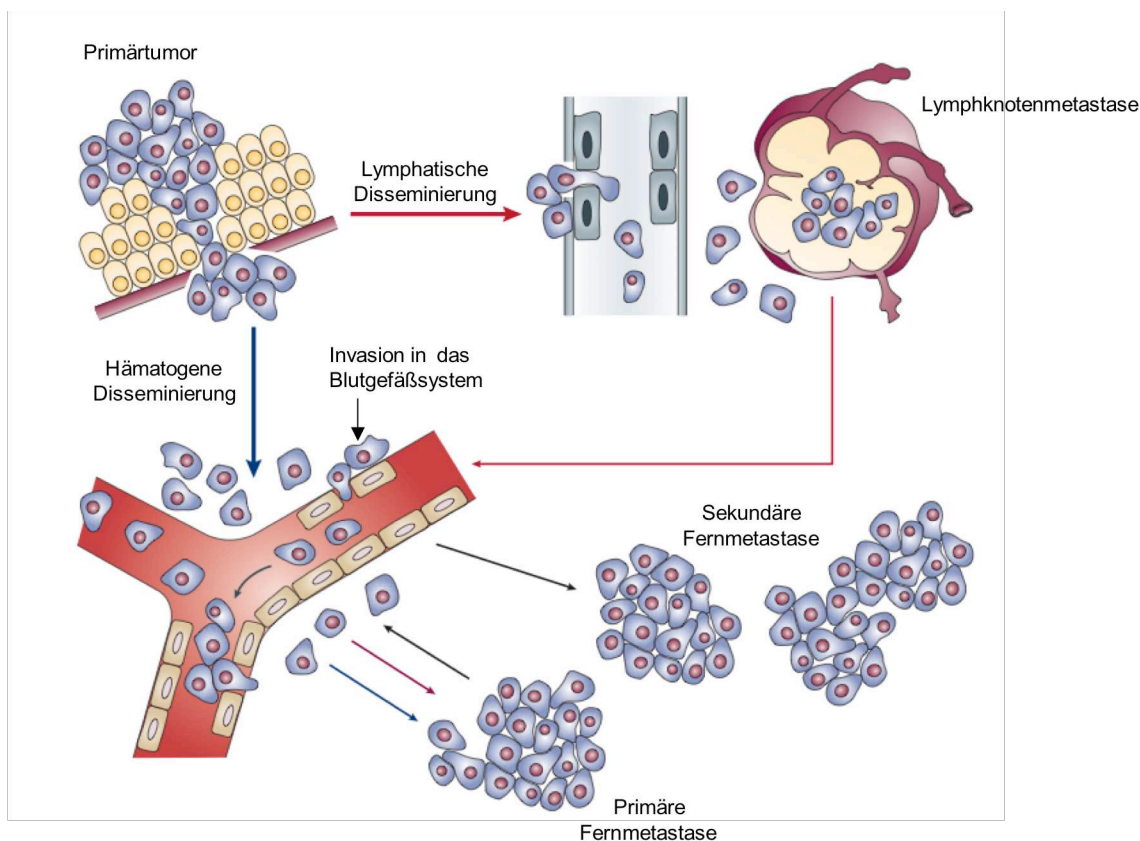


Im folgenden Schritt, der Promotion, etabliert sich der Schaden aus der Initiation. Durch den Verlust der Apoptose kommt es zur Ausbildung morphologisch erkennbarer, präneoplastischer Zellen, den Dysplasien.

Erst in der dritten Phase, der Progression, findet die eigentliche maligne Transformation statt. Dabei kann aufgrund zunehmender genetischer Instabilität aus einem benignen Tumor ein infiltrierender, metastasierender Tumor werden. Die Metastasierung epithelialer Karzinome gilt als häufigste Todesursache.

### **1.1.3 Metastasierung und Relevanz der mikrometastatischen Zelllinien**

Für die Ausbreitung von Tumorzellen aus einem malignen Tumor (Primärtumor) ist das Ablösen aus dem Zellverband eine wichtige Voraussetzung. Mithilfe von proteolytischen Enzymen (beispielsweise Matrix-Metalloproteasen) und dem Verlust von Zelladhäsionsmolekülen (Cadherin und Integrinen) disseminieren die Tumorzellen entweder über das lymphatische System (lymphatische Disseminierung) oder die Blutzirkulation (hämatogene Disseminierung) [4-6]. Diese Tumorzellen werden auch als disseminierte Tumorzellen (DTZ) bezeichnet. Bei der lymphatischen Disseminierung wandern die Tumorzellen zu den Lymphknoten, proliferieren zu soliden Tumoren und streuen zu einem späteren Zeitpunkt aus der Lymphknotenmetastase über das Blut in entfernte Organe, wo sie sekundäre Fernmetastasen ausbilden. Hingegen bei der hämatogenen Disseminierung disseminieren die Tumorzellen direkt vom Primärtumor, der Lymphknotenmetastase oder den Fernmetastasen (Abbildung 1) [6]. Bei dem eben beschriebenen Metastasierungsmodell handelt es sich um einen unidirektionalen Prozess, der inzwischen durch neueste Daten widerlegt wurde. Inzwischen geht man von einem multidirektionalem Prozess, dem *self-seeding*, aus [7]. Dabei disseminieren die Tumorzellen nicht nur in entfernte Organe sondern auch wieder zum Primärtumor zurück.



**Abbildung 1: Modell der Metastasierungskaskade.** Tumorzellen des Primärtumors können über den lymphatischen (roter Pfeil) als auch über den hämatogenen Weg (blauer Pfeil) disseminieren. Bei der lymphatischen Disseminierung erfolgt zunächst eine lokal begrenzte Besiedelung eines benachbarten Lymphknotens mit anschließender Ausbildung eines soliden Tumors. In einem späteren Stadium der malignen Progression können Tumorzellen von der Lymphknotenmetastase in entfernte Organe wandern, um sekundäre Fernmetastasen auszubilden. Im Vergleich dazu kann die hämatogene Disseminierung vom Primärtumor, der Lymphknotenmetastase oder der primären Fernmetastase erfolgen. Modifiziert nach Pantel et al., 2002 [6].

Ein bevorzugter Ort für die Bildung von Fernmetastasen bei Brust-, Lungen- und Prostatakarzinomen ist das Knochenmark [8]. Es stellt derzeit auch das einzige Sekundärorgan dar, aus dem sich DTZ isolieren lassen, wenn auch nur in sehr geringer Anzahl (1 DTZ auf  $10^5$  bis  $10^6$  normale Zellen). Jedoch gelang es Pantel et al. durch eine spezielle Kultivierung von Knochenmark-Aspiraten DTZ-Zelllinien von Brust-, Lungen- und Prostatakrebspatienten zu etablieren [9, 10]. Diese Zelllinien sind ein geeignetes Zellmodell für DTZ *in vivo*, da sie *in vitro* vermehrbar sind [11]. Mittels funktioneller Studien, Untersuchungen des Genexpressionsmusters oder proteomischer Untersuchungen [12] bieten sie die Möglichkeit ein besseres Verständnis in Bezug auf die frühe hämatogene Disseminierung ins Knochenmark oder die lymphatische Disseminierung in die regionalen Lymphknoten zu erlangen. Des Weiteren könnten neue Erkenntnisse sowohl zur Klärung ihrer biologischen Relevanz als prognostischer Faktor als auch zu einer präziseren Phänotypisierung beitragen. Da zum jetzigen Zeitpunkt eine

alleinige Resektion des Primärtumors und des regionalen Lymphabflussgebietes zu keinem dauerhaften Therapieerfolg führte, liegt das Augenmerk natürlich auf der Identifizierung von Genen in den DTZ, die neue Angriffspunkte für adjuvante oder neoadjuvante Therapien bieten könnten.

## 1.2 Tumorimmunologie

Aufgrund der Tatsache, dass Krebs mit eine der Haupttodesursachen in der westlichen Welt ist, wird intensiv nach umfassenden und adäquaten Therapieansätzen gesucht. Als klassische Behandlungsmethoden gelten derzeit operative Tumorentfernungen sowie Strahlen- und Chemotherapien. Jedoch haben all diese Therapien den großen Nachteil, dass beträchtliche Nebenwirkungen auftreten können. Des Weiteren ist der gewünschte Behandlungserfolg oftmals nur unzureichend. Aufgrund dieser Problematiken rückte in den letzten beiden Jahrzehnten die Tumorimmunologie immer mehr in den Fokus der Wissenschaft. Sie befasst sich mit der Erforschung immunologischer Vorgänge, die von der Entstehung bis hin zur Bekämpfung von Malignomen beteiligt sind. Bereits zu Beginn des 20. Jahrhunderts stellte Paul Ehrlich die Vermutung auf, dass mit Hilfe des Immunsystems der Wirt vor der Entstehung von Tumoren (Neoplasien) geschützt werden kann [13]. Diese Vorstellung wurde ab Ende der 1950er Jahre von Thomas und Burnet als Immunüberwachungstheorie („*immune surveillance*“) formuliert [14, 15]. Sie geht davon aus, dass das Auftreten von Tumoren eine ähnliche Häufigkeit wie Infektionen mit pathogenen Erregern besitzt und dass das Immunsystem schließlich in der Lage ist diese entarteten Tumorzellen aufgrund der Expression von tumorassoziierten Antigenen zu erkennen und zu eliminieren. Diese Hypothese geriet allerdings in Vergessenheit, da keine experimentellen Beweise vorlagen. Doch in den letzten Jahren mehrten sich Studien und unterstützen mit ihren Ergebnissen die Immunüberwachungstheorie von Thomas und Burnet [16, 17]. Dennoch kann es trotz einer erfolgreichen „*immun surveillance*“ zum Tumorwachstum kommen [18, 19]. Aus diesem Grund wurde die ursprüngliche Theorie abgewandelt beziehungsweise ergänzt und als „*immune editing*“ Hypothese, welche drei Phasen (Elimination, Äquilibrium und Evasion) umfasst, neu formuliert [18, 20].

## 1.3 Cancer-Testis Antigene (CTA)

Die *Cancer-Testis* Antigene (CTA) stellen eine Familie von Proteinen dar, die in verschiedenen soliden Tumoren und Leukämien, jedoch nicht in normalen Geweben, mit Ausnahme des Hodens und der Plazenta, exprimiert werden [21]. Weitere wichtige Eigenschaften dieser Gruppe sind: die Lokalisation der meisten Gene auf dem

X-Chromosom, wobei sie als Multigen-Familie auftreten sowie die Immunogenität in Krebspatienten [22, 23].

1991 entdeckte van der Bruggen et al., das erste CTA, namens MAGE-A1, auf das im folgenden Kapitel noch genauer eingegangen wird [24]. Melanome gehören zu den stärksten CTA exprimierenden Tumoren. Tumore der Blase, der Lunge, des Ovars sowie der Leber zeigen eine häufige CTA-Expression. Im Gegensatz dazu findet man in Karzinomen der Nieren, des Magens und des Kolons sowie Leukämie- oder Lymphomzellen niedrige CTA-Expression [23]. Im Hoden werden die verschiedenen CTAs in unterschiedlichen Stadien der Spermatogenese jedoch nicht in den Leydig- und Sertoli-Zellen exprimiert [25]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch in den Geweben des Trophoblasten und in den unreifen Keimzellen des fetalen Ovars CT-Antigene exprimiert werden [26].

In Anbetracht der Immuntherapie sind die CTAs aufgrund ihres Expressionsprofils sowie ihrer Immunogenität, die eine spontane Immunantwort hervorrufen kann, interessante Zielstrukturen. Da es sich bei den CTAs um endogene Proteine handelt, werden sie von den Proteasen der Proteasomen zu kurzen Peptidfragmenten degradiert. Die Peptide werden anschließend von einem dimeren Protein namens TAP (*transporter associated with antigen processing*) ins Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, wo sie dann an Klasse-I-MHC-Proteine gebunden und an die Zelloberfläche transportiert werden. Bei zellulärem Kontakt der nun antigenpräsentierenden Zelle (APC) mit CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, kommt es zu deren Stimulation und Differenzierung zu cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL). Die CTLs sind in der Lage die APC zu zerstören. Dieser Vorgang wird als zellvermittelte Immunität bezeichnet [27].

### **1.3.1 Die MAGE (*melanoma-associated antigen*)-Antigenfamilie**

Wie bereits erwähnt, war MAGE-A1 das erste CTA, das auf humanen Melanomzelllinien mittels T-Zell Epitop Klonierungstechnik identifiziert wurde [24]. Seitdem wurden mehr als 60 MAGE Gene im Menschen entdeckt [28]. Alle Mitglieder dieser Familie besitzen eine zentrale, homologe Region von etwa 170-200 Aminosäuren, die als MAGE *homology domain* (MHD) bezeichnet wird [29]. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Expressionsmuster werden die Proteine der MAGE-Familie in zwei Subgruppen unterteilt: MAGE Typ I und MAGE Typ II. Die Familien von MAGE-A, -B und -C gehören zum MAGE Typ I, die vor allem durch ihre Lokalisation auf dem X-Chromosom sowie ihrer begrenzten Expression im Hoden, im Trophoblasten und in der Plazenta charakterisiert sind [26, 29]. Die MAGE-A Gene befinden sich in der Region q28 des X-Chromosoms und umfassen 12 Mitglieder (MAGE-A1-12) [21, 30]. Wohingegen die MAGE-B Gene auf der Region Xp21 lokalisiert sind und durch sechs Mitglieder (MAGE-B1-6) repräsentiert werden [31]. Ebenfalls auf dem kurzen Arm des

X-Chromosoms (q26-27) befinden sich die MAGE-C Gene, die 3 Mitglieder (C1-3) besitzen [32, 33]. Im Vergleich dazu weisen die 15 Gene des MAGE Typ II ein undefiniertes Chromosomen *Clustering* auf und werden ubiquitär in einer Vielzahl von Geweben exprimiert [28], was besagt, dass sie keine CTAs sind [26]. Als Beispiel wäre hier die MAGE-D Subfamilie zu erwähnen, die zwei Mitglieder besitzt und auf Xp11 lokalisiert ist [34].

Im weiteren Verlauf wird nur noch auf die MAGE-A Mitglieder des MAGE Typ I eingegangen, da sie einen wichtigen Aspekt in dieser Arbeit einnehmen.

### 1.3.1.1 MAGE-A-Expression in normalen Geweben und Tumoren

Die MAGE-A-Expression, insbesondere von MAGE-A1 und -A4, erfolgt fast ausschließlich im Zellkern und Cytoplasma der testikulären Keimzellen (Spermatogonien und primäre Spermatozyten) [35]. Auch in der Plazenta werden einige Mitglieder der MAGE-A-Familie (MAGE-A3, -A4, -A8 bis -A11) exprimiert [21, 36]. Über die biologische Funktion dieser intrazellulären Proteine ist noch sehr wenig bekannt. Jedoch lässt sich aufgrund der Untersuchungen von Itoh et al. vermuten, dass sie eine wichtige Rolle während der Spermatogenese spielen, da während der Reifung der primären Spermatozyten eine Abnahme der MAGE-A-Expression erfolgt [37].

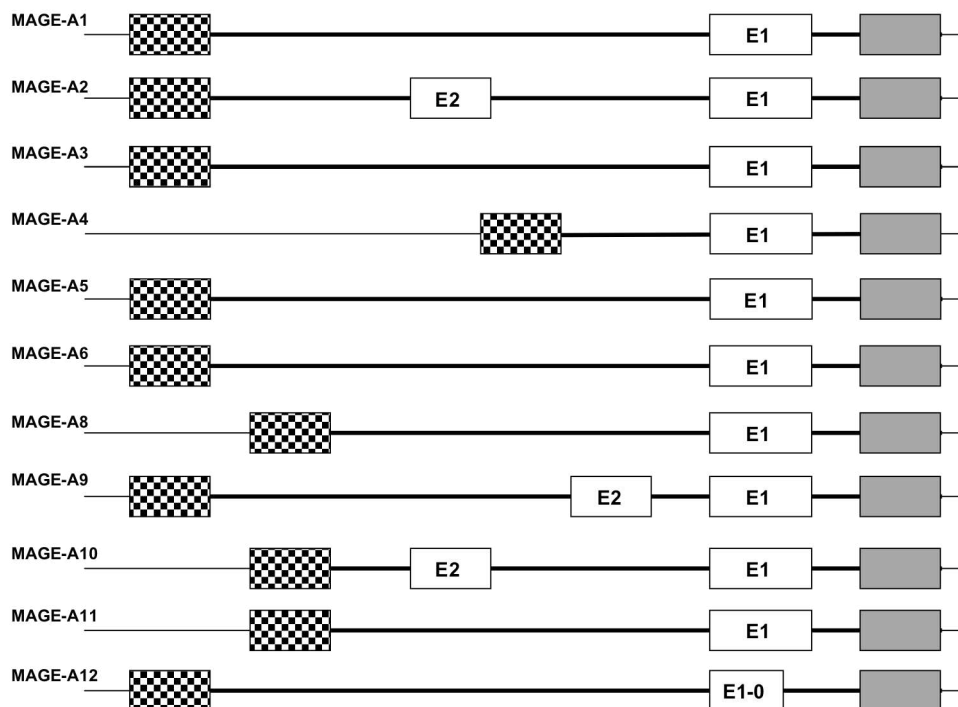
In der folgenden Tabelle sind die Expressionslevel der verschiedenen MAGE-A Antigene in verschiedenen Tumoren zusammengefasst.

**Tabelle 1: MAGE-A-Expression in verschiedenen Tumortypen**

Tumortyp	MAGE-A1	MAGE-A2	MAGE-A3	MAGE-A4	Referenz
Blasen	21%	30%	35%	33%	Patard et al., 1995 [38]
Brust	11%	4%	4%	0%	Russo et al., 1995 und Otte et al., 2001 [39, 40]
Hals und Nacken (squamos)	33/	41%	43%	27%	Eura et al., 1995 [41]
Leberzellkarzinom	86%	-	-	-	Yamashita et al., 1996 [42]
Lunge	11%	13%	38%	13%	Shichijo et al., 1995 [43]
kutanes Melanom	48%	70%	76%	22%	Van der Eynde et al., 1997 [44]
Neuroblastom	18%	-	73%	-	Corrias et al., 1996 [45]
Ösophagus (Primärtumor)	18%	26%	2%	8%	Toh et al., 1995 [46]
Ovar (normal)	6%	0%	6%	0%	Gillespie et al., 1998 [47]
Ovar (metastasiert)	33%	0%	0%	0%	Gillespie et al., 1998 [47]
Prostata	77%	24%	29%	24%	Kupfer et al., 2002 [48]

### 1.3.1.2 Struktur der MAGE-A Gene

Alle MAGE-A Gene besitzen drei Exone, mit Ausnahme von MAGE-A2 [49], MAGE-A9 [50] und MAGE-A10 [51], die ein viertes Exon aufweisen (Abbildung 2). Des Weiteren konnte anhand von Datenanalysen des „*Expressed Sequence Tags*“ (EST) gezeigt werden, dass außer MAGE-A2 und -A4 die meisten Gene eine vorherrschende Isoform besitzen [50]. Eine Ausnahme stellt MAGE-A7 dar, das ein Pseudogen ist und was nicht transkribiert werden kann [21]. Im letzten Exon von jedem Gen befindet sich die Proteinkodierende Region, die zur Ausbildung eines 309-319 Aminosäure langen Proteins führt [21]. Obwohl die MAGE-A Gene bezüglich ihrer Nukleinsäuresequenz eine Homologie von 80-98% aufweisen, weist MAGE-A1 nur eine Homologie von 57-77% zu den anderen MAGE-A Genen auf [21]. Im Gegensatz zu der hohen Homologie der 12 MAGE-A Gene sind ihre Promotoren variabel. MAGE-A4 ist das einzige MAGE-A Gen das acht alternative Promotoren besitzt, während alle anderen Mitglieder der MAGE-A-Familie nur einen einzigen Promoter aufweisen [52]. Innerhalb der MAGE-A-Promotoren befinden sich die DNA-Bindungsstellen für Ets-1 und Sp1, die für die Promotoraktivierung verantwortlich sind.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Exon-Intron Struktur der MAGE-A Gene.** Die schwarze dünne Linie stellt die genomische DNA mit den Exonen (Kästen) und Introns (dicke schwarze Linie) dar. Der graue Kasten ist das Protein-kodierende Exon. Das homologe Initialexon (Promotor) wird durch den karierten Kasten symbolisiert. Exon E1 ist in allen Isoformen mit Ausnahme von MAGE-A12 anwesend. In diesem Fall existiert ein chimäres Exon. Exon E2 tritt nur in MAGE-A2, -A9 und -A10 auf. Im Falle von MAGE-A2 und -A4 wurde nur eine von mehreren Isoformen dargestellt. Modifiziert nach Artomonova et al., 2004 [50].

### 1.3.1.3 Funktionen der MAGE-A Antigene

Obwohl über die physiologische Funktion der MAGE-A-Proteine wenig bekannt ist, zeigen Untersuchungen, dass sie Einfluss auf die Regulation des Zellzykluses sowie die Apoptose haben beziehungsweise eine wichtige Rolle während der humanen Tumorgenese spielen. Unter Verwendung des „*yeast two-hybrid*“ Screenings wurden für MAGE-A1, -A4 und -A11 Interaktionspartner identifiziert. Als potentieller Bindungspartner für MAGE-A1 und -A4 trat der transkriptionelle Regulator SKIP (*SKI-interacting protein*) auf. Im Notch1 Signalweg kann MAGE-A1 die SKIP-vermittelte NOTCH1 Signaltransduktion inhibieren, in dem es an SKIP bindet und anschließend HDAC1 rekrutiert. Folglich agiert MAGE-A1 hier als transkriptioneller Repressor [53]. Da der NOTCH1 Signalweg auch in den Keimzellen aktiviert ist, könnte die Involvierung von MAGE-A1 vermutlich die Expression bestimmter Differenzierungsgene während der Spermatogenese reprimieren [26]. Im hepatozellulären Karzinom bindet MAGE-A4 an das Onkoprotein Gankyrin, um dessen onkogene Aktivität zu reprimieren [54]. Als Folge wird die p53-abhängige und p53-unabhängige Apoptose induziert [26]. In Melanomzelllinien konnte nachgewiesen werden, dass MAGE-A3 mit Kap-1, einem Korepressor von p53, interagiert und somit die Apoptose in Tumorzellen unterdrückt [55]. In androgenabhängigen sowie Prostatakrebszelllinien wurde MAGE-A11 als Koregulator des Androgenrezeptors (AR) gefunden, in dem es seine internen Interaktionsdomänen moduliert und somit die AR-Aktivität erhöht [56].

### 1.3.1.4 Methylierungsabhängige Regulation der MAGE-A Gene

In normalen Geweben ist die Transkription der MAGE-A Gene durch die Methylierung der CpG-Dinukleotide innerhalb der CpG-Inseln der Promotorregionen reprimiert. 1996 konnte De Smet et al. zeigen, dass ein Zusammenhang zwischen der MAGE-A1-Expression und dem Methylierungsstatus der CpG-Dinukleotide vorliegt [57]. Liegen die CpG-Dinukleotide innerhalb der Bindungsstelle von Ets-1 methyliert vor, kann keine DNA-Bindung durch diesen Transkriptionsfaktor erfolgen und die Transkription wird inhibiert [58]. Im Vergleich dazu hat Sp1 eine methylierungsunabhängige DNA-Bindungsaffinität. Es ist auch wichtig, dass die Transkriptionsstartstelle demethyliert ist, damit der basale Transkriptionskomplex binden kann und die Induktion der MAGE-A-Expression ermöglicht. Die Anwendung des Demethylierungsmittels Aza zeigte die methylierungsabhängige Expression von MAGE-A1 [57, 59]. Unser Labor konnte zeigen, dass der stimulatorische Effekt von Aza durch den Histondeacetylase-Inhibitor TSA synergistisch hochreguliert werden kann. Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass beide, sowohl die Histonacetylierung als auch die

DNA-Methylierung, eine wichtige Rolle während der transkriptionellen Aktivierung der MAGE-A Gene spielen [1]

### 1.3.1.5 Relevanz der MAGE-A Antigene für die Tumorthherapie

Aufgrund der fehlenden Expression von Klasse-I-MHC-Moleküle in den Keimzellen verbleiben die MAGE-A-Proteine im Zytoplasma und werden nicht als Antigene prozessiert [60]. Die tumorspezifische MAGE-A Antigen Prozessierung macht sie zu interessanten Kandidaten der Tumorthherapie. Mit Hilfe verschiedenster Methoden konnte in *in vitro* und *in vivo* Experimenten gezeigt werden, dass die MAGE-A Peptide eine zellvermittelte Immunantwort hervorrufen können [61]. In mehreren klinischen Studien wurde die Vakzinierung an Patienten mit Melanomen [62], kolorektalen Karzinom [63], Gastrointestinalkarzinom [64] sowie metastasierten Patienten verschiedener Läsionen [65] durchgeführt. So konnte zum Beispiel in metastasierten Melanompatienten nach subkutaner Injektion mit MAGE-A3-Peptid bei sieben von 25 Patienten eine signifikante Tumorregression beobachtet werden, wovon drei eine vollständige Remission hatten [66]. Jedoch konnte eine monoklonale CTL-Antwort bisher nur in einem einzigen Melanompatienten nach MAGE-A3 Peptid Vakzinierung nachgewiesen werden [67]. Im Allgemeinen lässt sich jedoch festhalten, dass die Ergebnisse der bisherigen Immuntherapien nicht sehr vielversprechend sind. Denn die zellvermittelte Immunantwort der CTLs ist sehr gering, da nach der Vakzinierung nur eine sehr geringe Anzahl an T-Zellen aktiviert wird, die vermutlich unter der Nachweisgrenze liegen. Außerdem ist die Expression der MAGE-A Antigene in den verschiedenen Tumortypen sehr heterogen [23]. So gibt es Patienten mit Tumoren, die verschiedene MAGE-Antigene exprimieren und folglich nur durch eine Immunisierung mit mehreren Peptidkombinationen erfolgreich behandelt werden könnten. Andererseits existieren Tumore, die wenig oder gar keine MAGE-Antigene präsentieren und somit nicht als Zielstruktur in Frage kommen. Aus diesem Grunde ist es wichtig, die grundlegenden Mechanismen zur Induktion der MAGE-Antigene weiter zu erforschen, um in Zukunft eine bessere Immuntherapie erzielen zu können.

### 1.3.2 BORIS (*Brother of the Regulator of Imprinted Sites*)

Ein recht junges Mitglied der *Cancer-Testis* Antigenfamilie ist das von Loukinov et al. in Mäusen und Menschen entdeckte BORIS-Protein (*Brother of the Regulator of Imprinted Sites*) oder auch CTCFL (*CTCF-like*) genannt [68]. Die Expression des Proteins beschränkt sich wie bei allen CTAs auf das Hoden- und Tumorgewebe [68, 69]. BORIS ist ein Paralogon von CTCF, jedoch besitzen sie konträre Eigenschaften. CTCF ist multifunktional und ist an der transkriptionellen Genaktivierung und -reprimierung, der

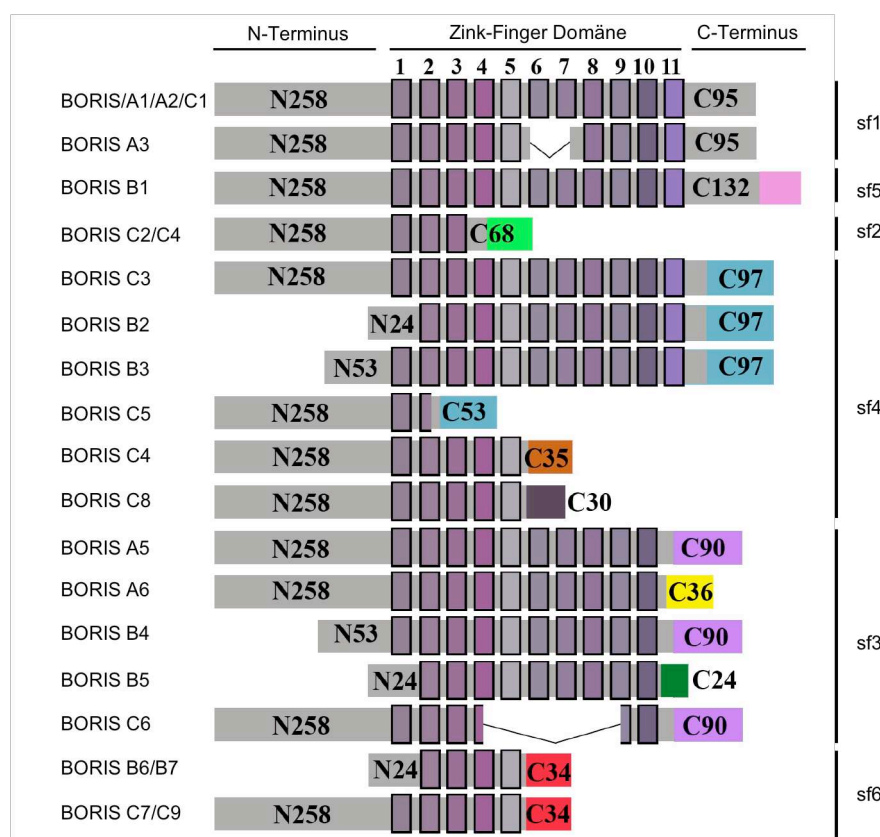


X-chromosomalen Inaktivierung und dem *Imprinting* involviert [70]. Das BORIS-Protein besitzt eine konservierte zentrale 11 Zink-Finger (ZF) DBD, die zu 99,5% mit der des CTCF-Proteins homolog ist [71]. Jedoch unterscheiden sich beide Proteine in den Domänen-flankierenden Regionen sowie den N- und C-Termini [68, 72]. Das BORIS Gen umfasst 29 kb auf dem autosomalen Chromosom 20q13.2 [68], eine Region, die in verschiedenen Tumoren häufig chromosomale Aberrationen aufweist. In diesem Locus finden häufig Amplifikationen statt. Jedoch wurden bisher noch keine Genamplifikationen für BORIS beschrieben. Basierend auf der Tatsache, dass BORIS ein CTA ist, stellt es einen potentiellen Kandidaten für die Tumorthherapie dar. In durchgeführten Mausexperimenten wurde bereits eine tumorspezifische Immunität mit entsprechender Antikörperantwort auf BORIS, T-Zellproliferation, Zytokinproduktion und T-Zellzytotoxizität beobachtet [73, 74]. Auch Loukinov et al. zeigten in Vakzinierungsexperimenten mit BORIS-DNA eine Inhibierung des Tumorwachstums und ein verlängertes Leben der Mäuse [75].

### 1.3.2.1 Struktur des BORIS Gens

Jüngst wurden drei alternative Promotoren (A, B und C) und 16 kodierende Exone, die 23 Isoformen erzeugen, beschrieben [76]. Renaud et al. konnten zeigen, dass die Transkriptionsstartstelle von Promotor A bei -1447 bp, die des Promotors B bei -899 bp und die des Promotors C bei -658 bp *upstream* des ersten ATG des BORIS offenen Leserasters (ORF) liegt. Jedoch werden die drei Promotoren unterschiedlich aktiviert. Im Hoden wird Promotor A zu 47%, Promotor B zu 12% und Promotor C zu 41% verwendet. Auffällig ist, dass Promotor B kaum genutzt wird. In den untersuchten Krebszelllinien wurde sogar nur eine 2%-ige Aktivität des Promotors B festgestellt. Stattdessen wird vermehrt auf Promotor A und/oder C zurückgegriffen [77]. In normalen Zellen wird entweder BORIS oder sein Paralogon CTCF exprimiert, aber nicht beide Faktoren zusammen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass CTCF wohlmöglich die BORIS Transkription negativ reguliert. Renaud et al. zeigten, dass unter normalen Bedingungen CTCF an alle drei BORIS-Promotoren, die spezifische CTCF-Bindungsstellen aufweisen, binden kann und folglich die BORIS-Expression reprimiert [77]. Die BORIS-Expression wird auch methylierungsabhängig reguliert. Die Aza-Behandlung führte zu einer Hypomethylierung der CpG-Insel innerhalb der Promotoren und zu einer verstärkten BORIS-Expression [69, 78, 79]. Das Tumorsuppressorprotein (TSP) p53 kann die Aktivität der drei BORIS-Promotoren reprimieren. Jedoch konnte keine Bindungsstelle für p53 in den Promotoren nachgewiesen werden. Es scheint, dass p53 mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 interagiert, und die Bindung von Sp1 an seine Konsensusbindungsstellen innerhalb der BORIS-Promotoren verhindert und somit die Promotoraktivität inhibiert [77].

Von 23 alternativ gespleißten RNAs werden 17 Proteinisoformen translatiert (Abbildung 3). Als möglicher Grund wird dafür angeführt, dass einige alternative Exone intronische Sequenzen enthalten, die zum frühzeitigen Einbau eines Stopcodons führen. Trotz des *nonsense-mediated mRNA decay Pathway* kommt es zur instabilen Proteinausbildung [76]. Überraschenderweise exprimieren nur sieben von 23 BORIS-Isoformen die vollständige 11 Zink-Finger DBD. Alle anderen Isoformen mit reduzierter Anzahl an ZFs ergeben sich durch die Verwendung von alternativen Splicestellen und Stopcodons. Daraus resultiert die Vermutung, dass die neuen ZFs der jeweiligen Isoformen neue DNA-Bindungen einhergehen können. In *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass die ersten neun ZF der DBD benötigt werden, um an die *IGF2/H19 Imprinting* Kontrollregion (ICR) zu binden [76]. Wohingegen nur fünf ZFs der BORIS DBD eine wichtige Rolle bei der Bindung und Aktivierung des hoden-spezifischen CST (Cerebrosid Sulfotransferase)-Promotors spielen [80].



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der BORIS-Isoformen mit N- und C-Terminus sowie der Zink-Finger Domäne.** Die Klassifizierung der BORIS-Isoformen erfolgt in sechs Subfamilien (sf1-6) basierend auf den gleichen 3'-terminalen Sequenzen. Die wichtigsten Vertreter der jeweiligen Subfamilie sind B0, C2, A5, C3, B1 und C7/C9. Des Weiteren sind die Isoformen durch drei alternative N-Termini (N258, N24 und N53) und 11 alternative C-Termini (C95, C132, C68, C97, C53, C35, C30, C90, C36, C24 und C34) gekennzeichnet. Modifiziert nach Pugacheva et al., 2010 [76].

### 1.3.2.2 Lokalisation und Expression der BORIS-Proteinisoformen

Loukinov et al. beschrieben, dass das von ihnen entdeckte BORIS-Protein nur in den CTCF-negativen Keimzellen des Hodens, den primären Spermatozyten, exprimiert wird. In der weiteren Entwicklung zu runden Spermatozyten werden die Keimzellen CTCF-positiv und BORIS-negativ [68]. BORIS ist vorwiegend im Zytoplasma der Spermatozyten lokalisiert und steht im Kontrast zur strikten nuklearen Lokalisation von CTCF. Wobei auch einige BORIS-Moleküle im Zellkern gefunden wurden [68]. Durch die Entdeckung der zahlreichen BORIS-Isoproteine wurden die vorher beschriebenen Erkenntnisse widerlegt beziehungsweise erweitert. Nun wurde gezeigt, dass die BORIS-Isoformen in nahezu allen Stadien der Spermatogenese exprimiert werden [76]. Alle sechs Subfamilien werden nur in geringem Maße im Zytoplasma der Spermatozyten und Spermatozoen exprimiert. Im Vergleich dazu wurden in den runden Spermatozyten vor allem die Subfamilien sf2, sf5 und sf6 exprimiert. Somit liegt die Vermutung nahe, dass die Expression der verschiedenen Isoformen ein entwicklungsabhängig kontrollierter Vorgang ist und dass die einzelnen Isoformen während der männlichen Keimzellentwicklung designierte Funktionen haben. Überdies wurde in fötalen Geweben eine starke Expression der BORIS-Subfamilie sf3 (Abbildung 3) im Ovar und aller Subfamilien in der Haut und der Milz nachgewiesen [76]. Neben der soeben beschriebenen Expression im normalen Gewebe erfolgt eine aberrante Expression von BORIS in zahlreichen Krebsarten [69, 81-83].

### 1.3.2.3 Potentielle Funktionen von BORIS

Vatolin et al. postulierten, dass BORIS direkt den Wechsel des epigenetischen Statuses des MAGE-A1-Promotors und möglicherweise auch bei anderen Keimzell-spezifischen regulatorischen Regionen, deren Gene (MAGE-A2, MAGE-A4, LAGE-1, NY-ESO-1, SPANX usw.) mit BORIS in CTCF-angereicherten Hodenspezifischen Keimzellen ko-exprimiert werden, einleitet [69]. Ihre Hypothese beruht unter anderem auf der Beobachtung, dass nach der Behandlung mit dem DNA-Demethylierungsmittel 5-Aza-2'-desoxycytidin (Aza) bereits nach wenigen Stunden die BORIS-Induktion erfolgte. Wohingegen die Re-Expression von MAGE-A1 erst nach ein bis zwei Tagen stattfand. Dies deutete darauf hin, dass BORIS vermutlich die *Cancer-Testis* Genaktivierung durch Aza vermittelt. Andere Arbeitsgruppen konnten die Hypothese von Vatolin et al. bestätigen, da sie für die Gene, SPANX und NY-ESO-1 ebenfalls die epigenetische Regulation durch BORIS beobachteten [69, 81, 84, 85]. Erst jüngst wurde gezeigt, dass BORIS direkt an den Promotor eines weiteren CTA namens TSP50 (*testis-specific protease 50*) bindet und dessen Expression aktiviert [86]. Andererseits wurde von Kholmanskikh et al. beim Melanom gezeigt, dass die CTA Gene, wie MAGE-A1, in

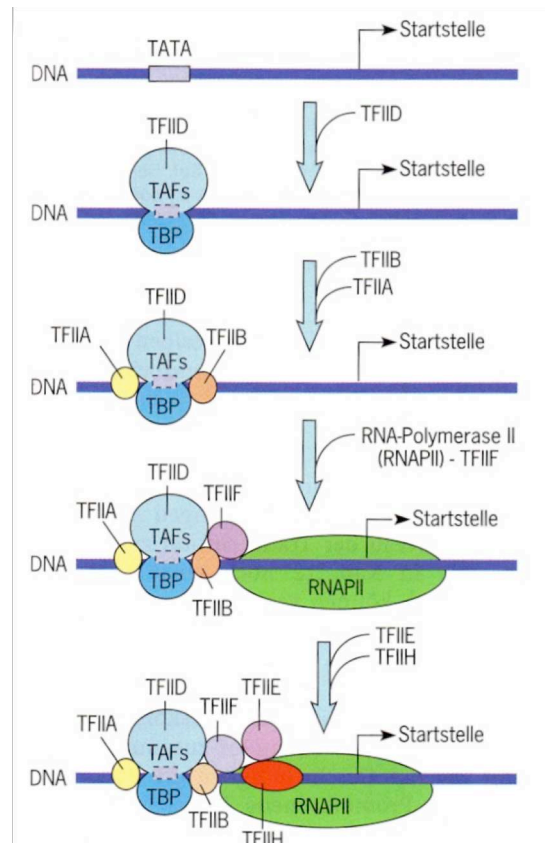
der Abwesenheit von BORIS dennoch induziert und transkribiert werden können [83]. Sie schlussfolgerten, dass BORIS beim Melanom kein notwendiger Faktor für die Aktivierung der CTA Gene ist. Des Weiteren trägt BORIS zu einer veränderten Histonmethylierung und Chromatinstruktur am BAG-1-Promotor bei und wird durch DNMT1 und DNMT3B an diesen Promotor rekrutiert [87]. Eine ähnliche Modulierung der Histonmethylierung, die zur Genexpression von MYC und BRCA1 führt, konnte für den BAT3-SET1A-BORIS-Komplex gezeigt werden [88]. Des Weiteren bindet BORIS an das methylierte H19/ICR und ist infolgedessen am *Imprinting* der männlichen Keimzellen beteiligt [89, 90]. Dabei wurde beobachtet, dass BORIS über seine N-terminale Domäne mit der Histonmethyltransferase PRMT7 sowie den Histonen H1, H2A und H3 interagiert und es zu einer PRMT7-vermittelten Histonmethylierung kommt [90].

#### 1.4 Die basale Transkription eukaryotischer Gene

Die Transkription eukaryotischer Gene wird im Zellkern durch drei verschiedene RNA-Polymerasen (I, II und III) vermittelt. Die RNA-Polymerase I transkribiert die Gene für die ribosomale RNA (rRNAs) während die RNA-Polymerase III für die Transkription der 5S rRNA, der Transfer-RNA (tRNA) und weiterer kleiner RNAs verantwortlich ist. Die Polymerase II, welche einen großen Multiproteinkomplex bestehend aus 12 Untereinheiten und einem Molekulargewicht von 500 kDa darstellt, transkribiert proteinkodierende Gene. Für die effektive Transkription spielen nicht nur die Polymerasen sondern auch eine Reihe weiterer Faktoren, wie die generellen und regulatorischen Transkriptionsfaktoren, die Aktivatoren und Koaktivatoren eine wichtige Rolle [91].

##### 1.4.1 Die basale Transkriptionsmaschinerie

Die basale Transkriptionsmaschinerie ist ein komplexes Gebilde, das aus vielen Proteinkomponenten, wie der RNA-Polymerase II, den generellen Transkriptionsfaktoren (GTFs, *generell transcription factors*) TFIIA, TFIIB, TFIID, TFII E, TFII F und TFII H sowie Komplexen aus Koaktivatoren und Korepressoren besteht (Abbildung 4) [92]. Eine zentrale Rolle in der Transkriptionsinitiation nimmt TFIID ein. Seine 38 kDa Untereinheit, das TATA-Box-bindende Protein (TBP), bindet an die TATA-Box etwa 30 bp *upstream* des Transkriptionsstarts und ist vermutlich das einzige sequenzspezifische DNA-Bindungsprotein des generellen Transkriptionskomplexes [93, 94]. Weitere Komponenten des TFIID-Komplexes sind die 12 TBP assoziierten Faktoren (TAFs), die mit dem TBP-Protein assoziiert sind [95, 96].



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Zusammenbaus des Transkriptionskomplexes.**  
Nach Karp, 2005 [27].

Über den 180 Aminosäuren langen C-terminalen Bereich des TBP, der innerhalb der Eukaryoten hoch konserviert ist, erfolgt die DNA-Bindung und leitet die schrittweise Assemblierung des Initiationskomplexes ein (Abbildung 4). Dagegen ist die Funktion des N-terminalen Bereichs noch nicht genau geklärt. Es wird vermutet, dass er regulatorische Funktionen hat. So wurde berichtet, dass der N-Terminus des TBP mit anderen Proteinen, wie den TAFs, den GTFs oder regulatorischen Transkriptionsfaktoren (beispielsweise Sp1) interagiert [97-99].

Die folgende Tabelle gibt einen kurzen Überblick über die weiteren GTFs mit ihren Funktionen.

**Tabelle 2: Übersicht der generellen Transkriptionsfaktoren der RNA-Polymerase II in Eukaryoten.** Modifiziert nach Munk, 2001 und Sikorski et al., 2009 [91, 92]

Faktor	Unter-einheiten	Molekularmasse (kDa)	Funktion
TFIIA	3	12, 19, 35	Stabilisierung der Bindung von TBP sowie der Interaktion von TAFs mit DNA
TFIIB	1	35	Bindet an TBP und DNA. Fördert die Bindung der RNA-Polymerase II an den Promotor
TFIIE	2	34, 57	Fördert die Bindung und Funktion des Faktors TFIIH
TFIIF	2	30, 74	Bindet im Komplex mit RNA-Polymerase II an TBP wodurch die Bildung des Präinitiationskomplexes verstärkt wird.
TFIIH	10	35-89	Öffnung der DNA im Promotorbereich mittels Helikase-Aktivität. Phosphorylierung der carboxyl-terminalen Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II, die daraufhin ihre Konformation ändert, so dass sie sich von den allgem. TFs löst und mit der Elongation der Transkription beginnt.

TBP stellt nicht nur eine wichtige Komponente bei der Bildung des TFIID dar, sondern nimmt auch eine entscheidende Rolle für die Transkription durch die anderen RNA-Polymerasen ein. Bei der Transkription durch die RNA-Polymerase I wird der Transkriptionsfaktor SL1 (*selectively factor 1*), welcher aus TBP und drei anderen TAFs (48, 63 und 110 kDa) besteht, in Verbindung mit dem *upstream binding factor* (UBF) benötigt. Der Transkriptionsfaktor TFIIB, welcher für die Transkription durch die RNA-Polymerase III wichtig ist, sowie der SNAP-Komplex für die Synthese von snRNAs (*small nuclear RNAs*) durch die RNA-Polymerase II und III setzt sich aus TBP und verschiedenen Komponenten der TAFs zusammen [96, 98].

Obwohl die Struktur von TBP als auch die Ausbildung des Transkriptionsinitiationskomplexes gut erforscht ist, ist über die Bedeutung von TBP für die Genexpression recht wenig bekannt. Es wurde berichtet, dass posttranslationale Modifikationen in Form von Phosphorylierungen eine steuernde Wirkung auf TBP besitzen. Somit scheint phosphoryliertes TBP während der M-Phase des Zellzykluses regulatorisch einzugreifen [100]. Eine weitere Studie zeigte, dass es zur gesteigerten Aktivität der RNA-Polymerase II kommt, sobald humanes TBP durch die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) phosphoryliert wird [101].

### 1.4.2 Regulatorische Transkriptionsfaktoren

Die Bindung sequenzspezifischer DNA-Bindeproteine, den regulatorischen Transkriptionsfaktoren (RTFs), an den distalen, proximalen Promotor induziert und aktiviert die Transkription. Die RTFs werden in Transkriptionsaktivatoren und

Transkriptionsrepressoren unterteilt. Dabei können sie direkt oder indirekt mit den GTFs der basalen Transkriptionsmaschinerie in Wechselwirkung treten und so die Transkriptionsinitiation aktivieren oder reprimieren. Die Entschlüsselung einzelner Strukturdomänen der RTFs konnte mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen und Kernspinresonanz-Spektroskopie (NMR, *nuclear magnetic resonance*) erfolgen. In der Regel existieren mindestens zwei Bereiche: eine DNA-Bindungsdomäne (DBD), die sich an eine spezifische Basenpaarsequenz der DNA heftet, und die Aktivierungsdomäne, die mit anderen Proteinen in Wechselwirkung tritt und so die Transkription steuert [27]. Als dritter möglicher Bereich kann die Repressordomäne, die die Genexpression des Zielgens unterbinden kann, innerhalb des RTFs vorkommen. Des Weiteren wird die DBD der höheren Eukaryoten in zahlreiche DNA-Bindungsmotiv-Klassen, wie dem Helix-Turn-Helix (HTM) Motiv, dem Helix-Loop-Helix (HLH) Motiv, dem Zink-Finger Motiv und dem Leucin-Zipper unterteilt.

### 1.4.3 Die Ets-Familie der Transkriptionsfaktoren

Das Ets-Onkogen (*v-ets* oder „*E-twenty-six-specific*“) wurde ursprünglich in dem Erythroblastomvirus des Vogels, dem E26, zusammen mit *gag* und *myb* entdeckt [102]. Zur Ets-Familie gehören etwa 25 bis 30 Mitglieder, die in verschiedenen Spezies (Drosophila, Maus, Huhn, Mensch) identifiziert wurden. Alle Ets-Onkogene sind dadurch gekennzeichnet, dass sie eine hoch konservierte Region mit einer Länge von 85 Aminosäuren (AS), die ETS-Domäne, besitzen. Diese Domäne bildet ein *winged* Helix-Turn-Helix Motiv aus und vermittelt die spezifische Bindung an eine purinreiche DNA-Kernsequenz mit dem zentralen GGAA/T-Motiv [103, 104].

Aufgrund der Homologien in den ETS-Domänen werden die Ets-Proteine in zehn Subfamilien unterteilt [105]. Die Lokalisation der Ets-DNA-Bindungsdomäne ist bei den meisten Ets-Familienmitgliedern am Carboxyl-Terminus. Eine Ausnahme stellen die Subfamilien TCF und ERF dar, da sie dort am N-Terminus vorliegt.

Die einzelnen Mitglieder der Ets-Familie werden sowohl als Transkriptions-Aktivatoren als auch -Repressoren beschrieben [106]. Aus diesem Grund spielen sie auch eine wichtige Rolle in zahlreichen biologischen Prozessen, wie Differenzierung, Metastasierung, Gewebeentwicklung, Angiogenese und Transformation [107]. Die funktionelle Aktivität der Ets-Proteine kann durch posttranslationale Modifikationen, wie zum Beispiel Phosphorylierung oder Sumoylierung reguliert werden [102].

Da der Transkriptionsfaktor Ets-1 aus der Familie der Ets-Proteine in der vorliegenden Arbeit für die epigenetische Regulation der MAGE-A Gene relevant war, wird dieser im Folgenden näher dargestellt.

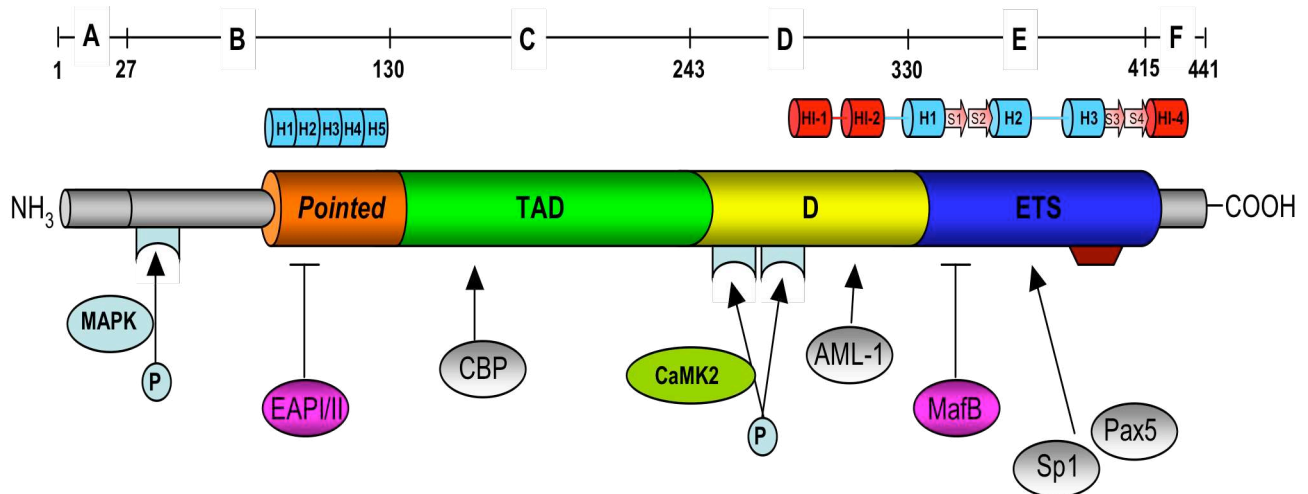
### 1.4.3.1 Der Transkriptionsfaktor Ets-1

1983 war Ets-1 der erste identifizierte Ets-Faktor [108, 109]. Das humane Ets-1 Gen ist auf dem Chromosom 11q23-24 lokalisiert und kodiert für eine 6,8 kb mRNA [110]. In der humanen T-Zelllinie CEM wurden sechs verschiedene Isoformen mit unterschiedlichen Molekularmassen des Ets-1 Genproduktes detektiert [111]. Die Unterteilung erfolgte in vier Hauptformen (p51, p48, p42 und p39) sowie zwei Nebenformen (pp52 und pp49). Die subzelluläre Lokalisation von pp52 sowie p51 beschränkt sich auf das Zytoplasma, wohingegen die Hauptformen p48 und p39 hauptsächlich im Zellkern vorkommen [111]. Die Synthese der verschiedenen Isoformen erfolgt entweder durch alternatives Spleißen der mRNA oder durch Proteinphosphorylierung [111].

Die Struktur des Transkriptionsfaktors Ets-1 (p54) ist in Abbildung 5 dargestellt. Ets-1 kann in sechs Domänen (A-F) eingeteilt werden, die jeweils unterschiedliche funktionelle Bedeutungen haben. Besondere Bedeutung kommt dabei der DNA-Bindungsdomäne (ETS-Domäne) am Carboxyl-Terminus, der aktivierende Domäne sowie der intramolekular inhibitorisch wirkenden Domäne zu [112, 113]. Für die weiteren Domänen ist die Funktion bisher noch nicht vollständig geklärt. Die Region A, welche am N-Terminus liegt, umfasst die ersten 27 AS. Über ihre Funktion ist bisher nichts bekannt. Bei der Region B (AS 28 bis 135) handelt es sich um eine konservierte Region zwischen den Transkriptionsfaktoren Ets-1, Ets-2, Erg, Fli1 und GABP [113]. Sie beinhaltet die *Pointed*-Domäne, die zwischen AS 54 bis 135 lokalisiert ist und aus fünf  $\alpha$ -Helixen besteht [112]. Es wird vermutet, dass sie Protein-Protein-Interaktionen vermittelt und von Ras-abhängigen Signalen durch eine benachbarte MAPK-Phosphorylierungsstelle reguliert wird [114]. Die sich anschließende Region C (AS 130-242) wird auch als Transaktivator-Domäne (TAD) bezeichnet. Sie ist für eine verstärkte Protein-DNA-Bindung von Ets-1 essentiell [115]. Der Faktor CBP/p300 interagiert mit Ets-1 über diese Region und fungiert als Koaktivator [112]. Die Region D (Exon VII beziehungsweise D-Domäne) erstreckt sich von AS 243 bis 330 und wird in zwei regulatorische Bereiche unterteilt. Im C-terminalen Bereich befindet sich das autoinhibitorische Modul [116], wohingegen im N-terminalen Bereich mehrere Phosphorylierungsstellen für die Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II (CaMK2) vorliegen [117]. Im Falle einer Phosphorylierung an der Serin-reichen Region innerhalb des N-terminalen Bereiches der Region D wird die inhibitorische Struktur stabilisiert. Folglich kommt es zur Autoinhibition der DNA-Bindung [118]. Im Bereich der AS 331 bis 415 befindet sich die Region E, die als ETS-Domäne bekannt ist. Sie besteht aus drei  $\alpha$ -Helixen und vier  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Die ETS-Domäne ist für die spezifische Erkennung von DNA-Sequenzen, die das GGAA/T Kernmotiv enthalten, verantwortlich [103]. Mit Hilfe von Deletionsexperimenten innerhalb dieser Region konnte die nukleäre Lokalisationssequenz nachgewiesen werden [119]. Somit wird die Penetration durch die



Kernwand ermöglicht, was sowohl das Vorkommen von Ets-1 im Zellkern als auch im Zytoplasma erklärt. Eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren (beispielsweise Sp1) und anderen Faktoren interagiert mit Ets-1, wobei die meisten dieser Faktoren direkt an die ETS-Domäne binden. Dadurch wird die transkriptionelle Aktivität von Ets-1 reguliert und erleichtert die Protein-DNA-Bindung.

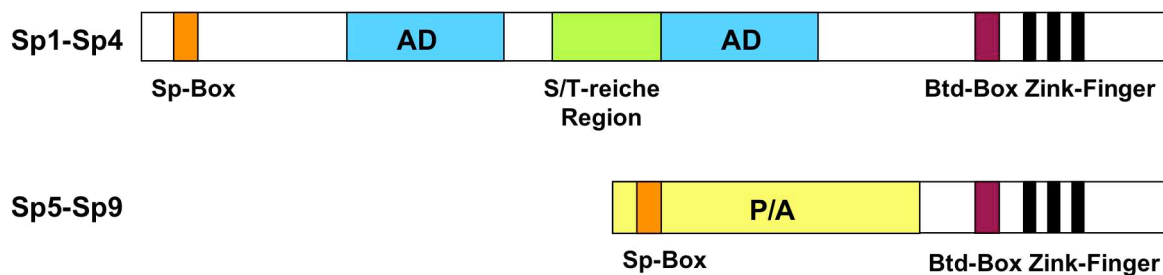


**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Ets-1 Proteinstruktur.** Das Ets-1 Protein wird in sechs unterschiedliche funktionelle Regionen (A-F) gegliedert und die Zahlen unterhalb beschreiben die Position der Aminosäure. Die funktionellen Regionen sind als farbige Zylinder folgendermaßen dargestellt: *Pointed*-Domäne (*Pointed*; orange), Transaktivator-Domäne (TAD; grün), D-Domäne (D; gelb) und ETS-Domäne (Erythroblast transformationsspezifische Domäne; blau). Die hellblauen Zylinder (H1-H5) stellen  $\alpha$ -Helix-Strukturen, die roten Zylinder (HI-1 bis HI-5) inhibitorisch wirkende  $\alpha$ -Helix-Strukturen und die rosé-farbenen Pfeile (S1-S4) die  $\beta$ -Faltblattstruktur dar. Die dunkelrote Struktur an der ETS-Domäne steht für das nukleäre Lokalisationssignal. Die hellgrauen Kreise kennzeichnen die Proteine, die mit Ets-1 kooperieren und die Protein-DNA-Interaktion von Ets-1 fördern. EAPI/II (Ets-1 assoziiertes Protein I oder II) wirken als Korepressoren und reprimieren zusammen mit Ets-1 die Transkription. MafB (*musculoaponeurotiev fibrosarcoma B*) wirkt inhibierend auf die Ets-1 Aktivität. NH<sub>3</sub>, N-terminales Ende; COOH, C-terminales Ende; P, Phosphor; MAPK, Mitogen-aktivierte-Proteinkinase. Modifiziert nach Dittmer, 2003 [112].

#### 1.4.4 Die Familie der Sp-Faktoren

Anfang der 1980er Jahre wurde der ubiquitäre Transkriptionsfaktor Sp1 als der Prototyp der Sp-Familie isoliert und charakterisiert [120, 121]. Inzwischen wurden noch weitere Mitglieder der Sp-Familie (Sp2-9) identifiziert [122], die an G-reiche Elemente, wie den GC-Boxen (GGGGCGGG) und den verwandten GT/CACCC-Boxen (GGTGTGGGG), binden [123]. Die Transkriptionsfaktoren der Sp-Familie werden der funktionellen Gruppe der Zink-Finger-Proteine zugeordnet, die für ihre korrekte Funktion die Anwesenheit von Zink benötigen. In ihrer Struktur sind die Sp-Transkriptionsfaktoren ähnlich (Abbildung 6). Alle besitzen eine am C-Terminus liegende 81 AS lange und hoch konservierte C2H2-Typ (zwei Cystin und zwei Histidin) Zink-Finger-Region, die drei Zink-Finger bildet und die DNA-Bindungsdomäne repräsentiert [123]. In der N-terminalen Region der

Transkriptionsfaktoren befinden sich zwei Glutamin-reiche Aktivierungsdomänen sowie Serin/Threonin Regionen. Bezüglich des Expressionsmusters unterscheiden sich die einzelnen Mitglieder geringfügig. Sp1, Sp2 und Sp3 werden ubiquitär exprimiert, während Sp4 vorwiegend in neuronalen Geweben vorkommt [123]. Trotz starker Homologien in der Proteinstruktur von Sp1, Sp3 und Sp4 weisen die jeweiligen Transkriptionsfaktoren signifikante funktionelle Unterschiede auf. Als mögliche Ursache könnten dafür posttranslationale Modifikationen verantwortlich sein. Im Falle von Sp1 wird dessen transkriptionelle Aktivität durch Phosphorylierung und Glykosylierung beeinflusst [124, 125]. Die Regulation von Sp3 erfolgt mittels Sumoylierung [126].



**Abbildung 6: Schematische Darstellung der Sp-Proteinstrukturen.** Die Transkriptionsfaktoren Sp1-Sp4 (oben) und Sp5-Sp9 (unten) unterscheiden sich in der allgemeinen Proteinstruktur. Einheitlich besitzen alle Mitglieder der Sp-Familie am N-terminalen Ende eine hochkonservierte AS-Sequenz (Sp-Box; orange) und am C-terminalen Ende die Buttonhead-Box (Btd; dunkelrot) sowie die ebenfalls hochkonservierte Zink-Finger-Region, die aus drei Zinger-Fingern (schwarz) besteht und die DNA-Bindungsdomäne repräsentiert. Die Transkriptionsfaktoren Sp1-Sp4 besitzen zwei glutamin-reiche Aktivierungsdomänen (AD; blau) sowie Serin/Threonin Regionen (grün). Im Vergleich dazu enthalten die Transkriptionsfaktoren Sp5-Sp9 eine prolin-reiche Domäne (P/A; gelb). Modifiziert nach Bouwman and Philipsen, 2002 [127].

#### 1.4.4.1 Der Transkriptionsfaktor Sp1

Der humane Transkriptionsfaktor Sp1 wurde erstmals 1987 kloniert und aus HeLa-Zellen isoliert [121]. Das humane Sp1 Gen ist auf dem Chromosom 12q13 lokalisiert [128]. Darüber hinaus ist bekannt, dass es sich bei Sp1 ausschließlich um einen starken transkriptionellen Aktivator handelt [129, 130], der an der Aktivierung zahlreicher Gene (*housekeeping*, gewebespezifische und Zellzyklus-regulierende) beteiligt ist. Weiterhin wird Sp1 auch für den Schutz der CpG-Inseln vor der *de novo* Methylierung benötigt [131]. Sp1 kann mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie dem TBP [132] und den TBP-assoziierten Faktoren interagieren [133, 134]. Als weitere Faktoren sind das Zellzyklus-regulierende Protein p107 [135] oder der Transkriptionsfaktor Ets-1 bekannt. Eine entscheidende Bedeutung spielt Sp1 in der Tumorentstehung, dem Tumorwachstum und der Metastasierung. So zeigten Wang et al., dass Sp1 als prognostischer Marker im Magenkarzinom Anwendung finden könnte [136]. Dies beruht

auf der Beobachtung, dass Sp1 an der Induktion des tumorfördernden Gens VEGF beteiligt ist [137]. Anhand von Patienten verschiedener Tumorentitäten wurde gezeigt, dass ein erhöhtes Sp1 Level mit einer gesteigerten VEGF-Expression einhergeht [138, 139]. Erst jüngst wurde berichtet, dass Sp1 von dem CTA BORIS rekrutiert wird und folglich die Re-Expression des CTA NY-ESO-1, während der pulmonalen Karzinogenese vermittelt [84].

## 1.5 Epigenetik

Im Jahre 1983 wurde erstmals durch Feinberg und Vogelstein [140] gezeigt, dass epigenetische Veränderungen in Form von globaler genomischer DNA-Demethylierung die Genexpression beeinflussen, ohne dass dabei die DNA-Sequenz verändert wird. Denn im Vergleich zur Genetik, welche sich mit der Sequenz der DNA, ihrer Organisation in Genen und den Veränderungen durch Mutationen befasst, beschäftigt sich die Epigenetik mit Mechanismen von meiotisch und mitotisch vererbaren Veränderungen, die jedoch nicht in der DNA-Sequenz selbst kodiert sind [141]. Demzufolge bezeichnet die Epigenetik alle Prozesse in einer Zelle, die sich „epi“, das heißt, neben oder über der DNA-Ebene abspielen.

Drei verschiedene molekulare Mechanismen spielen in der Epigenetik eine zentrale Rolle: DNA-Methylierung, Histonmodifizierungen und Chromatin *Remodelling* [142].

## 1.6 DNA-Methylierung

### 1.6.1 DNA-Methylierung in normalen Zellen

Die DNA-Methylierung bezeichnet die durch DNA-Methyltransferasen vermittelte Addition von Methyl-Gruppen ( $\text{CH}_3$ ) an die DNA. Diese natürliche Form der DNA-Modifikation kommt in fast allen Organismen vor, mit Ausnahme von *S. cerevisiae* und *C. elegans* [143]. In Eukaryoten trägt die DNA-Methylierung im Allgemeinen zur Inaktivierung von Genen und somit zur Genregulation sowie Erhaltung der Genomstabilität bei (Abbildung 6). In Säugerzellen stellen Cytosine (C) im Kontext von CpG-Dinukleotiden den vorherrschenden Akzeptor für Methylgruppen innerhalb der DNA dar [144]. 1982 beschrieben Ehrlich et al., dass 70-80% der in der DNA vorkommenden CpG-Dinukleotide methyliert vorliegen, wobei die unmethylierten CpGs vor allem im Bereich von sogenannten CpG-Inseln anzutreffen sind [145, 146]. Nur etwa 1% des humanen Genoms weist solche CpG-Inseln auf, die einen über 60%-igen Anteil an CpGs besitzen und etwa 0,5-4 kb lang sind [147]. Die meisten der innerhalb der CpG-Inseln vorkommenden CpG-Dinukleotide befinden sich in der proximalen Promotorregion von Genen [147, 148], wobei die Mehrheit der CpG-Inseln mit stabil und ubiquitär

exprimierten Genen (*housekeeping*-Genen) assoziiert sind [148-150]. Mehr als 90% der methylierten Cytosine des humanen Genoms sind in Retrotransposonen zu finden, ein kleiner Anteil in Satelliten-DNA-Sequenzen und nur eine Minderheit in Exonen und regulatorischen Sequenzen von Genen [151, 152].

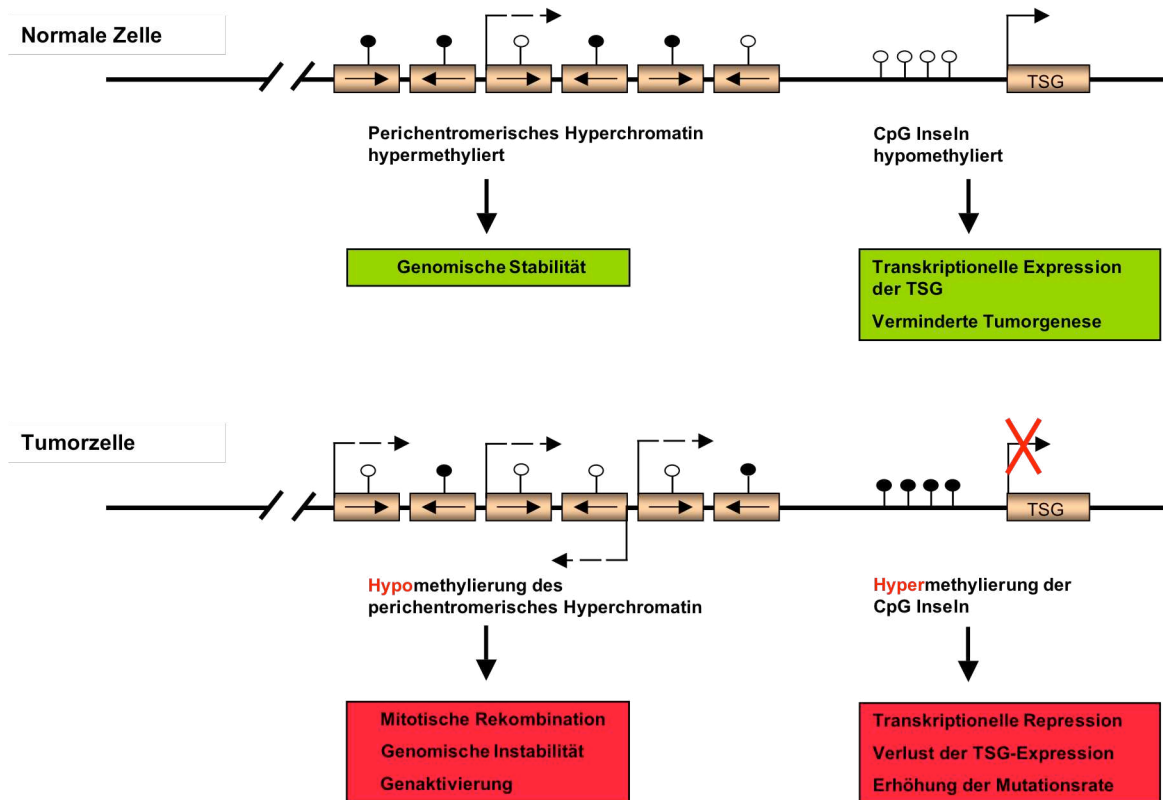
Bereits während der Entwicklung und Differenzierung von Zellen wird das Methylierungsmuster etabliert. Das genomische *Imprinting* („Prägung“) stellt solch einen epigenetischen Prozess dar und hat zur Folge, dass innerhalb der Keimbahn Gene oder Chromosomenabschnitte spezifisch markiert werden, so dass in somatischen Zellen entweder nur das mütterliche oder nur das väterliche Allel eines Gens aktiv ist. In Säugetierzellen erfolgt die DNA-Methylierung mit Hilfe der DNA-Methyltransferasen (DNMTs), von denen bis heute mehrere Isoenzymfamilien bekannt sind [153, 154]. Die wohl bekanntesten DNMTs unter den Eukaryoten sind: DNMT1, DNMT3a und DNMT3b. DNMT1 fungiert vor allem als Erhaltungsmethyltransferase und weist eine erhöhte Spezifität für hemimethylierte DNA auf, die zur Erhaltung der DNA-Methylierung während der Replikation dient [155, 156]. Wie von mehreren Gruppen gezeigt wurde, kann sie auch als *de novo* DNMT arbeiten [155, 157, 158]. Im Vergleich dazu haben DNMT3A und DNMT3B die Fähigkeit unmethylierte DNA zu methylieren und werden deshalb als *de novo* Methyltransferasen bezeichnet [159, 160]. Sie tragen maßgeblich an der Etablierung neuer DNA-Methylierungsmuster während der Embryogenese bei [154, 161]. Ein weiteres Mitglied der DNMT-Familie ist DNMT2, dessen biologische Funktion und Bedeutung bisher weitgehend ungeklärt ist. In *in vitro* Experimenten wurde kaum eine Methyltransferaseaktivität detektiert [162-164]. Jüngst wurde dem *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Maus* und humanen DNMT2-Enzym eine tRNA Methyltransferaseaktivität nachgewiesen [165, 166].

Über die Existenz einer DNA-Demethylase wurde schon berichtet, die während der Embryonalentwicklung aktiv sein soll [167-169]. Jedoch ist bisher nichts über den zugrunde liegenden Mechanismus beziehungsweise die enzymatische Aktivität bekannt.

### 1.6.2 DNA-Methylierung in Tumoren

Während der Tumorentwicklung laufen komplexe mehrstufige Prozesse ab, die zu einer Anhäufung von genetischen Veränderungen führen. Dabei treten häufig Mutationen auf, die zu einer aberranten Genexpression beziehungsweise -funktion oder schließlich zu einer Zerstörung der kodierenden Genregion führen [170]. Die Transformation von Wildtyp (wt)-Zellen zu Tumorzellen ist durch eine globale Änderung des DNA-Methylierungsprofils gekennzeichnet. Dabei kommt es einerseits zur genomweiten Reduktion des Gehalts an methylierten Cytosinen (Hypomethylierung). Feinberg und Vogelstein sowie Holliday und Pugh haben in ihren Ausführungen gezeigt, dass eine direkte Aktivierung von Onkogenen auftreten kann [140, 171]. Darüber hinaus wird eine

Aktivierung latenter Retrotransposonen sowie chromosomaler Instabilität beschrieben [172, 173]. Andererseits erfolgt eine Erhöhung der Methylierung (Hypermethylierung) in den Promotorbereichen von Tumorsuppressorgenen (TSG), die zur transkriptionellen Inaktivierung führen und so die Tumorsuppression unterstützen (Abbildung 7) [152, 174, 175].

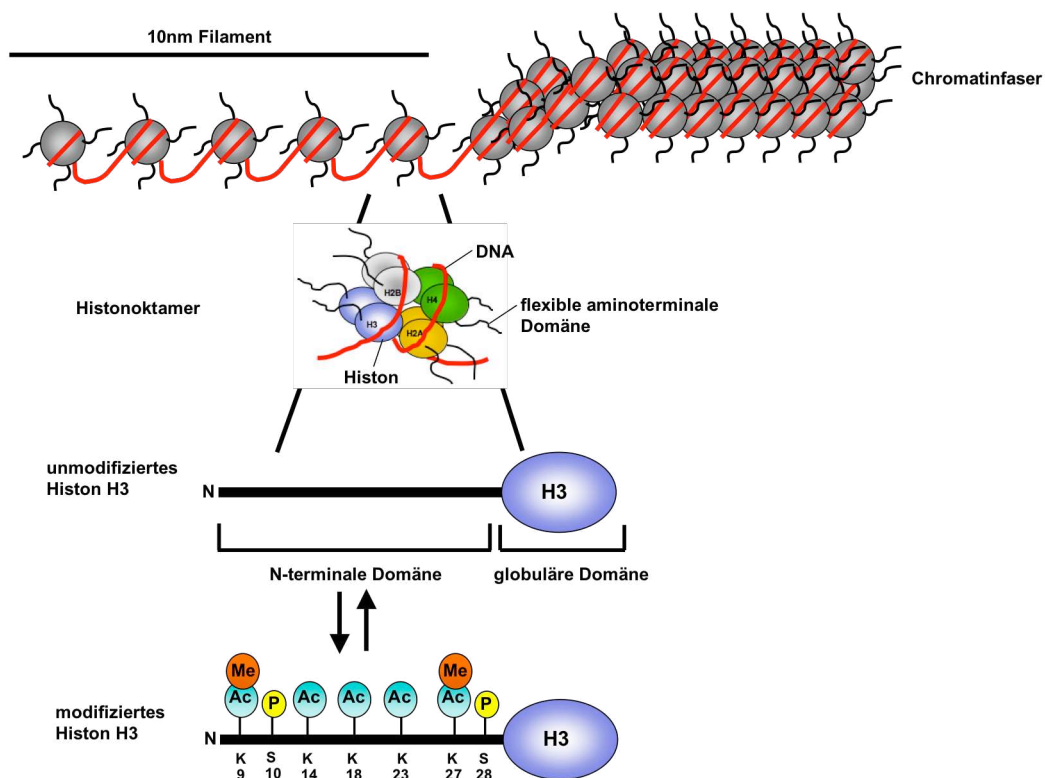


**Abbildung 7: Vergleich des DNA-Methylierungsmusters in einer normalen Zelle und Tumorzelle.** Die genomische DNA einer normalen Zelle weist sowohl hypomethylierte (weiße Köpfe) als auch hypermethylierte (schwarze Köpfe) CpGs auf. In einer Tumorzelle verändert sich das globale Methylierungsmuster drastisch. Modifiziert nach Clark et al., 2002 und Robertson 2005 [172, 173].

### 1.7 Chromatin-Remodelling und Histonmodifikationen

Im Zellkern eukaryotischer Zellen liegt die mit Histonproteinen assoziierte DNA (Nukleosomen) als Chromatin vor. Dieses „Modell“ wurde erstmals 1974 von Kronberg dargestellt [176] und mit Hilfe der Kristallstruktur bestätigt [177]. Die Grundverpackungseinheit des Chromatins bildet der Nukleosomenkomplex, welcher aus etwa 200 Basenpaaren und einem Histonoktamer besteht. Dabei ist ein 146 Basenpaar langer DNA-Doppelstrang um das Histonoktamer gewunden, der aus H2A, H2B, H3 und H4 Dimeren besteht (Abbildung 8) [178]. Die zwischen benachbarten Nukleosomen freiliegende DNA wird als Linker-DNA bezeichnet und ist an das Histon H1 gebunden.

Die N-terminalen Enden der Histonproteine sind Orte der posttranslationalen Modifikationen und spielen eine wichtige Rolle in Bezug auf die Verpackungseigenschaften des Chromatins und die Genregulation. Hierzu gehören die Histon-Acetylierung, -Phosphorylierung, -Methylierung, -Ribosylierung und -Ubiquitylierung [179-181]. Das Einbringen chemischer Veränderungen an den Histon-Seitenketten führt zur Rekrutierung regulatorischer Proteine (beispielsweise TFs oder MDBs) und zur Auflockerung beziehungsweise Kondensation des Chromatins, was zur Genexpression oder -repression führen kann.



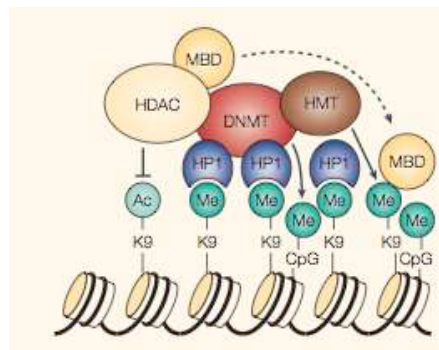
**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Chromatinorganisation.** Die DNA (schwarze Linie) windet sich spiralförmig um das Histonoktamer (bestehend aus je zwei Molekülen H2A (gelb), H2B (grau), H3 (blau) und H4 (grün)). Die N-terminalen Enden der Histone (hier anhand des Histons H3 in schwarz dargestellt) sind Ziel der posttranslationalen Modifikationen. Ac, Acetylierung; Me, Methylierung; P, Phosphorylierung. Modifiziert nach Strahl et al., 2000 [182].

### 1.7.1 Histon Methyltransferasen

Im Jahre 1964 wurde die Histonmethylierung entdeckt [183, 184]. Für die Histonmethylierung sind die Histon Methyltransferasen (HMT) verantwortlich. Die Methylierung erfolgt unter Verbrauch von S-Adenosylmethionin (SAM) nicht nur an Lysinen, sondern auch an Argininen. Die Modifizierung der Aminosäure Lysin (K) erfolgt

mit Hilfe der Histon-Lysin-Methyl-Transferasen (HKMT), die der Aminosäure Arginin (R) durch Protein-Arginin-Methyl-Transferasen (PRMT) [185, 186].

Die Methylierung der Histone erfolgt hauptsächlich an den N-Termini der Histone H3 und H4 [187]. Dabei kann die Kapazität der Methylierung an den Aminosäuren variieren: Lysin kann mono-, di- und trimethyliert; Arginin hingegen nur mono- und dimethyliert werden. Folglich kann der Grad und/oder die Position der Histonmethylierung die transkriptionelle Aktivität eines einzelnen Gens oder einer ganzen Chromatinregion positiv oder negativ beeinflussen [188, 189]. Dieser Zustand der Histonmodifikation und der dazugehörige Chromatinstatus (Eu- oder Heterochromatin) sind recht stabil und können mitotisch vererbt werden [189]. Wie aus Abbildung 9 hervorgeht, findet zwischen den Histonmethylierungen und deren spezifisch chromatinbindenden Proteinen, der DNA-Methylierung und den Methyl-bindenden Proteinen ein komplexes Zusammenspiel statt, was zu einer Repression der Genexpression führt. In malignen Zellen wird häufig die Methylierung des Histons H3 Lysin 9, H3 Lysin 36, H4 Lysin 20 und H3 Lysin 76 beobachtet, was letztlich zum Gen-*Silencing* führt [190-193].



**Abbildung 9: Schematische Darstellung über das Zusammenspiel verschiedener Komponenten der posttranslationalen Modifikationen an der DNA und dem Chromatin.** Ac, Acetylierung; Me, Methylierung; HP1, Heterochromatin Protein 1; MBD, Methyl-CpG Bindungsprotein; HDAC, Histondeacetylase; HMT, Histonmethyltransferase. Nach Feinberg und Tycko, 2004 [194].

### 1.7.2 Histonacetyltransferasen (HAT)

1963 wurde erstmals über die Acetylierung von Histonen berichtet [195] und bereits ein Jahr später zeigten Allfrey et al. in *in vivo* Versuchen, dass Histonmodifikationen (Acetylierung und Methylierung) die RNA-Synthese inhibieren und das vor allem lysinreiche Histone acetyliert werden [183]. Erst in den 1990er Jahren wurden die für die Histonmodifikationen verantwortlichen Enzyme gefunden [196, 197]. Sie werden aufgrund ihrer zellulären Lokalisation in HAT-A- (nukleäre Lokalisation) und HAT-B-Enzyme (zytoplasmatische Lokalisation) unterteilt. Die Histonacetylierung erfolgt durch die Übertragung einer Acetylgruppe von Acetyl-Coenzym A an die  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysinseitenketten am aminoterminalen Ende der Histonproteine. Dadurch kommt es

zur Neutralisierung der positiv geladenen Lysine, was die Wechselwirkung zwischen DNA und Histonen verringert. Dieser Effekt führt zur Destabilisierung der Nukleosomenstruktur. Das Chromatin wird partiell entfalten und der Zugang zur DNA wird für nukleäre Faktoren, wie Transkriptionsfaktoren, die den Promotor aktivieren, erleichtert [198, 199].

### 1.7.3 Histondeacetylasen (HDAC)

Bis heute sind vier Klassen der Histondeacetylasen (HDAC) bekannt und werden entsprechend ihrer Homologie zu den Hefeproteinen zugeordnet [200, 201]. Die Gemeinsamkeit aller HDACs ist die Fähigkeit Histone zu deacetylieren. Die N-terminalen Lysine der Histonseitenketten werden durch die Deacetylierung positiv geladen, was zu einer verstärkten Interaktion zwischen DNA und Nukleosom führt. Zur klassischen HDAC-Familie gehören die Klasse I, II und IV, welche für ihre Aktivität den Co-Faktor  $Zn^{2+}$  benötigen. Dahingegen benötigt die jüngst entdeckte Klasse III den Co-Faktor  $NAD^+$  (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid) und wird aufgrund ihrer Hefehomologie zum SIR2 (*silencing information regulator 2*) auch SIR2 Familie genannt. Sie umfasst sieben Mitglieder (SIRT 1-7), die eine subzelluläre Lokalisation (Cytoplasma, Mitochondrien und Zellkern) aufweisen. Bemerkenswert ist, dass die Klasse III HDACs nicht durch Inhibitoren, wie Trichostatin A, SAHA oder Butyrat inhibiert werden können [202, 203]. Dies scheint im Zusammenhang mit dem Prozess der Karzinogenese und der Alterung zu stehen [204]. Die Klasse I der HDACs, bestehend aus HDAC 1-3 und 8, ist eng verwandt mit dem Transkriptionsregulator RDP3 der Hefe und ist ubiquitär exprimiert [205]. Zur Klasse II HDACs gehören die Histondeacetylasen HDAC 4-7 sowie HDAC 9 und 10, welche eine Homologie zum Hefeprotein HDA1 aufweisen [206]. Mitglieder der Klasse II interagieren insbesondere mit dem myogenen Transkriptionsfaktor MEF2, welcher eine essentielle Rolle in der Regulation und Differenzierung von muskelspezifischen Genen spielt [207, 208]. Die Histondeacetylase HDAC 11, die homolog dem Hefeprotein HOS3 ist, weist konservierte Reste innerhalb der katalytischen Domäne auf, welche auch innerhalb der Klasse I und II HDACs vorliegen. Aufgrund der zu geringen Homologie der Gesamtsequenz zu den anderen drei Klassen wurde HDAC 11 einer neuen Klasse, der Klasse IV, zugeordnet. HDAC 11 wird in Geweben, wie Niere, Herz, Gehirn und Hoden exprimiert [209].

## 1.8 Strategien zur Induktion reprimierter Gene

Im Vergleich zu genetischen Mutationen, die einen irreversiblen Verlust der Genfunktion darstellen, sind die durch epigenetische Mechanismen (DNA-Methylierung sowie Histondeacetylierung) hervorgerufenen Repressionen der Transkription reversibel. Mit



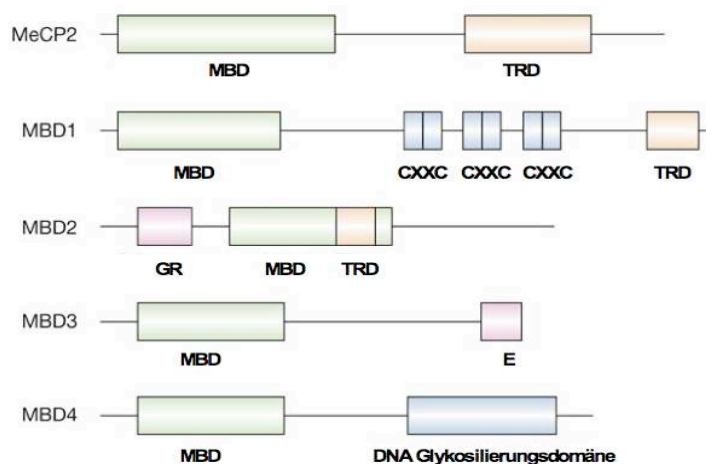
Hilfe von Inhibitoren der DNA-Methyltransferase oder Histondeacetylase kann die Repression einiger Gene aufgehoben und folglich wieder induziert werden.

Einen wichtigen Aspekt stellen die in klinischen Studien angewandten Cytidin-Analoga, wie Azacitidin (5-Azacytidin) und Decitabin (5-Aza-2'-desoxycytidin; Aza) für die DNA-Demethylierung dar [210-213]. Sie hemmen vor allem DNMT1, welche für den Erhalt des Methylierungsmusters zuständig ist. Eine weitere Strategie ist die Verwendung von DNMT-spezifischer *Antisense*-RNA in Zellkultur, die zu einem *knockdown* des DNMT Gens führt und so die Apoptose oder Zelldifferenzierung in Tumorzellen induziert [152, 214-216].

Eine andere Möglichkeit zur Induktion reprimierter Gene besteht in der Verwendung von Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACI), die bisher in Zellkulturen als auch klinischen Studien erprobt wurden. In diversen Studien konnte gezeigt werden, dass nach Behandlung mit HDACI die Histone hyperacetyliert wurden und antiproliferative Effekte in Tumoren auftraten. Des Weiteren konnten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* Studien zeigen, dass es zur Differenzierung, zur Apoptose, zum Wachstumsstillstand der Zellen sowie zur Angiogenese und damit verbundener Zellinvasion und Metastasierung kommen kann [141, 217-219]. Trichostatin A (TSA) in Kombination mit Aza erzeugt eine verstärkte Genexpression aufgrund der Auflockerung des Chromatins und der DNA-Demethylierung.

#### **1.8.1.1 Methylierungsunabhängige Methyl-CpG Bindungsdomäne Proteine**

Im Jahre 1989 wurde von Meehan et al. gezeigt, dass das Protein MeCP1 spezifisch an methylierte CpGs der DNA binden kann [220]. Kurz darauf wurde das CpG-bindende Protein MeCP2 entdeckt, welches wie MeCP1 die Transkription inhibieren kann [221]. In den folgenden Jahren wurden weitere verwandte Proteine nachgewiesen, die spezifisch an methylierte DNA *in vivo* und *in vitro* binden und an der Etablierung der Interaktion zwischen DNA-Methylierung und der Rekrutierungsmaschinerie zum Gen-*Silencing*, aber nicht der Ausbildung des DNA-Methylierungsmusters beteiligt sind [222, 223]. Die Familie der Methyl-CpG Bindungsdomäne Proteine besitzt fünf Mitglieder: MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 und MeCP2. Bezüglich der Sequenzhomologie sind die fünf Proteine sehr divergent und weisen nur innerhalb ihrer Methyl-CpG Bindungsdomäne (MBD) Homologien auf (Abbildung 10) [224].

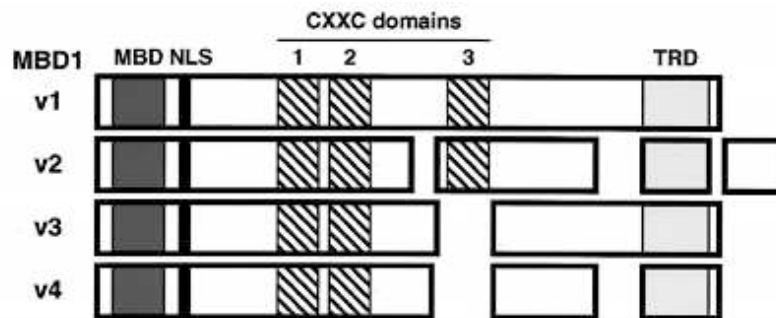


**Abbildung 10: Schematische Struktur der wichtigsten Vertreter der Methyl-CpG Bindungsdomäne Proteine.** CXXC, cysteinreiche DNA-Bindungsdomäne; GR, Glycin-Arginin Repeat; MBD, Methyl-CpG Bindungsdomäne; TRD, Transkriptions-Repressordomäne. Modifiziert nach Sansom et al., 2007 [225].

MeCP2 (Methyl-CpG bindendes Protein 2) erkennt einzelne symmetrische methylierte CpG-Stellen [226]. Das Gen, das für MeCP2 kodiert, ist auf dem X-Chromosom (Xq28) lokalisiert und enthält vier Exone. Das Genprodukt besteht aus drei funktionellen Domänen (Abbildung 10). Die erste funktionelle Domäne ist die Methyl-CpG Bindungsdomäne (MBD), welche sich am N-terminalen Ende befindet und für die Erkennung der methylierten CpGs sowie die Bindung an unmethylierte Sequenzen und MAR-Elemente (*Matrix attachment region*) verantwortlich ist. In der Mitte des Proteins befindet sich die Transkriptions-Repressordomäne (TRD), die der Rekrutierung von Repressorkomplexen, wie Sin3A und Histondeacetylasen (HDAC1 und 2) dient (Abbildung 12) [226]. Des Weiteren besitzt MeCP2 eine prolinreiche Domäne in der C-terminalen Region, die der Bindung von WW Domänen dient [227]. Im Allgemeinen ist MeCP2 an der Inaktivierung der Genexpression beteiligt. Amir et al. zeigten, dass Mutationen im MeCP2 Gen die genetische Ursache für das Rett-Syndrom sind [228].

Unter den MBD-Mitgliedern nimmt MBD1 eine besondere Stellung ein, da es als einziges Protein *in vitro* sowohl an methylierte als auch unmethylierte Promotoren binden und die Genexpression inhibieren kann [229, 230]. Durch alternatives Spleißen entstehen verschiedene Isoformen, die in Abbildung 11 dargestellt sind. Eine Besonderheit der MBD1 Isoformen ist das Vorkommen von zwei oder drei cysteinreichen CXXC-Domänen, die sich zwischen der MBD und TRD befinden. Diese Domänen kommen auch in DNA- und Histonmethyltransferasae vor [231, 232]. MBD1v1 und MBD1v2 besitzen drei Domänen und können aufgrund des Vorhandenseins der dritten Domäne an unmethylierte DNA binden, was zur methylierungsunabhängigen Genregulation führt [233]. Wischniewski et al. zeigten, dass MBD1v3 mit dem Vorhandensein von nur zwei cysteinreichen Domänen ebenfalls zur Repression unmethylierter Promotoren beiträgt

[234]. Jedoch wurde die wesentlich schwächere Repression der unmethylierten Promotoren nur in Mbd1-defizienten Mausfibroblasten gefunden. MBD1v4 besitzt wie MBD3 ebenfalls nur zwei cysteinreiche Domänen und reprimiert methylierungsabhängig die Transkription.

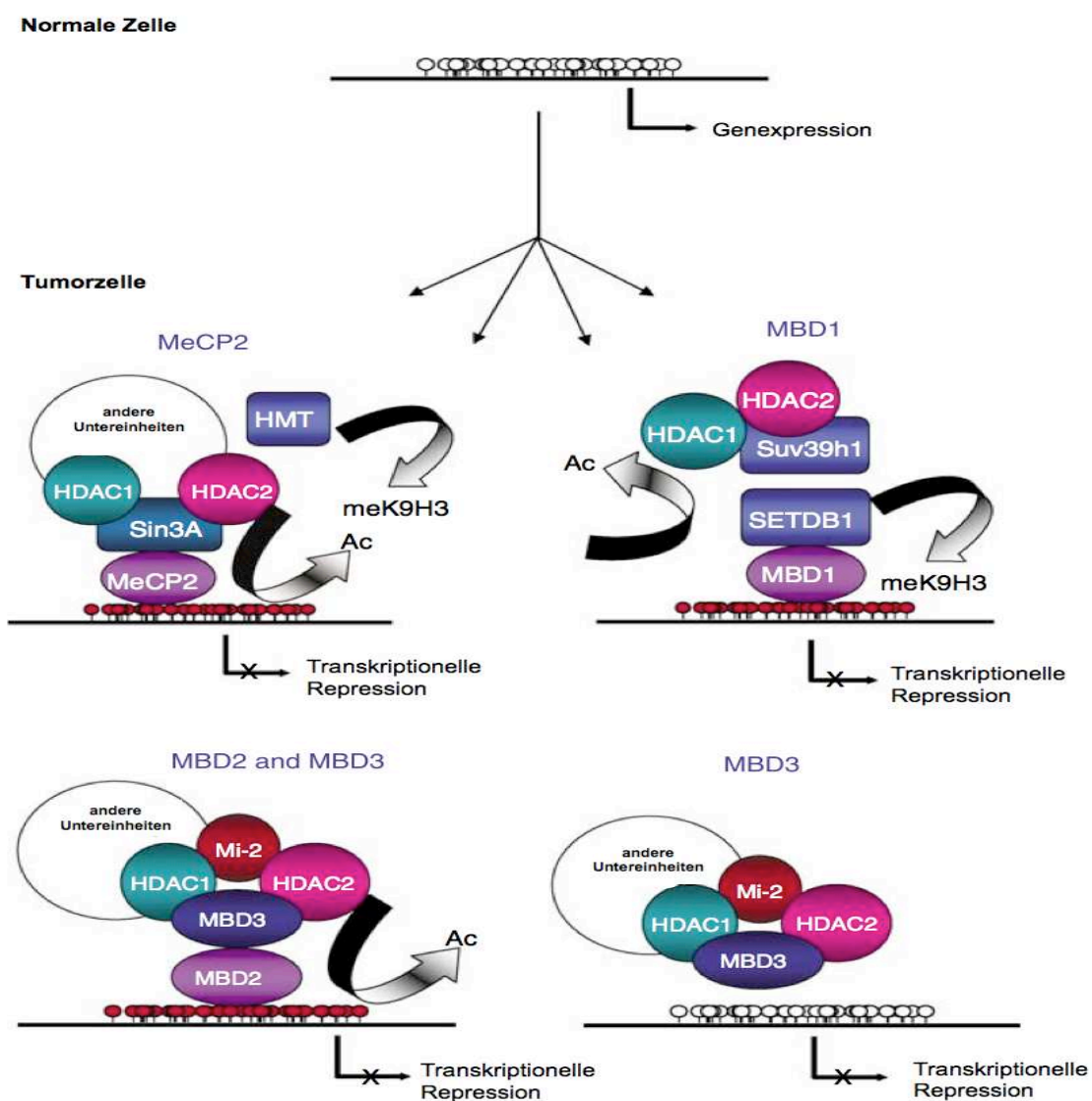


**Abbildung 11: Schematische Darstellung der verschiedenen MBD1 Isoformen.** Alle vier Isoformen (v1, v2, v3 und v4) besitzen eine MBD (Methyl-CpG Bindungsdomäne; dunkelgrauer Kasten) am N-Terminus. Dahinter folgt das nukleare Lokalisationssignal (NLS; als schwarzer Strich dargestellt). Am C-Terminus liegt die TRD (Transkriptions-Repressordomäne; hellgrauer Kasten). In der Mitte der jeweiligen Proteine befinden sich die cysteinreichen Zink-Bindungsdomänen (CXXC; schwarz-weiße Kästen). Nach Fujita et al., 2000 [229].

Die Aktivität der transkriptionellen Repression der MBD1 Isoformen scheint von der Rekrutierung eines Histondeacetylase-Komplexes abhängig zu sein [230, 235], wobei man noch nicht genau weiß, welche der HDACs mit MBD1 in Wechselwirkung treten. 1995 zeigten Ichimura et al., dass die TRD von MBD1 in der Lage ist, mit MCAF (*MBD1-containing chromatin associated factor*) zu interagieren und dementsprechend über einen HDAC-unabhängigen Mechanismus die verstärkte Heterochromatin-Bildung begünstigt [236]. MBD1 interagiert auch mit der Histon Methyltransferase Suv39h1 und HP1 (Heterochromatin Protein 1) [237, 238]. Dabei läuft die transkriptionelle Repression teilweise unabhängig von der TRD des MBD1 ab. Stattdessen interagiert Suv39h1 mit der MBD-Domäne und methyliert infolgedessen das Lysin 9 des Histons 3, was inhibierend auf die Transkription wirkt. Des Weiteren interagiert das Kernprotein MBD1 mit einer Untereinheit des CAF1 (*chromatin assembly factor 1*), dem p150, sowie der Histon Methyltransferase SETDB1 [239, 240]. Dieser MBD1-CAF1-SETDB1-Komplex lenkt die Genexpression über die Histonmethylierung (Abbildung 12).

Das dritte Mitglied der MBD Familie ist MBD2, welches als Komponente des MeCP1-Komplexes entdeckt wurde [241]. Es existieren zwei Isoformen, MBD2a und MBD2b, die sich aufgrund der Position ihrer Translationsstartstelle unterscheiden. Das erste Startcodon befindet sich innerhalb der CpG-Insel des MBD2 Gens, wohingegen das Zweite 152 Aminosäuren *downstream* lokalisiert ist. Folglich ist MBD2b 152 Aminosäuren an seinem N-Terminus gegenüber MBD2a verkürzt. Die Funktion des trunkierten MBD2b-Proteins ist bis heute noch nicht bekannt. Szyf und Kollegen haben in

*in vivo* und *in vitro* Versuchen gezeigt, dass MBD2b als DNA-Demethylase fungieren kann, wobei eine enzymatische Aktivität für das längere MBD2a-Protein bisher noch nicht nachgewiesen wurde [242-245]. Jedoch wird diese Eigenschaft diskutiert [224]. Neben der MBD und TRD besitzt MBD2 am N-Terminus Glycin-reiche *Repeats*, die eine Bindung an A/T-reiche DNA-Sequenzen vermitteln [152]. Die Fähigkeit der transkriptionellen Repression wird durch eine direkte oder indirekte Bindung von MBD2 an HDACs vermittelt. Boeke et al. zeigten, dass MBD2b an den Transkriptionsrepressor Sin3A bindet [246].



**Abbildung 12: Schematische Darstellung der verschiedenen Mechanismen zum epigenetischen Gen-Silencing mit Hilfe der MBD Proteine.** Dargestellt sind eine normale Zelle und eine Krebszelle. Die DNA-Sequenz ist als gerade Linie dargestellt, die weißen Kreise symbolisieren unmethylierte CpGs und die roten Kreise methylierte CpGs. Modifiziert nach Lopez-Serra et al., 2008 [223].

Das aus Säugetieren isolierte MBD3-Protein weist hohe DNA- und Protein-Sequenzhomologien zum MBD2-Protein auf, ist jedoch nicht in der Lage an methylierte DNA zu binden [247, 248]. MBD3 wurde als Komponente des Mi-2/NuRD Chromatin-Remodellierungskomplex entdeckt [222, 249]. Der Mi-2/NuRD Komplex ist am Nukleosom-*Remodelling* beteiligt und wird von MBD2 *in vitro* an methylierte DNA rekrutiert (Abbildung 12) [250]. Der Komplex aus Mi-2/NuRD und MBD2 entspricht dem MeCP1-Komplex [223]. Weitere Proteine, wie die Protein-Arginin-Methyl-Transferase PRMT5, werden rekrutiert [251].

MBD4 ist als einziges Mitglied der MBD-Familie nicht in die transkriptionelle Repression involviert. Stattdessen ist es an der DNA-Reparatur von TG-*Missmatches* (TG-CG) beteiligt, die aufgrund spontaner Desaminierung von Methylcytosinen zu Thyminen entstehen [222]. Neben einer MBD besitzt dieses Protein an seinem C-terminalen Ende eine Glykosylase-Domäne, die Struktur-Ähnlichkeiten zu bakteriellen Reparatur-Glykosylasen aufweist (Abbildung 10) [252, 253]. Es wurde für MBD4 gezeigt, dass es als Guanin-zu-Thymin- und spezifische Thymin-und-Uracil-Glykosylase agiert [254]. Neben diesem Reparaturmechanismus ist MBD4 auch in die methylierungsabhängige Genrepression der p16<sup>INK4a</sup> und MHL1 Gene [255] sowie in der Induktion der Apoptose nach Auftreten von DNA-Schäden [256] involviert.

## 1.9 Ziele der Arbeit

Die epigenetische Regulation der *Cancer-Testis* MAGE-A Gene wurde im Rahmen dieser Arbeit zum einen aufgrund des großen Interesses an der *Cancer*-spezifischen Expression von MAGE-A und ihrer Relevanz für die Tumorthherapie untersucht. Zum anderen dienten die innerhalb der Arbeitsgruppe von Wischnewski et al. gewonnenen Daten als Grundlage [1, 234]. Sie zeigten, dass der epigenetische Faktor MBD1 in MCF-7 Zellen die MAGE-A-Promotoren reprimiert, wohingegen der Transkriptionsfaktor Ets-1 aktivierend wirkte. Diese Erkenntnisse sollen nun auch auf die mikrometastatischen Zelllinien erweitert werden, um diese im Detail näher charakterisieren zu können. Jedoch ist das Hauptziel dieser Arbeit aufzuklären, wie BORIS im Zusammenspiel mit anderen epigenetischen Faktoren und Transkriptionsfaktoren die Genexpression insbesondere von MAGE-A1 beeinflusst und reguliert.

Aus diesem Grund sollen im ersten Teil dieser Arbeit Expressionsstudien durchgeführt werden, um zu zeigen, was für eine Rolle BORIS zusammen mit epigenetischen Faktoren (MBDs) und Transkriptionsfaktoren (Ets-1 und Sp1) in der Aktivierung der MAGE-A-Promotoren spielt. Als Modellsystem für die Durchführung der Expressionsstudien werden sowohl verschiedene Krebszelllinien (Brust, Darm, Leber,

Leukämie und Prostata) als auch die etablierten mikrometastatischen Zelllinien des Brust-, Prostata- und Lungenkarzinoms verwendet. Die mikrometastatischen Zelllinien stellen dabei ein geeignetes *in vitro* Modellsystem für disseminierte Tumorzellen dar.

Des Weiteren sollen epigenetische Untersuchungen den Einfluss von BORIS auf die Transkription und die Profile der DNA-Methylierung und Histonmodifikationen an den MAGE-A-Promotoren klären.

Da der generelle Transkriptionsapparat die basale Transkription initiiert und durch die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp1 aktiviert wird, ist es von großem Interesse zu untersuchen, ob BORIS mit der Komponente des generellen Transkriptionsapparates TBP und mit den Aktivatoren Ets-1 und Sp1 interagieren kann.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Acrylamidlösung (30%)	Serva, Heidelberg
Amplify N	GE Healthcare, Freiburg
Ampicillin	Sigma, Steinheim
Aqua (ad iniectabilia)	Baxter SA, Lessines
5'-Aza-2'-deoxycytidin	Sigma, Steinheim
Bacto-Agar	BD Bioscience, Heidelberg
Bacto-Trypton	BD Bioscience, Heidelberg
Borsäure	Sigma, Steinheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Bovines Serum Albumin (BSA)	Invitrogen, Karlsruhe
Desoxynucleoside Triphosphate Set (PCR <i>grade</i> )	Roche, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva, Heidelberg
Dithiothreitol (DTT)	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma, Steinheim
Ethanol abs.	Merck, Darmstadt
Ficoll	Amersham Bioscience, Freiburg
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
FuGENE HD	Roche, Mannheim
Glucose	Merck, Darmstadt
Glycerol	Serva, Heidelberg
Glycogen	Roche, Mannheim
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	BD Bioscience, Heidelberg
HEPES	Gibco BRL, Eggenstein
HiDi Formamid	Applied Biosystems, Mannheim
HPLC-H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
IGEPAL CA-630	Sigma, Steinheim
Isopropanol	Sigma, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
L-Rhamnose Monohydrate	Promega, Mannheim
Lysozym	Sigma, Steinheim
Loading buffer (6x)	Fermentas, St. Leon-Rot

Luminol	Sigma, Steinheim
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma, München
Methanol	J. T. Baker, Deventer, Holland
N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylene diamine	Fluka, Sigma, München
Natriumacetat (C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub> )	Fermentas, St. Leon-Rot
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Nuclease-Free Water	Promega, Mannheim
p-Cumarsäure	Sigma, Steinheim
Poly (dl-dC)	GE Healthcare, Freiburg
POP7 Polymer	Applied Biosystems, Mannheim
Protease Inhibitor Cocktail (PIC) Complete	Sigma, Steinheim
Phenol:Chloroform	Roth, Karlsruhe
ProtoGel Acrylamid	National Diagnostics
RNase-Free DNase	Qiagen, Hilden
Roti®-Safe Gelstain	Roth, Karlsruhe
Saccharose	Merck, Darmstadt
SeaKem LE Agarose	FMC Bioproducts
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Merck, Darmstadt
PBS ohne Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup>	Gibco BRL, Eggenstein
TE-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Trichostatin A	Sigma, Steinheim
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	USB, USA
Triton X-100	Sigma, Steinheim
Trizma Base	Sigma, Steinheim
Trichostatin A	Sigma, Steinheim
Tween-20	Merck, Darmstadt



### 2.1.2 Zellkulturmaterialien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Gibco BRL, Eggenstein
Roswell Park Memorial Institute (RPMI)	Gibco BRL, Eggenstein
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA GmbH, Pasching
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Streptomycin /Penicillin	Gibco BRL, Eggenstein
Insulin-Transferrin-Selenium A	Gibco BRL, Eggenstein
Trypsin/ EDTA (25%)	Gibco BRL, Eggenstein

### 2.1.3 Komplettierte Medien für die Zellkulturen

#### Kulturmedium 1 - DMEM:

90% (v/v) DMEM	Gibco BRL, Eggenstein
10% (v/v) FCS	PAA GmbH, Pasching
2 mM L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein

#### Kulturmedium 2 - RPMI:

90% (v/v) RPMI	Gibco BRL, Eggenstein
10% (v/v) FCS	PAA GmbH, Pasching
2 mM L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein

#### Kulturmedium 3 - RPMI:

90% (v/v) RPMI 1640	Gibco BRL, Eggenstein
10% (v/v) FCS	PAA GmbH, Pasching
2 mM L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
10 mg/ml Insulin-Transferrin-Selenium-A	Invitrogen, Karlsruhe
50 ng/ml EGF	Macs Miltenyi Biotec
10 ng/ml FGF	Macs Miltenyi Biotec

#### Trypsin-EDTA-Lösung (1x):

0,25% (w/v) Trypsin	Gibco BRL, Eggenstein
1 mM EDTA	Gibco BRL, Eggenstein
in PBS ohne Mg <sup>2+</sup> und Ca <sup>2+</sup>	Gibco BRL, Eggenstein

### 2.1.4 Bakteriennährmedien

#### LB-Medium (pH 7,5):

1% (w/v) Bacto-Trypton	BD Bioscience, Heidelberg
0,5% (w/v) Hefeextrakt	BD Bioscience, Heidelberg
1% (w/v) NaCl	Roth, Karlsruhe

#### LB-Ampicillin-Agar:

1 l LB-Medium (s.o.)	
1% (w/v) Bacto-Agar	BD Bioscience, Heidelberg
50 mg/ml Ampicillin (Endkonzentration: 100 µg/ml)	Sigma, München

### 2.1.5 Lösungen und Puffer

Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Roth (Karlsruhe) und Sigma-Aldrich (München) bezogen.

Dulbecco's PBS	w/o Sodium Bicarbonat w/o Calcium and Magnesium	Gibco BRL, Eggenstein
5x Ladungspuffer	50% Glycerol 0,5 M EDTA 1 M Tris pH 7,5 H <sub>2</sub> O Bromphenolblau (1:3), Xylene Cyanol (1:3)	5 ml 1 ml 200 µl ad 10 ml
10x PBS pH 7,4	NaCl Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	90 g 14,33 g 2,67 g ad 1 l
5x TBE (Tris-Borat EDTA)	Trizma Base Borsäure 0,5 M EDTA pH 8 H <sub>2</sub> O	54 g 27,5 g 20 ml ad 1 l

1 M Tris pH 7,5

Trypanblau

0,1 N NaOH

Bradford-Lösung

Sigma, München

Merck, Darmstadt

BioRad, München

### 2.1.6 Enzyme und Reaktionspuffer

Alkalische Phosphatase (CIAP; 1 U/μl)

DNase I

Glycogen

*HpaII* Methylase (4 U/μl)

Fermentas, St. Leon-Rot

Roche, Grenzach-Whylen

Roche, Mannheim

New England BioLabs,

Schwalbach

Ligase Puffer

PfuTurbo® Hotstart DNA Polymerase (2,5 U/μl)

Proteinase K

ProTEV

Restriktionsendonukleasen

Fermentas, St. Leon-Rot

Stratagene, Heidelberg

Millipore, Schwalbach

Promega, Mannheim

New England BioLabs,

Schwalbach oder Fermentas, St.

Leon-Rot

10x Restriktionspuffer

New England BioLabs,

Schwalbach oder Fermentas, St.

Leon-Rot

RNase Inhibitor

RQ1 RNase-Free DNase

T4 DNA-Ligase (5 U/μl)

10x T4 DNA-Ligase Puffer

T4 Polynukleotid Kinase (10 U/ml)

Taq DNA Polymerase (5 U/μl)

Fermentas, St. Leon-Rot

Promega, Mannheim

Fermentas, St. Leon-Rot

Fermentas, St. Leon-Rot

Fermentas, St. Leon-Rot

Qiagen, Hilden

### 2.1.7 Kits

BigDye® Terminator v1.1 Sequencing Kit

DNA Clean & Concentrator-25 Kit

Dual Luciferase® Reporter Assay Kit

EnPresso Tablet Set

Eukitt® quick-hardening mounting medium

EpiTect Bisulphite Kit

First Strand cDNA Synthesis Kit

Amersham Bioscience, Freiburg

Zymo Research, Freiburg

Promega, Mannheim

BioSilta, Oulu, Finnland

Sigma, Steinheim

Qiagen, Hilden

Fermentas, St. Leon-Rot

Halo Link™ Resin	Promega, Mannheim
HaloTag™ Resin	Promega, Mannheim
HaloTag® Protein Purification System	Promega, Mannheim
Illustra™ Microspin™ G-50 Säulen	GE Healthcare Bioscience, München
Magna ChIP™ G-Chromatin Kit	Millipore, Schwalbach
QIAamp Blood Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Spin Miniprep	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAShredder	Qiagen, Hilden
RNeasy® Mini Kit	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
Taq DNA Polymerase (5 U/μl)	Qiagen, Hilden
Taq Mastermix Kit	Qiagen, Hilden
TNT® Quick Coupled Transcription/ Translation System	Promega, Mannheim
TOPO TA cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Venor®GeM Mykoplasmandetektion Kit	Minerva-Biolabs, Berlin

### 2.1.8 Vektoren, Expressions- und Reporterplasmide

pcDNA3.1 (+) Expressionsplasmid	Invitrogen, Karlsruhe
pGL2 basic Firefly-Luciferase Reporterplasmid	Promega, Mannheim
pGL4.74 [hRLuc/ TK] Vektor	Promega, Mannheim
pCR2.1 TOPO-Vektor	Invitrogen, Karlsruhe
pCR-TOPO2.1 MAGE-A1(+47/+183)	PD V. Lobanekov, NIH; Bethesda, USA
pBIG-HA BORIS	PD V. Lobanekov, NIH; Bethesda, USA
pET-16b BORIS	PD V. Lobanekov, NIH; Bethesda, USA
pFN19A (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vektor	Promega, Mannheim
pcDNA3.1 (+) Expressionsvektor für MBD1v1, MBD1v3, MBD2a	Wischnewski F et al., 2007 MCR [234]

pGL2 MAGE-A1 Reporterplasmid (-82/+116)	Wischnewski F et al.,2007 MCR [234]
pRS shRNA BORIS Expressionsvektor	Origene, Rockville, USA
pRS shRNA scramble Expressionsvektor	Origene, Rockville, USA

## 2.1.9 Antikörper

**Tabelle 3: eingesetzte Erstantikörper**

Antikörper	Anwendung	Verdünnung	Hersteller
BORIS	EMSA/ WB	3 µl/ 1:10000	Abcam, Cambridge, England
BORIS	EMSA/ WB	3 µl/ 1:1000	Novus Biologicals, Littleton, USA
BORIS Lob #1	EMSA	3 µl	Group of V. Lobanenkov (NIH, Bethesda, USA)
BORIS Lob #2	EMSA	3 µl	Group of V. Lobanenkov (NIH, Bethesda, USA)
BORIS Lob #3	EMSA	3 µl	Group of V. Lobanenkov (NIH, Bethesda, USA)
BORIS Lob #4	EMSA	3 µl	Group of V. Lobanenkov (NIH, Bethesda, USA)
BORIS Lob #5	EMSA/ WB	3 µl/ 1:1000	Group of V. Lobanenkov (NIH, Bethesda, USA)
BORIS Lob #6	EMSA	3 µl	Group of V. Lobanenkov (NIH, Bethesda, USA)
Sp1	EMSA/ WB	3 µl/1:1000	Millipore, Billerica, USA
H3K4me	ChIP	3 µg	Millipore, Billerica, USA
H3K4me2	ChIP	3 µg	Millipore, Billerica, USA
H3K4me3	ChIP	3 µg	Millipore, Billerica, USA
H3K9ac	ChIP	3 µg	Millipore, Billerica, USA
H3K9me	ChIP	3 µg	Millipore, Billerica, USA
H3K9me3	ChIP	3 µg	Millipore, Billerica, USA
H4K8ac	ChIP	3 µg	Abcam, Cambridge, England
H4K20me	ChIP	3 µg	Millipore, Billerica, USA
H4K20me2	ChIP	3 µg	Millipore, Billerica, USA
H4K20me3	ChIP	3 µg	Millipore, Billerica, USA
IgG	ChIP	2 µg	Abcam, Cambridge, England

**Tabelle 4: Verwendete konjugierte Sekundärantikörper**

Antigen	Spezies	Konjugat	Hersteller
Kaninchen	Schwein	Peroxidase	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Maus	Kaninchen	Peroxidase	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark
Ziege	Kaninchen	Peroxidase	DakoCytomation, Glostrup, Dänemark

### 2.1.10 Primer

Alle aufgelisteten Primer wurden von Sigma-Aldrich, Steinheim hergestellt.

#### 2.1.10.1 Primer für Natriumbisulfit-behandelte DNA

Tabelle 5:

Name	Nukleotidsequenz 5'-3'	Produkt (bp)	Annealing (T°C)
5'-MAGE-A1_For	CCC AAG CTT TTT TAT TTT TAT TTA GGT AGG ATT	322	55
3'-MAGE-A1_Rev	CGG GGT ACC CCT AAT ATC TCT CAA AAC TTT TAA		
5'-MAGE-A2_For	GGT ATA TAT TGG TAA TGA TTT TAT TT(T/C) GAG	563	59
3'- MAGE-A2_Rev	CCC TAC AAA AAA ATC CAA ACC C(G/T)A CAA		

#### 2.1.10.2 Für cDNA-Expressionsanalysen verwendete Primer

Tabelle 6:

Name	Nukleotidsequenz 5'-3'	Produkt (bp)	Annealing (T°C)
BORIS_For	CTC AGG TGA GAA GCC TTA CG	134	57
BORIS_Rev	TGA TGG TGG CAC AAT GGG		
MAGE-A1_For	CGG CCG AAG GAA CCT GAC CCA G	429	65
MAGE-A1_Rev	GCT GGA ACC CTC ACT GGG TTG CC		
MAGE-A2_For	AAG TAG GAC CCG AGG CAC TG	236	58
MAGE-A2_Rev	GAA GAG GAA GAA GCG GTC TG		
MAGE-A3_For	TGG AGG ACC AGA GGC CCC C	725	62
MAGE-A3_Rev	GGA CGA TTA TCA GGA GGC CTG C		
MAGE-A12_For	GCG CGT TGG AGG TCA GAG A	420	56
MAGE-A12_Rev	CGG ATT GAC TCC AGA GAG TA		
β-Aktin_For	GGC GGC ACC ACC ATG TAC CCT	202	60
β-Aktin_Rev	AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT		
Ets-1_For	ATG GAG TCA ACC CAG CCT AT	287	55
Ets-1_Rev	CCC AGA CAA CAT GTG CAT GG		
Sp1_For	CAG ACT CAG TAT GTG ACC AA	241	56
Sp1_Rev	GTT GAG TAG CTA TTG GCA TT		

### 2.1.10.3 Für Klonierung verwendete Oligonukleotide

Tabelle 7:

Name	Nukleotidsequenz 5'-3'	Annealing (T°C)
MAGE-A1 (-77/-183)_For	GTT CCC GCC AGG AAA CAT C	60
MAGE-A1 (-77/-183)_Rev	GCC CAG GCT GAG ACG TCT TCC	
BORIS-Sgfl_For	CCA AAA TGC GAT CGC ATG TAC CCA TAC GAT GTT CCA	60
BORIS-PmeI_Rev	GAA TCA AGT TTA AAC TCA CTT ATC CAT CGT GTT	
Ets-1-KpnI_For	CCA AAA TGG TAC CAT GAA GGC GGC CGT CGA T	60
Ets-1-NotI_Rev	GAA TCA AGC GGC CGC TCA CTC GTC GGC ATC TGG	
Ets-1-Sgfl_For	CCA AAA TGC GAT CGC ATG AAG GCG GCC GTC GAT	58
Ets-1-PmeI_Rev	GAA TCA AGT TTA AAC TCA CTC GTC GGC ATC TGG	
hTBP-Comp/N-EcoRI_For	CCA AAA TGA ATT CAT GGA TCA GAA CAA CAG C	58
hTBP-Comp/C-XhoI_Rev	GAA TCA ACT CGA GTT ACG TCG TCT TCC TGA ATC C	
hTBP-N-XhoI_Rev	GAA TCA ACT CGA GAG AAC TCT CCG AAG CTG G	
hTBP-C-EcoRI_For	CCA AAA TGA ATT CGG GAT TGT ACC GCA GCT G	56
hTBP-Comp/N-Sgfl_For	CCA AAA TGC GAT CGC ATG GAT CAG AAC AAC AGC	
hTBP-Comp/C-PmeI_Rev	GAA TCA AGT TTA AAC TTAC GTC GTC TTC CTG AA	
hTBP-N-PmeI_Rev	GAA TCA AGT TTA AAC AGA ACT CTC CGA AGC TGG	
hTBP-C-Sgfl_For	CCA AAA TGC GAT CGC GGG ATT GTA CCG CAG CTG	
MBD1v1/v3-Sgfl_For	CCA AAA TGC GAT CGC ATG GCT GAG GAC TGG CT	68
MBD1v1/v3-PmeI_Rev	GAA TCA AGT TTA AAC CTA CTG CTT TCT AGC TC	
MBD2a-Sgfl_For	CCA AAA TGC GAT CGC CTT AAG CTT GGT ACC GAG	62
MBD2a/b-PmeI_Rev	GAA TCA AGT TTA AAC TTA GGC TTC ATC TCC ACT	
MBD2b-Sgfl_For	CCA AAA TGC GAT CGC ATG GAT TGC CCG GCC CTC	
Sp1-EcoRI_For	CCA AAA TGA ATT CAT GAG CGA CCA AGA TCA C	58
Sp1-XhoI_Rev	GAA TCA ACT CGA GTC AGA AGC CAT TGC CAC T	
Sp1-Sgfl_For	CCA AAA TGC GAT CGC ATG AGC GAC CAA GAT CAC	60
Sp1-PmeI_Rev	GAA TCA AGT TTA AAC TCA GAA GCC ATT GCC ACT	

#### 2.1.10.4 Für DNA-Sequenzierungsanalysen verwendete Primer

Tabelle 8:

Name	Nukleotidsequenz 5'-3'	Annealing (T°C)
GL1_For	TGT ATC TTA TGG TAC TGT AAC TG	50
GL2_Rev	CTT TAT GTT TTT GGC GTC TTC CA	50
T7_For	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	50
BGH_Rev	TAG AAG GCA CAG TCG AGG	50
Flexi_For	AGA TTT CCG GCG AGC CAA	50
Flexi_Rev	ATC AGC TTG CAT GCC TGC A	50

#### 2.1.10.5 Für quantitative *realtime* PCR eingesetzte Oligonukleotide

Tabelle 9:

Name	Nukleotidsequenz 5'-3'	Annealing (T°C)
BORIS_For	CTC AGG TGA GAA GCC TTA CG	57
BORIS_Rev	TGA TGG TGG CAC AAT GGG	
MAGE-A1_For	GTT CCC GCC AGG AAA CAT C	58
MAGE-A1_Rev	GAA CTC TAC GCC GTC CCT CAG	
RPLP0_For	TTA GTT TGC TGA GCT CGC CAG	60
RPLP0_Rev	CTC TGA GCT GCT GCC ACC TG	

#### 2.1.10.6 Verwendete Oligonukleotidsequenz in der shRNA BORIS

Oberstrang

*sense* *antisense*

5'-ATCTCTGTCCTTTCTGAGCAATTCACCAATCAAGAGTTGGTGAATTGCTCAGA  
AAGGACAGAGAT-3'

Unterstrang

*antisense* *sense*

5'-ATCTCTGTCCTTTCTGAGCAATTCACCAACTCTTGATTGGTGAATTGCTCAGA  
AAGGACAGAGAT-3'



### 2.1.10.7 Für den EMSA verwendete Oligonukleotide

Tabelle 10:

Name	Nukleotidsequenz 5'-3'
MAGE-A1 (+47/+183)	GGC TCT GTG AGG AGG CAA GGT GAG AGG CTG AGG AGG ACT GAG GAC CCC GCC ACT CCA AAT AGA GAG CCC CAA ATA TTC CAG CGC CGC CCT TGC TGC CAG CCC TGG CCC ACC CGC GGG AAG ACG TCT CAG CCT GGG C
MAGE-A1 (-77/-36)	TCC CGC CAG GAA ACA TCC GGG TGC CCG GAT GTG ACG CCA CTG
MAGE-A1 (-77/-36) mut1	TCC CGC CAG GAA ACA TCC <b>TTA</b> TGC CCG GAT GTG ACG CCA CTG
MAGE-A1 (-77/-36) mut8	<b>TCT TGA TAG</b> GAA ACA TCC GGG <b>TAT TTA</b> AAT GTG <b>ATT TTA TTA</b>
MAGE-A1 (-77/-36) del1 (-59/-50)	TCC CGC CAG GAA ACA TCC ATG TGA CGC CAC TG
MAGE-A1 (-77/-50) del2 (-49/-36)	TCC CGC CAG GAA ACA TCC GGG TGC CCG G
MAGE-A1 (-77/-43) del3 (-42/-36)	TCC CGC CAG GAA ACA TCC GGG TGC CCG GAT GTG AC
MAGE-A1 5' (-77/-60) mut2	TCC CGC CAG GAA ACA TCC
MAGE-A1 3' (-55/-36) mut3	GCC CGG ATG TGA CGC CAC TG
MAGE-A1 3' (-77/-36) mut4	<b>GCT TGA</b> ATG TGA CGC CAC TG
MAGE-A1 3' (-77/-36) mut5	GCC CGG ATG TGA <b>TGT TAC</b> TG
MAGE-A1 3' (-77/-36) mut6	<b>GCT TGA</b> ATG TGA <b>TGT TAC</b> TG
MAGE-A1 3' (-77/-36) mut7	<b>ATT TAA</b> ATG TGA <b>TTT TAT TA</b>
Ets-1 Konsensussequenz	GAT CTC GAG CAG GAA GTT CGA
Sp1 Konsensussequenz	ATT CGA TCG GGG CGG GGC GAG C
Sp1 Konsensussequenz mut	ATT CGA TCG <b>GTT</b> CGG GGC GAG C

### 2.1.11 Standardmarker

DNA <i>Molecular Weight</i> Marker VII	Roche, Mannheim
DNA <i>Molecular Weight</i> Marker VIII	Roche, Mannheim
DNA <i>Molecular Weight</i> Marker XIV	Roche, Mannheim
<i>Full Range Rainbow</i> RPN800	Amersham Bioscience, Freiburg

### 2.1.12 Eukaryotische Zellen

Tabelle 11: verwendete Zelllinien

Zelllinie	Tumorart	Quelle	Kulturmedium
BT20	duktales Mammakarzinom	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas	1
BT474	duktales Mammakarzinom	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas	2
GI101	duktales Mammakarzinom	Institut for Cancer Research, Plantation, Florida, USA	1
MCF-7	duktales Mammakarzinom	ICRF Laboratory, St Thomas' Hospital, London, UK	1
MDA-MB 231	duktales Mammakarzinom	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas	1
MDA-MB 468	Adenokarzinom der Brust	ICRF Laboratory, St Thomas' Hospital, London, UK	1
T47D	duktales Mammakarzinom	ICRF Laboratory, St Thomas' Hospital, London, UK	2

Zelllinie	Tumorart	Quelle	Kulturmedium
MTSV1.7	normale Brustepithelzellen	ICRF Laboratory, St Thomas' Hospital, London, UK	1
Du145	Prostatakarzinom	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas	1
LNCap	Prostatakarzinom, Lymphknotenmetastase	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas	1
LoVo	Colorektales Adenokarzinom	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas	1
WiDr	Colorektales Adenokarzinom	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas	1
Colo205	Colorektales Adenokarzinom	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas	1
HL60	Akute promyeloische Leukämie	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas	2
HepG2	Hepatozelluläres Karzinom	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas	1
BCM1	Zellen aus dem Knochenmark einer Brustkrebspatientin	[9, 11]	3
LCM1	Zellen aus dem Knochenmark eines Lungenkrebspatienten	[9, 11]	3
PCE1	Zellen aus dem Knochenmark eines Prostatakrebspatienten	[9, 11]	3

### 2.1.13 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	Invitrogen, Karlsruhe
<i>E. coli</i> Top10 (TOPO TA cloning Kit)	Invitrogen, Karlsruhe
Single Step KRX kompetente Zellen	Promega, Mannheim

### 2.1.14 Radioaktivität

[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-dATP	Hartmann Analytic, Braunschweig
[ <sup>35</sup> S]-L-Methionin	Hartmann Analytic, Braunschweig

### 2.1.15 Verbrauchsmaterialien

AirOtop	BioSilta, Oulu, Finnland
Eppendorf-Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon-Röhrchen (15 und 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Fuji Medical X-ray Film	Fuji, Düsseldorf
Immobilion PCDF-Membran	Millipore, Schwalbach

Kryo-Tubes TM Vials	Nunc, Wiesbaden
Multipette und Combitips	Eppendorf AG, Hamburg
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld Laboratory Glasware
Pipettenspitzen	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettus Akku	Sarstedt, Nümbrecht
Serologische Pipetten	Becton Dickinson, Heidelberg
twin.tec PCR-Platte	Eppendorf AG, Hamburg
UVette	Eppendorf AG, Hamburg
6-„well“-Platte	BD Falcon, Heidelberg
Whatman-Filter	VWR, Darmstadt
Zellkulturflaschen (T25 und T75)	Nunc, Wiesbaden
Zellschaber	BioChrom, Berlin

### 2.1.16 Geräte

Analysenwaage Satorius BP6100	MS Laborgeräte, Heidelberg
Analysenwaage Satorius CP2245	MS Laborgeräte, Heidelberg
Bakterienschüttler Certomat	B. Braun Biotech, International
Beckman Coulter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Biofuge pico Heraeus	Kendro, Langenselbold
Butangasbrenner flammy S	Schütt, Göttingen
Durchlichtmikroskop, Wilovert S	Helmut Hund GmbH, Wetzlar
EMSA-Apparatur	BioRad, München
Filmentwickler Model Hyperprocessor	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK
Geldokumentations-System GeneGenius 2	Syngene, Cambridge, UK
Gelkammer ComPor L Mini/ Midi	Bioplastics RV, Landgraaf, NL
Geltrockner 583	Bio-Rad, München
Genetic Analyzer 3130 Hitachi	Applied Biosystems, Mannheim
Gießstand Hoefer	Hoefer Amersham Biosciences, Freiburg
Nanodrop ND100 Spectrometer	PeqLab, Erlangen
Netzteil E143	Consort, Turnhout, BE
pH-Meter inoLab	WTW, Heidelberg
Photometer 6131	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe pipetus®	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Realplex <sup>4</sup> Mastercycler epgradient S	Eppendorf AG, Hamburg

Rollmischer Stuart SRT1	Bibby Sterilin, Staffordshire, UK
Rotator <i>Wheel</i>	neoLab, Heidelberg
Scanner Epson 1680	LaserSoft Imaging AG, Kiel
Schüttler	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Semidry Blotapparatur	BioRad München
Sonicator UP50H	Dr. Hielscher GmbH, Teltow
Thermocycler Flexigene	Techne, Staffordshire, UK
Thermomixer „kompakt“	Eppendorf AG, Hamburg
Thermoschüttler HTM 130	HLC, Bovenden
Trockenschrank Hereaus B12	Kendro, Langselbold
Vortex Genie 2	Scientific Industries, New York, USA
Wasserbad GFL-1003	GmbH für Labortechnik, Burgwedel
Zellkulturinkubator Hera cell 150	Thermo Scientific
Zellkulturmikroskop	Hund, Wetzlar
Zentrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Heaeus 3S-R	Kendro, Langenselbold
Zentrifuge Rotofix 32	Hettich, Villingen-Schwenningen

### 2.1.17 Software

Gene Mapper v4.0	Applied Biosystems, Mannheim
Sequencing Analysis 5.2	Applied Biosystems, Mannheim
GLOMAX	Promega, Mannheim
Realplex Software	Applied Biosystems, Mannheim
NCBI Blast	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi</a>
ENSEMBL	<a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>
Primer3	<a href="http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi">http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi</a>
Finch TV	<a href="http://www.geospiza.com/fincht">http://www.geospiza.com/fincht</a>

## 2.2 Methoden

Während meiner Doktorarbeit war ich auf Zuarbeit angewiesen (Schwangerschaft). Diese Zuarbeiten sind in der vorliegenden Dissertation gekennzeichnet. Nicht gekennzeichnete Arbeiten wurden von mir ausgeführt.

### 2.2.1 Zellkulturmethoden

#### 2.2.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in Hera150-Brutschränken bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> für Zellen in RPMI-Medium beziehungsweise 10% CO<sub>2</sub> für Zellen in DMEM-Medium. Die mikrometastatischen Zellen wurden bei 5% CO<sub>2</sub> und 10% O<sub>2</sub> RPMI-Medium in Kultur gehalten.

Sobald die Zellen zu 90% konfluent waren, wurden sie passagiert. Zunächst wurde das Medium abgesaugt und die adhärennten Zellen mit PBS ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> gewaschen. Durch Zugabe von Trypsin/EDTA (1/5 des Volumens) wurden die Zellen vom Kulturgefäßboden gelöst. Die abgelösten Zellen wurden in das jeweilige vorgewärmte Vollmedium (Kapitel 2.1.3) aufgenommen und anschließend für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 5 bis 10 ml Kulturmedium resuspendiert und in einer Dichte von 10-20% ausgesät. In regelmäßigen Abständen wurden die kultivierten Zellen einem Mycoplasmen-Test mit dem Venor<sup>®</sup> GeM Kit (Minerva Biolabs) nach Angaben des Herstellers unterzogen.

#### 2.2.1.2 Kryokonservierung eukaryotischer Zellen

Eukaryotische Zellen können durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff (-196°C) für einen langen Zeitraum gelagert werden. Damit es zu keiner Ausbildung von Eiskristallen kommt, wird den Zellen durch die Zugabe des stark hygroskopischen Dimethylsulfoxids (DMSO) langsam das Wasser entzogen. Etwa 2x10<sup>6</sup> Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium [90% (v/v) Vollmedium mit 10% (v/v) DMSO] resuspendiert und anschließend in 1,5 ml Kryoröhrchen (Nunc) überführt. Die Lagerung erfolgte zuerst für 1 bis 2 Tage bei -80°C, ehe sie in Flüssigstickstoff eingefroren wurden.

Zur Kultivierung wurden N<sub>2</sub>-eingelagerte Zellen für 1-2 min bei 37°C im Wasserbad geschwenkt. Bei Verflüssigung der Zellsuspension erfolgte eine direkte Aufnahme in 10 ml 37°C warmen Medium, welches anschließend für 3 min bei 1200 rpm zentrifugiert wurde, um das DMSO auszuwaschen. Das Zellpellet wurde dann in frisches Kulturmedium aufgenommen und in der gewünschten Dichte ausgesät.

### 2.2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die Zellzahl wurde mittels Trypanblau-Färbung bestimmt. Der Färbungsvorgang findet nur bei toten Zellen statt. Im Gegensatz zu den lebenden Zellen besitzen diese keine intakte Zellmembran mehr, so dass der Farbstoff durch Diffusion ins Zellinnere gelangt und dort an Proteine bindet.

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl Zellsuspension mit dem gleichen Volumen Trypanblaulösung vermischt. Das Gemisch aus Zellen und Farbstoff wurde dann in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Trypanblau angefärbten Zellen innerhalb der vier großen Quadranten wurden unter dem Durchlichtmikroskop ausgezählt. Da jeder Quadrant ein Volumen von 0,1 mm<sup>3</sup> (10<sup>-4</sup> ml) entspricht, wurde mit folgender Gleichung die Zellzahl in 1 ml berechnet:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl ausgezählter Quadranten}} \times 2 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 10^4$$

**Formel 1: Berechnung der Zellzahl pro ml**

### 2.2.1.4 Behandlung der Zellen mit 5-Aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A

Zur Induktion der Genexpression wurden die Zelllinien aus Tabelle 11 mit dem Demethylierungsgagens 5-Aza-2'-deoxycytidin (Aza; Sigma) und/oder mit dem Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA; Sigma) behandelt.

Die Zellen wurden 24 h nach dem Passagieren und bei einer 30%-igen Konfluenz mit frischem Medium und 1 µM Aza für 72 h inkubiert. Aufgrund der Instabilität des Demethylierungsgagens wurde die Substanz jeweils aller 24 h neu dazugegeben.

Die Behandlung der Zellen mit 0,5 µM TSA erfolgte in den letzten 24 h.

Erfolgte eine gleichzeitige Behandlung mit Aza und TSA, so wurden die Zellen zunächst in Tagesintervallen für 72 h mit Aza kultiviert. In den letzten 24 h erfolgte eine Inkubation mit zusätzlichen 0,5 µM TSA.

Zur Kontrolle der basalen Genexpression wurden unbehandelte Zellen immer in einem Parallelansatz kultiviert.

### 2.2.1.5 Transfektion eukaryotischer Zellen mit FuGENE HD

Die Transfektion der Reporter- und Expressionsplasmide in die eukaryotischen Zellen erfolgte mit Hilfe des Transfektionsreagenzes FuGENE<sup>®</sup>HD (Roche). FuGENE besteht aus kationischen Lipiden und bindet im Komplex mit Plasmid-DNA an negativ geladene Oberflächenstrukturen der Zellen, um über Endocytose in die Zellen aufgenommen zu werden.

Für die Transfektion zur Messung der Luciferaseaktivität wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion mit geeigneter Zellzahl in 6-*well*-Platten ausgesät, so dass am Tag der Durchführung eine 60%-ige Konfluenz vorlag. Für die Transfektion wurden pro *well* 2 µg Gesamt-Plasmid-DNA eingesetzt, die mit 3 µl (bei MCF-7 Zellen) oder 6 µl (bei mikrometastatischen Zellen) FuGENE-Transfektionsreagenz und mit serumfreien Medium auf ein finales Volumen von 100 µl aufgefüllt wurde. Für die Normalisierung wurden 0,2 µg des hRLuc-Vektors zu jedem Ansatz pipettiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden die DNA-FuGENE-Gemische auf die semikonfluenten Zellen aufgetropft. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und die Aktivität der Luciferase wurde am Luminometer gemessen.

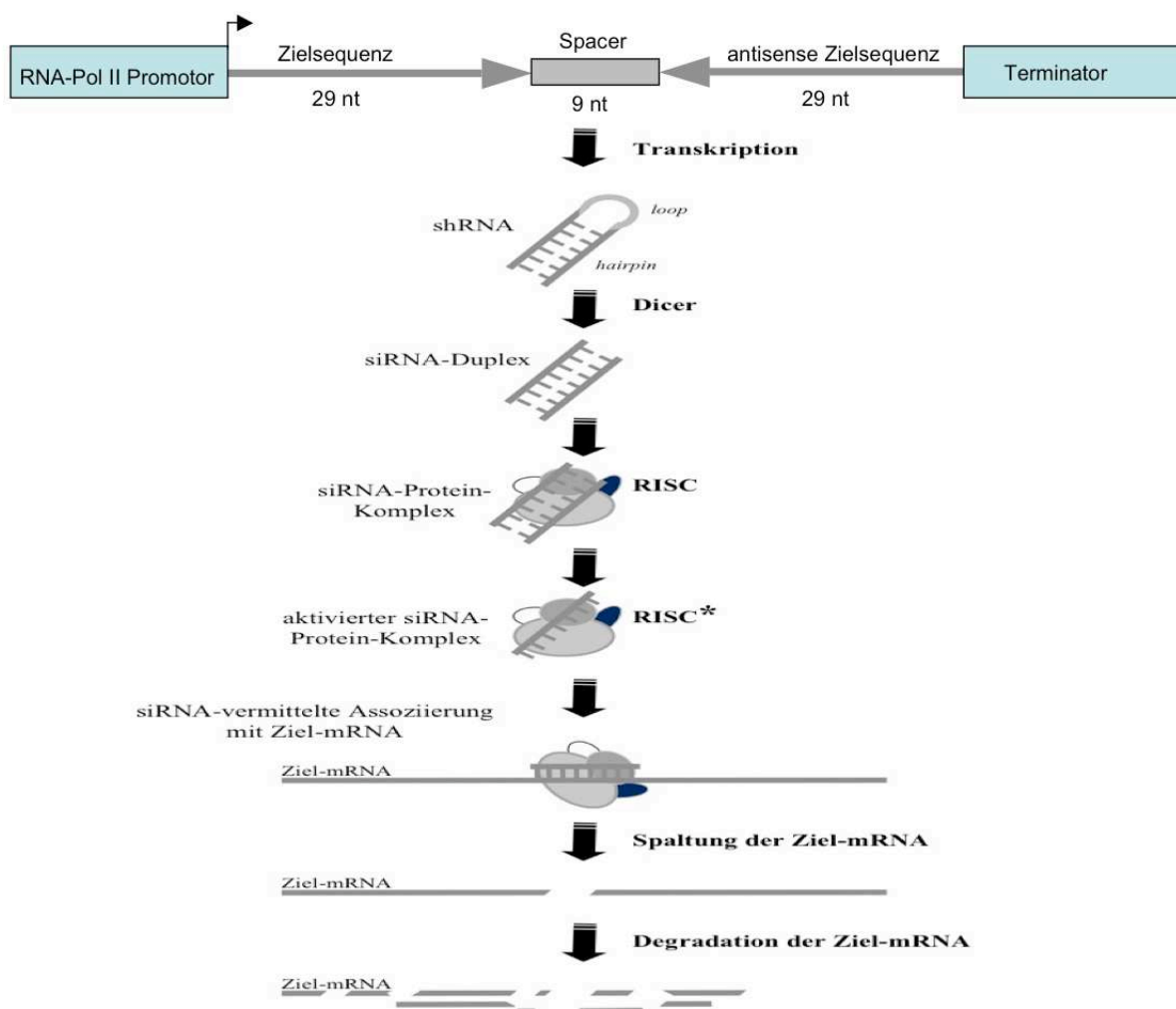
Für die Transfektion zur Bestimmung der mRNA-Expression wurden die Zellen einen Tag vor der Transfektion in T25-Zellkulturflaschen ausgesät, so dass sie am Tag der Durchführung eine Konfluenz von 60% hatten. Die Transfektionsmische enthielten jeweils 5 µg der Expressionsplasmide und 9 µl FuGENE-Transfektionsreagenz und wurden mit serumfreien Medium auf ein Endvolumen von 300 µl aufgefüllt. Es wurde stets eine T25-Zellkulturflasche unbehandelt gelassen, um die basale Expression zu analysieren. Das DNA-FuGENE-Gemisch wurde für 15 min bei RT inkubiert und anschließend vorsichtig auf die Zellen getropft. Am darauf folgenden Tag erfolgte ein Mediumwechsel, so dass die Zellen dann für weitere 48 h bei entsprechenden Kulturbedingungen inkubiert wurden.

### 2.2.1.6 Transfektion von shRNA

Die Methode der shRNA (*small hairpin*) ist eine junge RNA-Technologie und basiert auf der Bindung komplementärer RNA an spezifische Gen-Transkripte, die infolgedessen in den Zielzellen abgebaut werden. Somit kommt es zur Unterdrückung der Genexpression des Zielgens, ohne dabei in das Genom der Zelle einzugreifen. Abbildung 12 beschreibt die shRNA-Methode. Um ein spezifisches Gen nach seiner Transkription abzuschalten, wird ein Expressionsplasmid benötigt, welches eine ca. 70 nt lange DNA-Sequenz enthält, die für eine shRNA kodiert, *downstream* eines Polymerase II Promotors liegt und von einer Terminatorsequenz gefolgt wird. Diese DNA-Sequenz besteht aus einer 29 nt langen Genzielsequenz (*sense*) und ihrer *antisense* Sequenz in invertierter Orientierung,

getrennt durch eine 9 nt lange *Spacer*-Sequenz. Erfolgt die Transkription dieser Sequenzfolge, so faltet sich die RNA automatisch und generiert die shRNA.

Mit Hilfe einer RNase III (*Dicer*) wird doppelsträngige RNA (dsRNA) in 19-23 nt lange dsRNA-Fragmente mit 5'-phosphorylierten Enden, 3'-OH-Enden und ungepaarten 2nt-Überhängen zytoplasmatisch gespalten. Des Weiteren wird die *Spacer*-Sequenz (*loop*) entfernt und es formiert sich eine siRNA-Duplex [257]. Das doppelsträngige siRNA-Molekül wird anschließend in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) inkorporiert und dann aktiviert (RISC\*). Im Folgenden wird einer der siRNA-Stränge degradiert, wohingegen der andere Strang mit dem RISC\* assoziiert bleibt. Nach der Aktivierung von RISC\* kommt es zur Assoziation mit Ribosomen und führt vermutlich während ihrer Translation zur Erkennung potentieller mRNA-Substrate. Die Ziel-mRNA wird anschließend endonukleolytisch gespalten und mittels zellulärer RNasen degradiert [258-260].



**Abbildung 13: Schematische Darstellung der shRNA-vermittelten RNA-Interferenz.** Modifiziert nach Dykxhoorn et al., 2003 [258].



Für jeden Ansatz wurden  $3 \times 10^5$  Zellen in ein *well* einer 6-*well*-Platte eingesät und für 24 h kultiviert. Für die Transfektion wurde pro *well* 1  $\mu\text{g}$  shRNA Expressionsvektor allein oder in Kombination mit weiteren Expressionsplasmiden (je 1  $\mu\text{g}$ ) eingesetzt, die mit 6  $\mu\text{l}$  FuGENE-Transfektionsreagenz bei den mikrometastatischen Zellen und mit serumfreien Medium auf ein finales Volumen von 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt wurden. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT wurden die DNA-FuGENE-Gemische auf die semikonfluenten Zellen aufgetropft. Nach 48 h wurden die Zellen geerntet und die Gesamt-RNA isoliert (Kapitel 2.2.2.4).

## **2.2.2 Molekularbiologische Methoden**

### **2.2.2.1 Isolierung von genomischer DNA**

Die Isolierung der genomischen DNA aus Zellkulturen wurde unter Verwendung des QIAamp Blood Kit (Qiagen) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Die Zellen wurden in T75er Kulturflaschen kultiviert und bei einer Konfluenz von 80-90% geerntet. Bis zur weiteren Verwendung wurde die genomische DNA bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

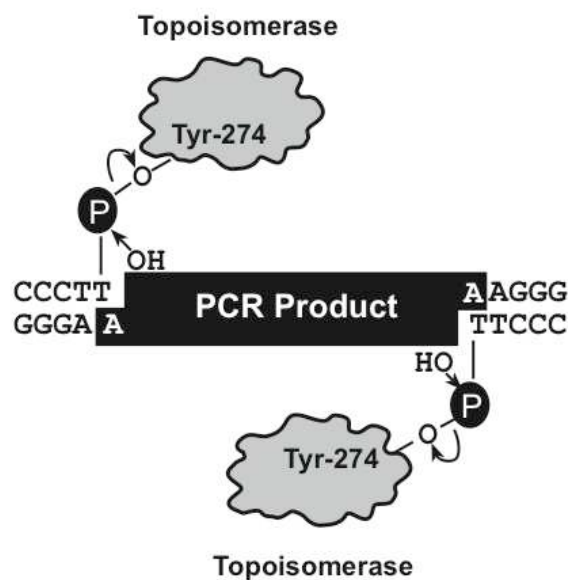
### **2.2.2.2 Natriumbisulfit-Behandlung genomischer DNA**

Für die Analyse des Methylierungsmusters der MAGE-A-Promotoren wurde die DNA aus unbehandelten und behandelten Zellen mit Natriumbisulfit versetzt. Durch die Behandlung mit Natriumbisulfit wird unmethyliertes Cytosin in Uracil umgewandelt, während die Methylgruppe das methylierte Cytosin vor der Desaminierung schützt und somit das Cytosin erhalten bleibt. Folglich wird durch die selektive Umwandlung der unmethylierten Cytosine in Uracil die Methylierungsinformation in eine Sequenzinformation umgeschrieben. In einer anschließenden PCR (Kapitel 2.2.2.6) enthalten die DNA-Amplifikate Thymin anstelle von Uracil.

In Zusammenarbeit mit Bettina Steinbach (Institut für Tumorbilogie, UKE, Hamburg) wurde die Natriumbisulfit-Behandlung genomischer DNA mit Hilfe des EpiTec Bisulphite Kits (Qiagen) nach Herstellerangaben durchgeführt. Dafür wurden 1,5  $\mu\text{g}$  genomische DNA mit 85  $\mu\text{l}$  Bisulfit-Mix und 35  $\mu\text{l}$  DNA Protect Puffer versetzt. Da für eine Umwandlung des Cytosins die DNA in Einzelstrang-DNA vorliegen muss, wurde die DNA zunächst bei  $99^\circ\text{C}$  denaturiert. Es schlossen sich mehrere Inkubationsphasen von  $60^\circ\text{C}$  an. Die Natriumbisulfit-behandelte DNA wurde nun mit dem EpiTec Bisulphite Kits (Qiagen) aufgearbeitet und aufgereinigt, in 100  $\mu\text{l}$  Elutionspuffer gelöst und bis zur weiteren Verwendung bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert.

### 2.2.2.3 Klonierung der Natriumbisulfit-behandelten DNA in den pCR2.1 TOPO-Vektor

Die praktische Arbeit wurde durch Bettina Steinbach (TA, Institut für Tumorbologie, UKE, Hamburg) durchgeführt. Um das Methylierungsmuster der Promotoren bestimmen zu können, wurden 2 µl der Bisulfit-behandelten DNA in einer PCR mit MSP-Primern (Methylierungs-spezifische Primer, Tabelle 5) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mittels eines präparativen Gels (Kapitel 2.2.2.10) und nachfolgender Elution der DNA gereinigt. Laut Anweisung des Herstellers wurde die gereinigte DNA in den pCR2.1 TOPO-Vektor mit Hilfe des TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) kloniert und in kompetente *E. coli*-Bakterien transformiert (Kapitel 2.2.2.15). Die Klonierung mit dem TOPO-System hat den Vorteil, dass das PCR-Produkt durch die Taq DNA-Polymerase generierten Adenosin-Überhänge am 3'-Ende direkt in den Vektor kloniert werden kann (Abbildung 14). Außerdem können äußerst geringe Mengen an PCR-Produkt eingesetzt werden.



**Abbildung 14: Schematische Darstellung zur Klonierung eines PCR-Produktes mit Adenosin-Überhängen in den pCR2.1 Topo-Vektor.** Die Topoisomerase I vom Virus *Vaccina* bindet an doppelsträngige DNA und schneidet die Phosphordiesterbindung nach der 5'-CCCTT-Sequenz am jeweiligen Strang [261]. Die dabei freiwerdende Energie wird genutzt, um den Tyrosinrest 274 der Topoisomerase I kovalent an die DNA zu binden. Durch die freie OH-Gruppe am 5'-Ende des PCR-Produktes wird die kovalente Bindung zwischen DNA und Enzym wieder gelöst. Die frei werdende Energie wird für die Ligation des PCR-Produktes an die DNA genutzt [262].

### 2.2.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA

Für die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen wurde der RNeasy® Mini Kit (Qiagen) verwendet. Hierfür wurden die unbehandelten (basalen), Aza- und/oder TSA-behandelten oder transfizierte Zellen einmal mit 5 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von 1 ml RLT-Puffer mit β-Mercaptoethanol wurden die Zellen vom Boden des

Kulturgefäßes mit einem Zellschaber abgeschabt. Die Zellsuspension wurde auf die QIASHredder-Säule pipettiert und für 2 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Das Lysat wurde mit dem gleichen Volumen 70%-igem Ethanol (1 ml) versetzt und durch vorsichtiges Pipettieren homogenisiert. Das Homogenisat wurde auf eine RNeasy Säule überführt und für 15 sec bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach dem Waschen mit 350 µl RW1-Puffer wurde direkt auf der Säule ein DNaseI-Verdau für 15 min bei RT durchgeführt. Nach weiteren Waschschritten mit 350 µl RW1-Puffer sowie 500 µl RPE-Puffer zu je 15 sec und 13000 rpm folgte eine weitere Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm. Im letzten Schritt wurde die RNA in 30 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O eluiert. Die RNA-Konzentration und Reinheit wurde am Nanometer bestimmt und die Proben anschließend bei -80°C gelagert.

#### **2.2.2.5 RT-Reaktion (Reverse Transkription)**

Die Methode der „Reversen Transkription“ beschreibt ein allgemeines Verfahren, um die Genexpression von spezifischen Genen in Zellen oder Geweben nachzuweisen. Zuerst wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die RNA in cDNA umgeschrieben. Die cDNA kann dann in einer anschließenden PCR mit genspezifischen Primerpaaren amplifiziert werden.

Die Reverse Transkription wurde mit dem „First Strand cDNA Synthesis Kit“ (Promega) durchgeführt. Die eingesetzten Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer hybridisieren mit den poly(A)-Überhängen, die somit als Matrize für die reverse Transkriptionsreaktion dienen. Pro Ansatz wurde jeweils 1 µg Gesamt-RNA mit 1 µl Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer (0,5 µg/µl) in einem Reaktionsvolumen von 11 µl für 5 min bei 70°C denaturiert und anschließend auf Eis gestellt. Dem RNA-Primer-Gemisch wurden 7 µl Reaktionslösung bestehend aus 4 µl 5x Reaktionspuffer, 1 µl RiboLock Ribonuklease Inhibitor (20 U/µl) und 20 µl dNTP-Mix (10 mM) zugesetzt und für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach einer Zugabe von 2 µl M-MuLV Reversen Transkriptase (20 U/µl) wurde der Ansatz für 60 min bei 37°C inkubiert. Die Synthese-Reaktion wurde auf 70°C für 15 min erhitzt und so gestoppt. Die RT-Reaktionsprodukte wurden bei -20°C gelagert bis sie für die PCR verwendet wurden.

#### **2.2.2.6 DNA-Amplifikation durch Polymerasekettenreaktion (PCR)**

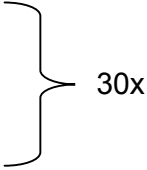
Die PCR ist ein Verfahren, bei dem durch eine DNA-Polymerase definierte Bereiche der DNA *in vitro* amplifiziert werden. Dies geschieht über zwei spezifische Oligonukleotid-Primer, die gegenläufig an den komplementären DNA-Strängen binden. Durch die Zugabe der vier Desoxyribonukleotide und eines geeigneten Mg<sup>2+</sup>-haltigen Enzympuffers kann mit Hilfe einer DNA-Polymerase die Neusynthese des zwischen den Primern liegenden DNA-Abschnitts erfolgen. Um eine möglichst große Ausbeute des

gewünschten DNA-Abschnitts zu erreichen, werden mehrere Amplifikationsschritte hintereinander geschaltet.

Je nach Fragestellung wurden zwei unterschiedliche DNA-Polymerasen für die Amplifikation von DNA gewählt. Bei der nachfolgenden Klonierung der PCR-Fragmente in Reporter- beziehungsweise Expressionsplasmide wurde die PfuTurbo® Hotstart DNA-Polymerase (Stratagene) verwendet, die aufgrund ihrer „*proof-reading*“-Aktivität eine deutlich verringerten Fehlerrate beim Einbau von Nukleotiden während der Synthese von DNA-Strängen aufweist. Für analytische Zwecke wurde die Taq DNA-Polymerase (Qiagen) verwendet. Im Vergleich zur PfuTurbo® Hotstart DNA-Polymerase besitzt das Enzym keine „*proof-reading*“-Aktivität, ist aber weniger empfindlich gegenüber Verunreinigungen.

### 2.2.2.7 Amplifikation mit PfuTurbo® Hotstart DNA-Polymerase

Die 50 µl Reaktionsansätze wurden auf Eis zusammen pipettiert und enthielten neben 5 µl Template-DNA, 5 µl 10x PfuTurbo-Reaktionspuffer [200 mM Tris-HCl (pH 8,8), 20 mM MgSO<sub>4</sub>, 100 mM KCl, 100 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10% (v/v) Triton X-100, 1 mg BSA], 1 µl dNTPs (10 mM, Roche, Mannheim), je 1 µl Primer (100 ng/µl), 36 µl H<sub>2</sub>O und 1 µl PfuTurbo® Hotstart DNA-Polymerase (2,5 U/µl). Die PCR-Reaktion wurde in einem Thermocycler (Flexigene) mit folgendem Programm durchgeführt:

- |  |   |
|--|---|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 95°C für 5 min (Initiale Denaturierung)</li> <li>2. 95°C für 1 min (Denaturierung)</li> <li>3. 52°C für 1 min (Primer-Annealing)</li> <li>4. 72°C für 30 sec (Primer-Extension)</li> <li>5. 72°C für 5 min (Auffüllreaktion)</li> <li>6. 4°C unendlich (Lagerung)</li> </ol> |  |
|--|---|

Die Temperatur für das Primer-Annealing lag je nach Nukleotidsequenz der beiden Primer (Tabelle 7) zwischen 56°C und 68°C. Die Dauer der Primer-Extension orientierte sich an der Größe des Amplifikationsproduktes und betrug 500 bp/min. Nach insgesamt 30 Zyklen folgte eine Auffüllreaktion der eventuell nicht fertig synthetisierten PCR-Produkte von 10 min bei 72°C. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei 4°C gelagert.

### 2.2.2.8 Amplifikation mit Taq DNA-Polymerase

Für eine PCR-Analyse mit der Taq DNA-Polymerase wurden als Matrize 100 ng genomische DNA, 10 ng Plasmid-DNA oder 3 µl cDNA eingesetzt. Die auf Eis

angesetzten 20 µl Reaktionsansätze enthielten neben der DNA noch 2 µl 10x Qiagen Taq Mastermix, je 0,5 µl Primer (100 ng/µl) und 0,5 µl Taq DNA-Polymerase (5 U/µl). Das Amplifikationsprogramm entsprach dem oben beschriebenen Programm mit der Ausnahme, dass die Extensionsgeschwindigkeit 1 kb/min betrug. Bei Verwendung von genomischer DNA wurde die Zyklenzahl auf 35 erhöht.

#### **2.2.2.9 Klonierung von PCR-Produkten**

Sollten PCR-Produkte in Plasmidvektoren kloniert werden, wurden speziell synthetisierte Oligonukleotid-Primer für die PCR-Amplifikation verwendet. Die Primer tragen an ihren 5'-Enden eine Schutzgruppe mit der Nukleotidsequenz CCAAAT oder GAATCAA. Dieser Sequenz folgt eine spezifische Erkennungssequenz für das zur Klonierung verwendete Restriktionsenzym. Am 3'-Ende der Oligonukleotid-Primer befindet sich die zur Zielsequenz komplementäre spezifische DNA-Sequenz. Die Schutzgruppen des PCR-Amplikons verhindern ein Aufschmelzen der DNA während des Restriktionsverdau, so dass dieser mit hoher Effizienz erfolgen kann. Die PCR-Reaktion erfolgte mit der PfuTurbo® Hotstart DNA-Polymerase. Die PCR-Produkte wurden nach erfolgreicher Amplifikation mit dem QIAquick® PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt und anschließend mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut (Kapitel 2.2.2.12). Anschließend wurden die DNA-Fragmente im Agarose-Gel aufgetrennt, aus dem Gel aufgereinigt und in den linearisierten Plasmidvektor ligiert.

#### **2.2.2.10 DNA-Gelelektrophorese**

Die Gelelektrophorese ist ein Verfahren, das zur analytischen und präparativen Trennung von DNA-Fragmenten im elektrischen Feld dient. Die DNA, aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen, wandert dabei im elektrischen Feld zur Anode. Die Geschwindigkeit der Wanderung ist von der Fragmentgröße und -struktur abhängig. Durch Verwendung eines geeigneten Größenstandards kann man die DNA einer bestimmten Größe zuordnen.

Hierzu wurde ein 1%-iges TBE-Agarosegel angesetzt. Nach dem Abkühlen wurden 2,5 µl Roti®-Safe Gelstain pro 50 ml Gellösung hinzugegeben. Dabei handelt es sich um eine *ready-to-use* Färbemischung. Die unter anderem darin enthaltenen Benzimidazole binden in der kleinen Grube der DNA-Helix; es kommt zu keiner Interkalation und durch UV-Bestrahlung emittiert Roti®-Safe Gelstain eine strahlend grüne Fluoreszenz. Die Aushärtung des Gels erfolgt in einer dafür vorgesehenen mit Kamm ausgestatteten Gelkammer bei RT. Anschließend wurde das Agarosegel in eine mit 1x TBE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und die aufzutrennenden DNA-Proben mit

5x Ladepuffer in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung der DNA erfolgte durch das Anlegen von 75-150 V in Richtung der Anode. Schließlich wurde das Gel unter dem UV-Licht bei 280 nm für analytische oder bei 365 nm für präparative Zwecke betrachtet.

#### **2.2.2.11 Aufreinigung und Elution von DNA aus Agarose-Gelen**

Für die Aufreinigung eines DNA-Fragments aus einem Agarosegel wurde die gewünschte Bande unter UV-Licht ( $\lambda = 365 \text{ nm}$ ) identifiziert und ausgeschnitten. Die DNA wurde anschließend mittels QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers aufgereinigt und in einem variablen Volumen  $\text{H}_2\text{O}$  eluiert. Die DNA wurde entweder direkt für die Ligation (Kapitel 2.2.2.14) verwendet oder bei  $-20^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

#### **2.2.2.12 Restriktionsverdau**

Bei einem Restriktionsverdau unterscheidet man zwei Methoden. Zum einen gibt es den analytischen Verdau, welcher der Charakterisierung von einer DNA-Probe dient. So wird beispielsweise der Erfolg einer Ligation oder die Integrität eines Plasmids nach Amplifikation in *E. coli* überprüft. Zum anderen gibt es den präparativen Verdau, bei dem ein gewünschtes DNA-Fragment mit Hilfe von Restriktionsenzymen aus einem Plasmid ausgeschnitten wird. Dieses Fragment kann isoliert und weiter verwendet werden, z. B. für die Insertion in einen neuen Vektor durch Ligation.

Generell wurde ein Restriktionsverdau in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  angesetzt. Hierbei wurden etwa 0,5  $\mu\text{g}$  der DNA mit je 0,5  $\mu\text{l}$  der gewünschten Restriktionsenzyme (10 U/ $\mu\text{l}$ ) zusammen mit 2  $\mu\text{l}$  des dazugehörigen 10x Restriktionspuffer eingesetzt. Zusätzlich war bei manchen Restriktionsenzymen die Zugabe von 2  $\mu\text{l}$  10x BSA für die Erhöhung der Aktivität erforderlich. Der Verdau erfolgte in der Regel über 2 h bei  $37^\circ\text{C}$ . Daran schloss sich eine analytische Auftrennung in einem 1%-igen Agarosegel oder eine Dephosphorylierung für die Ligation in einen Vektor.

#### **2.2.2.13 Dephosphorylierung**

Um eine Religation eines Vektors, der nur mit einem Restriktionsenzym geschnitten wurde und somit komplementäre Enden besitzt, zu vermeiden, wurden die entsprechenden Enden dephosphoryliert, das heißt die 5'-Phosphatgruppen des Vektors wurden entfernt. Hierzu wurden pro 1  $\mu\text{g}$  DNA 0,5  $\mu\text{g}$  Phosphatase zugegeben und bei  $37^\circ\text{C}$  für 1-1,5 h inkubiert. Bei einer Klonierung mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen konnte auf die Dephosphorylierung verzichtet werden.

### 2.2.2.14 Ligation

Die Ligation von Vektor- und Insert-DNA erfolgte mit Hilfe der T4 DNA-Ligase (Fermentas). In einem 10 µl Reaktionsansatz wurde 1 µl T4 DNA-Ligase (5 U/µl), 1 µl 10x Reaktionspuffer, 25 ng Vektor-DNA und eine variable Menge an Insert-DNA, die durch Berechnung mit der folgenden Gleichung ermittelt wurde, eingesetzt:

$$x \text{ ng Insert} = \frac{5 * 25 \text{ ng Vektor} \cdot \text{Insertlänge (bp)}}{\text{Vektorlänge (bp)}}$$

#### Formel 2: Berechnung der Insertmenge für die Ligation

Der Ligationsansatz wurde mit H<sub>2</sub>O auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt und anschließend über Nacht bei 16°C inkubiert. Als Kontrolle wurde anstatt des Insert das entsprechende Volumen von H<sub>2</sub>O dazugegeben. Die Erhöhung der Kopien des rekombinanten Plasmids erfolgte durch Transformation von Bakterien mit dem Ligationsansatz.

### 2.2.2.15 Transformation von Vektoren in kompetente *E.coli* Bakterien

Bei der Transformation werden die im Ligationsschritt entstandenen Vektoren in kompetente Bakterienzellen eingebracht.

Dazu wurden 30 µl von zuvor bei -80°C gelagerten kompetenten *E. coli*-Zellen (Invitrogen) langsam auf Eis aufgetaut. Danach erfolgte die Zugabe des gesamten Ligationsansatzes oder eine Pipettenspitze von bereits fertigen Plasmidkonstrukten zu den Bakterien, welche nun vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert wurden. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurde der Ansatz bei 42°C für 1 min erwärmt und nach 2 min auf Eis mit 470 µl vorgewärmten SOC-Medium aufgefüllt. Nach einer weiteren Inkubation von 1 h bei 37°C und 220 U/min wurden die nun transformierten Bakterien auf eine LB-Agar-Platte mit Ampicillin (100 µg/ml) aufgetragen, was zu einer Selektion der Bakterien führte, die ein Ampicillin-Resistenzgen-tragendes Plasmid besaßen. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C über Nacht. Um nachfolgend das Zellwachstum zu verlangsamen oder zu stoppen und die Plasmidstabilität zu gewährleisten, wurden die Kulturplatten bis zum Animpfen von Flüssigkulturen bei 4°C gelagert.

### 2.2.2.16 Plasmidisolierung im analytischen Maßstab (Minipräp)

Eine einzelne Bakterienkolonie wurde über Nacht in etwa 5 ml LB-/Ampicillin-Medium bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Um die Plasmid-DNA der herangezogenen Bakterienkolonien zu analysieren, wurden 4 ml des Ansatzes mittels QIAprep Spin

Miniprep Kit (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers aufgearbeitet. Mit Hilfe der Kit-Komponenten fand eine modifizierte alkalische Lyse der Bakterien mit anschließender Bindung der Plasmid-DNA an eine Silikonmembran statt. Nach mehreren Reinigungsschritten wurde die reversibel gebundene DNA in 50 µl EB-Puffer eluiert. Darauf folgte eine DNA-Konzentrationsbestimmung mittels Nanodrop (Kapitel 2.2.2.18) oder ein Restriktionsverdau z. B. zur Kontrolle der gewonnenen Plasmid-DNA (v. a. nach Ligation).

#### **2.2.2.17 Plasmidisolierung im präparativen Maßstab (Maxipräp)**

Für die Herstellung von großen Mengen eines Plasmids wurde eine DNA-Maxipräparation mit Hilfe des QIAfilter Plasmid Maxi Kits (Qiagen) durchgeführt. Zuerst wurde eine 5 ml Bakterien-Starterkultur bei 37°C für ca. 8 h im Schüttler herangezogen. Danach wurden 100 ml LB-Ampicillin-Medium mit 20 µl der Bakterien-Starterkultur angeimpft und über Nacht bei 37°C und 180 rpm inkubiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA nach dem Protokoll des Herstellers präpariert. Die gewonnene DNA wurde je nach Pelletgröße in 50-200 µl TE-Puffer (pH 8,0) aufgenommen und anschließend die Konzentration photometrisch bestimmt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

#### **2.2.2.18 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von DNA**

Im Photometer wurde die Absorption von 1 µl der zu messenden DNA in TE-Puffer (pH 8,0) beziehungsweise in H<sub>2</sub>O bestimmt, wobei als Referenz TE-Puffer (pH 8,0) beziehungsweise H<sub>2</sub>O eingesetzt wurde. Die Messung der maximalen Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die gemessene optische Dichte (OD) von 1,0 (1 OD-Einheit) entspricht einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA pro ml. Die Messung selbst erfolgte bei den Wellenlängen 230 nm, 260 nm, 280 nm und 320 nm, wobei die Wellenlängen 230 nm und 320 nm zur Hintergrundkorrektur dienten. Eine Messung der OD bei 280 nm gab den Proteingehalt wieder, so dass der Quotient aus OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> Aufschluss über die Reinheit der DNA gab. Dieser sollte bei aufgereinigter DNA über 1,8 liegen.

#### **2.2.2.19 Sequenzierung der DNA**

Die DNA-Sequenzierung wurde nach der Didesoxy-Methode mit dem BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Für einen 20 µl Sequenzieransatz wurden 0,25 µg DNA, 3 µl 5x BigDye Reaktionspuffer, 2 µl



BigDye v1.1, 1 µl Primer (10 µM) und H<sub>2</sub>O eingesetzt. Der Ansatz wurde im Thermocycler (Flexigene) in 25 Zyklen des folgenden Programms amplifiziert:

Denaturierung	30 sec	96°C
Primer-Annealing	15 sec	50°C
Primer-Extension	4 min	60°C

Der Ansatz der amplifizierten DNA wurde mit 16 µl H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Zugabe von weiteren 64 µl 100% Ethanol und Inkubation für 30 min bei RT führte zur Fällung der DNA. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 rpm, 30 min und 4 °C. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen. Danach wurde die DNA luftgetrocknet. Die Sequenzierung wurde am Genetic Analyzer 3130 Hitachi (Applied Biosystems) durchgeführt.

### 2.2.2.20 DNA-Methylierung

Für die Transfektionsstudien wurden die klonierten Reporterplasmide mit der *HpaII*-DNA-Methylase (New England Biolabs) *in vitro* methyliert. Diese Methylase methyliert nur die zentralen CpG-Stellen innerhalb einer CCGG-Sequenz. Der 50 µl Ansatz enthielt 20 µg Plasmid-DNA, 10 U der Methylase und 0,25 µl 400x S-Adenosylmethionin-Lösung (SAM, New England Biolabs) und wurde für 4 h bei 37°C inkubiert. Nach 2-stündiger Inkubation erfolgte eine weitere Zugabe von 0,25 µl SAM zur laufenden Reaktion. Die vollständige DNA-Methylierung der Plasmide wurde mit den Isoschizomeren *HpaII* und *MspI* (New England Biolabs) durch einen Restriktionsverdau überprüft (Kapitel 2.2.2.12). Das methylierungssensitive Restriktionsenzym, *HpaII* schneidet nur unmethylierte CCGG-Sequenzen, während *MspI* dieselbe Sequenz ungeachtet des Methylierungsstatus schneidet. Das Muster des Verdau wurde gelelektrophoretisch überprüft.

### 2.2.2.21 Luciferase-Genreporter-Assay

Zur Bestimmung der basalen Aktivität eines Promotors und seiner Aktivierung durch Transkriptionsfaktoren wurde der Luciferase-Genreporter-Assay verwendet. Dafür wurde die zu analysierende Promotorsequenz *upstream* der Sequenz, die für das lumineszierende Reporterprotein Luciferase kodiert, kloniert. Der zu untersuchende MAGE-A1 Promotorbereich (-77/+183) wurde unter Verwendung der Pfu-Polymerase und der genomischen DNA der Brustkarzinomzelllinie BT20 amplifiziert und in das Plasmid pGL2 *basic* (Promega) kloniert. MCF-7 Zellen sowie die mikrometastatischen Zellen wurden in 6-*well*-Platten ausgesät und unter Verwendung von FuGENE HD

transfiziert (Kapitel 2.2.1.5). Dem Transfektionsgemisch wurde das Plasmid pGL4.74 [hRLuc/ TK] im Verhältnis 1:100 zum Reporterplasmid beigefügt. Das Plasmid pGL4.74 [hRLuc/ TK] kodierte für ein zweites lumineszierendes Reporterprotein, das unter der Kontrolle des konstitutiv aktiven Thymidinkinase (TK)-Promotors aus dem *Herpes Simplex* Virus stand. Mit Hilfe dieses zweiten Reporterproteins konnte eine Normalisierung hinsichtlich der Transfektionseffizienz durchgeführt werden. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Nachweisreaktion der Promotoraktivität mit dem Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega). Hierfür wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 500 µl Lyse-Puffer (PLB) für 15 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation folgte eine kurze Zentrifugation für 30 sec bei 13000 rpm. Für die Messung der Lumineszenz wurden 20 µl des Überstandes mit 25 µl des Luciferase-Reagenz (LAR II) versetzt und im Luminometer Turner Biosystems 20/20 (Promega) gemessen. Für die Normalisierung der Messwerte wurden dem Gemisch 25 µl *Stop&Glow*-Reagenz (Promega) zugefügt, so dass die Renilla-Luciferase-Aktivität gemessen werden konnte.

#### **2.2.2.22 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)**

Das Verfahren der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) diente der Analyse von DNA-Protein-Interaktionen *in vivo*. Für die Durchführung der Experimente wurde die Zelllinien MCF-7 und die mikrometastatischen Zellen BCM1, LCM1 und PCE1 verwendet, welche entweder unbehandelt waren, mit Aza- und/oder TSA-behandelt oder mit BORIS-exprimierenden Vektor transfiziert wurden. Um die Proteine mit der DNA quervernetzten, wurde nach 72 h Formaldehyd in einer Endkonzentration von 1% zum Zellkulturmedium gegeben und für 10 min bei RT auf einem Schüttler geschwenkt. Alle weiteren Lösungen wurden aus dem Magna ChIP<sup>™</sup> G Kit (Millipore) verwendet. Durch die Zugabe von 2 ml 10x Glycin und einer Inkubationszeit von 5 min bei RT wurde die Reaktion gestoppt. Danach wurde das Zellkulturmedium abgenommen, die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 2 ml eiskaltem PBS (enthält 10 µl Protease Inhibitor Cocktail II) aus den Zellkulturflaschen geschabt, vereint und bei 4°C und 2900 rpm für 5 min zentrifugiert. Alle folgenden Schritte erfolgen bei 4°C. Das Zellpellet wurde mit 2,5 ml Zelllysepuffer (enthält 2,5 µl Protease Inhibitor Cocktail II) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Für die Extraktion der Zellkerne wurde die Zellsuspension 10-mal in einem eiskalten Douncer homogenisiert und für 5 min bei 2900 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 500 µl Nuklear Lysepuffer (enthält 2,5 µl Protease Inhibitor Cocktail II) versehen. Es folgte eine Ultraschallbehandlung des Lysates 10-mal pulsierend 20 sec auf Eis (Sonicator UP50H, Einstellung: 25% Power). Durch diesen Vorgang wurde die DNA in eine immunpräzipitierbare Größe von 200 bis

1000 bp überführt. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13000 rpm und 4°C.

Für die folgende Chromatin-Immunpräzipitation wurden  $0,5 \times 10^6$  lysierte Zellen mit 450 µl Dilution-Puffer sowie 2,25 µl Protease Inhibitor Cocktail II versetzt, so dass ein Endvolumen von 500 µl vorlag. Von diesem Lysat wurden 5 µl (1%) entnommen, die als Input-DNA bei -20°C aufbewahrt wurde. Zu jedem Ansatz wurden 3 µg Antikörper, die spezifisch für die Histonmodifikationen waren, sowie einem IgG-Antikörper pipettiert. Zuletzt wurden 20 µl der Protein G magnetischen Beads zu jedem Reaktionsansatz hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte rotierend bei 4°C über Nacht.

Am folgenden Tag wurde der DNA/Protein/Antikörper-Komplex mit jeweils 500 µl kaltem Niedrigsalzpuffer, Hochsalzpuffer sowie LiCl-Puffer und TE-Puffer (alle von Millipore) gewaschen. Um den Immunkomplex von den Protein G magnetischen Beads zu trennen sowie die Auflösung der durch das Formaldehyd vermittelten DNA/Protein-Bindung zu erlangen, wurde jedem Ansatz wie auch der Input-DNA 100 µl ChIP-Puffer sowie 1 µl Proteinase K hinzugefügt und für 2 h bei 62°C im schwenkenden Thermomixer inkubiert. Um die freigesetzten Proteine zu degradieren, folgte eine kurze Inkubation für 10 min bei 95°C. Danach wurde die DNA über Säulen gereinigt, in 50 µl Elutionspuffer eluiert und bis zur weiteren Verwendung in der qRT-PCR-Analyse bei -80°C gelagert.

### 2.2.2.23 Quantitative *realtime* PCR (qRT-PCR)

Das Verfahren der *realtime* PCR beruht auf dem Einsatz von DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoffen, die sich mit hoher Spezifität in die kleine Furche der doppelsträngigen DNA einlagern, was eine quantitative Echtzeitanalyse (*realtime*) von spezifischen DNA-Fragmenten ermöglicht. Mit fortschreitender PCR-Reaktion nimmt die Fluoreszenz zu und verhält sich proportional zur gebildeten PCR-Produktmenge.

Als Ausgangsmaterial für die qRT-PCR-Analyse wurden die immunpräzipitierten Proben aus dem ChIP-Assay (Kapitel 2.2.2.22) als auch die cDNA der shRNA transfizierten Zellen (Kapitel 2.2.1.6) sowie spezifische Primerpaare für MAGE-A1 und BORIS verwendet. Als Referenzgen wurde das *housekeeping*-Gen RPLP0 (ribosomal protein, large P0) gewählt. Bei jedem PCR-Lauf zur Untersuchung der ChIP-Proben wurde für die Quantifizierung der PCR-Produkte eine Standardreihe mit definierter Menge von humaner genomischer Leukozyten-DNA eingesetzt. Die Reaktionsansätze einer *realtime*-PCR hatten ein Endvolumen von 15 µl und wurden stets in zwei Versuchen in Duplikaten angefertigt. Pro Ansatz wurden 7,5 µl QuantiTect SYBR Green Mastermix (Qiagen), jeweils 0,4 µl Primer (10 pmol/µl) und 2 µl Template eingesetzt. Dieser Mastermix wurde in die twin.tec PCR-Platte (Eppendorf) vorgelegt und zum Schluss das Template hinzugefügt. Die PCR-Analyse erfolgte im realplex<sup>4</sup>-PCR-Gerät (Eppendorf) und wurde mit folgendem PCR-Programm durchgeführt:

1. initiale Denaturierung	15 sec	95°C	} 45X
2. Denaturierung	15 sec	95°C	
3. Primer-Annealing	30 sec	58°C	
4. Primer-Extension	30 sec	72°C	
5. Denaturierung	15 sec	95°C	
6. Ermittlung der Schmelzkurve	15 sec	60°C	
7. Ermittlung der Schmelzkurve	15 min	95°C	

Die Auswertung der Rohdaten erfolgte mit Hilfe der realplex<sup>4</sup>-PCR-Software. Weitere Berechnungen wurden mit Microsoft Excel ausgeführt.

### 2.2.2.23.1 Relative mRNA-Quantifizierung

Für die Berechnung der relativen Genexpression wurden die aus der quantitativen PCR gewonnenen Daten als Grundlage für die  $\Delta\Delta\text{CP}$ -Methode verwendet, wobei der CP-Wert (CP; *Crossing Point*) den PCR-Zyklus beschreibt, bei dem die Fluoreszenz der neusynthetisierten DNA erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz steigt.

Die Expression des Zielgens wird zunächst auf die Expression eines homogen exprimierten Referenzgens bezogen. Wichtig hierbei ist die gleiche Effizienz der PCR-Reaktion für Ziel- und Referenzgen. Als Referenzgen wurde RPLP0 verwendet. Im ersten Schritt wurde für jede untersuchte Probe der CP-Wert des Referenzgens vom CP-Wert des zu untersuchenden Gens subtrahiert:

$$\Delta\text{CP} = \text{CP}_{\text{Zielgen}} - \text{CP}_{\text{Referenzgen}}$$

Nach dieser Normierung wurde der  $\Delta\text{CP}$ -Wert der Proben (BORIS oder MAGE-A1) der  $\Delta\text{CP}$ -Wert der Kontrolle (basal) abgezogen:

$$\Delta\Delta\text{CP} = \Delta\text{CP}_{\text{BORIS oder MAGE-A1}} - \Delta\text{CP}_{\text{basal}}$$

Der relative Expressionsunterschied (Ratio) zwischen verschiedenen Proben normalisiert auf ein Referenzgen, ergibt sich aus der folgenden Formel:

$$\text{Ratio} = 2^{\Delta\Delta\text{CP}}$$

Liegt der relative Expressionsunterschied unter 1, so ist das analysierte Gen in der Probe im Vergleich zur Kontrolle herunterreguliert. Liegt er über 1, so ist das Gen heraufreguliert. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt und basieren auf mindestens zwei unabhängigen Experimenten.

## 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.3.1 *in vitro* Transkription/Translation-System

In Zusammenarbeit mit Bettina Steinbach (TA, Institut für Tumorbioogie, UKE, Hamburg) wurde die *in vitro* Transkription/Translation von Proteinen unter Verwendung des SP6/T7 TNT® Quick Coupled Transcription/Translation-System (Promega) durchgeführt. Hierbei handelt es sich um ein zellfreies System, das sich aus einem Kaninchen Retikulozyten-Lysat mit RNA-Polymerase, Nukleotiden, Salzen und RNasin® Ribonuklease-Inhibitor zusammensetzt. Die in einem Expressionsplasmid (pcDNA3.1 oder HaloTag) hinter einen T7- oder SP6-RNA-Polymerase Promoter klonierte cDNA wurde in einem gekoppelten Mechanismus transkribiert und translatiert. Zur Herstellung von radioaktiv-markierten Proben wurde <sup>35</sup>S-Methionin anstatt unmarkiertem Methionin zum Reaktionsansatz pipettiert. Für den Assay wurden alle Reagenzien auf Eis aufgetaut. Die Reaktionsansätze hatten folgende Zusammensetzung:

#### 50 µl Ansatz ohne <sup>35</sup>S Markierung:

40 µl TNT® Quick Master Mix  
 2 µl Plasmid-DNA (0,5 µg/µl)  
 1 µl Methionin (1 mM)  
 7 µl H<sub>2</sub>O

#### 50 µl Ansatz mit <sup>35</sup>S- Markierung:

40 µl TNT® Quick Master Mix  
 2 µl Plasmid-DNA (0,5 µg/µl)  
 2 µl [<sup>35</sup>S]-L-Methionin (1000Ci/mmol)  
 6 µl H<sub>2</sub>O

Die Reaktionsansätze wurden für 90 min bei 30°C inkubiert und anschließend bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

### 2.2.3.2 Expression rekombinanter Proteine

Die Durchführung dieses Experimentes erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Bettina Steinbach (TA, Institut für Tumorbioogie, UKE, Hamburg).

#### HaloTag® Aufreinigungspuffer

50 mM HEPES  
 150 mM NaCl  
 1 mM DTT  
 0,005% IGEPAL CA-630

#### Lösung zum Abspalten

1/16-faches Volumen an TEV Protease in HaloTag® Aufreinigungspuffer

Für die Genexpression der HaloTag-Fusionsproteine wurden zuerst die zu PCR-Produkte in den pFN19A (HaloTag® 7) T7 SP6 Flexi® Vektor kloniert. Nach der Transformation der kompetenten *E.coli* Bakterien mit dem Plasmid wurde ein Einzelklon für 6 bis 8 h bei 37°C und 200 rpm in 5 ml LB-Medium und Ampicillin vermehrt. Für die weitere Durchführung wurde das EnPresso™ Tablet Cultivation Set (BioSilta) verwendet. Hierfür wurde in einem 500 ml Erlenmeyerkolben 50 ml steriles Wasser vorgelegt, in dem dann 2 EnBase® Medium Tabletten, welche Mediumkomponente und einen Polysaccharidkomplex als Substrat enthielten, aufgelöst wurden. Nach dem Auflösen der Tabletten wurde Ampicillin, 500 µl der Vorkultur sowie 25 µl EnZ I'm (600 U/L; Gemisch aus steril gefilterten Enzymen) dem Ansatz zugefügt. Der Erlenmeyerkolben wurde mit *AirOtop* Seals verschlossen. Die *AirOtop* Membran lässt keine Keime von außen in die Kultur, dafür aber kontinuierlich Sauerstoff. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 30°C und 200 rpm. Danach wurde dem Ansatz 0,05% Rhamnose (Promega), 50 µl EnZ I'm und eine „Booster“ Tablette, die für optimale pH Bedingungen sorgte, hinzugefügt. Die weitere Kultivierung erfolgte für 24 h bei 30°C und 200 rpm. Danach wurde die Zellkultur für 10 min bei 5600 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml HaloTag®Aufreinigungspuffer, 50 µl Lysozym (10 mg/ml) sowie 50 µl RQ1 RNase-Free DNase (Promega) resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Ultraschallbehandlung des Lysates für 45 sec pulsierend auf Eis (Sonicator UP50H, Einstellung: 60% Power; Intervall 0,8). Das sonifizierte Lysat wurde auf 2 ml Reaktionsgefäße verteilt und sofort für 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert. In der Zwischenzeit wurde das HaloLink™ Resin, das aus einem an Sepharose® Beads gebundenen HaloTag® Liganden besteht, äquilibriert. Dafür wurde pro Ansatz 4 ml HaloLink™ Resin in ein 15 ml Falcon Tube (Greiner Bio-One GmbH) vorgelegt und sofort zentrifugiert. Es schloss sich ein dreimaliger Waschvorgang mit 10 ml HaloTag®Aufreinigungspuffer und jeweils 2-minütiger Zentrifugation bei 3300 rpm an. Zum äquilibrierten HaloLink™ Resin wurde das eiskalte Zellysate gegeben, gut gemischt und anschließend für 60 min auf dem Rotator (neoLab) inkubiert, so dass sich ein Protein-Resin Komplex ausbilden konnte. Nach Abschluss der Inkubation wurde das Gemisch gevortext und zentrifugiert (5 min bei 3300 rpm). Es folgten mehrere Waschschrte mit dem HaloTag®Aufreinigungspuffer für je 5 min und 3300 rpm. Dem sedimentierten Protein-Resin Komplex wurde nun 0,5 ml der Lösung zum Abspalten des HaloTags® vom Fusionsprotein hinzugefügt, gut gemischt und anschließend auf dem Rotator für 1 h inkubiert. Es schloss sich eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm an. Der gewonnene Überstand wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 50 µl 50% HisLink™ Resin für 20 min im Rotator bei RT inkubiert. Ein letzter Zentrifugationsschritt für 5 min bei 13000 rpm schloss sich an. Im Überstand befand sich

das gewonnene Protein, welches zu je 100 µl für 15 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert wurde.

### 2.2.3.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem kommerziell erhältlichen Bradford-Reagenz der Firma BioRAD (München) durchgeführt. 2 µl der zu messenden Probe wurden mit 798 µl 0,1 N NaOH und 200 µl Bradford-Reagenz versetzt, gut gemischt und für 5 bis 15 min bei RT inkubiert. Als Leerwert diente ein Ansatz ohne Protein. Die Proteinkonzentration wurde bei einer Wellenlänge von 595 nm gegen den Leerwert im Photometer bestimmt. Für die Erstellung einer Eichkurve wurde eine BSA-Stammlösung (1 mg/ml in 0,1 N NaOH) verdünnt eingesetzt.

### 2.2.3.4 Western Blot Analyse von Proteinen

Im Western Blot können Proteine mit einem spezifischen Antikörper nachgewiesen werden. Mit Hilfe einer Gelelektrophorese werden die Proteine entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und durch das *Blotting*-Verfahren (*Semi Dry*- oder *Wet* Elektrotransfer) auf eine Trägermembran übertragen. Die Durchführung der Western Blot Experimente erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Bettina Steinbach (TA, Institut für Tumorbilogie, UKE, Hamburg).

#### 2.2.3.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

##### Trenngel (12% Acrylamid):

% Acrylamid	3,3 ml
H <sub>2</sub> O	4 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 ml
10% (v/v) SDS	0,1 ml
10% (v/v) APS	0,1 ml
TEMED	0,004 ml

Sammelgel:

% Acrylamid	0,5 ml
H <sub>2</sub> O	2,1 ml
1,5 M Tris (pH 8,8)	0,38 ml
10% (v/v) SDS	0,03 ml
10% (v/v) APS	0,03 ml
TEMED	0,003 ml

5x Laemmli-Laufpuffer:

72,1 g Glycin  
0,5 % SDS  
15,1 g Tris-HCl  
auf 1 l ddH<sub>2</sub>O auffüllen

Die Proteine wurden nach ihrer relativen Größe mittels einer denaturierenden SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese nach Laemmli aufgetrennt [263]. Hierfür wurde zuerst ein diskontinuierliches SDS-Polyacrylamidgel angesetzt, bei dem auf ein Sammelgel ein Trenngel folgte. In das Sammelgel wurde vor der Polymerisation ein Probenaschen-Kamm eingelassen, in die später die Proben mit dem Ladepuffer aufgetragen wurden. Zur Durchführung der Elektrophorese wurde das Gel in die Minigelkammern Model SE250 der Firma Hoefer eingespannt und die Pufferreservoirs mit Laemmli-Laufpuffer befüllt. Nun wurden die Proteinproben für 5 min bei 95°C in Probenlaufpuffer erhitzt. Die erhöhte Temperatur als auch das im Probenpuffer enthaltene SDS sorgte dafür, dass die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur sowie die nicht-kovalenten Wechselwirkungen im Protein zerstört wurden und sich das Protein in seine Untereinheiten aufspaltet und entfaltet. Alle Proteine besitzen dann ein gleiches Ladung/Masse-Verhältnis, so dass die Auftrennung im Gel nur noch nach ihrem Molekulargewicht erfolgte. Nach dem Erhitzen wurden die Proben für 5 min auf Eis gekühlt. Jeweils 20 µl Probe wurden in die Tasche pipettiert und in eine separate Tasche 5 µl des Größenmarkers *Full Range Rainbow* RPN800 (Amersham Biosciences). Die Gelelektrophorese lief bei 25 mA/Gel für etwa 1 h. Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch einen Immunoblot nachgewiesen (Kapitel 2.2.3.4.3).



#### 2.2.3.4.2 Semidry-Transfer auf PVDF-Membranen

##### Transfer-Puffer

48 nM Tris-HCl

39 nM Glycin

20% (v/v) Methanol

0,037% (v/v) SDS

Die zuvor im Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine wurden durch einen Elektrotransfer auf eine Trägermembran (PVDF-Membran) übertragen. Da die Proteine mit SDS beladen sind, wanderten sie im elektrischen Feld zur Anode.

Dazu wurde zunächst eine PVDF-Membran für 1 min in 100% Methanol inkubiert, um die Membranoberfläche zu aktivieren, dann für 3 min in H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend für 5 min in Transferpuffer äquilibriert. Für den Transfer wurden jeweils eine Membran und vier 3MM-Whatman-Filter (VWR) auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Der Aufbau der Trans-Blot SD *Semidry*-Blotapparatur (BioRAD) erfolgte nach folgendem Schema:

- befeuchtete Anode
- 2 Lagen 3MM-Whatman-Filter in Transferpuffer getränkt
- PVDF-Membran
- Gel
- 2 Lagen 3MM-Whatman-Filter in Transferpuffer getränkt
- befeuchtete Kathode

Für 1 h bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> erfolgte der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran.

#### 2.2.3.4.3 Immunoblot-Analyse

##### 6% Milch/ PBS-T

6 g Trockenmilchpulver

100 ml PBS-Tween-20

##### PBS-T

0,05% (v/v) Tween-20

1l PBS (1x)

ECL-Lösung 1

0,1M Tris-HCl (pH 8,5)  
 25 nM Luminol (Sigma)  
 9 mM p-Cumarinsäure (Sigma)

ECL-Lösung 2

0,1M Tris-HCl (pH 8,5)  
 0,018% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Vor Gebrauch: Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1:1 mischen

Nach dem Transfer wurde die Membran für 2 h mit 6% Milch/PBS-T unter leichtem Schütteln bei RT geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen auf der proteinbeladenen Membran zu blockieren. Danach wurde in 6% Milch/PBS-T über Nacht bei 4°C mit dem Primäantikörper in der jeweiligen Verdünnung (Tabelle 3) inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS-T zum Entfernen von ungebundenen, überschüssigen Antikörpern, wurde die Membran für weitere 2 h bei RT mit einem entsprechend in 6% Milch/PBS-T verdünntem sekundär, Meerrettich-Peroxidase konjugiertem Antikörper (Tabelle 4) inkubiert. Die Membran wurde erneut gewaschen (sechsmal für 6 min PBS-T), so dass anschließend die Detektion der Protein-Antikörper-Komplexe mit Hilfe der ECL-Lösungen (ECL, *Enhanced Chemiluminescence*) gemäß den Herstellerangaben erfolgen konnte. Je nach Intensität der Chemilumineszenz wurden die Röntgenfilme (Fuji) für 10 sec bis 15 min exponiert. Die Entwicklung des Filmes erfolgte in einem automatischen Filmentwickler (Hyperprocessor, Amersham Biosciences).

### 2.2.3.5 Untersuchung der Protein-Protein-Interaktion mittels HaloLink™ Resin basierendem *Pulldown*-Assay

In Zusammenarbeit mit Bettina Steinbach (TA, Institut für Tumorbologie, UKE, Hamburg) wurden die *Pulldown*-Assays durchgeführt.

Die Methode des HaloLink™ Resin basierenden *Pulldown*-Assays eignet sich zur *in vitro* Analyse von Protein-Protein-Interaktionen und beruht auf einer Immobilisierung des HaloTag™-Fusionsproteins an den HaloLink™ Resin.

Um Protein-Protein-Interaktionen zu untersuchen, wurden zum einen die klonierten HaloTag™-Expressionsplasmide mit Hilfe des *in vitro* Transkription/Translation-Systems (Kapitel 2.2.3.1) synthetisiert. Während der Proteinbildung wird die N-terminale Fusionsdomäne des HaloTags an das klonierte Genprodukt (HaloTag „*bait*“-Fusionsprotein) synthetisiert. Zum anderen wurden die klonierten pcDNA3.1(+) Expressionsvektoren, die die Gensequenzen von Sp1, hTBP und hTBP-C enthielten, mit dem *in vitro* Transkription/Translation-System synthetisiert, wobei diese „*prey*“-Proteine <sup>35</sup>S-markiert wurden.

Jeweils 20 µl des „bait“- und „prey“-Proteins wurden miteinander gemischt, so dass es zu einer Komplexbildung kommen konnte. Als Negativkontrolle wurde anstelle des „bait“-Proteins 20 µl TNT-Mix hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT auf dem Schüttler. Währenddessen wurde das HaloLink™ Resin äquilibriert. Dafür wurde für jeden *Pulldown*-Ansatz 50µl HaloLink™ Resin in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt und sofort für 1 min bei 3300 rpm zentrifugiert. Es schloss sich ein dreimaliger Waschvorgang mit 400 µl Bindungspuffer und eine jeweils 2-minütige Zentrifugation bei 3300 rpm an. Danach wurde das sedimentierte HaloLink™ Resin in 100 µl Bindungspuffer resuspendiert und mit 20 µl des vorher inkubierten HaloTag-*bait-prey*-Komplex gemischt. Die Inkubation erfolgte für 90 min bei 4°C auf dem Rotator (neoLab). Durch Zentrifugation für 2 min bei 3300 rpm wurde der immobilisierte Resin-HaloTag-Protein-Komplex pelletiert. Um ungebundene Proteine zu entfernen, folgten drei Waschschrte mit je 1 ml Waschpuffer und Zentrifugation für 2 min bei 3300 rpm. Es schlossen sich zwei weitere Waschschrte mit dem Waschpuffer für 5 min bei RT an. Anschließend folgte eine Zentrifugation. Die Protein-Komplexe wurden danach mit 20 µl 1x SDS-Ladungspuffer für 5 min bei 90°C gekocht und auf einem 12%-igem SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Um die <sup>35</sup>S-markierten Proteine zu detektieren, wurde das Gel nach dem Lauf für 30 min in Gelfixierungslösung inkubiert. Nach der Fixierung wurde das Gel mit Wasser gewaschen und anschließend mit der Amplify N Verstärkungslösung (GE Healthcare) für 30 min unter leichtem Schütteln inkubiert. Danach wurde das Gel auf Whatman-Filter überführt, bei 80°C in einem Geltrockner (BioRAD) unter Vakuum getrocknet und über Nacht bei -80°C auf einen Röntgenfilm exponiert. In einem automatischen Filmentwickler erfolgte die Entwicklung des Filmes.

#### Waschpuffer

100 mM Tris (pH 7,6)  
150 mM NaCl  
1 mg/ml BSA  
0,05% IGPAL CA-630

#### Bindungspuffer

100 mM Tris (pH 7,6)  
150 mM NaCl  
0,05% IGPAL CA-630

4x SDS-Ladungspuffer

0,24 M Tris-HCl (pH 6,8)

3 mM Bromphenolblau

50,4% Glycerol

0,4 M DTT

2% SDS

**2.2.3.6 Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

Der *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA) ist eine Gelretardierungsanalyse und dient dem Nachweis und der Charakterisierung von DNA-Protein-Wechselwirkungen [264, 265].

Die EMSA-Methode beruht darauf, dass während einer elektrophoretischen Auftrennung die DNA-Protein-Komplexe langsamer laufen als freie DNA. Hierfür wird in einer Bindungsreaktion ein radioaktiv-markiertes DNA-Fragment, welches die zu analysierende spezifische DNA-Promotorsequenz enthält, zusammen mit Zellkern-Extrakt oder rekombinantem Protein inkubiert. Befindet sich eine spezifische Bindungsstelle des Proteins innerhalb des DNA-Fragments, so kommt es zur Ausbildung eines DNA-Protein-Komplexes, welcher mit Hilfe einer nativen Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch eine Autoradiographie analysiert werden kann. Um das gebundene Protein genauer zu charakterisieren, werden sowohl *supershift*- als auch Kompetitionsanalysen durchgeführt. Während des *supershift*-Verfahrens werden spezifische Antikörper zum DNA-bindenden Proteinkomplex hinzugefügt. Die Anlagerung des spezifischen Antikörpers an die DNA-bindende Proteinuntereinheit führt zu einer Retardierung des DNA-Protein-Antikörper-Komplexes gegenüber der proteingebundenen DNA, was in einem noch langsameren Laufverhalten im Gellauf resultiert. Um die Spezifität der DNA-Bindung nachzuweisen, wird das Kompetitionsverfahren genutzt. Dabei wird nicht radioaktiv-markiertes DNA, entweder eine spezifische Protein-Konsensussequenz oder das nicht radioaktiv-markierte Oligonukleotid, im Überschuss zur Bindungsreaktion zugegeben. Dabei kommt es zu einer Verdrängung der radioaktiv-markierten Oligonukleotide aus dem DNA-Protein-Komplex und resultiert in einem Verschwinden oder einer deutlichen Abschwächung der für das jeweilige spezifische Protein charakteristischen Bande. Im Vergleich dazu beeinflusst unspezifische oder mutierte Kompletitor-DNA den DNA-Protein-Komplex nicht.

Mit freundlicher Unterstützung von Bettina Steinbach (TA, Institut für Tumorbilogie, UKE, Hamburg) wurden die EMSA-Experimente durchgeführt.

### 2.2.3.6.1 Herstellung von Zellkern-Extrakten

Für den EMSA wurden Zellkern-Extrakte präpariert, indem kultivierte, subkonfluente Zellen mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen und anschließend mit einem Zellschaber vom Boden des Kulturgefäßes abgeschabt wurden. Die Zellen wurden für 10 min bei 1500 rpm und 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Die Zellen wurden nun in 300 µl hypotonischen Lysepuffer resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe von 20 µl 10%-iger (v/v) NP-40-Lösung. Die Probe wurde sofort für 10 sec bei maximaler Umdrehung auf dem Vortexer durchmischt. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm und 4°C, so dass die Kernproteine sedimentiert wurden. Der Überstand, die zytosolische Fraktion, wurde verworfen. Durch die Zugabe von 100 µl hypertonen Lysepuffer resuspendierten die sedimentierten Zellproteine, die dann für 20 min bei 4°C in einem Schüttler geschüttelt wurden. Nach der anschließenden 5-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde der Überstand, welcher die Kernproteine enthält, in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration wurde mittels Bradford-Protein-Assay (BioRAD) nach Angaben des Herstellers bestimmt (Kapitel 2.2.3.3). Der Zellkern-Extrakt wurde bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### Hypertoner Lysepuffer:

10 mM HEPES (pH 7,9 bei 4°C)

10 mM KCl

0,1 mM EDTA

0,1 mM EGTA

frisch vor dem Gebrauch hinzugefügt:

1 mM PMSF

0,5 mM DTT

#### Hypotonischer Lysepuffer:

20 mM HEPES (pH 7,9 bei 4°C)

25% Glycerol

420 mM NaCl

1 mM EDTA

1 mM EGTA

frisch vor dem Gebrauch hinzugefügt:

1 mM PMSF

0,5 mM DTT

### 2.2.3.6.2 Hybridisierung

Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden auf eine Endkonzentration von 100 pmol/μl eingestellt. Für die Hybridisierungsreaktion wurden jeweils 50 pmol der beiden Einzelstränge mit 0,5 μl 5M NaCl und H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 50 μl aufgefüllt und für 15 min bei 70°C im Wasserbad inkubiert. Das Wasserbad wurde danach ausgeschaltet und mitsamt der Reaktionslösung langsam auf RT abgekühlt, so dass sich doppelsträngige DNA-Fragmente bilden konnten. Bis zur weiteren Verwendung wurde die Lösung bei -20°C gelagert.

### 2.2.3.6.3 Herstellung von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-markierten Oligonukleotiden

Um DNA-Komplexe im EMSA zu untersuchen, wurde 1 μl Oligonukleotid (1 pmol/μl zu markierende 5'-Enden) zur radioaktiven Markierung in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Auf Eis erfolgte die Zugabe von 2 μl 10x Puffer A (Fermentas), 10 μl H<sub>2</sub>O, 5 μl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (3000 Ci/mmol) sowie 2 μl T4 Polynukleotid-Kinase (10 U/μl). Die Inkubation der Reaktionslösung erfolgte für 30 min bei 37°C. Die Kinase wurde anschließend bei einer 10-minütigen Inkubation bei 70°C inaktiviert. Danach wurden nicht eingebaute radioaktive Nukleotide mit Hilfe der Illustr<sup>TM</sup> Microspin<sup>TM</sup> G-50 Säulen (GE Healthcare) entsprechend den Angaben des Herstellers entfernt. Das Endvolumen betrug 50 μl. Um die Radioaktivität von 1 μl markierter DNA zu ermitteln, wurde 1 μl der erhaltenen Lösung in 3 ml Szintillationslösung pipettiert und im Beckman Coulter (Beckman Coulter GmbH) bestimmt. Die radioaktiv-markierte DNA wurde bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C im Gefrierschrank gelagert.

### 2.2.3.6.4 Bindungsreaktion

#### 3x Bindungspuffer

12%	Ficoll
60 mM	HEPES (pH 7,9)
150 mM	KCl
3 mM	EDTA
3 mM	DTT
0,75 mg/ml	BSA

Für die im EMSA stattfindende Bindungsreaktion zwischen DNA und Protein oder Zellkern-Extrakt wurde ein Gesamtvolumen von 15 μl angesetzt. Hierfür wurden 5 μl 3x Bindungspuffer, 4 μl rekombinantes Protein oder 2,5 μg Zellkern-Extrakt und 0,75 μl Poly (dl-dC) (10 U/μl), was zur Blockierung unspezifischer DNA-Bindung beiträgt, zusammen

pipettiert und für 2 min bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von 1 µl frischer  $^{32}\text{P}$ -markierter DNA-Probe (50000 cpm) und das restliche Volumen wurde mit  $\text{H}_2\text{O}$  aufgefüllt. Die Bindungsreaktion erfolgte für 30 min bei RT.

Für Kompetitionsanalysen wurde nicht radioaktiv-markierte DNA (10 ng/µl) zur Bindungsreaktion hinzugefügt.

Für die Ausbildung eines *supershiftes* wurde die Bindungsreaktion mit 4 µl des jeweiligen Antikörpers, die spezifisch für Sp1 und BORIS waren, für weitere 30 min bei RT inkubiert.

#### 2.2.3.6.5 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

##### 10x TBE-Puffer

890 mM	Tris
890 mM	Borsäure
20 mM	EDTA
in deionisiertem $\text{H}_2\text{O}$	

##### 4% Polyacrylamid-Gel

9,3 ml	30% Acrylamid/ Bisacrylamid
7 ml	5x TBE-Puffer
53,4 ml	$\text{H}_2\text{O}$
280 µl	10% APS
47 µl	TEMED

##### 6% Polyacrylamid-Gel

14 ml	30% Acrylamid/ Bisacrylamid
7 ml	10x TBE-Puffer
48,7 ml	$\text{H}_2\text{O}$
280 µl	10% APS
47 µl	TEMED

Je nach Größe der  $^{32}\text{P}$ -markierter DNA-Probe wurde ein 4%-iges oder 6%-iges Polyacrylamid-Gel in einer vertikalen Gelelektrophorese-Apparatur gegossen. Die DNA-Protein-Komplexe wurden nach einer Vorlaufzeit von 30 bis 60 min bei 200 V aufgetragen. Als Laufpuffer wurde ein 0,5-facher TBE-Puffer verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte die ersten 30 min bei 250 V und lief dann weitere 2,5 h bei 200 V. Anschließend wurde das Gel auf ein Whatman-Filter transferiert und für 2 h auf dem Geltrockner (BioRAD) unter Vakuum bei 80°C getrocknet. Die Exposition erfolgte auf einem Fuji Medical X-ray Film (Fuji) zunächst über Nacht bei

-80°C. In einem automatischen Filmentwickler (Hyperprocessor, Amersham Biosciences) erfolgte die Entwicklung des Filmes.



### 3 Ergebnisse

#### 3.1 BORIS-Expression in verschiedenen Krebszelllinien vor und nach Behandlung mit Aza und/oder TSA

Es wurden Zelllinien verschiedener Tumorentitäten ausgewählt, um die Expression des *Cancer-Testis* Antigens BORIS in den unbehandelten Zelllinien und nach der Behandlung mit dem Demethylierungsmittel 5-Aza-2'-deoxycytidin (Aza) und/oder dem Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA) zu untersuchen. Hierfür wurden acht Brustkrebs-, drei kolorektale, eine leukämische, eine hepatozelluläre und zwei Prostatakrebszelllinien jeweils mit 1 µM Aza über einen Zeitraum von 72 h und/oder 0,5 µM TSA in den letzten 24 h behandelt. Die Zellen wurden nach der Inkubation geerntet, Gesamt-RNA aus den unbehandelten, Aza-, TSA- und Aza&TSA-behandelten Krebszelllinien isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben (Kapitel 2.2.2.5). Durch semiquantitative PCR mit genspezifischen Primern für BORIS wurde das Transkriptniveau analysiert<sup>\*</sup>. Als interne Kontrolle wurde das konstitutiv exprimierte *housekeeping*-Gen  $\beta$ -Aktin gewählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 15 dargestellt.

In den unbehandelten Brustzelllinien MCF-7, MDA-MB 231, BT474 und BT20 wurden keine RNA-Transkripte nachgewiesen. Jedoch zeigte die MTSV1.7 Brustzelllinie eine schwache basale BORIS-Expression und die übrigen drei Brustzelllinien GI101, T47D und MDA-MB 464 eine hohe Konzentration an basalen RNA-Transkripten. Die in Abbildung 15b und c dargestellten Zelllinien zeigten alle eine basale BORIS-Expression.

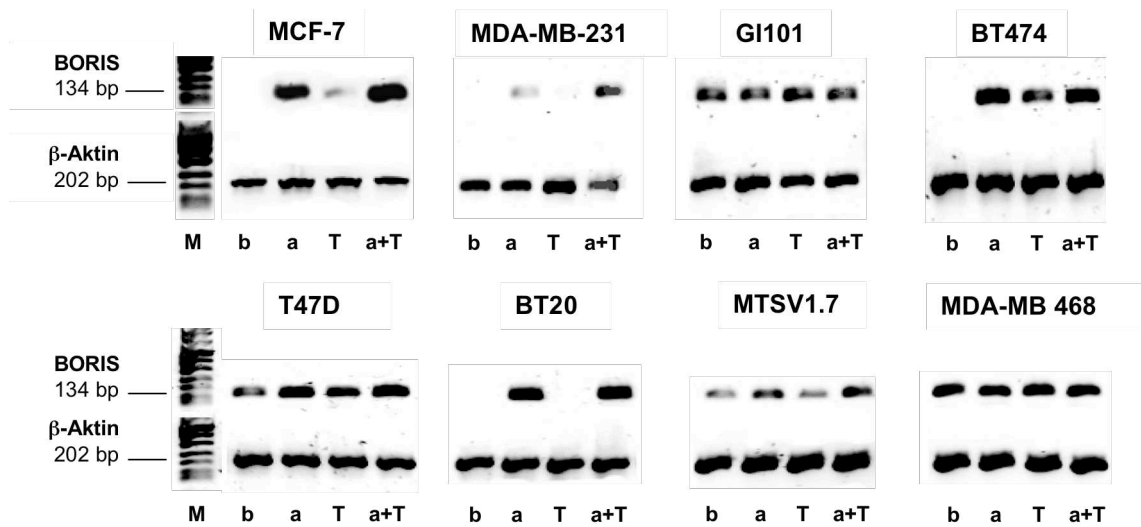
In allen untersuchten Zelllinien mit Ausnahme von MDA-MB 231 erfolgte schon nach alleiniger Aza-Behandlung eine hohe BORIS-Expression. Vor allem in den drei Brustzelllinien MCF-7, BT20 und BT474, die basal keine BORIS-Expression aufwiesen, konnte das DNA-Demethylierungsmittel Aza die Aktivität des BORIS-Promotors um ein Vielfaches erhöhen (Abbildung 15a). Bei MDA-MB 231 wurde durch Aza zumindest eine schwache Expression des BORIS Gens hervorgerufen. Auf die übrigen Zelllinien, die bereits eine hohe basale Genexpression zeigten, hatte Aza keinen weiteren Einfluss.

Im Gegensatz dazu zeigte die Behandlung mit dem Histondeacetylase-Inhibitor TSA kaum einen Effekt verglichen mit der Expression im unbehandelten Zustand. Nur die Brustzelllinie BT474 wies nach TSA-Behandlung eine erhöhte Expression auf, wohingegen die hepatozelluläre Zelllinie HepG2 eine Abnahme des BORIS RNA-Transkriptes zeigte. Nur in den Zelllinien MCF-7 und MDA-MB 231 konnte der Histondeacetylase-Inhibitor TSA bei gemeinsamer Gabe mit Aza die Genexpression synergistisch verstärken.

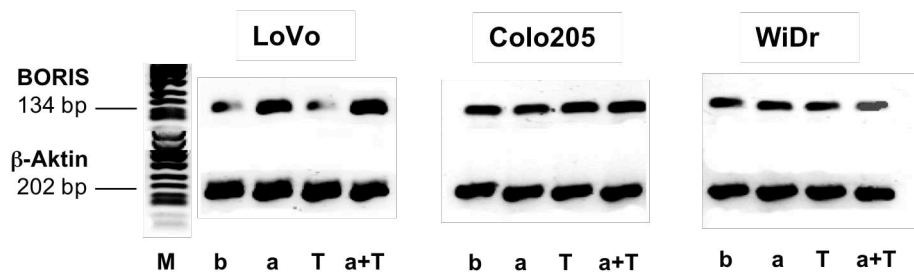
---

<sup>\*</sup> Praktische Arbeit durchgeführt von Bettina Steinbach (TA, Institut für Tumorbologie, UKE, Hamburg).

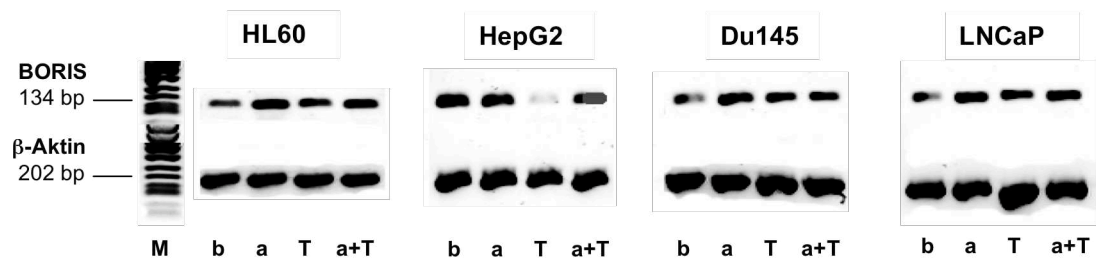
a)



b)



c)

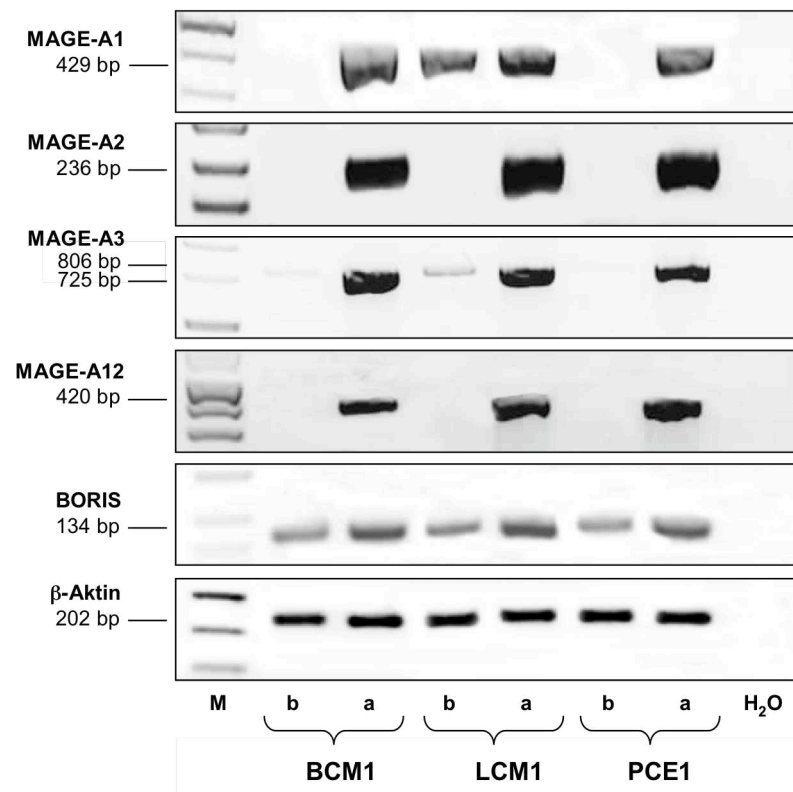


**Abbildung 15:** mRNA-Expressionsanalyse von BORIS in unbehandelten (basalen, b) sowie Aza- (a), TSA- (T) und Aza&TSA-behandelten (a+T) Krebszelllinien. Das BORIS PCR-Produkt besitzt eine Größe von 134 bp. Als interne Kontrolle wurde die Expression des *housekeeping*-Gens  $\beta$ -Aktin (202 bp) bestimmt. M, Marker. bp, Basenpaare.

### 3.2 BORIS- und MAGE-A1-, -A2-, -A3- und -A12-Expression in den mikrometastatischen Zelllinien vor und nach Behandlung mit Aza

Im Weiteren wurde nun überprüft, ob Aza ebenfalls in den mikrometastatischen Zelllinien BCM1, LCM1 und PCE1 die Genexpression von BORIS sowie die MAGE-A1, -A2, -A3 und -A12 induzieren kann. Für die folgende Analyse wurde die Gesamt-RNA aus unbehandelten und Aza-behandelten Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und in einer semiquantitativen PCR mit genspezifischen Primern für BORIS und MAGE-A1, -A2, -A3 sowie -A12 bestimmt.  $\beta$ -Aktin diente erneut als interne Kontrolle der jeweils eingesetzten RNA-Menge.

Wie in Abbildung 16 zu sehen ist, wiesen die mikrometastatischen Zelllinien keine RNA-Transkripte in Bezug auf MAGE-A2, -A3 und -A12 auf. Nur LCM1 zeigte ein hohes basales Expressionsniveau für MAGE-A1; MAGE-A3 hingegen wurde nur sehr schwach exprimiert. In allen drei Zelllinien wurden nach Zugabe von Aza die MAGE-A Gene demethyliert, was in einer starken Expression sichtbar wurde.



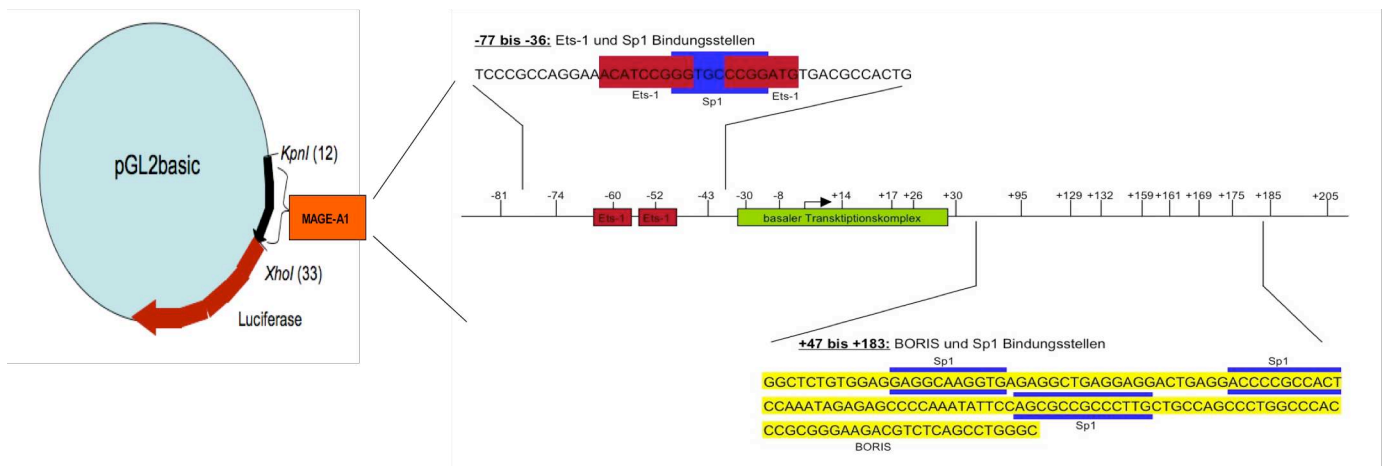
**Abbildung 16:** mRNA-Expressionsanalyse der Gene BORIS, MAGE-A1, -A2, -A3 und -A12 in den mikrometastatischen Zelllinien BCM1, LCM1 und PCE1. Die Zellen wurden 72 h unter den entsprechenden Bedingungen kultiviert und anschließend die RNA in cDNA umgeschrieben. Die RT-PCR erfolgte mit der unbehandelten (basal, b) und Aza-behandelten (a) cDNA und spezifischen Primerpaaren für MAGE-A1 (429 bp), -A2 (236 bp), -A3 (806 beziehungsweise 725 bp) und -A12 (420 bp) sowie BORIS (134 bp). Als Negativkontrolle wurde H<sub>2</sub>O als *Template* eingesetzt und als interne Kontrolle diente  $\beta$ -Aktin (202 bp). M, Marker; bp, Basenpaare.

Im Vergleich dazu war in allen untersuchten mikrometastatischen Zelllinien BORIS exprimiert. Die basale Expression konnte durch Aza noch leicht gesteigert werden.

### 3.3 Regulation des MAGE-A1-Promotors durch Transkriptionsfaktoren und epigenetische Faktoren

Als Grundlage für die hier durchgeführten transienten Ko-Transfektionen dienten die bisherigen Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe. Wischniewski et al. konnten zeigen, dass sowohl die Promotorhypermethylierung als auch die Histondeacetylierung an der Repression der MAGE-A1, -A2, -A3 und -A12 Genexpression beteiligt sind [1]. Weitere Ergebnisse mit der MCF-7 Zelllinie wiesen daraufhin, dass der epigenetische Faktor MBD1 die basale Aktivität der unmethylierten MAGE-A-Promotoren soweit reprimieren konnte, das selbst der Transkriptionsfaktor Ets-1 sie nicht aufheben konnte. Dahingegen konnte der epigenetische Faktor MBD2a die basale Promotoraktivität steigern [234].

Um nun den Einfluss von BORIS im Zusammenspiel mit den Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp1 sowie den epigenetischen Faktoren MBD1 und MBD2a auf die Regulation des MAGE-A1 Gens *in vitro* zu untersuchen, wurde ein Reporterplasmid konstruiert (Abbildung 17). Hierfür wurde in das Reporterplasmid das MAGE-A1 Promotorfragment (-77/+183), das Bindungsstellen für Ets-1, Sp1 und BORIS enthält, *upstream* der Sequenz, die für das fluoreszierende Luciferaseprotein kodiert, kloniert.



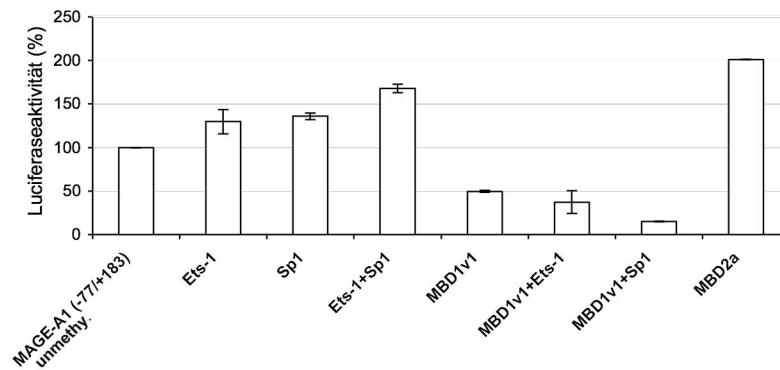
**Abbildung 17: Schematische Darstellung des pGL2 MAGE-A1 Reporterplasmids (-77/+183).** Das MAGE-A1 Promotorfragment (orangene Box) wurde über die *KpnI*- und *XhoI*-Schnittstellen in den pGL2 *basic* Vektor eingebracht und befindet sich *upstream* der Sequenz des Luciferasegens. Der grüne Kasten zeigt den Bereich, an dem der basale Transkriptionskomplex bindet. Die Transkriptionsstartstelle ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die *upstream* und *downstream* der Transkriptionsstartstelle liegenden potentiellen Bindungsstellen wurden folgendermaßen dargestellt: Ets-1 (rot), Sp1 (blau) und BORIS (gelb).

### 3.3.1 Die MBD1v1-vermittelte Repression des MAGE-A1-Promotors kann nicht durch Sp1 aufgehoben werden

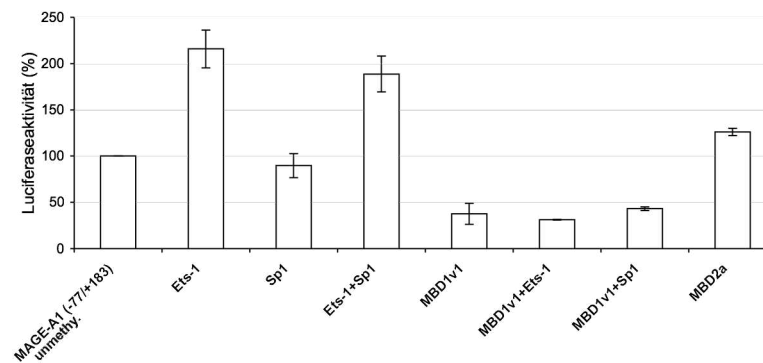
In den durchgeführten Ko-Transfektionsstudien wurde das unmethylierte Reporterplasmid mit Expressionsplasmiden, die für Ets-1, Sp1, MBD1 und MBD2a kodieren, in die MCF-7 Zelllinie sowie die mikrometastatischen Zelllinien LCM1 und PCE1 transfiziert. Die Aktivität des unmethylierten Reporterplasids wurde auf 100% gesetzt und zur Normalisierung der Transfektionseffizienz wurde das Reporterplasmid pGL4.74 [hRLuc/ TK] verwendet (Kapitel 2.2.2.21).

Die gemessene Luciferaseaktivität in den untersuchten Zelllinien zeigte, dass Ets-1 die MAGE-A1 Promotoraktivität in den MCF-7 Zellen um das 1,3-fache und in den LCM1 sowie PCE1 Zellen um etwa das 2-fache steigern (Abbildung 18). Der schwach stimulatorische Effekt durch Ets-1 dürfte durch endogenes Ets-1 verursacht sein. Dahingegen konnte der Transkriptionsfaktor Sp1 nur in den MCF-7 Zellen eine etwa 1,3-fache Erhöhung der MAGE-A1-Aktivität induzieren. In den beiden mikrometastatischen Zelllinien konnte kein Einfluss durch Sp1 nachgewiesen werden (Abbildung 18b und c). Wurden beide Expressionsplasmide, die entweder für Ets-1 oder Sp1 kodieren, zusammen in LCM1 und PCE1 transfiziert, so konnte Sp1 die Ets-1 vermittelte Aktivierung nicht weiter erhöhen. Im Vergleich dazu hatte die Ko-Transfektion beider Transkriptionsfaktoren in den MCF-7 Zellen einen höheren stimulatorischen Effekt (1,5-fach) als Ets-1 allein (Abbildung 18a). Die exogene Isoform MBD1v1 allein oder ko-transfiziert mit dem jeweiligen Transkriptionsfaktor Ets-1 oder Sp1 regulierte sowohl in LCM1, PCE1 als auch MCF-7 die transkriptionelle Aktivität des unmethylierten MAGE-A1-Promotors um etwa das 4-fache herunter. In keiner der untersuchten Krebszelllinien konnte Ets-1 oder Sp1 die MBD1v1-vermittelte Repression aufheben. Durch die Ko-Transfektion mit dem Reporterplasmid und dem Expressionsplasmid für MBD2a konnte eine etwa 2-fache Steigerung gegenüber der basalen Aktivität in den MCF-7 Zellen beobachtet werden. In den LCM1 Zellen trat nur eine etwa 1,3-fache MAGE-A1 Steigerung auf. Auffällig ist, dass in den PCE1 Zellen kein Effekt durch MBD2a auf den MAGE-A1-Promotor beobachtet wurde (Abbildung 18c).

## a) MCF-7



## b) LCM1



## c) PCE1

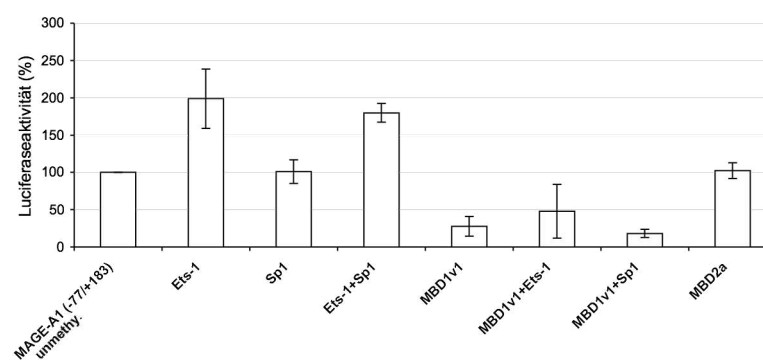
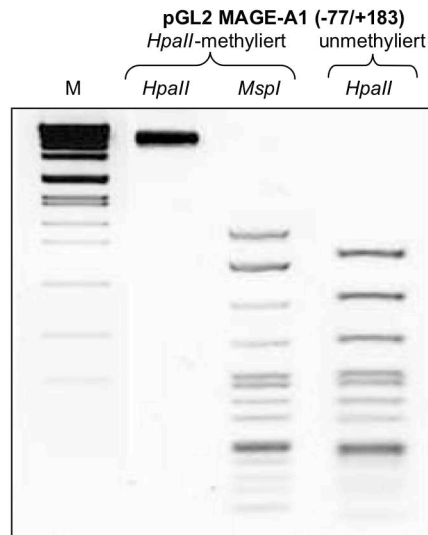


Abbildung 18: Luciferaseaktivität der ko-transfizierten Zelllinien MCF-7 (a), LCM1 (b) und PCE1 (c) mit dem unmethylierten pGL2 MAGE-A1 Reporterplasmid (-77/+183), das die BORIS Bindungsstelle *downstream* der Transkriptionsstartstelle enthält, und den Expressionsplasmiden, die für die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp1 sowie die epigenetischen Faktoren MBD1v1 und MBD2a kodieren. Die Aktivität des unmethylierten Reporterplasmids wurde auf 100% gesetzt. Normalisiert wurden die Werte mit Hilfe der Aktivität des Reporterplasmids pGL4.74 [hRLuc/ TK]. Unmethy., unmethyliert.

### 3.3.2 Sp1 inhibiert die BORIS-vermittelte Aktivierung des MAGE-A1-Promotors in der mikrometastatischen Zelllinie des Brustkarzinoms (BCM1)

Aufgrund mehrerer Studien ist bekannt, dass BORIS die Expression von Genen, die für andere *Cancer-Testis* Antigene, wie MAGE-A1 oder NY-ESO-1 kodieren, in verschiedenen Zelllinien aktivieren konnte [69, 81, 266]. In jüngsten Studien wurde nun berichtet, dass BORIS an der DNA-Hypomethylierung in Krebszelllinien involviert sein könnte [266, 267]. Daher wurden transiente Ko-Transfektionsstudien mit dem epigenetischen Faktor BORIS, den Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp1 und einem *in vitro* *HpaII*-methylierten MAGE-A1-Promotor in den mikrometastatischen Zelllinien BCM1 und PCE1 durchgeführt. Dafür wurde sowohl das bereits in Abbildung 17 beschriebene Reporterplasmid als auch das von Wischnewski et al. konstruierte Reporterplasmid pGL2 MAGE-A1 (-82/+116) verwendet [234]. Dieses Plasmid besitzt eine unvollständige BORIS-Bindungsstelle *downstream* der Transkriptionsstartstelle. Für die Transfektionsassays wurden beide Reporterplasmide *in vitro* methyliert. Zum einen durch die *HpaII*-Methylase, die das zentrale Cytosin in der CCGG-Sequenz methyliert ( $\rightarrow$  C<sup>m</sup>CGG), und zum anderen durch die CpG-Methylase *SssI*, die jedes Cytosin innerhalb des CpG-Dinukleotides methyliert ( $\rightarrow$  <sup>m</sup>CG).

Diese künstlich hervorgerufene Promotorhypermethylierung führt im Allgemeinen zur Repression der Genexpression, da die Transkriptionsfaktoren nicht mehr an die CpG-Dinukleotide binden können. Um die vollständige Methylierung der Reporterplasmide zu überprüfen, wurde ein Restriktionsverdau mit den Isochizomeren *HpaII* und *MspI* durchgeführt. Dabei schneidet das methylierungssensitive Restriktionsenzym *HpaII* nur unmethylierte CCGG-Sequenzen, während *MspI* die gleiche Sequenz ungeachtet des Methylierungsmusters schneidet. Auf einem 1%-igem Agarosegel wurde die Restriktion elektrophoretisch aufgetrennt. Abbildung 19 zeigt das vollständig *HpaII*-methylierte pGL2 MAGE-A1 Reporterplasmid (-77/+183), denn nach dem *HpaII*-Verdau waren keine verdauten Plasmidfragmente sichtbar.



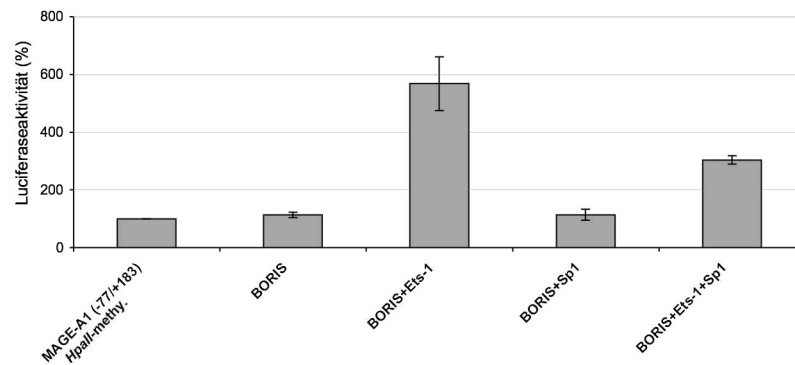
**Abbildung 19: Restriktionsverdau des *HpaII*-methylierten und unmethylierten pGL2 MAGE-A1 Reporterplasmids (-77/+183) mit den Isochizomeren *MspI* (nicht methylierungssensitiv) und *HpaII* (methylierungssensitiv).** Nach der vollständigen Methylierung bleibt das Reporterplasmid nach dem Verdau mit dem methylierungssensitiven Restriktionsenzym *HpaII* intakt. Wohingegen bei Verwendung des nicht methylierungssensitiven Restriktionsenzym *MspI* das geschnittene Reporterplasmid nahezu das gleiche Bandenmuster wie die Kontrolle, das unmethylierte Plasmid, aufweist. M, Marker.

Da in beiden Reporterplasmiden weniger CCGG-Stellen als CpG-Dinukleotide vorhanden waren, fiel die Repression der Luciferaseaktivität in den *HpaII*-methylierten Plasmiden schwächer aus als in dem *SssI*-methylierten Plasmiden (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurden in den weiteren transienten Ko-Transfektionsexperimenten nur noch die *HpaII*-methylierten Konstrukte eingesetzt.

Die in Abbildung 20 dargestellten Ergebnisse der Luciferaseaktivität in der transfizierten mikrometastatischen Zelllinie PCE1 zeigten nach der Transfektion des BORIS-Expressionsplasmids keinen aktivierenden Effekt auf den methylierten MAGE-A1-Promotor. Jedoch konnte nach der Ko-Transfektion von BORIS und Ets-1 eine etwa 5-fache Erhöhung der MAGE-A1 Promotoraktivität beobachtet werden. Der Transkriptionsfaktor Sp1 hatte im Zusammenspiel mit BORIS keinen stimulatorischen Effekt. Im Vergleich dazu konnten alle drei Expressionsplasmide, die für BORIS, Ets-1 und Sp1 kodieren, zusammen die MAGE-A1-Aktivität um das 3-fache hochregulieren.



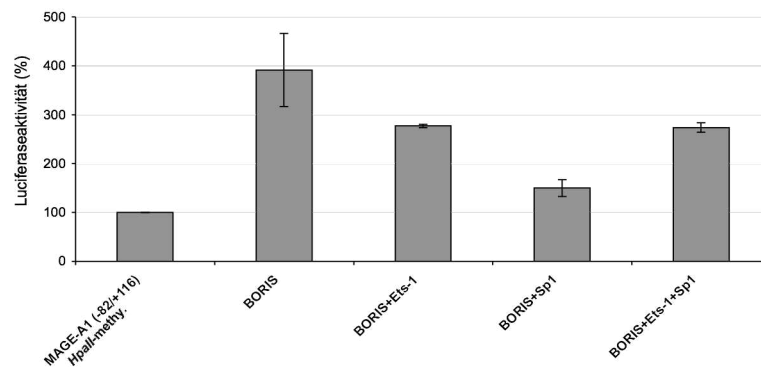
## PCE1



**Abbildung 20: Analyse der Luciferaseaktivität des transfizierten *HpaII*-methylierten pGL2 MAGE-A1 Reporterplasmids (-77/+183) mit der BORIS-Bindungsstelle *downstream* der Transkriptionsstartstelle in der mikrometastatischen Zelllinie PCE1.** Die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und/oder Sp1 sowie der epigenetische Faktor BORIS wurden ko-transfiziert. Die Luciferaseaktivität des *HpaII*-methylierten Reporterplasmids wurde 100% gesetzt. Normalisiert wurden die Werte mit Hilfe der Aktivität des Reporterplasmids pGL4.74 [hRLuc/ TK]. *HpaII*-methy., *HpaII*-methyliert.

BCM1 Zellen wurden nun mit dem methylierten pGL2 MAGE-A1 Reporterplasmid (-82/+116) und den Expressionsplasmiden, die für BORIS, Ets-1 und Sp1 kodieren, transient ko-transfiziert (Abbildung 21). In diesen Zellen wurde durch die Transfektion mit dem BORIS-Expressionsplasmid die basale Aktivität des MAGE-A1-Promotors um das 3-fache gesteigert. Ets-1 im Zusammenspiel mit BORIS konnte die BORIS-vermittelte Promotoraktivität nicht weiter stimulieren. Interessanterweise reprimierte der ko-transfizierte Transkriptionsfaktor Sp1 den durch BORIS-vermittelten aktivierenden Effekt. Wurden alle drei Expressionsplasmide, die für BORIS, Ets1 und SP1 kodieren, zusammen in die BCM1 Zellen transfiziert, konnte Ets-1 die beobachtete Repression durch Sp1 nicht aufheben.

## BCM1



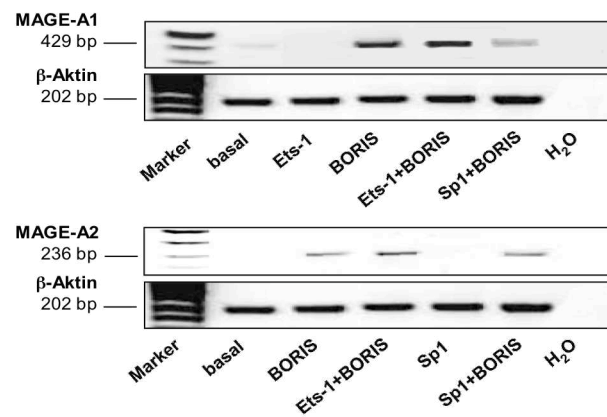
**Abbildung 21:** Ko-Transfektionen der mikrometastatischen Zelllinie BCM1 mit dem *HpaII*-methylierten pGL2 MAGE-A1 Reporterplasmid (-82/+116), mit der unvollständigen BORIS-Bindungsstelle *downstream* der Transkriptionsstartstelle und den Expressionsplasmiden, die für den epigenetischen Faktor BORIS und die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp1 kodieren. Die Aktivität des *HpaII*-methylierten Reporterplasmids wurde 100% gesetzt. Normalisiert wurden die Werte mit Hilfe der Aktivität des Reporterplasmids pGL4.74 [hRLuc/ TK]. *HpaII*-methy., *HpaII*-methyliert.

### 3.4 Studien über die MAGE-A mRNA-Expression

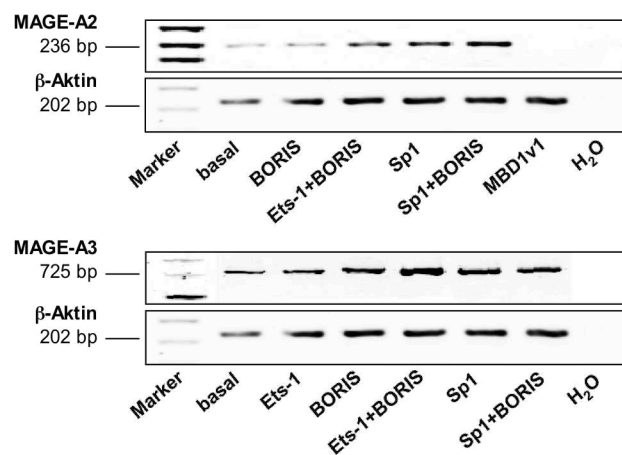
Um den beobachteten reprimierten Effekt der BORIS-vermittelten Aktivität durch Sp1 zu verifizieren, wurden transiente Ko-Transfektionsstudien in verschiedenen Krebszelllinien, die basal keine oder nur eine schwache MAGE-A Genexpression aufwiesen, sowie den mikrometastatischen Zelllinien durchgeführt. Die Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp1, die epigenetischen Faktoren MBD1 und MBD2a sowie BORIS allein oder in Kombination ko-transfiziert. Nach einer 72-stündigen Inkubation wurden die Zellen geerntet, Gesamt-RNA isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Durch eine semiquantitative RT-PCR mit genspezifischen Primern für MAGE-A1, -A2, -A3 und -A12 wurde die jeweilige mRNA-Expression untersucht.

In Du145 Zellen fand weder basal noch nach Transfektion von Ets-1 oder Sp1 eine MAGE-A1- und MAGE-A2-Expression statt (Abbildung 22a). Das exogene BORIS induzierte eine starke MAGE-A1-Expression während MAGE-A2 nur geringfügig gegenüber der basalen Expression erhöht wurde. Erfolgte eine Ko-Transfektion von BORIS und Ets-1 so konnte das Transkriptniveau von MAGE-A1 und -A2 minimal gegenüber der alleinigen Transfektion von BORIS gesteigert werden. Der Transkriptionsfaktor Sp1 minderte sowohl die BORIS-vermittelte MAGE-A1 als auch MAGE-A2 Genexpression.

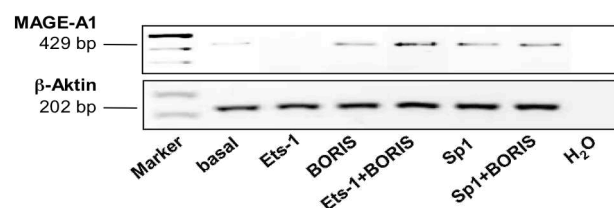
## a) Du145



## b) MDA-MB 231



## c) MCF-7



**Abbildung 22: mRNA-Expressionsanalyse der MAGE-A Gene in den Krebszelllinien Du145 (a), MDA-MB 231 (b) und MCF-7 (c).** Um das basale Expressionslevel bestimmen zu können, wurden die Zelllinien unbehandelt kultiviert. In transienten Transfektionen wurden alle Zelllinien mit den Expressionsplasmiden für Ets-1, Sp1, BORIS und MBD1v1 transfiziert. Nach 72 h wurde die RNA isoliert, DNase verdaut und in cDNA umgeschrieben. Die semiquantitative RT-PCR erfolgte mit spezifischen MAGE-A Primern. Die Längen der PCR-Produkte befinden sich links vom Bild. Als interne Kontrolle erfolgte die Amplifikation des *housekeeping*-Gens  $\beta$ -Aktin, dass eine gleichmäßige Expression zeigte. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne *Template* mit H<sub>2</sub>O. bp, Basenpaare.

Die MDA-MB 231 Zelllinie zeigte eine schwache basale Expression des MAGE-A2 und MAGE-A3 Gens, was auf eine Methylierung ihrer Promotoren hinweisen könnte (Abbildung 22b). Der Transkriptionsfaktor Ets-1 konnte die MAGE-A3-Expression im Gegensatz zum Transkriptionsfaktor Sp1 nicht steigern, der ein verstärktes Expressionslevel sowohl bei MAGE-A2 als auch bei MAGE-A3 hervorrief. Für Sp1 konnte bereits gezeigt werden, dass es auch methylierte Promotoren aktivieren kann [268]. Die Ko-Transfektion der MDA-MB 231 Zellen mit beiden Expressionsplasmiden, BORIS und Ets-1, zeigte, dass Ets-1 die durch BORIS gesteigerten MAGE-A Genexpression weiter stimulieren konnte. Eine Ko-Transfektion von BORIS zusammen mit Sp1 konnte diesen Effekt nicht hervorrufen. Der transfizierte epigenetische Faktor MBD1v1 inhibierte die MAGE-A2 Transkription.

Die ebenfalls untersuchte Brustkrebszelllinie MCF-7 zeigte basal und nach Ets-1 Transfektion keine MAGE-A1-Expression (Abbildung 22c). BORIS allein konnte die basale MAGE-A1-Expression nur minimal steigern. Erst die Ko-Transfektion der Expressionsplasmide Ets-1 und BORIS erhöhte das MAGE-A1 Transkriptniveau. Im Vergleich dazu waren nach der Transfektion von Sp1 allein oder in Kombination mit BORIS nur geringe Mengen an MAGE-A1 Transkripten nachweisbar.

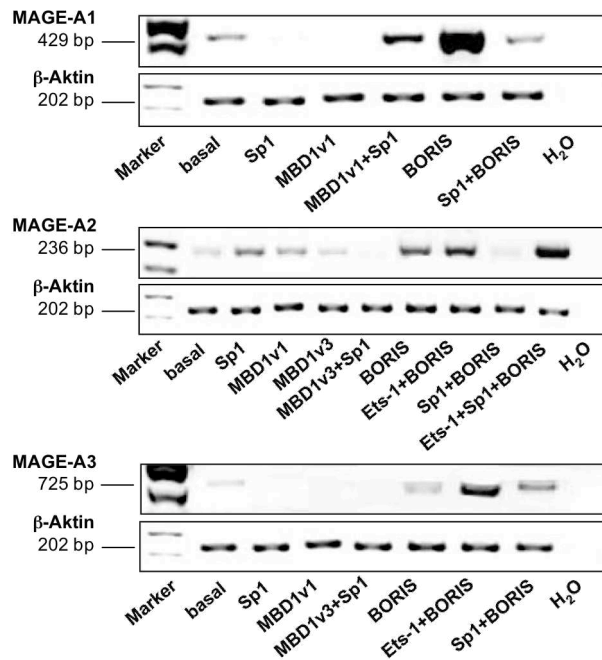
In den mikrometastatischen Zelllinien BCM1 und LCM1 wurde ebenfalls die MAGE-A mRNA-Expression analysiert.

In den transienten Transfektionen der BCM1 Zelllinie wurde basal eine schwache MAGE-A1-, -A2- und -A3-Expression nachgewiesen (Abbildung 23a). Der Transkriptionsfaktor Sp1 konnte nur die MAGE-A2-Expression gegenüber der basalen Expression steigern. Der epigenetische Faktor MBD1 inhibierte die Expression aller MAGE-A Gene. Die durch MBD1v1-vermittelte Repression von MAGE-A1 konnte durch transfiziertes Sp1 aufgehoben werden. Allerdings ist dieser Effekt bei MAGE-A2 und -A3 nicht zu erkennen. Die Transfektion von BORIS allein oder in Kombination mit dem Transkriptionsfaktor Ets-1 konnte die Expression von MAGE-A1, -A2 sowie -A3 gegenüber dem basalen Transkriptniveau um das 2- bis 5-fache steigern. Jedoch minderte Sp1 die BORIS-vermittelte MAGE-A Genexpression. Im Falle des untersuchten MAGE-A2-Promotors konnte eine Ko-Transfektion von BORIS mit den beiden Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp1 die MAGE-A2 Transkription erhöhen.

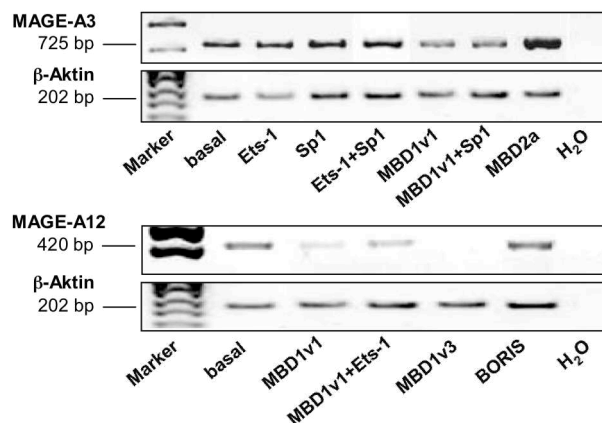
Die in Abbildung 23b untersuchte mikrometastatische Zelllinie LCM1 zeigte basal sowohl eine starke MAGE-A3- als auch -A12-Expression. Die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp1 steigerten die MAGE-A3-Expression nur minimal. Nach der Transfektion mit dem epigenetischen Faktor MBD1 konnte eine geminderte MAGE-A3- als auch MAGE-A12-Expression detektiert werden. Die Ko-Transfektion beider

Expressionsplasmide (MBD1v1 und Sp1 beziehungsweise Ets-1) zeigte, dass weder Ets-1 noch Sp1 die durch MBD1v1-vermittelte Repression stimulieren konnte. Der epigenetische Faktor MBD2a steigerte das MAGE-A3 Transkriptniveau. BORIS konnte die basale MAGE-A12 Genexpression nicht weiter stimulieren.

### a) BCM1



### b) LCM1



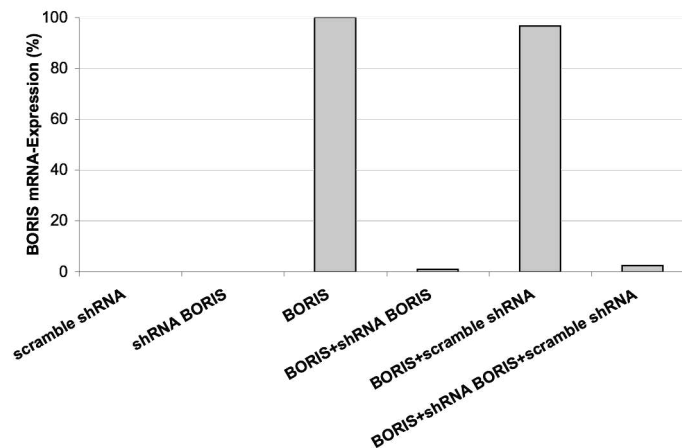
**Abbildung 23: Ko-Transfektion der mikrometastatischen Zelllinien BCM1 (a) und LCM1 (b) mit den Expressionsplasmiden für die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp1 sowie den epigenetischen Faktoren MBD1, MBD2a und BORIS.** Nach 72-stündiger Kultivierung wurde die RNA isoliert, DNase verdaut und in cDNA umgeschrieben. Die semiquantitative RT-PCR erfolgte unter Verwendung spezifischer MAGE-A Primer. Die PCR-Produkte wurden auf einem 1%-igem Agarosegel aufgetragen. Die Längen des jeweiligen erwarteten PCR-Produkts befinden sich links der Abbildung. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin und als Negativkontrolle wurde ein Ansatz nur mit H<sub>2</sub>O durchgeführt. bp, Basenpaare.

### 3.5 Hemmung der exogenen BORIS- sowie endogenen MAGE-A1-Expression mit BORIS-spezifischer shRNA

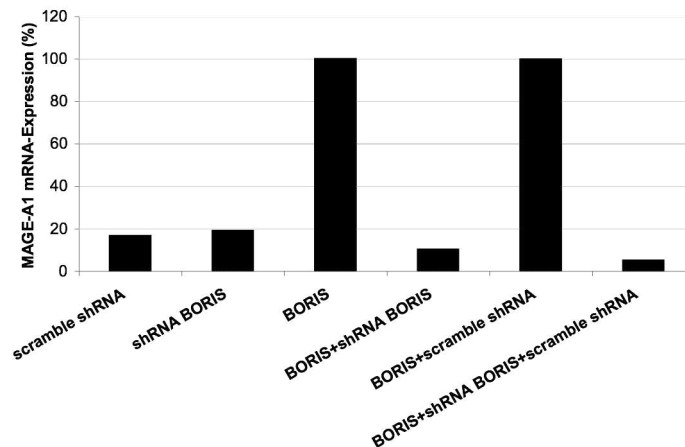
Um den Einfluss des exogenen BORIS-Proteins auf die MAGE-A1 Genexpression in den untersuchten Zelllinien zu bestätigen, wurde mit Hilfe einer shRNA die Effizienz der spezifischen BORIS-Hemmung überprüft. Dazu wurde die mikrometastatische Zelllinie BCM1 sowie die Brustkrebszelllinie MCF-7, die basal keine BORIS-Expression aufwies, sowohl mit dem BORIS- als auch dem shRNA-exprimierenden Vektor transfiziert (Kapitel 2.2.1.6). Der pRS-*scramble* shRNA Vektor wurde als Negativkontrolle zur Bestimmung unspezifischer Einflüsse auf die Ziel-Transkripte transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. In einer quantitativen *realtime* PCR wurde neben der BORIS-Expression auch die MAGE-A1-Expression untersucht, welche nun anhand der mikrometastatischen Zelllinie BCM1 beispielhaft dargestellt wurde (Abbildung 24).

Nach der Transfektion des Expressionsplasmids für BORIS konnte eine starke BORIS-Expression beobachtet werden, welche auf 100% gesetzt wurde (Abbildung 24a). Eine starke Verringerung auf nur 0,9% der mRNA-Konzentration von BORIS wurde nach der Zugabe der shRNA erzielt. Die Kontrollansätze mit der *scramble* shRNA zeigten keinen Effekt auf die RNA-Expression. Im Vergleich dazu ist in Abbildung 24b die mRNA-Expression von MAGE-A1 dargestellt. Dabei wurde festgestellt, dass durch das Expressionsplasmid für BORIS die MAGE-A1-Expression etwa um das 5-fache gegenüber der Kontrolle gesteigert werden konnte. Nach der Ko-Transfektion von BORIS und shRNA konnte eine Reprimierung der MAGE-A1-Expression beobachtet werden. Durch die *scramble* shRNA konnte auch in dieser Untersuchung keine Veränderung der Expression festgestellt werden.

## a) BORIS



## b) MAGE-A1

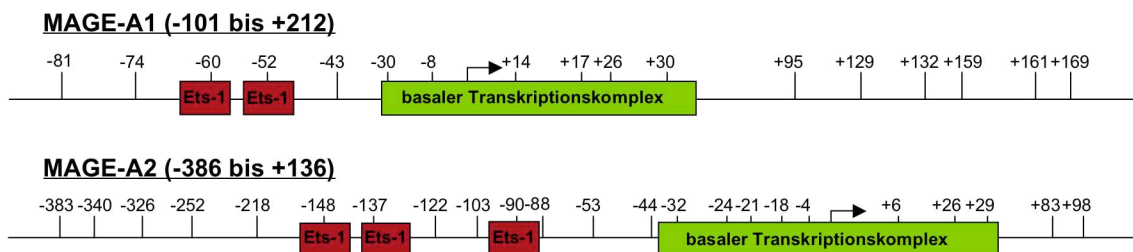


**Abbildung 24: Hemmung der exogenen BORIS- sowie der endogenen MAGE-A1-Expression durch BORIS-spezifische shRNA.** Analyse der mRNA-Expression von BORIS (a) und MAGE-A1 (b) durch quantitative *realtime* PCR in der mikrometastatischen Zelllinie BCM1. Die Zellen wurden mit dem Expressionsplasmid für BORIS sowie den Vektoren der BORIS-spezifischen shRNA und *scramble* shRNA (Kontrolle) transient transfiziert. Nach 48 h wurde die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Als interne Ladekontrolle und zur Normalisierung wurde das *housekeeping*-Gen RPLP0 verwendet. Das Expressionslevel des Expressionsplasmids für BORIS wurde auf 100% gesetzt.

### 3.6 Untersuchungen zum Einfluss des Demethylierungsgagens Aza und dem exogenem BORIS-Protein auf das DNA-Methylierungsmuster des MAGE-A1- und -A2-Promotors

Da die Promotorhypermethylierung eine wichtige Rolle in der Repression von MAGE-A spielt, sollte im Folgenden der Einfluss von Aza und exogenem BORIS-Protein auf das Methylierungsmuster der MAGE-A Gene untersucht werden. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse war bekannt, dass die mikrometastatische Zelllinie BCM1 basal keine beziehungsweise eine nur schwache, jedoch nach Aza-Behandlung eine starke MAGE-

A1 und -A2 Genexpression aufweist (Kapitel 3.2). Laut Literatur befinden sich im MAGE-A1-Promotor zwei Ets-1-Bindungsstellen in den Bereichen -64 bis -56 und -53 bis -45 (die Positionen sind relativ zur Transkriptionsstartstelle angegeben) und im MAGE-A2-Promotor drei Ets-1-Bindungsstellen bei -154 bis -145, -143 bis -134 und -99 bis -90 (Abbildung 25) [1, 58]. In einer von De Smet et al. durchgeführten Studie in Melanomzelllinien wurde gezeigt, dass die DNA-Methylierung der Ets-1-Bindungsstellen von MAGE-A für die Aktivierung der Genexpression unabdingbar ist [58]. Des Weiteren ist bekannt, dass die transkriptionelle Startstelle, die in dem Bereich zwischen -30 und +30 lokalisiert ist, für die basale MAGE-A1 Promotoraktivität demethyliert sein sollte [269].



**Abbildung 25: Schematische Darstellung der untersuchten MAGE-A1 und -A2 Promotorfragmente.** Der grüne Kasten beschreibt den Bereich, an dem der basale Transkriptionskomplex bindet. Der Startpunkt der Transkription ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die *upstream* der Transkriptionsstartstelle liegenden Ets-1-Bindungsstellen sind als roter Kasten dargestellt. Die Zahlen geben die Positionen der CpG-Dinukleotide relativ zur Transkriptionsstartstelle an.

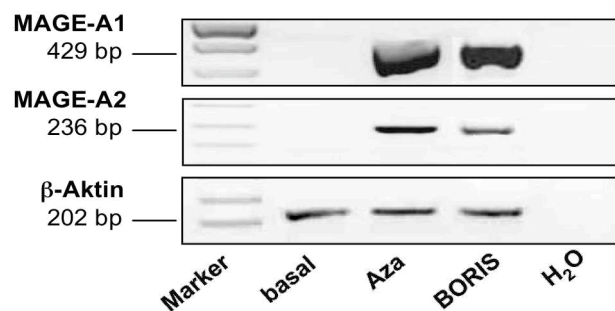
Um den Status der Demethylierung in der mit Aza-behandelten mikrometastatischen Zelllinie BCM1 zu ermitteln, wurde genomische DNA mit Natriumbisulfit konvertiert\* (Kapitel 2.2.2.2). Durch die chemische Behandlung wird nicht-methyliertes Cytosin in Uracil konvertiert, das sich in einer folgenden PCR wie Thymin verhält. Im Gegensatz dazu wird methyliertes Cytosin nicht deaminiert und bleibt als „ursprüngliche“ CG-Sequenz erhalten. In einer anschließenden PCR wurden die Promotorregionen (MAGE-A1 und -A2) amplifiziert, danach kloniert und sequenziert (Kapitel 2.2.2.3)\*. Die Sequenzierungsanalyse zeigt die Methylierungsinformation und lässt Rückschlüsse auf das ursprüngliche Methylierungsmuster der genomischen DNA zu. Damit die Effizienz der Demethylierung analysiert werden kann, wurde für den Vergleich die unbehandelte Zelllinie (Kontrolle; basal) verwendet. Von der unbehandelten Zelllinie wurden vier, von der Aza-behandelten Zelllinie fünf und der BORIS-transfizierten Zelllinie jeweils sechs Klone untersucht. Abbildung 26 zeigt die mRNA-Expressionsergebnisse von MAGE-A1

\* Aufgrund meiner Schwangerschaft wurde die praktische Arbeit von Bettina Steinbach (TA, Institut für Tumorbologie, UKE, Hamburg) durchgeführt.



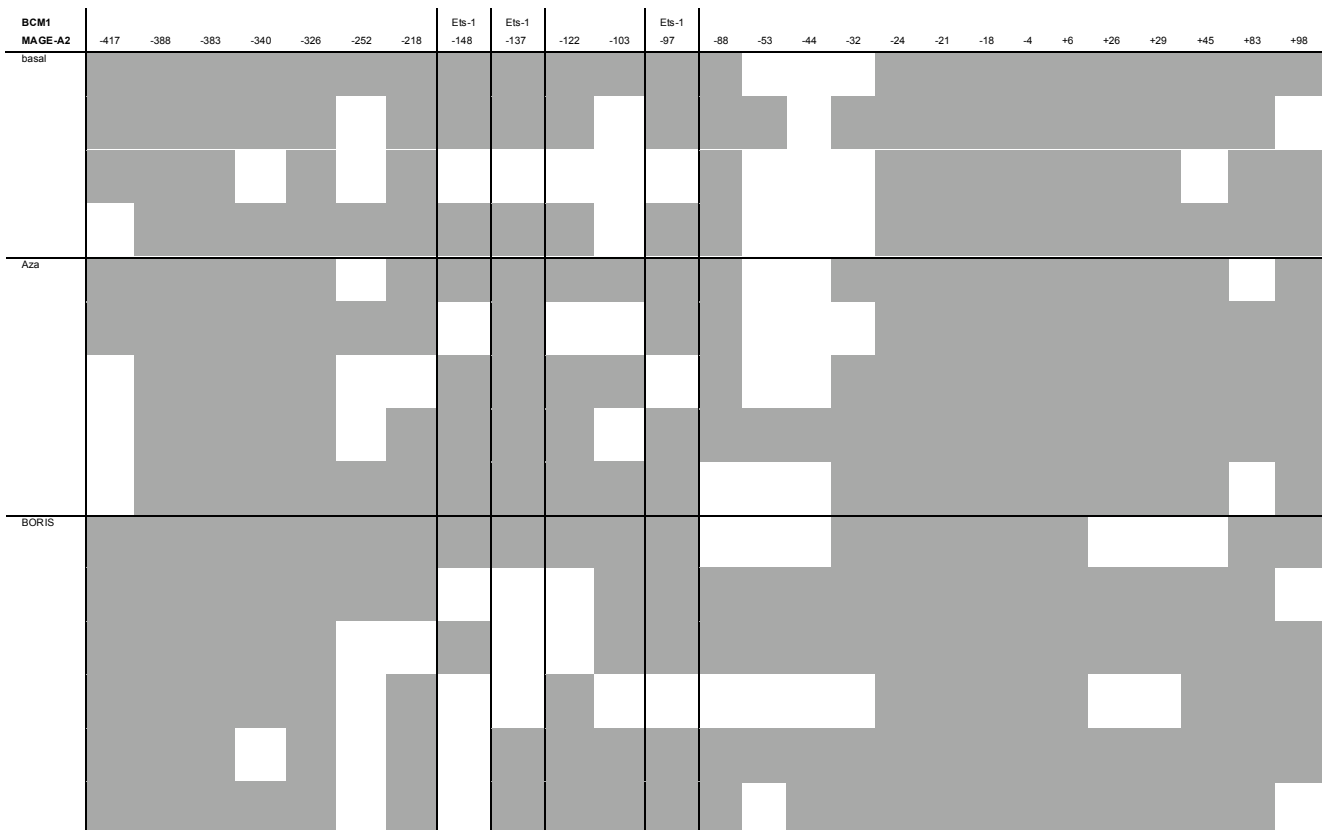
und -A2 in unbehandelten, Aza-behandelten und BORIS-transfizierten Zellen. In Abbildung 27 ist das Methylierungsprofil nach der Sequenzierung des Gens MAGE-A2 beispielhaft dargestellt.

In den unbehandelten Zellen wurden keine mRNA-Transkripte für beide MAGE-A Gene nachgewiesen, was auf eine Methylierung des jeweiligen Promotors hinweisen könnte (Abbildung 26). Sowohl das DNA-Demethylierungsmittel Aza als auch das exogene BORIS konnten die MAGE-A-Expression stimulieren.



**Abbildung 26: Nachweis der mRNA-Expression der Gene MAGE-A1 und MAGE-A2 in der mikrometastatischen Zelllinie BCM1 vor und nach Behandlung mit Aza sowie dem transfizierten Expressionsplasmid für BORIS.** Nach 72-stündiger Kultivierung wurden die Zellen geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die Amplifikation der mRNA Transkription der spezifischen Gene erfolgte mittels RT-PCR. Als Negativkontrolle wurde H<sub>2</sub>O als *Template* eingesetzt und als interne Kontrolle diente  $\beta$ -Aktin. Die Größen der PCR-Produkte befinden sich links vom Bild. bp, Basenpaare.

Schaut man sich nun das Methylierungsmuster an, so fällt auf, dass dieses sehr heterogen innerhalb des MAGE-A2-Promotors vorlag (Abbildung 27). Die Sequenzierung der basalen Klone zeigte, dass im Durchschnitt 77% der untersuchten CpG-Dinukleotide im methylierten Zustand vorlagen. Jedoch wurde weder in der Aza-behandelten noch in der BORIS-transfizierten Zelllinie eine deutliche Übereinstimmung zwischen dem Demethylierungsmuster und der durch Aza- oder BORIS-stimulierten Genexpression beobachtet. Es erfolgte keine signifikante Aza- und BORIS-vermittelte Promotordemethylierung an den Ets-1-Bindungsstellen und der Transkriptionsstartstelle. Allgemein zeigte sich die durch Aza- beziehungsweise BORIS-stimulierte Promotordemethylierung nur bei etwa 1-19% beziehungsweise 1-7%.



**Abbildung 27: Methylierungsmuster des MAGE-A2-Promotors in der mikrometastatischen Zelllinie BCM1 vor und nach Aza-Behandlung sowie transfiziertem Expressionsplasmid für BORIS.** Über den unmethylierten (weißer Kasten) und methylierten Feldern (grauer Kasten) befinden sich die Positionen der CpG-Dinukleotide innerhalb des Promotors.

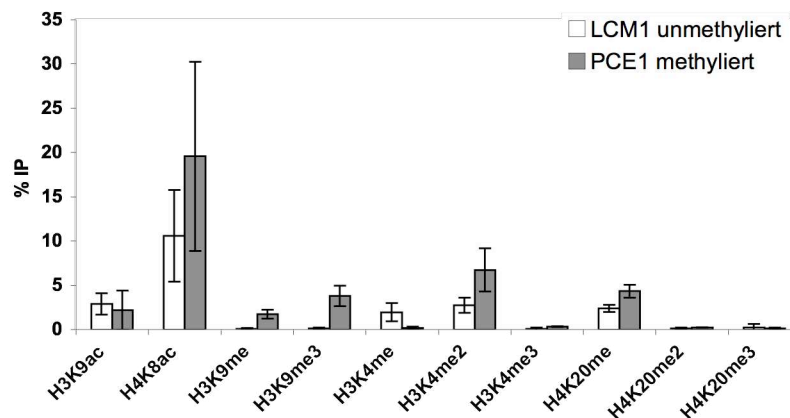
### 3.7 *in vivo* Untersuchungen der an den MAGE-A1-Promotor gebundenen Histone

Neben der DNA-Methylierung spielen auch Histonmodifikationen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Promotoraktivität. Die an den Promotor gebundenen Histone können zahlreiche Modifikationen erfahren und sind dementsprechend an der transkriptionellen Aktivierung oder Repression von Genen beteiligt. Im Allgemeinen ist die Acetylierung der N-terminalen Histonschwänze ein dominantes Signal für aktives Chromatin, das die Bindung der Komponenten des basalen Transkriptionsapparates unterstützt [270]. Die Histon-Methylierung hingegen kann entweder ein aktives oder repressives Signal sein.

Aus diesem Grund wurden nun die Modifikationen der Histone am MAGE-A1-Promotor *in vivo* untersucht. Dazu wurden einerseits für den CHIP-Assay die MAGE-A1-negativen MCF-7 und PCE1 Zelllinien aufgrund ihrer MAGE-A-Promotorhypermethylierung genutzt, andererseits aber auch die MAGE-A1-positive LCM1 Zelllinie. Die Analyse der mikrometastatischen Zelllinien LCM1 und PCE1 erfolgte nur im unbehandelten (basalen) Zustand, während die MCF-7 Zelllinie mit Aza-, TSA- sowie Aza&TSA-behandelt beziehungsweise mit dem Expressionsplasmid für BORIS transfiziert wurden (Kapitel 2.2.1.4 und 2.2.1.5). Nach dem *cross-linking* der DNA-gebundenen Proteine durch Formaldehyd und anschließender Sonifizierung wurden die an die

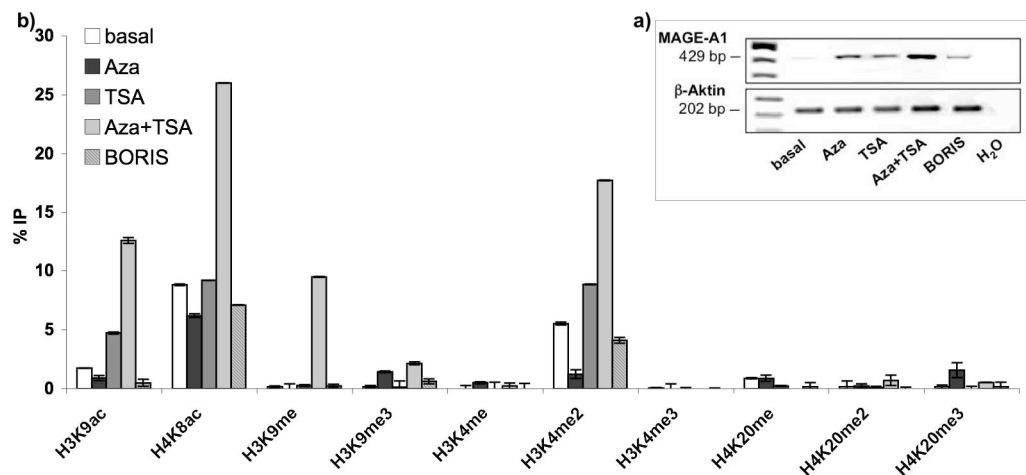
Chromatinfragmente gebundenen Proteine mit spezifischen Antikörpern für die methylierten Histone H3 Lysin 9 (H3K9), H3 Lysin 4 (H3K4) und H4 Lysin 20 (H4K20) sowie die acetylierten Histone H3 Lysin 9 (H3K9ac) und H4 Lysin 8 (H4K8ac) immunpräzipitiert. Der Nachweis von MAGE-A1 erfolgte durch eine quantitative *realtime* PCR mit genspezifischen Primern. In diesem Fall konnte für die Auswertung nicht das *housekeeping*-Gen RPLP0 als Kontrolle herangezogen werden, da es genau wie alle anderen Gene an modifizierte Histone gebunden ist. Deshalb wurde der ermittelte Wert des Kontroll-Antikörpers IgG von der berechneten Differenz zwischen Histon-spezifischer Immunpräzipitation und *Input*-DNA als Hintergrund abgezogen. Die somit gewonnenen Daten können Aufschluss über den Code der am MAGE-A1-Promotor gebundenen Histone in den Zelllinien MCF-7, LCM1 und PCE1 geben.

Zuerst wurde die Histonsignatur des aktiven, unmethylierten MAGE-A1-Promotors in LCM1 und der repressive, methylierte MAGE-A1-Promotor in PCE1 untersucht (Abbildung 28). Die Anreicherung der acetylierten Histone H3K9 und H4K8 war sowohl beim unmethylierten als auch beim methylierten MAGE-A1-Promotor relativ ähnlich. Dabei konnte für die methylierten Histone gezeigt werden, dass nur das trimethylierte H3K9 eine erhöhte Immunpräzipitation am methylierten Promotor im Vergleich zum unmethylierten MAGE-A1-Promotor in LCM1 aufwies, was auch mit der Genrepression assoziiert war.



**Abbildung 28: Signatur der am MAGE-A1-Promotor gebundenen Histone in den mikrometastatischen Zelllinien LCM1 (basal unmethyliert) und PCE1 (basal methyliert).** ChIP der unbehandelten LCM1 und PCE1 Zellen nach 72 h. Die mittels Formaldehyd kovalent an die DNA gebundenen Proteine wurden mit spezifischen Antikörpern für methylierte und acetylierte Histone immunpräzipitiert. Die präzipitierte DNA wurde in einer quantitativen *realtime* PCR mit Hilfe spezifischer MAGE-A1 Primer amplifiziert. Vor der Zugabe der Antikörper wurde von jeder Probe *Input*-DNA, die als Positivkontrolle diente, entnommen. Als Negativkontrolle (Hintergrundwert) wurde der IgG-Antikörper verwendet. H3K9, Lysin 9 an Histon H3; H3K4, Lysin 4 an Histon H3; H4K20, Lysin 20 an Histon H4; me, monomethyliert; me2, dimethyliert; me3, trimethyliert; ac, acetyliert; IP, Immunpräzipitierte DNA.

Um die *in vivo* Bindung der modifizierten Histone auch in der MAGE-A1-negativen MCF-7 Zelllinie analysieren zu können, wurde zunächst das mRNA-Expressionslevel von MAGE-A1 in den unbehandelten, behandelten und mit dem BORIS-Expressionsplasmid transfizierten MCF-7 Zellen überprüft (Abbildung 29a). Dabei konnte gezeigt werden, dass in unbehandelten Zellen eine schwache MAGE-A1-Expression vorlag. Das Demethylierungsgagens Aza und der Histondeacetylase-Inhibitor TSA konnten die MAGE-A1-Expression in diesen Zellen synergistisch heraufregulieren. Das exogene BORIS war in der Lage, das geringe basale Transkriptlevel von MAGE-A1 zu steigern. Jedoch war die BORIS-vermittelte Stimulation wesentlich schwächer als der durch beide Agenzien (Aza+TSA) oder alleinige Aza-Behandlung erzielte Effekt. BORIS und TSA alleine hatten jeweils ähnliche Wirkung auf die MAGE-A1-Expression.



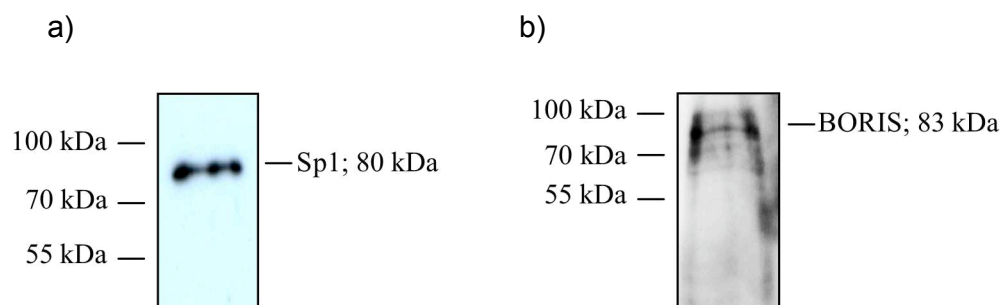
**Abbildung 29: Einfluss der Stimulationsagenzien (Aza und/oder TSA) sowie dem exogenen BORIS-Protein auf das mRNA-Expressionslevel (a) und die Signatur (b) der am MAGE-A1-Promotor gebundenen Histone in der MCF-7 Zelllinie. a)** Semiquantitative RT-PCR-Analyse der MAGE-A1-Expression in unbehandelten, Aza- und/oder TSA-behandelten sowie mit dem BORIS Expressionsplasmid transfizierten MCF-7 Zellen. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin. **b)** Analyse des ChIP mit spezifischen Antikörpern für acetylierte und methylierte Histone, die kovalent an die DNA gebunden wurden. Die Amplifikation der präzipitierten DNA wurde in einer quantitativen *realtime* PCR mit Hilfe spezifischer MAGE-A1 Primer durchgeführt. Für die Normalisierung und gleichzeitig als Positivkontrolle wurde vor der Zugabe der Antikörper von jeder Probe *Input*-DNA entnommen. Zur Bestimmung des Hintergrundes wurde der IgG-Antikörper als Negativkontrolle verwendet. H3K9, Lysin 9 an Histon H3; H3K4, Lysin 4 an Histon H3; H4K20, Lysin 20 an Histon H4; me, monomethyliert; me2, dimethyliert; me3, trimethyliert; ac, acetyliert; IP, Immunpräzipitierte DNA.

Basierend auf diesen Ergebnissen wurde nun der Effekt der Behandlung mit Aza und/oder TSA sowie der Einfluss von BORIS auf die Signatur der MAGE-A1-Promotor gebundenen Histone im Vergleich zu der unbehandelten MCF-7 Zelllinie analysiert (Abbildung 29b). Nach der TSA-Behandlung konnte eine Anreicherung des acetylierten H3K9 beobachtet werden, was auf die Funktion des TSA als Histondeacetylase-Inhibitor

hinweist. Im Vergleich dazu hatte die DNA-Demethylierung durch Aza keinen beziehungsweise nur einen minimalen Effekt auf die einzelnen Histonmodifikationen in den MCF-7 Zellen. Nach der Behandlung mit beiden Agenzien trat eine Anreicherung der DNA mit den Antikörpern für acetyliertes H3K9 und H4K8, monomethyliertes H3K9 sowie dimethyliertes H3K4 auf. Auffällig war, dass sowohl in den unbehandelten als auch in den behandelten Zellen nur eine sehr geringe Immunpräzipitation bei trimethyliertem H3K4 sowie bei mono-, di- und trimethyliertem H4K20 gefunden wurde. Die BORIS-transfizierten Zellen zeigten keine Änderungen in den Histonmodifikationen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen.

### 3.8 Herstellung der rekombinanten Proteine BORIS und Sp1

Für die folgenden EMSA-Analysen (Kapitel 2.2.3.6) wurden die rekombinanten Proteine Sp1 und BORIS hergestellt. Dafür wurden HaloTag-Expressionsvektoren, spezifisch für Sp1 und BORIS, hergestellt\*. Nach der Hitzetransformation in kompetente *E.coli* Bakterien wurden die HaloTag-Fusionsproteine mit Hilfe des HaloLink™ Resin Systems (Kapitel 2.2.3.2) aufgearbeitet und eluiert\*. Wie aus Abbildung 30 hervorgeht, wurde bereits nach 24 h eine ausreichende Menge an Sp1- und BORIS-Protein detektiert.

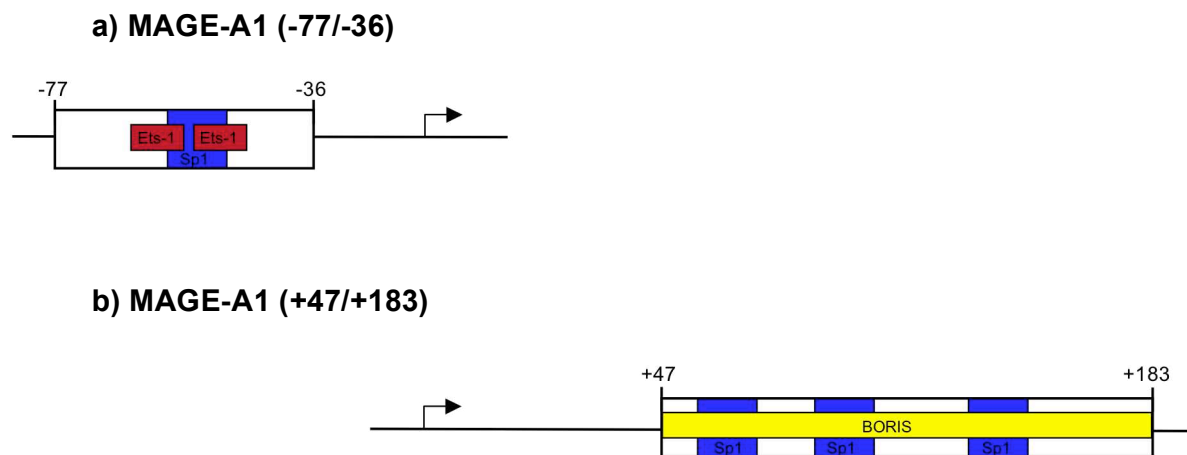


**Abbildung 30: Nachweis der rekombinanten Proteinexpression von Sp1 (a) und BORIS (b).** Mit der Western Blot Analyse wurde die Sp1 und BORIS Proteinexpression nachgewiesen. Die aus den hitzetransformierten *E.coli* Bakterien gewonnenen HaloTag-Fusionsproteine wurden mittels HaloLink™ Resin aufgearbeitet, gelelektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Der Nachweis des 80 kDa Sp1- und des 83 kDa BORIS-Proteins erfolgte mit den polyklonalen Sp1- und BORIS-Antikörper.

\* Praktische Arbeit durchgeführt von Bettina Steinbach (TA, Institut für Tumorbologie, UKE, Hamburg).

### 3.9 *In vitro* Interaktionsstudien der rekombinanten Proteine mit dem MAGE-A1-Promotor

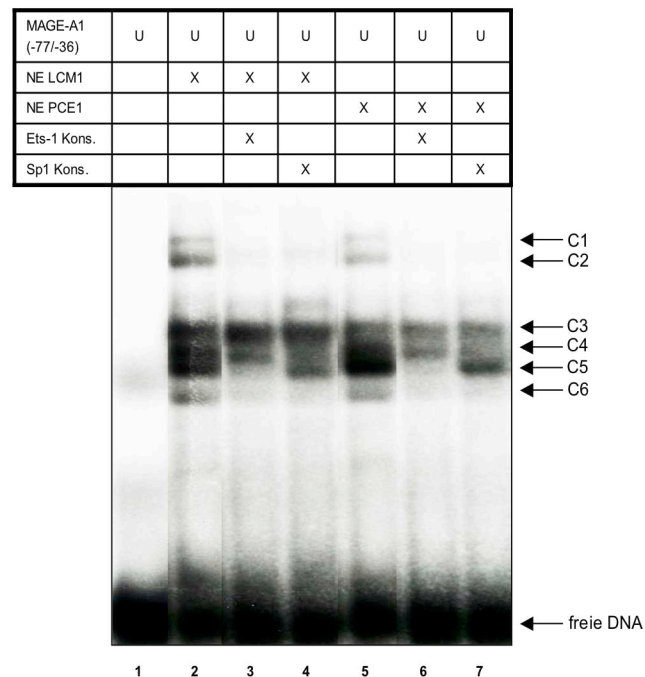
Um die beobachteten Ergebnisse des inhibierenden Effektes durch Sp1 nach BORIS-Aktivierung näher zu charakterisieren, wurden *electrophoretic mobility shift assays* (EMSA) mit synthetisierten [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-markierten Doppelstrang-Oligonukleotiden durchgeführt (Kapitel 2.2.3.6). Die dafür ausgewählten MAGE-A1 Promotorfragmente sind in Abbildung 31 schematisch dargestellt. Zum einen wurde das 42 bp-lange MAGE-A1 Promotorfragment (-36 bis -77 relativ zur Transkriptionsstartstelle) verwendet, das zwei Ets-1-Bindungsstellen sowie eine über *in silico* Analysen ermittelte Sp1-Bindungsstelle *upstream* der Transkriptionsstartstelle aufwies [58]. Das zweite Oligonukleotid war 137 bp lang (+47 bis +183 relativ zur Transkriptionsstartstelle) und besaß *downstream* liegend eine BORIS- und drei weitere über *in silico* Analysen ermittelte Sp1-Bindungsstellen.



**Abbildung 31: Schematische Darstellung der MAGE-A1 Promotorfragmente mit Ets-1-, Sp1- und BORIS-Bindungsstellen.** Die im EMSA verwendeten DNA-Fragmente sind durch einen weißen Kasten mit Start- und Endpunkt dargestellt. **a)** Das 42 bp-lange MAGE-A1 Promotorfragment, dem die BORIS-Bindungsstelle *downstream* der Transkriptionsstartstelle fehlt. **b)** Das 136 bp-lange MAGE-A1 Promotorfragment mit den *upstream* der Transkriptionsstartstelle liegenden Bindungsstellen. Die Positionen der Protein-Bindungsstellen im MAGE-A1-Promotor sind folgendermaßen dargestellt: Ets-1 (rot), Sp1 (blau) und BORIS (gelb). Die Transkriptionsstartstelle ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

### 3.9.1 Nachweis der Proteine Ets-1 und Sp1 im Zellkern-Extrakt der mikrometastatischen Zelllinien LCM1 und PCE1

Für die folgende Untersuchung\* wurde das unmethylierte 42 bp-lange MAGE-A1 Promotorfragmente sowie Zellkern-Extrakte der mikrometastatischen Zelllinien LCM1 und PCE1 verwendet. Des Weiteren wurden die Konsensussequenzen von Ets-1 und Sp1 (Tabelle 10) als Kompetitoren eingesetzt, um zu klären, ob diese Proteine im Zellkern-Extrakt enthalten waren und folglich an die untersuchten Promotorfragmente banden.



**Abbildung 32: EMSA mit dem unmethylierten [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-markierten Doppelstrang-Oligonukleotid, das dem MAGE-A1 Promotor (-77/-36) entspricht, und Zellkern-Extrakten (NE) aus den mikrometastatischen Zelllinien LCM1 und PCE1. Spur 1 zeigt die Bindung ohne nukleären Extrakt. Als Kompetitor wurde die Ets-1 sowie Sp1 Konsensussequenz (Kons.) eingesetzt. Die Komplexe zwischen dem MAGE-A1 Promotorfragment und dem Zellkern-Extrakt (C1-C6) sowie die freie DNA sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. U, unmethyliert; X, verwendete Komponente.**

Wie aus Abbildung 32 hervorgeht, kam es zu mehreren Komplexbildungen (C1-C6) zwischen dem Zellkern-Extrakt von LCM1 (Spur 2) und PCE1 (Spur 5) mit dem MAGE-A1 Promotorfragment. Durch die Zugabe der Ets-1 Konsensussequenz konnten die MAGE-A1/LCM1-Komplexe C1, C2, C5 und C6 (Spur 3) sowie die MAGE-A1/PCE1-Komplexe C1, C2, C5 und C6 (Spur 6) kompetiert werden. Dies könnte daraufhin deuten, dass es sich dabei um Ets-1 handelt. Nach der Competition mit der Sp1-Konsensussequenz wurden die MAGE-A1/LCM1-Komplexe C1, C2, C4 und C6

\* Aufgrund meiner Schwangerschaft wurde die praktische Arbeit von Bettina Steinbach (TA, Institut für Tumorbologie, UKE, Hamburg) durchgeführt.

(Spur 4) und MAGE-A1/PCE1-Komplexe C1, C2, C4 und C6 (Spur 7) nicht mehr detektiert. Der Komplex C3 wurde durch keine der beiden Konsensussequenzen kompetiert. Aus diesem Grund bedarf es weiterer Untersuchungen mit verschiedenen Kompetitoren, um zu klären, welches mögliche Protein aus dem Zellkernextrakt von LCM1 und PCE1 an das MAGE-A1 Promotorfragment bindet.

### 3.9.2 *In vitro* Bindung der rekombinanten Proteine BORIS und Sp1 an die MAGE-A1 Promotorregion

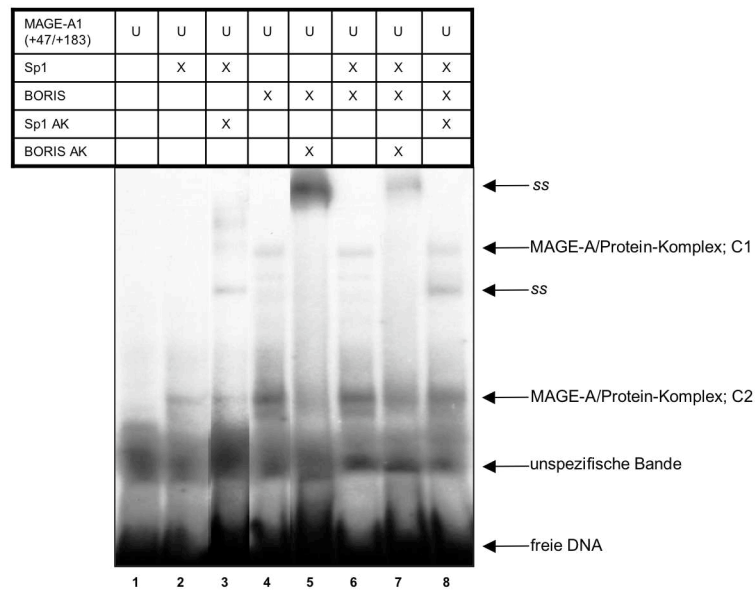
Aufgrund der reprimierenden Wirkung auf die BORIS-vermittelte MAGE-A1 Promotoraktivität durch Sp1 in den transienten Ko-Transfektionen wurden nun die rekombinanten Proteine Sp1 und BORIS mit dem langen unmethylierten MAGE-A1 Promotorfragment (+47/+183) inkubiert\*.

Abbildung 33 zeigt, dass das rekombinante Sp1-Protein mit dem MAGE-A1 Promotorfragment einen einzelnen Komplex (C2; Spur 2) formierte. Beim rekombinanten BORIS-Protein wurden zwei Komplexe (C1 und C2, Spur 4) detektiert, wobei der Komplex C1 im Vergleich zu C2 allgemein sehr schwach war. Um die DNA-Protein-Komplexbildung zu überprüfen, wurden *supershift*-Analysen mit den spezifischen Antikörpern für Sp1 und BORIS durchgeführt. Durch die Bindung des Antikörpers an den DNA/Protein-Komplex wird dieser Komplex im Gel während seiner Wanderung stärker retardiert und bildet einen *supershift*. Spur 3 zeigt einen *supershift* des DNA-Protein-Komplexes für Sp1 und in Spur 5 den spezifischen *supershift* für BORIS. Nach der Inkubation beider rekombinanten Proteine mit dem MAGE-A1 Promotorfragment wurden überraschenderweise dieselben DNA-Protein-Komplex (C1 und C2) detektiert (Spur 6). In Spur 7 und 8 sind die *supershift*-Reaktionen nach spezifischer Antikörperzugabe des jeweiligen Proteins ersichtlich. In jedem Reaktionsansatz (Spur 2-8) und selbst in Spur 1, die die Bindung ohne rekombinante Proteine zeigt, wurde eine unspezifische Bande detektiert.

---

\* Aufgrund meiner Schwangerschaft wurde die praktische Arbeit von Bettina Steinbach (TA, Institut für Tumorbologie, UKE, Hamburg) durchgeführt.





**Abbildung 33: EMSA supershift-Analysen mit den polyklonalen Sp1- und BORIS-Antikörpern.** EMSA mit den rekombinanten Proteinen Sp1 und BORIS unter Nutzung eines unmethylierten [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-markierten Doppelstrand-Oligonukleotids, das dem *downstream* liegenden MAGE-A1 Promotorbereich (+47/+183) entspricht. Spur 1 zeigt die Bindung ohne rekombinante Proteine. Die supershifts der MAGE-A/Protein-Komplexe (ss), die MAGE-A/Protein-Komplexe (C1-2), die unspezifische Bande sowie die freie DNA werden durch einen Pfeil markiert. U, unmethyliert; X, verwendete Komponente.

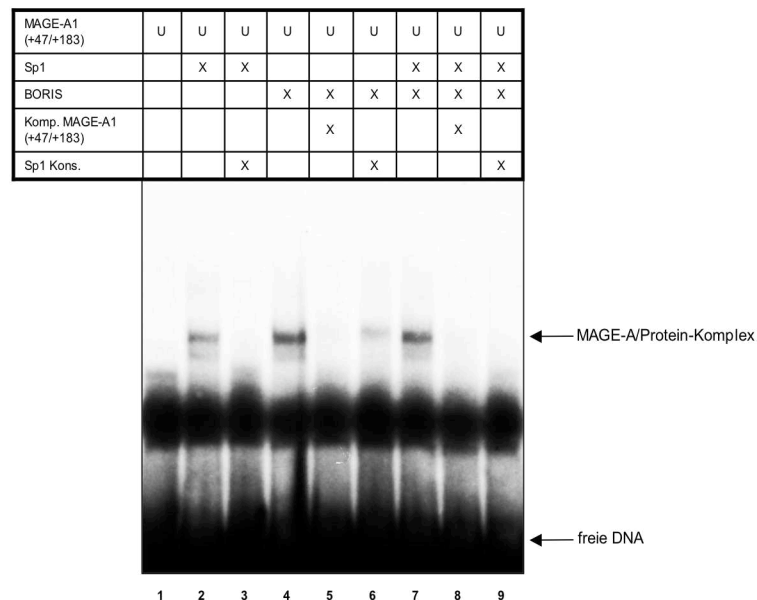
### 3.9.3 BORIS kann nach Bindung an den MAGE-A1-Promotor durch die Sp1 Konsensussequenz kompetiert werden

Um im Detail zu überprüfen, ob tatsächlich eine Konkurrenz um dieselbe Bindungsstelle am MAGE-A1-Promotor vorliegt, wurde das lange MAGE-A1 Promotorfragment (+47/+183) zusammen mit den rekombinanten Proteinen Sp1 und/oder BORIS inkubiert\*. Anschließend wurden Konkurrenzanalysen mit der Konsensussequenz des Sp1-Proteins und dem nicht-markierten selbst-Oligonukleotid durchgeführt\*.

Wie erwartet und in Übereinstimmung mit Abbildung 33 (Spur 2) kam es zur DNA-Protein-Komplexbildung zwischen dem MAGE-A1 Promotorfragment und Sp1 (Abbildung 34, Spur 2). Jedoch trat mit dem rekombinanten BORIS-Protein nur noch eine spezifische DNA-Protein-Komplexbildung auf (Abbildung 34, Spur 4). Die Bindung des Sp1-Proteins wurde durch die Zugabe der spezifischen Sp1 Konsensussequenz kompetiert (Abbildung 34, Spur 3). Durch die Zugabe eines Überschusses von unmethyliertem nicht-markiertem selbst-Oligonukleotid zum BORIS-Protein konnte die Spezifität von BORIS an das lange MAGE-A1 Promotorfragment gezeigt werden (Spur 5). Hervorzuheben ist, dass die Bindung von BORIS an seine Bindungsstelle innerhalb des Promotorfragments durch die Sp1 Konsensussequenz teilweise kompetiert wurde

\* Aufgrund meiner Schwangerschaft wurde die praktische Arbeit von Bettina Steinbach (TA, Institut für Tumorbologie, UKE, Hamburg) durchgeführt.

(Spur 6). Nach der DNA-Protein-Komplexbildung beider Proteine mit dem MAGE-A1 Promotorfragment (Spur 7) erfolgte durch die Zugabe der Sp1 Konsensussequenz (Spur 8) und dem nicht-markierten selbst-Oligonukleotid (Spur 9) der Verlust der spezifischen Bande.



**Abbildung 34: EMSA mit dem unmethylierten [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-markierten MAGE-A1 Promotorfragment (+47/+183), das den *downstream* liegenden Bereich umfasst, den rekombinanten Proteinen Sp1 und/oder BORIS und der spezifischen Sp1 Konsensussequenz.** Spur 1 enthält nur das radioaktiv-markierte DNA-Fragment des MAGE-A1-Promotors. Als Kompetitor diente die Sp1 Konsensussequenz (Kons.) und das unmethylierte nicht-markierte MAGE-A1 Promotorfragment (+47/+183). Die MAGE-A1/Protein-Komplexe und die freie DNA sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. U, unmethyliert; X, verwendete Komponente.

### 3.9.4 BORIS und Sp1 konkurrieren möglicherweise um dieselbe Bindungsstelle innerhalb des MAGE-A1 Gens

Basierend auf den aus Abbildung 33 und 34 gewonnenen Ergebnissen, wurde nun überprüft, ob auch eine mögliche Bindung des BORIS-Proteins *upstream* der Transkriptionsstartstelle des MAGE-A1-Promotors existiert. Denn laut *in silico* Analyse könnte die putative Sp1-Bindungsstelle im untersuchten MAGE-A1 Promotorfragment (-77/-36) dafür genutzt werden (Abbildung 31a). Um nun die potentiellen Bindungsstellen des Sp1- und BORIS-Proteins zu entschlüsseln, wurden Wettbewerbsanalysen mit dem 42 bp-langem MAGE-A1 Promotorfragment, den rekombinanten Proteinen Sp1 sowie BORIS und verschiedenen mutierten oder deletierten nicht-markierten Oligonukleotiden sowie der mutierten Sp1 Konsensussequenz durchgeführt\* (Abbildung 35).

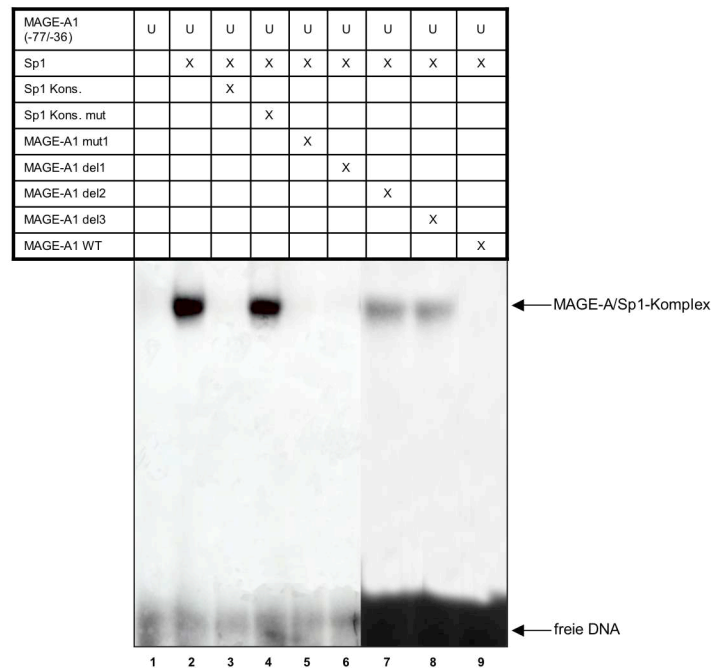
\* Aufgrund meiner Schwangerschaft wurde die praktische Arbeit von Bettina Steinbach (TA, Institut für Tumorbologie, UKE, Hamburg) durchgeführt.

In Abbildung 35a richtet sich das Augenmerk auf das Sp1-Protein. Als Negativkontrolle in Spur 1 wurde nur das radioaktiv-markierte MAGE-A1 Promotorfragment (-77/ -36) ohne Zusatz des rekombinanten Proteins aufgetragen. Spur 2 zeigt eine Bindung des Sp1-Proteins *upstream* der Transkriptionsstartstelle. Diese Bindung wurde in Spur 3 durch die Zugabe der Sp1 Konsensussequenz, aber nicht durch die mutierte Sp1 Konsensussequenz (Spur 4) kompetiert. Um im Folgenden zu klären, ob es sich tatsächlich um eine über *in silico* Analyse ermittelte Sp1-Bindungsstelle handelt, wurden zu Beginn drei Nukleotide (GGG → TTA) der Sp1 Erkennungssequenz mutiert. Spur 5 zeigt, dass diese eingebauten Mutationen dennoch zu einer Kompetition des Sp1-Proteins führte. Aus diesem Grund wurde nun die vollständige putative Sp1-Bindungsstelle deletiert. Jedoch erwies sich diese Mutante auch als Kompetitor (Spur 6). Basierend auf diesen Resultaten wurden weitere Mutanten generiert, von denen in der folgenden Abbildung nur noch zwei (MAGE-A1 del2 und MAGE-A1 del3) gezeigt werden. Mutante MAGE-A1 del2 deckte den Bereich von -77 bis -50 relativ zur Transkriptionsstelle ab, so dass 14 Nukleotide am 3'-Ende des Fragments deletiert wurden. Wie aus Spur 7 hervorgeht, erfolgte keine Kompetition. Im Vergleich dazu konnte die Mutante MAGE-A1 del3, der nur 7 Nukleotide am 3'-Ende des Fragments fehlen (-77 bis -43 relativ zur Transkriptionsstartstelle), die Bindung des Sp1-Proteins an den MAGE-A1-Promotor etwas kompetieren (Spur 8). Zum Schluss wurde noch das nicht-mutierte selbst-Oligonukleotid (-77 bis -36 relativ zur Transkriptionsstartstelle) als Kompetitor eingesetzt (Spur 9). Dieser Kompetitor konnte die spezifische Bindung des Sp1-Proteins an das MAGE-A1 Promotorfragment verhindern, da keine Bande sichtbar wurde.

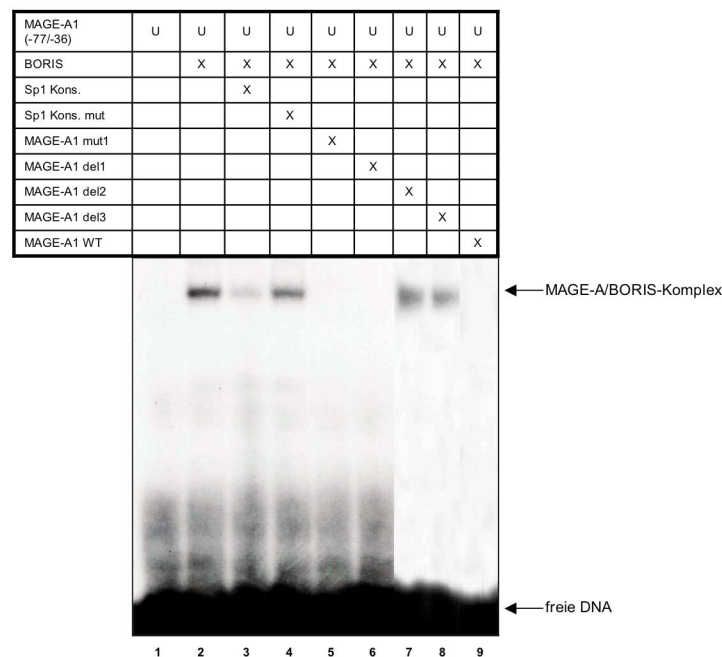
Die eben beschriebenen Untersuchungen mit den diversen mutierten und deletierten Kompetitoren wurden auch mit dem BORIS-Protein durchgeführt (Abbildung 35b). Es sollte geklärt werden, ob die vorher beobachteten mRNA-Expressionsergebnisse der BORIS-vermittelten MAGE-A1-Aktivierung durch Sp1 vielleicht deshalb gehemmt werden (Kap. 3.4), da beide Faktoren möglicherweise eine Affinität zur gleichen Position innerhalb des MAGE-A1-Promotors aufweisen.

Wider Erwarten war eine Bindung des BORIS-Proteins an das kurze MAGE-A1 Promotorfragment, dem die BORIS-Bindungsstelle fehlt, aufgetreten (Abbildung 35b, Spur 2). Diese Bindung konnte durch die Zugabe der spezifischen Sp1 Konsensussequenz (Spur 3), aber nicht durch die mutierte Sp1 Konsensussequenz (Spur 4) kompetiert werden. Dies lässt die Vermutung zu, dass der epigenetische Faktor BORIS ebenso wie der Transkriptionsfaktor Sp1 *upstream* des MAGE-A1-Promotors bindet. Die weiteren Kompetitionsanalysen (Spur 5 bis 9) verifizieren die Resultate des Sp1-Proteins, wenn auch etwas in abgeschwächter Form.

a)



b)



**Abbildung 35: EMSA mit dem unmethylierten  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ -markierten MAGE-A1 Promotorfragment (+47/+183), den rekombinanten Proteinen Sp1 (a) und BORIS (b) sowie verschiedenen Kompetitoren zur Bestimmung der Bindungsstellen *upstream* der Startstelle.** Spur 1 enthält nur das radioaktiv-markierte DNA-Fragment des MAGE-A1-Promotors. Als Kompetitoren dienen die Sp1 Konsensussequenz (Kons.), die mutierte Sp1 Konsensussequenz (Kons. mut), das nicht-markierte selbst-Oligonukleotid (MAGE-A1 WT) und die nicht-markierten mutierten Oligonukleotide (mut, mut1 und del1-3). Der MAGE-A/Sp1- beziehungsweise MAGE-A1/BORIS-Komplex und die freie DNA sind durch einen Pfeil gekennzeichnet. U, unmethyliert; X, verwendete Komponente.

### 3.10 Identifizierung von Interaktionspartnern des Transkriptionsfaktors Sp1 und BORIS

Es wurde die Involvierung der Transkriptionsfaktoren (Ets-1 und Sp1) und epigenetischen Faktoren (BORIS, MBD1 und MBD2a) in der Regulation der MAGE-A Genexpression mittels transienter Transfektionsanalysen untersucht. Nun wurde untersucht, ob diese Proteine möglicherweise in der Abwesenheit der DNA sekundäre Komplexe untereinander und mit der Kernkomponente des generellen Transkriptionsapparates TBP ausbilden können. Basierend auf der Methode der *Pulldown*-Technik (Kapitel 2.2.3.5) wurden die *in vitro* translatierten „prey“-Proteine Sp1, hTBP und der Carboxyl-Terminus des hTBP (hTBP-C) Methionin-markiert und mit den nicht-markierten *in vitro* translatierten Proteinen inkubiert<sup>\*</sup>. Die Protein-Protein-Wechselwirkungen der untersuchten Proteine Sp1, hTBP sowie hTBP-C wurden auf einem 12%-igem Polyacrylamigel aufgetrennt und anschließend mittels Fluorographie sichtbar gemacht (Abbildung 36). Für alle Untersuchungen wurde der TNT-Mix als interne Negativkontrolle verwendet.

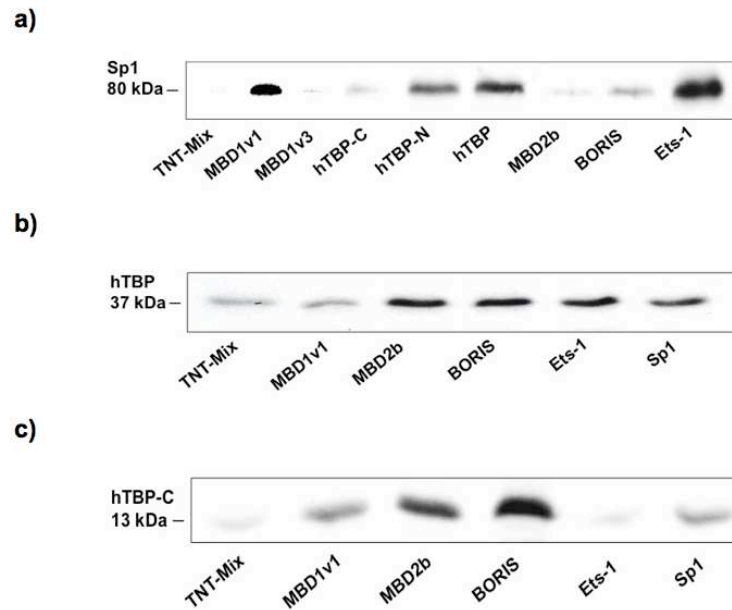
Für das Sp1-Protein konnte eine Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor Ets-1 sowie dem Amino-Terminus des hTBP (hTBP-N), dem generellen Transkriptionsfaktor des basalen Transkriptionskomplexes, nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse werden durch bereits publizierte Daten von Peterson et al. und Dittmer et al. bestätigt [99, 271]. Interessanterweise wurde durch dieses Experiment auch eine Wechselwirkung von MBD1v1, dem Repressor des MAGE-A1-Promotors, mit Sp1 gezeigt. Keine Protein-Protein-Komplexbildung wurde zwischen Sp1 und dem Carboxyl-Terminus des hTBP sowie den epigenetischen Faktoren MBD1v3, MBD2b und BORIS beobachtet (Abbildung 36a).

In einer weiteren *Pulldown*-Analyse wurde das hTBP Methionin-markiert und durch Fluorographie verifiziert (Abbildung 36b). Dabei konnte erneut ein Protein-Protein-Komplex zwischen hTBP und Sp1 detektiert werden. Des Weiteren wurde zum ersten Mal im Rahmen dieser Arbeit auch eine starke Wechselwirkung mit MBD2b, BORIS und Ets-1 gezeigt.

Die zum Schluss in Abbildung 34c durchgeführte *Pulldown*-Analyse mit dem hTBP-C bestätigte die Wechselwirkung zwischen dem hTBP und den epigenetischen Faktoren MBD2b und BORIS. Keine detektierte Bande, verglichen mit der Negativkontrolle, und somit keine Komplexbildung konnte für MBD1v1, Ets-1 sowie Sp1 nachgewiesen werden.

---

<sup>\*</sup> Praktische Arbeit durchgeführt von Bettina Steinbach (TA, Institut für Tumorbilogie, UKE, Hamburg).



**Abbildung 36: Nachweis der Protein-Protein-Interaktionen von Sp1, hTBP und hTBP-C.** Die Methionin-gelabelten *in vitro* translatierten „prey“-Proteine Sp1 (a), hTBP (b) und der Carboxyl-Terminus des hTBP (hTBP-C; c) wurden mit den jeweiligen HaloLink™ Resin gebundenen *in vitro* translatierten „bait“-Proteinen inkubiert. Als interne Negativkontrolle wurde der TNT-Mix verwendet. C, Carboxyl-Terminus; N, Amino-Terminus.

## 4 Diskussion

Ziel dieses Promotionsvorhabens war es, unter Verwendung transienter Transfektionsstudien die Rolle von BORIS zusammen mit Transkriptionsfaktoren sowie epigenetischen Faktoren auf die Expression der tumorassoziierten MAGE-A Antigene, insbesondere MAGE-A1, zu untersuchen. Weiterhin sollte zum besseren Verständnis für die krebsspezifische Expression der MAGE-A Antigene als Zielstrukturen in der Immuntherapie geklärt werden, ob BORIS die epigenetischen Mechanismen der DNA-Methylierung und der Histonmodifizierungen an den MAGE-A-Promotoren beeinflussen kann.

Die Genexpression der *Cancer-Testis* Antigene MAGE-A wird in gesunden Zellen, mit Ausnahme des Hodens und der Plazenta, unter anderem aufgrund der Hypermethylierung des Promotors unterdrückt. Jedoch tragen im Verlauf der Karzinogenese epigenetische Veränderungen, wie DNA-Hypomethylierungen und Histonmodifizierungen, dazu bei, dass sich das Expressionsmuster der *Cancer-Testis* Antigene ändert. Seit der Entdeckung des *Cancer-Testis* Antigens BORIS wird auch darüber diskutiert, ob BORIS ein möglicher Regulator der MAGE-A1-Expression sein kann. Das tumorspezifisch exprimierte BORIS ist ein Paralogon des ubiquitär vorkommenden CTCF, welches multifunktional ist und unter anderem eine wichtige Rolle bei der Organisation der Chromatinstruktur spielt [70]. Untersuchungen in verschiedenen Krebszelllinien konnten einen direkten Wechsel des epigenetischen Status des MAGE-A1-Promotors und anderer *Cancer-Testis* Antigene zeigen [69, 79, 81, 84]. Eine weitere Grundlage für die vorliegende Arbeit lieferten die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe über den Einfluss der Promotordemethylierung und der Histonacetylierung zur Regulation der MAGE-A Genexpression [1, 234]. Dennoch sind die bedeutenden Mechanismen zur transkriptionellen Regulation der MAGE-A Gene in Tumorzellen bisher noch nicht vollständig erforscht.

Im Zuge der durchgeführten Analysen konnte gezeigt werden, dass BORIS die MAGE-A-Promotoren aktivieren kann. Dies ist vor allem durch die Interaktion zwischen BORIS und der Komponente des generellen Transkriptionsapparates TBP möglich. Folglich wird die MAGE-A-Expression durch den Transkriptionsinitiationskomplex reguliert. Interessanterweise wurde bei der gemeinsamen Überexpression des Transkriptionsfaktors Sp1 und BORIS die BORIS-vermittelte MAGE-A-Expression nicht weiter stimuliert. Stattdessen wurde ein reprimierender Effekt beobachtet. Dies beruht möglicherweise darauf, dass beide Faktoren um dieselbe Bindungsstelle am MAGE-A-Promotor konkurrieren. Des Weiteren konnte keine direkte Einflussnahme von BORIS auf das DNA-Methylierungsmuster der Promotoren sowie die Histonmodifikationen beobachtet werden. Schließlich zeigten die Ergebnisse der Protein-Protein-Interaktion, dass der Transkriptionsfaktor Sp1 mit Ets-1, MBD1v1 und

der N-terminalen Domäne des TBP interagiert. Im Vergleich dazu traten Wechselwirkungen zwischen der C-terminalen Domäne des TBP mit MBD2b auf.

#### **4.1 Genexpression von MAGE-A und BORIS in verschiedenen Krebszelllinien und mikrometastatischen Zelllinien**

Zunächst wurde die BORIS- und MAGE-A-Expression auf RNA-Ebene in verschiedenen Krebszelllinien (acht Brustkrebs-, drei kolorektale, eine leukämische, eine hepatozelluläre und zwei Prostatakrebszelllinien) und mikrometastatischen Zelllinien untersucht. Lediglich in vier Brustkrebszelllinien konnten keine mRNA-Transkripte für BORIS nachgewiesen werden. Dies bestätigen die Arbeiten von D'Arcy et al. sowie Hines et al. [272, 273]. Vergleicht man nun die BORIS-Expression mit den durch Wischniewski et al. durchgeführten MAGE-A-Expressionsanalysen [1], so lässt sich kein direkter Zusammenhang zwischen der Expression der MAGE-A Gene und dem BORIS Gen feststellen. Die Expression der MAGE-A Gene in den detektieren BORIS-negativen Zelllinien könnte durch die Verwendung des Primerpaares erklärt werden, welches nicht alle möglichen Splicevarianten amplifiziert. So werden nur 12 von 23 Isoformen detektiert. Folglich bleibt die Frage offen, ob BORIS als epigenetischer Faktor für die Aktivierung dieser Gene in den untersuchten Zelllinien nicht zwingend erforderlich ist oder ob möglicherweise weitere Faktoren, die noch nicht identifiziert sind, für die Expression benötigt werden.

Es ist hinlänglich bekannt, dass das Demethylierungsmittel Aza die Expression unterschiedlicher *Cancer-Testis* Antigene, wie MAGE-A1, NY-ESO-1 aber auch BORIS in verschiedenen negativen Zelllinien induzieren kann [1, 81, 274]. Aza ist ein Demethylierungsmittel, welches bereits in der Therapie Anwendung findet und aufgrund seiner Struktur einem Cytidin-Analoga entspricht [210, 275]. Sobald eine Aza-Behandlung erfolgt, wird es während der Replikation an der Stelle von Cytosin in die neu synthetisierten DNA-Stränge eingebaut. Das eingebaute Cytidin-Analoga hemmt vor allem die DNA-Methyltransferase DNMT1, welche für den Erhalt des Methylierungsmusters zuständig ist. Infolgedessen kommt es zu einer genomweiten Demethylierung und zur Re-Expression von Genen, die vorher durch Methylierung inhibiert waren [57, 147]. Um einen Zusammenhang zwischen DNA-Hypermethylierung und Genexpression nachweisen zu können, wurden alle Zelllinien mit Aza behandelt. Es bestätigte sich durch eine gesteigerte BORIS mRNA-Expression gegenüber der Transkription in den unbehandelten Zellen. Vor allem die vier Brustkrebszelllinien (MCF-7, MDA-MB 231, BT474 und BT20), deren Promotoren im nativen Zustand methyliert waren, wurden im Zuge der Aza-Behandlung demethyliert und resultierten in einer deutlichen Re-Expression von BORIS. Für die Zelllinien MTSV1.7, T47D, LoVo, HL60, Du145 und LNCap, die bereits unbehandelt eine schwache Expression aufwiesen,



kann angenommen werden, dass deren Promotoren zumindest teilweise methyliert vorlagen. Die Demethylierung durch Aza führte hier zu einer weiteren Steigerung der BORIS Genexpression. Im Vergleich dazu war BORIS in den Zelllinien MDA-MB 468, Colo205, WiDr und HepG2 konstitutiv exprimiert und konnten durch Aza nicht weiter heraufreguliert werden. Folglich sind deren BORIS-Promotoren unmethyliert. Im Fall der BORIS exprimierenden kolorektalen Zelllinie Colo205 konnten Renaud et al. zeigen, dass die BORIS Transkription ausschließlich von Promotor B initiiert wird und dieser im nativen Zustand unmethyliert beziehungsweise lediglich teilweise methyliert vorliegt [77]. Dieses Ergebnis stimmt mit der Beobachtung dieser Arbeit überein.

Als molekularer Mechanismus spielt in der Epigenetik neben der DNA-Methylierung auch die Histonmodifikation eine zentrale Rolle. Diverse Arbeitsgruppen untersuchten die Verwendung des Histondeacetylase-Inhibitors TSA als Induktor der Genexpression [276, 277]. Durch TSA wird die Struktur des Chromatins aufgelockert, so dass es zu einer erleichterten Anlagerung des generellen Transkriptionsapparates und regulatorischer Transkriptionsfaktoren kommt. Dieses kann möglicherweise in einer erhöhten Genexpression resultieren. Dementsprechend ergaben die Untersuchungen in den TSA-behandelten Zelllinien, mit Ausnahme der Brustkrebszelllinien MDA-MB 231 und BT20, eine Induktion der BORIS-Expression. Jedoch war der Effekt schwächer als nach Aza-Behandlung. Dies könnte daran liegen, dass durch die TSA-Behandlung zwar das Chromatin aufgelockert wurde, aber die Promotor-Hypermethylierung im Wesentlichen noch bestehen blieb. Vereinzelt könnten methylierungsunabhängige regulatorische Faktoren (beispielsweise Sp1) an den Promotor, welcher nach der Auflockerung des Chromatins zugänglich wurde, binden und führten in den Zelllinien zu einer schwachen Aktivierung. Dass die zwei Brustkrebszelllinien nach TSA-Behandlung auch keine Re-Expression zeigten, lässt sich zum einem mit der starken Promotor-Hypermethylierung erklären, welche durch die TSA-Behandlung unberührt blieb. Zum anderen könnte das Modell der Methylierungs-vermittelten Chromatin-Remodellierung eine Erklärung bieten. Die methylierten Promotoren der zwei Brustkrebszelllinien werden im nativen Zustand von den Methyl-CpG bindenden Proteinen, hier vor allem MeCP2, erkannt und gebunden. Im Zusammenhang mit rekrutierten Histondeacetylasen wird eine dichtere Chromatinstruktur aufgebaut, welche die Zugänglichkeit für die Transkriptionsmaschinerie vermindert [278, 279]. Dies führt zu einer Unterdrückung der Transkription. Worm et al. und Yuan et al. unterstützen die Ergebnisse in der Zelllinie MDA-MB 231, da sie nach TSA-Behandlung ebenfalls keine Expression ihres untersuchten Gens nachweisen konnten [280, 281]. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass eine TSA-bedingte Aktivierung von Schlüsselgenen der Apoptosekaskade mit

nachfolgender Apoptoseinduktion erfolgt und daher nur eine geminderte beziehungsweise keine Expression nachweisbar ist [217, 218].

Wurden die Zelllinien sowohl mit Aza als auch mit TSA behandelt, dann erfolgte nur in einzelnen Zelllinien ein additiver und synergistischer Effekt. Eine mögliche Ursache könnte sein, dass in den meisten Zellen bereits das höchste Expressionsniveau erreicht wurde. Dies zeigten auch die Studien von Kang et al. und Hong et al. an Lungenkrebszelllinien, bei denen ebenfalls die BORIS-Expression vor und nach Aza-beziehungsweise TSA-Behandlung untersucht wurde [81, 84].

Des Weiteren wurden die mikrometastatischen Zelllinien des Brust-, Lungen- und Prostatakarzinoms nicht nur auf BORIS sondern auch in Bezug auf die MAGE-A Gene untersucht [9]. Bei allen drei Zelllinien wurden keine MAGE-A2, -A3 und -A12 RNA-Transkripte detektiert. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die MAGE-A-Promotoren zu diesem Zeitpunkt entweder methyliert vorlagen oder beispielsweise durch Repressoren reprimiert wurden. Lediglich der MAGE-A1-Promotor in der mikrometastatischen Zelllinie des Lungenkarzinoms wies als einziger einen demethylierten Status auf. Dies resultierte in einer starken basalen Transkription. Kontrovers zu den in meiner Arbeit durchgeführten RNA-Expressionsanalysen konnten Putz et al. Transkripte für MAGE-A1, -A2 und -A12 in der PCE1 Zelllinie und MAGE-A1 bis -A12 in der LCM1 Zelllinie detektieren [10]. Ein möglicher Grund für diese abweichenden Ergebnisse könnte in der Langzeitlagerung der Zellen in flüssigem Stickstoff liegen. Außerdem spielt die Kultivierung und insbesondere die höhere Passage bei der RNA-Gewinnung der mikrometastatischen Zellen eine mögliche Rolle. Seit geraumer Zeit ist bekannt, dass das Passagieren der Zelllinien über mehrere Zellgenerationen das DNA-Methylierungsmuster stark verändern kann. Jedoch sind eindeutige Ursachen noch nicht erforscht. Vielmehr wird vermutet, dass Selektionseffekte im Rahmen der Zellkultur ein verändertes Methylierungsprofil bedingen können [282, 283]. Im Vergleich zu den MAGE-A Antigenen war BORIS in allen mikrometastatischen Zelllinien exprimiert, so dass die Transkription von einem der drei verschiedenen Promotoren erfolgen muss [77]. In den unbehandelten mikrometastatischen Zelllinien führte die mRNA-Expression der *Cancer-Testis* Antigene wie in den verschiedenen Krebszelllinien (Brust, Kolon, Prostata etc.) nach Aza-Behandlung zu einer Erhöhung der Transkriptkonzentration für MAGE-A1, -A2, -A3, -A12 und BORIS. Daher kann angenommen werden, dass die Hypermethylierung der MAGE-A-Promotoren in den unbehandelten DTZ einen potentiellen Einfluss auf die frühe hämatogene Disseminierung nehmen kann. Da es sich hierbei nur um eine Spekulation handelt, müsste dies durch weiterführende Experimente belegt werden.

## 4.2 Regulation der MAGE-A-Genexpression durch Transkriptionsfaktoren und epigenetische Faktoren

Nachdem die Zelllinien auf ihre BORIS- und MAGE-A-Expression untersucht wurden, erfolgten transiente Transfektionsstudien sowohl mit Reporter- als auch Expressionplasmiden. Mit Hilfe dieser Verfahren sollten wichtige Erkenntnisse über die Regulation der MAGE-A-Promotoren durch die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp1 sowie die epigenetischen Faktoren MBD1, MBD2a und BORIS gewonnen werden.

### MAGE-A-Regulation durch die Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp1

Zunächst wurde der Einfluss der Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp1 sowie der epigenetischen Faktoren MBD1 und MBD2a *in vitro* auf den unmethylierten MAGE-A1-Promotor untersucht. Die Ko-Transfektion des MAGE-A1 Reporterplasmids mit dem Expressionsplasmid für Ets-1 führte sowohl in der MCF-7 als auch in der LCM1 sowie in der PCE1 Zelllinie zu einer Aktivierung des MAGE-A1-Promotors. Diese Aktivierung durch Ets-1 wurde bereits in der Literatur beschrieben [58, 234]. De Smet et al. zeigten, dass neben dem Transkriptionsfaktor Ets-1, welcher zu 90% aktivierend wirkt, auch der Transkriptionsfaktor Sp1 zu 10% für die hohe transkriptionelle Aktivierung des MAGE-A1-Promotors verantwortlich ist [57, 58]. So zeigte sich in der Brustkrebszelllinie MCF-7, dass Sp1 den MAGE-A1-Promotor aktivieren konnte. Demgegenüber stehen jedoch die Beobachtungen in den mikrometastatischen Zelllinien. Die basale Aktivität des unmethylierten MAGE-A1-Promotors konnte durch exogenes Sp1 kaum gesteigert werden. Durch den Nachweis der endogenen Sp1-Expression über RT-PCR-Analysen in allen Zelllinien (Daten nicht gezeigt) kann angenommen werden, dass das ubiquitäre Sp1-Protein die potentielle Sp1-Bindungsstelle *upstream* der Transkriptionsstartstelle am Reporterplasmid blockierte. Folglich könnte das exogene Sp1 nicht mehr binden und die transkriptionelle Aktivierung des MAGE-A1-Promotors nicht weiter heraufregulieren. Um diese offene Frage, weshalb keine Sp1-vermittelte Aktivierung in diesen Zellen induziert werden konnte, im Detail klären zu können, müssten Sp1-*knockout* Zelllinien zum Beispiel durch die siRNA-Technologie etabliert werden. Mit Hilfe dieses Modellsystems wäre es dann möglich den Einfluss des exogenen Sp1-Proteins auf den Promotor erneut zu untersuchen und möglicherweise eine stärkere Aktivierung des MAGE-A1-Promotors festzustellen. Auch nach der Ko-Transfektion beider Expressionsplasmide für Ets-1 und Sp1 konnte keine gesteigerte MAGE-A1-Aktivität gegenüber der alleinigen Aktivierung durch Ets-1 beobachtet werden. Hier kann angenommen werden, dass Ets-1 an zwei Bindungsstellen *upstream* der Transkriptionsstartstelle bindet und daher die Bindung von Sp1 blockiert, da sich die Bindungsstellen überlappen. Demgegenüber steht die Beobachtung der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Protein-Protein-Interaktionsstudie, bei der eine direkte

Interaktion zwischen Ets-1 und Sp1 nachgewiesen wurde. Weiterhin zeigten Studien einen synergistischen Effekt von Ets-1 und Sp1 an unterschiedlichen Promotoren, wie MAGE-A4, PDGF (*platelet-derived growth factor*) und dem Parathormon-related Protein (PTHrP) [52, 284-286]. Jedoch schlossen Dittmer et al. nicht aus, dass die Kooperation von Ets-1 und Sp1 durch andere Transkriptionsfaktoren inhibiert oder moduliert werden könnte [284].

### **Reprimierender Einfluss des Methyl-CpG bindenden Proteins (MBD) kann durch Sp1 nicht aufgehoben werden**

Zahlreiche Studien über methylierungsabhängig regulierte Gene zeigten, dass die Bindung der MBDs sowohl an methylierte als auch an unmethylierte Promotoren einen reprimierenden Effekt auf die Expression hat [287-289]. Beispielsweise bindet und reprimiert MBD1v1 die methylierten als auch die unmethylierten Promotoren der tumorassoziierten Gene CD44, Cyclin D2, GLIPR1 und PTEN in den untersuchten Zelllinien [287]. Außerdem wird mit Hilfe der HDAC3 das MBD1-Protein an das onkogene Fusionsprotein PML-RAR $\alpha$  (PML, Promyelotische Leukämie; RAR $\alpha$ , Retinosäurerezeptor alpha) rekrutiert, was eine konstitutive Unterdrückung der methylierten RAR- $\alpha$  regulierten Gene zur Folge hat [290, 291]. Ebenso wird die Promotoraktivität des methylierten Adhäsionsmoleküls E-Cadherin oder des methylierten Tumorsuppressorgens VHL (Von-Hippel-Landau) durch die MBD1-Bindung reprimiert [230]. Neben der Bindung an methylierte Promotoren besitzt MBD1 jedoch auch die Fähigkeit an unmethylierte Promotoren der MAGE-A Gene sowie des Metallothionin-I Gens zu binden und diese zu reprimieren [234, 288]. Vermittelt wird diese Eigenschaft des MBD1-Proteins durch das Vorhandensein einer dritten, zusätzlichen CXXC-Domäne (CXXC3) [230, 233]. Die durchgeführten Luciferase-Assays mit dem unmethylierten Reporterplasmid in den MCF-7, LCM1 und PCE1 Zelllinien zeigten einen deutlich reprimierenden Effekt auf den unmethylierten MAGE-A1-Promotor. Dies bestätigt, dass die CXXC3 Zink-Finger des MBD1 keine Sequenzspezifität besitzen und stattdessen *in vitro* an ein unmethyliertes CpG-Dinukleotid innerhalb der vorgegebenen Sequenz binden können [292]. Die durch MBD1v1-vermittelte Repression konnte weder durch Ets-1 noch durch Sp1 aufgehoben werden. Untersuchungen zu Ets-1 im Zusammenspiel mit MBD1v1 und MBD1v3 erfolgten bereits in MBD1-defizienten Mausfibroblasten und zeigten ähnliche Resultate [234]. Als eine erste Erklärungsmöglichkeit könnte die bevorzugte Bindung von CXXC3 des MBD1 an unmethylierte CpG-Dinukleotide dienen, welche sich auch innerhalb des Ets-1 Bindungsmotivs befinden. Folglich könnte Ets-1 durch die kompetitive Bindung von MBD1v1 verdrängt werden. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass das unmethylierte MAGE-A1 Reporterplasmid durch endogene DNMTs *de novo* methyliert wird. Dies erleichtert einerseits die Bindung von

MBD1v1 über seine Methyl-CpG Bindungsdomäne, andererseits würde das Ets-1 Bindungsmotiv methyliert werden und seine Bindung sterisch verhindern. Vor allem die mögliche *de novo* Methylierung des MAGE-A1 Promotorfragments kann durch die EMSA-Daten von Wischnewski et al. bestätigt werden. Diese zeigten, dass MBD1v1 an methylierte MAGE-A1 Fragmente binden kann [234].

Dass Sp1 die MBD1v1-vermittelte Repression des MAGE-A1-Promotors nicht aufheben konnte, kann durch die erstmals in dieser Arbeit nachgewiesene Ausbildung eines sekundären Komplexes zwischen Sp1 und MBD1v1 erklärt werden. Die Transkriptions-Repressordomäne (TRD) von MBD1v1 konnte an die N-terminale Region der HDAC3 binden und letztlich HDAC3 zum MAGE-A1-Promotor rekrutieren [291]. Folglich kann es zu einer dichter verpackten Chromatinstruktur kommen, welche die Bindung von Sp1 sterisch stört und die Genexpression inhibiert. Weiterhin ist bekannt, dass MBD1 zusammen mit MCAF (*MBD1-containing chromatin associated factor*) einen Repressionskomplex formiert, welcher möglicherweise die transaktivierende Kapazität des Sp1 unterbinden könnte [293].

Hinsichtlich der MAGE-A1-Aktivität wurde in dieser Arbeit auch der Einfluss von MBD2a auf die Genexpression analysiert. In Übereinstimmung mit zwei Studien von Wischnewski et al. und Fujita et al. konnte der epigenetische Faktor MBD2a den unmethylierten MAGE-A1-Promotor in den MCF-7, LCM1 und PCE1 Zelllinien stimulieren [234, 294]. Es ist bekannt, dass MBD2a keine Bindungsaffinität zu den MAGE-A-Promotoren besitzt. Deshalb könnte MBD2a als Ko-Faktor agieren, der die Promotoraktivierung ermöglicht [234]. Diesbezüglich stellten Fujita et al. ein Modell für Promotoren, welche ein „cAMP-response“ Element (CRE) besitzen, auf [294]. Dabei fungiert MBD2a als Koaktivator neben der RNA-Polymerase II und der RNA-Helikase A und tritt in direkten Kontakt mit dem TBP. In dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass MBD2b mit der C-terminalen Domäne des TBP interagiert. Nun stellt sich die Frage, ob diese Wechselwirkung die Aktivierung des MAGE-A1-Promotors begünstigen könnte. Boeke et al. zeigten bisher nur, dass MBD2b an methylierte Promotoren bindet, mit dem transkriptionellen Repressor Sin3A interagiert und eine transkriptionelle Repression vermittelt [246]. Inwiefern diese Beobachtung von MBD2b auf die Aktivierung oder Repression der MAGE-A-Promotoren übertragen werden kann, erfordert weitere Analysen.

#### **4.3 Funktionelle Untersuchungen zur Involvierung von BORIS in die Regulation von MAGE-A1**

Mit verschiedenen Assays sollte untersucht werden, ob BORIS tatsächlich ein Regulator der MAGE-A Gene ist. Dafür wurden zunächst die MAGE-A-negativen Zelllinien MCF-7, Du145, MDA-MB 231 sowie die mikrometastatischen Zelllinien für die transienten

Transfektionsexperimente ausgewählt. Es kann angenommen werden, dass ein methylierter Promotorstatus in diesen Zelllinien vorliegt. BORIS konnte die Promotoraktivität der methylierten MAGE-A Gene induzieren und die mRNA-Expression in den untersuchten Zelllinien stimulieren. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit anderen Studien [69, 81, 85] aber im Widerspruch zu publizierten funktionellen Studien von Kholmanskikh et al. sowie Woloszynska-Read et al. [83]. Beide Studien berichteten, dass die Expression von MAGE-A1 sowie anderer CTA-Genen (MAGE-A2, -A4, -B1, NY-ESO-1 sowie XAGE-1) in der Abwesenheit von BORIS in den untersuchten Melanom- und Ovarkrebszelllinien erfolgte. Selbst nach gesteigerter ektopischer Expression von BORIS als auch 4-wöchiger Inkubation mit dem Expressionsplasmid für BORIS wurde keine MAGE-A-Aktivierung beobachtet [83, 274]. Schließlich schlussfolgerten beide Gruppen, dass BORIS kein notwendiger Faktor für die Aktivierung dieser Gene im Melanom oder Ovarkrebs sei. Vielmehr seien andere Faktoren, die bisher noch nicht identifiziert sind, in die Aktivierung der CTA-Gene während der frühen männlichen Keimzellentwicklung involviert.

Um im weiteren Verlauf diesen stimulatorischen Effekt von BORIS auf das *Cancer-Testis* Antigene MAGE-A1 zu bestätigen, wurde die BORIS-Expression mit Hilfe einer BORIS-spezifischen shRNA in der mikrometastatischen Zelllinie des Brustkarzinoms gehemmt. Dabei zeigte sich ein nahezu vollständiger *knockdown* der BORIS-mRNA. Um eine ektopische Expression des BORIS Gens zu erzeugen, wurde in einem Parallelansatz das Expressionsplasmid für BORIS in die MAGE-A1-negativen BCM1 Zellen transfiziert. Damit sollte gezeigt werden, dass durch die BORIS Überexpression eine Aktivierung der MAGE-A Transkription ähnlich dem Effekt der Induktion mit Hilfe des Demethylierungagens Aza erfolgen kann. Die transfizierten Zellen wiesen infolge der exogenen Zugabe von BORIS einen 5-fachen Anstieg der MAGE-A1-Expression gegenüber den unbehandelten Zellen auf. Außerdem zeigte sich, dass durch den *knockdown* von BORIS auch die MAGE-A1-Expression reprimiert wurde. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass BORIS eine wichtige Rolle in der Aktivierung des MAGE-A1 Gens einnehmen kann. Die in dieser Arbeit beobachtete Aktivierung wird durch eine Studie an der Lungenkrebszelllinie H1299 bestätigt, in der mittels quantitativer RT-PCR der Einfluss von BORIS auf die Regulation der MAGE-A-Promotoren (MAGE-A1 bis -A4) untersucht wurde [295]. In einer weiteren Publikation wurde gezeigt, dass nach der Transfektion BORIS-spezifischer shRNA die Bindung von BORIS an den BAG-1-Promotor ausblieb und in einer geminderten BAG-1-Expression endete [87]. Parallel dazu wurden Änderungen der Signatur der an den BAG-1-Promotor gebundenen Histone beobachtet [87]. Denn schließlich agiert das BAG-Protein als Co-Chaperone und kann zelluläre Prozesse einschließlich Teilung, Migration, Differenzierung und *pro-survival* Signalwege beeinflussen [296, 297]. Weiterhin führten Untersuchungen in

der Brustkrebszelllinie MDA-MB 231 nach der Behandlung mit BORIS-spezifischer siRNA (*short interfering RNA*) zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der BORIS-Expression und gleichzeitig zur Induktion der Apoptose [298]. Basierend auf diesen Daten postulierten Dougherty et al., dass BORIS vermutlich auch eine kritische Rolle im Verlauf der Tumorprogression einnimmt, wobei die zugrunde liegenden apoptotischen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind [298].

Der Nachweis, dass BORIS die Expression der MAGE-A Transkripte stimulieren konnte, war von großer Bedeutung für die nachfolgenden Transfektionsassays. Aus diesem Grund galt nun das Interesse dem Zusammenspiel mit den Transkriptionsfaktoren Ets-1 und Sp1. Kang et al. beschrieben, dass BORIS in der Lage ist, Sp1 an den NY-ESO-1-Promotor zu rekrutieren und folglich dessen Re-Expression während der pulmonalen Karzinogenese zu vermitteln [84]. Ehe der Fokus auf den Transkriptionsfaktor Sp1 gelegt wurde, konnte sowohl auf mRNA-Ebene als auch mit Luciferase-Assays im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass BORIS zusammen mit Ets-1 die methylierten MAGE-A-Promotoren in den unterschiedlichen Zelllinien aktivieren konnte. Diese Daten lassen sich mit den Ergebnissen der durchgeführten Sequenzierungen der Bisulfit-behandelten DNA der MAGE-A-Promotoren erklären. Hierbei könnten die aufgetretenen Veränderungen des Methylierungsprofils an vereinzelt Ets-1-Bindungsstellen innerhalb des MAGE-A1-Promotors eine mögliche Ursache sein. Diese Daten werden durch die publizierte Studie von De Smet et al. unterstützt, welche darstellten, dass vor allem die Demethylierung der Ets-1-Bindungsstellen zu einer starken Induktion der Expression des MAGE-A1 Gens führen kann [58]. Zum anderen konnte in dieser Arbeit in den Protein-Protein-Interaktionsanalysen nachgewiesen werden, dass BORIS mit der C-terminalen, evolutionär konservierten Domäne des TBP interagiert. Diese Domäne tritt auch mit vielen anderen Transkriptionsfaktoren in Kontakt [299-301]. Daher ist es wahrscheinlich, dass die MAGE-A1 Promotoraktivität sowohl durch BORIS vermittelt wird, aber auch durch die Interaktion mit TBP unterstützt wird. Jedoch bedarf es weiterer Untersuchungen in Form von Luciferase-Assays, welche die direkte Interaktion von BORIS und TBP an der MAGE-A DNA veranschaulichen und möglicherweise in einer Stimulation des MAGE-A1-Promotors resultieren. So könnte der Mechanismus der transkriptionellen Aktivierung durch BORIS detaillierter nachvollzogen werden. Interessanterweise fanden keine oder nur geringe stimulatorische Effekte an den Promotoren statt wenn BORIS und Sp1 zusammen agierten. Dieses Ergebnis führte zur Hypothese, dass beide Faktoren möglicherweise um die gleiche Bindungsstelle am MAGE-A-Promotor konkurrieren. Dabei könnten sie sich gegenseitig so behindern, so dass die MAGE-A-Expression inhibiert wird.

### **Sp1 und BORIS binden *upstream* der Transkriptionsstartstelle des MAGE-A1-Promotors und konkurrieren möglicherweise um die gleiche Bindungsstelle**

Um die negative Regulation der MAGE-A-Expression durch BORIS und Sp1 besser verstehen zu können, wurde zunächst der Nachweis der spezifischen DNA-Bindung beider Faktoren an den MAGE-A1-Promotor mit Hilfe der rekombinanten Proteine im EMSA erbracht. Dabei zeigte sich, dass sowohl Sp1 als auch BORIS *upstream* der Transkriptionsstartstelle an den MAGE-A1-Promotor binden können. In der Literatur gab es in Bezug auf den MAGE-A1-Promotor bisher nur den Hinweis, dass BORIS *downstream* der Transkriptionsstartstelle in der Region +47 bis +183 bindet [69]. Eine publizierte Studie aus dem Jahr 2010 konnte die BORIS-Bindungsstelle am CST-Promotor (*cerebroside sulfotransferase*) identifizieren [80]. Da diese Bindungssequenz relativ ähnlich der Konsensussequenz von Sp1 ist, wurde vermutet, dass tatsächlich eine Konkurrenz zwischen BORIS und Sp1 am MAGE-A1-Promotor vorliegt. Mit Hilfe der durchgeführten Mutationsanalysen konnte die Bindungsstelle beider Faktoren am Promotor auf den Bereich -49 bis -43 *upstream* der Transkriptionsstartstelle eingegrenzt werden. Inwiefern eine mögliche Bindung beider Faktoren an dieselbe Bindungsstelle in dieser Region ein reprimierender Effekt am MAGE-A-Promotor verursacht wird, muss in funktionellen Analysen weiterführend betrachtet werden.

### **4.4 Untersuchungen der Änderungen des DNA-Methylierungsmusters durch BORIS oder Aza**

Der stimulatorische Effekt auf die MAGE-A-Expression durch BORIS war im Vergleich zum Demethylierungagens Aza etwas schwächer. Es stellte sich deshalb die Frage, welchen Einfluss BORIS und Aza auf das Methylierungsmuster der MAGE-A-Promotoren haben kann. Aus diesem Grund wurden die Sequenzierungen der Bisulfit-behandelten genomischen DNA der MAGE-A-Promotoren (A1 und A2) untersucht. Die Ergebnisse der Methylierungsprofile der jeweiligen Promotoren wurden mit der entsprechenden Genexpression verglichen. Dabei zeigte sich eine Übereinstimmung zwischen dem Methylierungsmuster der MAGE-A-Promotoren und ihrer Expression in den unbehandelten Zellen. Die MAGE-A1 und -A2 Gene in den unbehandelten Zellen waren so stark methyliert, was durch die fehlende Expression unterstützt wird. Studien zeigten, dass CpGs, die sich in dem regulatorischen Bereich eines Gens befinden, demethyliert werden müssen, um den Promotor für den generellen Transkriptionsapparat und die Transkriptionsfaktoren zugänglich machen zu können [57, 269, 302-304]. Daher konnte angenommen werden, dass die Methylierung nach der BORIS- oder Aza-Behandlung abnehmen würde. Jedoch konnte in beiden Fällen keine signifikante Promotordemethylierung festgestellt werden. Vielmehr zeigte sich auf zellulärer Ebene eine äußerst heterogene und somit eher zufällige Demethylierung in den untersuchten



Promotorbereichen. Eine mögliche Ursache für das beobachtete heterogene Methylierungsmuster nach Aza-Behandlung könnte die Unempfindlichkeit einzelner Zellen gegenüber Aza sein. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Zellen aufgrund ihrer normalen Heterogenität das Demethylierungsgenz Aza beziehungsweise das transfizierte Expressionsplasmid für BORIS unterschiedlich aufgenommen haben. Die Ergebnisse dieser Arbeit stimmen mit den Studien sowohl von De Smet et al., Vatolin et al. als auch Kholmanskikh et al. überein, welche ebenfalls ein heterogenes DNA-Methylierungsmuster des MAGE-A1-Promotors nach Aza-Behandlung beziehungsweise ektopischer Expression von BORIS zeigten [83, 269]. Die auch in dieser Arbeit gezeigte schwach verringerte Methylierung der Promotoren vor allem nach ektopischer Expression von BORIS deutet daraufhin, dass die CpGs, welche für die MAGE-A1 Transkription von Bedeutung sind, methyliert bleiben. Auch die Demethylierung einzelner CpG-Dinukleotide konnte den transkriptionellen Status von MAGE-A1 nicht beeinflussen. Im Hinblick auf die Ets-1-Bindungsstellen im MAGE-A1-Promotor konnte die Studie von Suyama auch keinen direkten Zusammenhang zwischen der DNA-Demethylierung und der transkriptionellen Aktivität finden [305]. Die Gruppe um Bhan et al. zeigte nach der Transfektion und Induktion von BORIS für den MAGE-A3-Promotor eine Demethylierung [295]. Jedoch beobachteten sie im Falle von MAGE-A2 und -A4 ebenfalls keine Änderung in der Promotormethylierung. Diese und auch die Ergebnisse dieser Arbeit lassen somit die Vermutung zu, dass BORIS *die Cancer-Testis* Antigenexpression sowohl in einem methylierungsabhängigen als auch -unabhängigen Mechanismus regulieren kann. Es muss jedoch auch davon ausgegangen werden, dass die zum Teil unterschiedlichen Studienergebnisse auf der Analyse unterschiedlicher Zelllinien beruhen, die sich in der intrazellulären Ausstattung unterscheiden [306]. Um ein statistisch präziseres Bild des Methylierungsmusters der Promotoren in den Zellen einer Zelllinie zu erhalten, müssten zudem mehr Klone untersucht werden [306]. Zusammenfassend konnte in Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass BORIS keinen direkten molekularen Einfluss auf den epigenetischen Mechanismus der DNA-Methylierung hat.

#### **4.5 Einfluss von BORIS auf die Modifikationen der am MAGE-A1-Promotor gebundenen Histone**

Um Informationen über den Einfluss von BORIS auf den epigenetischen Mechanismus der Modifikationen der am MAGE-A1-Promotor gebundenen Histone zu erhalten, wurden Chromatin-Immünpräzipitations Assays durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass BORIS ebenfalls keinen Einfluss auf die Modifikationen der am MAGE-A1-Promotor gebundenen Histone hat. Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen stellten Bhan et al. fest, dass in der Lungenkrebszelllinie A549 nach BORIS-Induktion eine positive Regulation

von MAGE-A1 bis -A4 erfolgte. Neben einer gesteigerten *Cancer-Testis* Antigenexpression konnten auch aktivierende Modifikationen an den MAGE-A-Promotoren gebundenen Histonen nachgewiesen werden [295]. Vergleichende Analysen wurden mit Aza und/oder TSA in der MCF-7 Zelllinie durchgeführt. Nach der TSA-Behandlung konnte vor allem eine Anreicherung des acetylierten H3K9 am MAGE-A1-Promotor beobachtet werden, welches vorher in der unbehandelten Zelllinie nicht vorlag. Diese Beobachtung bestätigt die Funktion von TSA, da einerseits die Deacetylierung der Lysinseitenketten gehemmt wird und andererseits die acetylierten Histone, die in den Bereichen aktivierter Gene binden können, vermehrt werden. Warum für das acetylierte H4K8 keine Anreicherung erfolgte, kann nicht erklärt werden. Auch nach der Aza-Behandlung erfolgte nur eine geringe Veränderung der Histonmodifikationen am MAGE-A1-Promotor. Jedoch konnte nach der Behandlung mit beiden Agenzien eine Anreicherung der DNA von acetyliertem H3K9 und H4K8 sowie H3K9me und H3K4me2 beobachtet werden. Mit Ausnahme von H3K9me wurden diese Histonmodifikationen im Zusammenhang mit aktiver Transkription beschrieben [270, 307]. Für die weiteren Modifikationen, wie das trimethylierte H3K4 sowie mono-, di- und trimethylierte H4K20 wurde keine Anreicherung am MAGE-A1-Promotor gefunden.

#### **4.6 Allgemeine Schlussfolgerung**

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit eine Aktivierung von BORIS auf die MAGE-A-Promotoren gezeigt werden. Die *in vitro* als auch *in vivo* Daten veranschaulichen, dass es sich um ein sehr komplexes Zusammenspiel der verschiedenen Faktoren (epigenetische Faktoren, Transkriptionsfaktoren und der Komponente des generellen Transkriptionsapparates TBP) in der Regulation der MAGE-A Genexpression handelt. Um jedoch die grundlegenden Mechanismen und die Bedeutung der *Cancer-Testis* Antigene in den Krebszellen, vor allem den mikrometastatischen Zellen, besser verstehen zu können, sind weitergehende funktionelle Untersuchungen nötig.

#### **4.7 Ausblick**

Um den Einfluss und die Rolle von BORIS auf die MAGE-A-Promotoren in den verschiedenen Tumorentitäten noch besser verstehen zu können, sind weitere molekularbiologische Untersuchungen notwendig.

Eine wichtige Voraussetzung hierfür ist die Generierung von verschiedenen Modellsystemen. So könnte durch die Überexpression des BORIS-Proteins in einer

defizienten oder BORIS-schwach-exprimierenden Zelllinie (MCF-7) die Funktion des epigenetischen Faktors BORIS näher untersucht werden. Mit Hilfe der siRNA-Technologie könnte sowohl die endogene Sp1-, Ets-1 als auch BORIS-Expression in den entsprechend exprimierenden Zelllinien gemindert werden. Somit könnte das Zusammenwirken der verschiedenen Faktoren an den MAGE-A-Promotoren oder der generelle Einfluss von BORIS auf die anderen Faktoren in *in vitro* Assays noch zielgerichteter untersucht werden.

Anhand der nachgewiesenen Interaktionen zwischen der Komponente des generellen Transkriptionsapparates TBP und MBD2b beziehungsweise BORIS wäre es auch von großem Interesse, wie diese Interaktionen die MAGE-A-Promotoren stimulieren könnten. Kombinationen aus Luciferase-Assays, mRNA-Expressionsstudien oder EMSAs könnten dazu beitragen, die Stimulation im Detail aufzuklären.

Bisher wird BORIS nur als stimulatorischer Faktor der MAGE-A1- und NY-ESO-1-Expression diskutiert [69, 81]. Eine Möglichkeit bietet sich darin, Mikroarray-Experimente und bioinformatische Analysen durchzuführen, welche eventuell einen Einblick von BORIS in die Aktivierung von weiteren Genen geben, die eine Rolle in der Tumorgenese spielen.

Eine weitere wichtige Frage ist die Repression der BORIS-vermittelten MAGE-A-Aktivierung durch Sp1. Erste Mutationsanalysen im EMSA deuten auf eine Konkurrenz beider Faktoren um dieselbe Bindungsstelle innerhalb des Promotors hin. Für eine Definition der spezifischen Bindungsstelle beider Faktoren bieten sich *footprint*-Analysen oder zielgerichtete Punktmutationen in einem MAGE-A1 Reporterplasmid an.

Um weitere Interaktionspartner des BORIS-Proteins und somit mögliche Ko-Aktivatoren beziehungsweise -Repressoren identifizieren zu können, ist ein HaloLink™ Resin basierender *Pulldown*-Assay unerlässlich. Mit Hilfe der HaloTag®-Technologie, die sowohl in Zellen als auch im zellfreien System erfolgen kann, sollte BORIS als Fusionsprotein mit einem Protein-Tag exprimiert werden. Hierfür müsste zunächst die BORIS Sequenz in den HaloTag® Expressionsvektor („bait“-Fusionsprotein) kloniert und anschließend in die gewünschte Zelllinie transfiziert werden. Daraufhin könnte das HaloTag®-*bait*-Fusionsprotein (BORIS) mit endogenem *prey*-Protein interagieren, welches mittels Western Blot oder Massenspektrometrie identifiziert werden müsste.

Die bereits im Verlauf dieser Arbeit begonnenen immunhistologischen Färbungen an gesunden Geweben könnten auf maligne Gewebe (beispielsweise der Prostata) ausgeweitet werden, da es bisher nur Untersuchungen zur aberranten BORIS-Expression in der Lunge [81], der Brust [82] und dem Melanom [83] gibt. Hierfür könnten verschiedene Gewebearrays verwendet werden. Hier besteht die Möglichkeit der Tendenzenerkennung, die dann detailliert für den jeweiligen Gewebetyp untersucht

werden müssten. Um jedoch die BORIS-Expression in den unterschiedlichen Tumoren besser analysieren zu können, ist es unabdingbar, dass BORIS-spezifische, polyklonale Antikörper generiert werden. Die bisherigen kommerziellen Antikörper erwiesen sich als nicht zuverlässig.

## 5 Literaturverzeichnis

1. Wischnewski, F., Pantel, K., and Schwarzenbach, H. (2006). Promoter demethylation and histone acetylation mediate gene expression of MAGE-A1, -A2, -A3, and -A12 in human cancer cells. *Mol Cancer Res* 4, 339-349.
2. Robert-Koch-Institut (2010). Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends
3. Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
4. Nabeshima, K., Inoue, T., Shima, Y., and Sameshima, T. (2002). Matrix metalloproteinases in tumor invasion: role for cell migration. *Pathol Int* 52, 255-264.
5. Salon, C., Lantuejoul, S., Eymin, B., Gazeri, S., Brambilla, C., and Brambilla, E. (2005). The E-cadherin-beta-catenin complex and its implication in lung cancer progression and prognosis. *Future Oncol* 1, 649-660.
6. Pantel, K., and Brakenhoff, R.H. (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer* 4, 448-456.
7. Comen, E., Norton, L., and Massague, J. (2011). Clinical implications of cancer self-seeding. *Nat Rev Clin Oncol* 8, 369-377.
8. Nguyen, D.X., Bos, P.D., and Massague, J. (2009). Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 9, 274-284.
9. Pantel, K., Dickmanns, A., Zippelius, A., Klein, C., Shi, J., Hoechtlen-Vollmar, W., Schlimok, G., Weckermann, D., Oberneder, R., Fanning, E., et al. (1995). Establishment of micrometastatic carcinoma cell lines: a novel source of tumor cell vaccines. *J Natl Cancer Inst* 87, 1162-1168.
10. Putz, E., Witter, K., Offner, S., Stosiek, P., Zippelius, A., Johnson, J., Zahn, R., Riethmuller, G., and Pantel, K. (1999). Phenotypic characteristics of cell lines derived from disseminated cancer cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors: establishment of working models for human micrometastases. *Cancer Res* 59, 241-248.
11. Solakoglu, O., Maierhofer, C., Lahr, G., Breit, E., Scheunemann, P., Heumos, I., Pichlmeier, U., Schlimok, G., Oberneder, R., Kollermann, M.W., et al. (2002). Heterogeneous proliferative potential of occult metastatic cells in bone marrow of patients with solid epithelial tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2246-2251.
12. Bartkowiak, K., Wieczorek, M., Buck, F., Harder, S., Moldenhauer, J., Effenberger, K.E., Pantel, K., Peter-Katalinic, J., and Brandt, B.H. (2009). Two-dimensional differential gel electrophoresis of a cell line derived from a breast cancer micrometastasis revealed a stem/progenitor cell protein profile. *J Proteome Res* 8, 2004-2014.
13. Ehrlich, P. (1909). Über den jetzigen Stand der Karzinomforschung. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 5, 273-290.
14. Burnet, F.M. (1970). The concept of immunological surveillance. *Prog Exp Tumor Res* 13, 1-27.
15. Thomas, L. (1959). Discussion of cellular and humoral aspects of the hypersensitive states. H.S. Lawrence, ed. (New York: Hoeber-Harper).
16. Kaplan, D.H., Shankaran, V., Dighe, A.S., Stockert, E., Aguet, M., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (1998). Demonstration of an interferon gamma-dependent

- tumor surveillance system in immunocompetent mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7556-7561.
17. Darnell, R.B., and Posner, J.B. (2003). Observing the invisible: successful tumor immunity in humans. *Nat Immunol* 4, 201.
  18. Dunn, G.P., Bruce, A.T., Ikeda, H., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2002). Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol* 3, 991-998.
  19. Shankaran, V., Ikeda, H., Bruce, A.T., White, J.M., Swanson, P.E., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2001). IFN $\gamma$  and lymphocytes prevent primary tumour development and shape tumour immunogenicity. *Nature* 410, 1107-1111.
  20. Dunn, G.P., Old, L.J., and Schreiber, R.D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol* 22, 329-360.
  21. De Plaen, E., Arden, K., Traversari, C., Gaforio, J.J., Szikora, J.P., De Smet, C., Brasseur, F., van der Bruggen, P., Lethe, B., Lurquin, C., et al. (1994). Structure, chromosomal localization, and expression of 12 genes of the MAGE family. *Immunogenetics* 40, 360-369.
  22. Zendman, A.J., Ruiter, D.J., and Van Muijen, G.N. (2003). Cancer/testis-associated genes: identification, expression profile, and putative function. *J Cell Physiol* 194, 272-288.
  23. Scanlan, M.J., Gure, A.O., Jungbluth, A.A., Old, L.J., and Chen, Y.T. (2002). Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol Rev* 188, 22-32.
  24. van der Bruggen, P., Traversari, C., Chomez, P., Lurquin, C., De Plaen, E., Van den Eynde, B., Knuth, A., and Boon, T. (1991). A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science* 254, 1643-1647.
  25. Kalejs, M., and Erenpreisa, J. (2005). Cancer/testis antigens and gametogenesis: a review and "brain-storming" session. *Cancer Cell Int* 5, 4.
  26. Simpson, A.J., Caballero, O.L., Jungbluth, A., Chen, Y.T., and Old, L.J. (2005). Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer. *Nat Rev Cancer* 5, 615-625.
  27. Karp, G. (2005). *Molekulare Zellbiologie. Springer 4. Auflage*, 888-894.
  28. Feng, Y., Gao, J., and Yang, M. (2011). When MAGE meets RING: insights into biological functions of MAGE proteins. *Protein Cell* 2, 7-12.
  29. Barker, P.A., and Salehi, A. (2002). The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *J Neurosci Res* 67, 705-712.
  30. Rogner, U.C., Wilke, K., Steck, E., Korn, B., and Poustka, A. (1995). The melanoma antigen gene (MAGE) family is clustered in the chromosomal band Xq28. *Genomics* 29, 725-731.
  31. Lurquin, C., De Smet, C., Brasseur, F., Muscatelli, F., Martelange, V., De Plaen, E., Brasseur, R., Monaco, A.P., and Boon, T. (1997). Two members of the human MAGEB gene family located in Xp21.3 are expressed in tumors of various histological origins. *Genomics* 46, 397-408.
  32. Lucas, S., De Plaen, E., and Boon, T. (2000). MAGE-B5, MAGE-B6, MAGE-C2, and MAGE-C3: four new members of the MAGE family with tumor-specific expression. *Int J Cancer* 87, 55-60.
  33. Lucas, S., De Smet, C., Arden, K.C., Viars, C.S., Lethe, B., Lurquin, C., and Boon, T. (1998). Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. *Cancer Res* 58, 743-752.

34. Ohman Forslund, K., and Nordqvist, K. (2001). The melanoma antigen genes—any clues to their functions in normal tissues? *Exp Cell Res* 265, 185-194.
35. Takahashi, K., Shichijo, S., Noguchi, M., Hirohata, M., and Itoh, K. (1995). Identification of MAGE-1 and MAGE-4 proteins in spermatogonia and primary spermatocytes of testis. *Cancer Res* 55, 3478-3482.
36. Jungbluth, A.A., Silva, W.A., Jr., Iversen, K., Frosina, D., Zaidi, B., Coplan, K., Eastlake-Wade, S.K., Castelli, S.B., Spagnoli, G.C., Old, L.J., et al. (2007). Expression of cancer-testis (CT) antigens in placenta. *Cancer Immun* 7, 15.
37. Itoh, K., Hayashi, A., Nakao, M., Hoshino, T., Seki, N., and Shichijo, S. (1996). Human tumor rejection antigens MAGE. *J Biochem* 119, 385-390.
38. Patard, J.J., Brasseur, F., Gil-Diez, S., Radvanyi, F., Marchand, M., Francois, P., Abi-Aad, A., Van Cangh, P., Abbou, C.C., Chopin, D., et al. (1995). Expression of MAGE genes in transitional-cell carcinomas of the urinary bladder. *Int J Cancer* 64, 60-64.
39. Russo, V., Traversari, C., Verrecchia, A., Mottolese, M., Natali, P.G., and Bordignon, C. (1995). Expression of the MAGE gene family in primary and metastatic human breast cancer: implications for tumor antigen-specific immunotherapy. *Int J Cancer* 64, 216-221.
40. Otte, M., Zafrakas, M., Riethdorf, L., Pichlmeier, U., Loning, T., Janicke, F., and Pantel, K. (2001). MAGE-A gene expression pattern in primary breast cancer. *Cancer Res* 61, 6682-6687.
41. Eura, M., Ogi, K., Chikamatsu, K., Lee, K.D., Nakano, K., Masuyama, K., Itoh, K., and Ishikawa, T. (1995). Expression of the MAGE gene family in human head-and-neck squamous-cell carcinomas. *Int J Cancer* 64, 304-308.
42. Yamashita, N., Ishibashi, H., Hayashida, K., Kudo, J., Takenaka, K., Itoh, K., and Niho, Y. (1996). High frequency of the MAGE-1 gene expression in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 24, 1437-1440.
43. Shichijo, S., Hayashi, A., Takamori, S., Tsunosue, R., Hoshino, T., Sakata, M., Kuramoto, T., Oizumi, K., and Itoh, K. (1995). Detection of MAGE-4 protein in lung cancers. *Int J Cancer* 64, 158-165.
44. Van den Eynde, B.J., and van der Bruggen, P. (1997). T cell defined tumor antigens. *Curr Opin Immunol* 9, 684-693.
45. Corrias, M.V., Scaruffi, P., Occhino, M., De Bernardi, B., Tonini, G.P., and Pistoia, V. (1996). Expression of MAGE-1, MAGE-3 and MART-1 genes in neuroblastoma. *Int J Cancer* 69, 403-407.
46. Toh, Y., Yamana, H., Shichijo, S., Fujita, H., Tou, U., Sakaguchi, M., Kakegawa, T., and Itoh, K. (1995). Expression of MAGE-1 gene by esophageal carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 86, 714-717.
47. Gillespie, A.M., Rodgers, S., Wilson, A.P., Tidy, J., Rees, R.C., Coleman, R.E., and Murray, A.K. (1998). MAGE, BAGE and GAGE: tumour antigen expression in benign and malignant ovarian tissue. *Br J Cancer* 78, 816-821.
48. Kufer, P., Zippelius, A., Lutterbuse, R., Mecklenburg, I., Enzmann, T., Montag, A., Weckermann, D., Passlick, B., Prang, N., Reichardt, P., et al. (2002). Heterogeneous expression of MAGE-A genes in occult disseminated tumor cells: a novel multimarker reverse transcription-polymerase chain reaction for diagnosis of micrometastatic disease. *Cancer Res* 62, 251-261.
49. De Smet, C., Lurquin, C., van der Bruggen, P., De Plaen, E., Brasseur, F., and Boon, T. (1994). Sequence and expression pattern of the human MAGE2 gene. *Immunogenetics* 39, 121-129.

50. Artamonova, I., and Gelfand, M.S. (2004). Evolution of the exon-intron structure and alternative splicing of the MAGE-A family of cancer/testis antigens. *J Mol Evol* **59**, 620-631.
51. Rimoldi, D., Salvi, S., Reed, D., Coulie, P., Jongeneel, V.C., De Plaen, E., Brasseur, F., Rodriguez, A.M., Boon, T., and Cerottini, J.C. (1999). cDNA and protein characterization of human MAGE-10. *Int J Cancer* **82**, 901-907.
52. De Plaen, E., Naerhuyzen, B., De Smet, C., Szikora, J.P., and Boon, T. (1997). Alternative promoters of gene MAGE4a. *Genomics* **40**, 305-313.
53. Laduron, S., Deplus, R., Zhou, S., Kholmanskikh, O., Godelaine, D., De Smet, C., Hayward, S.D., Fuks, F., Boon, T., and De Plaen, E. (2004). MAGE-A1 interacts with adaptor SKIP and the deacetylase HDAC1 to repress transcription. *Nucleic Acids Res* **32**, 4340-4350.
54. Nagao, T., Higashitsuji, H., Nonoguchi, K., Sakurai, T., Dawson, S., Mayer, R.J., Itoh, K., and Fujita, J. (2003). MAGE-A4 interacts with the liver oncoprotein gankyrin and suppresses its tumorigenic activity. *J Biol Chem* **278**, 10668-10674.
55. Yang, B., O'Herrin, S.M., Wu, J., Reagan-Shaw, S., Ma, Y., Bhat, K.M., Gravekamp, C., Setaluri, V., Peters, N., Hoffmann, F.M., et al. (2007). MAGE-A, mMage-b, and MAGE-C proteins form complexes with KAP1 and suppress p53-dependent apoptosis in MAGE-positive cell lines. *Cancer Res* **67**, 9954-9962.
56. Bai, S., He, B., and Wilson, E.M. (2005). Melanoma antigen gene protein MAGE-11 regulates androgen receptor function by modulating the interdomain interaction. *Mol Cell Biol* **25**, 1238-1257.
57. De Smet, C., De Backer, O., Faraoni, I., Lurquin, C., Brasseur, F., and Boon, T. (1996). The activation of human gene MAGE-1 in tumor cells is correlated with genome-wide demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 7149-7153.
58. De Smet, C., Courtois, S.J., Faraoni, I., Lurquin, C., Szikora, J.P., De Backer, O., and Boon, T. (1995). Involvement of two Ets binding sites in the transcriptional activation of the MAGE1 gene. *Immunogenetics* **42**, 282-290.
59. Weber, J., Salgaller, M., Samid, D., Johnson, B., Herlyn, M., Lassam, N., Treisman, J., and Rosenberg, S.A. (1994). Expression of the MAGE-1 tumor antigen is up-regulated by the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Res* **54**, 1766-1771.
60. Fiszer, D., and Kurpisz, M. (1998). Major histocompatibility complex expression on human, male germ cells: a review. *Am J Reprod Immunol* **40**, 172-176.
61. Gillespie, A.M., and Coleman, R.E. (1999). The potential of melanoma antigen expression in cancer therapy. *Cancer Treat Rev* **25**, 219-227.
62. Thurner, B., Haendle, I., Roder, C., Dieckmann, D., Keikavoussi, P., Jonuleit, H., Bender, A., Maczek, C., Schreiner, D., von den Driesch, P., et al. (1999). Vaccination with mage-3A1 peptide-pulsed mature, monocyte-derived dendritic cells expands specific cytotoxic T cells and induces regression of some metastases in advanced stage IV melanoma. *J Exp Med* **190**, 1669-1678.
63. Toh, H.C., Wang, W.W., Chia, W.K., Kvistborg, P., Sun, L., Teo, K., Phoon, Y.P., Soe, Y., Tan, S.H., Hee, S.W., et al. (2009). Clinical Benefit of Allogeneic Melanoma Cell Lysate-Pulsed Autologous Dendritic Cell Vaccine in MAGE-Positive Colorectal Cancer Patients. *Clin Cancer Res* **15**, 7726-7736.
64. Sadanaga, N., Nagashima, H., Mashino, K., Tahara, K., Yamaguchi, H., Ohta, M., Fujie, T., Tanaka, F., Inoue, H., Takesako, K., et al. (2001). Dendritic cell



- vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res* 7, 2277-2284.
65. Marchand, M., Punt, C.J., Aamdal, S., Escudier, B., Kruit, W.H., Keilholz, U., Hakansson, L., van Baren, N., Humblet, Y., Mulders, P., et al. (2003). Immunisation of metastatic cancer patients with MAGE-3 protein combined with adjuvant SBAS-2: a clinical report. *Eur J Cancer* 39, 70-77.
  66. Marchand, M., van Baren, N., Weynants, P., Brichard, V., Dreno, B., Tessier, M.H., Rankin, E., Parmiani, G., Arienti, F., Humblet, Y., et al. (1999). Tumor regressions observed in patients with metastatic melanoma treated with an antigenic peptide encoded by gene MAGE-3 and presented by HLA-A1. *Int J Cancer* 80, 219-230.
  67. Coulie, P.G., Karanikas, V., Colau, D., Lurquin, C., Landry, C., Marchand, M., Dorval, T., Brichard, V., and Boon, T. (2001). A monoclonal cytolytic T-lymphocyte response observed in a melanoma patient vaccinated with a tumor-specific antigenic peptide encoded by gene MAGE-3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 10290-10295.
  68. Loukinov, D.I., Pugacheva, E., Vatolin, S., Pack, S.D., Moon, H., Chernukhin, I., Mannan, P., Larsson, E., Kanduri, C., Vostrov, A.A., et al. (2002). BORIS, a novel male germ-line-specific protein associated with epigenetic reprogramming events, shares the same 11-zinc-finger domain with CTCF, the insulator protein involved in reading imprinting marks in the soma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6806-6811.
  69. Vatolin, S., Abdullaev, Z., Pack, S.D., Flanagan, P.T., Custer, M., Loukinov, D.I., Pugacheva, E., Hong, J.A., Morse, H., 3rd, Schrupp, D.S., et al. (2005). Conditional expression of the CTCF-paralogous transcriptional factor BORIS in normal cells results in demethylation and derepression of MAGE-A1 and reactivation of other cancer-testis genes. *Cancer Res* 65, 7751-7762.
  70. Phillips, J.E., and Corces, V.G. (2009). CTCF: master weaver of the genome. *Cell* 137, 1194-1211.
  71. Hore, T.A., Deakin, J.E., and Marshall Graves, J.A. (2008). The evolution of epigenetic regulators CTCF and BORIS/CTCF in amniotes. *PLoS Genet* 4, e1000169.
  72. Klenova, E.M., Morse, H.C., 3rd, Ohlsson, R., and Lobanenko, V.V. (2002). The novel BORIS + CTCF gene family is uniquely involved in the epigenetics of normal biology and cancer. *Semin Cancer Biol* 12, 399-414.
  73. Ghochikyan, A., Mkrtychyan, M., Loukinov, D., Mamikonyan, G., Pack, S.D., Movsesyan, N., Ichim, T.E., Cribbs, D.H., Lobanenko, V.V., and Agadjanyan, M.G. (2007). Elicitation of T cell responses to histologically unrelated tumors by immunization with the novel cancer-testis antigen, brother of the regulator of imprinted sites. *J Immunol* 178, 566-573.
  74. Mkrtychyan, M., Ghochikyan, A., Loukinov, D., Davtyan, H., Ichim, T.E., Cribbs, D.H., Lobanenko, V.V., and Agadjanyan, M.G. (2008). DNA, but not protein vaccine based on mutated BORIS antigen significantly inhibits tumor growth and prolongs the survival of mice. *Gene Ther* 15, 61-64.
  75. Loukinov, D., Ghochikyan, A., Mkrtychyan, M., Ichim, T.E., Lobanenko, V.V., Cribbs, D.H., and Agadjanyan, M.G. (2006). Antitumor efficacy of DNA vaccination to the epigenetically acting tumor promoting transcription factor BORIS and CD80 molecular adjuvant. *J Cell Biochem* 98, 1037-1043.
  76. Pugacheva, E.M., Suzuki, T., Pack, S.D., Kosaka-Suzuki, N., Yoon, J., Vostrov, A.A., Barsov, E., Strunnikov, A.V., Morse, H.C., 3rd, Loukinov, D., et

- al. (2010). The structural complexity of the human BORIS gene in gametogenesis and cancer. *PLoS One* 5, e13872.
77. Renaud, S., Pugacheva, E.M., Delgado, M.D., Braunschweig, R., Abdullaev, Z., Loukinov, D., Benhattar, J., and Lobanenkov, V. (2007). Expression of the CTCF-paralogous cancer-testis gene, brother of the regulator of imprinted sites (BORIS), is regulated by three alternative promoters modulated by CpG methylation and by CTCF and p53 transcription factors. *Nucleic Acids Res* 35, 7372-7388.
  78. Hoffmann, M.J., Muller, M., Engers, R., and Schulz, W.A. (2006). Epigenetic control of CTCFL/BORIS and OCT4 expression in urogenital malignancies. *Biochem Pharmacol* 72, 1577-1588.
  79. Woloszynska-Read, A., James, S.R., Link, P.A., Yu, J., Odunsi, K., and Karpf, A.R. (2007). DNA methylation-dependent regulation of BORIS/CTCF expression in ovarian cancer. *Cancer Immun* 7, 21.
  80. Suzuki, T., Kosaka-Suzuki, N., Pack, S., Shin, D.M., Yoon, J., Abdullaev, Z., Pugacheva, E., Morse, H.C., 3rd, Loukinov, D., and Lobanenkov, V. (2010). Expression of a testis-specific form of Gal3st1 (CST), a gene essential for spermatogenesis, is regulated by the CTCF paralogous gene BORIS. *Mol Cell Biol* 30, 2473-2484.
  81. Hong, J.A., Kang, Y., Abdullaev, Z., Flanagan, P.T., Pack, S.D., Fischette, M.R., Adnani, M.T., Loukinov, D.I., Vatolin, S., Risinger, J.I., et al. (2005). Reciprocal binding of CTCF and BORIS to the NY-ESO-1 promoter coincides with derepression of this cancer-testis gene in lung cancer cells. *Cancer Res* 65, 7763-7774.
  82. D'Arcy, V., Abdullaev, Z.K., Pore, N., Docquier, F., Torrano, V., Chernukhin, I., Smart, M., Farrar, D., Metodiev, M., Fernandez, N., et al. (2006). The potential of BORIS detected in the leukocytes of breast cancer patients as an early marker of tumorigenesis. *Clin Cancer Res* 12, 5978-5986.
  83. Kholmanskikh, O., Lorient, A., Brasseur, F., De Plaen, E., and De Smet, C. (2008). Expression of BORIS in melanoma: lack of association with MAGE-A1 activation. *Int J Cancer* 122, 777-784.
  84. Kang, Y., Hong, J.A., Chen, G.A., Nguyen, D.M., and Schrupp, D.S. (2007). Dynamic transcriptional regulatory complexes including BORIS, CTCF and Sp1 modulate NY-ESO-1 expression in lung cancer cells. *Oncogene* 26, 4394-4403.
  85. Kouprina, N., Noskov, V.N., Pavlicek, A., Collins, N.K., Schoppee Bortz, P.D., Ottolenghi, C., Loukinov, D., Goldsmith, P., Risinger, J.I., Kim, J.H., et al. (2007). Evolutionary diversification of SPANX-N sperm protein gene structure and expression. *PLoS One* 2, e359.
  86. Kosaka-Suzuki, N., Suzuki, T., Pugacheva, E.M., Vostrov, A.A., Morse, H.C., 3rd, Loukinov, D., and Lobanenkov, V. (2011). Transcription factor BORIS (brother of the regulator of imprinted sites) directly induces expression of a cancer-testis antigen, TSP50, through regulated binding of BORIS to the promoter. *J Biol Chem*.
  87. Sun, L., Huang, L., Nguyen, P., Bisht, K.S., Bar-Sela, G., Ho, A.S., Bradbury, C.M., Yu, W., Cui, H., Lee, S., et al. (2008). DNA methyltransferase 1 and 3B activate BAG-1 expression via recruitment of CTCFL/BORIS and modulation of promoter histone methylation. *Cancer Res* 68, 2726-2735.
  88. Nguyen, P., Bar-Sela, G., Sun, L., Bisht, K.S., Cui, H., Kohn, E., Feinberg, A.P., and Gius, D. (2008). BAT3 and SET1A form a complex with

- CTCF/BORIS to modulate H3K4 histone dimethylation and gene expression. *Mol Cell Biol* 28, 6720-6729.
89. Nguyen, P., Cui, H., Bisht, K.S., Sun, L., Patel, K., Lee, R.S., Kugoh, H., Oshimura, M., Feinberg, A.P., and Gius, D. (2008). CTCF/BORIS is a methylation-independent DNA-binding protein that preferentially binds to the paternal H19 differentially methylated region. *Cancer Res* 68, 5546-5551.
  90. Jelinic, P., Stehle, J.C., and Shaw, P. (2006). The testis-specific factor CTCF cooperates with the protein methyltransferase PRMT7 in H19 imprinting control region methylation. *PLoS Biol* 4, e355.
  91. Munk, K. (2001). *Genetik. Spektrum Lehrbuch*.
  92. Sikorski, T.W., and Buratowski, S. (2009). The basal initiation machinery: beyond the general transcription factors. *Curr Opin Cell Biol* 21, 344-351.
  93. Roeder, R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends Biochem Sci* 21, 327-335.
  94. Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P.A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56, 549-561.
  95. Albright, S.R., and Tjian, R. (2000). TAFs revisited: more data reveal new twists and confirm old ideas. *Gene* 242, 1-13.
  96. Pugh, B.F. (2000). Control of gene expression through regulation of the TATA-binding protein. *Gene* 255, 1-14.
  97. Burley, S.K., and Roeder, R.G. (1996). Biochemistry and structural biology of transcription factor IID (TFIID). *Annu Rev Biochem* 65, 769-799.
  98. Hernandez, N. (1993). TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev* 7, 1291-1308.
  99. Peterson, M.G., Tanese, N., Pugh, B.F., and Tjian, R. (1990). Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding protein. *Science* 248, 1625-1630.
  100. Leresche, A., Wolf, V.J., and Gottesfeld, J.M. (1996). Repression of RNA polymerase II and III transcription during M phase of the cell cycle. *Exp Cell Res* 229, 282-288.
  101. Chibazakura, T., Watanabe, F., Kitajima, S., Tsukada, K., Yasukochi, Y., and Teraoka, H. (1997). Phosphorylation of human general transcription factors TATA-binding protein and transcription factor IIB by DNA-dependent protein kinase--synergistic stimulation of RNA polymerase II basal transcription in vitro. *Eur J Biochem* 247, 1166-1173.
  102. Oettgen, P. (2006). Regulation of vascular inflammation and remodeling by ETS factors. *Circ Res* 99, 1159-1166.
  103. Nye, J.A., Petersen, J.M., Gunther, C.V., Jonsen, M.D., and Graves, B.J. (1992). Interaction of murine ets-1 with GGA-binding sites establishes the ETS domain as a new DNA-binding motif. *Genes Dev* 6, 975-990.
  104. Karim, F.D., Urness, L.D., Thummel, C.S., Klemsz, M.J., McKercher, S.R., Celada, A., Van Beveren, C., Maki, R.A., Gunther, C.V., Nye, J.A., et al. (1990). The ETS-domain: a new DNA-binding motif that recognizes a purine-rich core DNA sequence. *Genes Dev* 4, 1451-1453.
  105. Dittmer, J., and Nordheim, A. (1998). Ets transcription factors and human disease. *Biochim Biophys Acta* 1377, F1-11.
  106. Sharrocks, A.D., Brown, A.L., Ling, Y., and Yates, P.R. (1997). The ETS-domain transcription factor family. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1371-1387.

107. Turner, D.P., Findlay, V.J., Moussa, O., and Watson, D.K. (2007). Defining ETS transcription regulatory networks and their contribution to breast cancer progression. *J Cell Biochem* 102, 549-559.
108. Leprince, D., Gegonne, A., Coll, J., de Taisne, C., Schneeberger, A., Lagrou, C., and Stehelin, D. (1983). A putative second cell-derived oncogene of the avian leukaemia retrovirus E26. *Nature* 306, 395-397.
109. Nunn, M.F., Seeburg, P.H., Moscovici, C., and Duesberg, P.H. (1983). Tripartite structure of the avian erythroblastosis virus E26 transforming gene. *Nature* 306, 391-395.
110. Watson, D.K., McWilliams-Smith, M.J., Nunn, M.F., Duesberg, P.H., O'Brien, S.J., and Papas, T.S. (1985). The ets sequence from the transforming gene of avian erythroblastosis virus, E26, has unique domains on human chromosomes 11 and 21: both loci are transcriptionally active. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7294-7298.
111. Koizumi, S., Fisher, R.J., Fujiwara, S., Jorcyk, C., Bhat, N.K., Seth, A., and Papas, T.S. (1990). Isoforms of the human ets-1 protein: generation by alternative splicing and differential phosphorylation. *Oncogene* 5, 675-681.
112. Dittmer, J. (2003). The biology of the Ets1 proto-oncogene. *Mol Cancer* 2, 29.
113. Wasylyk, B., Hahn, S.L., and Giovane, A. (1993). The Ets family of transcription factors. *Eur J Biochem* 211, 7-18.
114. Slupsky, C.M., Gentile, L.N., Donaldson, L.W., Mackereth, C.D., Seidel, J.J., Graves, B.J., and McIntosh, L.P. (1998). Structure of the Ets-1 pointed domain and mitogen-activated protein kinase phosphorylation site. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 12129-12134.
115. Gegonne, A., Punyammalee, B., Rabault, B., Bosselut, R., Seneca, S., Crabeel, M., and Ghysdael, J. (1992). Analysis of the DNA binding and transcriptional activation properties of the Ets1 oncoprotein. *New Biol* 4, 512-519.
116. Petersen, J.M., Skalicky, J.J., Donaldson, L.W., McIntosh, L.P., Alber, T., and Graves, B.J. (1995). Modulation of transcription factor Ets-1 DNA binding: DNA-induced unfolding of an alpha helix. *Science* 269, 1866-1869.
117. Rabault, B., and Ghysdael, J. (1994). Calcium-induced phosphorylation of ETS1 inhibits its specific DNA binding activity. *J Biol Chem* 269, 28143-28151.
118. Cowley, D.O., and Graves, B.J. (2000). Phosphorylation represses Ets-1 DNA binding by reinforcing autoinhibition. *Genes Dev* 14, 366-376.
119. Boulukos, K.E., Pognonec, P., Rabault, B., Begue, A., and Ghysdael, J. (1989). Definition of an Ets1 protein domain required for nuclear localization in cells and DNA-binding activity in vitro. *Mol Cell Biol* 9, 5718-5721.
120. Dynan, W.S., and Tjian, R. (1983). The promoter-specific transcription factor Sp1 binds to upstream sequences in the SV40 early promoter. *Cell* 35, 79-87.
121. Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R., and Tjian, R. (1987). Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51, 1079-1090.
122. Safe, S., and Abdelrahim, M. (2005). Sp transcription factor family and its role in cancer. *Eur J Cancer* 41, 2438-2448.
123. Suske, G. (1999). The Sp-family of transcription factors. *Gene* 238, 291-300.
124. Jackson, S.P., MacDonald, J.J., Lees-Miller, S., and Tjian, R. (1990). GC box binding induces phosphorylation of Sp1 by a DNA-dependent protein kinase. *Cell* 63, 155-165.

125. Jackson, S.P., and Tjian, R. (1988). O-glycosylation of eukaryotic transcription factors: implications for mechanisms of transcriptional regulation. *Cell* 55, 125-133.
126. Stielow, B., Kruger, I., Diezko, R., Finkernagel, F., Gillemans, N., Kong-a-San, J., Philipsen, S., and Suske, G. (2010). Epigenetic silencing of spermatocyte-specific and neuronal genes by SUMO modification of the transcription factor Sp3. *PLoS Genet* 6, e1001203.
127. Bouwman, P., and Philipsen, S. (2002). Regulation of the activity of Sp1-related transcription factors. *Mol Cell Endocrinol* 195, 27-38.
128. Matera, A.G., and Ward, D.C. (1993). Localization of the human Sp1 transcription factor gene to 12q13 by fluorescence in situ hybridization. *Genomics* 17, 793-794.
129. Courey, A.J., and Tjian, R. (1988). Analysis of Sp1 in vivo reveals multiple transcriptional domains, including a novel glutamine-rich activation motif. *Cell* 55, 887-898.
130. Pascal, E., and Tjian, R. (1991). Different activation domains of Sp1 govern formation of multimers and mediate transcriptional synergism. *Genes Dev* 5, 1646-1656.
131. Brandeis, M., Frank, D., Keshet, I., Siegfried, Z., Mendelsohn, M., Nemes, A., Temper, V., Razin, A., and Cedar, H. (1994). Sp1 elements protect a CpG island from de novo methylation. *Nature* 371, 435-438.
132. Emili, A., Greenblatt, J., and Ingles, C.J. (1994). Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol* 14, 1582-1593.
133. Tanese, N., Saluja, D., Vassallo, M.F., Chen, J.L., and Admon, A. (1996). Molecular cloning and analysis of two subunits of the human TFIID complex: hTAFII130 and hTAFII100. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13611-13616.
134. Chiang, C.M., and Roeder, R.G. (1995). Cloning of an intrinsic human TFIID subunit that interacts with multiple transcriptional activators. *Science* 267, 531-536.
135. Datta, P.K., Raychaudhuri, P., and Bagchi, S. (1995). Association of p107 with Sp1: genetically separable regions of p107 are involved in regulation of E2F- and Sp1-dependent transcription. *Mol Cell Biol* 15, 5444-5452.
136. Wang, L., Wei, D., Huang, S., Peng, Z., Le, X., Wu, T.T., Yao, J., Ajani, J., and Xie, K. (2003). Transcription factor Sp1 expression is a significant predictor of survival in human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 9, 6371-6380.
137. Yao, J.C., Wang, L., Wei, D., Gong, W., Hassan, M., Wu, T.T., Mansfield, P., Ajani, J., and Xie, K. (2004). Association between expression of transcription factor Sp1 and increased vascular endothelial growth factor expression, advanced stage, and poor survival in patients with resected gastric cancer. *Clin Cancer Res* 10, 4109-4117.
138. Shi, Q., Le, X., Abbruzzese, J.L., Peng, Z., Qian, C.N., Tang, H., Xiong, Q., Wang, B., Li, X.C., and Xie, K. (2001). Constitutive Sp1 activity is essential for differential constitutive expression of vascular endothelial growth factor in human pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 61, 4143-4154.
139. Loeffler, S., Fayard, B., Weis, J., and Weissenberger, J. (2005). Interleukin-6 induces transcriptional activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) in astrocytes in vivo and regulates VEGF promoter activity in glioblastoma cells via direct interaction between STAT3 and Sp1. *Int J Cancer* 115, 202-213.

140. Feinberg, A.P., and Vogelstein, B. (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301, 89-92.
141. Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., and Jones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429, 457-463.
142. Hashimoto, H., Vertino, P.M., and Cheng, X. (2010). Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics* 2, 657-669.
143. Bird, A. (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16, 6-21.
144. Jones, P.A. (2003). Epigenetics in carcinogenesis and cancer prevention. *Ann N Y Acad Sci* 983, 213-219.
145. Ehrlich, M., Gama-Sosa, M.A., Huang, L.H., Midgett, R.M., Kuo, K.C., McCune, R.A., and Gehrke, C. (1982). Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 10, 2709-2721.
146. Cheung, P., and Lau, P. (2005). Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol* 19, 563-573.
147. Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415-428.
148. Bird, A.P. (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* 321, 209-213.
149. Antequera, F., and Bird, A. (1993). Number of CpG islands and genes in human and mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 11995-11999.
150. Esteller, M. (2011). Epigenetic changes in cancer. *F1000 Biol Rep* 3, 9.
151. Yu, F., Zingler, N., Schumann, G., and Stratling, W.H. (2001). Methyl-CpG-binding protein 2 represses LINE-1 expression and retrotransposition but not Alu transcription. *Nucleic Acids Res* 29, 4493-4501.
152. Müller, I. (2008). Allelverluste der fraktionierten, zellfreien DNA im humanen Blutplasma und epigenetische Einflüsse auf die Regulation von tumorassoziierten Genen. (Hamburg: Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg).
153. Robertson, K.D. (2002). DNA methylation and chromatin - unraveling the tangled web. *Oncogene* 21, 5361-5379.
154. Turek-Plewa, J., and Jagodzinski, P.P. (2005). The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett* 10, 631-647.
155. Pradhan, S., Bacolla, A., Wells, R.D., and Roberts, R.J. (1999). Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 274, 33002-33010.
156. Pradhan, S., Talbot, D., Sha, M., Benner, J., Hornstra, L., Li, E., Jaenisch, R., and Roberts, R.J. (1997). Baculovirus-mediated expression and characterization of the full-length murine DNA methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 25, 4666-4673.
157. Fatemi, M., Hermann, A., Gowher, H., and Jeltsch, A. (2002). Dnmt3a and Dnmt1 functionally cooperate during de novo methylation of DNA. *Eur J Biochem* 269, 4981-4984.
158. Gowher, H., Stockdale, C.J., Goyal, R., Ferreira, H., Owen-Hughes, T., and Jeltsch, A. (2005). De novo methylation of nucleosomal DNA by the mammalian Dnmt1 and Dnmt3A DNA methyltransferases. *Biochemistry* 44, 9899-9904.

159. Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-257.
160. Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* 31, 89-97.
161. Reik, W., Dean, W., and Walter, J. (2001). Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science* 293, 1089-1093.
162. Hermann, A., Schmitt, S., and Jeltsch, A. (2003). The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J Biol Chem* 278, 31717-31721.
163. Okano, M., Xie, S., and Li, E. (1998). Dnmt2 is not required for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 26, 2536-2540.
164. Dong, A., Yoder, J.A., Zhang, X., Zhou, L., Bestor, T.H., and Cheng, X. (2001). Structure of human DNMT2, an enigmatic DNA methyltransferase homolog that displays denaturant-resistant binding to DNA. *Nucleic Acids Res* 29, 439-448.
165. Goll, M.G., Kirpekar, F., Maggert, K.A., Yoder, J.A., Hsieh, C.L., Zhang, X., Golic, K.G., Jacobsen, S.E., and Bestor, T.H. (2006). Methylation of tRNA<sup>Asp</sup> by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 311, 395-398.
166. Jurkowski, T.P., Meusburger, M., Phalke, S., Helm, M., Nellen, W., Reuter, G., and Jeltsch, A. (2008). Human DNMT2 methylates tRNA(Asp) molecules using a DNA methyltransferase-like catalytic mechanism. *RNA* 14, 1663-1670.
167. Bhattacharya, S.K., Ramchandani, S., Cervoni, N., and Szyf, M. (1999). A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 397, 579-583.
168. Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., and Haaf, T. (2000). Demethylation of the zygotic paternal genome. *Nature* 403, 501-502.
169. Oswald, J., Engemann, S., Lane, N., Mayer, W., Olek, A., Fundele, R., Dean, W., Reik, W., and Walter, J. (2000). Active demethylation of the paternal genome in the mouse zygote. *Curr Biol* 10, 475-478.
170. Knudson, A.G. (1997). Hereditary predisposition to cancer. *Ann N Y Acad Sci* 833, 58-67.
171. Holliday, R., and Pugh, J.E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science* 187, 226-232.
172. Clark, S.J., and Melki, J. (2002). DNA methylation and gene silencing in cancer: which is the guilty party? *Oncogene* 21, 5380-5387.
173. Robertson, K.D. (2005). DNA methylation and human disease. *Nat Rev Genet* 6, 597-610.
174. Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358, 1148-1159.
175. Jones, P.A., and Laird, P.W. (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21, 163-167.
176. Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868-871.
177. Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389, 251-260.
178. Kornberg, R.D., and Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98, 285-294.
179. Bradbury, E.M. (1992). Reversible histone modifications and the chromosome cell cycle. *Bioessays* 14, 9-16.

180. Dobosy, J.R., and Selker, E.U. (2001). Emerging connections between DNA methylation and histone acetylation. *Cell Mol Life Sci* 58, 721-727.
181. Cheung, P., Allis, C.D., and Sassone-Corsi, P. (2000). Signaling to chromatin through histone modifications. *Cell* 103, 263-271.
182. Strahl, B.D., and Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41-45.
183. Allfrey, V.G., Faulkner, R., and Mirsky, A.E. (1964). Acetylation and Methylation of Histones and Their Possible Role in the Regulation of Rna Synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 786-794.
184. Murray, K. (1964). The Occurrence of Epsilon-N-Methyl Lysine in Histones. *Biochemistry* 3, 10-15.
185. Vaquero, A., Loyola, A., and Reinberg, D. (2003). The constantly changing face of chromatin. *Sci Aging Knowledge Environ* 2003, RE4.
186. Wolf, S.S. (2009). The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell Mol Life Sci* 66, 2109-2121.
187. Strahl, B.D., Ohba, R., Cook, R.G., and Allis, C.D. (1999). Methylation of histone H3 at lysine 4 is highly conserved and correlates with transcriptionally active nuclei in Tetrahymena. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14967-14972.
188. Bannister, A.J., Schneider, R., and Kouzarides, T. (2002). Histone methylation: dynamic or static? *Cell* 109, 801-806.
189. Kim, K.C., and Huang, S. (2003). Histone methyltransferases in tumor suppression. *Cancer Biol Ther* 2, 491-499.
190. Cao, R., Wang, L., Wang, H., Xia, L., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Jones, R.S., and Zhang, Y. (2002). Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science* 298, 1039-1043.
191. Feng, Q., Wang, H., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Struhl, K., and Zhang, Y. (2002). Methylation of H3-lysine 79 is mediated by a new family of HMTases without a SET domain. *Curr Biol* 12, 1052-1058.
192. Strahl, B.D., Grant, P.A., Briggs, S.D., Sun, Z.W., Bone, J.R., Caldwell, J.A., Mollah, S., Cook, R.G., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., et al. (2002). Set2 is a nucleosomal histone H3-selective methyltransferase that mediates transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 22, 1298-1306.
193. Nishioka, K., Rice, J.C., Sarma, K., Erdjument-Bromage, H., Werner, J., Wang, Y., Chuikov, S., Valenzuela, P., Tempst, P., Steward, R., et al. (2002). PR-Set7 is a nucleosome-specific methyltransferase that modifies lysine 20 of histone H4 and is associated with silent chromatin. *Mol Cell* 9, 1201-1213.
194. Feinberg, A.P., and Tycko, B. (2004). The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 4, 143-153.
195. Phillips, D.M. (1963). The presence of acetyl groups of histones. *Biochem J* 87, 258-263.
196. Brownell, J.E., Zhou, J., Ranalli, T., Kobayashi, R., Edmondson, D.G., Roth, S.Y., and Allis, C.D. (1996). Tetrahymena histone acetyltransferase A: a homolog to yeast Gcn5p linking histone acetylation to gene activation. *Cell* 84, 843-851.
197. Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H., and Nakatani, Y. (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell* 87, 953-959.
198. Sterner, D.E., and Berger, S.L. (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol Mol Biol Rev* 64, 435-459.



199. Grunstein, M. (1997). Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* **389**, 349-352.
200. Gregorette, I.V., Lee, Y.M., and Goodson, H.V. (2004). Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* **338**, 17-31.
201. Witt, O., Deubzer, H.E., Milde, T., and Oehme, I. (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* **277**, 8-21.
202. Xu, W.S., Parmigiani, R.B., and Marks, P.A. (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* **26**, 5541-5552.
203. Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M., and Guarente, L. (2000). Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* **403**, 795-800.
204. Jung-Hynes, B., Reiter, R.J., and Ahmad, N. Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: building a bridge between aging and cancer. *J Pineal Res* **48**, 9-19.
205. de Ruijter, A.J., van Gennip, A.H., Caron, H.N., Kemp, S., and van Kuilenburg, A.B. (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**, 737-749.
206. Marks, P., Rifkind, R.A., Richon, V.M., Breslow, R., Miller, T., and Kelly, W.K. (2001). Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* **1**, 194-202.
207. McKinsey, T.A., Zhang, C.L., and Olson, E.N. (2001). Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. *Curr Opin Genet Dev* **11**, 497-504.
208. Black, B.L., and Olson, E.N. (1998). Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* **14**, 167-196.
209. Gao, L., Cueto, M.A., Asselbergs, F., and Atadja, P. (2002). Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem* **277**, 25748-25755.
210. Jabbour, E., Issa, J.P., Garcia-Manero, G., and Kantarjian, H. (2008). Evolution of decitabine development: accomplishments, ongoing investigations, and future strategies. *Cancer* **112**, 2341-2351.
211. Samlowski, W.E., Leachman, S.A., Wade, M., Cassidy, P., Porter-Gill, P., Busby, L., Wheeler, R., Boucher, K., Fitzpatrick, F., Jones, D.A., et al. (2005). Evaluation of a 7-day continuous intravenous infusion of decitabine: inhibition of promoter-specific and global genomic DNA methylation. *J Clin Oncol* **23**, 3897-3905.
212. Amato, R.J. (2007). Inhibition of DNA methylation by antisense oligonucleotide MG98 as cancer therapy. *Clin Genitourin Cancer* **5**, 422-426.
213. Atallah, E., Kantarjian, H., and Garcia-Manero, G. (2007). The role of decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Expert Opin Pharmacother* **8**, 65-73.
214. Johnstone, R.W. (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* **1**, 287-299.
215. Marks, P.A., Richon, V.M., and Rifkind, R.A. (2000). Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* **92**, 1210-1216.
216. Leu, Y.W., Rahmatpanah, F., Shi, H., Wei, S.H., Liu, J.C., Yan, P.S., and Huang, T.H. (2003). Double RNA interference of DNMT3b and DNMT1 enhances DNA demethylation and gene reactivation. *Cancer Res* **63**, 6110-6115.

217. Liu, T., Kuljaca, S., Tee, A., and Marshall, G.M. (2006). Histone deacetylase inhibitors: multifunctional anticancer agents. *Cancer Treat Rev* 32, 157-165.
218. Dickinson, M., Johnstone, R.W., and Prince, H.M. (2010). Histone deacetylase inhibitors: potential targets responsible for their anti-cancer effect. *Invest New Drugs* 28 Suppl 1, S3-20.
219. Gui, C.Y., Ngo, L., Xu, W.S., Richon, V.M., and Marks, P.A. (2004). Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1241-1246.
220. Meehan, R.R., Lewis, J.D., McKay, S., Kleiner, E.L., and Bird, A.P. (1989). Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs. *Cell* 58, 499-507.
221. Lewis, J.D., Meehan, R.R., Henzel, W.J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., and Bird, A. (1992). Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69, 905-914.
222. Hendrich, B., and Bird, A. (1998). Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol Cell Biol* 18, 6538-6547.
223. Lopez-Serra, L., and Esteller, M. (2008). Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words. *Br J Cancer* 98, 1881-1885.
224. Ballestar, E., and Wolffe, A.P. (2001). Methyl-CpG-binding proteins. Targeting specific gene repression. *Eur J Biochem* 268, 1-6.
225. Sansom, O.J., Maddison, K., and Clarke, A.R. (2007). Mechanisms of disease: methyl-binding domain proteins as potential therapeutic targets in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 4, 305-315.
226. Koch, C., and Stratling, W.H. (2004). DNA binding of methyl-CpG-binding protein MeCP2 in human MCF7 cells. *Biochemistry* 43, 5011-5021.
227. Buschdorf, J.P., and Stratling, W.H. (2004). A WW domain binding region in methyl-CpG-binding protein MeCP2: impact on Rett syndrome. *J Mol Med* 82, 135-143.
228. Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U., and Zoghbi, H.Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 23, 185-188.
229. Fujita, N., Shimotake, N., Ohki, I., Chiba, T., Saya, H., Shirakawa, M., and Nakao, M. (2000). Mechanism of transcriptional regulation by methyl-CpG binding protein MBD1. *Mol Cell Biol* 20, 5107-5118.
230. Fujita, N., Takebayashi, S., Okumura, K., Kudo, S., Chiba, T., Saya, H., and Nakao, M. (1999). Methylation-mediated transcriptional silencing in euchromatin by methyl-CpG binding protein MBD1 isoforms. *Mol Cell Biol* 19, 6415-6426.
231. Bestor, T.H., and Verdine, G.L. (1994). DNA methyltransferases. *Curr Opin Cell Biol* 6, 380-389.
232. Cross, S.H., Meehan, R.R., Nan, X., and Bird, A. (1997). A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins. *Nat Genet* 16, 256-259.
233. Jorgensen, H.F., Ben-Porath, I., and Bird, A.P. (2004). Mbd1 is recruited to both methylated and nonmethylated CpGs via distinct DNA binding domains. *Mol Cell Biol* 24, 3387-3395.
234. Wischnewski, F., Friese, O., Pantel, K., and Schwarzenbach, H. (2007). Methyl-CpG binding domain proteins and their involvement in the regulation of the MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A3, and MAGE-A12 gene promoters. *Mol Cancer Res* 5, 749-759.

235. Ng, H.H., Jeppesen, P., and Bird, A. (2000). Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1. *Mol Cell Biol* 20, 1394-1406.
236. Ichimura, T., Watanabe, S., Sakamoto, Y., Aoto, T., Fujita, N., and Nakao, M. (2005). Transcriptional repression and heterochromatin formation by MBD1 and MCAF/AM family proteins. *J Biol Chem* 280, 13928-13935.
237. Fujita, N., Watanabe, S., Ichimura, T., Tsuruzoe, S., Shinkai, Y., Tachibana, M., Chiba, T., and Nakao, M. (2003). Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J Biol Chem* 278, 24132-24138.
238. Lachner, M., O'Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K., and Jenuwein, T. (2001). Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* 410, 116-120.
239. Reese, B.E., Bachman, K.E., Baylin, S.B., and Rountree, M.R. (2003). The methyl-CpG binding protein MBD1 interacts with the p150 subunit of chromatin assembly factor 1. *Mol Cell Biol* 23, 3226-3236.
240. Sarraf, S.A., and Stancheva, I. (2004). Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol Cell* 15, 595-605.
241. Ng, H.H., Zhang, Y., Hendrich, B., Johnson, C.A., Turner, B.M., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Reinberg, D., and Bird, A. (1999). MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 23, 58-61.
242. Ramchandani, S., Bhattacharya, S.K., Cervoni, N., and Szyf, M. (1999). DNA methylation is a reversible biological signal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 6107-6112.
243. Cervoni, N., and Szyf, M. (2001). Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J Biol Chem* 276, 40778-40787.
244. Detich, N., Theberge, J., and Szyf, M. (2002). Promoter-specific activation and demethylation by MBD2/demethylase. *J Biol Chem* 277, 35791-35794.
245. Kanai, Y., Ushijima, S., Nakanishi, Y., and Hirohashi, S. (1999). Reduced mRNA expression of the DNA demethylase, MBD2, in human colorectal and stomach cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 264, 962-966.
246. Boeke, J., Ammerpohl, O., Kegel, S., Moehren, U., and Renkawitz, R. (2000). The minimal repression domain of MBD2b overlaps with the methyl-CpG-binding domain and binds directly to Sin3A. *J Biol Chem* 275, 34963-34967.
247. Bogdanovic, O., and Veenstra, G.J. (2009). DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma* 118, 549-565.
248. Saito, M., and Ishikawa, F. (2002). The mCpG-binding domain of human MBD3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC1 and MTA2. *J Biol Chem* 277, 35434-35439.
249. Wade, P.A. (2001). Methyl CpG-binding proteins and transcriptional repression. *Bioessays* 23, 1131-1137.
250. Zhang, Y., Ng, H.H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., and Reinberg, D. (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev* 13, 1924-1935.
251. Fabbrizio, E., El Messaoudi, S., Polanowska, J., Paul, C., Cook, J.R., Lee, J.H., Negre, V., Rousset, M., Pestka, S., Le Cam, A., et al. (2002). Negative regulation of transcription by the type II arginine methyltransferase PRMT5. *EMBO Rep* 3, 641-645.

252. Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H.H., Jiricny, J., and Bird, A. (1999). The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature* *401*, 301-304.
253. Bellacosa, A., Cicchillitti, L., Schepis, F., Riccio, A., Yeung, A.T., Matsumoto, Y., Golemis, E.A., Genuardi, M., and Neri, G. (1999). MED1, a novel human methyl-CpG-binding endonuclease, interacts with DNA mismatch repair protein MLH1. *Proc Natl Acad Sci U S A* *96*, 3969-3974.
254. Petronzelli, F., Riccio, A., Markham, G.D., Seeholzer, S.H., Genuardi, M., Karbowski, M., Yeung, A.T., Matsumoto, Y., and Bellacosa, A. (2000). Investigation of the substrate spectrum of the human mismatch-specific DNA N-glycosylase MED1 (MBD4): fundamental role of the catalytic domain. *J Cell Physiol* *185*, 473-480.
255. Kondo, E., Gu, Z., Horii, A., and Fukushige, S. (2005). The thymine DNA glycosylase MBD4 represses transcription and is associated with methylated p16(INK4a) and hMLH1 genes. *Mol Cell Biol* *25*, 4388-4396.
256. Zabkiewicz, J., and Clarke, A.R. (2004). DNA damage-induced apoptosis: insights from the mouse. *Biochim Biophys Acta* *1705*, 17-25.
257. Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* *15*, 2654-2659.
258. Dykxhoorn, D.M., Novina, C.D., and Sharp, P.A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* *4*, 457-467.
259. Hannon, G.J. (2002). RNA interference. *Nature* *418*, 244-251.
260. Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* *411*, 494-498.
261. Shuman, S. (1991). Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in *Escherichia coli* is sequence specific. *Proc Natl Acad Sci U S A* *88*, 10104-10108.
262. Invitrogen (2006). TopoTA Cloning Kit Manual. 9.
263. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
264. Mitchell, P.J., and Tjian, R. (1989). Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins. *Science* *245*, 371-378.
265. Garner, M.M., and Revzin, A. (1981). A gel electrophoresis method for quantifying the binding of proteins to specific DNA regions: application to components of the *Escherichia coli* lactose operon regulatory system. *Nucleic Acids Res* *9*, 3047-3060.
266. Smith, I.M., Glazer, C.A., Mithani, S.K., Ochs, M.F., Sun, W., Bhan, S., Vostrov, A., Abdullaev, Z., Lobanenko, V., Gray, A., et al. (2009). Coordinated activation of candidate proto-oncogenes and cancer testis antigens via promoter demethylation in head and neck cancer and lung cancer. *PLoS One* *4*, e4961.
267. Woloszyńska-Read, A., Zhang, W., Yu, J., Link, P.A., Mhawech-Fauceglia, P., Collamat, G., Akers, S.N., Ostler, K.R., Godley, L.A., Odunsi, K., et al. (2011). Coordinated cancer germline antigen promoter and global DNA hypomethylation in ovarian cancer: association with the BORIS/CTCF expression ratio and advanced stage. *Clin Cancer Res* *17*, 2170-2180.

268. Holler, M., Westin, G., Jiricny, J., and Schaffner, W. (1988). Sp1 transcription factor binds DNA and activates transcription even when the binding site is CpG methylated. *Genes Dev* 2, 1127-1135.
269. De Smet, C., Loriot, A., and Boon, T. (2004). Promoter-dependent mechanism leading to selective hypomethylation within the 5' region of gene MAGE-A1 in tumor cells. *Mol Cell Biol* 24, 4781-4790.
270. Dahl, J.A., and Collas, P. (2007). Q2ChIP, a quick and quantitative chromatin immunoprecipitation assay, unravels epigenetic dynamics of developmentally regulated genes in human carcinoma cells. *Stem Cells* 25, 1037-1046.
271. Dittmer, J., Pise-Masison, C.A., Clemens, K.E., Choi, K.S., and Brady, J.N. (1997). Interaction of human T-cell lymphotropic virus type I Tax, Ets1, and Sp1 in transactivation of the PTHrP P2 promoter. *J Biol Chem* 272, 4953-4958.
272. D'Arcy, V., Pore, N., Docquier, F., Abdullaev, Z.K., Chernukhin, I., Kita, G.X., Rai, S., Smart, M., Farrar, D., Pack, S., et al. (2008). BORIS, a paralogue of the transcription factor, CTCF, is aberrantly expressed in breast tumours. *Br J Cancer* 98, 571-579.
273. Hines, W.C., Bazarov, A.V., Mukhopadhyay, R., and Yaswen, P. BORIS (CTCFL) is not expressed in most human breast cell lines and high grade breast carcinomas. *PLoS One* 5, e9738.
274. Woloszynska-Read, A., James, S.R., Song, C., Jin, B., Odunsi, K., and Karpf, A.R. (2010). BORIS/CTCFL expression is insufficient for cancer-germline antigen gene expression and DNA hypomethylation in ovarian cell lines. *Cancer Immun* 10, 6.
275. Jones, P.A., and Taylor, S.M. (1980). Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell* 20, 85-93.
276. Karpf, A.R. (2006). A potential role for epigenetic modulatory drugs in the enhancement of cancer/germ-line antigen vaccine efficacy. *Epigenetics* 1, 116-120.
277. Claus, R., Almstedt, M., and Lubbert, M. (2005). Epigenetic treatment of hematopoietic malignancies: in vivo targets of demethylating agents. *Semin Oncol* 32, 511-520.
278. Nguyen, C.T., Gonzales, F.A., and Jones, P.A. (2001). Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Res* 29, 4598-4606.
279. Nan, X., Ng, H.H., Johnson, C.A., Laherty, C.D., Turner, B.M., Eisenman, R.N., and Bird, A. (1998). Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393, 386-389.
280. Yuan, Y., Mendez, R., Sahin, A., and Dai, J.L. (2001). Hypermethylation leads to silencing of the SYK gene in human breast cancer. *Cancer Res* 61, 5558-5561.
281. Worm, J., Kirkin, A.F., Dzhandzhugazyan, K.N., and Guldborg, P. (2001). Methylation-dependent silencing of the reduced folate carrier gene in inherently methotrexate-resistant human breast cancer cells. *J Biol Chem* 276, 39990-40000.
282. Baylin, S., and Bestor, T.H. (2002). Altered methylation patterns in cancer cell genomes: cause or consequence? *Cancer Cell* 1, 299-305.

283. Antequera, F., Boyes, J., and Bird, A. (1990). High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines. *Cell* 62, 503-514.
284. Dittmer, J., Gegonne, A., Gitlin, S.D., Ghysdael, J., and Brady, J.N. (1994). Regulation of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) gene expression. Sp1 binds through an inverted CACCC motif and regulates promoter activity in cooperation with Ets1. *J Biol Chem* 269, 21428-21434.
285. Santiago, F.S., and Khachigian, L.M. (2004). Ets-1 stimulates platelet-derived growth factor A-chain gene transcription and vascular smooth muscle cell growth via cooperative interactions with Sp1. *Circ Res* 95, 479-487.
286. Liu, M.Y., Eyries, M., Zhang, C., Santiago, F.S., and Khachigian, L.M. (2006). Inducible platelet-derived growth factor D-chain expression by angiotensin II and hydrogen peroxide involves transcriptional regulation by Ets-1 and Sp1. *Blood* 107, 2322-2329.
287. Muller, I., Wischnewski, F., Pantel, K., and Schwarzenbach, H. (2010). Promoter- and cell-specific epigenetic regulation of CD44, Cyclin D2, GLIPR1 and PTEN by methyl-CpG binding proteins and histone modifications. *BMC Cancer* 10, 297.
288. Majumder, S., Kutay, H., Datta, J., Summers, D., Jacob, S.T., and Ghoshal, K. (2006). Epigenetic regulation of metallothionein-i gene expression: differential regulation of methylated and unmethylated promoters by DNA methyltransferases and methyl CpG binding proteins. *J Cell Biochem* 97, 1300-1316.
289. Danam, R.P., Howell, S.R., Brent, T.P., and Harris, L.C. (2005). Epigenetic regulation of O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression by histone acetylation and methyl-CpG binding proteins. *Mol Cancer Ther* 4, 61-69.
290. Melnick, A., and Licht, J.D. (1999). Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93, 3167-3215.
291. Villa, R., Morey, L., Raker, V.A., Buschbeck, M., Gutierrez, A., De Santis, F., Corsaro, M., Varas, F., Bossi, D., Minucci, S., et al. (2006). The methyl-CpG binding protein MBD1 is required for PML-RARalpha function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 1400-1405.
292. Clouaire, T., de Las Heras, J.I., Merusi, C., and Stancheva, I. (2010). Recruitment of MBD1 to target genes requires sequence-specific interaction of the MBD domain with methylated DNA. *Nucleic Acids Res* 38, 4620-4634.
293. Fujita, N., Watanabe, S., Ichimura, T., Ohkuma, Y., Chiba, T., Saya, H., and Nakao, M. (2003). MCAF mediates MBD1-dependent transcriptional repression. *Mol Cell Biol* 23, 2834-2843.
294. Fujita, H., Fujii, R., Aratani, S., Amano, T., Fukamizu, A., and Nakajima, T. (2003). Antithetic effects of MBD2a on gene regulation. *Mol Cell Biol* 23, 2645-2657.
295. Bhan, S., Negi, S.S., Shao, C., Glazer, C.A., Chuang, A., Gaykalova, D.A., Sun, W., Sidransky, D., Ha, P.K., and Califano, J.A. BORIS binding to the promoters of cancer testis antigens, MAGEA2, MAGEA3, and MAGEA4, is associated with their transcriptional activation in lung cancer. *Clin Cancer Res* 17, 4267-4276.
296. Takayama, S., and Reed, J.C. (2001). Molecular chaperone targeting and regulation by BAG family proteins. *Nat Cell Biol* 3, E237-241.

297. Doong, H., Vrailas, A., and Kohn, E.C. (2002). What's in the 'BAG'?--A functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Lett* 188, 25-32.
298. Dougherty, C.J., Ichim, T.E., Liu, L., Reznik, G., Min, W.P., Ghochikyan, A., Agadjanyan, M.G., and Reznik, B.N. (2008). Selective apoptosis of breast cancer cells by siRNA targeting of BORIS. *Biochem Biophys Res Commun* 370, 109-112.
299. Schubart, D.B., Sauter, P., Massa, S., Friedl, E.M., Schwarzenbach, H., and Matthias, P. (1996). Gene structure and characterization of the murine homologue of the B cell-specific transcriptional coactivator OBF-1. *Nucleic Acids Res* 24, 1913-1920.
300. Zwilling, S., Annweiler, A., and Wirth, T. (1994). The POU domains of the Oct1 and Oct2 transcription factors mediate specific interaction with TBP. *Nucleic Acids Res* 22, 1655-1662.
301. Friedman, J.S., Khanna, H., Swain, P.K., Denicola, R., Cheng, H., Mitton, K.P., Weber, C.H., Hicks, D., and Swaroop, A. (2004). The minimal transactivation domain of the basic motif-leucine zipper transcription factor NRL interacts with TATA-binding protein. *J Biol Chem* 279, 47233-47241.
302. De Smet, C., Lurquin, C., Lethe, B., Martelange, V., and Boon, T. (1999). DNA methylation is the primary silencing mechanism for a set of germ line- and tumor-specific genes with a CpG-rich promoter. *Mol Cell Biol* 19, 7327-7335.
303. Honda, T., Tamura, G., Waki, T., Kawata, S., Terashima, M., Nishizuka, S., and Motoyama, T. (2004). Demethylation of MAGE promoters during gastric cancer progression. *Br J Cancer* 90, 838-843.
304. Janssen, B.L., van de Locht, L.T., Fourkour, A., de Smet, C., Mensink, E.J., van Muijen, G.N., and de Vries, T.J. (1999). Transcription of the MAGE-1 gene and the methylation status of its Ets binding promoter elements: a quantitative analysis in melanoma cell lines using a real-time polymerase chain reaction technique. *Melanoma Res* 9, 213-222.
305. Suyama, T., Ohashi, H., Nagai, H., Hatano, S., Asano, H., Murate, T., Saito, H., and Kinoshita, T. (2002). The MAGE-A1 gene expression is not determined solely by methylation status of the promoter region in hematological malignancies. *Leuk Res* 26, 1113-1118.
306. Wischnewski, F. (2007). Untersuchungen zur methylierungsabhängigen Regulation der MAGE-A Gene in humanen Karzinomzelllinien. (Hamburg: Department Biologie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg).
307. Li, B., Carey, M., and Workman, J.L. (2007). The role of chromatin during transcription. *Cell* 128, 707-719.