

Aus der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Kinderchirurgie  
(Univ.-Prof. Dr. M. Ghadimi)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

# **Die Rolle des Chromatinremodulators CHD1 im kastrationsresistenten Prostatakarzinom**

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Simon Joseph Böcker**

aus

Berlin

Göttingen 2020

Dekan: Prof. Dr. med. W. Brück

### **Betreuungsausschuss**

Betreuer: Prof. Dr. S. A. Johnsen, Ph.D.

Ko-Betreuer: Univ.-Prof. Dr. med. L. Trojan

### **Prüfungskommission**

Referent/in Prof. Dr. S. A. Johnsen, Ph.D.

Ko-Referent/in: Univ.-Prof. Dr. med. L. Trojan

Drittreferent/in: Prof. Dr. med. R. Dressel

Datum der mündlichen Prüfung: 05.10.2021

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel "Die Rolle des Chromatinremodulators CHD1 im kastrationsresistenten Prostatakarzinom" eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Göttingen, den .....

.....  
(Unterschrift)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>IV</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Prostatakarzinom .....	1
1.1.1 Inzidenz und Mortalität.....	1
1.1.2 Erkrankungsverlauf und Therapie.....	1
1.1.3 Häufige genetische Aberrationen .....	3
1.2 Epigenetik.....	5
1.2.1 Epigenetische Modifikationen .....	6
1.2.2 Epigenetische Regulatoren .....	7
1.2.3 CHD1.....	8
1.2.4 Polycomb repressive complex 2 .....	9
1.3 Fragestellung und Versuchsaufbau.....	10
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>12</b>
2.1 Material .....	12
2.1.1 Geräte.....	12
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	13
2.1.3 Chemikalien.....	13
2.1.4 Reagenzien und Kits .....	14
2.1.5 Puffer und Medien .....	15
2.1.6 Enzyme .....	17
2.1.7 Inhibitoren.....	17
2.1.8 Komigrationsstandards .....	17
2.1.9 Vektoren .....	18
2.1.10 Primer.....	18
2.1.11 Antikörper .....	19
2.1.12 Zelllinie .....	19
2.1.13 Software.....	20
2.2 Methoden .....	21
2.2.1 Analyse öffentlich verfügbarer Sequenzierungsdaten.....	21
2.2.2 Zellkultur .....	21
2.2.3 Proteinbiochemische Methoden.....	23
2.2.4 Molekularbiologische Methoden .....	24
2.2.5 Next Generation Sequencing .....	29
2.2.6 Bioinformatische Analyse der Sequenzierungsdaten .....	30
2.2.7 Erstellen von Venn-Diagrammen.....	33

<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
3.1	<i>CHD1</i> -Aberrationen finden sich vermehrt in kastrationsresistenten Prostatakarzinomen .....	34
3.2	<i>CHD1</i> -Knockdown in LNCaP-Zellen .....	36
3.3	<i>CHD1</i> -Knockdown begünstigt androgenunabhängiges Wachstum in LNCaP-Zellen .....	36
3.4	<i>CHD1</i> -Status und Androgenentzug beeinflussen Genexpression in LNCaP-Zellen .....	38
3.5	CHD1 bindet unter Hormonentzug vermehrt nahe der TSS hochregulierter Gene .....	40
3.6	H3K4me3 weist unter Hormonentzug Anreicherungen nahe der TSS hochregulierter Gene auf .....	43
3.7	Alterierende Genexpression unter <i>CHD1</i> -Knockdown und Androgenentzug trägt H3K27me3-Signatur.....	45
3.8	<i>EZH2</i> -Expression ist abhängig von <i>CHD1</i> -Status und Androgenentzug.....	47
3.9	<i>EZH2</i> und H3K27me3 binden unter Hormonentzug nach <i>CHD1</i> -Knockdown vermehrt nahe der TSS reprimierter Gene.....	49
3.10	Bindungsprofile von CHD1, <i>EZH2</i> , H3K4me3 und der H3K27me3 an den Genen <i>CDKN1A</i> , <i>SMAD7</i> und <i>PMEPA1</i> .....	53
3.11	Der <i>EZH2</i> -Inhibitor JQEZ5 beeinflusst das Wachstum von LNCaP-Zellen im Androgenentzug.....	57
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>60</b>
4.1	CHD1.....	60
4.1.1	Einfluss von CHD1 auf das Zellwachstum .....	60
4.1.2	Einfluss von CHD1 auf die Transkription.....	61
4.1.3	Zielgene von CHD1 .....	62
4.2	<i>EZH2</i> .....	63
4.2.1	<i>EZH2</i> -Überexpression in Krebserkrankungen .....	63
4.2.2	<i>EZH2</i> als Onkogen.....	64
4.2.3	<i>EZH2</i> in der epigenetischen Regulation .....	65
4.2.4	Bivalentes Chromatin .....	66
4.2.5	Zielgene von <i>EZH2</i> .....	69
4.2.6	<i>EZH2</i> -Inhibitoren als Therapieoption für Krebserkrankungen.....	73
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>75</b>
<b>6</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>77</b>
6.1	Liste differenziell regulierter Gene .....	77
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>79</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1: Histonmodifikationen.....	7
Abbildung 1-2: Strukturelle Darstellung der Bindung zwischen CHD1 und H3K4me3.....	9
Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des PRC2 als Methyltransferase.....	10
Abbildung 2-1: Vektorenkarte des pGIPZ Vektors.....	22
Abbildung 3-1: Häufigkeit von <i>CHD1</i> -Aberrationen in Genomsequenzierungsstudien.....	35
Abbildung 3-2: <i>CHD1</i> -Expression der transduzierten Zelllinien.....	36
Abbildung 3-3: Wachstum von LNCaP-Zellen in FBS Medium.....	37
Abbildung 3-4: Wachstum von LNCaP-Zellen in CSS Medium.....	38
Abbildung 3-5: Genexpression unter <i>CHD1</i> -Knockdown und Androgenentzug.....	39
Abbildung 3-6: qPCR-Kontrollen der CHD1-ChIP.....	40
Abbildung 3-7: CHD1 bindet unter Hormonentzug vermehrt in Nähe der TSS.....	41
Abbildung 3-8: CHD1-Anreicherungen unter signifikant regulierten Genen in der RNA-Seq.....	42
Abbildung 3-9: qPCR-Kontrollen der H3K4me3-ChIP.....	44
Abbildung 3-10: Unter Hormonentzug finden sich vermehrt Anreicherungen der H3K4me3 in Nähe der TSS.....	45
Abbildung 3-11: Regulierte Gene tragen H3K27me3-Signatur.....	47
Abbildung 3-12: <i>CHD1</i> -Knockdown und Androgenentzug beeinflussen <i>EZH2</i> -Expression und Bindung.....	48
Abbildung 3-13: qPCR-Kontrollen der <i>EZH2</i> -ChIP und H3K27me3-ChIP.....	50
Abbildung 3-14: <i>EZH2</i> bindet nach <i>CHD1</i> -Verlust im Hormonentzug vermehrt in Nähe der TSS.....	51
Abbildung 3-15: H3K27me3 bindet nach <i>CHD1</i> -Verlust im Hormonentzug vermehrt in Nähe der TSS.....	52
Abbildung 3-16: Bindungsprofile von CHD1, <i>EZH2</i> , H3K4me3 und H3K27me3 an <i>CDKN1A</i> .....	54
Abbildung 3-17: Bindungsprofile von CHD1, <i>EZH2</i> , H3K4me3 und H3K27me3 an <i>SMAD7</i> .....	55
Abbildung 3-18: Bindungsprofile von CHD1, <i>EZH2</i> , H3K4me3 und H3K27me3 an <i>PMEPA1</i> .....	56
Abbildung 3-19: Strukturformel von JQEZ5.....	57
Abbildung 3-20: Wachstum von LNCaP-Zellen unter Hormonentzug (+/- <i>CHD1</i> -Knockdown) mit JQEZ5-Behandlung.....	59
Abbildung 4-1: Vereinfachte Darstellung des p53/p21-Signalwegs.....	62
Abbildung 4-2: Mögliche bivalente Regulation durch CHD1 und <i>EZH2</i> im Hormonentzug.....	67
Abbildung 4-3: Vergleich von differenziell regulierten Genen mit zwei Gen Sets aus Ben-Porath et al. (2008).....	68
Abbildung 4-4: Bindungsprofile von CHD1, <i>EZH2</i> , H3K4me3 und der H3K27me3 am Gen <i>ZFHX3</i> .....	70
Abbildung 4-5: Der TGF- $\beta$ Signalweg.....	72

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms (nach Wittekind 2016).....	2
Tabelle 1-2: Abkürzungen und Charakteristika der Zelllinien. ....	11
Tabelle 2-1: Geräte.....	12
Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterialien.....	13
Tabelle 2-3: Chemikalien.....	13
Tabelle 2-4: Reagenzien und Kits.....	14
Tabelle 2-5: Puffer, Lösungen und Medien.....	15
Tabelle 2-6: Enzyme.....	17
Tabelle 2-7: Proteaseinhibitoren.....	17
Tabelle 2-8: Inhibitoren.....	17
Tabelle 2-9: Komigrationsstandards.....	17
Tabelle 2-10: Vektoren.....	18
Tabelle 2-11: Genexpressionsprimer.....	18
Tabelle 2-12: ChIP-Primer.....	18
Tabelle 2-13: Primärantikörper.....	19
Tabelle 2-14: Sekundärantikörper.....	19
Tabelle 2-15: Zelllinie.....	19
Tabelle 2-16: Software.....	20
Tabelle 2-17: Protokoll Genexpression.....	25
Tabelle 2-18: Protokoll ChIP.....	26
Tabelle 3-1: Verwendete Datensätze und ihre jeweiligen Zusammensetzungen.....	34
Tabelle 3-2: Im Hormonentzug vermehrt exprimierte Gene mit signifikanter CHD1- Anreicherung.....	42
Tabelle 6-1: Liste differenziell regulierter Gene.....	78

## Abkürzungsverzeichnis

ADT	Androgendeprivationstherapie
AR	Androgenrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
Bp	Basenpaar(e)
Cdk	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CDKN1A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CHD1	<i>Chromodomain-helicase-DNA-binding protein 1</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
ChIP-Seq	Chromatin-Immunpräzipitation-DNA-Sequenzierung
CRPC	<i>Castration-resistant prostate cancer</i>
CSS	<i>Charcoal-stripped fetal bovine serum</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
ETS	<i>E26 transformation-specific</i>
ES	<i>Enrichment score</i>
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GRHL3	<i>Grainyhead like transcription factor 3</i>
GSEA	<i>Gene set enrichment analysis</i>
H3K4me3	Histon-3-Lysin-4-Trimethylierung
H3K27me3	Histon-3-Lysin-27-Trimethylierung
IgG	Immunglobulin G
KD	<i>Knockdown</i>
LNCaP	<i>Lymph node cancer of the prostate</i>
mCRPC	<i>Metastasized castration-resistant prostate cancer</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
OLIG2	<i>Oligodendrocyte transcription factor 2</i>
PARP	Poly-ADP-Ribose-Polymerase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCa	<i>Prostate cancer</i>
PcG	<i>Polycomb-group proteins</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PMEPA1	<i>Prostate transmembrane protein, androgen induced 1</i>
PRC1	<i>Polycomb repressive complex 1</i>
PRC2	<i>Polycomb repressive complex 2</i>
PSA	Prostata-spezifisches Antigen
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i>
RNA-Seq	RNA-Sequenzierung
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
shRNA	<i>Short-hairpin RNA</i>
SMAD7	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 7</i>
SSRP1	<i>Structure specific recognition protein 1</i>
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with tween-20</i>
TFF1	<i>Trefoil factor 1</i>
TGF- $\beta$	<i>Transforming growth factor beta</i>
TNM	Tumor-Nodus-Metastase
TSS	<i>Transcription start site</i>



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Prostatakarzinom

### 1.1.1 Inzidenz und Mortalität

Im Jahr 2019 ist das Prostatakarzinom mit einer geschätzten Inzidenz von 174650 Fällen die häufigste neu aufgetretene Krebserkrankung bei Männern in den USA. Unter den durch Krebs verursachten Todesfällen befindet sich Prostatakrebs auf Platz zwei (Siegel et al. 2019). Global betrachtet ist Prostatakrebs die am zweithäufigsten neu diagnostizierte Krebserkrankung bei Männern. Unter den durch Krebs verursachten Todesfällen bei Männern ist Prostatakrebs für 7% aller Fälle weltweit verantwortlich und rangiert damit auf Platz fünf (Stewart und Wild 2014).

Während in den USA in den letzten Jahren eine sinkende Inzidenz für *low-risk* Prostatakarzinome festgestellt wurde, konnte eine steigende Inzidenz für fortgeschrittene, metastasierte Prostatakarzinome verzeichnet werden, insbesondere in der Altersgruppe der Männer von 55 bis 69 Jahren (Weiner et al. 2016). Prostatakrebs stellt somit eine globale gesundheitliche Herausforderung dar.

### 1.1.2 Erkrankungsverlauf und Therapie

Das Prostatakarzinom wird anhand der TNM-Klassifikation (TNM = Tumor-Nodus-Metastasen) in verschiedene Stadien eingeteilt (siehe Tabelle 1-1). Unter Berücksichtigung der Größe und Ausbreitung des Primärtumors (T), des Befalls von regionären Lymphknoten (N) und des Vorhandenseins von Fernmetastasen (M) lässt sich abschätzen, wie weit die Erkrankung bereits fortgeschritten ist und welche Therapieoptionen dem Patienten zur Verfügung stehen. Des Weiteren helfen der *Gleason-Score*, ein System zur Bewertung des Malignitätsgrades von Gewebeprospektiven, und die Konzentration des prostataspezifischen Antigens (PSA-Wert) im Blut um eine Aussage über die Prognose zu machen (Leitlinie Prostatakarzinom 2019).

**Tabelle 1-1: TNM-Klassifikation des Prostatakarzinoms (nach Wittekind 2016).**

<b>Stadium</b>	<b>Beschreibung</b>
Tx	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
T1	Klinisch nicht erkennbarer Tumor, der weder tastbar noch in bildgebenden Verfahren sichtbar ist
T1a	Tumor zufälliger histologischer Befund (“incidental carcinoma”) in 5% oder weniger des resezierten Gewebes
T1b	Tumor zufälliger histologischer Befund (“incidental carcinoma”) in 5% oder mehr des resezierten Gewebes
T1c	Tumor durch Nadelbiopsie diagnostiziert (z. B. wegen erhöhtem PSA)
T2	Tumor begrenzt auf Prostata
T2a	Tumor befällt die Hälfte eines Lappens oder weniger
T2b	Tumor befällt mehr als die Hälfte eines Lappens
T2c	Tumor in beiden Lappen
T3	Tumor durchbricht die Prostatakapsel
T3a	Extraprostatische Ausbreitung (einseitig oder beidseitig) eingeschlossen mikroskopisch nachweisbare Infiltration des Blasenhalses
T3b	Tumor infiltriert Samenblase(n)
T4	Tumor ist fixiert oder infiltriert andere benachbarte Strukturen als Samenblasen, z. B. Sphincter externus, Rektum, und/oder Levatormuskel und/oder ist an Beckenwand fixiert
Nx	Regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Regionäre Lymphknotenmetastasen
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen
M1a	Nichtregionäre(r) Lymphknoten
M1b	Knochen
M1c	Andere Lokalisation(en)

Typisch für das Prostatakarzinom ist ein stadienhafter Krankheitsverlauf. Im Frühstadium der Erkrankung ist das Tumorgewebe auf die Prostata begrenzt. Die Patienten sind meist asymptomatisch, häufig wird die Erkrankung im Rahmen einer Routineuntersuchung entdeckt.

Die Therapieoptionen sind abhängig von Alter, Komorbidität und individueller Präferenz des Patienten. Neben der Strahlentherapie und der operativen Entfernung der Prostata (radikale Prostatektomie) bietet sich bei Patienten mit niedrigem Risikostadium auch die aktive Überwachung oder eine fokale Therapie an (Leitlinie Prostatakarzinom 2019). Für die drei Therapieverfahren (Strahlentherapie, Prostatektomie, aktive Überwachung) konnten in der 10-Jahres-Überlebensrate nach Erstdiagnose des lokalisierten Prostatakarzinoms keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Hamdy et al. 2016).

Im Spätstadium der Erkrankung hat das Prostatakarzinom die Organgrenzen überschritten. Neben unspezifischen Beschwerden wie Fatigue und Gewichtsverlust können abhängig von Ausbreitung und Infiltration der Nachbarorgane Symptome wie Harnverhalt, Hämaturie und Inkontinenz auftreten. Da die Metastasierung vor allem ossär in Wirbelsäule und Becken

erfolgt, kommt es nach Metastasenbildung zudem häufig zu Knochenschmerzen und -frakturen, sowie Lähmungserscheinungen.

Die Therapie des metastasierten Prostatakarzinoms ist palliativ und besteht aus einer hormonablativen Therapie, ggf. in Kombination mit einer Chemotherapie.

Wie Huggins und Hodges (1972) erstmals zeigen konnten, ist das Wachstum des Prostatakarzinoms abhängig von männlichen Sexualhormonen. Dies wird klinisch genutzt, indem durch chemische oder chirurgische Kastration der Testosteronspiegel des Patienten auf einen Zielwert unter 50 ng/dl gesenkt wird. Durch den Hormonentzug kann das Fortschreiten der Erkrankung häufig stark verlangsamt und die Lebensqualität des Patienten verbessert werden. Nichtsdestotrotz kann eine hormonablative Therapie auch mit Nebenwirkungen wie Hitzewallungen, Gynäkomastie und Osteoporose verbunden sein.

Neben der Primärtherapie beim metastasierten Prostatakarzinom kann eine hormonablative Therapie auch adjuvant bei perkutaner Strahlentherapie eines lokal begrenzten Prostatakarzinoms mit mittlerem bis hohem Risikoprofil eingesetzt werden (Leitlinie Prostatakarzinom 2019).

Zeigt sich anhand von PSA-Werten oder radiologischer Bildgebung trotz Androgendeprivation eine Progression, wird der Tumor als kastrationsresistentes Prostatakarzinom (im Englischen *castration-resistant prostate cancer*, CRPC) bezeichnet (Leitlinie Prostatakarzinom 2019).

Ab diesem Zeitpunkt ist das Prostatakarzinom mit einer erhöhten Mortalität assoziiert. Während für Prostatakrebs im Frühstadium (lokalisiert auf Prostata oder auf Prostata mit regionalen Lymphknoten) eine 5-Jahres-Überlebensrate von 100% festgestellt werden konnte, betrug diese für das metastasierte Prostatakarzinom nur noch etwa 30% (Cronin et al. 2018).

### 1.1.3 Häufige genetische Aberrationen

Die maligne Entartung von Zellen entsteht im menschlichen Körper aufgrund von Schädigungen und Veränderungen der Desoxyribonukleinsäure (im Englischen *deoxyribonucleic acid*, DNA). Diese Veränderungen können in Form von Mutationen, Translokationen, Amplifikationen und Deletionen auftreten. Auf dem Feld der Krebsforschung konnten in den letzten Jahrzehnten große Erfolge darin verzeichnet werden, typische Veränderungen des Genoms für bestimmte Krebsarten zu identifizieren und diese therapeutisch zu nutzen. Beispielhaft stehen hierfür die Mutation des Gens *BReast CAncer 1 (BRCA1)* beim Mammakarzinom oder die Philadelphia-Translokation bei der chronischen myeloischen Leukämie (Nowell und Hungerford 1960; Miki et al. 1994).

Mit Hilfe genomweiter Sequenzierungen einer großen Anzahl von Patientenbiopsien und Prostatektomiepräparaten konnten auch für das Prostatakarzinom typische genetische Veränderungen identifiziert werden.

Zu den häufigsten Aberrationen zählen die *ETS (E26 transformation-specific)* Fusionen, die in bis zu 50% aller Prostatakarzinome auftreten (Abeshouse et al. 2015). Hierbei handelt es sich

um Fusionen von Genen, die für Proteine der ETS Familie codieren, und Genen, deren Transkription androgenabhängig induziert wird. Die ETS Familie umfasst eine Gruppe von Transkriptionsfaktoren, die mit über 200 Zielgenen wichtige Prozesse des Zellmetabolismus wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zelle regulieren (Sementchenko und Watson 2000). Es konnte gezeigt werden, dass es dabei besonders häufig zu Fusionen der Gene *ERG* (*ETS-related gene*) und *ETV1* (*ETS translocation variant 1*) mit dem Gen *TMPRSS2* (*transmembrane protease serine subtype 2*) kommt, welches in der Prostata androgenabhängig transkribiert wird (Tomlins et al. 2005). Es kommt durch die Fusion also androgeninduziert zu einer vermehrten Bildung von ETS Transkriptionsfaktoren und somit zu Dysregulation im Zellmetabolismus und Entartung der Zelle.

Ebenfalls häufig treten genetische Veränderungen im PI3K-Akt-Signalweg auf (Robinson et al. 2015).

Robinson et al. (2015) untersuchten Gewebeproben von insgesamt 150 an mCRPC (*metastasized castration-resistant prostate cancer*) erkrankten Männern. Die Patienten waren zuvor hormonablativ mit Enzalutamid, Abirateron oder im Rahmen von klinischen Studien in Kombination mit Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)-Inhibitoren oder Aurorakinase-Inhibitoren behandelt worden. Es zeigten sich den Signalweg betreffende Mutationen in 49% der metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinome, größtenteils in den Genen *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*), *PIK3CA* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*) und *PIK3CB* (*phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta*).

In einer Studie von Grasso et al. (2012) wurden außerdem die Exome von 50 mehrfach vorbehandelten, lethalen CRPCs sowie elf unbehandelten, lokal begrenzten *high-grade* Prostatakarzinomen sequenziert und analysiert. *PTEN* konnte dabei als ein signifikant mutiertes Gen identifiziert werden.

Der PI3K-Akt-Signalweg fördert in der Zelle Prozesse wie Wachstum, Proliferation, Migration und Angiogenese und wird von dem Tumorsuppressor *PTEN* negativ reguliert. Kommt es durch Mutationen zur Inaktivierung von *PTEN*, bewirkt dies ein unkontrolliertes Wachstum und Proliferation der Zelle und trägt so zur Karzinogenese bei (Sarker et al. 2009).

Genetische Aberrationen im Androgenrezeptor (AR) und in dessen konsekutiver Signalkaskade konnten in ca. 70% des metastasierten kastrationsresistenten Prostatakarzinoms (mCRPC) gefunden werden (Robinson et al. 2015). Mit Abstand am häufigsten waren darunter Amplifikationen und Mutationen z. B. in der AR-Ligandenbindungsdomäne zu finden.

Mutationen in der AR-Bindungsstelle ermöglichen es dem Rezeptor beispielsweise, andere Steroidhormone (z. B. Cortisol und Östrogen) oder auch Rezeptorantagonisten als agonistische Liganden zu nutzen. Der AR kann sich aber auch derart verändern, dass gar keine Ligandenbindungsdomäne mehr vorhanden ist: AR-Spleißvarianten umgehen den Weg der Aktivierung durch Ligandenbindung und sind konstitutiv als Transkriptionsfaktoren aktiv.

Selbst ohne Mutation im Rezeptor kann die Aktivität des AR durch zelluläre Prozesse wie posttranslationale Modifikationen und Alterationen in AR-Kofaktoren (Repression von Korepressoren oder Aktivierung von Koaktivatoren) moduliert werden, sodass plötzlich viel geringere Androgenmengen eine ähnliche Aktivierung des Rezeptors bewirken. Auch konnten alternative Quellen der Androgenproduktion identifiziert werden. Die Androgenvorstufen Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Androstendion (ASD) werden in der Nebennierenrinde produziert und im Tumor in Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt, sodass trotz Kastration weiterhin eine geringe Androgenkonzentration besteht. Außerdem konnte festgestellt werden, dass unter Androgenentzug der Glukokortikoidrezeptor (GR) hochreguliert wird und für Transkription von AR-Zielgenen verantwortlich ist (Knudsen und Penning 2010; Watson et al. 2015).

Als eines der am häufigsten deletierten Gene konnte zudem das Gen *CHD1* (*Chromodomain-helicase-DNA binding protein 1*) identifiziert werden (Grasso et al. 2012; Huang et al. 2012; Burkhardt et al. 2013; Augello et al. 2019; Zhang et al. 2020). *CHD1* codiert für das *Chromodomain-helicase-DNA binding protein 1*, einem ATP-abhängigen Chromatinremodulator. Huang et al. (2012) untersuchten die Genome von 86 primären PCas und konnten *CHD1*-Deletionen in 17% der Proben feststellen. Während in der o. g. Studie von Robinson et al. (2015) in nur 9% der Biopsien *CHD1*-Aberrationen auftraten, fanden sich in der o. g. Studie von Grasso et al. (2012) in bis zu 27% des untersuchten Materials Alterationen des Gens. Außerdem konnte gezeigt werden, dass *CHD1*-Alterationen häufiger im CRPC als im frühen Prostatakarzinom auftreten. Dies gibt Hinweis auf einen möglichen Zusammenhang zwischen *CHD1*-Aberration und Kastrationsresistenz.

## 1.2 Epigenetik

Die DNA liegt in eukaryotischen Zellen als Chromatin organisiert im Zellkern vor. Das Chromatin setzt sich aus DNA, RNA (*ribonucleic acid*) und Proteinen zusammen und besteht aus vielen sich wiederholenden Untereinheiten, den Nukleosomen. Ein Nukleosom bezeichnet dabei den Komplex aus DNA und Histonen, bei dem die DNA um ein Histonoktamer gewunden ist, bestehend aus jeweils zwei Einheiten der vier Histonproteine H2A, H2B, H3, H4 (Kornberg 1974).

Chromatin liegt im Zellkern in Form von Heterochromatin oder Euchromatin vor. Heterochromatin bezeichnet die stark kondensierten Bereiche des Chromatins. Diese sind schlecht zugänglich für Enzyme und assoziiert mit geringer Genexpression. Als Euchromatin werden die gering kondensierten, offenen Bereiche des Chromatins bezeichnet. Große Abschnitte der DNA sind zugänglich für Enzyme der Translation und Transkription, sodass diese Bereiche mit hoher Genexpression assoziiert sind (Cheung und Lau 2005).

### 1.2.1 Epigenetische Modifikationen

Die Struktur und Konformation des Chromatins ändert sich kontinuierlich durch Interaktionen mit unterschiedlichen Enzymen und Modulatoren.

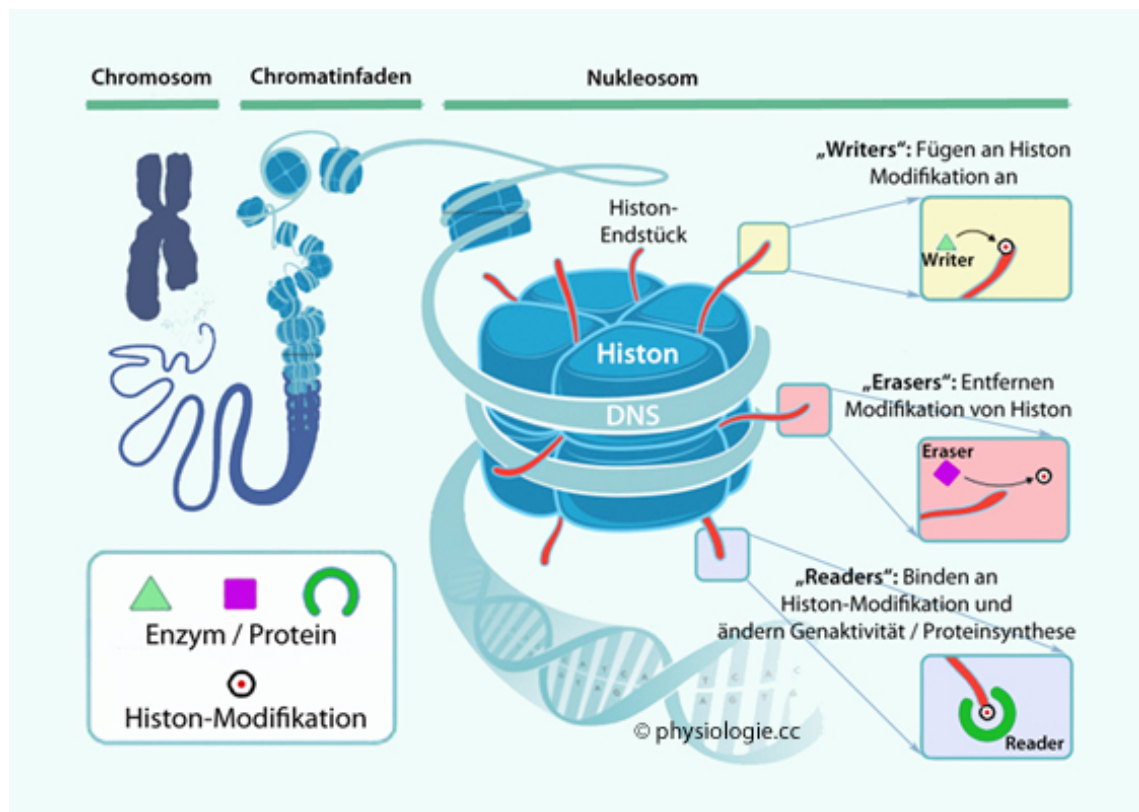
Eine zentrale Rolle in diesem Prozess nehmen die Histone ein. Neben einer globulären Domäne weisen Histone verschiedene N- und C-terminale Enden von Aminosäureketten auf, die aus dem Nukleosom herausragen. Diese Enden können Ziel verschiedener posttranslationaler Modifikationen werden und dadurch zu Veränderungen in der Chromatinstruktur führen (Campos und Reinberg 2009). Abbildung 1-1 stellt den Aufbau eines Nukleosoms schematisch dar.

Die posttranslationalen Modifikationen können in Form von Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinierung und ADP-Ribosylierung stattfinden und sind spezifisch für bestimmte Aminosäuren an bestimmten Histonen. Zusammen bilden sie ein komplexes Muster von Histonmodifikationen, welches auch als der Histon-Code bezeichnet wird. Die Modifikationen können einerseits selber Konformationsänderungen im Chromatin durch elektrostatische Wechselwirkungen herbeiführen. Vor allem dient der Histon-Code aber als Leseraster für spezifische Proteine, die DNA-Proteininteraktionen wie Transkription kontrollieren und somit die Genexpression hoch-oder runterregulieren können (Strahl und Allis 2000; Jenuwein und Allis 2018).

Bestimmte epigenetische Modifikationen sind dabei entweder mit Gen-Aktivierung oder Gen-Suppression assoziiert.

Acetylierungen wie die Histon-3-Lysin-27-Acetylierung (H3K27ac) finden nur an Lysinen statt und korrelieren mit Gen-Aktivierung, da die elektrostatische Wechselwirkung zwischen Histon und DNA unterbrochen wird und die DNA so zugänglich für Transkriptionsenzyme ist (Creyghton et al. 2010).

Methylierungen können sowohl Marker für Gen-Aktivierung als auch Gen-Suppression sein. Während die Trimethylierung von Lysin 4 an Histon 3 (H3K4me3) mit aktiver Transkription des anliegenden Genabschnitts assoziiert ist, ist die Histon-3-Lysin-27-Trimethylierung (H3K27me3) ein Marker für Gensuppression und somit ein Gegenspieler der Acetylierung an dieser Stelle (Campos und Reinberg 2009).



**Abbildung 1-1: Histonmodifikationen (aus physiologie.cc).** Die Abbildung zeigt schematisch, wie verschiedene Enzyme mit den Seitenketten eines Histons interagieren. Die Verwendung der Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Helmut Hinghofer-Szalkay.

## 1.2.2 Epigenetische Regulatoren

Epigenetische Regulatoren lassen sich vereinfacht in drei Gruppen einteilen: *Writer*, *Eraser* und *Reader* (siehe Abbildung 1-1).

*Writer* sind Enzyme wie Methyl- und Acetyltransferasen, die die Bindungen von Histonmodifikationen an die Aminogruppen der Histone katalysieren. Als *Eraser* werden dementsprechend Regulatoren bezeichnet, die diese Bindungen wieder lösen, z. B. Histondeacetylasen (HDACs). Die Gruppe der *Reader* bezeichnet Proteine, die Histonmodifikationen lesen, da sie bestimmte Strukturen wie Chromodomänen oder Bromodomänen tragen, die an die Modifikationen binden. In Folge dessen interagieren sie mit dem Chromatin, können Konformationsänderungen bewirken und weitere Enzyme wie Transkriptionsfaktoren rekrutieren, um so die Genexpression zu regulieren (Nagarajan und Johnsen 2016; Jenuwein und Allis 2018).

Berger et al. (2009) beschreiben Epigenetik als Erklärung für einen Phänotyp, der nicht auf Änderungen in der DNA-Sequenz, sondern auf strukturellen Veränderungen im Chromosom basiert. Epigenetische Regulation spielt eine zentrale Rolle in Entwicklungsprozessen wie Embryogenese, Zelldifferenzierung und Zellwachstum. Bei der Differenzierung von

Stammzellen werden durch epigenetische Mechanismen bestimmte Genexpressionsprofile aktiviert, die zum organspezifischen Phänotyp der Zelle führen. Im späteren Leben ermöglichen diese es der Zelle dann, auf extrazelluläre Signale zu reagieren. Epigenetische Regulation stellt somit also auch eine Kommunikationsmöglichkeit zwischen der Umwelt und dem Genom dar (Badeaux und Shi 2013).

Anomalitäten in der epigenetischen Regulation konnten in den letzten Jahren als Treiber für die maligne Entartung von Zellen identifiziert werden. Während Krebs lange Zeit nur als Folge von Veränderungen in der DNA-Sequenz betrachtet wurde, wird zunehmend deutlich, dass epigenetische Fehlregulationen und daraus resultierende Veränderungen in den Genexpressionsprofilen eine zentrale Rolle in tumorspezifischen Prozessen wie Zellproliferation, Metastasierung oder Angiogenese spielen. Gleichzeitig bieten epigenetische Veränderungen völlig neue Optionen in der Therapie von Krebserkrankungen, da sie im Gegensatz zu genetischen Veränderungen reversibel sind (Sharma et al. 2010; Baylin und Jones 2011).

### 1.2.3 CHD1

Das *Chromodomain-helicase-DNA binding protein 1* ist ein ATP-abhängiger Chromatinremodulator, der aus einer Tandem-Chromodomäne, einer zentralen SNF2-like-ATPase-Domäne und einer DNA-Bindedomäne besteht (Delmas et al. 1993; Woodage et al. 1997). Mithilfe der Tandem-Chromodomäne bindet CHD1 im Menschen an die Histonmodifikation H3K4me2/3 (siehe Abbildung 1-2, Flanagan et al. 2005; Sims et al. 2005). Es fungiert somit als *Reader*-Protein und ist mit dekondensierter Chromatinstruktur assoziiert (Stokes und Perry 1995). CHD1 spielt eine wichtige Rolle in der Strukturierung von Chromatin, insbesondere in der Organisation von Nukleosomen (McKnight et al. 2011). So konnte gezeigt werden, dass CHD1 mit anderen Chromatinremodulatoren und Elongationsfaktoren interagiert und während der Translation die Chromatinstruktur stabilisiert (Kelley et al. 1999; Simic et al. 2003; Smolle et al. 2012).

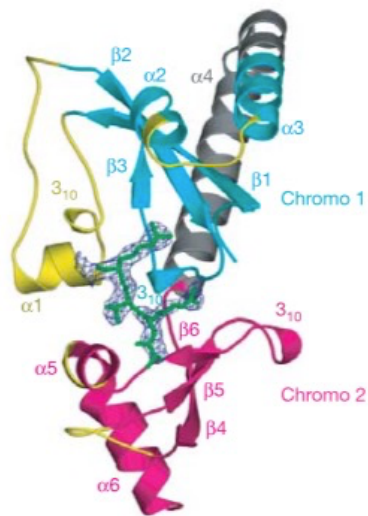
Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass CHD1 in Prostatakarzinomzellen eine wichtige Rolle bei der Reparatur von DNA- Doppelstrangbrüchen einnimmt (Kari et al. 2016). CHD1 ist dabei verantwortlich für die Rekrutierung des CtBP (*C-terminal binding protein*) *interacting protein* (CtIP). Der Verlust von CHD1 machte die Prostatakarzinomzellen in dieser Studie anfällig für die Behandlung mit DNA-schädigenden Stoffen und PARP-Inhibitoren.

CHD1 spielt zudem eine Rolle bei Prozessen der Zelldifferenzierung. Baumgart et al. (2017) konnten zeigen, dass CHD1 in mesenchymalen Stammzellen die Aktivierung Osteoblastenspezifischer Gene induziert und vermehrt an der *Transcription Start Site* (TSS) dieser Gene bindet.

In einer Arbeit von Zhang et al. (2020) konnte zuletzt nachgewiesen werden, dass der Verlust von CHD1 die Resistenzentwicklung gegen den AR-Inhibitor Enzalutamid in Prostatakrebszellen fördert. Die Depletion des Chromatinremodulators resultierte dabei in einer



Chromatindysregulation und Aktivierung pathologischer zellulärer Differenzierungsprozesse durch die Transkriptionsfaktoren NR3C1, POU3F2, NR2F1 und TBX2.



**Abbildung 1-2: Strukturelle Darstellung der Bindung zwischen CHD1 und H3K4me3 (aus Flanagan et al. 2005).** Die Histonmodifikation H3K4me3 ist in grün dargestellt, die beiden Chromodomänen in rot und türkis. Die Verwendung der Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Springer-Nature.

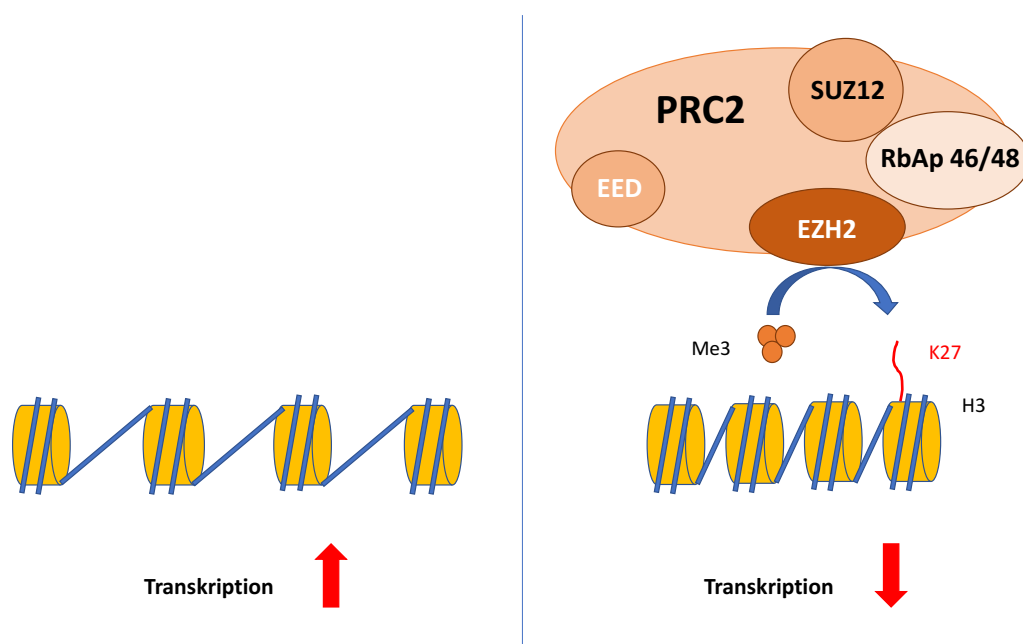
#### 1.2.4 Polycomb repressive complex 2

Der *Polycomb repressive complex 2* (PRC2) gehört zusammen mit dem *Polycomb repressive complex 1* (PRC1) der Familie der *Polycomb-group* (PcG) Proteine an. Diese Multiproteinkomplexe wirken mithilfe verschiedener Mechanismen repressiv auf die Expression von Genen ein (Morey und Helin 2010).

Der PRC2 setzt sich aus den Proteinen EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*), EED, SUZ12 sowie dem Histonbindeproteinen RbAp46/48 zusammen. Die katalytische Untereinheit EZH2 fungiert als Methyltransferase und vermittelt im Zusammenspiel mit anderen Komponenten des Proteinkomplexes die Mono-, Di- und Trimethylierung von Lysin 27 an Histon 3. EZH2 fungiert also als *Writer*-Protein für die repressiven Histonmodifikationen H3K27me1/2/3 (Pasini et al. 2004b; Viré et al. 2006; Margueron und Reinberg 2011). Abbildung 1-3 stellt den PRC2 schematisch dar.

Die Demethylasen KDM6A und KDM6B (*Lysine-specific demethylase 6A/6B*) nehmen die Rolle der Gegenspieler des PRC2 ein. Sie demethylieren Lysin 27 an Histon 3 und fungieren somit als *Eraser*-Proteine der Histonmodifikation H3K27me3 (Agger et al. 2007).

PcG-Komplexe spielen unter anderem eine wichtige Rolle in der epigenetischen Regulation von embryonalen Stammzellen (ES-Zellen). Diese undifferenzierten Zellen zeichnen sich dadurch aus, dass sie pluripotent sind und aus ihnen fast jede Art von embryonalem Gewebe hervorgehen kann (Boiani und Schöler 2005). Ob und wie sich eine ES-Zelle differenziert, wird unter anderem durch posttranslationale Histonmodifikationen reguliert. PRC1 und PRC2 sind hierbei zentrale Elemente, da sie die Bindung von repressiven Modifikationen an bestimmten Regionen des Genoms vermitteln, welche die Differenzierung der Zelle regulieren. In diesen bivalenten Domänen sind neben repressiven auch aktivierende Histonmodifikationen zu finden. Es wird davon ausgegangen, dass dadurch zelluläre Differenzierungsprozesse effektiv gesteuert und initiiert werden können (Azuara et al. 2006; Bracken et al. 2006; Fisher und Fisher 2011).



**Abbildung 1-3: Schematische Darstellung des PRC2 als Methyltransferase (nach Pasini et al. 2004a).** Die Untereinheiten EZH2, EED, Suz12 und RbAp46/48 bilden den PRC2. EZH2 katalysiert die Trimethylierung von Lysin 27 (K27) an Histon 3 (H3).

### 1.3 Fragestellung und Versuchsaufbau

Vorherige Arbeiten (Grasso et al. 2012; Abeshouse et al. 2015; Kari et al. 2016) konnten zeigen, dass *CHD1*-Mutationen häufiger in kastrationsresistenten Prostatakarzinomen auftreten als in früheren Stadien der Erkrankung.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit soll nun die Rolle des Chromatinremodulators CHD1 im CRPC genauer charakterisiert werden. Mechanismen, die zu der Entstehung einer Kastrationsresistenz beitragen und androgenunabhängiges Wachstum begünstigen, sollen dabei näher untersucht werden.

Mithilfe von biochemischen und molekularbiologischen Methoden soll untersucht werden, wie sich verschiedene epigenetische Regulatoren und Modifikationen unter *CHD1*-KD und Androgenentzug verändern.

Ziel der Arbeit ist es, durch Analyse der epigenetischen Landschaft differentiell regulierte Gene und Signalwege zu identifizieren, die zu Krankheitsprogress und Kastrationsresistenz beitragen. Nicht zuletzt sollen dadurch mögliche neue Ansatzpunkte für Inhibitoren und Therapeutika aufgedeckt werden, um somit einen Beitrag zur Therapie des Prostatakarzinoms zu leisten.

Im Vorfeld der Arbeit wurde ein *in vitro* Zellmodell etabliert. Durch lentivirale Transduktion einer *small hairpin RNA* (shRNA) konnte ein stabiler *CHD1*-KD in zwei Gruppen der humanen Zelllinie LNCaP (*Lymph Node Carcinoma of the Prostate*) erreicht werden, die im Folgenden als LNCaP sh2 und LNCaP sh4 bezeichnet werden. Als Kontrollgruppe wurden LNCaP-Zellen mit einer *non-targeting shRNA* transduziert, im Folgenden als NT bezeichnet, um einen alleinigen Effekt durch Transduktion auszuschließen. Des Weiteren wurden Wildtyp LNCaP-Zellen untersucht, im Folgenden als WT bezeichnet.

Um den Effekt des Hormonentzugs auf die Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen für einige der folgenden Experimente in zwei verschiedenen Medien kultiviert, FBS Medium und CSS Medium (siehe Material und Methoden). Entsprechend werden im Folgenden der Übersicht halber Abkürzungen für die verschiedenen Versuchsgruppen verwendet, die sich aus dem verwendeten Medium (FBS oder CSS) und dem *CHD1*-Status (NT, sh2, sh4, WT) zusammensetzen. Tabelle 1-2 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen mit entsprechendem Knockdown- und Hormonstatus:

**Tabelle 1-2: Abkürzungen und Charakteristika der Zelllinien.**

Abkürzung	Zelllinie	<i>CHD1</i> -KD	Androgenentzug
FBS NT	LNCaP	nein	nein
FBS sh2	LNCaP	ja	nein
FBS sh4	LNCaP	ja	nein
CSS NT	LNCaP	nein	ja
CSS sh2	LNCaP	ja	ja
CSS sh4	LNCaP	ja	ja
FBS WT	LNCaP	nein	nein
CSS WT	LNCaP	nein	ja

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

Tabelle 2-1: Geräte

Gerät	Firma
CFX Connect Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
ChemiDoc XRS+ Imager	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Cytometer Celigo	Cytellect Inc., San Diego, USA
DynaMag-96 Seitenmagnet	Life Technology, Carlsbad, USA
Elektrophoreseeinheit Horizon	Life Technology, Carlsbad, USA
Fluorometer Qubit 2.0	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Flüssigkeits-Absaugsystem BVC control	Vacuubrand GmbH, Wertheim
Gefrierschrank -20°C Premium	Liebherr GmbH, Biberach
Gefrierschrank -80°C U535 Innova	New Brunswick Scientific, Edison, USA
Gefrierschrank -150°C MDF-C2156VAN	Panasonic, Kadoma, Japan
Inkubator HERAcell 150i CO <sub>2</sub>	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Kühlgerät Minichiller	Diagenode SA, Liège, Belgium
Kühlschrank +4°C FKU 1800	Liebherr GmbH, Biberach
Magnetrührer ICT Basic	IKA-Werke GmbH, Staufen
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon, Tokyo, Japan
Mikrowelle	Sharp, Osaka, Japan
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Mini-PROTEAN Tetra Cell	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Netzteil PowerPac Basic	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
Netzteil PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA
pH-Meter inoLab	WTW GmbH, Weilheim
Pipetten Research plus	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Pipet-Aid XP	Drummond Scientific Co., Broomall, USA
Rollenmischer RM5-30V	Labortechnik Fröbel GmbH, Lindau
Sicherheitswerkbank Safe 2020	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sonicator Bioruptor Pico	Diagenode SA, Liège, Belgium
Sonicator Bioruptor Plus	Diagenode SA, Liège, Belgium
Spektrophotometer DeNovix DS-11	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Thermal Cycler C1000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
ThermoMixer C	Eppendorf AG, Hamburg
Vortex Genie 2	Electro Scientific Industr. Inc., Portland, USA
Waage LE623S	Sartorius AG, Göttingen
Wasserbad Isotemp	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zählkammer (Neubauer)	Heinz Herenz Medizinalbedarf GmbH, Hamburg
Zentrifuge Fesco 21	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge Megafuge 1.OR	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
2100 Bioanalyser	Agilent Technologies, Santa Clara, USA

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2-2: Verbrauchsmaterialien**

Material	Firma
Bioruptor Microtubes mit Kappen, 1,5 ml	Diagenode SA, Liège, Belgium
Blotting Membran Amershan Protran 0,45 NC	GE Healthcare Europe GmbH, München
Celigo Multiwellplatte, 24 Well	Corning Inc., New York, USA
Cryo.S, PP, 2ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
DNA LoBind Tube, 1,5 ml	Eppendorf AG, Wessling-Berzdorf
Einmalspritze NORM-JECT	Henke Sass Wolf GmbH, Tuttlingen
High Sensitivity DNA Chips	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
Röhrchen, PP, Cellstar <sup>®</sup> 15 und 50ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
PCR Platte, weiß, 96-well	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Pipettenspitzen	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter	Ratiolab GmbH, Dreieich
Reagiergefäß, PP, SafeSeal, 1,5ml und 2ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Spritzenvorsatzfilter, CA- Membran	Th. Geyer GmbH, Renningen
Stripette Costar, 5ml, 10ml, 25ml	Corning Inc., New York, USA
Zellkultur Multiwellplatte, Cellstar 6 well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkultur Schale Cellstar 100x20 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellkultur Schale Cellstar 145x20 mm	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Zellschaber, 16cm und 25 cm	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

### 2.1.3 Chemikalien

**Tabelle 2-3: Chemikalien**

Chemikalie	Firma
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Agencourt AMPure XP Beads	Beckman Coulter Inc., Brea, USA
Aktivkohlegefiltertes fetales Kälberserum (CSS)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumsulfat ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Aprotinin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
β-Glycerophosphat (BGP)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs)	Promega GmbH, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GmbH & Co., KG, Karlsruhe
dNTPs	Jena Bioscience GmbH, Jena
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co., KG, Karlsruhe
Ethanol 100%	Merck KGaA, Darmstadt
Fetales Kälberserum (FBS)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Formaldehyd 37%	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Indol-3-essigsäure (IAA)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt

<b>Chemikalie</b>	<b>Firma</b>
Leupeptin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Lineares Acrylamid	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Lithiumchlorid (LiCl)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumazid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumdesoxycholat	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
N-Ethylmaleinimid (NEM)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Nickel-chlorid (NiCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Nonidet P-40	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
PBS Tabletten	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Pefabloc	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Penicillin-Streptomycin Lösung	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Ponceau	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Präzipitant, pink	Bioline, Luckenwalde
Protein A Sepharose CL-4B	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
RNase inhibitor	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Roti-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Rotiphose Gel 30	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
RPMI Medium 1640 (1X)	GIBCO, Invitrogen GmbH, Darmstadt
Sepharose CL-4B	GE Healthcare, Uppsala, Sweden
SYBR Green I	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Trehalose	Pancreac AppliChem GmbH, Darmstadt
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	AppliChem GmbH, Darmstadt
Trizol	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Life Technology, Carlsbad, USA
Tween-20	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

#### 2.1.4 Reagenzien und Kits

Tabelle 2-4: Reagenzien und Kits

<b>Reagenz</b>	<b>Firma</b>
Immobilon Western HRP	Millipore, Billerica, USA
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Qubit dsDNA HS Assay	Life Technology, Carlsbad, USA
SuperSignal West Femto Maximum	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Truseq ChIP Sample Preparation Kit, Set A+B	Illumina, San Diego, USA

## 2.1.5 Puffer und Medien

**Tabelle 2-5: Puffer, Lösungen und Medien**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Blocklösung	1x TBS-T
	5% Milchpulver (w/v)
ChIP Waschpuffer	8 M LiCl
	0,5 M EDTA (pH 8)
	1 M Tris-HCl (pH 8,5)
<i>Cross-linking</i> Puffer	1x PBS
	37% Formaldehyd
CSS Zellkulturmedium	1x RPMI Medium 1640 (1X)
	10% CSS
	100 U/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	1% L-Glutamin
Einfriermedium	42% FBS Zellkulturmedium
	50% FBS
	8% DMSO
FBS Zellkulturmedium	1x RPMI Medium 1640 (1X)
	10% FBS
	100 U/ml Penicillin
	100 µg/ml Streptomycin
	1% L-Glutamin
IP Puffer	5 M NaCl
	0,5 M EDTA (pH 8)
	1 M Tris-HCl (pH 8,5)
	10% Nonidet P-40 (v/v)
	0,5% NaF
	10% Natriumdesoxycholat (w/v)
	10% SDS
Laemmli Puffer (6x)	0,35 M Tris-HCl (pH 6,8)
	30% Glycerin
	10% SDS (w/v)
	9,3% Diethiothreitol (DTT)
	0,02% Bromphenolblau
Laufpuffer	200 mM Glycin
	25 mM Tris
	0,1% SDS (w/v)
<i>Nuclear Preparation</i> Puffer	5 M NaCl
	0,5 M EDTA (pH 8,0)
	1 M Tris (pH 7,5)
	10% Nonidet P-40 (v/v)
	10% Triton-X-100 (v/v)
	0,5 M NaF
PBS	1 Tablette PBS gelöst in 500 ml H <sub>2</sub> O dest.

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
qPCR Puffer	75 mM Tris-HCl (pH 8,8)
	20 mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
	0,01% Tween-20
	3 mM MgCl <sub>2</sub>
	200 µM dNTPs
	0,5 U/Reaktion Taq DNA Polymerase
	0.25% Triton X-100
	300 mM Trehalose
	30 nM Primer
RIPA Lysepuffer	1:80000 SYBR Green I
	1x PBS
	0,5% Natriumdesoxycholat (v/v)
	1% NP-40 (v/v)
SDS Sammelgel (5%)	0,1% SDS (w/v)
	5% Acrylamid
	375 mM Tris-HCl (pH 6,8)
	0,1% APS (v/v)
SDS Trenngel (X%)	0,1% TEMED
	X% Acrylamid
	375 mM Tris-HCl (pH 8,8)
	0,1% SDS (w/v)
Sonifizierungspuffer 1	0,1% APS (v/v)
	0,04% TEMED
	0,5 M EDTA (pH 8)
Sonifizierungspuffer 2	1 M Tris-HCl (pH 8)
	1% SDS
	5 M NaCl
	0,5 M EDTA (pH 8)
	1 M Tris-HCl (pH 8)
TBS	10% Nonidet P-40 (v/v)
	0,5 M NaF
	150 mM NaCl
	2,68 mM KCl
TBS-T	4,29 mM Natriumdihydrogenphosphat
	1,47 mM Kaliumdihydrogenphosphat (pH 7,4)
TE Puffer	1x TBS
	0,1% Tween-20 (v/v)
Transferpuffer	1 M Tris-HCl (pH 8)
	0,5 M EDTA (pH 8)
Verdünnungspuffer	10% Western Salts (10x) (v/v)
	15% Methanol (v/v)
	5 M NaCl
	0,5 M EDTA (pH 8,0)
<i>Western Salts</i> (10x)	1 M Tris-HCl (pH 8)
	10% Nonidet P-40 (v/v)
	0,5 M NaF
	10% Natriumdesoxycholat (w/v)
	1,92 M Glycin
	250 mM Tris-HCl (pH 8,3)
	0,02% SDS (w/v)



### 2.1.6 Enzyme

**Tabelle 2-6: Enzyme**

Enzym	Firma
Taq DNA Polymerase	Prime Tech, Minsk, Weißrussland
Reverse Transkriptase (M-MuLV)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Reverse Transkriptase Reaktionspuffer 10X (M-MuLV)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Proteinase K	Life Technology, Carlsbad, USA
RNase A	Qiagen GmbH, Hilden
RNase Inhibitor	New England Biolabs, Frankfurt am Main

### 2.1.7 Inhibitoren

**Tabelle 2-7: Proteaseinhibitoren**

Inhibitor	Konzentration
Aprotinin/Leupeptin	1 mM
BGP	10 mM
IAA	10 $\mu$ M
NEM	1 mM
NiCl <sub>2</sub>	1 mM
Pefabloc	1 mM

**Tabelle 2-8: Inhibitoren**

Inhibitor	Quelle
JQEZ5	<a href="#">Zhang et al. 2016</a>

### 2.1.8 Komigrationsstandards

**Tabelle 2-9: Komigrationsstandards**

Standard	Firma
Gene Ruler DNA-Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
PageRuler Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot

## 2.1.9 Vektoren

**Tabelle 2-10: Vektoren**

Name	Sequenz	Quelle
GIPZ shRNA-CHD1 #1 Clone V3THS_312675	TTTTTGTAAGAACTCCCT	Dharmacon Inc (Lafayette, USA)
GIPZ shRNA-CHD1 #2 Clone V2THS_112971	ATAATTCAGAAATGAGATC	Dharmacon Inc (Lafayette, USA)
GIPZ non-targeting- control	TACTCTCGCCCAA-GCGAG	Dharmacon Inc (Lafayette, USA)

### 2.1.10 Primer

Alle Primer wurden mithilfe des Primer Designing Tools der NCBI Website (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) entworfen und bei der Firma Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA erworben. Die Sequenz ist in Richtung 5'-3' angegeben. Für die Reverse Transkription wurden unspezifische 9mer Primer der Firma Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA benutzt.

**Tabelle 2-11: Genexpressionsprimer**

Gen	Sequenz	Quelle
EZH2 F	GACCTCTGTCTTACTTGTGGAG	Diese Arbeit
EZH2 R	CGTCAGATGGTGCCAGCAATAG	Diese Arbeit
GAPDH F	ATGGGAAGGTGAAGGTCG	Diese Arbeit
GAPDH R	GCATTGATGGCAACAATA	Diese Arbeit

**Tabelle 2-12: ChIP-Primer**

Gen	Sequenz	Quelle
OLIG2 F	ATGCACGACCTCAACATCGCC	Diese Arbeit
OLIG2 R	CTGGACGCGGGTACCTATAA	Diese Arbeit
TFF1 R	ACACCCACCTTCCACAACAC	Diese Arbeit
TFF1 F	CAGGCTTCTCCCTTGATGAAT	Diese Arbeit
GAPDH TSS R	AAGAAGATGCGGCTGACTGT	Diese Arbeit
GAPDH TSS F	CGGCTACTAGCGGTTTACG	Diese Arbeit
GRHL3 F	ACTGTGGAGCACATTGAGGA	Diese Arbeit
GRHL3 R	CTGTGCTCAGACAGTTTACGC	Diese Arbeit
SSRP1 F	TCACAGTGCCAGGCAACTTCC	Diese Arbeit
SSRP1 R	ACAGGTGGCTTGTGGACGTA	Diese Arbeit

### 2.1.11 Antikörper

Tabelle 2-13: Primärantikörper

Antikörper	Firma	Katalognummer	ChIP	Verdünnung Western Blot
CHD1	Bethyl Laboratories, Montgomery, USA	A301-218A		1:500
CHD1	Diagenode, Liège, Belgien	c15410334	1 µg	
EZH2	Cell Signaling Technology, Cambridge, Vereinigtes Königreich,	5246S	4 µg	1:1000
H3K27me3	Diagenode, Liège, Belgien	c15410195	1 µg	
H3K4me3	Diagenode, Liège, Belgien	c15200152	1 µg	
HSC70	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA	sc-7298		1:30000
IgG	Diagenode, Liège, Belgien	c15410206	1 µg	

Tabelle 2-14: Sekundärantikörper

Antikörper	Firma	Katalognummer	Verdünnung
Anti-mouse (IgG)-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA	sc-358917	1:10000
Anti-rabbit (IgG)-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA	sc-2004	1:10000

### 2.1.12 Zelllinie

Tabelle 2-15: Zelllinie

Name	Spezies	Organ	Quelle
LNCaP	Mensch	Prostata	Horoszewicz et al. 1983

### 2.1.13 Software

**Tabelle 2-16: Software**

<b>Name</b>	<b>Quelle</b>
Bio-Rad CFX Manager 3.1	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
useGalaxy	<a href="https://usegalaxy.org">https://usegalaxy.org</a>
cBioPortal	<a href="http://www.cbioportal.org">http://www.cbioportal.org</a>
Celigo software 2.01	Cytellect Inc., San Diego, USA
GSEA Software	<a href="http://software.broadinstitute.org/gsea/downloads.jsp">http://software.broadinstitute.org/gsea/downloads.jsp</a>
Graph Pad Prism 6	<a href="https://www.graphpad.com/">https://www.graphpad.com/</a>
Image Lab Version 5.2 build 14	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Integrative Genomics Viewer, Version 2.3	<a href="https://software.broadinstitute.org/software/igv/download">https://software.broadinstitute.org/software/igv/download</a>
Tool Venn-Diagramm	<a href="http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/">http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/</a>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Analyse öffentlich verfügbarer Sequenzierungsdaten

Die Analyse öffentlich verfügbarer Sequenzierungsdaten wurde mithilfe der Online-Plattform *cBioportal* durchgeführt (Cerami et al. 2012; Gao et al. 2013).

Verschiedene Studien (Taylor et al. 2010; Barbieri et al. 2012; Grasso et al. 2012; Baca et al. 2013; Hieronymus et al. 2014; Abeshouse et al. 2015; Robinson et al. 2015; Kumar et al. 2016; Fraser et al. 2017; Armenia et al. 2018) wurden hinsichtlich genetischer Alterationen im *CHD1*-Gen untersucht. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte durch die Funktion *Cancer Types Summary*.

### 2.2.2 Zellkultur

#### 2.2.2.1 Verwendete Zelllinie

In dieser Arbeit wurde die Zelllinie LNCaP (*Lymph Node Carcinoma of the Prostate*) verwendet. Sie stellt eine bekannte und häufig verwendete Zelllinie im Bereich der Prostatakrebsforschung dar. Die Zellen wurden 1977 aus der supraklavikulären Lymphknotenmetastase eines 50-jährigen Patienten mit Prostatakarzinom isoliert. LNCaP-Zellen exprimieren einen mutierten AR und sind androgensensibel. Sie sind adhärent und wachsen einzeln oder in Aggregaten bei einer Verdopplungszeit von 60 Stunden (Horoszewicz et al. 1983).

#### 2.2.2.2 Kultivierung der LNCaP-Zellen

Die LNCaP-Zellen wurden bei 37°C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% kultiviert. Als Nährmedium wurde das Medium RPMI-1640 verwendet, versetzt mit 10% fetalem Kälberserum (FBS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1% L-Glutamin. Um einen Hormonentzug zu simulieren, wurde die gleiche Zelllinie bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>-Gehalt in RPMI-1640 Medium kultiviert, welches mit 10% aktivkohlefiltertem fetalen Kälberserum (CSS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und 1% L-Glutamin versetzt wurde.

#### 2.2.2.3 *CHD1*-Knockdown

Um die Rolle von *CHD1* zu untersuchen, wurde im Vorfeld der Arbeit mittels shRNA (*short hairpin RNA*) ein stabiler *CHD1*-KD in der Zelllinie LNCaP durch Dr. med. Oliver Hahn und Dr. rer. nat. Simon Baumgart etabliert. Hierfür wurden die Zellen mit einem pGIPZ Vektor (siehe Abbildung 2-1) lentiviral transduziert. Dieser trägt neben der shRNA auch eine Sequenz für den Marker GFP (Grün fluoreszierendes Protein), sowie eine Ampicillinresistenz.

Durch die Transduktion wurde das DNA-Konstrukt des Vektors stabil in das Genom der Zielzellen integriert. Bei Zellteilung wird es an die Tochterzellen weitervererbt. Der *CHD1*-KD wird insofern erreicht, als dass bei der Transkription auch die shRNA transkribiert wird.

Die entstandene mRNA (messenger RNA) ist komplementär zur mRNA von *CHD1* und bindet diese. Das entstandene Konstrukt kann im Zuge der Proteinbiosynthese nicht mehr korrekt prozessiert werden und der Chromatinremodulator wird vermindert exprimiert.

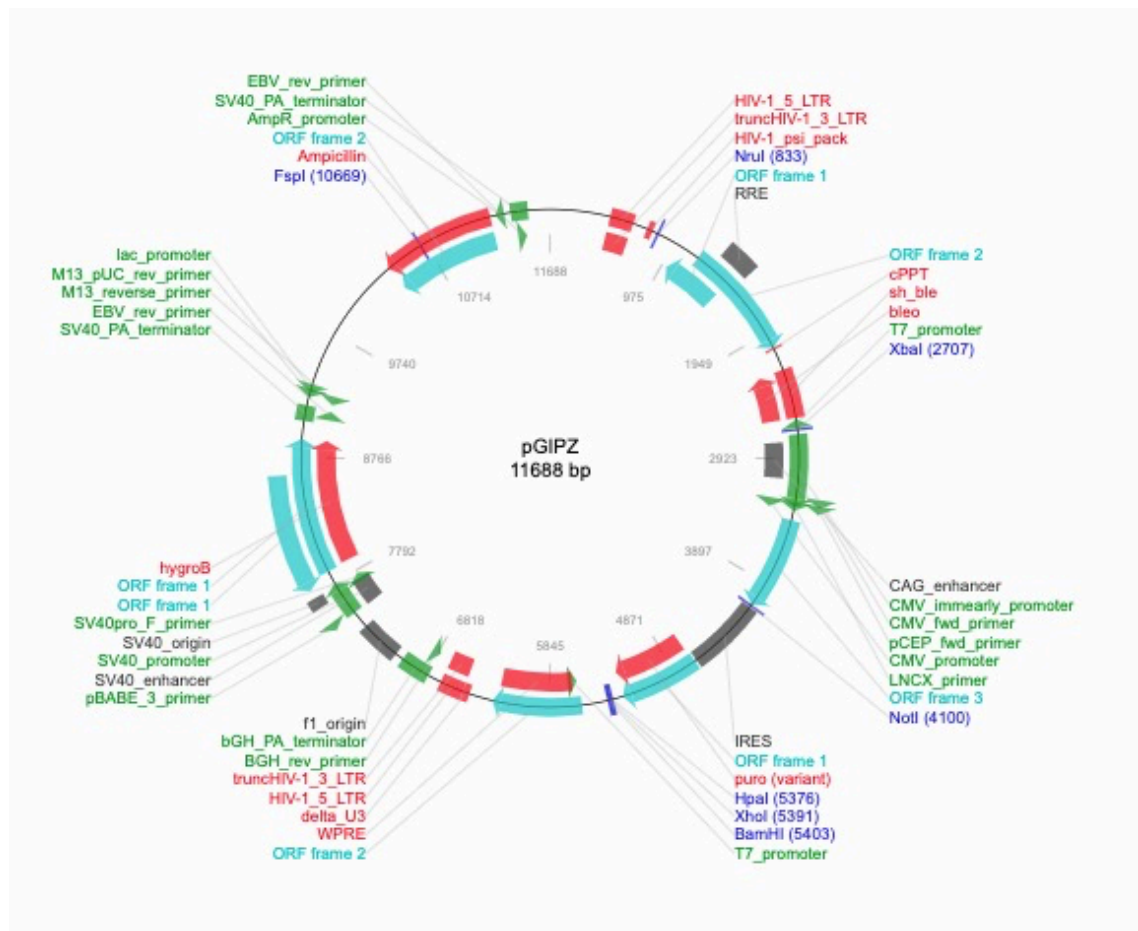


Abbildung 2-1: Vektorenkarte des pGIPZ Vektors (aus addgene.org).

#### 2.2.2.4 Zellproliferation

Zur Überprüfung des phänotypischen Effekts von Knockdowns oder Inhibitoren kann die Zellproliferation gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde hierzu das Celigo Cytometer verwendet. Das Gerät erfasst über mehrere Tage mittels eines automatischen optischen Mikroskops die von den Zellen bedeckte Fläche. Von den Änderungen in der Konfluenz kann dann auf die Proliferationsraten der Zellen geschlossen werden.

Hierzu wurden 5000 Zellen pro Well in 500  $\mu$ l Medium auf einer 24-Well Celigo Multiwellplatte ausgesät. Sowohl der Medienwechsel als auch etwaige Inhibitorbehandlungen fanden alle zwei Tage statt. Die Konfluenz der Zellen wurde mit dem Celigo-Cytometer alle zwei Tage vor dem Medienwechsel bzw. der Inhibitorbehandlung gemessen. Das Experiment wurde in Form von Duplikaten durchgeführt, aus denen dann ein Mittelwert errechnet wurde. Die Werte wurden anschließend zu Tag 1 des Experiments normalisiert.

## 2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.3.1 Zellyse und Proteinkonzentrationsbestimmung

Proteinzusammensetzungen in Zellysaten können Aufschluss darüber geben, inwiefern verschiedene Faktoren wie Gen-Knockdowns, Inhibitorbehandlungen etc. Einfluss auf die Proteinbiosynthese der Zelle haben.

Zur Herstellung von Zellysaten wurden 100000 Zellen pro Well auf einer 6-Well-Multiwellplatte ausgesät. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit 300 µl RIPA-Lysepuffer lysiert, welchem die Proteaseinhibitoren BGP (10 mM), NEM (10 mM), Pefabloc (10 mM) und Aprotinin/Leupeptin (1 mM) hinzugefügt wurden. Anschließend wurden die Proben zehn Minuten im *Sonicator* „*Bioruptor Plus*“ (abwechselnd 30 sek an/30 sek aus) beschallt. Hierbei werden intermolekulare Bindungen durch Ultraschallwellen getrennt. Es kommt dadurch zur Auflösung von Zellmembranen und der Freisetzung intrazellulärer Bestandteile.

Die Proteinkonzentration der Proben wurde anschließend mithilfe der *Nanodrop*-Funktion des Spektrophotometers „*DeNovix DS-11*“ gemessen.

### 2.2.3.2 Western Blot

Mithilfe eines Western Blot, auch Immunoblot genannt, können verschiedene Proteine einer Probe anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt und anschließend immunhistochemisch nachgewiesen werden. Dem eigentlichen Western Blot, der aus dem Proteintransfer und dem Nachweis der Proteine durch spezifische Antikörper besteht (Renart et al. 1979; Towbin et al. 1979), geht die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) voraus.

#### SDS-PAGE

Diese von Laemmli (1970) erstmals beschriebene Technik ermöglicht es, Proteingemische aufgrund der elektrischen Ladung und des unterschiedlichen Molekulargewichts der enthaltenen Proteine aufzutrennen.

Zunächst wurden den Proben 4 µl des 6x Laemmli Puffers beigefügt und diese dann zehn Minuten bei 95°C erhitzt. Die Proben wurden dann auf ein SDS-Sammelgel (5%) geladen. Dem schloss sich, je nach Größe des zu untersuchenden Proteins, ein SDS-Trenngel mit der entsprechenden Konzentration Acrylamid (Gelzusammensetzung siehe Materialteil) an. Die Elektrophorese erfolgte im Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA solange, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Ein Komigrationsstandard wurde zum Vergleich mitgeführt.

#### Proteintransfer

Nach erfolgreicher Größenauftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden diese auf eine Blotting Membran übertragen. Dazu wurde senkrecht zum Gel ein elektrisches Feld

angelegt. Die Übertragung fand im Transferpuffer bei einer konstanten Spannung von 100 V über eineinhalb Stunden statt.

### Proteindetektion

Anschließend wurde die Membran für 30 Minuten bei Raumtemperatur in die Blocklösung gelegt, um unspezifische Antikörperbindungsstellen zu blockieren. Die Membran wurde dann über Nacht bei 4°C in 5 ml Blocklösung inkubiert, versetzt mit einem entsprechenden Primärantikörper (Verdünnung siehe Kapitel 2.11). Am nächsten Tag wurde die Membran zweimal zehn Minuten in TBS-T gewaschen und dann eine Stunde bei Raumtemperatur in einem entsprechenden Sekundärantikörper, ebenfalls gelöst in 5 ml Blocklösung, inkubiert. Die Membran wurde daraufhin wieder zweimal zehn Minuten in TBS-T gewaschen und nach Auftragen der Lumineszenzsubstrats „Immobilon Western HRP“ oder „Super Signal West Femto Maximum“ mithilfe des Imagers analysiert.

Als Kontrolle für eine gleichmäßige Beladung der Taschen wurden bei jeder Membran die Banden des Proteins HSC70 kontrolliert. HSC70 hat ein Molekulargewicht von 70 kDa und wird unabhängig von Knockdowns, Inhibitoren etc. überwiegend gleichmäßig synthetisiert.

## 2.2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.4.1 Quantitative RT-PCR

Um die Genexpression der Zellen unter unterschiedlichen Bedingungen zu untersuchen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Methode der quantitativen RT-PCR (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion) verwendet. Die Technik besteht aus mehreren Schritten: Zunächst wird die RNA der Zelle isoliert. Mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wird dann anhand der isolierten RNA eine komplementäre DNA synthetisiert. Anschließend findet eine quantitative PCR, auch Echtzeit-PCR genannt, statt, die ähnlich funktioniert wie eine konventionelle PCR. Die DNA-Polymerase amplifiziert dabei anhand spezifischer Primersequenzen bestimmte DNA-Sequenzen. Durch zyklisches Wiederholen der Reaktion kommt es zur exponentiellen Vervielfältigung dieser Sequenzen. Der Reaktion wird ein fluoreszierender Farbstoff (*SYBR Green I*) hinzugefügt, der mit der DNA interkaliert. Anhand von Fluoreszenzmessungen nach jedem Zyklus können dann, sozusagen in Echtzeit, die Produkte der Reaktion quantifiziert werden (Freeman et al. 1999).

### RNA Isolation

Es wurden 100000 Zellen pro Well auf einer 6-Well Multiwellplatte ausgesät und für zehn Tage kultiviert. Nach Entfernen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann mit 500 µl Trizol lysiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Oberfläche abgeschabt und in ein 1,5 ml Reagiergefäß überführt. Zur weiteren RNA Isolation wurden 100 µl Chloroform hinzugefügt. Nach etwa 15 sek Durchmischung mithilfe des Vortex wurden die Proben zentrifugiert (13000g, 4°C, 30 min).



Anschließend wurden etwa 200  $\mu\text{l}$  der oberen Phase abgenommen und in ein neues Reagenzgefäß überführt, in welches eine äquivalente Menge an Isopropanol hinzugefügt wurde. Die Proben wurden dann mindestens eine Stunde bei  $-80^{\circ}\text{C}$  zur Präzipitation gelagert. Nach anschließender Zentrifugation (13000g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 30 min) wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Es folgten zwei Waschdurchgänge mit 70% Ethanol. Das verbliebene Pellet wurde in 40  $\mu\text{l}$  Nuklease-freiem Wasser resuspendiert. Die RNA-Konzentration wurde mithilfe des Spektrophotometers „DeNovix DS-11“ gemessen.

#### Komplementäre DNA-Synthese

Zu 500 ng RNA wurden 2  $\mu\text{l}$  unspezifische 9mer Primer (15  $\mu\text{M}$ ) und 4  $\mu\text{l}$  dNTP Mix (2,5 mM) hinzugegeben. Das Volumen wurde mit Nuklease-freiem Wasser auf 16  $\mu\text{l}$  gebracht und dann 5 min bei  $70^{\circ}\text{C}$  erhitzt. Anschließend wurde jeder Probe 2  $\mu\text{l}$  10X Reaktionspuffer, 0,25  $\mu\text{l}$  RNase Inhibitor, 0,125  $\mu\text{l}$  M-MuLV Reverse Transkriptase und 1,625  $\mu\text{l}$  Nuklease-freies Wasser beigefügt und dann bei  $42^{\circ}\text{C}$  für eine Stunde inkubiert. Das Enzym wurde daraufhin für fünf Minuten bei  $95^{\circ}\text{C}$  inaktiviert. Jede Probe wurde abschließend auf ein Volumen von 50  $\mu\text{l}$  gebracht.

#### Quantitative PCR

Pro Reaktion wurden jeweils entweder 1  $\mu\text{l}$  cDNA oder 1  $\mu\text{l}$  ChIP DNA zu 24  $\mu\text{l}$  des qPCR Puffers hinzugefügt. Zur Amplifikation und Analyse wurden die folgenden Protokolle verwendet:

**Tabelle 2-17: Protokoll Genexpression**

	Temperatur	Zeit	Durchgänge
1.	$95^{\circ}\text{C}$	120 sek	1
2.	$95^{\circ}\text{C}$	10 sek	39
3.	$60^{\circ}\text{C}$	30 sek	
4.	$4^{\circ}\text{C}$	bis Ende	1

**Tabelle 2-18: Protokoll ChIP**

	Temperatur	Zeit	Durchgänge
1.	95°C	120 sek	1
2.	95°C	10 sek	45
3.	60°C	30 sek	
4.	25°C	60 sek	1

Für die Experimente wurden jeweils Triplikate verwendet. Eine Standardkurve zur Quantifizierung wurde aus einer Mischung aller Proben und entsprechender Verdünnung erstellt. Im Falle der ChIP DNA wurden nur die Inputs vermischt. Die Expression des Haushaltsgens *GAPDH* (Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase) wurde als Referenz für die Expression anderer Gene genutzt. Die Werte wurden zu einer Ausgangskondition normalisiert und als „relative mRNA Expression“ angegeben. Für die ChIP DNA hingegen wurde jede Kondition zu ihrem Input normalisiert und die Expression als „% des Inputs“ angegeben.

#### Statistische Auswertung

Die Visualisierung und statistische Auswertung der Experimente erfolgte mit dem Programm *Graph Pad Prism 6*. Hierfür wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf einen p-Wert  $\leq 5\%$  festgelegt, im Folgenden gekennzeichnet als  $*$  ( $= p \leq 0,05$ ).

#### 2.2.4.2 Chromatin-Immunpräzipitation

Um DNA-Protein-Interaktionen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit unter anderem die Methode der Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) in einem modifizierten Protokoll nach Nelson et al. (2006) durchgeführt. Die Chromatin-Immunpräzipitation lässt sich vereinfacht wie folgt erklären: Zunächst werden die intrazellulären DNA-Protein-Verbindungen fixiert. Danach wird die DNA in Fragmente von etwa 150-300 bp (*base pairs*) geteilt. Anschließend werden proteinspezifische Antikörper genutzt, um die DNA-Protein-Komplexe zu binden. Sepharose ist der Handelsname für quervernetzte Agarose-Kügelchen, dessen Oberflächen mit Protein A oder G beschichtet sind. Protein A und G binden mit unterschiedlicher Affinität an Antikörper verschiedener Organismen. Mithilfe von Sepharose-Kügelchen (*beads*) werden diese Antikörper, die DNA-Protein-Antikörper-Komplexe präzipitieren, gebunden und können isoliert werden. Die Bindung zwischen Protein und DNA wird im Anschluss wieder gelöst und übrig bleiben die DNA-Fragmente, die mit dem gesuchten Protein assoziiert werden.

#### Fixierung

Die DNA-Protein-Bindungen der Zellen wurden durch 1% Formaldehyd für zehn Minuten fixiert. Durch Zugabe von 1,25 M Glycin für fünf Minuten wurde die Reaktion anschließend gestoppt. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS wurden die Zellen in *Nuclear Preparation* Puffer, versetzt mit den Proteinase-Inhibitoren, resuspendiert und in 1,5 ml

ReagiergefäÙe übetragen. Das nach Zentrifugierung (12000 g, 2 min, 4°C) gebildete Zellkern-pellet wurde dann erneut mit *Nuclear Preparation* Puffer gewaschen.

### Sonifizierung

Das Zellkernpellet wurde anschließend in Sonifizierungspuffer 1 (mit Proteinase-Inhibito-ren) resuspendiert und auf einem rotierenden Rad inkubiert (15 min, 4°C). Nach Hinzufügen eines äquivalenten Volumens Sonifizierungspuffer 2 (mit Proteinase-Inhibitoren) wurden die Proben im Sonicator „Bioruptor Pico“ für zehn Minuten (abwechselnd 30 sek an/30 sek aus) beschallt. Die Proben wurden dann herunterzentrifugiert (12000 g, 2 min, 4°C) und die Überstände in ein neues 1,5 ml Reagiergefäß überführt.

### *Shearing Check*

Um zu überprüfen, ob durch die Beschallung eine erfolgreiche Fragmentierung des Chro-matins stattgefunden hatte, wurde der *Shearing Check* durchgeführt. Dazu wurden 10 µl der Probe zusammen mit 100 µl Sonifizierungspuffer 1 und 1 µl Proteinase K bei 65°C und 800 rpm auf einem *Shaker* über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 µl Wasser, 10 µl LiCl (8 M) und 2 µl *pink precipitant* hinzugegeben und anschließend eine Phenol/Chlo-roform/Isoamylalkohol DNA-Extraktion durchgeführt. Dafür wurden zur Probe 200 µl Phenol/Chloroform/Isoamyl (Verhältnis 25:24:1) hinzugefügt, 30 Sekunden per Vortex durchmischt, zwei Minuten bei 13000 g zentrifugiert und dann die wässrige obere Phase in ein neues Reagiergefäß überführt. Zur weiteren Extraktion der organischen Phase wurde eine Lösung bestehend aus 200 µl 10 mM Tris (pH 8) und 0,4 M LiCl hinzugefügt; es folgten erneut das Durchmischen per Vortex (30 sek) und das Zentrifugieren (13000 g, 2 min). Die wässrige Phase wurde erneut abgenommen und der anderen wässrigen Phase hinzugefügt. Anschließend wurde den Proben 1 ml 100% Ethanol beigefügt und für mindestens eine Stunde bei -80°C inkubiert. Das nach dem darauffolgenden Zentrifugieren (15000 g, 30 min, 4°C) verbliebene DNA-Pellet wurde noch einmal mit 70% Ethanol gewaschen und dann in 15 µl Tris 10 mM (pH 8) und 100 µg/mL RNase A resuspendiert. Abschließend wurde die Probe auf ein 1,5% Agarose-Gel geladen und durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Wenn ein Großteil der DNA- Fragmente der Proben sich im Bereich 150-300 bp befand, hatte zuvor eine erfolgreiche Fragmentierung des Chromatins stattgefunden und die Proben konnten weiter prozessiert werden.

### *Preclearing*

Um unspezifische Bindungen zwischen den Proteinen und der Sepharose zu reduzieren, wurde zuvor eine Aufreinigung der Proben vorgenommen. Hierzu wurden die Proben mit 600 µl Verdünnungspuffer (mit Proteinase-Inhibitoren) verdünnt und es wurden 100 µl einer 50%- Sepharoselösung, gelöst in Verdünnungspuffer, hinzugefügt. Nach Inkubation auf ei-nem rotierenden Rad (1h, 4°C) und anschließender Zentrifugierung (12000 g, 2 min, 4°C) wurden die Proben entsprechend in neue 1,5 ml ReagiergefäÙe aliquotiert. Dabei wurde stets

eine Probe für die Präzipitation mit einem IgG (Immunglobulin G) -Antikörper angelegt und 33% Volumen der Proben als Input aufbewahrt.

Die Präzipitation mit einem IgG-Antikörper dient in diesem Experiment als Negativkontrolle, da IgG normalerweise nicht mit dem Chromatin interagieren sollte. Nichtsdestotrotz weisen diese Proben oft geringe Mengen unspezifischer Bindungen auf, sogenannte *background reads*. Anhand dieser lässt sich später abschätzen, wie spezifisch die anderen Antikörper angereicherte Bindungen anzeigen.

### Immunpräzipitation

Den Proben wurde der jeweilige Antikörper in der entsprechenden Menge (siehe Kapitel 2.11) beigelegt. Dann wurden sie über Nacht bei 4°C auf einem rotierenden Rad inkubiert. Entsprechend des Antikörpers wurden am nächsten Morgen den Proben 30 µl Protein A- oder Protein G- Sepharose hinzugefügt und dann für zwei Stunden bei 4°C auf einem rotierenden Rad inkubiert. Anschließend wurden die Chromatin-Protein-Komplexe, welche durch die Sepharose-Antikörper-Interaktion gebunden wurden, zweimal mit IP Puffer, zweimal mit ChIP Waschlösung, wieder zweimal mit IP Puffer und abschließend zweimal mit TE Puffer gewaschen. Zwischen den Waschschritten wurden die Proben bei 2000 g, 4°C für zwei Minuten zentrifugiert.

### DNA Isolation

Das präzipitierte Chromatin wurde in Tris 10 mM pH 8, versetzt mit RNase A (0,2 µg/µl), resuspendiert und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch anschließendes Hinzufügen von 1 µl Proteinase K (20 mg/ml) und Inkubieren über Nacht auf einem *Shaker* (65°C, 800 rpm) wurden die vorhandenen Protein-DNA-Bindungen getrennt. Am nächsten Tag wurden die Proben zentrifugiert (2000 g, 2 min, Raumtemperatur) und der Überstand in neue 1,5 ml Reagiergefäße übertragen. Der Sepharose wurde ein weiteres Mal Tris 10 mM pH 8 hinzugefügt, die Proben wurden auf einem *Shaker* inkubiert (800 rpm, 10 min, 65°C), runterzentrifugiert (5000 g, 2 min, Raumtemperatur) und der Überstand erneut übertragen. Nach Hinzufügen von 10 µl LiCl (8 M) und 4 µl linearem Acrylamid wurde eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol DNA-Extraktion durchgeführt. Das verbliebene DNA-Pellet wurde abschließend in 40 µl Wasser resuspendiert.

### Kontrolle

Um zu kontrollieren, ob eine erfolgreiche Chromatin-Immunpräzipitation stattgefunden hatte, wurden anschließend quantitative PCRs mit den Proben durchgeführt.

## 2.2.5 Next Generation Sequencing

*Next Generation Sequencing* ermöglicht die Bestimmung von Nukleotidabfolgen in DNA- oder RNA-Strängen und wird in Form von unterschiedlichen Methoden eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde eine bereits durchgeführte Sequenzierung von RNA (RNA-Seq) analysiert. Außerdem wurde die Sequenzierung der durch ChIP gewonnenen DNA (ChIP-Seq) durchgeführt und analysiert.

### 2.2.5.1 ChIP-Seq

Die Sequenzierung der durch Chromatin-Immunpräzipitation gewonnenen DNA-Fragmente ermöglicht es, spezifische Bindeprofile der mit dem Chromatin interagierenden Proteine zu erstellen und diese Interaktionen somit auf einer genomweiten Ebene zu untersuchen (Furey 2012). Um die Proben sequenzieren zu können, wurden diese zuvor in Form einer *library preparation* aufbereitet.

Die Effektivität der Chromatin-Immunpräzipitation wurde zunächst mithilfe von qPCR anhand einer Negativ- und Positivkontrolle überprüft. Der DNA-Gehalt der Proben wurde dann per Qubit dsDNA HS Assay gemessen.

Für die *Library Preparation* wurden jeweils 5 ng einer Probe verwendet. Zur Probenaufbereitung wurde das Truseq ChIP Sample Preparation Kit (Illumina) verwendet. Die Aufbereitung erfolgte anhand der Anleitung des Herstellers. Im ersten Schritt wurden durch Zugabe des *End Repair Mix* die Enden der DNA-Fragmente vereinheitlicht, 3'-Überhänge wurden entfernt und 5'-Überhänge aufgefüllt. Anschließend wurde der *A-Tailing Mix* beigefügt, durch den jedem 3'-Ende eines DNA-Fragments ein A-Nukleotid angefügt wurde. Dies ermöglichte es im nächsten Schritt, jeder Probe einen spezifischen Adapter zuzuordnen, der an seinem 3'-Ende mit einem komplementären T-Nukleotid ausgestattet war. Außerdem konnten so unerwünschte Fusionen zwischen unterschiedlichen DNA-Fragmenten zu einem großen Teil vermieden werden. Den Proben wurden ein *PCR Master Mix* und ein *PCR Primer Cocktail* beigefügt. Durch PCR wurden dann die DNA-Fragmente amplifiziert, die an beiden Enden mit Adaptern ausgestattet waren. So wurde die Gesamtmenge der DNA erhöht.

Der DNA-Gehalt der Proben wurde dann erneut per Qubit dsDNA HS Assay gemessen. Die Fragmentgrößen wurden mithilfe des Agilent Bioanalyzer 2100 (High Sensitivity DNA assay) analysiert.

Abschließend wurden jeweils 24 Proben zusammen in 10 mM Tris (pH 8,5, 0,1% Tween-20) gepoolt und per Illumina HiSeq 4000 Sequencer im Transkriptomanalyselabor (TAL), Göttingen, sequenziert.

### 2.2.5.2 RNA-Seq

Die Genexpression von Zellen zu einem bestimmten Zeitpunkt unter bestimmten Konditionen (Gen-Knockdown, Behandlung mit Inhibitoren etc.) kann mithilfe einer RNA-Seq untersucht werden (Wang et al. 2009). Diese wurde im Vorfeld dieser Arbeit von Dr. med.

Oliver Hahn und Dr. rer. nat. Simon Baumgart experimentell durchgeführt. Die generellen Arbeitsschritte werden im Folgenden kurz erläutert:

Zunächst wurde die RNA der untersuchten Zellen isoliert. Diese repräsentiert die Gene, die zum Zeitpunkt der Isolation unter den auf die Zelle einwirkenden Bedingungen aktiv transkribiert wurden. Eukaryotische RNA besteht aus mehreren Komponenten (tRNA, rRNA, mRNA etc.). Aufschluss über die Genexpression gibt dabei insbesondere die mRNA, da diese im Prozess der Translation in die Proteinbiosynthese eingeht.

Eukaryotischer mRNA wird im Zellkern ein Poly(A)-Schwanz (eine Reihe von Adenin-Nukleotiden) durch das Enzym Poly(A)-Polymerase angehängt. Mithilfe von Poly(I)-Oligomeren, die an magnetische *beads* gekoppelt sind und diese posttranslationale Modifikation binden, wurde die mRNA von der Gesamt-RNA isoliert. Die isolierte mRNA wurde dann durch Inkubation im *Thermal Cycler* fragmentiert. Anschließend wurden aus den mRNA-Fragmenten mithilfe des Enzyms Reverse Transkriptase und unspezifischen Primern komplementäre DNA-Stränge synthetisiert. Zu dieser einsträngigen cDNA wurde mittels DNA-Polymerase ein komplementärer Strang synthetisiert, sodass anschließend doppelsträngige DNA (dsDNA) vorlag. Diese wurde im Anschluss anschließend weiter verarbeitet.

Um beide Stränge der dsDNA-Fragmente auf eine gleiche Länge zu bringen, wurden die 3'-Überhänge dieser Stränge entfernt bzw. die 5'-Überhänge aufgefüllt. Den 3'-Enden der Fragmente wurden dann jeweils eine einzelne Adenin-Base angefügt. Diese diente im Folgenden der Ligation der Adapter, welche mit einen 3'-Thymin-Überhang komplementär an die Adenin-Base binden.

Die Sequenzierung erfolgte mithilfe des Illumina HiSeq 4000 Sequencer im Transkriptom-analyselabor (TAL), Göttingen.

## 2.2.6 Bioinformatische Analyse der Sequenzierungsdaten

Die Daten der RNA-Seq und der ChIP-Seq wurden mithilfe verschiedener *Tools* der öffentlich verfügbaren Online-Plattform *Galaxy* (Afgan et al. 2018) verarbeitet und analysiert.

### 2.2.6.1 Prozessierung und Analyse der ChIP-Sequenzierungsdaten

#### Qualitätskontrolle

Zunächst wurden die rohen Sequenzierungsdaten als FASTQ-Dateien in der Plattform hochgeladen und einer Qualitätskontrolle unterzogen. Hierfür wurde das *Tool FASTQ quality check (FASTQC)* auf die Daten angewendet.

#### Zuordnung an Referenzgenom

Die FASTQ-Dateien wurden anschließend genutzt, um die sequenzierten DNA-Fragmente einem Referenzgenom zuzuordnen. Hierfür wurde die *Bowtie2*-Funktion verwendet. Als Referenzgenom diente das menschliche Genom *hg19, GRCh37* (Langmead und Salzberg 2012).

Dabei wurden die Dateien in das SAM (*Sequence Alignment/Map*) Format umgewandelt, welche anschließend mithilfe der *SAMtools*-Funktion in das BAM (*Binary Alignment/Map*) Format konvertiert wurden (Li et al. 2009).

### *Peak Calling*

Im nächsten Schritt wurde untersucht, welche Regionen des Genoms besonders häufig unter den sequenzierten DNA-Fragmenten repräsentiert waren und somit überdurchschnittlich hohe Anreicherungen der untersuchten DNA-Protein-Interaktionen aufweisen. Hierzu wurden die BAM-Dateien der Triplikate einer Probe zu einer Datei zusammengefasst und mit dem *Tool MACS2 (model-based analysis of ChIP-seq 2)* einem *Peak Calling* unterzogen (Feng et al. 2012). Als Referenzhintergrund wurden die sequenzierten *Input*-Proben verwendet. Der *q*-Wert (*-q*) wurde auf 0,05 eingestellt und als Referenzgenom wurde *hs (homo sapiens)* angegeben.

### Normalisierung

Im Anschluss daran wurden die BAM-Dateien mithilfe der Funktion *bamCoverage* normalisiert (Ramírez et al. 2016). Das Programm unterteilt hierfür das Genom in gleich große Abschnitte und berechnet anschließend, wie häufig sequenzierte DNA-Fragmente mit einem bestimmten Abschnitt überlappen. Die Größe der Abschnitte wurde dabei auf 50 bp festgelegt. Die Gesamtanzahl der Überlappungen wurde dann mithilfe der *RPKM (reads per kilobase per million)* Funktion normalisiert. Durch die Prozessierung mit *bamCoverage* wurden die BAM-Dateien in sogenannte *bigwig*-Dateien umgewandelt.

### Visualisierung

Die *bigwig*-Dateien wurden dann genutzt, um die Ergebnisse der ChIP-Seq mittels verschiedener Methoden zu visualisieren.

Um die Bindungsintensität der untersuchten Proteine an spezifischen Regionen des Genoms zu untersuchen, wurden die *bigwig*-Dateien im öffentlich verfügbaren Programm *Integrative Genomics Viewer (IGV)* geöffnet (Robinson et al. 2011). Die Spuren verschiedener Konditionen wurden dabei für eine bessere Vergleichbarkeit zueinander genormt und übereinandergelegt.

Um Unterschiede der Bindungsaffinitäten an bestimmten Regionen, z. B. der *Transcription Start Site (TSS)*, darzustellen, wurden *Heatmaps* und *Aggregation Plots* mithilfe des *Tools plotHeatmap* erstellt (Ramírez et al. 2016). Da diese Funktion nur Dateien im *computeMatrix*-Format verarbeiten kann, wurden die *bigwig*-Dateien vorher durch das *Tool computeMatrix* umgewandelt (Ramírez et al. 2016).

### 2.2.6.2 Prozessierung und Analyse der RNA-Sequenzierungsdaten

#### Qualitätskontrolle

Die Qualitätskontrolle der Rohdaten der RNA-Seq erfolgte mittels der Funktion *FASTQ quality check* (FASTQC).

#### Zuordnung an Referenzgenom

Die *FASTQ*-Dateien wurden anschließend einem menschlichen Referenzgenom (*hg19*) zugeordnet. Dafür wurde die Funktion *TopHat* genutzt (Kim et al. 2013).

#### Abgleichen der Proben

Die dabei entstandenen SAM-Dateien wurden anschließend mithilfe der Funktion *Cufflinks/Cuffdiff* weiter prozessiert, um die Proben untereinander abzugleichen und so Unterschiede in der Expression herauszustellen (Trapnell et al. 2010).

#### *Gene Set Enrichment Analysis*

Um Unterschiede in den Genexpressionsprofilen zu analysieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA) nach Subramanian et al. (2005) angewendet. Diese Methode gleicht Unterschiede in der Genexpression zweier Konditionen mit öffentlich verfügbaren Datensätzen ab, um diese dann mit typischen Expressionsprofilen bestimmter Signalwege, Stoffwechselwege, Zellphänotypen etc. zu assoziieren. Zunächst wird dafür eine Liste der regulierten Gene erstellt. Die Gene werden dabei nach Expressionsunterschieden zwischen den beiden zu untersuchenden Konditionen sortiert. Anschließend wird diese Liste mit öffentlich verfügbaren Gensets abgeglichen, um zu überprüfen, ob die darin enthaltenen Gene an den Enden der Liste angereichert sind. Der *Enrichment Score* (ES) wird dabei als laufende Summenstatistik berechnet. Die Liste wird hierfür Gen für Gen von oben nach unten abgegangen. Befindet sich das jeweilige Gen auch in dem zu vergleichenden Genset, wird ein Wert zu dieser Summe addiert. Befindet es sich nicht in dem Genset, wird die Summe um einen Wert verringert.

Die Analyse wurde mithilfe der GSEA Software durchgeführt (Mootha et al. 2003; Subramanian et al. 2005). Um Unterschiede in der Genexpression zwischen CSS NT mit FBS NT und CSS NT mit CSS sh*CHD1* zu vergleichen, wurden die Listen der signifikant differenziell regulierten Gene (*fold change* > 1, p-Wert < 0,05, q-Wert < 0,01) mit vermehrter Expression unter Hormontenzug (CSS NT) und Repression nach *CHD1*-KD (CSS sh*CHD1*) hochgeladen. Es wurden die Gensets aus der *Molecular Signatures Database v6.2* (MSigDB) verwendet (Subramanian et al. 2005; Liberzon et al. 2011), öffentlich verfügbar unter <http://software.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>.



### **2.2.7 Erstellen von Venn-Diagrammen**

Die Venn-Diagramme wurden mittels eines frei verfügbaren Tools erstellt, zu finden unter der Webseite <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>. Hierzu wurden die untersuchten Genlisten in die dafür vorgesehenen Felder der Webseite kopiert, benannt und die Überschneidungen der Listen dann mithilfe des Tools visualisiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 *CHD1*-Aberrationen finden sich vermehrt in kastrationsresistenten Prostatakarzinomen

In verschiedenen Studien der letzten Jahre wurden Prostatakarzinombiopsien sequenziert und auf genetische Alterationen untersucht, um somit Einblicke in die genetischen Grundlagen der Erkrankung zu bekommen. Dabei konnten, je nach Studie, in 15-27% aller Fälle Aberrationen im *CHD1*-Gen aufgedeckt werden (Grasso et al. 2012; Abeshouse et al. 2015; Robinson et al. 2015).

Um einen Überblick über die Ergebnisse aktueller Studien zu bekommen, wurden verschiedene, öffentlich verfügbare Datensätze genomweiter Sequenzierungsstudien mit Hinblick auf Alterationen im *CHD1*-Gen analysiert.

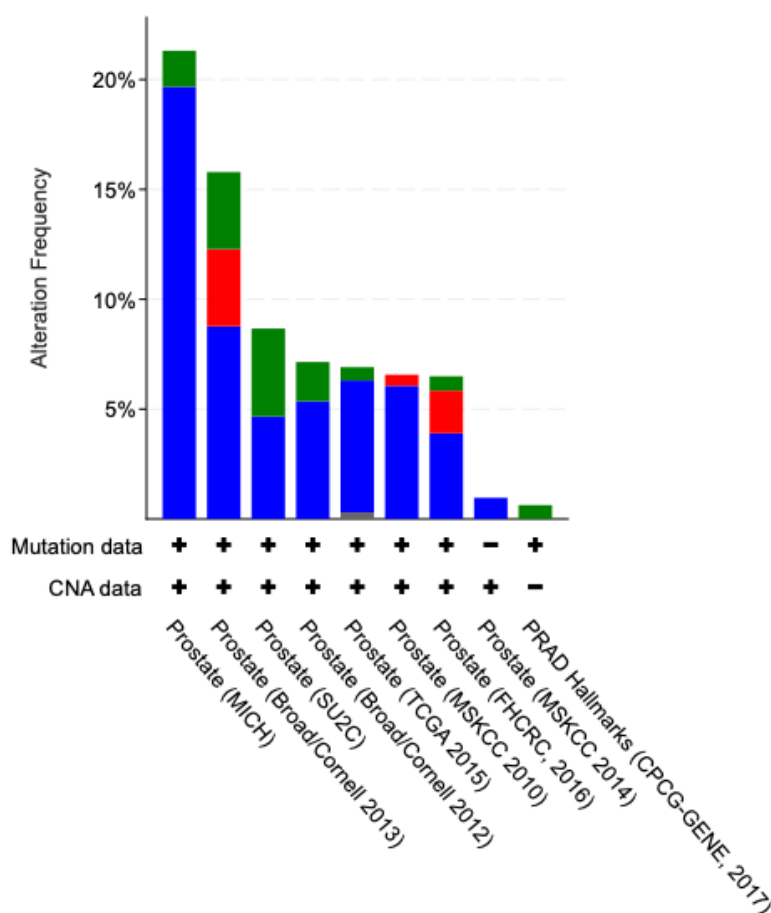
Die Datensätze umfassen Patientenkollektive verschiedener Größen und Erkrankungsstadien des Adenokarzinoms der Prostata. So stammen die untersuchten Biopsien sowohl aus wenig aggressiven, lokalisierten Karzinomen als auch aus kastrationsresistentem, bereits metastasiertem Gewebe. Einige Patienten wurden zudem bereits mit unterschiedlichen Medikamenten vorbehandelt. Die Studien umfassen also eine heterogene Gruppe von Gewebebiopsien. Die Charakteristiken der einzelnen Datensätze sind in Tabelle 3-1 genauer beschrieben.

**Tabelle 3-1: Verwendete Datensätze und ihre jeweiligen Zusammensetzungen**

Name	Publikation	Untersuchtes Material
Prostate (MICH)	Grasso et al. 2012	61 Proben, darunter 50 mehrfach vorbehandelte mCRPCs und elf unbehandelte, primäre high-grade PCas
Prostate (Broad/Cornell 2013)	Baca et al. 2013	57 Proben, darunter 55 unbehandelte primäre PCas und zwei neuroendokrine PCa-Metastasen mit vorausgegangener hormonablativer Therapie
Prostate (SU2C)	Robinson et al. 2015	150 mCRPCs, hormonablativ vorbehandelt mit Enzalutamid oder Abirateron oder in Kombination mit PARP-Inhibitoren oder Aurorakinase-Inhibitoren
Prostate (Broad/Cornell 2012)	Barbieri et al. 2012	112 unbehandelte primäre PCas amerikanischer und australischer Patienten
Prostate (TCGA 2015)	Abeshouse et al. 2015	333 primäre PCas, Vorbehandlungen unbekannt
Prostate (MSKCC 2010)	Taylor et al. 2010	218 Proben, darunter 181 primäre PCas und 37 PCa-Metastasen, Vorbehandlungen unbekannt
Prostate (FHCRC 2016)	Kumar et al. 2016	176 Proben (sowohl Primärtumore als auch Metastasen) von 63 Patienten mit mCRPC und vorausgegangener hormonablativer Therapie
Prostate (MSKCC 2014)	Hieronimus et al. 2014	104 primäre PCas, nicht hormonablativ vorbehandelt
PRAD Hallmarks (CPCG-GENE, 2017)	Fraser et al. 2017	200 primäre PCas, nicht hormonablativ vorbehandelt

Wie in Abbildung 3-1 zu sehen ist, konnten in den meisten Studien in mindestens 6% und in bis zu 21% der sequenzierten Genome *CHD1*-Aberrationen gefunden werden. Auffällig ist dabei, dass die Studie mit dem höchsten Anteil an Alterationen (*Prostate (MICH)*, Grasso et al. 2012) ein einigermaßen homogenes Patientenkollektiv untersucht hat: es handelt sich dabei um Gewebematerial von metastasierten, kastrationsresistenten Karzinomen. Genetische *CHD1*-Alterationen scheinen also häufiger in fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung vorzukommen. Auch die Kohorte *Prostate (SU2C)* aus Robinson et al. (2015) umfasst Proben von mCRPCs. Hier liegt der Anteil der *CHD1*-Aberrationen nur bei etwa 9%, Deletionen finden sich nur in ca. 5%.

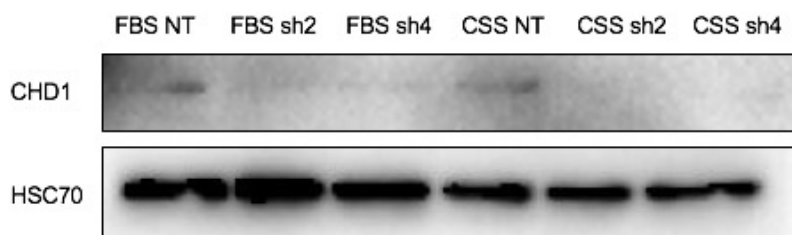
Insgesamt bestehen die *CHD1*-Alterationen in den untersuchten Studien zum Großteil aus Deletionen (blau). Mutationen (grün) und Amplifikationen (rot) kommen seltener vor.



**Abbildung 3-1: Häufigkeit von *CHD1*-Aberrationen in Genomsequenzierungsstudien.** Die relative Häufigkeit von Deletionen (blau), Mutationen (grün) und Amplifikationen (rot) von *CHD1* in verschiedenen Studien ist in Prozent dargestellt.

### 3.2 *CHD1*-Knockdown in LNCaP-Zellen

Der Nachweis des *CHD1*-KD in den lentiviral transduzierten Zelllinien erfolgte auf Proteinebene und ist in Abbildung 3-2 dargestellt. Die Gruppen FBS sh2, FBS sh4 sowie CSS sh2 und CSS sh4 weisen eine deutlich reduzierte Menge an nachweisbarem *CHD1* auf. Hingegen konnte in den Kontrollgruppen FBS NT und CSS NT Mengen an *CHD1* nachgewiesen werden. Es zeigt sich kein Unterschied zwischen den jeweiligen FBS- und CSS-Gruppen.



**Abbildung 3-2: *CHD1*-Expression der transduzierten Zelllinien.** Es zeigen sich schwache Proteinbanden für *CHD1* in den Kontrollgruppen FBS NT und CSS NT. Die Gruppen FBS sh2, FBS sh4, CSS sh2 und CSS sh4 weisen dort keine Proteinbanden auf, *CHD1* wurde durch lentivirale Transduktion erfolgreich ausgeschaltet. HSC70 dient als Ladekontrolle.

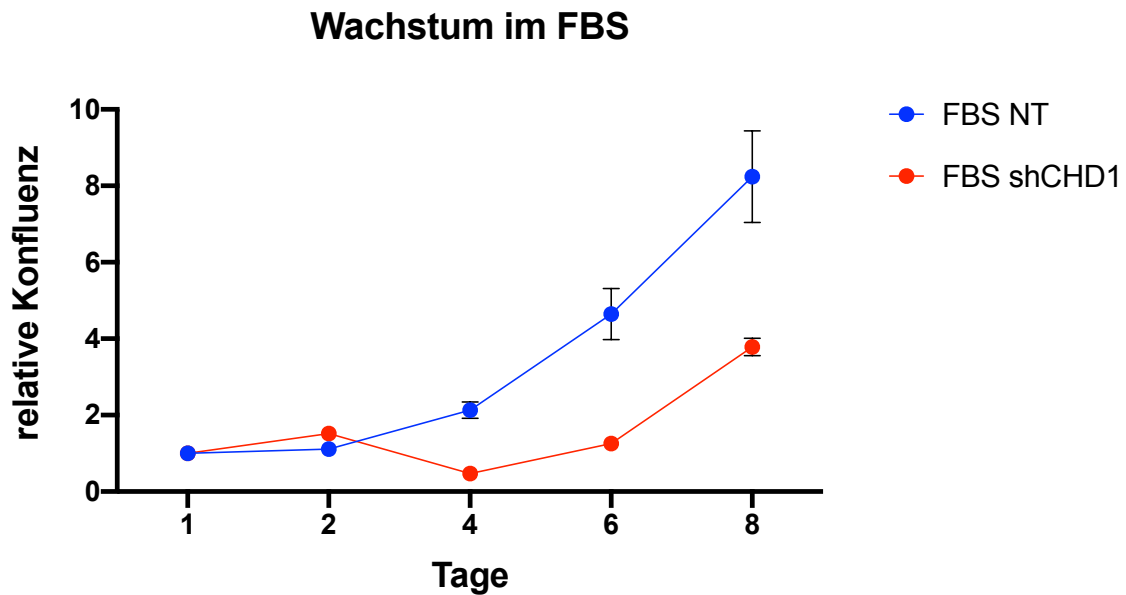
### 3.3 *CHD1*-Knockdown begünstigt androgenunabhängiges Wachstum in LNCaP-Zellen

*CHD1*-Aberrationen konnten häufiger in kastrationsresistenten Prostatakarzinomen gefunden werden als in frühen Stadien der Erkrankung. Im Folgenden wurde daher untersucht, welchen Einfluss der *CHD1*-Status und die Androgendeprivation auf das Wachstum der LNCaP-Zellen hat.

Zunächst wurde untersucht, wie sich der Knockdown von *CHD1* auf das Wachstum der LNCaP-Zellen allgemein auswirkt. Die Konfluenz der Zelllinien FBS NT und FBS sh*CHD1* wurde hierfür über acht Tage mithilfe des Celigo Cytometers gemessen. Die Messwerte wurden zu Tag 1 normalisiert, die Mittelwerte der Messungen ( $n = 2$ ) sind in Abbildung 3-3 dargestellt.

Beide Zellgruppen zeigen über acht Tage insgesamt eine Zunahme der Konfluenz. Die Zellen ohne *CHD1*-Depletion (FBS NT) weisen ein konstant positives Wachstum auf. Die Konfluenz der Zellen mit *CHD1*-KD (FBS sh*CHD1*) nimmt zwischen Tag 2 und 6 ab, erst danach weist diese Gruppe wieder ein positives Wachstum auf. Insgesamt wachsen die Zellen ohne *CHD1*-Depletion besser im FBS-Medium. Der Knockdown von *CHD1* scheint sich

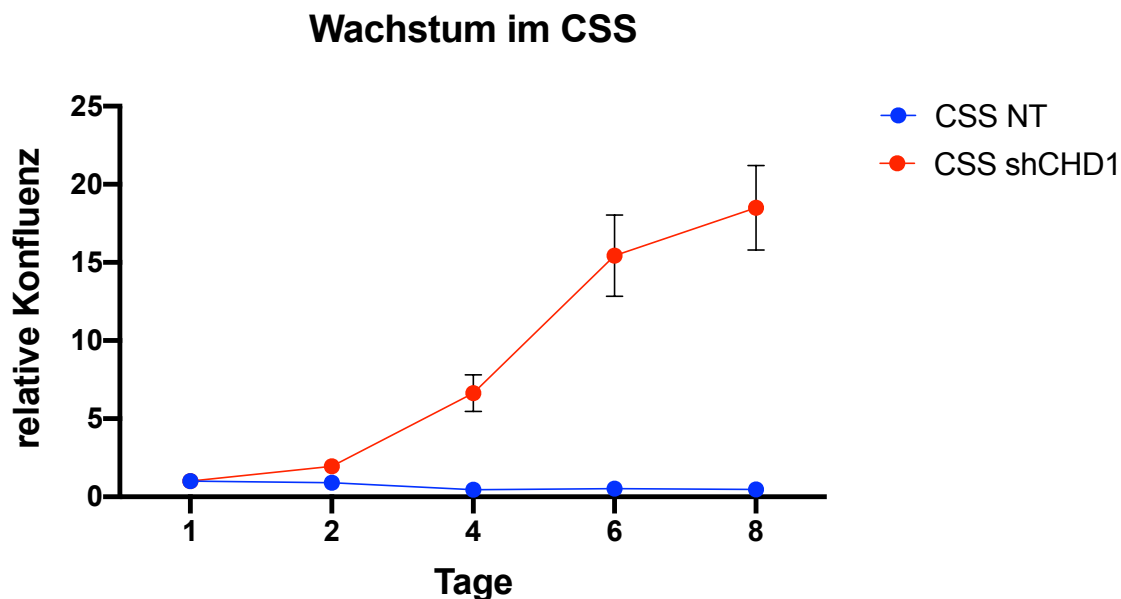
hier negativ auf das Wachstumsverhalten von LNCaP-Zellen in der Anwesenheit von Androgenen auszuwirken.



**Abbildung 3-3: Wachstum von LNCaP-Zellen in FBS-Medium.** Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n = 2$ ) der relativen Konfluenz der Gruppen FBS NT und FBS shCHD1 über eine Dauer von acht Tagen, gemessen mit einem Celigo Cytometer. Die Werte wurden zu Tag 1 normalisiert.

Anschließend wurde untersucht, wie sich der *CHD1*-Status auf das Wachstum der LNCaP-Zellen im Hormonentzug auswirkt. Hierfür wurden die Gruppen LNCaP NT und LNCaP shCHD1 über acht Tage in CSS Medium kultiviert. Die Konfluenz der Zelllinien wurde täglich mithilfe des Celigo Cytometers gemessen. Die Messwerte wurden zu Tag 1 normalisiert, die Mittelwerte der Messungen ( $n = 4$ ) sind in Abbildung 3-4 dargestellt.

Das Wachstum der Kontrollgruppe CSS NT stagniert unter Hormonentzug, die Konfluenz sinkt über die Dauer der Zeit. Für die *CHD1*-depletierte Gruppe CSS shCHD1 lässt sich über die Zeit ein konstanter Anstieg der Konfluenz beobachten.



**Abbildung 3-4: Wachstum von LNCaP-Zellen in CSS Medium.** Die Abbildung zeigt die Mittelwerte  $\pm$  SEM ( $n=4$ ) der relativen Konfluenz der Gruppen CSS NT und CSS sh*CHD1* über eine Dauer von acht Tagen, gemessen mit einem Celigo Cytometer. Die Werte wurden zu Tag 1 normalisiert.

Insgesamt fällt auf, dass das Zellwachstum der Gruppe ohne *CHD1*-KD (CSS NT) unter Hormonentzug deutlich schwächer ist als das Zellwachstum der Gruppe mit *CHD1*-KD (CSS sh*CHD1*). Dies bestätigt einerseits, dass das Wachstumsverhalten von LNCaP-Zellen durch Androgene positiv stimuliert wird. Des Weiteren lässt sich ein direkter Zusammenhang zwischen dem *CHD1*-Status und dem Zellwachstum unter Hormonentzug erkennen, bei dem *CHD1*-Depletion in LNCaP Zellen ein androgenunabhängiges Wachstum begünstigt.

### 3.4 *CHD1*-Status und Androgenentzug beeinflussen Genexpression in LNCaP-Zellen

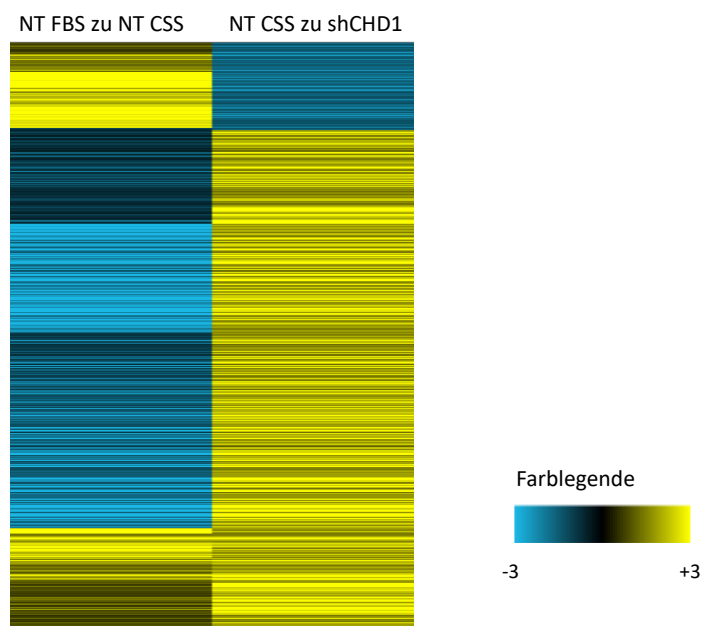
Der Einfluss von *CHD1*-Status und Androgenentzug auf die Genexpression von LNCaP-Zellen konnte mithilfe einer RNA-Seq der verschiedenen Konditionen FBS NT, FBS sh2, FBS sh4, CSS NT, CSS sh2, CSS sh4 untersucht werden. Die Zellen wurden dafür zehn Tage lang in den entsprechenden Medien kultiviert.

Abbildung 3-5 zeigt eine *Heatmap*, die anhand der RNA-Seq erstellt wurde. Die beiden Knockdown-Konditionen sh2 CSS und sh4 CSS sind zusammengefasst zu sh*CHD1* CSS. Die *Heatmap* stellt alle Gene dar, die sowohl durch Hormonentzug (NT FBS zu NT CSS) als auch durch *CHD1*-KD (NT CSS zu sh*CHD1* CSS) signifikant differenziell reguliert werden. Als Signifikanzkriterien gelten die folgende Werte: *fold change* > 1, p-Wert < 0,05, q-Wert < 0,01.

Die linke Spalte repräsentiert Unterschiede in der Genexpression zwischen den Gruppen FBS NT und CSS NT. Der blaue Bereich stellt Gene dar, die unter Hormonentzug reprimiert sind. Der gelbe Bereich zeigt Gene an, die in CSS NT hochreguliert sind. Es fällt auf, dass durch die chemische Kastration ein großer Anteil der regulierten Gene vermindert exprimiert wird.

Die rechte Spalte zeigt entsprechend Gene an, die im Androgenentzug in *CHD1*-depletierten Zellen im Vergleich zu der Kontrollgruppe (CSS NT) hoch- (gelb) oder runterreguliert (blau) sind. Hier wird ein großer Teil der Gene durch *CHD1*-KD unter Androgenentzug vermehrt exprimiert.

Androgenentzug und *CHD1*-KD beeinflussen also die Genexpression in LNCaP-Zellen. Dabei fällt auf, dass diese beiden Faktoren teilweise gegensätzlich auf die Expression einwirken. Eine größere Gruppe von Genen wird im Hormonentzug vermindert exprimiert, durch *CHD1*-KD aber wieder hochreguliert. Die Gene im oberen Teil der *Heatmap* werden hingegen unter Androgendeprivation vermehrt exprimiert. Mit *CHD1*-KD werden sie jedoch herunterreguliert. Mechanistisch ist hier denkbar, dass die Transkription dieser Gene in Zusammenhang mit der Histonmodifikation H3K4me3 steht. Durch den Knockdown des Reader-Proteins CHD1 unter Androgendeprivation kann die expressionsfördernde Histonmodifikation nicht abgelesen werden und die Gene werden vermindert exprimiert.



**Abbildung 3-5: Genexpression unter *CHD1*-Knockdown und Androgenentzug.** Die Abbildung zeigt eine *Heatmap*, die aus Daten der RNA-Seq generiert wurde. Die linke Spalte stellt die Genregulation in CSS NT im Vergleich zu FBS NT dar, die rechte Spalte die Genregulation in CSS sh*CHD1* im Vergleich zu CSS NT. Gezeigt werden Gene, die statistisch signifikant hoch- und runterreguliert sind ( $fold\ change > 1$ , p-Wert  $< 0,05$ , q-Wert  $< 0,01$ ). Gelbe Bereiche zeigen vermehrte Expression an, blaue Bereiche verminderte Expression.

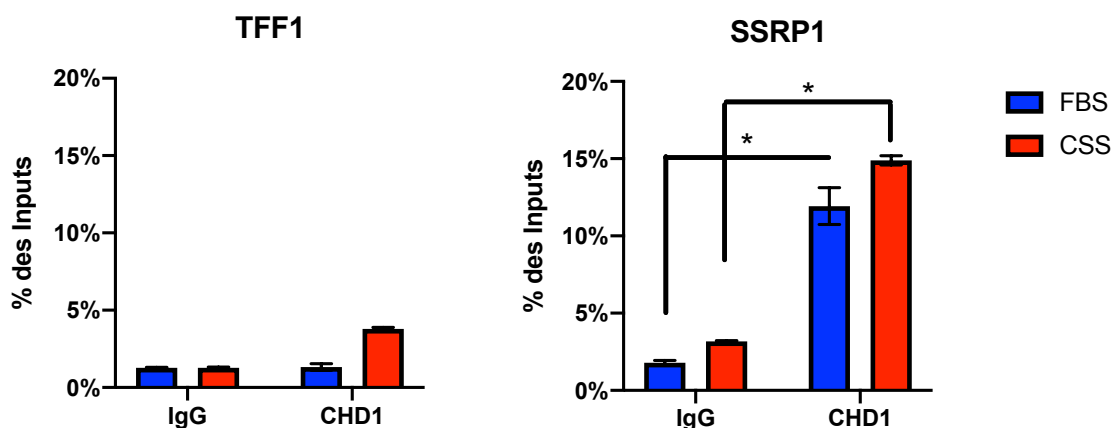
### 3.5 CHD1 bindet unter Hormonentzug vermehrt nahe der TSS hochregulierter Gene

Der Knockdown von *CHD1* scheint unter Androgenentzug in verminderter Expression einer bestimmten Gruppe von Genen zu resultieren, die zuvor in Anwesenheit von CHD1 unter Hormondeprivation vermehrt exprimiert werden. Es stellt sich daher die Frage, ob CHD1 möglicherweise in die vermehrte Expression dieser Gene involviert ist. Um Einblicke in die Transkriptionsregulation des Chromatinremodulators zu erhalten, wurde das Bindungsprofil von CHD1 unter Androgenentzug untersucht. Hierfür wurde eine ChIP-Seq von Wildtyp-LNCaP-Zellen (FBS WT und CSS WT) durchgeführt.

Der Erfolg der durchgeführten CHD1-ChIP wurde im Vorfeld der Sequenzierung mittels einer Positiv- und Negativkontrolle untersucht. Hierzu wurden mit der dabei isolierten DNA quantitative PCRs durchgeführt.

Als Negativkontrolle für CHD1 wurde das Gen *TFF1* (*trefoil factor 1*) gewählt. *TFF1* wird primär in der Magenschleimhaut exprimiert und dort zusammen mit anderen Proteinen sezerniert (Newton et al. 2000). Das Gen *SSRP1* (*structure specific recognition protein 1*) diene als Positivkontrolle. *SSRP1* ist Teil eines Multiproteinkomplexes und an der Erkennung und Bindung modifizierter DNA-Abschnitte beteiligt (Bruhn et al. 1992). Es konnte gezeigt werden, dass CHD1 mit *SSRP1* interagiert und eine Kolo-kalisation am Chromatin aufweist (Kelley et al. 1999)

Die Ergebnisse der qPCRs sind in Abbildung 3-6 dargestellt. Die Bindungen von IgG an der DNA sind unspezifisch und dienen daher in diesem Experiment als negativer Vergleichswert. Es zeigt sich, dass CHD1 nur sehr schwach an *TFF1* bindet. Die Bindung von CHD1 und IgG an dem Gen unterscheiden sich nur gering voneinander. An der Positivkontrolle *SSRP1* weist CHD1 jedoch eine stärkere Bindung auf, die außerdem deutlich über der Bindung des IgG liegt. Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass eine erfolgreiche CHD1-ChIP stattgefunden hat.

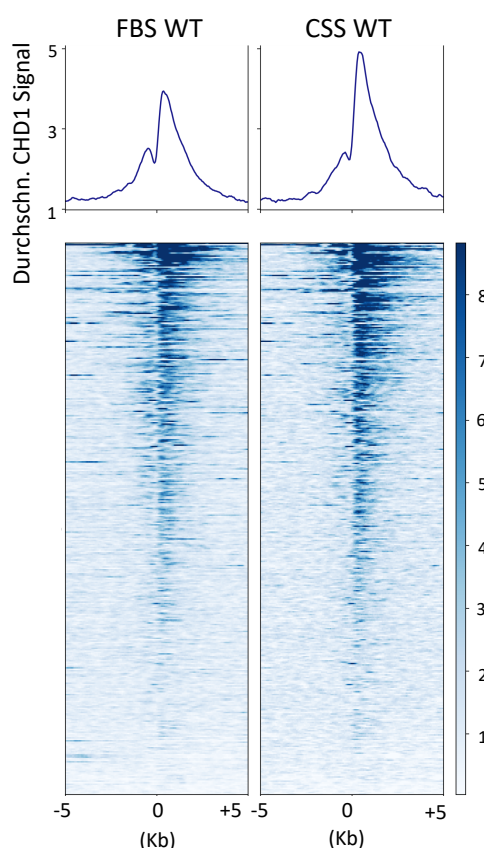


**Abbildung 3-6: qPCR-Kontrollen der CHD1-ChIP.** Die Bindungen von IgG und CHD1 an den Genen *TFF1* (links) und *SSRP1* (rechts) in den Konditionen FBS (blau) und CSS (rot) sind als Prozent des Inputs dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=3$ . Die statistische Analyse erfolgte durch den ungepaarten t-Test (\*= $p \leq 0,05$ , \*\*= $p \leq 0,01$ ).



Im Anschluss wurden die in der RNA-Seq signifikant durch Androgenentzug hochregulierten Gene (von FBS NT zu CSS NT, *fold change* > 1, p-Wert < 0,05, q-Wert < 0,01) auf genomweite Bindungen von CHD1 nahe der TSS analysiert. Abbildung 3-7 zeigt die entsprechenden *Aggregation Plots* und *Heatmaps* für die beiden Konditionen FBS WT und CSS WT.

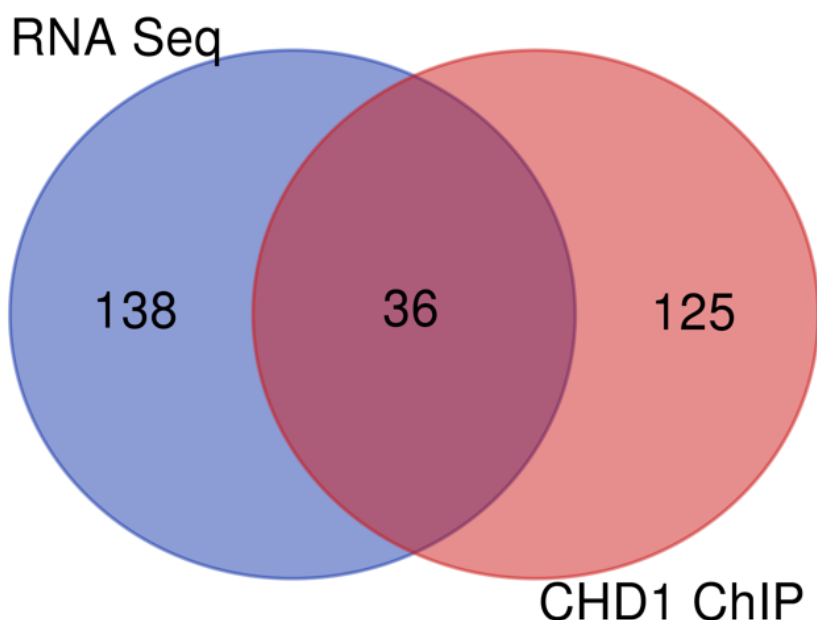
Es ist zu erkennen, dass im Vergleich zur Gruppe FBS WT unter Androgenentzug (CSS WT) eine stärkere CHD1-DNA-Interaktion im Bereich kurz hinter dem TSS besteht. CHD1 weist also eine erhöhte Bindung nahe der TSS von Genen auf, die unter Androgenentzug vermehrt transkribiert werden. Dies lässt darauf schließen, dass der Chromatinremodulator unter Hormonentzug in die vermehrte Transkription bestimmter Gene involviert ist.



**Abbildung 3-7: CHD1 bindet unter Hormonentzug vermehrt in Nähe der TSS.** Die Abbildung zeigt *Aggregate plots* und *Heatmaps*, die aus Daten der ChIP-Seq generiert wurden. Sie stellen die CHD1-Bindung +/-5 Kb um die TSS in den Gruppen FBS WT (links) und CSS WT (rechts) dar. Gezeigt sind die Bindungen von CHD1 an den Genen, die in der RNA-Seq als signifikant hochreguliert durch Androgenentzug identifiziert werden konnten (von FBS NT zu CSS NT, *fold change* > 1, p-Wert < 0,05, q-Wert < 0,01).

Des Weiteren wurde analysiert, wie viele der signifikant regulierten Gene im Hormonentzug eine vermehrte CHD1-Bindung aufweisen. Hierfür wurde die Schnittmenge zweier Gruppen untersucht: Zum einen die 138 signifikant regulierten Gene, die unter Hormonentzug vermehrt exprimiert werden und mit CHD1-Verlust reprimiert werden. Zum anderen eine Gruppe von 125 Genen, die im CHD1-ChIP in LNCaP WT Zellen signifikant höhere

Anreicherungen des Proteins unter Hormonentzug aufweisen ( $q$ -Wert  $< 0,05$ ). Abbildung 3-8 stellt die Schnittmenge dieser beiden Gruppen in Form eines Venn-Diagramms grafisch dar. Es zeigt sich, dass insgesamt 36 der 138 in der RNA-Seq signifikant regulierten Gene eine signifikante CHD1-Anreicherung in der CHD1-ChIP aufweisen.



**Abbildung 3-8: CHD1-Anreicherungen unter signifikant regulierten Genen in der RNA-Seq.** Der blaue Kreis stellt die Gene dar, die in der RNA-Seq signifikant durch Androgenentzug und CHD1-KD reguliert werden ( $fold\ change > 1$ ,  $p$ -Wert  $< 0,05$ ,  $q$ -Wert  $< 0,01$ ). Der rote Kreis umfasst die Gene, die in der CHD1-ChIP signifikante Anreicherungen von CHD1 unter Hormonentzug ( $q$ -Wert  $< 0,05$ , WT FBS zu WT CSS) aufweisen.

Die 36 identifizierten Gene sind in Tabelle 3-2 aufgelistet:

**Tabelle 3-2: Im Hormonentzug vermehrt exprimierte Gene mit signifikanter CHD1-Anreicherung.**

Vermehrt exprimierte Gene		
<i>ABCC8</i>	<i>GALNT10</i>	<i>MYRIP</i>
<i>ANKRD44</i>	<i>GRB14</i>	<i>OSBPL10</i>
<i>APCDD1</i>	<i>HOXC9</i>	<i>PLXDC2</i>
<i>APLP1</i>	<i>ID1</i>	<i>PVRL4</i>
<i>BMF</i>	<i>ID2</i>	<i>SELENBP1</i>
<i>CASZ1</i>	<i>IRX5</i>	<i>SMAD6</i>
<i>CDKN1A</i>	<i>JAKMIP1</i>	<i>SRCIN1</i>
<i>CELSR1</i>	<i>KCNS3</i>	<i>TMEM184C</i>
<i>CLMN</i>	<i>KLAA1467</i>	<i>TMEM47</i>
<i>COLEC12</i>	<i>LRRN1</i>	<i>TMEM59L</i>
<i>DEGS2</i>	<i>MCF2L</i>	<i>TOM1L2</i>
<i>EDN2</i>	<i>MDGA1</i>	<i>VPS13A</i>

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die *CHD1*-Depletion in LNCaP Zellen ein androgenunabhängiges Wachstum begünstigt. Bestimmte Gene werden außerdem *CHD1*-abhängig und kastrationsabhängig differentiell reguliert. Unter Hormonentzug konnten vermehrte *CHD1*-DNA-Interaktionen nahe der TSS von hochregulierten Genen nachgewiesen werden. Mit *CHD1*-KD werden diese Gene dann vermindert exprimiert.

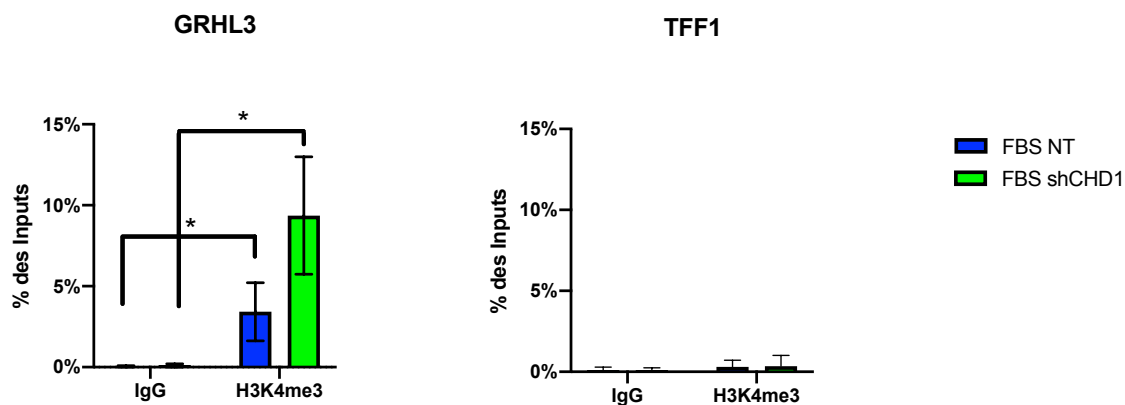
### 3.6 H3K4me3 weist unter Hormonentzug Anreicherungen nahe der TSS hochregulierter Gene auf

Da *CHD1* das *Reader*-Protein für die Histonmodifikation H3K4me3 ist, sind die Bindungen des Enzyms abhängig von den Anreicherungen der Histonmodifikationen am Chromatin. Um zu überprüfen, ob die beobachteten Bindungsprofile von *CHD1* kohärent mit den Bindungsprofilen der H3K4me3 sind, wurde eine ChIP-Seq der Histonmodifikation in LNCaP-Zellen unter Hormonentzug und *CHD1*-KD (NT FBS, NT CSS, sh*CHD1* FBS, sh*CHD1* CSS) durchgeführt.

Der Erfolg der H3K4me3-ChIP wurde im Vorfeld der Sequenzierung mittels Positiv- und Negativkontrolle untersucht. Hierzu wurden mit der dabei isolierten DNA quantitative PCRs durchgeführt.

Wie auch für *CHD1* wurde als Negativkontrolle für die H3K4me3 das o. g. Gen *TFF1* gewählt. Als Positivkontrolle wurden die Bindungen der Histonmodifikation an dem Gen *GRHL3* (*grainyhead like transcription factor 3*) untersucht, welches in Prostatagewebe exprimiert wird (Uhlén et al. 2015).

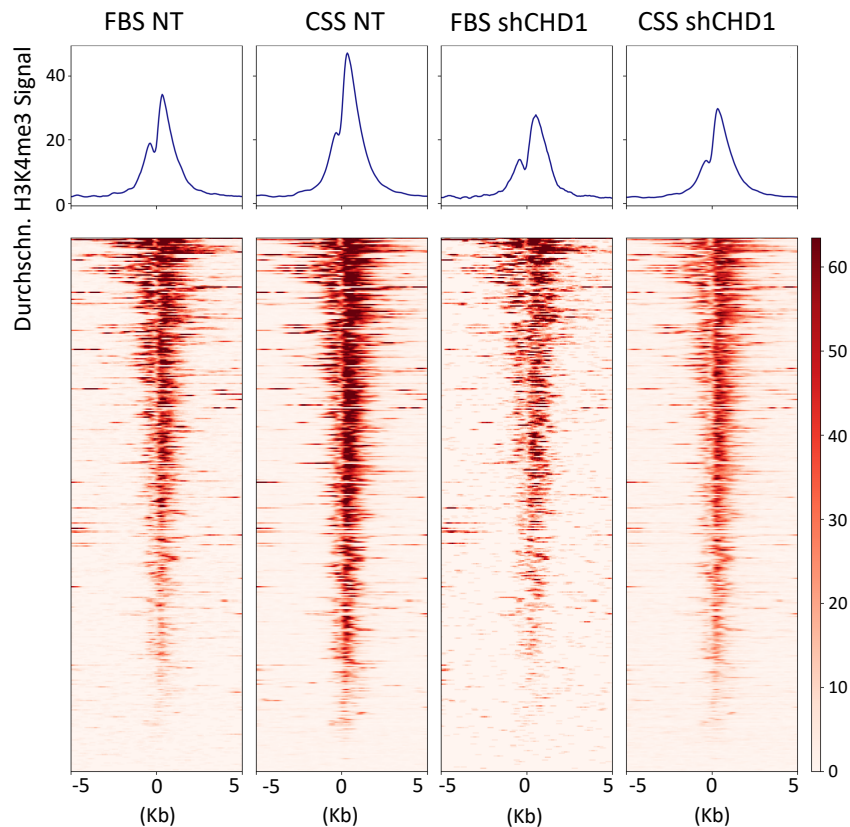
Abbildung 3-9 stellt die Ergebnisse der qPCRs dar. Es zeigt sich nur eine geringfügig erhöhte Bindung der H3K4me3 am Gen *TFF1* im Vergleich zum unspezifisch bindenden IgG in den Konditionen FBS NT und FBS sh*CHD1*. Die Positivkontrolle *GRHL3* weist hingegen Anreicherungen der Histonmodifikation in diesen Konditionen auf, die signifikant über denen des IgG liegen. Aus diesen Beobachtungen wurde geschlossen, dass eine erfolgreiche H3K4me3-ChIP stattgefunden hatte, und es folgte die Sequenzierung der Proben.



**Abbildung 3-9: qPCR-Kontrollen der H3K4me3-ChIP.** Die Bindungen von IgG und der H3K4me3 an den Genen *GRHL3* (links) und *TFF1* (rechts) in den Konditionen FBS NT (blau) und FBS sh*CHD1* (grün) sind als Prozent des Inputs dargestellt. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=3$ . Die statistische Analyse erfolgte durch den ungepaarten t-Test (\*= $p \leq 0,05$ , \*\*= $p \leq 0,01$ ).

Anschließend wurden die in der RNA-Seq signifikant regulierten Gene (*fold change* > 1,  $p$ -Wert < 0,05,  $q$ -Wert < 0,01) mit Hochregulation unter Androgenentzug und Repression unter *CHD1*-KD auf Bindungen der H3K4me3 untersucht. Abbildung 3-10 stellt die entsprechenden *Aggregation Plots* der Gene in den unterschiedlichen Konditionen dar. Es zeigt sich, dass die untersuchten Gene im Hormonentzug (CSS NT) die größte Anreicherung von H3K4me3 aufweisen. Dies ist kohärent mit den Ergebnissen zu den Bindungsprofilen von CHD1 aus Kapitel 3.5. Hier konnte für CHD1 ebenfalls eine vermehrte Anreicherung unter Androgenentzug nachgewiesen werden.

Die Gruppen mit *CHD1*-KD (FBS sh*CHD1* und CSS sh*CHD1*) weisen die geringsten Mengen H3K4me3 in der Nähe der TSS dieser Gene auf. Der Verlust von CHD1 scheint somit in einer verminderten Bindung der Histonmodifikation zu resultieren.



**Abbildung 3-10: Unter Hormonentzug finden sich vermehrt Anreicherungen der H3K4me3 in Nähe der TSS.** Die Abbildung zeigt *Aggregate plots* und *Heatmaps*, die aus Daten der ChIP-Seq generiert wurden. Sie stellen die H3K4me3-Bindung  $\pm 5$  Kb um die TSS in den Gruppen FBS NT, CSS NT, FBS sh*CHD1* und CSS sh*CHD1* (von links nach rechts) dar. Gezeigt sind die Bindungen der Histonmodifikation an den Genen, die in der RNA-Seq als signifikant hochreguliert durch Androgenentzug identifiziert werden konnten (von FBS NT zu CSS NT, *fold change*  $> 1$ , *p*-Wert  $< 0,05$ , *q*-Wert  $< 0,01$ ).

### 3.7 Alterierende Genexpression unter *CHD1*-Knockdown und Androgenentzug trägt H3K27me3-Signatur

Die Tatsache, dass der *CHD1*-Status sowie die Androgenverfügbarkeit Einfluss auf die Expression einer bestimmten Gruppe von Genen der LNCaP-Zellen haben, wirft die Frage auf, was diese Gene gemeinsam haben und wie sie reguliert werden.

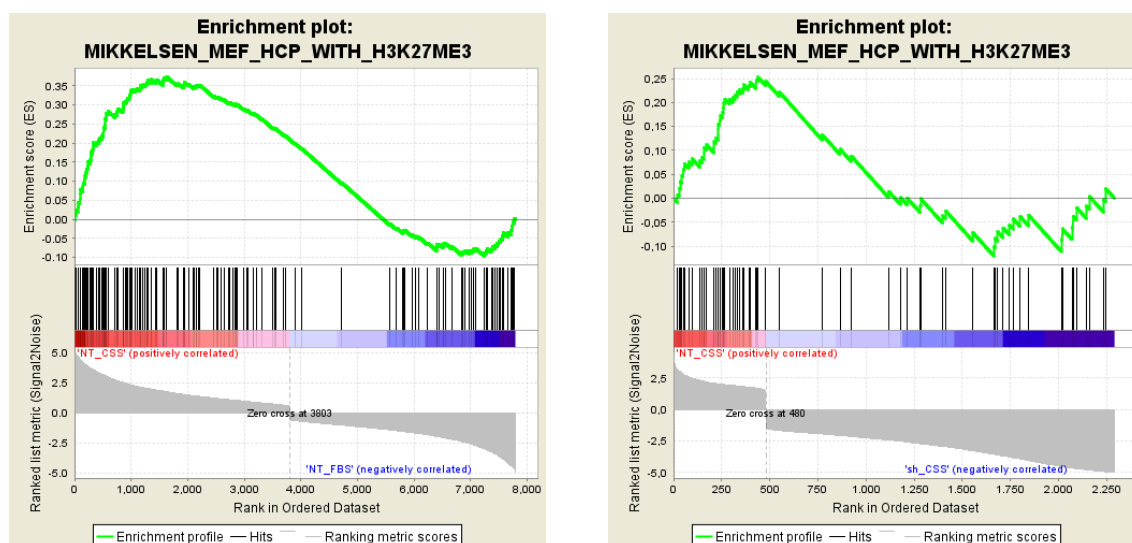
Die GSEA (*Gene Set Enrichment Analysis*) bietet eine Möglichkeit, Genexpressionsprofile verschiedener Zellgruppen untereinander und mit Expressionsprofilen aus öffentlichen Datenbanken zu vergleichen. Dies ermöglicht es, Unterschiede zwischen den Zellgruppen mit Expressionsprofilen zu assoziieren, die typisch sind für bestimmte Krankheitsbilder, Tumore, Zellphänotypen etc.

Die GSEA wurde auf die beschriebene RNA-Seq der Gruppen FBS NT, CSS NT und CSS sh*CHD1* angewandt. Für Gene, die in CSS NT vermehrt exprimiert werden und entsprechend in FBS NT vermindert exprimiert sind, konnte eine verstärkte Assoziation mit Datensätzen festgestellt werden, die H3K27me<sub>3</sub>-regulierte Gene enthalten. Zu diesen Datensätzen gehört auch „MIKKELSEN\_MEF\_HCP\_WITH\_H3K27ME3“. Das Genset aus (Mikkelsen et al. 2007) umfasst Gene aus Fibroblastenzellen von Mäuseembryonen, an denen anhand von CHIP-Seq Experimenten hohen Anreicherungen der H3K27me<sub>3</sub> nachgewiesen werden konnten. In Abbildung 3-11 sind die *Enrichment Plots* des Datensatzes dargestellt.

Die linke Abbildung zeigt den *Enrichment Plot* für die Gene, die in Zellen unter Hormonentzug (CSS NT) vermehrt exprimiert werden und entsprechend in Anwesenheit von Androgenen (FBS NT) vermindert exprimiert sind. Der höchste Wert für den *Enrichment Score* liegt im positiven Bereich bei 0,4. An diesem Punkt findet sich die höchste Überschneidung zwischen dem Genset und der Liste aus regulierten Genen aus der RNA-Seq wieder. Diese befindet sich unter den Genen der Gruppe CSS NT, also den Zellen ohne *CHD1*-KD im Hormonentzug. Es werden also unter Hormonentzug bestimmte Gene vermehrt exprimiert, die mit einer H3K27me<sub>3</sub>-Signatur assoziiert sind. Diese wird allgemein als eine repressive Histonmodifikation beschrieben. Dies weist darauf hin, dass Veränderungen im Bindungsmuster der H3K27me<sub>3</sub> ursächlich für die regulierte Genexpression zwischen den Konditionen FBS NT und CSS NT sein könnten.

Die rechte Abbildung zeigt den *Enrichment Plot* des Datensatzes für die Gene, die unter Hormonentzug durch *CHD1*-Depletion differenziell reguliert sind. Der höchste *Enrichment Score* liegt hier bei 0,25 im Bereich der Gene, die in CSS NT im Vergleich zu CSS sh*CHD1* vermehrt exprimiert sind. Diese Gene werden dann mit *CHD1*-KD unter Hormonentzug reprimiert.

Durch Anwendung der GSEA auf die Ergebnisse der RNA-Seq konnte gezeigt werden, dass die in den verschiedenen Konditionen regulierten Gene mit der Histonmodifikation H3K27me<sub>3</sub> assoziiert sind. Unter Hormonentzug (CSS NT) zeigt sich eine Anreicherung von H3K27me<sub>3</sub>-tragenden Genen. Diese Gene sind in Anwesenheit von Androgenen vermindert exprimiert. Auch mit *CHD1*-KD unter Hormonentzug (CSS sh*CHD1*) werden die mit dieser Histonmodifikation assoziierten Gene reprimiert. Es ist somit anzunehmen, dass neben der H3K4me<sub>3</sub> auch die H3K27me<sub>3</sub> regulierend auf die Expression dieser Gene einwirkt.

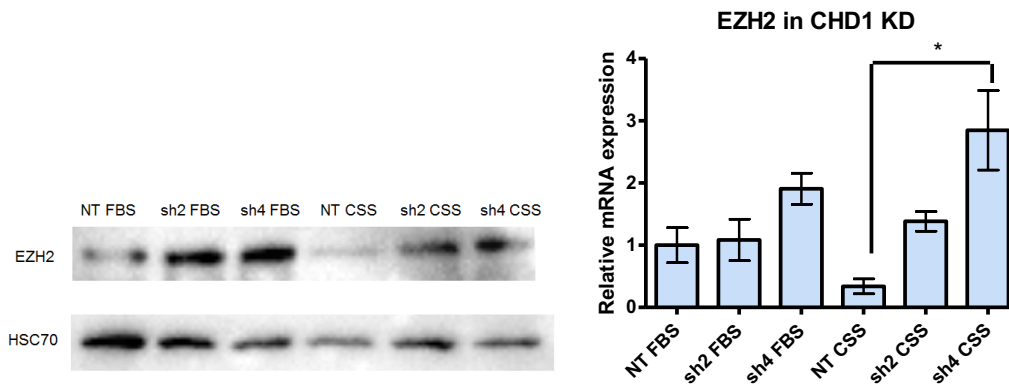


**Abbildung 3-11: Regulierte Gene tragen H3K27me3 Signatur.** Die Abbildung zeigt die *Enrichment plots* der GSEA, die auf die Daten der RNA-Seq angewendet wurde. Links der *Enrichment Plot* für FBS NT und CSS NT mit dem Genset „MIKKELSEN\_MEF\_HCP\_WITH\_H3K27ME3“, rechts für CSS NT und CSS sh*CHD1*. Das Genset aus Mikkelsen et al. (2007) umfasst Gene, die hohe Anreicherungen der H3K27me3 in Fibroblastenzellen von Mäuseembryonen zeigten. Untersucht wurden jeweils die signifikant durch Androgenentzug und *CHD1*-KD regulierten Gene (*fold change* > 1, p-Wert < 0,05, q-Wert < 0,01).

### 3.8 *EZH2*-Expression ist abhängig von *CHD1*-Status und Androgenentzug

Die Histonmodifikation H3K27me3 konnte mit differenzieller Genexpression von LNCaP-Zellen mit *CHD1*-Depletion unter Androgenentzug assoziiert werden. Die H3K27me3 wird durch das *Writer*-Enzym *EZH2* katalysiert, welches als Histon-Methyltransferase Teil des *Polycomb repressive complex 2* (PRC2) ist. Im Folgenden wurde deshalb untersucht, welchen Einfluss Androgendeprivation und *CHD1*-Depletion auf die Expression von *EZH2* in LNCaP-Zellen haben.

Auf Protein- sowie auf RNA-Ebene konnte eine inverse Korrelation zwischen *CHD1*-KD, Androgenentzug und *EZH2*-Expression nachgewiesen werden. Wie in Abbildung 3-12 zu sehen ist, weisen die Gruppen mit *CHD1*-KD (FBS sh2, FBS sh4, CSS sh2, CSS sh4) eine höhere Expression von *EZH2* auf als die Kontrollgruppen ohne *CHD1*-KD (FBS NT, CSS NT). Außerdem scheint zwischen den Kontrollgruppen (von FBS NT zu CSS NT) die *EZH2*-Expression unter Androgenentzug zunächst abzunehmen. Erst mit *CHD1*-KD steigt die *EZH2*-Expression auch unter Androgenentzug wieder an.



**Abbildung 3-12: *CHD1*-Knockdown und Androgenentzug beeinflussen *EZH2*-Expression und Bindung.** Links: Immunoblotanalyse von *EZH2*, *HSC70* als Ladekontrolle. Rechts: RNA-Expression von *EZH2*, dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=3$ . Die statistische Analyse erfolgte durch den ungepaarten t-Test (\*= $p \leq 0,05$ , \*\*= $p \leq 0,01$ ).

Androgendeprivation und *CHD1*-Status scheinen die Expression des *Writer*-Proteins *EZH2* zu beeinflussen. Die in der RNA-Seq durch *CHD1*-KD und Hormonentzug regulierten Gene konnten mit der Histonmodifikation H3K27me3 assoziiert werden. Es stellt sich daher die Frage, ob und inwiefern *EZH2* an der epigenetischen Regulation bestimmter Gene beteiligt ist. Mechanistisch wäre das denkbar. Unter Hormonentzug nimmt die Expression von *EZH2* in LNCaP-Zellen ab (von FBS NT zu CSS NT). Gleichzeitig konnte *CHD1* vermehrt nahe der TSS von Genen nachgewiesen werden, die unter Androgendeprivation vermehrt exprimiert werden. Die verminderte Präsenz von *EZH2* könnte dabei förderlich für die Expression dieser Gene sein. Mit *CHD1*-KD unter Androgenentzug wird *EZH2* wieder verstärkt in LNCaP-Zellen exprimiert. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass eine bestimmte Gruppe von Genen durch den *CHD1*-KD vermindert exprimiert wird. Die verminderte Expression dieser Gene könnte dabei, wie zunächst gedacht, nicht nur das Resultat einer verminderten Menge von *CHD1* sein. Vielmehr ist es möglich, dass die erhöhten Mengen von *EZH2* aktiv zur Repression dieser Gene beitragen. Dies würde bedeuten, dass *CHD1* und *EZH2* gemeinsam die Expression bestimmter Gene unter Androgenentzug regulieren.



### 3.9 EZH2 und H3K27me3 binden unter Hormonentzug nach *CHD1*-Knockdown vermehrt nahe der TSS reprimierter Gene

Um zu untersuchen, inwiefern EZH2 und die H3K27me3 in die epigenetische Regulation von LNCaP-Zellen involviert sind, wurde eine ChIP-Seq der untersuchten Gruppen (+/- Androgen, +/- *CHD1*) für die Methyltransferase und die entsprechende Histonmodifikation durchgeführt.

Der Erfolg der EZH2-ChIP und der H3K27me3-ChIP wurde im Vorfeld der Sequenzierung mittels Positiv- und Negativkontrolle untersucht. Hierzu wurden mit der dabei isolierten DNA quantitative PCRs durchgeführt.

Für EZH2 wurden die Bindungen an dem Gen *GAPDH* als Negativkontrolle und dem Gen *OLIG2* (*oligodendrocyte transcription factor 2*) als Positivkontrolle untersucht.

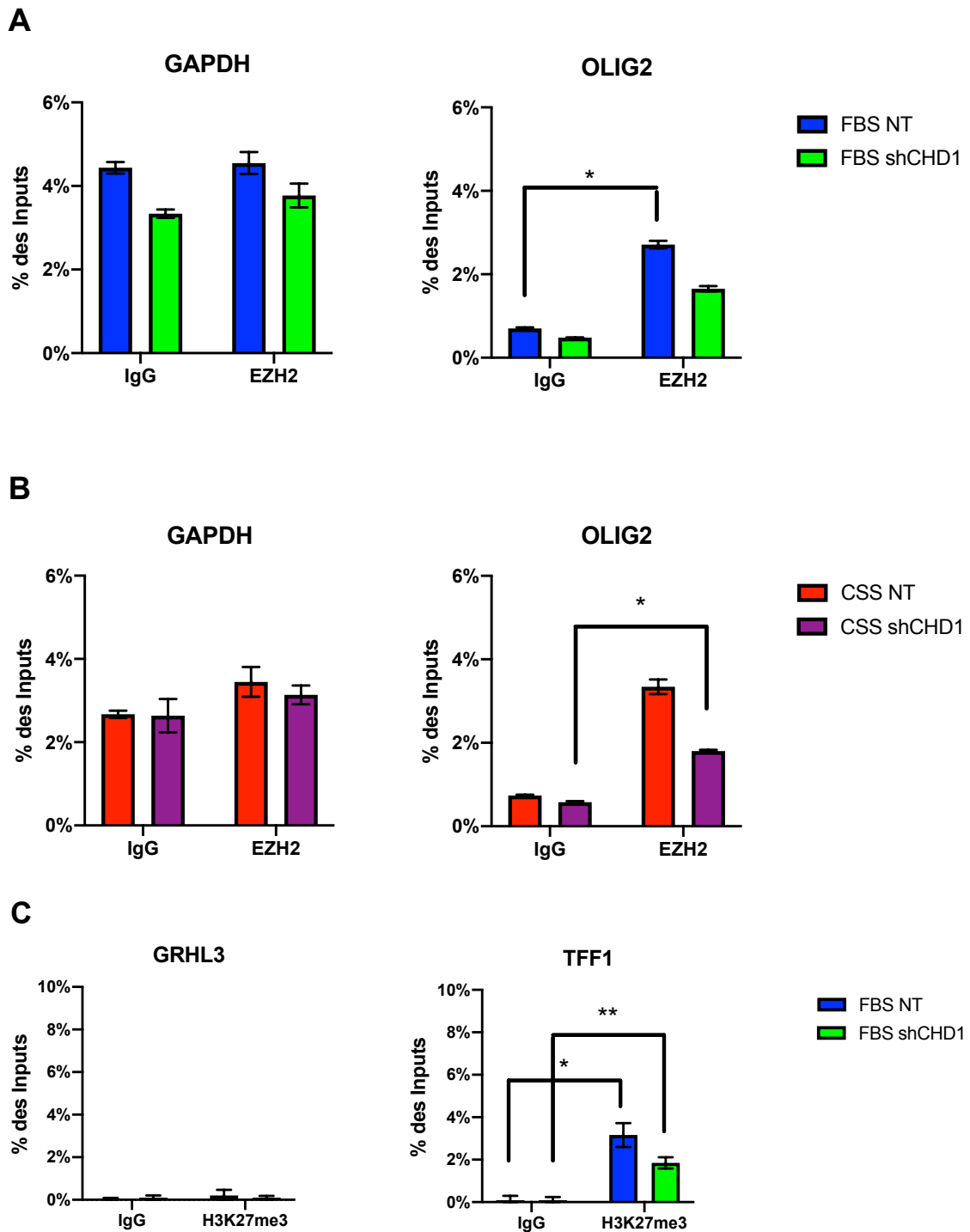
*GAPDH* codiert für ein zentrales Enzym der Glykolyse und ist damit essenziell für den Stoffwechsel der Zelle. Es wird in den meisten Zellen und Geweben konstant exprimiert und fungiert als sogenanntes „Haushaltsgen“ (Nicholls et al. 2012). Die Expression von *GAPDH* sollte daher nicht durch epigenetische Mechanismen beeinflusst werden. Wie erwartet zeigt sich in Abbildung 3-13 kein nennenswerter Unterschied in der Bindungsaffinität von EZH2 und IgG an *GAPDH*.

*OLIG2* fungiert als Transkriptionsfaktor im zentralen Nervensystem und reguliert dort die embryonale Entwicklung sowie später die Differenzierung verschiedener Nervenzellen (Gaber und Novitsch 2011). Es ist daher davon auszugehen, dass *OLIG2* in den hier untersuchten Zellen kaum exprimiert wird, eine EZH2-vermittelte Repression ist außerdem denkbar. Abbildung 3-13 zeigt, dass EZH2 stärker an *OLIG2* bindet als IgG. Dennoch ist nur eine schwache Bindung von EZH2 an *OLIG2* erkennbar.

Entgegengesetzt zu der H3K4me3-ChIP wurde als Positivkontrolle für die H3K27me3-ChIP das o. g. Gen *TFF1* gewählt. Als Negativkontrolle wurden die Bindungen der Histonmodifikation an dem o. g. Gen *GRHL3* untersucht.

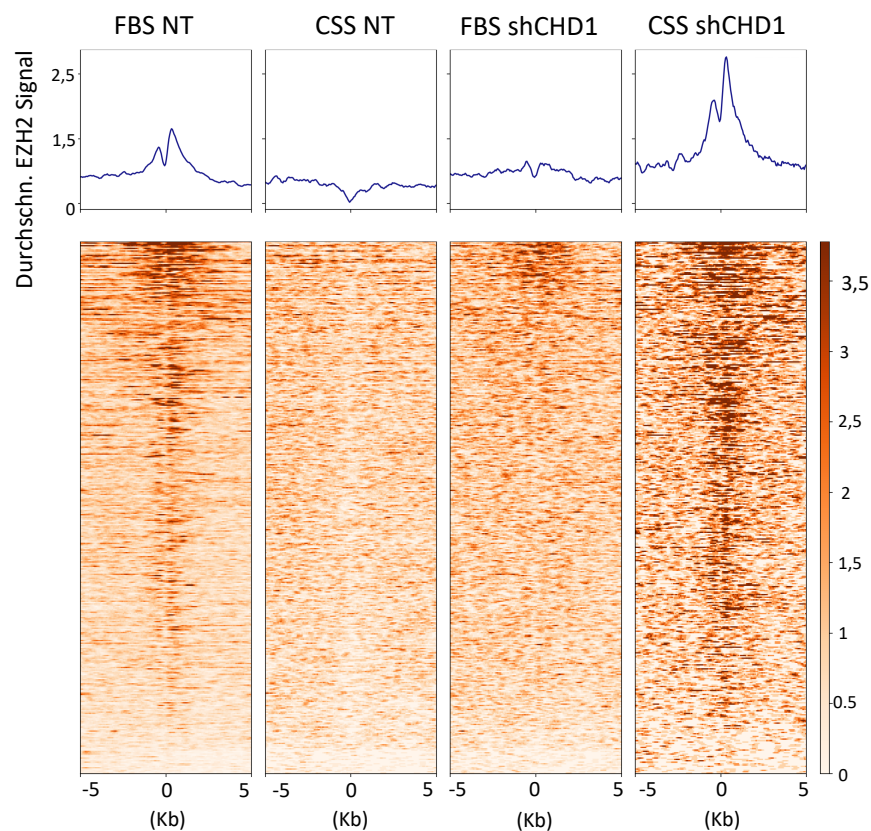
In Abbildung 3-13 zeigt sich für die H3K27me3 nur eine geringfügig erhöhte Bindung an der Negativkontrolle *GRHL3* im Vergleich zu IgG. An der Positivkontrolle *TFF1* zeigen sich hingegen signifikant vermehrte Anreicherungen der Histonmodifikation im Vergleich zum IgG.

Aufgrund dieser Beobachtungen wurde geschlussfolgert, dass eine erfolgreiche ChIP von EZH2 und der H3K27me3 stattgefunden hatte, und es folgte die Sequenzierung der Proben.

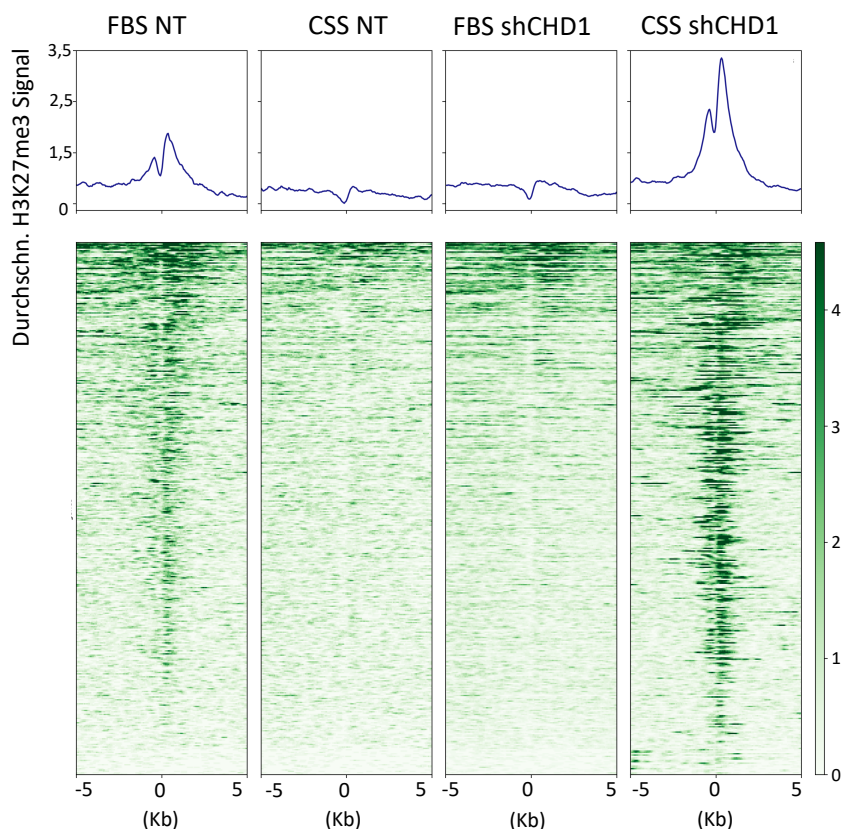


**Abbildung 3-13: qPCR-Kontrollen der EZH2-ChIP und H3K27me3-ChIP.** Die Abbildung stellt die Bindungen von IgG, EZH2 und der H3K27me3 an unterschiedlichen Kontrollgenen als Prozent des Inputs dar. In (A) sind die Bindungen von IgG und EZH2 an den Genen *GAPDH* und *OLIG2* in den Konditionen FBS NT und FBS shCHD1 dargestellt, (B) zeigt diese Bindungen für die Konditionen CSS NT und CSS shCHD1. In (C) sind die Bindungen von IgG und der H3K27me3 an den Genen *GRHL3* und *TFF1* in den Konditionen FBS NT und FBS shCHD1 dargestellt. Gezeigt sind jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SD,  $n=3$ . Die statistische Analyse erfolgte durch den ungepaarten t-Test (\*= $p \leq 0,05$ , \*\*= $p \leq 0,01$ ).

Die in der RNA-Seq unter Androgendeprivation hochregulierten Gene (von FBS NT zu CSS NT, 1,5x *fold change* >10) wurden dann auf Bindungen nahe der TSS untersucht. Die Abbildung 3-14 und Abbildung 3-15 zeigen die *Aggregation Plots* von EZH2 (orange) und der H3K27me3 (grün) um die TSS jeweils in den Konditionen FBS NT, CSS NT, FBS sh*CHD1* und CSS sh*CHD1* (von links nach rechts). Unter Androgenentzug sinken die Bindungen um die TSS in den Gruppen ohne *CHD1*-KD (von NT FBS zu NT CSS). Mit *CHD1*-KD ist unter chemischer Kastration wieder eine erhöhte Bindung der Histonmodifikation und des *Writer*-Proteins um die TSS zu beobachten. Der Anstieg von EZH2 in den Gruppen mit *CHD1*-KD unter Normalbedingungen (sh2 FBS, sh4 FBS) auf Protein- und RNA-Ebene findet sich jedoch nicht in dem entsprechenden Bindungsprofil um die TSS wieder.



**Abbildung 3-14: EZH2 bindet nach *CHD1*-Verlust im Hormonentzug vermehrt in Nähe der TSS.** Die Abbildung zeigt *Aggregation plots* und *Heatmaps*, die aus den Daten der ChIP-Seq generiert wurden. Sie stellen die Bindungen von EZH2 in der Nähe der TSS (+/- 5 Kb) dar. Untersucht wurden die Bindungen an den Genen, die in der RNA-Seq als signifikant hochreguliert durch Androgenentzug identifiziert werden konnten (von FBS NT zu CSS NT, *fold change* > 1, p-Wert < 0,05, q-Wert < 0,01). Von links nach rechts sind jeweils die Profile in den Konditionen FBS NT, CSS NT, FBS sh*CHD1* und CSS sh*CHD1* dargestellt.



**Abbildung 3-15: H3K27me3 bindet nach CHD1-Verlust im Hormonentzug vermehrt in Nähe der TSS.** Die Abbildung zeigt *Aggregation plots* und *Heatmaps*, die aus den Daten der ChIP-Seq generiert wurden. Sie stellen die Bindungen der Histonmodifikation H3K27me3 in der Nähe der TSS ( $\pm 5$  Kb) dar. Untersucht wurden die Bindungen an den Genen, die in der RNA-Seq als signifikant hochreguliert durch Androgenentzug identifiziert werden konnten (von FBS NT zu CSS NT, *fold change*  $> 1$ , *p*-Wert  $< 0,05$ , *q*-Wert  $< 0,01$ ). Von links nach rechts sind jeweils die Profile in den Konditionen FBS NT, CSS NT, FBS sh*CHD1* und CSS sh*CHD1* dargestellt.

Die hier präsentierten *Aggregation Plots* von EZH2 und der H3K27me3 stützen die Theorie, dass EZH2 ein möglicher Regulator in der Genexpression von *CHD1*-depletierten LNCaP-Zellen unter Androgenentzug ist.

Wenn CHD1 in der Zelle vorhanden ist, nimmt die Bindung von EZH2 und der H3K27me3 an den hochregulierten Genen unter Androgendeprivation zunächst ab. Es konnte gezeigt werden, dass CHD1 dann vermehrt an diesen Genen bindet (Kapitel 3.5). Mit Knockdown von *CHD1* nimmt die Expression dieser Gene dann ab (Kapitel 3.4). Die verminderte Expression der Gene resultiert mutmaßlich zum einem aus dem *CHD1*-KD, da das *Reader*-Protein nicht mehr transkriptionsfördernd auf die Gene einwirken kann. Zum anderen scheint eine Regulation durch EZH2 und die H3K27me3 plausibel, da diese dann vermehrt in Nähe der TSS dieser Gene binden und repressiv auf die Transkription einwirken.

Unter Androgenentzug scheint die Depletion von *CHD1* in LNCaP-Zellen also in einer EZH2-vermittelten Repression bestimmter Gene zu resultieren.

### 3.10 Bindungsprofile von CHD1, EZH2, H3K4me3 und der H3K27me3 an den Genen *CDKN1A*, *SMAD7* und *PMEPA1*

In Kapitel 3.3 konnte gezeigt werden, dass *CHD1*-Depletion in LNCaP-Zellen androgenunabhängiges Wachstum ermöglicht. Des Weiteren scheinen Androgenentzug und *CHD1*-KD die Expression einer bestimmten Gruppe von Genen zu regulieren. Die Methyltransferase EZH2 scheint bei diesem Regulationsprozess eine Rolle zu spielen, da das Enzym unter *CHD1*-KD vermehrt an Genen bindet, die durch Androgenentzug und *CHD1*-KD vermindert exprimiert werden.

Nun stellt sich die Frage, inwiefern die Depletion von *CHD1* das Wachstum der Zellen im Hormonentzug fördert. Denkbar ist, dass die aus dem Knockdown resultierende und EZH2-vermittelte Transkriptionsrepression sich auf Gene bezieht, die unter normalen Umständen inhibierend auf das Zellwachstum einwirken. Durch den *CHD1*-KD könnten diese Gene EZH2-abhängig vermindert exprimiert werden und ihre Funktion in der Zelle nicht mehr voll erfüllen. Es käme also zu einer verminderten Expression von Inhibitoren des Zellwachstums, wodurch die Proliferation gefördert werden würde.

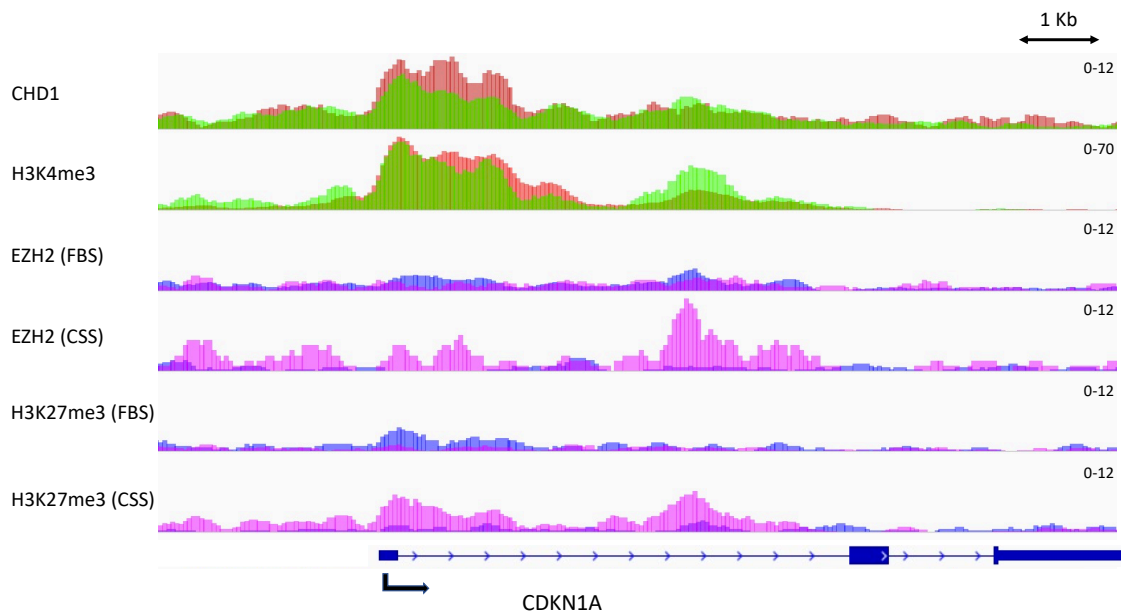
Daher wurden die in der RNA-Seq durch *CHD1*-Depletion und Androgenentzug regulierten Gene auf Assoziationen mit Signalwegen untersucht, die eine Rolle in zellulären Prozessen wie Proliferation, Zellzyklus, Metastasierung etc. spielen. Es wurden die Gene analysiert, die unter Androgenentzug signifikant hochreguliert und dann mit *CHD1*-KD signifikant vermindert exprimiert werden (*fold change* > 1, p-Wert < 0,05, q-Wert < 0,01). Um einen Einblick in die epigenetische Regulierung durch die verschiedenen Modifikationen und Enzyme zu erhalten, wurde anschließend mit Hilfe des *Integrative Genomics Viewer* die spezifischen Bindungsprofile von CHD1, EZH2, H3K4me3 und der H3K27me3 an diesen Genen untersucht. Diese wurden aus den ChIP-Seq der jeweiligen Konditionen generiert.

Im Folgenden werden nun beispielhaft die Bindungsprofile an drei Genen dargestellt, deren differenzielle Regulierung sich potenziell auf die Karzinogenese und somit das androgenunabhängige Wachstum der Zellen auswirken. Inwiefern die differenzielle Expression dieser Gene einen Einfluss auf die Zelle hat und welche weiteren Gene und Signalwege eine Rolle spielen könnten, soll in Kapitel 4 genauer erläutert werden.

Zunächst sind die Bindungsprofile am Gen *CDKN1A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) dargestellt (siehe Abbildung 3-16). Es codiert für das Protein p21, einem Inhibitor der cyclin-abhängigen Kinasen (CDKs) (Xiong et al. 1993).

*CDKN1A* befindet sich unter den Genen, die neben einer signifikanten Regulierung in der RNA-Seq durch *CHD1*-KD und Androgenentzug auch eine signifikante Anreicherung von CHD1 unter Androgenentzug in der CHD1-ChIP aufweist (siehe Abbildung 3-8 und Tabelle 3-2). Diese Beobachtung wird durch die Bindungsprofile bestätigt. CHD1 und die H3K4me3 binden unter Hormonentzug vermehrt nahe der TSS des Gens. Für EZH2 und die

H3K27me3 lässt sich beobachten, dass sowohl das *Writer*-Protein als auch die Histonmodifikation im Hormonentzug vermehrt am Gen *CDKN1A* binden.

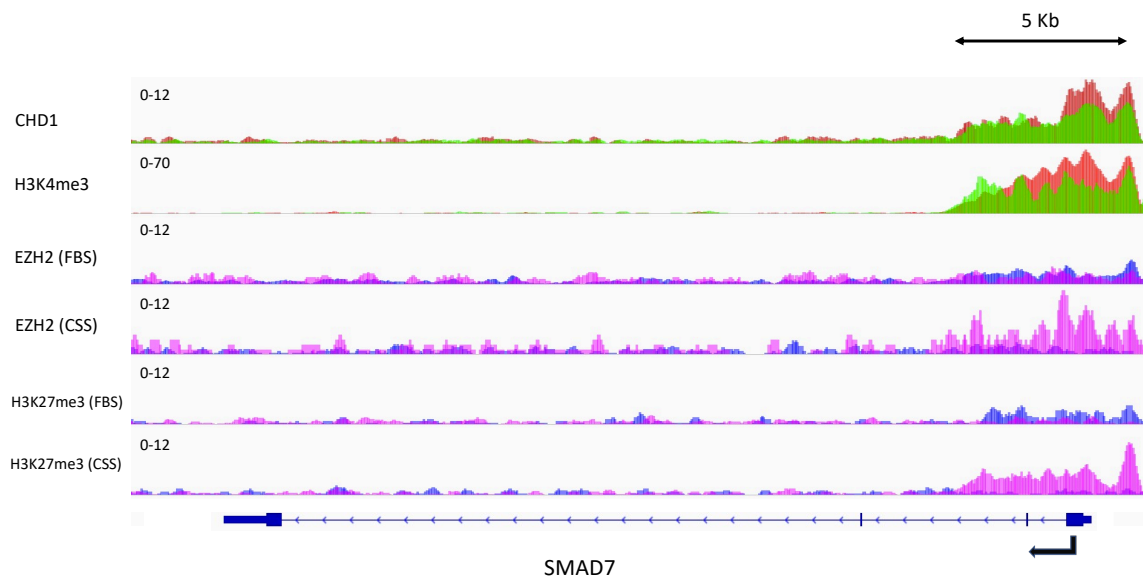


**Abbildung 3-16: Bindungsprofile von CHD1, EZH2, H3K4me3 und H3K4me27 am Gen *CDKN1A*.** Die obere Spur zeigt die Bindungen von CHD1 an *CDKN1A* in LNCaP Wildtyp-Zellen. Diese wurden in FBS-Medium (grün) und CSS-Medium (rot) kultiviert. Darunter findet sich die Spur für die H3K4me3-Bindungen in LNCaP shNT in FBS-Medium (grün) und CSS-Medium (rot). Die Spuren wurden zueinander skaliert und übereinandergelegt. Die unteren Spuren zeigen die Bindungen von EZH2 und der H3K27me3 an *CDKN1A* in LNCaP-Zellen. LNCaP shNT (blau) und LNCaP sh*CHD1* (pink) wurden in FBS-Medium und CSS-Medium kultiviert. Die Spuren von EZH2 wurden untereinander skaliert und die Spuren der jeweiligen Medien übereinandergelegt, ebenso für die H3K27me3.

Des Weiteren sind die Bindungsprofile am Gen *SMAD7* (*Mothers against decapentaplegic homolog 7*) dargestellt (siehe Abbildung 3-17).

*SMAD7* codiert für das Protein SMAD7, welches inhibitorisch auf den TGF- $\beta$  (*transforming growth factor beta*) Signalweg einwirkt. Dieser wiederum ist an vielen wichtigen Prozessen wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung etc. beteiligt (Hayashi et al. 1997). Abbildung 3-17 zeigt die Bindungsprofile von CHD1, EZH2, H3K4me3 und der H3K27me3 an dem Gen *SMAD7*. CHD1 bindet unter Hormonentzug vermehrt an der TSS des Gens. Selbiges lässt sich für die H3K4me3 beobachten. Dies passt zu der Beobachtung, dass *SMAD7* unter Androgendeprivation vermehrt exprimiert wird. EZH2 und die H3K27me3 weisen, wie erwartet, ein ähnliches Bindungsprofil auf. Unter Androgenentzug binden sowohl die Methyltransferase als auch die Histonmodifikation vermehrt an das Gen, wenn *CHD1* depletiert ist. Diese Beobachtung passt zu den Ergebnissen aus Kapitel 3.9. Dort konnte gezeigt werden, dass EZH2 und die H3K27me3 vermehrt an herunterregulierten Genen binden.

SMAD7 wird unter Androgenenzug mit *CHD1*-Depletion vermindert exprimiert. Verantwortlich dafür könnte die EZH2-vermittelte Repression durch die Histonmodifikation H3K27me3 sein. Hierdurch wird möglicherweise die SMAD7-vermittelte Inhibition des TGF- $\beta$  Signalweges beeinträchtigt. Durch vermehrte Aktivität dieses Signalweges könnte somit die Depletion von *CHD1* unter Androgenenzug zu androgenunabhängigem Wachstum beitragen.



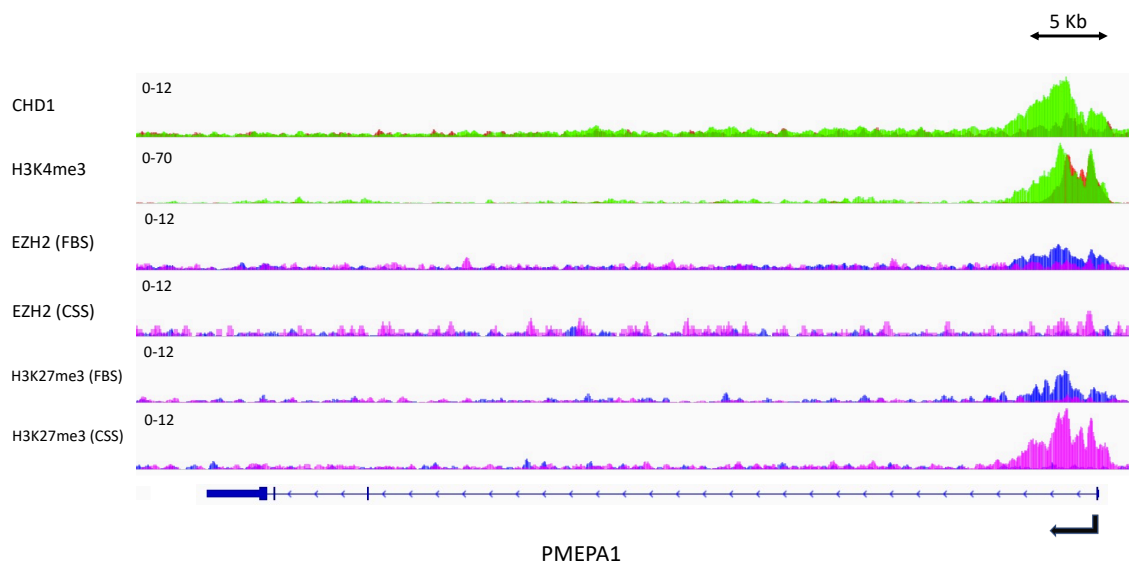
**Abbildung 3-17: Bindungsprofile von CHD1, EZH2, H3K4me3 und H3K27me3 an *SMAD7*.**

Die obere Spur zeigt die Bindungen von CHD1 an *SMAD7* in LNCaP Wildtyp-Zellen. Diese wurden in FBS-Medium (grün) und CSS-Medium (rot) kultiviert. Darunter findet sich die Spur für die H3K4me3-Bindungen in LNCaP shNT in FBS-Medium (grün) und CSS-Medium (rot). Die Spuren wurden zueinander skaliert und übereinandergelegt. Die unteren Spuren zeigen die Bindungen von EZH2 und der H3K27me3 an *SMAD7* in LNCaP-Zellen. LNCaP shNT (blau) und LNCaP sh*CHD1* (pink) wurden in FBS-Medium und CSS-Medium kultiviert. Die Spuren von EZH2 wurden untereinander skaliert und die Spuren der jeweiligen Medien übereinandergelegt, ebenso für die H3K27me3.

Ein weiteres, durch Androgenenzug und *CHD1*-KD differenziell reguliertes Gen ist *PMEPA1*. Es codiert für das *Transmembrane prostate androgen-induced protein* (TMEPAI). Niedrige *PMEPA1*-Expression konnte zuletzt vermehrt mit Metastasen von Prostatakarzinomen assoziiert werden. Außerdem konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass der Knockdown von *PMEPA1* vermehrt in Metastasen von PCa-Zellen resultiert (Fournier et al. 2015). Die Bindungsprofile von EZH2 und der H3K27me3 für *PMEPA1* sind ähnlich wie für *SMAD7*. Unter Hormonentzug führt der Knockdown von *CHD1* zu einer vermehrten Bindung des *Writer*-Enzyms und der Histonmodifikation nahe der TSS des Genes. CHD1 bindet vor allem in Anwesenheit von Androgenen an *PMEPA1*, nach Hormonentzug zeigen sich

deutlich verminderte Mengen des Proteins nahe der TSS. Diese Beobachtung lässt sich auch für die Histonmodifikation H3K4me3 machen (siehe Abbildung 3-18).

*PMEPA1* wird nach *CHD1*-Depletion unter Hormonentzug vermindert exprimiert. Nach *CHD1*-KD unter Hormonentzug binden außerdem vermehrt EZH2 und die H3K27me3 nahe der TSS des Gens. Es ist daher anzunehmen, dass *CHD1*-Depletion unter Hormonentzug zu einer EZH2/H3K27me3-vermittelten Repression des Gens führt. Der Verlust von *CHD1* könnte somit in Bezug zur Metastasierung des Prostatakarzinoms stehen, da *PMEPA1*-Depletion vermehrt mit diesen assoziiert wurde.



**Abbildung 3-18: Bindungsprofile von CHD1, EZH2, H3K4me3 und H3K27me3 an *PMEPA1*.**

Die obere Spur zeigt die Bindungen von CHD1 an *PMEPA1* in LNCaP Wildtyp-Zellen. Diese wurden in FBS-Medium (grün) und CSS-Medium (rot) kultiviert. Die Spuren wurden zueinander skaliert und übereinandergelegt. Die unteren Spuren zeigen die Bindungen von EZH2 und der H3K27me3 an *PMEPA1* in LNCaP-Zellen. LNCaP shNT (blau) und LNCaP sh*CHD1*(pink) wurden in FBS-Medium und CSS-Medium kultiviert. Die Spuren von EZH2 wurden untereinander skaliert und die Spuren der jeweiligen Medien übereinandergelegt, ebenso für die H3K27me3.

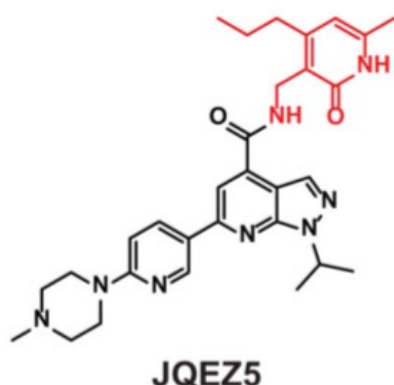
Die Analyse der oben genannten Gene gibt Aufschluss über die epigenetischen Regulationsmechanismen in LNCaP-Zellen. Sie veranschaulicht, wie sich die verschiedenen epigenetischen Regulatoren und Modifikationen unter unterschiedlichen Konditionen (+/- Androgen, +/- *CHD1*-KD) verhalten. Gleichzeitig weisen die identifizierten Gene auf mögliche Signalwege und Mechanismen hin, die eine Rolle in der Karzinogenese der Zelle spielen könnten.



### 3.11 Der EZH2-Inhibitor JQEZ5 beeinflusst das Wachstum von LNCaP-Zellen im Androgenentzug

In den vorherigen Kapiteln konnte gezeigt werden, dass *CHD1*-Depletion androgenunabhängiges Wachstum in LNCaP-Zellen begünstigt. Zudem haben *CHD1*-KD und Hormonentzug Einfluss auf die Expression bestimmter Gene. Dabei konnte gezeigt werden, dass im Hormonentzug durch Knockdown von *CHD1* vermehrt *EZH2* exprimiert wird. Die Methyltransferase und die entsprechende Histonmodifikation H3K27me<sub>3</sub> werden vermehrt zu den TSS vermindert exprimierter Gene rekrutiert. Unter den reprimierten Gene befinden sich unter anderem die Gene *CDKN1A*, *SMAD7* und *PMEPA1*.

Im Folgenden wurde getestet, welchen Einfluss der EZH2-Inhibitor JQEZ5 (Abbildung 3-19, Zhang et al. 2016) auf die LNCaP-Zellen im Androgenentzug mit und ohne *CHD1*-KD hat. Mechanistisch ist vorstellbar, dass die durch *CHD1*-Depletion bedingte Überexpression von *EZH2* und damit verbundene Repression bestimmter Gene durch den EZH2-Inhibitor gehemmt wird. Dadurch könnte es wieder zu vermehrter Expression der Gene kommen, deren Repression scheinbar maligne Entartung begünstigt. Somit würde die Inhibition von EZH2 hemmend auf das androgenunabhängige Wachstum *CHD1*-depletierter LNCaP-Zellen einwirken.



**Abbildung 3-19: Strukturformel von JQEZ5 (aus Zhang et al. 2016).** Die Verwendung der Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung durch die *American Association for Cancer Research*.

Die Zelllinien CSS NT und CSS sh*CHD1* wurden über neun Tage mit JQEZ5 in unterschiedlichen Konzentrationen (250 nM, 500 nM, 1 µM) behandelt. Zur Kontrolle wurden die Zellen ebenfalls mit DMSO behandelt. Die Konfluenz wurde mithilfe des Celigo Cytometers gemessen. Abbildung 3-20 zeigt die relative Konfluenz über den Verlauf von neun Tagen. Die Mittelwerte der Messungen (n=2) wurden zu Tag 1 normalisiert.

Zunächst fällt auf, dass die LNCaP-Zellen mit *CHD1*-Depletion (CSS sh*CHD1*) unter Androgenentzug ein deutlich stärkeres Wachstum aufweisen als die Kontrollgruppe CSS NT.

Dies bestätigt die Ergebnisse aus Kapitel 3.3. Hier konnte gezeigt werden, dass der Verlust von *CHD1* androgenunabhängiges Wachstum in LNCaP-Zellen fördert.

Des Weiteren zeigt sich für beide Zellgruppen unter Androgenentzug eine inhibierende Wirkung von JQEZ5 auf das Zellwachstum. Für die Gruppe CSS NT zeigt sich ab Tag 5 ein Rückgang der Konfluenz unter allen Konzentrationen (250 nM, 500 nM, 1  $\mu$ M). Die Kurven für 500 nM und 1  $\mu$ M JQEZ5 zeigen ab Tag 5 einen fast identischen Verlauf. Die gesteigerte Konzentration des Inhibitors scheint nicht zu einem stärkeren Rückgang der Konfluenz zu führen.

In *CHD1*-depletierten Zellen (CSS sh*CHD1*) wirkt unter Androgenentzug 1  $\mu$ M JQEZ5 inhibierend auf das Zellwachstum. Nach neun Tagen ist die Konfluenz der Zellen im Vergleich zur Kontrolle hier um fast 50% reduziert. Behandlungen mit niedrigeren Konzentrationen haben hingegen keinen Effekt auf das Wachstum (500 nM) oder resultieren teilweise sogar in einer gesteigerten Konfluenz (250 nM).

Insgesamt zeigt sich ein inhibierender Effekt von JQEZ5 auf das Wachstum von LNCaP-Zellen im Hormonentzug. Bei einer Konzentration von 1  $\mu$ M ist dieser stärker in *CHD1*-depletierten Zellen zu beobachten als in der Kontrollgruppe.

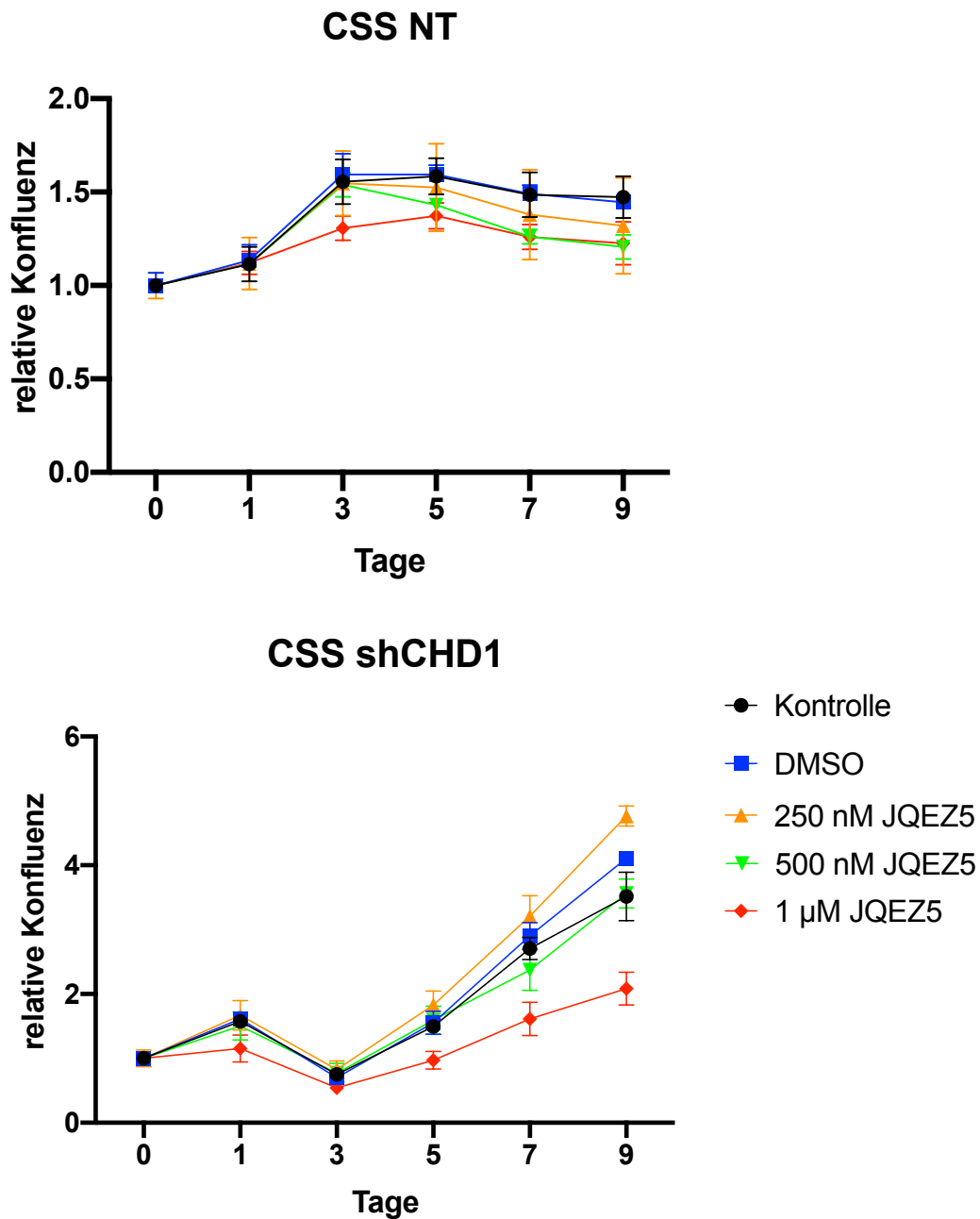


Abbildung 3-20: Wachstum von LNCaP-Zellen unter Hormonentzug (+/- *CHD1*-Knock-down) mit JQEZ5-Behandlung. Die Konfluenz der Zelllinien CSS NT und CSS sh*CHD1* wurde über neun Tage gemessen, jede Zelllinie wurde jeweils mit JQEZ5 in den Konzentrationen 250 nM, 500 nM, 1 μM und DMSO als Kontrolle behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n=2) der Messungen als relative Konfluenz. Die Werte wurden zu Tag 1 normalisiert.

## 4 Diskussion

Die vorangegangenen Ergebnisse zeigen verschiedene neue Erkenntnisse auf. Androgenentzug und *CHD1*-Status scheinen sich sowohl auf das Wachstumsverhalten als auch auf die Genexpression von LNCaP-Zellen auszuwirken. Das Bindungsverhalten von CHD1 und der H3K4me3 werden dabei durch den Androgenentzug beeinflusst und regulieren so die Genexpression. Das *Writer*-Enzym EZH2 und die Histonmodifikation H3K27me3 interagieren abhängig von diesen Faktoren ebenfalls unterschiedlich stark mit der DNA. Sie wirken somit ebenfalls auf die Transkription ein.

Gleichzeitig werfen diese Erkenntnisse neue Fragen auf. Durch welche Mechanismen reguliert der Androgenstatus die DNA-Interaktionen von CHD1 und EZH2 in LNCaP-Zellen? Warum treten EZH2-Bindungen vermehrt in der Abwesenheit von CHD1 auf? Welche Gene werden durch EZH2 reprimiert? Und trägt die Repression dieser Gene letztlich zur Karzinogenese und zum androgenunabhängigen Wachstum der Zellen bei?

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse in den aktuellen Stand der Forschung eingeordnet und mit diesem verglichen. Außerdem werden mögliche Erklärungsansätze und Hypothesen für die neu aufgeworfenen Fragen diskutiert.

### 4.1 CHD1

#### 4.1.1 Einfluss von CHD1 auf das Zellwachstum

Der Einfluss von CHD1 auf das Zellwachstum wurde in Kapitel 3.3 untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass LNCaP-Zellen mit *CHD1*-Depletion in Anwesenheit von Androgenen weniger stark proliferieren als die Kontrollzellen (siehe Abbildung 3-3).

In der Literatur finden sich unterschiedliche, zum Teil kontroverse Angaben zum Einfluss von CHD1 auf das Wachstum von Prostata(krebs)zellen. In einer Studie von Burkhardt et al. (2013) resultierte die Depletion von *CHD1* in PC-3-Zellen in verminderter Zellproliferation und Invasivität. PC-3-Zellen repräsentieren dabei Prostatakrebszellen in einem sehr fortgeschrittenen Krankheitsstadium. Die Zelllinie wurde 1979 aus der Knochenmetastase eines fortgeschrittenen Prostatakarzinoms isoliert, hat ein hohes Metastasierungspotenzial und wächst androgenunabhängig (Kaighn et al. 1979). Gegensätzliche Ergebnisse finden sich in einer Studie von Huang et al. (2012). Hier wurde u.a. ein *CHD1*-KD in der Prostataepithelzelllinie RWPE-1 durchgeführt, welcher keinen Einfluss auf das Zellwachstum hatte, aber in einer gesteigerten Invasivität resultierte. Die dabei untersuchte Zelllinie RWPE-1 entstammt nicht-neoplastischen Zellen, exprimiert den AR und wächst androgenabhängig (Bello et al. 1997). Auch in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit von Augello et al. (2019) zeigte der Verlust von *CHD1* keinen Einfluss auf das Wachstum von Prostatakrebszellen. Untersucht wurde dabei, wie auch in dieser Arbeit, die Zelllinie LNCaP, die androgenabhängig wächst (Horoszewicz et al. 1983).

Der Einfluss von CHD1 auf das Zellwachstum in Anwesenheit von Androgenen lässt sich anhand dieser Ergebnisse nicht eindeutig beurteilen. Auch die Androgensensibilität der einzelnen Zelllinien scheint hierfür kein verlässlicher Parameter zu sein, da sich das Wachstumsverhalten der androgenabhängigen Zelllinie LNCaP in dieser Arbeit und der Studie von Augello et al. (2019) unterscheidet.

Dennoch weisen mehrere Faktoren darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen dem *CHD1*-Status, dem AR-Signalweg und dem Wachstum bzw. der Karzinogenese von Prostatakrebszellen besteht.

Zum einen konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass *CHD1*-depletierte LNCaP-Zellen unter Androgenentzug ein erhöhtes Zellwachstum aufweisen (siehe Abbildung 3-4). Das Wachstum von *CHD1*-intakten Zellen stagniert unter diesen Bedingungen hingegen vollständig. Da LNCaP-Zellen androgenabhängig wachsen, ist dies nicht verwunderlich. Es zeigt jedoch, dass der Verlust von *CHD1* den LNCaP-Zellen ein androgenunabhängiges Wachstum ermöglicht. Der Hormonentzug scheint sich sogar förderlich auf die Proliferation *CHD1*-depletierter Zellen auszuwirken. Ähnliche Ergebnisse fanden sich dazu in einer Studie von Zhang et al. (2020). Hier wurde unter anderem die Proliferation von LNCaP-Zellen unter Behandlung mit Enzalutamid untersucht. *CHD1*-depletierte Zellen zeigten ein dabei ein schnelleres Wachstum als *CHD1*-Wildtyp-Zellen. Nach Wiedereinbringung des Chromatinremodulators in die Zellen durch eine *CHD1*-cDNA war die Resistenz gegen den AR-Inhibitor zudem komplett reversibel.

#### 4.1.2 Einfluss von CHD1 auf die Transkription

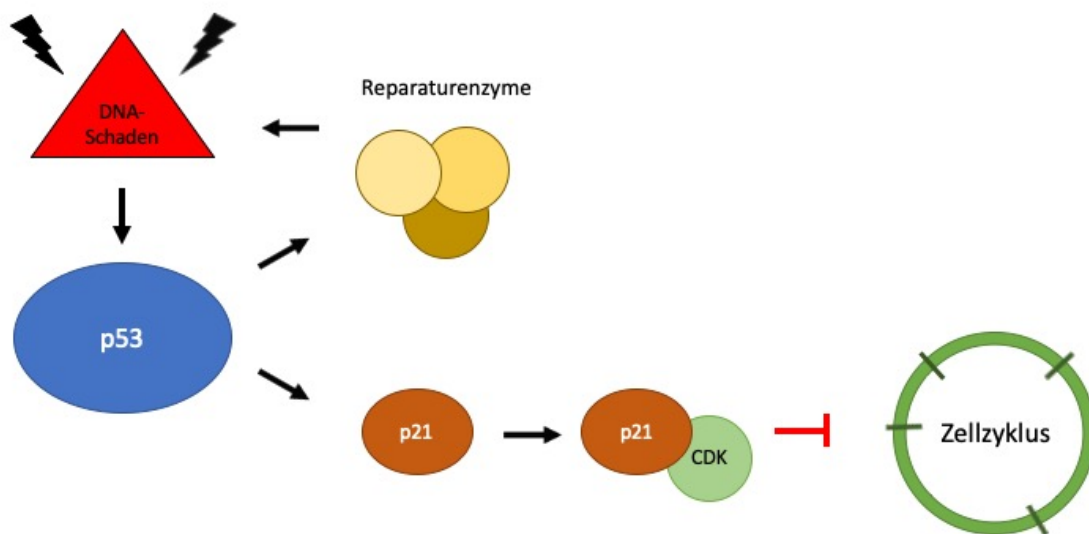
Zum anderen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass durch den Androgenentzug die Interaktion zwischen CHD1 und dem Chromatin beeinflusst wird. In Kapitel 3.5 konnte nachgewiesen werden, dass CHD1 unter Androgendeprivation vermehrt nahe der TSS hochregulierter Gene bindet (siehe Abbildung 3-7).

Dies entspricht den Ergebnissen unterschiedlicher Studien, in denen der Chromatinremodulator als wichtiges Element in der aktiven Transkription von Genen identifiziert wurde. In embryonalen Stammzellen ist CHD1 mit einer offenen Chromatinstruktur und vermehrter Gentranskription assoziiert (Gaspar-Maia et al. 2009; Koh et al. 2015). CHD1 wird insbesondere zu den TSS aktiv transkribierter Gene rekrutiert und garantiert dort die Zugänglichkeit des Chromatins für andere Enzyme (Siggens et al. 2015). Es konnte gezeigt werden, dass CHD1 mit verschiedenen Elongationsfaktoren an aktiv transkribierten Genen interagiert (Sismic et al. 2003). Es ist daher anzunehmen, dass CHD1 unter Hormonentzug aktiv zu der vermehrten Expression bestimmter Gene in LNCaP-Zellen beiträgt, indem es nahe der TSS dieser Gene bindet. Die Anwesenheit von CHD1 führt dabei zu einer besseren Zugänglichkeit der DNA für andere Enzyme der Proteinbiosynthese.

### 4.1.3 Zielgene von CHD1

Abbildung 3-8 stellt die Schnittmenge der Gene dar, die einerseits nach Hormonentzug signifikant vermehrt exprimiert werden ( $fold\ change > 1$ , p-Wert  $< 0,05$ , q-Wert  $< 0,01$ ), und andererseits eine signifikante CHD1-Anreicherung unter Hormonentzug aufweisen (q-Wert  $< 0,05$ ). Die dabei identifizierten 36 Gene sind in Tabelle 3-2 dargestellt. Zu diesen zählt unter anderem das Gen *CDKN1A*.

*CDKN1A* codiert für das Protein p21 einen wichtigen Regulator des Zellzyklus. p21 wirkt inhibierend auf den Zellzyklus, indem es reversible Komplexe mit den CDKs bildet (Xiong et al. 1993). Als Bestandteil des p53-Signalwegs kommt diese Funktion beispielsweise zum Tragen, wenn in der Zelle DNA-Schäden auftreten. In diesem Fall akkumuliert p53 in der geschädigten Zelle und wird von unterschiedlichen Enzymen phosphoryliert, was in einer Konformationsänderung und Aktivierung des Proteins als Transkriptionsregulator resultiert. In dieser Funktion induziert p53 dann die Expression von p21. Außerdem interagiert p53 mit unterschiedlichen Enzymen, die in die Reparatur der geschädigten DNA involviert sind. Der beschriebene Mechanismus stellt somit eine Kontrollinstanz dar, die die Zelle im Falle einer Schädigung vor maligner Entartung schützen soll (Mello und Attardi 2018). Er ist in der folgenden Abbildung 4-1 schematisch dargestellt.



**Abbildung 4-1: Vereinfachte Darstellung des p53/p21-Signalwegs (nach Mello und Attardi 2018).**

Die Ergebnisse einer Arbeit von Gotoh et al. (1997) zu p21 im Prostatakarzinom stützen diese Erkenntnisse. Hier wurde mithilfe eines Vektors p21 künstlich in unterschiedliche Prostatakrebszelllinien eingebracht. Sowohl in androgenabhängigen (LNCaP) wie auch in androgenunabhängigen (PC3) Zelllinien resultierte dies in einem Stopp der Zellproliferation.

Abbildung 3-16 zeigt die Bindungsprofile von CHD1 und der H3K4me3 am Gen *CDKN1A* in den Konditionen WT FBS und WT CSS. Es zeigen sich vermehrte Anreicherungen des Chromatinremodulator und der Histonmodifikation unter Hormonentzug im Bereich um die TSS.

Möglicherweise stellt die CHD1-vermittelte Expression von *CDKN1A* einen Mechanismus dar, der unter Hormonentzug p21-abhängig einen Stopp der Zellproliferation bewirkt.

Eine kürzlich veröffentlichte Studie von Augello et al. (2019) lieferte zudem weitere Erkenntnisse bezüglich der epigenetischen Interaktion von CHD1 und dem AR beim Prostatakarzinom. In dieser wurden die genomweiten Bindungsprofile der beiden Proteine analysiert. Es zeigte sich, dass CHD1 an *Enhancern* von AR-Zielgenen bindet und so die Aktivität des Rezeptors reguliert. Der Verlust von *CHD1* führte zu einer Umverteilung der genomweiten AR-Bindungen und einer daraus resultierenden Aktivierung bestimmter Signalwege, die mit Tumorprogression des Prostatakarzinoms assoziiert sind.

Die Ergebnisse dieser Arbeit komplettieren dieses Bild. Nicht nur der Verlust des Gens *CHD1* beeinflusst die AR-bedingte Transkription. Entgegengesetzt beeinflusst auch die Verfügbarkeit von Androgenen die Bindung von CHD1 und dadurch die Expression bestimmter Gene (siehe Abbildung 3-7). Die epigenetische Wechselwirkung dieser beiden Faktoren stellt somit mutmaßlich einen zentralen Punkt in der Pathogenese des Prostatakarzinoms dar.

## 4.2 EZH2

In der Bestrebung, die durch Androgenentzug und CHD1-Bindung regulierten Gene mit bekannten zellulären Signalwegen oder epigenetischen Regulationsmechanismen zu assoziieren und somit weitere Einblicke in die Mechanismen der Regulation zu erhalten, wurde eine *Gene Set Enrichment Analysis* durchgeführt (siehe Kapitel 3.7). Dadurch konnten die regulierten Gene mit der Histonmodifikation H3K27me3 assoziiert werden (siehe Abbildung 3-11), welche durch die Methyltransferase EZH2 katalysiert wird.

### 4.2.1 EZH2-Überexpression in Krebserkrankungen

In dieser Arbeit wurde daraufhin die Expression von *EZH2* in LNCaP-Zellen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *CHD1*-Depletion in LNCaP-Zellen in einer vermehrten Expression sowie Gesamtproteinmenge von *EZH2* resultiert. Die höchste Expression von *EZH2* zeigte sich dabei in der Gruppe CSS sh4, also mit *CHD1*-KD unter Hormonentzug (siehe Abbildung 3-12). Gleichzeitig fand sich kein Hinweis auf eine differenziell regulierte Expression der Demethylasen KDM6A und KDM6B.

Erhöhte Expressionswerte von *EZH2* sind mit verschiedenen Krebserkrankungen assoziiert. So konnte gezeigt werden, dass in Blasen-, Mamma- und Prostatakarzinomen die katalytische Untereinheit *EZH2* vermehrt exprimiert wird und mit der Aggressivität der Erkrankungen korreliert (Kleer et al. 2003; Bachmann et al. 2006; Collett 2006). Auch in Studien von kolorektalen Karzinomen und Plattenepithelkarzinomen der Mundhöhle konnte diese Beobachtung gemacht werden (Mimori et al. 2005; Kidani et al. 2009). In einer Studie von Varambally et al. (2002) wurde die *EZH2*-Expression in insgesamt 1023 Gewebeproben von Prostatabiopsien untersucht. Die untersuchten Proben reichten von benignen oder atrophierten Prostatageweben, über prostatistische intraepitheliale Neoplasien und lokalisierte Prostatakarzinome bis hin zu metastasierten, kastrationsresistenten Prostatakarzinomen. Es konnte gezeigt werden, dass die *EZH2*-Expression mit zunehmender Progression der Erkrankung steigt. Die stärkste Expression von *EZH2* konnte in Gewebeproben von mCRPCs nachgewiesen werden. In diesen Proben war die Expression von *EZH2* signifikant höher als in lokalisierten Prostatakarzinomen.

#### 4.2.2 *EZH2* als Onkogen

Die Ergebnisse verschiedener Studien weisen zudem darauf hin, dass *EZH2* in unterschiedlichen Krebserkrankungen als Onkogen fungiert.

Als Onkogene werden Gene bezeichnet, deren Mutation oder Amplifikation zur Karzinogenese einer Zelle beitragen. Als Proto-Onkogene werden diese Gene zunächst normal exprimiert. Für gewöhnlich sind sie an zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung und Apoptose beteiligt. Durch Mutation oder Amplifikation werden Proto-Onkogene zu Onkogenen. Es kommt zur Dysregulation wichtiger zellulärer Prozesse und zur malignen Entartung der Zelle (Croce 2008).

In der o. g. Studie von Bachmann et al. (2006) wurde die *EZH2*-Expression in Tumorgeweben von insgesamt 696 Patienten bestimmt. Die untersuchten Gewebe stammten aus Prostatakarzinomen, Mammakarzinomen, Endometriumkarzinomen und Melanomen. Es konnte gezeigt werden, dass die *EZH2*-Expression mit der Tumorzellproliferation korreliert. Tumore mit einer erhöhten Expression von *EZH2* wiesen eine gesteigerte Proliferationsrate auf. Dazu passende Beobachtungen konnten in Arbeiten zu der Rolle von *EZH2* in Pankreas- und Kolonkarzinomen gemacht werden. In beiden Tumorarten resultierte die Depletion von *EZH2* in einer verminderten Tumorzellproliferation (Ougolkov et al. 2008; Fussbroich et al. 2011). Die o. g. Arbeit von Varambally et al. (2002) untersuchte zudem, wie sich die verminderte Expression von *EZH2* in zwei Prostatazelllinien auf die Zellproliferation auswirkt. Die Zelllinie RWPE entstammt gesundem Prostatagewebe, die Zelllinie PC3 hingegen entstammt kastrationsresistentem Gewebe einer Prostatakrebs-Metastase. In beiden Zelllinien führte eine reduzierte *EZH2*-Expression zu einer deutlichen Hemmung der Zellproliferation.



Weiterhin ist ein onkogenes Potenzial der Methyltransferase in verschiedenen Arbeiten zu Migrations- und Invasionsverhalten von Tumorzellen zu beobachten. Speziell für Prostatakrebszellen wurde dort die Rolle von *EZH2* genauer analysiert. In einer Studie von Cao et al. (2008) wurden zunächst eine Überexpression von *EZH2* in gesunden Epithelzellen der Prostata herbeigeführt. Die Zellen wiesen daraufhin einen vermehrt invasiven Phänotyp auf. Außerdem wurden Zellen der Prostatakrebszelllinie DU145 mit einer *EZH2*-spezifischen shRNA transduziert. DU145-Zellen stellen eine weitere häufig verwendete Zelllinie in der Prostatakrebsforschung dar. Sie wurden aus einer Hirnmetastase isoliert, wachsen androgenunabhängig und haben ein moderates Metastasierungspotenzial (Stone et al. 1978; MuraliKrishna et al. 2005). Der induzierte Knockdown von *EZH2* minderte das invasive Potenzial dieser Zelllinie deutlich.

Diese Ergebnisse werden durch eine ähnliche Studie von Shin und Kim (2012) gestützt. Die Arbeit untersuchte die *EZH2*-Expression und das Invasionsverhalten der Prostatakrebszelllinien LNCaP, PC3 und DU145. Die Expressionswerte von *EZH2* korrelierten hier mit der invasiven Aktivität der Zelllinien.

Xu et al. (2012) beschrieben außerdem einen weiteren Mechanismus, der *EZH2* als Onkogen in kastrationsresistenten Prostatakrebszellen identifiziert. So konnten sie zeigen, dass das Enzym abgesehen von seiner repressiven Funktion als Methyltransferase auch als Coaktivator diverser Transkriptionsfaktoren agiert, unter anderem dem AR.

Die Resultate der angeführten Studien geben Hinweis darauf, dass *EZH2* auch in den in dieser Arbeit untersuchten Zellen eine wichtige Rolle in der Tumorprogression und Kastrationsresistenz spielen könnte. Um den tatsächlichen Einfluss des Proteins auf Transkriptionsebene zu untersuchen, wurden deshalb die DNA-Protein-Interaktionen von *EZH2* und der H3K27me3 analysiert (siehe Kapitel 3.9).

### 4.2.3 *EZH2* in der epigenetischen Regulation

Speziell wurden hierfür die Bindungsprofile in der Gruppe von Genen untersucht, die unter Androgenentzug vermehrt exprimiert werden, um dann mit *CHD1*-KD reprimiert zu werden. Für diese Gene konnte eine vermehrte *CHD1*-Bindung unter Androgendeprivation festgestellt werden (siehe Abbildung 3-7). Gleichzeitig konnte festgestellt werden, dass nach *CHD1*-Depletion *EZH2* und die H3K27me3 vermehrt nahe der TSS dieser Gene binden (siehe Abbildung 3-14 und Abbildung 3-15).

Da *EZH2* als Teil des *Polycomb repressive complex 2* die Mono-, Di-, und Trimethylierung von Lysin 27 an Histon 3 katalysiert und dadurch repressiv auf die Genexpression einwirkt (Margueron und Reinberg 2011), ist somit davon auszugehen, dass *EZH2* H3K27me3-vermittelt nach *CHD1*-Verlust die Expression bestimmter Gene im Androgenentzug reprimiert.

Gleichzeitig stellt sich die Frage nach der Bedeutung von *CHD1* für die Genregulation durch *EZH2*. *CHD1* scheint maßgeblich auf die epigenetische Regulation durch *EZH2*

einzuwirken, da sich eine vermehrte Bindung des Enzyms erst nach *CHD1*-Depletion zeigt. Aber welcher Zusammenhang besteht zwischen dem Verlust des Chromatinremodulators und der Akkumulation von EZH2?

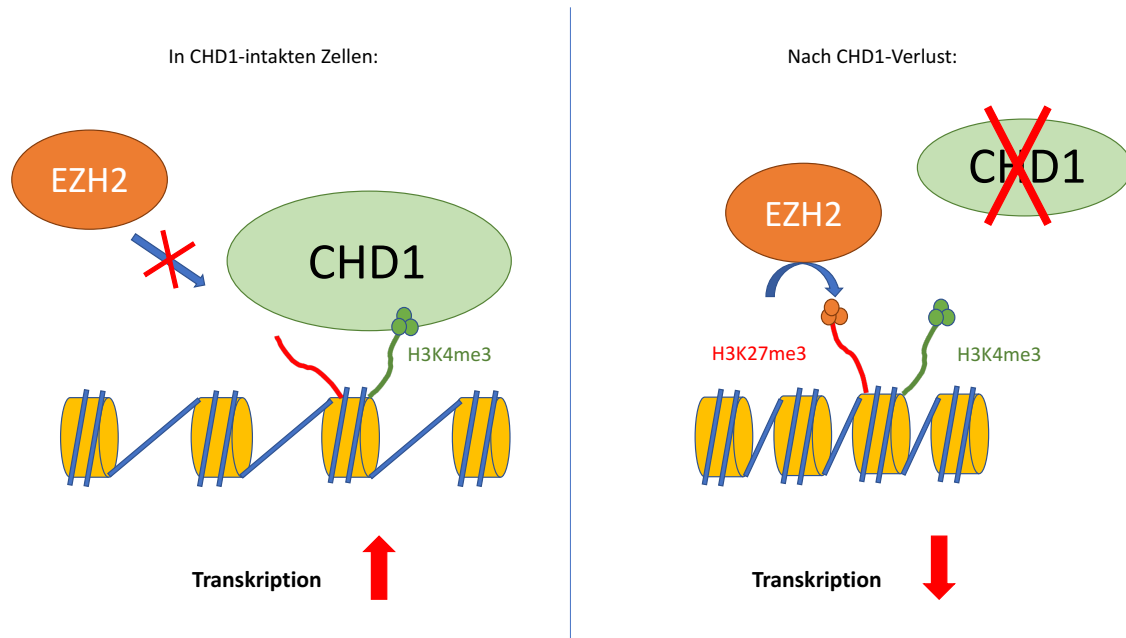
#### 4.2.4 Bivalentes Chromatin

Ein Zusammenspiel von CHD1 und EZH2 in der epigenetischen Regulation der Genexpression konnte unter anderem für bestimmte Abschnitte des Genoms embryonaler Stammzellen (ES-Zellen) beobachtet werden. Diese Chromatinbereiche werden auch als bivalentes Chromatin bezeichnet. Charakteristisch für bivalentes Chromatin ist, dass es sowohl aktivierende wie auch inhibierende Histonmodifikationen trägt. So konnte gezeigt werden, dass die Histonmodifikationen H3K27me3 und H3K4me3 die Promotoren von Genen co-okkupieren, die für die Differenzierung der Zelle von Bedeutung sind (Bernstein et al. 2006; Mikkelsen et al. 2007). Es wird davon ausgegangen, dass die entgegengesetzt wirkenden Histonmodifikationen dabei als eine Art Schalter für diese Gene fungieren. Die repressive Histonmodifikation H3K27me3 unterdrückt die Transkription und erhält so die Pluripotenz der Zelle. Gleichzeitig ermöglicht es die Histonmodifikation H3K4me3, das Gen ab einem bestimmten Zeitpunkt zu transkribieren und dadurch die Differenzierung von ES-Zellen zu spezialisiertem Gewebe einzuleiten (Vastenhouw und Schier 2012).

Interessanterweise konnte in verschiedenen Studien zudem eine Assoziation zwischen den Methylierungsmustern bivalenter Chromatinomänen von ES-Zellen und Methylierungsmustern in Krebszellen festgestellt werden. Schlesinger et al. 2007 konnten dabei zunächst zeigen, dass in unterschiedlichen Tumorentitäten H3K27me3-abhängig Hypermethylierungen bestimmter Gene auftreten. Widschwendter et al. (2007) und Easwaran et al. (2012) verglichen daraufhin diese Gene mit bivalenten Chromatinabschnitten in ES-Zellen. Dabei zeigte sich, dass einige der in Krebszellen durch Hypermethylierung reprimierten Gene als Differenzierungsregulatoren in bivalenten Chromatinregionen von ES-Zellen fungieren. Die Expression dieser Gene wird dort H3K27me3-abhängig reprimiert. Entsprechende Ergebnisse fanden sich in einer Studie von Ben-Porath et al. (2008). Hier wurden typische Genexpressionsmuster von ES-Zellen in Tumorzellen untersucht. Es zeigte sich, dass EZH2-Zielgene in ES-Zellen auch in verschiedenen mäßig differenzierten Tumorentitäten vermindert exprimiert werden, beispielsweise in Brust- und Blasenkrebszellen. Es wird daher vermutet, dass die Entstehung stammzellartiger Histonmodifikationsmuster in Tumorzellen in Genexpressionsprofilen resultiert, die denen von Stammzellen ähneln. Diese veränderte Genexpression führt mutmaßlich zu Stammzeleigenschaften in Tumorzellen, wie etwa einer verminderten Differenzierung und einer vermehrten Proliferation.

Mit Hinblick auf diese Erkenntnisse lässt sich für die Ergebnisse dieser Arbeit folgende Hypothese aufstellen: In LNCaP-Zellen findet im Hormonentzug für eine bestimmte Gruppe von Genen eine bivalente Regulation durch die beiden Enzyme CHD1 und EZH2 statt. Das intakte CHD1 fördert dabei zunächst die Expression dieser Gene und blockiert die Bindung

von EZH2 und die dadurch vermittelte H3K27me3. Nach Verlust von CHD1 kann EZH2 an die nun freien Bereiche des Chromatins binden und H3K27me3-vermittelt die Transkription dieser Gene unterdrücken. Vereinfacht ist dieser Mechanismus in Abbildung 4-2 dargestellt.



**Abbildung 4-2: Mögliche bivalente Regulation durch CHD1 und EZH2 im Hormonentzug.** In *CHD1*-intakten Zellen blockiert CHD1 die H3K27me3 durch EZH2. Nach Verlust des Chromatinremodulator kommt es dann EZH2/H3K27me3-vermittelt zur Repression der Transkription.

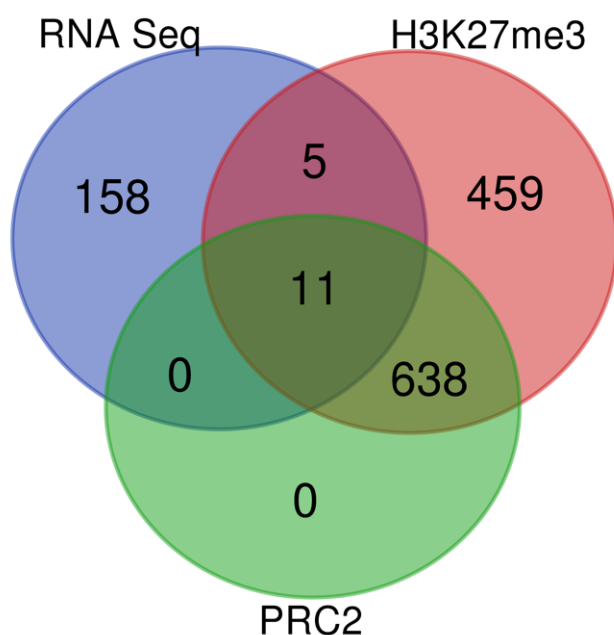
Möglicherweise kommt es durch diesen Prozess zur Repression von Genen aus bivalenten Chromatinomänen. Davon ausgehend, dass diese Chromatinbereiche für Gene codieren, die für Differenzierungsprozesse und Proliferation der Zelle von Bedeutung sind (Bernstein et al. 2006), würde diese Repression somit zur De-differenzierung, vermehrter Proliferation und letztlich Karzinogenese der Zelle beitragen.

Um diese Hypothese einer ersten Prüfung zu unterziehen, wurden die in der RNA-Seq signifikant regulierten Gene (vermehrt exprimiert mit Androgenentzug, vermindert exprimiert mit *CHD1*-KD) mit unterschiedlichen Gensätzen aus der o. g. Arbeit von Ben-Porath et al. (2008) verglichen.

Abbildung 4-3 zeigt die Schnittmenge dieser Gene (RNA-Seq) mit zwei Gen Sets: Das Gen Set H3K27me3 umfasst Gene, die in ES-Zellen eine H3K27me3-Signatur in der Promoterregion tragen. Das Gen Set PRC2 beinhaltet Zielgene des PRC2 in ES-Zellen. Diese sind in diesem Fall definiert als Gene, die sowohl von der H3K27me3 als auch von SUZ12 und EED gebunden werden, welche Teil des PRC2 sind. Wie aus Abbildung 4-3 hervorgeht, ist das Gen Set PRC2 daher komplett im Gen Set H3K27me3 enthalten.

Aus Abbildung 4-3 ist ersichtlich, dass insgesamt 16 der 174 in der RNA-Seq differenziell regulierten Gene auch in ES-Zellen eine H3K27me3-Signatur aufweisen. Von diesen 16 Genen werden außerdem elf Gene von SUZ12 und EED gebunden, was sie als Zielgene des PRC2 qualifiziert, zu denen auch EZH2 gehört (Abbildung 1-3).

Die Beobachtungen stützen die oben beschriebene Hypothese, dass EZH2 im Hormonentzug nach Verlust von CHD1 vermehrt an Gene bindet, die auch in ES-Zellen PRC2-abhängig vermindert exprimiert werden und so mutmaßlich durch Förderung stammzellartiger Expressionsmuster zur Karzinogenese in LNCaP-Zellen beiträgt.



**Abbildung 4-3: Vergleich von differenziell regulierten Genen mit zwei Gen Sets aus Ben-Porath et al. (2008).** Der blaue Kreis (RNA-Seq) umfasst alle Gene, die in der RNA-Seq signifikant (*fold change* > 1, p-Wert < 0,05, q-Wert < 0,01) differenziell reguliert sind (vermehrt exprimiert mit Androgenentzug, vermindert exprimiert mit *CHD1*-KD). Der rote Kreis (H3K27me3) beinhaltet Gene mit H3K27me3-Signatur in ES-Zellen, der grüne Kreis (PRC2) umfasst PRC2-Zielgene in ES-Zellen.

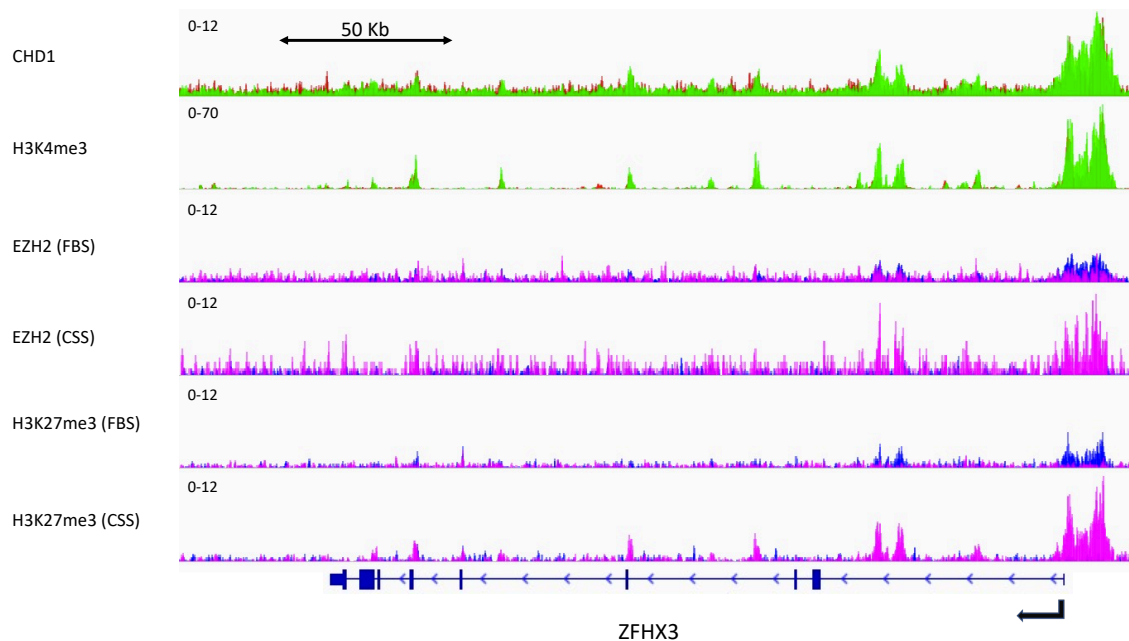
#### 4.2.5 Zielgene von EZH2

Im nächsten Schritt wurden die elf Gene, die als Schnittmenge dieser drei Gen Sets identifiziert werden konnten (siehe Abbildung 4-3), auf Assoziationen mit der Karzinogenese des Prostatakarzinoms untersucht. Als in dieser Hinsicht relevant konnte das Gen *ZFHX3* (*Zinc finger homeobox protein 3*) identifiziert werden. Es codiert für einem Transkriptionsfaktor aus der Familie der Zinkfingerproteine (Morinaga et al. 1991).

*ZFHX3*-Mutationen gehören zu den häufigsten Mutationen in fortgeschrittenen PCas und CRPCs. Darunter fallen vor allem *Frameshift*-Mutationen, die zu einer Inaktivierung des Proteins führen (Sun et al. 2005; Grasso et al. 2012). In Mäusen führte die Depletion von *ZFHX3* zu intraepithelialen Prostataneoplasien, die eine Dysregulation in der Expression von Zellmembranproteinen aufwiesen (Sun et al. 2014). Hu et al. (2019) konnten in LNCaP-Zellen zeigen, dass *ZFHX3* mit dem Estrogenrezeptor beta (ER $\beta$ ) interagiert, um über die Repression des Transkriptionsfaktors MYC die Zellproliferation zu inhibieren. Der Verlust von *ZFHX3* führte dazu, dass der ER $\beta$  nicht mehr an MYC binden konnte, was in einer vermehrten Zellproliferation resultierte. Dem ER $\beta$  wird bezüglich der Pathogenese des Prostatakarzinoms eine Rolle als Tumorsuppressor zugeschrieben (Stettner et al. 2007).

Die Bindungsprofile der hier untersuchten epigenetischen Regulatoren und Modifikationen am Gen *ZFHX3* sind in Abbildung 4-4 dargestellt. Wie erwartet zeigen sich nach *CHD1*-KD im Hormonentzug vermehrte Bindungen der H3K27me<sub>3</sub> und EZH2. Das Gen wird reprimiert. Die Bindungen von CHD1 und der H3K4me<sub>3</sub> zeigen hingegen keinen nennenswerten Unterschied in Anwesenheit von Androgen und nach Hormonentzug.

Eine EZH2/H3K27me<sub>3</sub>-vermittelte Repression von *ZFHX3* nach *CHD1*-Verlust könnte unter Berücksichtigung des o. g. Einflusses des Genes auf die Zellproliferation ein Mechanismus sein, der zum Wachstum von LNCaP-Zellen im Hormonentzug beitragen könnte.



**Abbildung 4-4: Bindungsprofile von CHD1, EZH2, H3K4me3 und der H3K27me3 am Gen *ZFH3*.** Die obere Spur zeigt die Bindungen von CHD1 an *CDKN1A* in LNCaP Wildtyp-Zellen. Diese wurden in FBS-Medium (grün) und CSS-Medium (rot) kultiviert. Darunter findet sich die Spur für die H3K4me3-Bindungen in LNCaP shNT in FBS-Medium (grün) und CSS-Medium (rot). Die Spuren wurden zueinander skaliert und übereinandergelegt. Die unteren Spuren zeigen die Bindungen von EZH2 und der H3K27me3 an *CDKN1A* in LNCaP-Zellen. LNCaP shNT (blau) und LNCaP sh*CHD1* (pink) wurden in FBS-Medium und CSS-Medium kultiviert. Die Spuren von EZH2 wurden untereinander skaliert und die Spuren der jeweiligen Medien übereinandergelegt, ebenso für die H3K27me3.

Des Weiteren ist für *ZFH3* eine aktivierende Wirkung auf *CDKN1A* und somit p21 beschrieben (Kataoka et al. 2003).

*CDKN1A* konnte von Lee et al. (2006) ebenfalls als EZH2-Zielgen in ES-Zellen identifiziert werden. Anhand der durchgeführten RNA-Seq ist ersichtlich, dass *CDKN1A* in LNCaP signifikant durch Hormonentzug und *CHD1*-Status reguliert wird. Nach Androgendeprivation wird es dabei zunächst vermehrt exprimiert, um dann mit *CHD1*-Verlust reprimiert zu werden.

Die IGV-Profile der unterschiedlichen epigenetischen Enzyme und Modifikationen an *CDKN1A* weisen auf eine Regulation entsprechend der o. g. Hypothese hin. Unter Hormonentzug zeigen CHD1 und die H3K4me3 vermehrte Anreicherungen am Gen (siehe Abbildung 3-16). Es wird in dieser Kondition am stärksten exprimiert. Mit *CHD1*-Verlust im Hormonentzug binden dann EZH2 und die H3K27me3 stärker am Gen (siehe Abbildung 3-16), *CDKN1A* wird reprimiert. Möglicherweise antagonisiert EZH2 nach *CHD1*-Verlust im Hormonentzug die Expressionsinduktion von p21 durch p53, welches in LNCaP-Zellen als Wildtyp-p53 vorliegt und somit nicht mutiert ist (Bokhoven et al. 2003). Dadurch würde ein zentraler Signalweg der Tumorsuppression gestört werden.

Die EZH2-abhängige Repression von *CDKN1A* bietet somit eine mögliche Erklärung für eine vermehrte Proliferation von LNCaP-Zellen mit *CHD1*-KD im Hormonentzug.

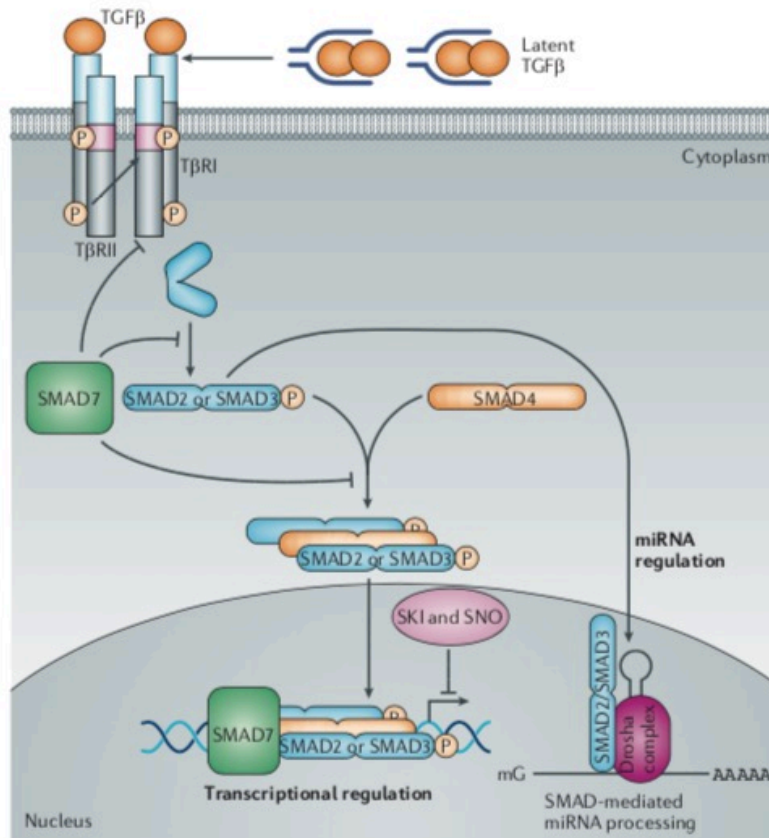
Unabhängig von Assoziationen mit bivalentem Chromatin in ES-Zellen wurden die potenziellen EZH2-Zielgene weiterhin auf Gene untersucht, für die ein Zusammenhang mit dem Krankheitsprogress von Prostatakarzinomen beschrieben wurde.

In Kapitel 3.10 wurden bereits die Bindungsprofile von EZH2, CHD1, H3K4me3 und der H3K27me3 an den Genen *CDKN1A* (Abbildung 3-16), *SMAD7* (Abbildung 3-17) und *PMEPA1* (Abbildung 3-18) dargestellt.

Das Protein *SMAD7* ist ein Bestandteil des TGF- $\beta$  Signalwegs (siehe Abbildung 4-5), welcher unterschiedliche zelluläre Funktionen wie Proliferation, Differenzierung, Zell-Zell-Adhäsion etc. reguliert. Vereinfacht dargestellt kommt es dabei nach Bindung eines Liganden der TGF- $\beta$  Familie an in der Zellmembran gelegenen TGF- $\beta$  Rezeptor Typ II zur Aktivierung und Komplexbildung mit einem Rezeptor Typ I. Dieser phosphoryliert die intrazellulären Proteine *SMAD2* und *SMAD3*, welche daraufhin einen Komplex mit *SMAD4* bilden und in den Zellkern wandern. Dort wirkt dieser Komplex je nach Interaktion mit anderen Enzymen fördernd oder hemmend auf die Expression unterschiedlicher Gene ein. Außerdem ist er in die Chromatinremodulation involviert. Der Signalweg wird gehemmt durch *SMAD7*, der die Komplexbildung von *SMAD2* und *SMAD3* mit *SMAD4* inhibiert. Die Signalvermittlung des TGF- $\beta$  Signalwegs ist dabei vor allem kontextabhängig und kann abhängig von Ligand und Gewebetyp unterschiedlich ausfallen (Hata und Chen 2016). Auch in Krebserkrankungen spielt der Signalweg eine ambivalente Rolle. So wird über TGF- $\beta$  zu Beginn der Erkrankung zunächst das Zellwachstum inhibiert und die Apoptose induziert. Im späteren Verlauf wirkt die Signalvermittlung dann häufig onkogen auf den Tumor, die Zellen proliferieren vermehrt und werden invasiver (Massagué 2008). Dementsprechend fallen auch die Beobachtungen bezüglich der Expression von *SMAD7* in unterschiedlichen Krebserkrankungen aus. So konnte die vermehrte Expression des Genes beispielsweise in Endometriumkarzinomen und kolorektalen Karzinomen mit einer schlechteren Überlebensrate assoziiert werden (Boulay et al. 2003; Dowdy et al. 2005).

Im Prostatakarzinom scheint *SMAD7* eine tumorsuppressive Wirkung zu haben. In einer Arbeit von Brodin et al. (1999) resultierte die Kastration von Ratten in Apoptose der Prostatazellen, gleichzeitig zeigten sich eine erhöhte *SMAD7*-Expression in den Zellen. Passend dazu konnten Landström et al. (2000) zeigen, dass die Überexpression von *SMAD7* in der Prostatakrebszelllinie PC3 zur Induktion von Apoptose führt.

Die EZH2-vermittelte Repression von *SMAD7* stellt somit einen möglichen Mechanismus des androgenunabhängigen Wachstums *CHD1*-depletierten Prostatakrebszellen im Hormonentzug dar. Zum einen kommt es dadurch zu einer verminderten proapoptotischen Wirkung des Proteins. Zum anderen fehlt die inhibierende Wirkung von *SMAD7* auf den TGF- $\beta$  Signalweg, welchem bei fortgeschrittenem Verlauf eine onkogene Wirkung auf die Krebserkrankung zugeschrieben wird.



**Abbildung 4-5: Der TGF-β Signalweg (aus Akhurst und Hata 2012).** Die Verwendung der Abbildung erfolgt mit freundlicher Genehmigung von Springer-Nature.

*PMEPA1* codiert für das *Transmembrane prostate androgen-induced protein* (TMPEPAI). Xu et al. (2003) konnten zeigen, dass die Überexpression von *PMEPA1* sich in unterschiedlichen PCa-Zelllinien (DU145, PC3, LNCaP) inhibierend auf das Zellwachstum auswirkt. Zudem verglich die Studie PCa-Biopsien und gesundes Prostatagewebe von 62 Patienten. In 40 dieser 62 Fälle war die *PMEPA1*-Expression im Tumorgewebe niedriger als im gesunden Gewebe. In diesen Fällen war die Erkrankung assoziiert mit einem erhöhten pathologischen Staging und erhöhten Serum-PSA-Werten. Niedrige *PMEPA1*-Expression konnte zuletzt vermehrt mit Metastasen von Prostatakarzinomen assoziiert werden. Außerdem konnte in einem Mausmodell gezeigt werden, dass der Knockdown von *PMEPA1* vermehrt in Metastasen von PCa-Zellen resultiert (Fournier et al. 2015).

*PMEPA1* wird, wie auch *SMAD7* und *CDKN1A*, nach *CHD1*-Verlust im Hormonentzug EZH2-vermittelt reprimiert. Auch Zhang et al. (2020) konnten zeigen, dass die Depletion von *CHD1* in LNCaP-Zellen in einer verminderten Expression von *PMEPA1* als einem möglichen AR-Zielgen resultiert.



Die Repression von *PMEPA1* stellt unter Berücksichtigung der o. g. Forschungsergebnisse somit einen weiteren Faktor dar, der zur Onkogenese des *CHD1*-depletierten Prostatakarzinoms unter Hormonentzug beitragen könnte.

Die untersuchten Gene bieten Ansatzpunkte, um ein androgenunabhängiges Wachstum von LNCaP-Zellen anhand epigenetischer Regulationsmechanismen zu erklären. Konkrete Aussagen bezüglich des Einflusses einzelner Mechanismen lassen sich so allerdings nicht treffen. Hierzu müssten weitere Untersuchungen folgen. Diese könnten beispielweise in Form von Expressionsanalysen einzelner Gene (Western Blot, RT-PCR), Knockdownexperimenten und Proliferationsassays erfolgen.

#### 4.2.6 EZH2-Inhibitoren als Therapieoption für Krebserkrankungen

Die Überexpression von *EZH2* und damit verbundene Deregulierung verschiedener zellulärer Prozesse scheint eine wichtige Rolle in der Progression unterschiedlicher Tumorerkrankungen zu spielen. Die Entwicklung und Testung von *EZH2*-Inhibitoren ist daher ein aktiver Bestandteil der aktuellen Krebsforschung.

Erste Ergebnisse konnten dabei zunächst mit dem Stoff 3-Deazaneplanocin A (DZNep) erzielt werden. DZNep ist ein Inhibitor der S-Adenosylhomocystein-Synthese und fungiert außerdem als unspezifischer Methyltransferase-Inhibitor (Glazer et al. 1986). Die Behandlung mit 5  $\mu$ M DZNep führte zum Zelltod unterschiedlicher Krebszelllinien, auch der PCa-Zelllinie DU-145 (Tan et al. 2007). Es konnte gezeigt werden, dass DZNep die Proteinlevel von *EZH2*, *SU12* und *EED* reduziert und außerdem die *H3K27me3* inhibiert. Nach DZNep-Behandlung kam es zur Re-Expression verschiedener Gene, die zuvor *EZH2*-abhängig reprimiert worden waren. Im Mammakarzinomzellen führte dies zur Induktion von Apoptose.

Auf DZNep folgend wurden in den letzten Jahren Stoffe entwickelt, die selektivere Inhibitoren für *EZH2* darstellen, darunter EPZ005687 und GSK126. EPZ005687-Behandlung führte in Lymphom-Zellen zur einer verminderten *H3K27me3*-Bindung und induzierte Apoptose in *EZH2*-mutierten Zellen (Knutson et al. 2012). Das *small molecule* GSK126 weist eine noch höhere Selektivität für *EZH2* auf. Ähnlich wie EPZ005687 reduzierte es in Lymphom-Zellen das *H3K27me3*-Level und bewirkte außerdem die Re-expression von PRC2-reprimierten Zielgenen. Sowohl in Lymphom-Zelllinien als auch in Lymphom-transplantierten Mäusen inhibierte GSK126 das Wachstum der Tumorzellen (McCabe et al. 2012).

In einer Studie von Kirk et al. (2015) wurde die Wirkung von GSK126 in Kombination mit dem Chemotherapeutikum Etoposid auf die PCa-Zelllinien LNCaP und Myc-CaP getestet. Die Kombination der beiden Stoffe führte in beiden Zelllinien zu einer signifikanten Steigerung des Zelltodes. Die Zelllinie Myc-CaP wurde aus dem Prostatakarzinom einer Maus isoliert. Die Entstehung des Karzinoms war zuvor durch Transduktion des Genes *c-Myc* induziert worden. Die Zelllinie wächst androgenabhängig und zeigt eine Überexpression des AR ohne vorangegangene Androgendeprivation (Watson et al. 2005).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung des EZH2-Inhibitors JQEZ5 auf das Wachstum der LNCaP-Zellen untersucht. JQEZ5 wurde in einer Studie von Zhang et al. (2016) entwickelt und an Mäusen mit *EZH2*-überexprimierenden Lungenkarzinomen getestet. Der Inhibitor bewirkte eine Regression des Tumorwachstums in Mäusen und reduzierte außerdem die H3K27me3-Level in den Tumorzellen. Der Inhibitor weist im Vergleich zu GSK126 eine ähnliche Wirkstärke auf, die mittlere inhibitorische Konzentration lag für beide Stoffe bei 80 nM. Während für GSK126 jedoch *in vivo* Dosen bis zu 150 mg/kg benötigt wurden, um eine Anti-Tumorwirkung zu zeigen (McCabe et al. 2012), konnte diese durch JQEZ5 bereits bei 75 mg/kg erreicht werden, was für eine verbesserte Pharmakokinetik des Inhibitors spricht.

JQEZ5 scheint in LNCaP-Zellen unter Hormonentzug keinen großen Einfluss auf das Zellwachstum zu haben. Dennoch lässt sich erkennen, dass dieser abhängig vom *CHD1*-Status der Zellen ist. Die inhibierende Wirkung wirkt sich dabei stärker auf *CHD1*-depletierte Zellen aus. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen eine höhere Expression von *EZH2* aufweisen, und *EZH2* in diesen Zellen möglicherweise die Repression bestimmter Tumorsuppressorgene vermittelt. Zu berücksichtigen ist hierbei, dass LNCaP-Zellen ohne *CHD1*-Depletion (CSS NT) nur ein schwaches Zellwachstum unter Hormonentzug aufweisen. Dies erschwert die Beurteilung des Einflusses von JQEZ5 auf diese Gruppe.

Der Inhibitor zeigt vor allem für die Konzentrationen 1  $\mu$ M und 5  $\mu$ M eine inhibierende Wirkung auf das Zellwachstum. Kohärent damit konnte in den Experimenten von Zhang et al. (2016) eine inhibierende Wirkung von JQEZ5 für Konzentrationen von 2  $\mu$ M und 5  $\mu$ M auf das Wachstum verschiedener Lungenkarzinomzelllinien beobachtet werden.

## 5 Zusammenfassung

Das Prostatakarzinom weist in seinem klinischen Verlauf ab einem bestimmten Zeitpunkt ein androgenunabhängiges Wachstum auf. Diese Kastrationsresistenz ist assoziiert mit einer schlechteren Prognose, vermehrter Bildung von Metastasen und erhöhter Mortalität. Sequenzierungsstudien von Prostatabiopsien konnten zeigen, dass in kastrationsresistenten Prostatakarzinomen vermehrt genetische Aberrationen im Gen *CHD1* auftreten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Rolle des Chromatinremodulators CHD1 für die Kastrationsresistenz des Prostatakarzinoms zu untersuchen. Hierfür wurden verschiedene mikrobiologische Methoden eingesetzt, um epigenetische Regulationsmechanismen zu identifizieren, die zur Kastrationsresistenz von Prostatakarzinomzellen beitragen.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass der Knockdown von *CHD1* in LNCaP-Zellen ein androgenunabhängiges Wachstum fördert.

Sowohl Androgenentzug als auch *CHD1*-Depletion beeinflussen die Genexpression in LNCaP-Zellen. CHD1 bindet unter Hormondeprivation vermehrt nahe der TSS hochregulierter Gene. Nach Depletion von *CHD1* werden diese Gene dann vermindert exprimiert. Dies weist darauf hin, dass CHD1 unter Hormonentzug die Transkription bestimmter Gene fördert.

Des Weiteren scheint die Methyltransferase EZH2 eine zentrale Rolle in der epigenetischen Regulation der Genexpression in LNCaP-Zellen einzunehmen. *EZH2* wird in *CHD1*-depletierten Zellen vermehrt exprimiert. Im Hormonentzug bindet EZH2 nach *CHD1*-KD stärker nahe der TSS vermindert exprimierter Gene. Diese Gene zeigen ebenfalls erhöhte Anreicherungen von H3K27me3 im Bereich um die TSS. Diese Schlussfolgerung legt nahe, dass EZH2 H3K27me3-vermittelt die Transkription bestimmter Gene reprimiert, deren Expression unter Androgenentzug zunächst durch CHD1 gefördert wird.

Als durch CHD1 und EZH2 regulierte Ziele konnten unter anderem die Gene *CDKN1A*, *SMAD7* und *PMEPA1* identifiziert werden. Die Repression dieser Gene wird mit Proliferation und Metastasierung von Prostatakrebszellen assoziiert.

Der EZH2-Inhibitor JQEZ5 wirkt sich inhibierend auf das Wachstum von *CHD1*-depletierten Zellen im Androgenentzug aus.

Zusammengefasst weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hin, dass die Depletion von *CHD1* in LNCaP-Zellen unter Hormonentzug in einer EZH2/H3K27me3-vermittelten Repression von Tumorsuppressorgenen resultiert. Der Verlust von *CHD1* fördert über diesen Mechanismus das androgenunabhängige Wachstum von LNCaP-Zellen. Im Prostatakarzinomen tragen *CHD1*-Deletionen so möglicherweise zu der Entstehung einer Kastrationsresistenz und einer Progression der Erkrankung bei.

Die Ergebnisse weisen auf eine mögliche Therapieoption mit EZH2-Inhibitoren für das kastrationsresistente Prostatakarzinom mit *CHD1*-Depletion hin. Um zu erklären, mittels welcher Mechanismen CHD1 und EZH2 einander beeinflussen, bedarf es weiterer Studien.

## 6 Anhang

### 6.1 Liste differenziell regulierter Gene

Im Folgenden werden alle Gene aufgelistet, die durch die RNA-Seq anhand der Kriterien  $fold\ change > 1$ , p-Wert  $< 0,05$ , q-Wert  $< 0,01$  als signifikant differenziell reguliert identifiziert werden konnten. Die folgenden Gene zeigen dabei eine vermehrte Expression nach Hormonentzug (von FBS NT zu CSS NT) und werden im Hormonentzug nach *CHD1*-Verlust vermindert exprimiert (von CSS NT zu CSS sh*CHD1*):

Tabelle 6-1: Liste differenziell regulierter Gene

Differenziell regulierte Gene			
<i>ABCC8</i>	<i>EGLN3</i>	<i>LOC100128822</i>	<i>SLC22A17</i>
<i>ABP1</i>	<i>EIF2C1</i>	<i>LOC100130417</i>	<i>SLC2A8</i>
<i>ALDH5A1</i>	<i>EIF2C4</i>	<i>LOC100505633</i>	<i>SLC33A1</i>
<i>ANKRD44</i>	<i>ELK2AP</i>	<i>LRRN1</i>	<i>SLC6A19</i>
<i>ANO7</i>	<i>EPHB3</i>	<i>LUZP2</i>	<i>SMAD6</i>
<i>APCDD1</i>	<i>EPN3</i>	<i>LYNX1</i>	<i>SMAD7</i>
<i>APLP1</i>	<i>FAM169A</i>	<i>MARVELD2</i>	<i>SMAD9</i>
<i>ARHGAP32</i>	<i>FAT1</i>	<i>MCF2L</i>	<i>SMARCD3</i>
<i>ARHGAP6</i>	<i>FLJ20021</i>	<i>MCTP1</i>	<i>SPECC1</i>
<i>ATP6V0A1</i>	<i>FOSL2</i>	<i>MDGA1</i>	<i>SRCIN1</i>
<i>BAI2</i>	<i>FURIN</i>	<i>MLL3</i>	<i>SSPO</i>
<i>BMF</i>	<i>FXYD3</i>	<i>MRS2</i>	<i>STAG3L4</i>
<i>C18orf1</i>	<i>FZD1</i>	<i>MYRIP</i>	<i>STAT3</i>
<i>C9orf172</i>	<i>GADD45G</i>	<i>NAAA</i>	<i>STBD1</i>
<i>CACNA1H</i>	<i>GALNT10</i>	<i>NACC2</i>	<i>STON2</i>
<i>CARNS1</i>	<i>GARNL3</i>	<i>NBPF7</i>	<i>STXBP5L</i>
<i>CASZ1</i>	<i>GPR137B</i>	<i>NEDD9</i>	<i>SUSD2</i>
<i>CCDC64</i>	<i>GRB14</i>	<i>NEO1</i>	<i>SVIP</i>
<i>CD276</i>	<i>HIST1H2AC</i>	<i>NOTCH3</i>	<i>SYNGR3</i>
<i>CDC42BPG</i>	<i>HIST1H2BC</i>	<i>NPTXR</i>	<i>SYTL2</i>
<i>CDKN1A</i>	<i>HIST1H4H</i>	<i>NUP54</i>	<i>TAX1BP1</i>
<i>CELSR1</i>	<i>HIST2H2BE</i>	<i>ODZ2</i>	<i>TBX3</i>
<i>CLMN</i>	<i>HMGCS2</i>	<i>OGDHL</i>	<i>THBS1</i>
<i>CLSTN3</i>	<i>HOXC13</i>	<i>OSBPL10</i>	<i>TLE1</i>
<i>CMTM8</i>	<i>HOXC9</i>	<i>PACSLN1</i>	<i>TLE2</i>
<i>COBL1</i>	<i>ID1</i>	<i>PCDH1</i>	<i>TMEM184C</i>
<i>COLEC12</i>	<i>ID2</i>	<i>PLEKHH3</i>	<i>TMEM47</i>
<i>CPLX1</i>	<i>ID3</i>	<i>PLK2</i>	<i>TMEM59L</i>
<i>CRNDE</i>	<i>IGFBP3</i>	<i>PLXDC2</i>	<i>TMTC2</i>
<i>CSPG5</i>	<i>IGFBP5</i>	<i>PMS2P4</i>	<i>TOM1L2</i>
<i>CTNNA1</i>	<i>IRX3</i>	<i>PSD4</i>	<i>TSPAN13</i>
<i>CXCR7</i>	<i>IRX5</i>	<i>PVRL4</i>	<i>TTC3P1</i>
<i>CXXC5</i>	<i>JAKMIP1</i>	<i>REG4</i>	<i>UPK3BL</i>
<i>DAB2IP</i>	<i>JARID2</i>	<i>RNF224</i>	<i>VPS13A</i>
<i>DAPK1</i>	<i>JDP2</i>	<i>RTN1</i>	<i>VSIG10L</i>
<i>DDR1</i>	<i>JUNB</i>	<i>RXRΑ</i>	<i>WDR7</i>
<i>DEGS1</i>	<i>KCNS3</i>	<i>SCNN1A</i>	<i>ZBTB47</i>
<i>DEGS2</i>	<i>KIAA0922</i>	<i>SECISBP2L</i>	<i>ZDHHC8P1</i>
<i>DLX3</i>	<i>KIAA1161</i>	<i>SELENBP1</i>	<i>ZFHX3</i>
<i>DSEL</i>	<i>KIAA1467</i>	<i>SEMA4A</i>	<i>ZFP36</i>
<i>DUSP2</i>	<i>KLF4</i>	<i>SEMA6A</i>	<i>ZNF217</i>
<i>EBF4</i>	<i>LEF1</i>	<i>SEMA6D</i>	<i>ZNF467</i>
<i>EDN2</i>	<i>LEPREL1</i>	<i>SH3RF1</i>	
<i>EFNA5</i>	<i>LINC00478</i>	<i>SHC2</i>	

## 7 Literaturverzeichnis

Abeshouse A, Ahn J, Akbani R, Ally A, Amin S, Andry CD, Annala M, Aprikian A, Armenia J, Arora A et al. (2015): The molecular taxonomy of primary prostate cancer. *Cell* **163**, 1011–1025

Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Čech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Grüning BA et al. (2018): The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Res* **46**, W537–W544

Agger K, Cloos PAC, Christensen J, Pasini D, Rose S, Rappsilber J, Issaeva I, Canaani E, Salcini AE, Helin K (2007): UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. *Nature* **449**, 731–734

Akhurst RJ, Hata A (2012): Targeting the TGF $\beta$  signalling pathway in disease. *Nat Rev Drug Discov* **11**, 790–811

Armenia J, Wankowicz SAM, Liu D, Gao J, Kundra R, Reznik E, Chatila WK, Chakravarty D, Han GC, Coleman I et al. (2018): The long tail of oncogenic drivers in prostate cancer. *Nat Genet* **50**, 645–651

Augello MA, Liu D, Deonarine LD, Robinson BD, Huang D, Stelloo S, Blattner M, Doane AS, Wong EWP, Chen Y et al. (2019): CHD1 loss alters AR binding at lineage-specific enhancers and modulates distinct transcriptional programs to drive prostate tumorigenesis. *Cancer Cell* **35**, 603–617

Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M, Jørgensen HF, John RM, Gouti M, Casanova M, Warnes G, Merckenschlager M, Fisher AG (2006): Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol* **8**, 532–538

Baca SC, Prandi D, Lawrence MS, Mosquera JM, Romanel A, Drier Y, Park K, Kitabayashi N, MacDonald TY, Ghandi M et al. (2013): Punctuated evolution of prostate cancer genomes. *Cell* **153**, 666–677

Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, Salvesen HB, Otte AP, Akslen LA (2006): EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, Prostate, and Breast. *J Clin Oncol* **24**, 268–273

Badaux AI, Shi Y (2013): Emerging roles for chromatin as a signal integration and storage platform. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 211–224

Barbieri CE, Baca SC, Lawrence MS, Demichelis F, Blattner M, Theurillat J-P, White TA, Stojanov P, Van Allen E, Stransky N et al. (2012): Exome sequencing identifies recurrent SPOP, FOXA1 and MED12 mutations in prostate cancer. *Nat Genet* **44**, 685–689

- Baumgart SJ, Najafova Z, Hossan T, Xie W, Nagarajan S, Kari V, Ditzel N, Kassem M, Johnsen SA (2017): CHD1 regulates cell fate determination by activation of differentiation-induced genes. *Nucleic Acids Res* 45, 7722–7735
- Baylin SB, Jones PA (2011): A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 11, 726–734
- Bello D, Webber MM, Kleinman HK, Wartinger DD, Rhim JS (1997): Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. *Carcinogenesis* 18, 1215–1223
- Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA (2008): An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 40, 499–507
- Berger SL, Kouzarides T, Shiekhattar R, Shilatifard A (2009): An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* 23, 781–783
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K et al. (2006): A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 125, 315–326
- Boiani M, Schöler HR (2005): Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells: Developmental cell biology. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 872–881
- Bokhoven A van, Varela-Garcia M, Korch C, Johannes WU, Smith EE, Miller HL, Nordeen SK, Miller GJ, Lucia MS (2003): Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *The Prostate* 57, 205–225
- Boulay J L, Mild G, Lowy A, Reuter J, Lagrange M, Terracciano L, Laffer U, Herrmann R, Rochlitz C (2003): SMAD7 is a prognostic marker in patients with colorectal cancer. *Int J Cancer* 104, 446–449
- Bracken AP, Dietrich N, Pasini D, Hansen KH, Helin K (2006): Genome-wide mapping of Polycomb target genes unravels their roles in cell fate transitions. *Genes Dev* 20, 1123–1136
- Brodin G, ten Dijke P, Funa K, Heldin C H, Landström M (1999): Increased smad expression and activation are associated with apoptosis in normal and malignant prostate after castration. *Cancer Res* 59, 2731–2738
- Bruhn SL, Pil PM, Essigmann JM, Housman DE, Lippard SJ (1992): Isolation and characterization of human cDNA clones encoding a high mobility group box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 2307–2311
- Burkhardt L, Fuchs S, Krohn A, Masser S, Mader M, Kluth M, Bachmann F, Hülndt H, Steuber T, Graefen M et al. (2013): CHD1 is a 5q21 tumor suppressor required for ERG rearrangement in prostate cancer. *Cancer Res* 73, 2795–2805



- Campos EI, Reinberg D (2009): Histones: annotating chromatin. *Annu Rev Genet* 43, 559–599
- Cao Q, Yu J, Dhanasekaran SM, Kim JH, Mani R-S, Tomlins SA, Mehra R, Laxman B, Cao X, Yu J et al. (2008): Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene* 27, 7274–7284
- Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E et al. (2012): The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data: figure 1. *Cancer Discov* 2, 401–404
- Cheung P, Lau P (2005): Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol* 19, 563–573
- Collett K (2006): Expression of enhancer of zeste homologue 2 Is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clin Cancer Res* 12, 1168–1174
- Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA et al. (2010): Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci* 107, 21931–21936
- Croce CM (2008): Oncogenes and cancer. *N Engl J Med* 358, 502–511
- Cronin KA, Lake AJ, Scott S, Sherman RL, Noone A-M, Howlader N, Henley SJ, Anderson RN, Firth AU, Ma J et al. (2018): Annual report to the nation on the status of cancer, part I: National cancer statistics. *Cancer* 124, 2785–2800
- Delmas V, Stokes DG, Perry RP (1993): A mammalian DNA-binding protein that contains a chromodomain and an SNF2/SWI2-like helicase domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2414–2418
- DKG (2019): Interdisziplinäre Leitlinie der Qualität S3 zur Früherkennung, Diagnose und Therapie der verschiedenen Stadien des Prostatakarzinoms. Leitlinienprogramm Onkologie <http://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom/>; abgerufen am 24.07.2019
- Dowdy SC, Mariani A, Reinholz MM, Keeney GL, Spelsberg TC, Podratz KC, Janknecht R (2005): Overexpression of the TGF- $\beta$  antagonist Smad7 in endometrial cancer. *Gynecol Oncol* 96, 368–373
- Easwaran H, Johnstone SE, Van Neste L, Ohm J, Mosbrugger T, Wang Q, Aryee MJ, Joyce P, Ahuja N, Weisenberger D et al. (2012): A DNA hypermethylation module for the stem/progenitor cell signature of cancer. *Genome Res* 22, 837–849
- Feng J, Liu T, Qin B, Zhang Y, Liu XS (2012): Identifying CHIP-seq enrichment using MACS. *Nat Protoc* 7, 1728–1740
- Fisher CL, Fisher AG (2011): Chromatin states in pluripotent, differentiated, and

reprogrammed cells. *Curr Opin Genet Dev* 21, 140–146

Flanagan JF, Mi L-Z, Chruszcz M, Cymborowski M, Clines KL, Kim Y, Minor W, Rastinejad F, Khorasanizadeh S (2005): Double chromodomains cooperate to recognize the methylated histone H3 tail. *Nature* 438, 1181–1185

Fournier PGJ, Juárez P, Jiang G, Clines GA, Niewolna M, Kim HS, Walton HW, Peng CXH, Liu Y, Mohammad KS et al. (2015): The TGF $\beta$  signaling regulator PMEPA1 suppresses prostate cancer metastases to bone. *Cancer Cell* 27, 809–821

Fraser M, Sabelnykova VY, Yamaguchi TN, Heisler LE, Livingstone J, Huang V, Shiah Y-J, Yousif F, Lin X, Masella AP et al. (2017): Genomic hallmarks of localized, non-indolent prostate cancer. *Nature* 541, 359–364

Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE (1999): Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* 26, 112–122, 124–125

Furey TS (2012): ChIP-seq and Beyond: new and improved methodologies to detect and characterize protein-DNA interactions. *Nat Rev Genet* 13, 840–852

Fussbroich B, Wagener N, Macher-Goeppinger S, Benner A, Fälth M, Sülthmann H, Holzer A, Hoppe-Seyler K, Hoppe-Seyler F (2011): EZH2 depletion blocks the proliferation of colon cancer cells. *PLoS ONE* 6, e21651

Gaber ZB, Novitsch BG (2011): All the embryo's a stage, and Olig2 in its time plays many parts. *Neuron* 69, 833–835

Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E et al. (2013): Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 6, p11

Gaspar-Maia A, Alajem A, Polesso F, Sridharan R, Mason MJ, Heidersbach A, Ramalho-Santos J, McManus MT, Plath K, Meshorer E, Ramalho-Santos M (2009): Chd1 regulates open chromatin and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* 460, 863–868

Glazer RI, Knode MC, Tseng CK, Haines DR, Marquez VE (1986): 3-Deazaneplanocin A: a new inhibitor of S-adenosylhomocysteine synthesis and its effects in human colon carcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 35, 4523–4527

Gotoh A, Kao C, Ko SC, Hamada K, Liu TJ, Chung LW (1997): Cytotoxic effects of recombinant adenovirus p53 and cell cycle regulator genes (p21 WAF1/CIP1 and p16CDKN4) in human prostate cancers. *J Urol* 158, 636–641

Grasso CS, Wu Y-M, Robinson DR, Cao X, Dhanasekaran SM, Khan AP, Quist MJ, Jing X, Lonigro RJ, Brenner JC et al. (2012): The mutational landscape of lethal castration-resistant prostate cancer. *Nature* 487, 239–243

Hamdy FC, Donovan JL, Lane JA, Mason M, Metcalfe C, Holding P, Davis M, Peters TJ, Turner EL, Martin RM et al. (2016): 10-year outcomes after monitoring, surgery, or radiotherapy for localized prostate cancer. *N Engl J Med* 375, 1415–1424

Hata A, Chen Y-G (2016): TGF- $\beta$  signaling from receptors to smads. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 8

Hayashi H, Abdollah S, Qiu Y, Cai J, Xu Y-Y, Grinnell BW, Richardson MA, Topper JN, Gimbrone MA, Wrana JL, Falb D (1997): The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF $\beta$  receptor and functions as an antagonist of TGF $\beta$  signaling. *Cell* 89, 1165–1173

Hieronymus H, Schultz N, Gopalan A, Carver BS, Chang MT, Xiao Y, Heguy A, Huberman K, Bernstein M, Assel M et al. (2014): Copy number alteration burden predicts prostate cancer relapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 11139–11144

Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP (1983): LNCaP model of human prostatic carcinoma. 43, 11

Hu Q, Zhang B, Chen R, Fu C, A J, Fu X, Li J, Fu L, Zhang Z, Dong J-T (2019): ZFH3 is indispensable for ER $\beta$  to inhibit cell proliferation via MYC downregulation in prostate cancer cells. *Oncogenesis* 8, 28

Huang S, Gulzar ZG, Salari K, Lapointe J, Brooks JD, Pollack JR (2012): Recurrent deletion of CHD1 in prostate cancer with relevance to cell invasiveness. *Oncogene* 31, 4164–4170

Huggins C, Hodges CV (1972): Studies on prostatic cancer: I. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *CA Cancer J Clin* 22, 232–240

Jenuwein T, Allis CD (2018): Translating the histone code. *Science* 293, 8

Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW (1979): Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* 17, 16–23

Kari V, Mansour WY, Raul SK, Baumgart SJ, Mund A, Grade M, Sirma H, Simon R, Will H, Dobbstein M et al. (2016): Loss of *CHD1* causes DNA repair defects and enhances prostate cancer therapeutic responsiveness. *EMBO Rep* 17, 1609–1623

Kataoka H, Bonnefin P, Vieyra D, Feng X, Hara Y, Miura Y, Joh T, Nakabayashi H, Vaziri H, Harris CC, Riabowol K (2003): ING1 represses transcription by direct DNA binding and through effects on p53. *Cancer Res* 63, 5785–5792

Kelley DE, Stokes DG, Perry RP (1999): CHD1 interacts with SSRP1 and depends on both its chromodomain and its ATPase/helicase-like domain for proper association with chromatin. *Chromosoma* 108, 10–25

Kidani K, Osaki M, Tamura T, Yamaga K, Shomori K, Ryoke K, Ito H (2009): High expression of EZH2 is associated with tumor proliferation and prognosis in human oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 45, 39–46

- Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL (2013): TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol* 14, R36
- Kirk JS, Schaarschuch K, Dalimov Z, Lasorsa E, Ku S, Ramakrishnan S, Hu Q, Azabdaftari G, Wang J, Pili R, Ellis L (2015): Top2a identifies and provides epigenetic rationale for novel combination therapeutic strategies for aggressive prostate cancer. *Oncotarget* 6, 3136–3146
- Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RGAB, Otte AP, Hayes DF, et al. (2003): EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 11606–11611
- Knudsen KE, Penning T (2010): Partners in crime: deregulation of AR activity and androgen synthesis in prostate cancer. *Trends Endocrinol Metab* TEM 21, 315–324
- Knutson SK, Wigle TJ, Warholic NM, Sneeringer CJ, Allain CJ, Klaus CR, Sacks JD, Raimondi A, Majer CR, Song J et al. (2012): A selective inhibitor of EZH2 blocks H3K27 methylation and kills mutant lymphoma cells. *Nat Chem Biol* 8, 890–896
- Koh FM, Lizama CO, Wong P, Hawkins JS, Zovein AC, Ramalho-Santos M (2015): Emergence of hematopoietic stem and progenitor cells involves a Chd1-dependent increase in total nascent transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112, E1734–E1743
- Kornberg RD (1974): Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* 184, 868–871
- Kumar A, Coleman I, Morrissey C, Zhang X, True LD, Gulati R, Etzioni R, Bolouri H, Montgomery B, White T et al. (2016): Substantial interindividual and limited intraindividual genomic diversity among tumors from men with metastatic prostate cancer. *Nat Med* 22, 369–378
- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680
- Landström M, Heldin N-E, Bu S, Hermansson A, Itoh S, ten Dijke P, Heldin C-H (2000): Smad7 mediates apoptosis induced by transforming growth factor  $\beta$  in prostatic carcinoma cells. *Curr Biol* 10, 535–538
- Langmead B, Salzberg SL (2012): Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9, 357–359
- Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K et al. (2006): Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* 125, 301–313
- Leitlinie Prostatakarzinom: siehe DKG 2019

- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R (2009): The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079
- Liberzon A, Subramanian A, Pinchback R, Thorvaldsdóttir H, Tamayo P, Mesirov JP (2011): Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics* 27, 1739–1740
- Margueron R, Reinberg D (2011): The polycomb complex PRC2 and its mark in life. *Nature* 469, 343–349
- Massagué J (2008): TGF $\beta$  in cancer. *Cell* 134, 215–230
- McCabe MT, Ott HM, Ganji G, Korenchuk S, Thompson C, Van Aller GS, Liu Y, Graves AP, Della Pietra A, Diaz E et al. (2012): EZH2 inhibition as a therapeutic strategy for lymphoma with EZH2-activating mutations. *Nature* 492, 108–112
- McKnight JN, Jenkins KR, Nodelman IM, Escobar T, Bowman GD (2011): Extranucleosomal DNA binding directs nucleosome sliding by Chd1. *Mol Cell Biol* 31, 4746–4759
- Mello SS, Attardi LD (2018): Deciphering p53 signaling in tumor suppression. *Curr Opin Cell Biol* 51, 65–72
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W et al. (1994): A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* 266, 66–71
- Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim T-K, Koche RP et al. (2007): Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* 448, 553–560
- Mimori K, Ogawa K, Okamoto M, Sudo T, Inoue H, Mori M (2005): Clinical significance of enhancer of zeste homolog 2 expression in colorectal cancer cases. *Eur J Surg Oncol EJSO* 31, 376–380
- Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson K-F, Subramanian A, Sihag S, Lehar J, Puigserver P, Carlsson E, Ridderstråle M, Laurila E et al. (2003): PGC-1 $\alpha$ -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat Genet* 34, 267–273
- Morey L, Helin K (2010): Polycomb group protein-mediated repression of transcription. *Trends Biochem Sci* 35, 323–332
- Morinaga T, Yasuda H, Hashimoto T, Higashio K, Tamaoki T (1991): A human alpha-fetoprotein enhancer-binding protein, ATBF1, contains four homeodomains and seventeen zinc fingers. *Mol Cell Biol* 11, 6041–6049

- MuraliKrishna PS, Gondi CS, Lakka SS, Julta A, Estes N, Gujrati M, Rao JS (2005): RNA interference-directed knockdown of urokinase plasminogen activator and urokinase plasminogen activator receptor inhibits prostate cancer cell invasion, survival and tumorigenicity in vivo. *J Biol Chem* 280, 36529–36540
- Nagarajan S, Johnsen SA: Crosstalk between histone modifications integrates various signaling inputs to fine-tune transcriptional output. In: Binda O, Fernandez-Zapico ME (Hrsg.): *Chromatin Signaling and Diseases*. Elsevier Inc., Amsterdam 2016, 217–239
- Nelson JD, Denisenko O, Bomsztyk K (2006): Protocol for the fast chromatin immunoprecipitation (ChIP) method. *Nat Protoc* 1, 179–185
- Newton J, Allen A, Westley B, May F (2000): The human trefoil peptide, TFF1, is present in different molecular forms that are intimately associated with mucus in normal stomach. *Gut* 46, 312–320
- Nicholls C, Li H, Liu J-P (2012): GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39, 674–679
- Nowell PC, Hungerford DA (1960): Chromosome studies on normal and leukemic human leukocytes. *J Natl Cancer Inst* 25, 85–109
- Ougolkov AV, Bilim VN, Billadeau DD (2008): Regulation of pancreatic tumor cell proliferation and chemoresistance by the histone methyltransferase EZH2. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 14, 6790–6796
- Pasini D, Bracken AP, Helin K (2004a): Polycomb group proteins in cell cycle progression and cancer. *Cell Cycle* 3, 394–398
- Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Denchi EL, Helin K (2004b): Suz12 is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J* 23, 4061–4071
- Ramírez F, Ryan DP, Grüning B, Bhardwaj V, Kilpert F, Richter AS, Heyne S, Dündar F, Manke T (2016): deepTools2: a next generation web server for deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res* 44, 160–165
- Renart J, Reiser J, Stark GR (1979): Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 3116–3120
- Robinson D, Van Allen EM, Wu Y-M, Schultz N, Lonigro RJ, Mosquera J-M, Montgomery B, Taplin M-E, Pritchard CC, Attard G et al. (2015): Integrative clinical genomics of advanced prostate cancer. *Cell* 161, 1215–1228
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP (2011): Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* 29, 24–26
- Sarker D, Reid AHM, Yap TA, de Bono JS (2009): Targeting the PI3K/AKT pathway for the treatment of prostate cancer. *Clin Cancer Res* 15, 4799–4805

- Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, Eden E, Yakhini Z, Ben-Shushan E, Reubinoff BE et al. (2007): Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet* 39, 232–236
- Sementchenko VI, Watson DK (2000): Ets target genes: past, present and future. *Oncogene* 19, 6533–6548
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA (2010): Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 31, 27–36
- Shin YJ, Kim J-H (2012): The role of EZH2 in the regulation of the activity of matrix metalloproteinases in prostate cancer cells. *PloS ONE* 7, e30393
- Siegel RL, Miller KD, Jemal A (2019): Cancer statistics, 2019. *CA Cancer J Clin* 69, 7–34
- Siggens L, Cordeddu L, Rönnerblad M, Lennartsson A, Ekwall K (2015): Transcription-coupled recruitment of human CHD1 and CHD2 influences chromatin accessibility and histone H3 and H3.3 occupancy at active chromatin regions. *Epigenetics Chromatin* 8, 4
- Simic R, Lindstrom DL, Tran HG, Roinick KL, Costa PJ, Johnson AD, Hartzog GA, Arndt KM (2003): Chromatin remodeling protein Chd1 interacts with transcription elongation factors and localizes to transcribed genes. *EMBO J* 22, 1846–1856
- Sims RJ, Chen C-F, Santos-Rosa H, Kouzarides T, Patel SS, Reinberg D (2005): Human but not yeast CHD1 binds directly and selectively to histone H3 methylated at lysine 4 via its tandem chromodomains. *J Biol Chem* 280, 41789–41792
- Smolle M, Venkatesh S, Gogol MM, Li H, Zhang Y, Florens L, Washburn MP, Workman JL (2012): Chromatin remodelers Isw1 and Chd1 maintain chromatin structure during transcription by preventing histone exchange. *Nat Struct Mol Biol* 19, 884–892
- Stettner M, Kaulfuss S, Burfeind P, Schweyer S, Strauss A, Ringert R-H, Thelen P (2007): The relevance of estrogen receptor- expression to the antiproliferative effects observed with histone deacetylase inhibitors and phytoestrogens in prostate cancer treatment. *Mol Cancer Ther* 6, 2626–2633
- Stewart BW, Wild CP (Hrsg.): *World Cancer Report 2014*. 1. Auflage; International Agency for Research on Cancer/World Health Organization, Lyon 2014
- Stokes DG, Perry RP (1995): DNA-binding and chromatin localization properties of CHD1. *Mol Cell Biol* 15, 2745–2753
- Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF (1978): Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer* 21, 274–281
- Strahl BD, Allis CD (2000): The language of covalent histone modifications. *Nature* 403, 41–45

- Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA, Paulovich A, Pomeroy SL, Golub TR, Lander ES, Mesirov JP (2005): Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 15545–15550
- Sun X, Frierson HF, Chen C, Li C, Ran Q, Otto KB, Cantarel BM, Vessella RL, Gao AC, Petros J et al. (2005): Frequent somatic mutations of the transcription factor ATBF1 in human prostate cancer. *Nat Genet* 37, 407–412
- Sun X, Fu X, Li J, Xing C, Frierson HF, Wu H, Ding X, Ju T, Cummings RD, Dong J-T (2014): Deletion of *Atbf1/Zfx3* in mouse prostate causes neoplastic lesions, likely by attenuation of membrane and secretory proteins and multiple signaling pathways. *Neoplasia N Y N* 16, 377–389
- Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee PL, Karuturi RKM, Tan PBO, Liu ET, Yu Q (2007): Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev* 21, 1050–1063
- Taylor BS, Schultz N, Hieronymus H, Gopalan A, Xiao Y, Carver BS, Arora VK, Kaushik P, Cerami E, Reva B et al. (2010): Integrative genomic profiling of human prostate cancer. *Cancer Cell* 18, 11–22
- Tomlins SA, Rhodes DR, Perner S, Dhanasekaran SM, Mehra R, Sun X-W, Varambally S, Cao X, Tchinda J, Kuefer R et al. (2005): Recurrent fusion of *TMPRSS2* and *ETS* transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310, 644–648
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350–4354
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L (2010): Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 28, 511–515
- Uhlén M, Fagerberg L, Hallström BM, Lindskog C, Oksvold P, Mardinoglu A, Sivertsson Å, Kampf C, Sjöstedt E, Asplund A et al. (2015): Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science* 347, 1260419
- Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RGAB, Otte AP et al. (2002): The polycomb group protein *EZH2* is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419, 624–629
- Vastenhouw NL, Schier AF (2012): Bivalent histone modifications in early embryogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 24, 374–386



- Viré E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden J-M et al. (2006): The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439, 871–874
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009): RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 10, 57–63
- Watson PA, Ellwood-Yen K, King JC, Wongvipat J, LeBeau MM, Sawyers CL (2005): Context-dependent hormone-refractory progression revealed through characterization of a novel murine prostate cancer cell line. *Cancer Res* 65, 11565–11571
- Watson PA, Arora VK, Sawyers CL (2015): Emerging mechanisms of resistance to androgen receptor inhibitors in prostate cancer. *Nat Rev Cancer* 15, 701–711
- Weiner AB, Matulewicz RS, Eggener SE, Schaeffer EM (2016): Increasing incidence of metastatic prostate cancer in the United States (2004–2013). *Prostate Cancer Prostatic Dis* 19, 395–397
- Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, Weisenberger DJ, Campan M, Young J, Jacobs I, Laird PW (2007): Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* 39, 157–158
- Wittekind C (Hrsg.): *Tnm: Klassifikation Maligner Tumoren*. 8. Auflage; John Wiley & Sons, Incorporated, Newark 2016
- Woodage T, Basrai MA, Baxevanis AD, Hieter P, Collins FS (1997): Characterization of the CHD family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 11472–11477
- Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D (1993): p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701–704
- Xu K, Wu ZJ, Groner AC, He HH, Cai C, Lis RT, Wu X, Stack EC, Loda M, Liu T et al. (2012): EZH2 oncogenic activity in castration-resistant prostate cancer cells is polycomb-independent. *Science* 338, 1465–1469
- Xu LL, Shi Y, Petrovics G, Sun C, Makarem M, Zhang W, Sesterhenn IA, McLeod DG, Sun L, Moul JW, Srivastava S (2003): PMEPA1, an androgen-regulated NEDD4-binding protein, exhibits cell growth inhibitory function and decreased expression during prostate cancer progression. *Cancer Res* 63, 4299–4304
- Zhang H, Qi J, Reyes JM, Li L, Rao PK, Li F, Lin CY, Perry JA, Lawlor MA, Federation A et al. (2016): Oncogenic deregulation of EZH2 as an opportunity for targeted therapy in lung cancer. *Cancer Discov* 6, 1006–1021
- Zhang Z, Zhou C, Li X, Barnes SD, Deng S, Hoover E, Chen C-C, Lee YS, Zhang Y, Wang C et al. (2020): Loss of CHD1 promotes heterogeneous mechanisms of resistance to AR-targeted therapy via chromatin dysregulation. *Cancer Cell* 37, 584–598

## **Internetquellen**

Hinghofer-Szalkay H: Abbildung: Epigenetische Veränderung - Beispiel Histonmodifikation  
<http://physiologie.cc/I.5.htm>; abgerufen am 24.07.2019

## Danksagung

Da eine wissenschaftliche Arbeit nicht das Werk einer einzelnen Person ist, möchte ich mich im Folgenden bei allen Menschen bedanken, die mich sowohl bei der Durchführung des experimentellen Teils als auch bei der Erstellung dieser Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Steven A. Johnsen für die Möglichkeit der Promotion innerhalb der Arbeitsgruppe für translationale Tumorepigenetik sowie für die zahlreichen Anregungen und Ratschläge, die für mein Weiterkommen unabdingbar waren.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. med. Lutz Trojan und PD Dr. rer. nat. Paul Thelen für die Übernahme der Betreuung.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Oliver Hahn, der dieses Projekt initiiert hat. Ich bedanke mich für die geduldige Einarbeitung, die lange und umfangreiche Betreuung und die konstante Unterstützung, sowohl im Labor als auch beim Verfassen dieser Arbeit.

Des Weiteren danke ich Dr. rer. nat. Simon Baumgart sowie Dr. rer. nat. Vijaya Lakshmi Kari, deren Arbeiten den Grundstein für dieses Projekt gelegt haben.

Außerdem möchte ich mich herzlich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für translationale Tumorepigenetik bedanken. Die kollegiale Arbeitsatmosphäre, die vielen hilfreichen Tipps und der tägliche Austausch haben wesentlich zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.