



Entzündung und epigenetische Regulation der Genexpression

-

Funktion durch Stickstoffmonoxid

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Daniela Kremer
aus Meerbusch-Lank

Düsseldorf, März 2010

aus dem Institut für Molekulare Medizin, Forschungsgruppe Immunbiologie
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Frau Prof. Dr. Kolb-Bachofen
Koreferent: Herr Prof. Dr. Beyé

Tag der mündlichen Prüfung:

Zusammenfassung

Es gibt immer mehr Hinweise, dass epigenetische Prozesse eine wichtige Rolle in der Regulation der Genexpression spielen. Ein epigenetischer Prozess ist die DNA-Methylierung, welche die Genregulation ohne eine Änderung in der DNA-Sequenz erlaubt. Das Methylierungsprofil jedes Zelltyps ist einmalig und globale Hypomethylierung in Kombination mit lokaler Hypermethylierung sind charakteristisch für die Tumorgenese. Eine Verbindung zwischen chronischer Entzündung und einer Regulation der DNA-Methylierung wird immer wahrscheinlicher. Für eine chronische Entzündung ist die Anwesenheit von proinflammatorischen Cytokinen, welche zu einer Aktivierung der induzierbaren NO-Synthase und einer hohen Freisetzung von Stickstoffmonoxid führen, charakteristisch. Die Regulation der iNOS ist hochkomplex und es gibt zusätzlich Hinweise auf eine epigenetische Regulation. In dieser Arbeit zeigen wir, dass die DNA-Methylierung eine Schlüsselrolle in der Regulation der iNOS Expression spielt und das NO die DNA-Methylierung des gesamten Genoms beeinflusst. Hier wurde ein klassischer Feedback-Mechanismus gefunden, wobei die Demethylierung zu einer gesteigerten Expression führt, was zu einer gesteigerten NO-Produktion führt und dann über eine Remethylierung die iNOS Expression inhibiert. Wir konnten zeigen, dass hierbei auch die NFκB Bindungsstelle reguliert wird. Die Remethylierung nicht nur der iNOS, sondern auch des gesamten Genoms wird von einer gesteigerten Aktivität der DNMT 1 und DNMT 3a begleitet. Die gesteigerte Aktivität könnte über eine erleichterte DNA-Methylierung aufgrund der S-Nitrosierung der an der enzymatischen Reaktion beteiligten Thiole erklärt werden. Dies könnte eine Verbindung zwischen chronischer Entzündung und Tumorgenese darstellen.

Summary

During the last decade emerging data demonstrate that epigenetic processes play an important role in gene regulation. One mechanism of epigenetic control is DNA-methylation, which allows gene regulation without sequence alterations. The methylation profile of each cell type is unique and alterations in methylation like hypo- as well as hypermethylation are hallmarks of cancer development. Increasing evidence points to a direct connection between chronic inflammation and regulation of DNA-methylation. Chronic inflammation is characterized by the presence of proinflammatory cytokines, which lead to the expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS) and high-output nitric oxide (NO) synthesis. The regulation of the iNOS in human cells is highly complex and so far only one publication suggests its involvement in epigenetic control. Our work shows that DNA-methylation plays a key role in the regulation of iNOS-expression and NO regulates DNA-methylation of the whole genome. We find a feedback mechanism, where demethylation of the iNOS-promoter leads to an increase in its expression following increased production of NO which in turn causes whole genome re-methylation which then stops or limits iNOS-expression. Further confirmation in the importance of cellular imprinting comes from the finding that treatments leading to decreased methylation correlate with increased NFkB activity, where it is known that its binding sites are susceptible to methylation. Interestingly, we can show that the NO-induced re-methylation occurs in the whole genome, thereby providing a direct link between abnormal methylation and inflammatory reactions. This remethylation process was mediated by an increase in the activity of DNMT 1 and DNMT 3b. We postulate that the S-nitrosation of the thiols in the enzymatic reaction during the DNA-methylation process facilitates the DNA-methylation. This finding may provide a new link between chronic inflammation and tumorigenesis.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	i
Summary	ii
1 Einleitung	
1.1 Epigenetik	1
1.2 DNA-Methylierung	1
Mechanismus der DNA-Methylierung	1
CpG	2
1.3 DNA-Methyltransferasen	3
DNMT 1	4
DNMT 2	4
DNMT 3	5
1.4 Wirkung der Methylierung	5
DNA-Demethylierung	7
Histon-Modifikationen	7
Methyl-bindende Proteine (MBP)	8
1.5 Stickstoffmonoxid (NO)	8
NO-Synthasen	10
Regulation der iNOS-Expression und Aktivität	12
NFκB	14
1.6 Entzündung und Epigenetik	14
2 Zielsetzung	15

3 Materialien und Methoden

3.1	Materialien	17
	Chemikalien	17
	Puffer und Lösungen	17
	Cytokine	18
	Antikörper	18
	Zellkulturmedien und Zusätze für die Zellkultur	18
	Donoren und Inhibitoren von Stickstoffmonoxid (NO)	19
	Inhibitoren der DNA-Methylierung	20
3.2	Methoden	21
	Zellen und Zellkulturtechniken	21
	Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Neutralrot-Färbung	23
	Bestimmung von apoptotischen und nekrotischen Zellen	23
	Bestimmung der iNOS-Promotoraktivität und der NFκB Aktivität mittels Luciferase-Assay	23
	Proteinbestimmung	24
	Charakterisierung der Genexpression	24
	DNA-Präparation	26
	Bestimmung des genomischen DNA-Methylierungs Levels	26
	Bestimmung der Aktivität der DNA-Methyltransferasen	27
	Aktivitätsbestimmung der DNMT 1 und DNMT 3b	27
	Massenspektrometrische Messung	27
	Statistische Analyse	28

4 Ergebnisse

4.1	Bestimmungen der Cytotoxizität	29
	Toxizität der Methylierungsinhibitoren 5-Aza-2'-deoxycytidine und Trichostatin A	29
	Toxizität des Stickstoffmonoxid-Donors DetaNO	31
4.2	DNA-Methylierung und Stickstoffmonoxid: Einfluss auf die Aktivität der iNOS	34
	Die Promotoraktivität der iNOS	34
	Einfluss auf NFκB Bindungsstellen	35
	Die mRNA-Expression und die Enzymaktivität der iNOS	37

4.3.	DNA-Methylierung und Stickstoffmonoxid:	
	Einfluss auf den Methylierungsstatus	39
	Etablierung einer massenspektrometrischen Messung von	
	5-Methylcytosin	39
	Etablierung eines DNA-ELISA zur Quantifizierung	
	des globalen Methylierungsstatus	41
	Bestimmung der Veränderungen des Methylierungsstatus in A549iNOS	43
	Bestimmung der Veränderungen des Methylierungsstatus	
	in primären humanen Keratinocyten	44
4.4	DNA-Methylierung und Stickstoffmonoxid:	
	Einfluss auf die DNA-Methyltransferasen	46
	Die Expression der DNA-Methyltransferasen	46
	Die Aktivität der DNA-Methyltransferasen	47
	Einfluss von NO auf die DNA-Methyltransferase 1	48
	Einfluss von NO auf die DNA-Methyltransferase 3b	49
4.5	Einfluss von NO auf hypomethylierte Zellen	50

5 Diskussion

5.1	Wie wird die DNA-Methylierung untersucht?	53
5.2	Welche Auswirkungen hat die Blockierung der Methylierung auf die iNOS?	55
5.3	Der Einfluss von NO auf das gesamte Genom	57
5.4	Welcher Mechanismus bewirkt die Remethylierung?	58
5.5	Der vollständige Regulationsmechanismus	61

6 Anhang

6.1	Plasmide und Plasmidsequenzen	62
6.2	Ergänzende Abbildungen	66
6.3	Ergänzende Methoden	67
6.4	Ergänzende Graphiken	69

7 Verzeichnisse

7.1	Tabellenverzeichnis	70
7.2	Abbildungsverzeichnis	70
7.3	Abkürzungsverzeichnis	72
7.4	Publikationsverzeichnis	74
7.5	Literaturverzeichnis	76

Eidesstattliche Erklärung	87
----------------------------------	-----------

Danksagung	88
-------------------	-----------

Lebenslauf	89
-------------------	-----------

1 Einleitung

1.1. Epigenetik

Der Begriff *Epigenetik* ist zusammengesetzt aus dem griechischen Präfix „epi“- neben oder auf- und dem ebenfalls aus dem griechisch stammenden Wort „Genetik“ –der Wissenschaft von den Grundlagen und Gesetzmäßigkeiten der Vererbung-. Conrad Waddington (1905-1975) definierte als Erster die Epigenetik als „Zweig der Biologie, der die kausalen Wechselwirkungen zwischen Genen und ihren Produkten untersucht, welche den Phänotyp hervorbringen“ (Waddington C.H. 1942). Heute definiert man Epigenetik als „Studium der erblichen Veränderungen in der Genomfunktion, die ohne eine Änderung der DNA-Sequenz auftreten“ (Esteller M. 2008). Dabei unterscheidet man derzeit zwischen Veränderungen der Chromatinstruktur, ausgelöst durch DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen, welche in einem ständigen Zusammenspiel stehen, sowie der RNA-Interferenz. In der vorliegenden Arbeit konzentrierten wir uns auf die DNA-Methylierung im Säugetiergenom.

1.2 DNA-Methylierung

Mechanismus der DNA-Methylierung

Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um eine Übertragung und Bindung einer Methylgruppe (CH_3) von S-Adenosyl-Methionin (SAM) an die C5-Position des Cytosinrings durch DNA-Methyltransferasen. Die DNA-Methyltransferase bindet kovalent an die C6-Position, wobei es Elektronen an die C5-Position abgibt, dadurch kann ein negativer Alkylrest die Methylgruppe von SAM angreifen. Nach dem Methyltransfer wird ein endständiges H-Atom von der Methylgruppe abgespalten, gleichzeitig wird vom benachbarten C-Atom Diethylsulfid abgespalten und es entsteht eine C=C Doppelbindung. Während dieses Vorgangs der β -Elimination wird die DNA-Methyltransferase wieder regeneriert (**Abb. 1.1**) (Bestor 2000).

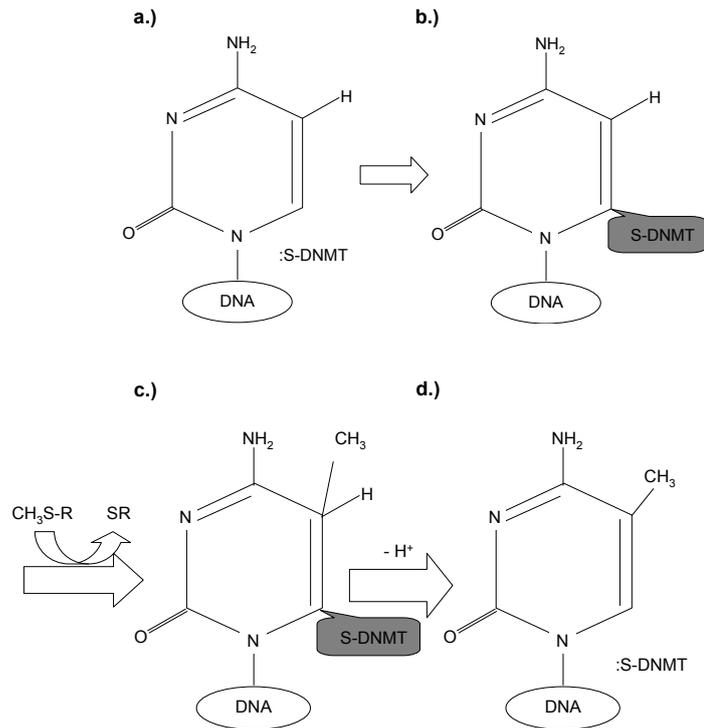


Abb. 1.1: Mechanismus der DNA-Methylierung

a.) Thiolattacke am 6-Carbon (C6) des Substrates Cytosin b.) die Methylgruppe von S-Adenosylmethionin wird von Enamine attackiert c.) ein Proton aus dem 5-C (C5) des Substrates Cytosin wird freigesetzt d.) β-Elimination regeneriert das freie Enzym (Bestor 2000)

Diese Reaktion ist unter anderem abhängig von der Konzentration des Substrats SAM, welches von der essentiellen Aminosäure Methionin synthetisiert wird. Eine Diät mit einem geringen Anteil an Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ vermindert den Aufbau der essentiellen Aminosäure Methionin, was in einer verminderten DNA-Methylierung resultiert (Kanai 2008).

CpG

Das humane Genom ist zu 4-6 % methyliert (Ehrlich and Wang 1981), wobei ausschließlich das Palindrom CpG methyliert wird (Razin and Riggs 1980).

Das Palindrom wird zu 80-90% methyliert, wobei die meisten CpGs in Transposons und retroviraler DNA liegen und durch Methylierung stilllegen (Yoder *et al.* 1997, Bestor 1998). Die Suppression der Expression und Aktivität der Retrotransposons grenzt ihre Ausbreitung im Genom ein und schützt so die Genomintegrität (Yoder *et al.* 1997).

Hingegen sind CpGs in CpG-reichen Sequenzen „CpG-Inseln“, definiert als DNA-Abschnitte von 0,2 - 5 kb Länge, einem Guanin:Cytosin-Gehalt von 50 % und einer Häufung von CpG-Dinukleotiden (>30 CpG/500 Nukleotide) (Antequerera *et al.* 1993, Caiafa *et al.* 2005), meist unmethyliert (Gardiner-Garden *et al.* 1987). Ausgenommen sind geprägte Gene, wie auch das inaktive X-Chromosom, deren CpG-Inseln methyliert sind (Reik and Walter 2001). Bei der Hälfte aller Gene mit spezifischer Expression und bei Haushaltsgenen findet man im Promotorbereich und im ersten Exon CpG-Inseln (Larsen *et al.* 1992). Die Häufigkeit des Palindroms CpG liegt 20 % unter der errechenbaren Wahrscheinlichkeit, was sich dadurch erklären lässt, dass das methylierte Cytosine zu Thymin desaminiert wird und diese Veränderung nur ineffizient von der Thymin-DNA-Glykosylase detektiert und repariert werden kann (Jiricny 1996). Dies führt zu einer Punktmutation und stört somit die Genomintegrität und ist eine Erklärung für den Verlust von CpGs im Laufe der Evolution. Unmethyliertes Cytosin hingegen wird zu Uracil desaminiert, welches effektiv von der Uracil-DNA-Glykosylase detektiert und repariert werden kann (Jones *et al.* 1992).

1.2 DNA-Methyltransferasen

Die drei Gruppen der DNA-Methyltransferasen (DNMT) 1, 2 und 3 katalysieren die DNA-Methylierung.

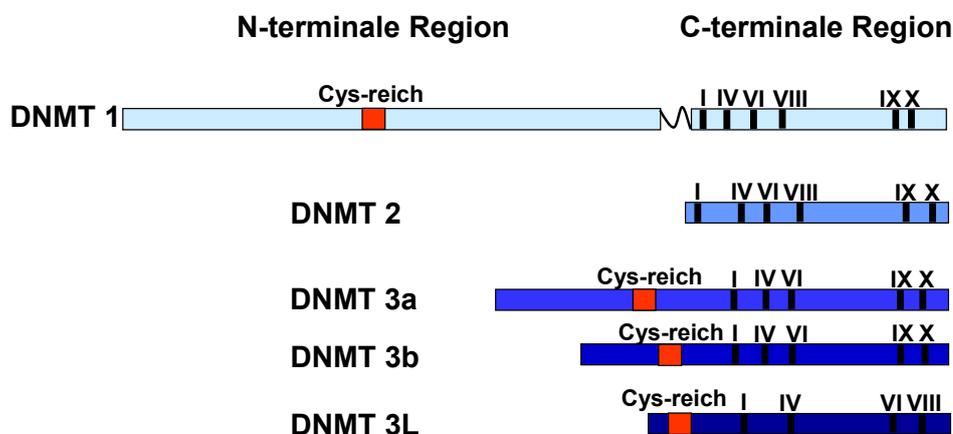


Abb.1.2 : Die drei Familien der DNMTs

Ausgenommen der DNMT 2 enthalten alle DNMTs eine N-terminale Region mit einer Cysteinereiche (Cys-reich) Domäne. In der C-terminalen Region findet man 10 charakteristische Sequenzmotive, welche für die SAM-Bindung und die Bindung an die DNA wichtig sind. (modifiziert nach Bestor 2000).

Alle drei Gruppen besitzen eine C-terminale katalytische Region, hingegen weisen nur die DNMT 1 und DNMT 3 eine N-terminale regulatorische Region auf (**Abb. 1.2**) (Hermann *et al.* 2004). Die C-terminale Region enthält 10 spezifische Sequenzmotive, die für die Bindung an die DNA und an SAM essentiell sind (Hermann *et al.* 2004). Eine Cystein-reiche Region findet man hingegen in der N-terminalen Domäne (Hermann *et al.* 2004).

DNMT 1

Die DNMT 1 sorgt für eine stabile Weitergabe des Methylierungsmusters an die Tochterzelle, indem dieses von hemi-methylierter DNS kopiert wird (Chuang *et al.* 1997). Eine kleinere keimzellspezifische Form der DNMT 1, die DNMT 1 α kommt im Zytoplasma von Oocyten und im preimplantierten Embryo vor und zeigt eine *De novo* Aktivität (Yoder *et al.* 1997, Howell *et al.* 2001). Die DNMT 1 hingegen kommt ausschließlich im Zellkern somatischer Zellen vor (Bestor 2000). An die N-terminale Region der DNMT 1 binden viele Proteine, die einen Einfluss auf den Zellzyklus haben (z.B. PCNA, p21WAF1) sowie die Lokalisation der DNMT 1 in der S-Phase mit dem Proteinkomplex der Replikationsmaschinerie bewirken (Chuang *et al.* 1997). Die N-terminale Region enthält zudem eine Cystein-reiche Zn²⁺ Bindungsdomäne vom CXXC-Typ (Bestor 1992, Chuang *et al.* 1997). Diese Domäne beinhaltet acht konservierte Cysteine in zwei CXXCXXC Gruppen und zwei freie Cysteine, wobei hier zwei Zn²⁺ Ionen gebunden werden können, und ist wichtig für die Bindung an die DNA (Fatemi *et al.* 2001). Zudem interagiert die DNMT 1 mit Histon-modifizierenden Enzymen, mit Methyl-CpG-Bindungsproteinen sowie mit der DNMT 3a und der DNMT 3b (Hermann *et al.* 2004).

DNMT 2

Die Funktion der DNMT 2 ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In murinen embryonalen Stammzellen fand man eine *De novo* Aktivität (Okano *et al.* 1998), während keine Aktivität der DNMT 2 *in vitro* (Hermann *et al.* 2003) nachgewiesen werden konnte.

Goll *et al.* (2006) berichten von einer Funktion der DNMT 2 als tRNA-Methyltransferase, die durch eine Methylierung am 3' Ende von kleinen nicht-kodierende RNAs diese stabilisiert. Eine Erkennung von methylierten RNAs über Toll-like Rezeptoren - Transmembranrezeptoren, welche pathogen-assoziierte molekulare Muster erkennen- und damit eine Verbindung zur Entzündungsreaktion wird hierbei diskutiert (Roughi *et al.* 2008)

DNMT 3

Die Familie besteht aus den miteinander verwandten, aber von unterschiedlichen Genen kodierten DNMT 3a und DNMT 3b, sowie der DNMT 3L. Die beiden ersteren Enzyme sind für die *De novo* Methylierung während der Embryonalentwicklung zuständig (Kim *et al.* 2009). Die DNMT 3a zeigt eine Präferenz für die DNA-Methylierung einzelner Gene (Hata *et al.* 2002), während die DNMT 3b die DNA-Methylierung perizentromerischer Sequenzen bevorzugt (Lin *et al.* 2002). Die DNMT 3L zeigt Interaktionen mit den anderen beiden Enzymen, eine eigenständige Funktion ist noch nicht bekannt (Hata *et al.* 2002). Alle DNMTs der Familie werden hauptsächlich während der Gametogenese und der Embryogenese exprimiert (Hata *et al.* 2002, Bourc'his *et al.* 2001). Die DNMT 3a und die DNMT 3b enthalten in ihrer N-terminalen Region eine Domäne für die Bindung an die DNA (PWWP Domäne) und eine Cytsein-reiche Zn²⁺ Bindungsdomäne (Hermann *et al.* 2004). Diese Domäne erlaubt eine Unterdrückung der Transkription, unabhängig von der Aktivität (Bachman *et al.* 2001). Auch hier findet man eine Interaktion mit histonmodifizierenden Enzymen und Methyl-CpG-bindenden Proteinen (Hermann *et al.* 2004). Im Gegensatz zu den anderen DNMTs ist eine Mutation der DNMT 3b nicht letal, führt aber zum ICF (Immundefizienz, Instabilität der Centromere, Gesichtsveränderungen) Syndroms (Bestor 2000).

1.4 Wirkung der DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung kann die Transkription von Genen durch drei Mechanismen inhibieren.

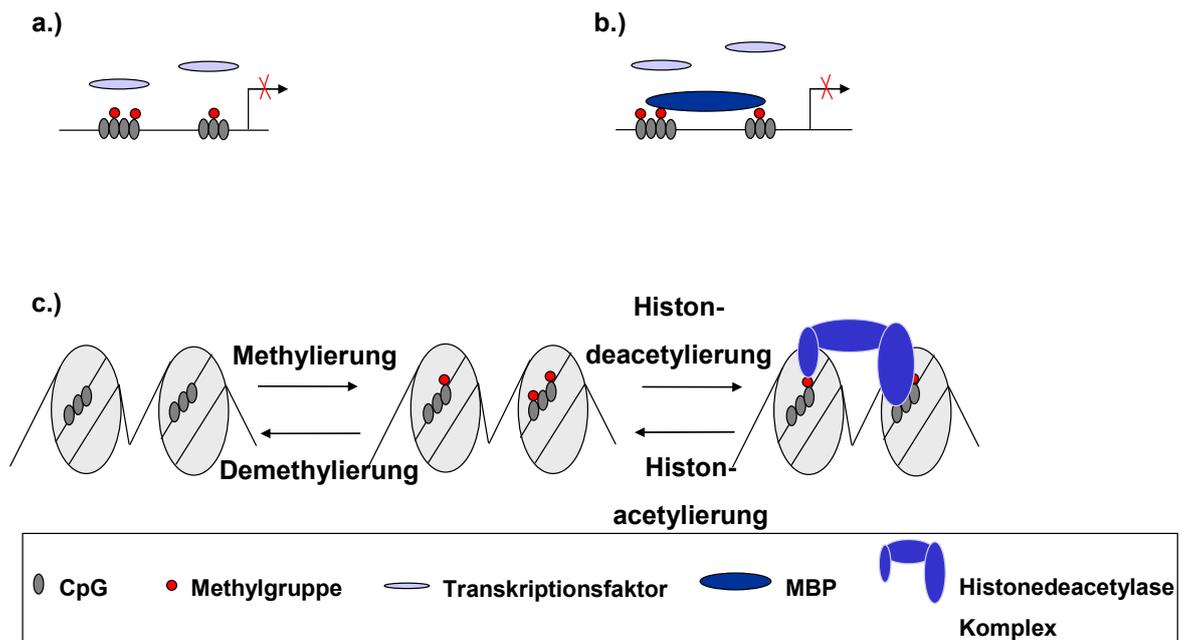


Abb.1. 3: Mechanismen der DNA-Methylierung, welche die Gentranskription behindern

- a.) Methylierung des Promotors inhibiert die Bindung von Transkriptionsfaktoren und somit die Gentranskription
- b.) Methylbindende Proteine (MBPs) binden an die methylierten Cytosine und blocken somit die Bindung von Transkriptionsfaktoren
- c.) MBPs binden an methylierte Cytosine und bilden Komplexe mit der Histondeacetylase und Cofaktoren, welches zu Histondeacetylierung, Chromatinkondensation und zu einer Inhibition der Transkription führt.
(Attwood *et al.* 2002)

Durch die Bindung der Methylgruppen an die DNA kann sterisch die Bindung von Transkriptionsfaktoren und somit die Transkription verhindert werden (**Abb. 1.3 a**). Ein weiterer Mechanismus besteht aus der Rekrutierung von methylbindenden Proteinen (MBP) an methylierte DNA, welcher die Bindung von Transkriptionsfaktoren blockiert (**Abb. 1.3 b**). Zudem können methylbindende Proteine Komplexe mit Co-Repressoren und der Histondeacetylase bilden. Diese fördern die Histondeacetylierung, welche eine Chromatin-Kondensation zur Folge hat (**Abb. 1.3 c**) und somit die Bindung von Transkriptionsfaktoren und die Genexpression inhibiert (Attwood *et al.* 2002) (**Abb.1.3 c**). Die DNA-Methylierung kontrolliert die differenzierte Expression von maternalem und paternalem Allel und die X-Chromosom Aktivierung, welche schon während der Gametogenese implantiert wird (Bourc'his *et al.* 2001). Defekte im Imprinting führen zu verschiedenen Krankheiten wie Beckwith-Wiedemann, Prader-Willi und Angelman Syndrom (Bogdanovic and Veenestra 2009).

Veränderungen der DNA-Methylierung findet man während der Tumorgenese und im soliden Tumor. Charakteristisch ist hierbei eine globale Hypomethylierung in Kombination mit einer regionalen Hypermethylierung. Die globale Hypomethylierung resultiert in einer chromosomalen Instabilität, Reaktivierung von Transposons und Verlust des Imprintings (Gaudet *et al.* 2003, Jelinic and Shaw 2007), während regionale Hypermethylierung häufig Tumorsuppressor-Gene betrifft, aber abhängig vom Tumortyp ist (Esteller 2008). In Korrelation findet man eine erhöhte Expression der DNMT 1, DNMT 3a und besonders der DNMT 3b in Tumoren (Robertson *et al.* 1999). Die Methylgruppe verändert zudem das für Cytosin charakteristische Absorptionsspektrum, wodurch die Bildung von Pyrimidin-Dimeren, in der DNA von Hautzellen erhöht und die Entstehung von Hautkrebs begünstigt wird (Pfeifer *et al.* 2005).

DNA-Demethylierung

Eine globale Demethylierung findet während der Gametogenese und vor der Implantation statt (Morgan *et al.* 2005). Es gibt Hinweise auf eine passive Demethylierung durch eine Blockierung der DNMT 1, welche das vorhandene Methylierungsmuster nicht mehr aufrechterhalten kann (Cedar and Verdine 1999), und einer aktiven Demethylierung vermittelt über Gadd 45 α (Wachstumsstopp und DNA-Schädigung-induziertes Gen 45 α). Der Zusammenhang zwischen einer erhöhten mRNA-Expression von Gadd 45 α und einer Demethylierung des Genoms (Barreto *et al.* 2007) wird widersprüchlich diskutiert (Jin *et al.* 2008). Der genaue Mechanismus ist bisher unbekannt.

Histonmodifikationen

Die Basis des Chromatins bildet das Nukleosom, bestehend aus 147 bp DNA gewunden um ein Histon-Oktamer. Dieses besteht aus jeweils zwei Kopien der Proteine H2A, H2B, H3 und H4 (Luger *et al.* 1997). Diese weisen im N-terminalen Bereich sehr häufig die basische Aminosäure Lysin (K) auf und sind daher für die Interaktion mit den negativ geladenen Nukleinsäuren bestens geeignet. Die N-terminalen Enden der Histone ragen aus dem Chromatin hervor und können von Enzymen,

welche Acetyl-, Methyl- oder Phosphat-Gruppen übertragen, leicht modifiziert werden (Kouzarides 2007, Santos-Rosa and Caldos. 2005). Die strukturellen Eigenschaften des Chromatins werden zum einen durch Acetylierungs-/Deacetylierungs-Vorgänge reguliert und zum anderen durch Methylierung der Lysine, vor allem in den Histonen H3 und H4 (Kouzarides 2007).

Methylbindende Proteine (MBP)

Methylierte DNA rekrutiert methyl-CpG Bindungsproteine (MBP) und methyl-CpG Zinkfinger Proteine der Kaiso-Familie (Kaiso/ZBTB33, ZBTB3 und ZBTB38) (Bogdanovic and Veenstra 2009). Man unterscheidet vier Gruppen an MBP: MeCP 2, MBD 1, MBD 2, MBP 3 und MBP 4. Parallel zur Bindung an methylierte DNA ist MeCP 2 mit anderen Co-Repressoren wie Sin3a, NCoR und c-Ski assoziiert (Kokura *et al.* 2001) und verhindert somit die Transkription. MBD 1 und MBD 2 interagieren mit vielen anderen Repressoren oder epigenetischen Mechanismen (Bogdanovic and Veenstra 2009) um die Transkription zu blockieren. Die MBD 3 kann nicht direkt an methylierte DNA binden, weist aber Wechselwirkungen mit anderen epigenetischen Mechanismen auf (Saito and Ishikawa 2002). Das MBD 4 erkennt eine durch Desaminierung von Methylcytosin entstandene G/T Mutation und initiiert eine Basenaustausch Reparatur (Li *et al.* 2007). Die Proteine der Kaiso-Familie binden spezifisch über Zinkfinger an methylierte DNA und können ebenfalls die Transkription verhindern (Li *et al.* 2007).

1.5 Stickstoffmonoxid (NO)

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein Radikal mit einer Halbwertszeit von mehreren Sekunden und ist damit –im Vergleich zu anderen Radikalen- nicht sehr reaktiv (Monacada *et al.* 1991, Kröncke *et al.* 2001). Aufgrund seiner geringen Größe und lipophilen Eigenschaften kann es gut durch Zellmembranen überwinden penetrieren. In biologischen Geweben kommt es in Konzentrationen im μM -Bereich vor (Kröncke *et al.* 2001). NO kann in Anwesenheit von Sauerstoff über höhere Stickoxide wie N_2O_3 oder N_2O_4 (ROI),

zu seinen stabilen inaktiven Endprodukten Nitrit (NO_2^-) und Nitrat (NO_3^-) oxidiert werden (**Abb. 1.4**). Die Reaktivität der verschiedenen Intermediate (ROI) mit den unterschiedlichen Zielgruppen erklärt die pleiotropen Effekte von NO in biologischen Systemen (Stamler *et al.* 1992).

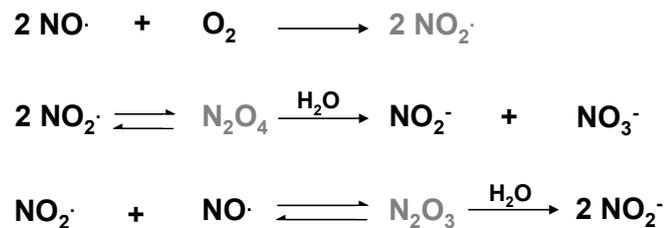


Abb. 1.4: Reaktionsprodukte von NO mit molekularem Sauerstoff

Die verschiedenen chemischen Reaktionen hängen primär von der lokalen NO-Konzentration ab. Stabile Oxidationsprodukte sind Nitrit und Nitrat. Unstabile und hochreaktive Intermediate sind in dieser Abbildung grau gedruckt. (nach: Kröncke *et al.* 2001)

NO kann mit Fe^{2+} interagieren und Enzyme, mit Ausnahme der löslichen Guanylatcyclase, inhibieren. Bei der löslichen Guanylatcyclase bindet NO an Fe^{2+} , was eine Konformationsänderung bewirkt und zur Aktivierung des Enzyms mit der Freisetzung von cGMP (Guanosin 3'5'-cyclisches Monophosphat) führt. Dieser NO-cGMP-Signalweg reguliert Vasodilatation, intraneuronale Kommunikation und die gastrointentionale Motilität (Gao 2009). S-Nitrosierungen von Cystein-Resten sind häufig auftretende NO-medierte Proteinmodifikationen (Gao 2009). So sind eine Reihe von Enzymen bekannt, deren katalytische Zentren reduzierte SH-Gruppen beinhalten, die nach erfolgter S-Nitrosierung, auch ohne das Vorhandensein komplexierter Metalle, einen temporären Funktionsverlust des Proteins zur Folge haben (Sun *et al.* 2006). Aber auch die Aktivierung von Proteinen mittels S-Nitrosierung wurde gefunden, so z.B. beim kleinen GTP-bindenden Protein $\text{p}21^{\text{ras}}$ (Sun *et al.* 2006). Die S-Nitrosierung ist reversibel und das resultierende nitrosierte Thiol kann als „Transporter“ und „Vorrat“ aufgrund der geringeren Aktivität angesehen werden (Kröncke *et al.* 2001). NO kann aber auch irreversibel durch S-Nitrosierung Zinkfinger (ZN-S) zerstören. Es kommt zur Freisetzung von Zn^{2+} und die Bindung an die DNA wird verhindert (Kröncke *et al.* 1994). Durch eine Reaktion von NO mit O_2^- entsteht Peroxynitrit (ONOO^-).

Unter pathophysiologischen Bedingungen wird viel Peroxynitrit und dessen Derivate (ROS) produziert, dieses führt zu einer irreversiblen Schädigung der Atmungskette, Inhibition der ATP-Synthese, Cytochrom C Freisetzung und Induktion von Caspase-abhängiger Apoptose (Gao *et al.* 2009). Die S-Nitrosierung von Proteinthiolen durch NO schützt diese vor einer irreversiblen oxidativen Modifikation durch ROS (Haendeler *et al.* 2002).

NO-Synthasen

Die Familie der Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS) katalysiert die Reaktion von molekularem Sauerstoff und L-Arginin zu NO und L-Citrullin.

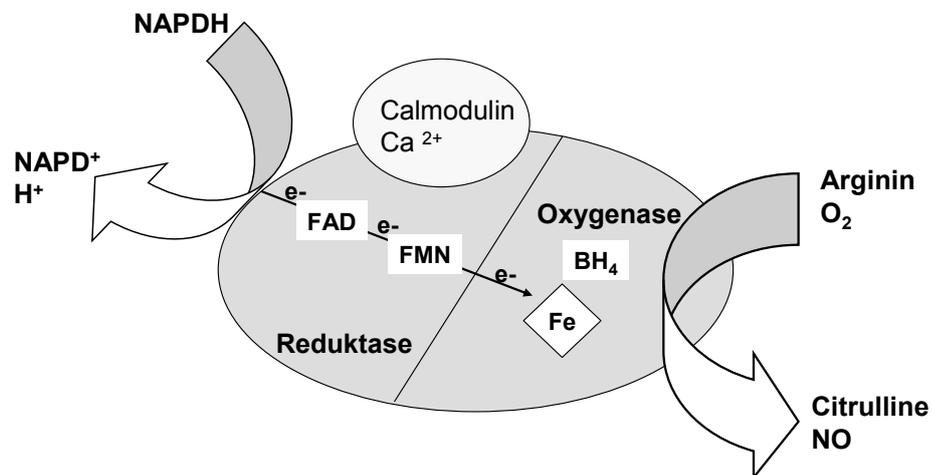


Abb.1.5 : Schematische Reaktion der NOS

Von NADPH werden Elektronen von der reduktiven Seite der NOS aufgenommen und über FAD und FMN Redoxüberträger zur Oxygenaseseite. Dort interagieren sie mit dem Eisen von Häm und BH₄ an der aktiven Seite und katalysieren die Reaktion von Arginin und Sauerstoff zu NO und Citrullin (nach Alderton *et al.* 2001)

In einer 5-Elektronen Reaktion wird L-Arginin unter Beteiligung der essentiellen Co-Faktoren, Flavinmononukleotid (FMN), Flavinadenindinukleotid (FAD), Protoporphyrin IX Häm und Tetrahydrobiopterin (BH₄), zum freien Radikal NO oxidiert (**Abb. 1.5**). Das aktive iNOS Protein ist ein Homo-Dimer, in welchem die N-terminale Oxygenase Domäne die Bindungsstellen für Häm und Tetrahydrobiopterin BH₄ enthält. L-Arginin ist über eine Calmodulin-Bindungsstelle mit der C-terminalen Reduktase Domäne verbunden, in welcher die Bindungsstellen der Co-Faktoren FAD, FMN und NADPH lokalisiert sind. (Alderton *et al.* 2001).

Tetrahydrobiopterin scheint die aktive dimerische Form der NOS zu stabilisieren (Nathan 1992).

Man unterscheidet drei Isoformen der NO-Synthasen, die durch unterschiedliche Gene kodiert werden (Zhang *et al.* 2000) und eine 51-57 % Homologie aufweisen (Kleinert *et al.* 2000). Zwei Isoformen werden aufgrund ihrer konstitutiven Expression als konstitutive NO-Synthasen definiert. Hierzu zählen die endotheliale NO-Synthase (eNOS) und die neutrophile NO-Synthase (Marsden *et al.* 1992, Nakane *et al.* 1993), die nach den Geweben, in welchen sie zuerst entdeckt wurden, benannt sind. Die konstitutiven NO-Synthasen werden über Ca^{2+} aktiviert (Monacada *et al.* 1991) und synthetisieren niedrige NO-Konzentrationen (pm-Bereich) die pulsatil freigesetzt werden. Nach der Stimulation von spezifischen Rezeptoren mit verschiedenen Agonisten (z.B. Acetylcholin, Bradykinin, Serotonin, Adenosin, Histamin und Thrombin) steigt die intrazelluläre Konzentration an freiem Ca^{2+} . Die Bindung von Ca^{2+} an die Ca^{2+} /Calmodulin Untereinheit des Enzyms aktiviert dessen Produktion von NO. Von der eNOS-gebildetes NO beeinflusst die Relaxation der glatten Muskelzellen, die Regulation des Blutdrucks und Thrombocytenreifung. Im zentralen Nervensystem ist nNOS-gebildetes NO ein Faktor für die klinische Manifestation von Depressionen (Buechler *et al.* 1994). Im autonomen Nervensystem in nicht-adrenogenen, nicht-cholingerischen Nerven, inhibiert NO Neurotransmitter und führt zur Relaxation im Gastrointestinal Trakt und im Corpus Caverosum (Bult *et al.* 1990, Desai *et al.* 1991, Burnett *et al.* 1992).

Die dritte Isoform der NO-Synthasen ist die induzierbare NO-Synthase (iNOS), die zur Ca^{2+} -unabhängigen Expression einen entzündlichen Reiz benötigt, z. B. durch proinflammatorische Cytokine ($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, $\text{IFN-}\gamma$) oder bakterielle Proteine wie Lipopolysaccharid (LPS). Die Induktion der iNOS-Expression ist dabei zell- und speziesspezifisch (Kleinert *et al.* 2000) Nach Induktion synthetisiert die iNOS über einen Zeitraum von Stunden bis Tagen hohe, scheinbar unregulierte, Mengen an NO (Drapier *et al.* 1988). Die Funktionen des durch die iNOS gebildeten NO sind vielfältig. Protektive Effekte sind z. B. antimikrobielle und antivirale Aktivitäten (MacMicking *et al.* 1997, Croen *et al.* 1993, Karupiah *et al.* 1993, Saura *et al.* 1999, Shiloh *et al.* 1999, Anstey *et al.* 1996, Nussler *et al.* 1991),

antiapoptotische Effekte sowie der Schutz vor UV-induzierter Zellschädigung (Kröncke *et al.* 2000, Hemmrich *et al.* 2003). Destruktive Effekte sind z. B. DNA Schädigung und Mutagenität (Wink and Mitchell. 1991). Zudem stellt iNOS-produziertes NO ein wichtiges Signal zur Regulation von Differenzierung und Proliferation dar (Krischel *et al.* 1998), dies ist wichtig für Wundheilungsprozesse (Boissel *et al.* 2004).

Regulation der iNOS-Expression und Aktivität

Das humane iNOS-Gen ist auf dem Chromosom 17 an der Position 17cen-q11.2 lokalisiert (Chartrain *et al.* 1994). Es ist 36 kb lang und besteht aus 26 Exons und 25 Introns mit einem offenen Leseraster von 3459 bp. Das Enzym besteht aus 1153 Aminosäuren und hat ein errechnetes Molekulargewicht von 131 kDa. Im Vergleich von humaner und muriner iNOS zeigt sich eine 60 % Homologie in den proximalen 400 bp der 5'-flankierende Promotorregion, welche sich auf 44 % reduziert, wenn die ersten 1,5 kb beider Promotoren verglichen werden (DeVera *et al.* 1996).

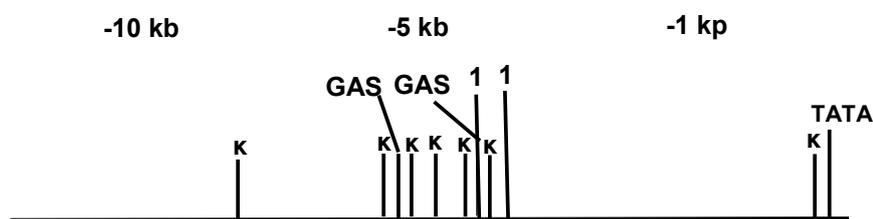


Abb. 1.6: Struktur des humanen iNOS-Promotors

Gezeigt sind die -10 kp des humanen iNOS-Promotors mit den Bindestellen für AP-1 (1), NFκB (κ) und STAT-1 α (GAS). TATA markiert die TATA-Box. (modifiziert nach: Kleinert *et al.* 2003)

Der humane iNOS-Promotor enthält in der -8.7 kb 5'-flankierende Region viele Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren, wie AP-1 (Aktivatorprotein 1), NFκB (Nukleärer Faktor κB), γ-IRE (IFN-γ responsible Element), NF-IL-6 (nukleärer Faktor für IL-6), GAS (γ-aktivierte Seite), IRF-E (IFN regulatorisches Faktor-Element), ISRE (IFN-stimuliertes responsible Element), TNF-RE (TNF responsible Element) und X box (**Abb. 1.6**) (Chu *et al.* 1998). Zusätzlich findet man drei Alu-Sequenzen (Chu *et al.* 1998). Die Transkriptionsfaktoren NF-κB, Stat-1α und AP-1 sind hierbei besonders zu betrachten (Kleinert *et al.* 2003).

Den fünf NFκB Bindungsstellen zwischen -5,2 kb und -6,5 kb wird eine wichtige Funktion für die Induktion der iNOS zugeschrieben (Taylor *et al.* 1998), während die Bedeutung der downstream NFκB Bindungsstelle kontrovers diskutiert wird (Taylor *et al.* 1998, Nunokawa *et al.* 1996). Eine Aktivierung von NFκB durch LPS, IL-1β, TNF-α induziert eine Expression der iNOS, hingegen zeigt eine Inhibition von NFκB durch Glucocorticoide, TGF-1β oder Antioxidantien auch eine Inhibition der iNOS-Expression (Ghosh *et al.* 1998). Diese Inhibition resultiert aus einem Abfangen von NFκB durch Protein-Protein-Interaktionen (Mukaida *et al.* 1994), Inhibition der Kerntranslokation (Jeon *et al.* 1998), Inhibierung der NFκB Transaktivität (Yu and Kone 2002) oder von einer verminderten Expression von I-κB, einem spezifischen Inhibitor von NFκB (DeVera *et al.* 1997). Es findet sich bei -6,7 bp auch ein NFκB repressing factor (NRE), welcher für die negative transkriptionale Regulation von NFκB wichtig ist (Feng *et al.* 2002). STAT-1α stimuliert die iNOS Induktion durch eine direkte Bindung an die DNA oder durch eine Aktivierung von IRF-1 (Interferon regulatorischer Faktor 1) (Ganster *et al.* 2001). Man weiß, dass AP-1 eine essentielle Rolle bei der Inhibition der iNOS spielt, aber der genaue Mechanismus ist noch nicht bekannt (Kleinert *et al.* 2003). Auch ein Einfluss der 3'-flankierende Region des iNOS-Promotors auf deren Induktion wurde gezeigt (Nunokawa *et al.* 1997). Es scheint keine Regulation der Enzymaktivität zu geben (Kleinert *et al.* 2003). Jedoch besteht eine Selbstregulation der iNOS durch NO über folgende Mechanismen:

- Hochregulation der zellulären cGMP Konzentration;
- Verhinderung der p53 Aktivität, welche den iNOS-Promotor inhibiert (Forrester *et al.* 1996);
- Reduktion der Aktivität von HIF-1 (Hypoxie-induzierter Faktor 1) (Yin *et al.* 2000);
- Inhibition der cytokininduzierten NFκB Aktivität (Taylor *et al.* 1997)

oder

- Nitrierung des Tyrosins von STAT-1α (Llovera *et al.* 2001).

Es konnte aber auch eine Erhöhung der cytokininduzierten iNOS-Expression durch NO gezeigt werden (Kleinert *et al.* 2003).

NFκB

Nukleärer Faktor kappa B (NFκB) ist ein Transkriptionsfaktor, welcher im Cytoplasma jeder Zelle als inaktiver Komplex, gebunden an inhibitorische Proteine der IκB Familie, vorkommt. Nach Stimulierung wird IκB phosphoryliert und über eine Ubiquitin-vermittelte Proteolyse degradiert, worauf NFκB in den Zellkern wandert und dort an regulatorische Bindungsstellen bindet (Kröncke 2003). NFκB wird aktiviert durch eine Reihe von Faktoren: Stress, Zigarettenrauch, Viren, Bakterien, Cytokine, freie Radikale, Tumorgenese und Endotoxine. Bei Aktivierung reguliert NFκB mehr als 400 Gene, wie Enzyme (z.B. COX-2, 5-LOX und iNOS), Cytokine (z.B. TNF, IL-1, IL-6, IL-8 und Chemokine), Adhäsionsmoleküle, virale Proteine etc. (Schmitz *et al.* 2004). Die konstitutive Aktivierung von NFκB korreliert mit einer Reihe von Krankheiten wie Asthma, Atherosklerose, rheumatische Arthritis, Diabetes, Alzheimer und Krebs. Die Aktivität von NFκB wird von Th2 Cytokinen (IL-4, IL-13, IL-10), Interferonen, endokrinen Hormonen oder Phytochemikalien inhibiert (Ahn *et al.* 2005). Auch NO hat eine regulatorische Funktion auf NFκB. Dabei ist die Aktivierung von NFκB an die Konzentration von NO gebunden. Während bei geringen Mengen NO eine verstärkte NFκB DNA Bindungsaktivität zu sehen ist, zeigen hohe NO Mengen einen gegenteiligen Effekt (Kröncke 2003).

1.6 Entzündung und Epigenetik

Verschiedene Verbindungen zwischen Entzündungsreaktionen und epigenetischen Modifikationen sind bekannt.

Bei der Regulation der Genexpression im Immunsystems, wie z.B. bei CD4, CD8 und MHC, ist die DNA-Methylierung beteiligt. Auch bei der Pathogenabwehr ist diese essentiell. Virale und bakterielle DNA weisen keine DNA-Methylierung auf und werden daher beim Eindringen in den Körper vom TLR 9 erkannt und eine Signalkaskade zur Elimination des Pathogens wird in Gang gesetzt (Scheule 2000). Vermehrt zeigen Studien zudem, dass epigenetische Modifikationen eine Rolle bei der Antigen-Präsentation, der Selbst-Fremd Unterscheidung und der Balance zwischen Toleranz und Autoimmunität spielen (Fitzpatrick and Wilson, 2003).

Auch in pathophysiologischen Prozessen zeigen beide Mechanismen eine Wechselwirkung. 25 % aller Krebsfälle gehen auf eine Infektion oder chronische Entzündung zurück (Hussain and Harris 2007). Wobei eine globale Hypomethylierung in Kombination mit einer lokalen Hypermethylierung charakteristisch für die Tumorentstehung ist. In einer Entzündungsreaktion entsteht oxidativer Stress, welcher ein Initiator der Tumorgenese sein kann. Dieser kann durch Oxidation oder Nitrosierung die DNA schädigen oder spezifische Mutationen hervorrufen. Am besten ist hierbei die Oxidation von Guanosin zu 8-Hydroxy-2-deoxyguanosin charakterisiert. Diese Veränderung führt zu einer G-T Transversion, die DNA kann nicht mehr methyliert werden und ein erster Schritt in Richtung Tumorgenese kann erfolgen (Maltseva et al. 2008). Die NO-Synthasen produzieren diesen oxidativen Stress und es gibt immer mehr Evidenzen, dass diese wiederum von epigenetischen Prozessen reguliert werden können.

2 Fragestellung

In den letzten Jahren gab es vermehrte Hinweise über eine Regulation der NO-Synthasen durch epigenetische Prozesse. Bei der eNOS fand man sowohl eine Regulation über die DNA-Methylierung (Chan *et al.* 2004) als auch über Veränderungen in den Histonmodifikationen (Fish *et al.* 2005). Auch die murine iNOS zeigt eine Regulation über die DNA-Methylierung (Yu *et al.* 2004, Cvetkovic *et al.* 2004) und die Histonacetylierung (Yu and Kone 2005). Humane eNOS und murine iNOS weisen eine 50 %ige Sequenzhomologie mit der humanen iNOS auf. Im Vergleich zu dieser sind jedoch der Aufbau des Promotors, die Expression und die Regulation verschieden. Möglicherweise wird die humane iNOS ebenfalls über epigenetische Modifikationen reguliert, was in dieser Arbeit geklärt werden sollte. Chan *et al.* (2005) zeigten eine Korrelation des DNA-Methylierungsstatus mit der iNOS-Expression, sowie eine weitere epigenetische Modifikation, H3 Lysine 9 Methylierung, welche deren Induzierbarkeit in DLD-1 Zellen vermindert. Zudem führte die Inhibition der Methylierung, mit Methylierungsinhibitoren wie mit antisense DNA gegen die DNMT 3b, zu einer erhöhten iNOS Promotoraktivität (Yu *et al.* 2004). Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss der DNA-Methylierung auf die Promotoraktivität und mRNA-Expression der humanen iNOS untersucht werden und die Promotorregion über welche diese Regulation erfolgt, eingegrenzt werden. Eine Arbeit von Hdmadcha (*et al.* 1999) zeigte das NO die Aktivität der DNA-Methyltransferasen erhöhen kann. *In vivo* findet man einen erniedrigten DNA-Methylierungsstatus in Karzinomzellen. Daher stellten sich die Fragen ob NO regulatorisch, vielleicht sogar autoregulatorisch, die DNA-Methylierung verändern kann und ob diese Regulation auch in Karzinomzellen erfolgt.

Dies könnte eine neue Verbindung zwischen Entzündungsprozessen und epigenetischer Regulation darstellen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien

Chemikalien

Die Produkte werden in alphabetischer Reihenfolge angegeben.

Albumin aus Rinderserum: BSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland); Dinatriumhydrogenphosphat: Na_2HPO_4 (Merck, Darmstadt, Deutschland); Natriumsalz (Alexis, Grünberg, Deutschland); Dimethylsulfoxid: DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland); Ethylendinitrilo-tetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat: EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland); Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland); 2-Mercaptoethanol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland); Natriumchlorid: NaCl (Merck, Darmstadt, Deutschland); Trishydroxymethylaminomethan: Tris (Roth, Karlsruhe, Deutschland); Triton X-100 (Serva, Heidelberg, Deutschland); Viralex Trypsin (0,25 %) (PAA Laboratories, Cölbe, Deutschland); Polyoxyethylensorbitan Monolaurat: Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland).

Puffer und Lösungen

Tabelle 3.1.1: Verwendete Puffer und Lösungen

PUFFER UND LÖSUNGEN	ZUSAMMENSETZUNG
20× PBS	2,740 M NaCl 0,160 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,030 M KH_2PO_4
1× PBS	50 ml 20×PBS ad 1 l bidest. H_2O
1× PBS/0,02 % EDTA	50 ml 20× PBS 200 mg EDTA ad 1 l bidest. H_2O
20× TBS	20 mM TRIS 150 mM NaCl pH 7,5
1× TBS	50 ml 20× TBS ad 1 l bidest. H_2O pH 7,5
1× TBS/0,05 % Tween	1 l 1×TBS 500 µl Tween 20
1× TBS/1 % BSA	50 ml 1×TBS 0,5 g BSA

Cytokine

Rekombinantes humanes Interleukin 1 β (IL-1 β), rekombinantes humanes Interferon γ (IFN- γ) und rekombinanter Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF- α) von Strathman Biotech (Hamburg, Deutschland)

Antikörper

Monoklonaler Maus-anti-5-Methylcytosine Antikörper (Calbiochem, USA und Eurogentec, Belgien); Polyklonaler Ziege-anti-Maus Immunglobulin Antikörper, HRP-gekoppelt (BD Biosystems, USA).

Zellkulturmedien und Zusätze für die Zellkultur

Tabelle 3.1.2: Zellkulturmedien und Einfriermedien

Zellkulturmedien	Zusammensetzung	Zelllinien
10 % FCShq RPMI 1640	RPMI 1640 1 mM Natriumpyruvat 60 U/ml Penicillin-Streptomycin 3 mM Glutamax I 1× MEM nicht essentielle Aminosäuren 10 mM Hepes 10 % FCShq (Endotoxingehalt $\leq 0,45$ ng/ml)	A549iNOS A549_NF κ B LNCAP 5367
10 % FCShq RPMI1640/ 10 % DMSO	10 ml 10 % FCShq RPMI 1640 1 ml DMSO	A549iNOS A549_NF κ B LNCAP 5367 (Einfriermedium)
Keratinocyten SFM	Keratinocytenmedium SFM Supplements for Keratinocyten SFM 60 U/ml Penicillin/Streptomycin 3 mM Glutamax 0,9 mM CaCl ₂	Keratinocyten
Keratinocytenmedium/ 10 % DMSO	10 ml Keratinocytenmedium SFM 1 ml DMSO	Keratinocyten (Einfriermedium)

Die Zellkulturplatten und die sterilen Materialien für die Zellkultur sind von Greiner Labortechnik. RPMI 1640, fötales endotoxin-armes Kälberserum (FCShq), Natriumpyruvat (100×), nicht-essentielle Aminosäuren (MEM), 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic Säure (HEPES, 1 M), Penicillin-Streptomycin und Trypsin/EDTA sind von PAA Laboratories (Pasching, Österreich).

100× L-alanyl-Glutamin (GlutaMax), Keratinocytenmedium SFM und Supplements für Keratinocyten SFM sind von der Firma Gibco (Gibco Laboratories, Eggenstein, Deutschland).

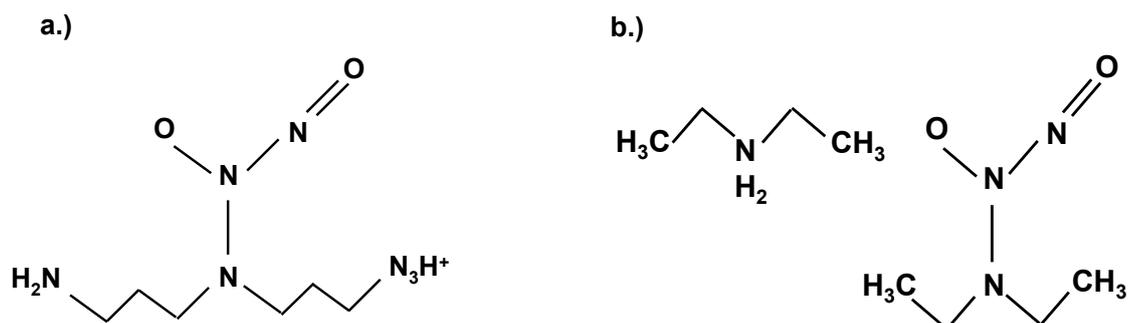
Donoren und Inhibitoren von Stickstoffmonoxid (NO)

Der NO-Donor DetaNO (Z)-1-[2-(2-Aminoethyl)-N-(2-amminonio-ethyl) amino] diazen-1-ium-1,2-diolate] hat bei 37°C im Zellkulturmedium eine Halbwertszeit von ca. 8 Stunden (Hrabie *et al.* 1993). Unmittelbar vor Gebrauch wurde eine 50 mM Stocklösung auf Eis hergestellt, und mit dem Zellkulturmedium auf die benötigte Endkonzentration verdünnt. DetaNO wurde alle 24 Stunden erneut zu den Zellen gegeben. DetaNO wurde uns freundlicherweise von Prof. Dr. Klaus Kröncke (Institut für Biochemie und Molekularbiologie I, HHU Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. DetaNO bildet bei einer Konzentration von 1 mM ungefähr 3 µM NO pro Minute (Berendji *et al.* 1997).

Der NO-Donor DeaNO 2-(N,N-Diethylamino)-diazenolate-2-oxide diethylammoniumsalz (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) hat eine Halbwertszeit von 2,1 Minuten bei 37°C und einem pH-Wert von 7,4 (Morley *et al.* 1993).

Eine Inhibierung der NO-Synthasen erfolgte mit L-NIO L-N-(Iminoethyl)-ornithin-dihydrochlorid (Alexis, Biochemicals, Grünberg, Deutschland), welches die Substratbindung des Enzyms hemmt (McCall *et al.* 1991, Mulligan *et al.* 1992), jedoch nicht auf DNA/RNA-Ebene eingreift (Rees *et al.* 1990). Aus einer 50 mM Stammlösung in bidest. H₂O wurde die benötigte Konzentration im Zellkulturmedium verdünnt.

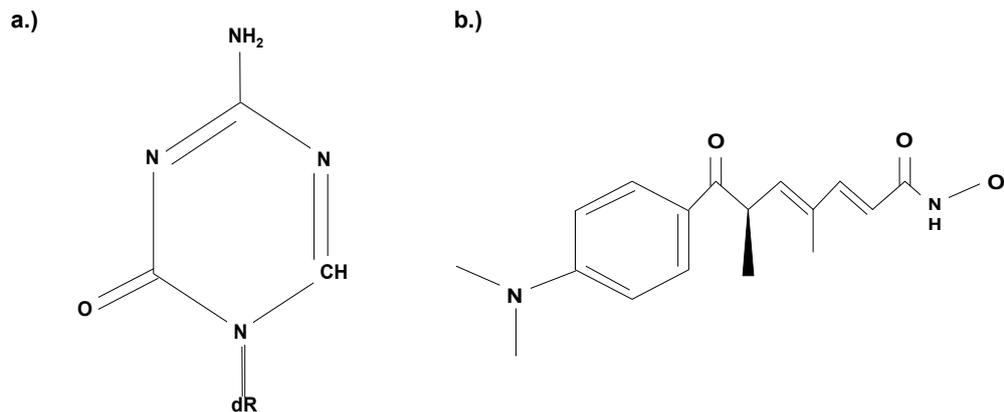
Abb. 3.1.1: Strukturformel von DetaNO (a.) und DeaNO (b.)



Inhibitoren der DNA-Methylierung

Zur Inhibierung der DNA-Methylierung wurde 5-Aza-2'-deoxycytidine und Trichostatin A verwendet. 5-Aza-2'-deoxycytidine (Aza, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) ist ein Cytosinanalogen und als solches inhibiert es die DNA-Methylierung (Christmann 2002). Aus einer 1 M Stammlösung wurden die benötigten Konzentrationen Aza kurz vor Verbrauch mit PBS verdünnt. Trichostatin A (TSA, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) inhibiert die Histondeacetylierung (Marks *et al.* 2001). Als 2,2 mM Stammlösung wurde TSA in EtOH gelöst und die benötigten Konzentrationen kurz vor Gebrauch mit PBS verdünnt.

Abb. 3.1.2: Strukturformel von 5-Aza-2'-deoxycytidine (a.) und Trichostatin A (b.)



3.2 Methoden

Zellen und Zellkulturtechniken

Verwendete Zellen

Die humane Lungenepithel-Zelllinie A549/8-pXPZ-iNOS (A549iNOS) wurde uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Kleinert (Institut für Pharmakologie, Universität Mainz) zur Verfügung gestellt. A549iNOS sind stabil mit einem 16kb Fragment des iNOS-Promotors vor einem Luciferasereporter gen transfiziert (*Plasmid pXPZ-iNOS im Anhang*). Die Zellen wurden in 10 % FCS_{hq} RPMI 1640 kultiviert und alle 5-8 Passagen mit 1 mg/ml Genitacin G 418 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) selektiert.

Von der Firma Panomics (Fremont, USA) wurde die humane Lungenepithel-Zelllinie A549/NFκB-luc (A549_NFκB) bezogen. Durch eine Kotransfektion von pNFκB-luc (*Plasmid im Anhang*) und pHyg der humanen Lungenepithel-Zelllinie A549, gefolgt von einer Selektion mit Hydromycin, wurden die Zellen hergestellt. Durch die chromosomale Integration eines Luciferase Reporterkonstrukts, reguliert von mehreren Kopien der NFκB Bindestelle, wird eine Beobachtung der Aktivität des NFκB Transkriptionsfaktors möglich. Die Aktivierung der Zellen erfolgte mit 500 U/ml TNF-α. Die Zellen wurden in 10 % FCS_{hq} RPMI 1640 kultiviert und alle 5-8 Passagen mit 10 µg/ml Hydromycin B (Roche Diagnostic, Mannheim, Deutschland) selektiert.

Die humane Prostatakarzinomzelllinie LNCAP (Horoszewicz *et al.* 1983) und die humane Blasenkarzinomzelllinie 5367 (Welte *et al.* 1985) wurden uns freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. Schulz (Urologisches Forschungslabor, Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. Beide Zelllinien wurden in 10 % FCS_{hq} RPMI 1640 kultiviert.

Humane primäre epidermale Keratinocyten wurden von der Firma Gibco (Gibco Laboratories, Eggenstein, Deutschland) bezogen. Die Zellen wurden aus adulter Haut isoliert und nach negativer Testung auf Mycoplasmen, Hepatitis B, Hepatitis C und HIV von der Firma ausgeliefert. Die primären Zellen wurden in Keratinocyten SFM Medium kultiviert und in der 3-5 Passage für die Versuche eingesetzt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte im Brutschrank (Heraeus® Hera Cell® (Thermo Electron LED GmbH, Langensfeld, Deutschland) bei 37°C und 5 % iger CO₂-Atmosphäre.

Alle Zelllinien wurden nach dem Auftauen und nach jeder 10. Passage auf Mycoplasmen-Kontamination getestet (Mycoplasmen Test PCR, Minerva) und waren stets negativ.

Kultur der Zellen

Zur Subkultivierung wurden die Zellen bei einer Konfluenz von 75-80 % passagiert. Hierzu wurden die Zellen mit 1× PBS/0,02 % EDTA gewaschen und mit 1% Trypsin/0,3 % EDTA behandelt. Die Trypsinierungsdauer wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und mit 10 % FCS_{hq} RPMI 1640 abgestoppt. Die Zellen wurden bei 500 g (1000 rpm) in der Allegra 6KR Zentrifuge (Beckman Coulter GmbH - Diagnostics, Fullerton (CA), USA), zentrifugiert und in Zellkulturmedium (**s. Tab.3.1.2**) resuspendiert. In der Neubauer Kammer (0.0025 mm² x 0.1 mm; Brand, Wertheim, Deutschland) mit einem Zeiss Axiovert 200 Mikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Köln, Deutschland) wurden die Zellen gezählt und in der benötigten Zellzahl ausgesät. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte in 10-cm Zellkulturschalen. Für die Experimente wurden 10×10⁴ Zellen in 6-Well Kulturschalen (Neutralrotfärbung), 50×10⁴ Zellen in 6-Well Kulturschalen (Luciferase-Assay, Real-Time PCR) und 50×10⁴ Zellen in 10-cm Zellkulturschalen (DNA-Präparation, Dnmts Assay) ausgesät und, wie in den Experimenten beschrieben, behandelt.

Einfrieren und Auftauen der Zellen

Die Zellen wurden, wie oben beschrieben, trypsinisiert und das Zellpellet in kaltem FCS_{hq} resuspendiert. In einem 1:2 Verhältnis wurde die Zellsuspension mit kaltem Einfriermedium (**s. Tab.3.1.2**) vermischt und in einem Kryoröhrchen in einem 5100 Cyro 1°C Freezing Container (Nalgene Labware, Rochester (NY), USA) bei -80°C eingefroren. Zum Auftauen wurden die Zellen bei 37°C aufgetaut und in Zellkulturmedium resuspendiert. Nach einer Zentrifugation bei 500 g (1000 rpm, Allegra 6KR Centrifuge; Beckman Coulter GmbH - Diagnostics, Fullerton (CA), USA.) wurde das Zellpellet in Zellkulturmedium resuspendiert und die Zellen auf Zellkulturplatten ausgesät.

Bestimmung der Lebendzellzahl mittels Neutralrot-Färbung

Die Zellen wurden für 90 Minuten mit einer Neutralrot-Lösung (1:100 Verdünnung einer 3 % Lösung, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) inkubiert, zweimal mit 1 × PBS gewaschen, getrocknet und mit 0,05 M HCl in Isopropanol lysiert. 100 µl des Zelllysats wurden bei 530 nm in einem Photometer (FLUOstar OPTIMA von BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) gemessen. Nur stoffwechselaktive Zellen können durch Neutralrot angefärbt werden, wobei die Extinktion mit der Zellzahl linear korreliert (Finter 1969).

Bestimmung von apoptotischen und nekrotischen Zellen

Die Quantifizierung apoptotischer Zellen erfolgte mit einer Höchst-Färbung (BisBenzimid Farbstoff), die gleichzeitige Propidiumiodid-Färbung erlaubt die Quantifizierung nekrotischer Zellen. Der Farbstoff BisBenzimid (HOE 33342) bindet spezifisch an adenin- und thymidinreiche Sequenzen, somit wird die DNA im Zellkern angefärbt und es werden Veränderungen im Zellkern sichtbar. Der Farbstoff Propidium-Iodid dringt nur in die Zelle ein und interkaliert in die DNA, wenn die Zellmembran z.B. durch Nekrose permeabel ist. Zu dem Zellmedium wurden die Farbstoffe BisBenzimid (4 µg/ml; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und Propidiumiodid (1 µg/ml; Promega, Mannheim, Deutschland) gegeben und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenz der Zellkerne wird mittels eines Zeiss Fluoreszenz Mikroskop (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Deutschland) -für die Höchst-Färbung bei einer Extinktion von 355 nm und der Emission von 465 nm und für die Propidiumiodid-Färbung bei einer Extinktion von 520 nm und einer Emission von 610 nm- gemessen und optisch ausgewertet.

Bestimmung der iNOS-Promotoraktivität und der NFκB Aktivität mittels Luciferase-Assay

Die Zellen wurden mit dem Reporter Gen Assay Lyse Puffer (Roche Diagnostics GmbH) lysiert und für 2 Minuten bei 1000 g (16000 rpm, 4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und unverzüglich eingefroren (-80°C).

Der Luciferase Assay Puffer (30 mM Tricine, 0,1 mM EDTA, 15 mM MgSO₄, 10 mM DTT) wurde mit 0,27 mM Coenzym-A, 0,53 mM ATP, und mit 0,5 mM des Substrates D-Luciferin, versetzt. 100 µl des Luciferase-Substrats wurden 7 sec vor der Messung von einer Injektionspumpe im Luminometer (FLUOstar OPTIMA von BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) auf 10 µl der Probe gegeben und die Lumineszenz wurde quantifiziert. Die gemessenen Licht-Einheiten (LU) wurden gegen den Proteingehalt, bestimmt durch den Lowry Assay, der Proben normiert. Die Aktivität des iNOS-Promotors sowie die Aktivität von NFκB wurden im Verhältnis zu den unbehandelten Zellen angegeben.

Proteinbestimmung

Basierend auf dem Lowry Assay (Lowry *et al.* 1951) wurde die Proteinmenge mit dem BioRad DC Protein Assay (Bio-Rad) -gemäß Herstellerangaben durchgeführt- ermittelt. Aus einer Stammlösung von 20 mg/ml BSA in bidest.H₂O wurde die Standardreihe (20000 µg/ml, 15000 µg/ml, 10000 µg/ml, 7500 µg/ml, 5000 µg/ml, 2500 µg/ml, 1250 µg/ml, 250 µg/ml, 0 µg/ml) verdünnt. Die Proben und die Standardreihe wurden in derselben Weise behandelt. Die Absorption wurde bei 750 nm (FLUOstar OPTIMA von BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) gemessen und die Proteinkonzentration der Proben gegen die Standardreihe errechnet.

Charakterisierung der Genexpression

Zellyse und Reverse Transkription

Die Zellen wurden in einem RLT Lysepuffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit 1 % 2-Mercaptoethanol lysiert und anschließend im QIASchredder Zentrifugationsröhrchen (Qiagen, Hilden, Deutschland) homogenisiert. Das Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), zur Isolierung zellulärer RNA, wurde nach Herstellerprotokoll verwendet. Die Reinheit und Menge der gesamten RNA wurde im NanoDrop (peQLab, Erlangen, Deutschland), anhand des Absorptionsspektrum (A_{260}/A_{280}), ermittelt. Die reverse Transkription erfolgte mit 1 µg RNA mittels QuantiTect® Reverse Transkription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben.

Real-time RT-PCR

In der Real-Time PCR wird das Power SyBRgreen PCR Master Mxt Kit (Applied Biosystems) im ABI PRISM 7900 (Applied Biosystem) nach dem Programm 15' 95°C (15'' 95°C, 30'' 60°C, 30'' 72°C (40 Zyklen) eingesetzt.

Aus der Literatur (Schneider-Stock *et al.* 2005, Bruch-Gerharz *et al.* 2003) wurden die Primersequenzen entnommen und mit dem Homologievergleich von Blast (NCBI) kontrolliert. Die Effizienz und Spezifität der Primer wurde durch Amplifikationen einer Probe -aus einer Sammlung vieler unterschiedlich vorbehandelter Proben- getestet und durch die Analyse der Schmelzkurve überprüft.

Die Auswertung des relativen Expressionsniveaus erfolgte mit der Rest®Software nach dem folgendem mathematischen Modell von Pfaffl (Pfaffl *et al.* 2002, Muller *et al.* 2002):

$$(E \text{ target})^{\Delta CP \text{ target (MEAN control-MEAN sample)}}$$

$$R = \frac{\quad}{\quad}$$

$$(E \text{ ref})^{\Delta CP \text{ ref (MEAN control-MEAN sample)}}$$

E target : real-time PCR Effizienz des zu untersuchenden Gentranskripts

E ref : real-time PCR Effizienz des Referenz-Gentranskripts

$\Delta CP \text{ target}$: ΔCP des durchschnittlichen CP des zu untersuchenden Gens

$\Delta CP \text{ ref}$: ΔCP des durchschnittlichen CP des Referenzgens

Tabelle 3.2.1: In dieser Studie verwendete Real-Time PCR Primer

NAME	ACCESSION NUMMER	PRIMERSEQUENZ	FRAGMENT-GRÖÖE
humane iNOS	NM_000625.4	5'-CCATGGAACATCCCAAATAC-3' 5'-TCTGCATGTACTTCATGAAGG-3'	357 bp
humane Dnmt 1	NM_001379	5'-GCTTCTACTTCCTCGAGGCCTA-3' 5'-GTTGCAGTCCTCTGTGAACACTGTG-3'	332 bp
humane Dnmt 3a	AF067972	5'-GTCACACAGAAGCATATCCAGGAGTG-3' 5'-GTCCTCACTTTGCTGAACACTTGGC-3'	428 bp
humane Dnmt 3b	XM_009449	5'-AATGTGAATCCAGCCAGGAAAGGC-3' 5'-ACTGGATTACACTCCAGGAACCGT-3'	191 bp
humane Gadd45 α	NM_001924	5'-CTGCGTGCTGGTGACGAA-3' 5'-AGGGAGTAAGTACTGCTTGAGTAACTA-3'	212 bp
humane 18S	X01117	5'-CATGGTGACCACGGGTGAC-3' 5'-TCCCTTGATGTGGTAGCCG-3'	79 bp

DNA-Präparation

Die Lyse der Zellen und die Präparation der DNA erfolgten mithilfe des Qiagen Blood Cell & Culture Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Mit Ausnahme von zwei Modifizierungen wurde dem Herstellerprotokoll gefolgt. Zum einem wurden die Kerne in 10 ml G2-Puffer mit 95 µl Qiagen®Proteinase K (Qiagen, Hilden, Deutschland) und 10 µl 100 mg/ml DNase free RNase (Qiagen, Hilden, Deutschland) bei 50°C über Nacht lysiert. Zum anderen wurde die Resuspension der DNA im TE-Puffer (Qiagen, Hilden, Deutschland) durch eine einstündige Erhitzung auf 55°C, gefolgt von einer 30 minütigen Inkubation bei 94°C, verbessert. Die DNA wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert. Ein mehrmaliges Auftauen und Einfrieren wurde vermieden. Für die weiteren Versuche wurde die DNA-Konzentration im Nanodrop (peQlab, Erlangen, Deutschland) ermittelt.

Bestimmung des genomischen DNA-Methylierungs Levels

Zur Bestimmung des DNA-Methylierungsgehaltes des Genoms wurde ein neuer Assay, basierend auf dem ELISA-Prinzip, etabliert. 10 ng DNA in 50 µl 1× TBS wurden für exakt 2 Minuten bei 94°C denaturiert, direkt auf eine Microtiterplatte (Nunc, Roskilde, Dänemark) gegeben und über Nacht ,unter leichtem Schütteln bei 4°C, inkubiert. Mit 180 µl 1× TBS/1 % BSA (1 h, RT, 60 rpm) wurden unspezifische Bindungsstellen blockiert. Zur Detektion von 5-Methylcytosin wurden 50 µl 0,1 µg/µl anti-5-Methylcytosine Maus mAb (Calbiochem, Darmstadt, Deutschland oder Eurogentec, Belgien) für 1 Stunde unter Schütteln (60 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert. Auf ein fünfmaliges Waschen mit 180 µl 1× TBS/0,05 % Tween erfolgte eine einstündige Inkubation (RT, 60 rpm) mit 50 µl HRP-gekoppeltem polyklonalem Ziege-anti-Maus Immunoglobulin Antikörper (BD Bioscience, USA). Anschließend wurde fünfmal mit 180 µl 1× TBS/0,05 % Tween gewaschen. Die Detektion erfolgte mit 100 µl H₂O₂/Tetramethylbenzidin-Substratlösung (Substrate Reagent Pack von R&D Systems, USA) für 15 min, abgestoppt durch 50 µl 1 M H₂SO₄.

Im Photometer (FLUOstar OPTIMA von BMG Labtech, Offenburg, Deutschland) wurde die optische Farbdichte der Proben bei 450 nm und die Absorption der Platte bei 540 nm gemessen. Zum Ausgleich von Plattenfehlern wurde von der Absorption der Proben die Plattenabsorption abgezogen.

Bestimmung der Aktivität der DNA-Methyltransferasen

Kernextraktion

Zur Extraktion der Kerne wurde das EpiQuik™ Nuclear Extraction Kit (Epigentek, NY, USA) nach Herstellerangaben verwendet.

Dnmts Assay

Mittels des Lowry-Assays wurde die Proteinkonzentration der Kernextrakte ermittelt und 8 µg Protein wurden im Epi Quick™ DNA Methyltransferase Activity/Inhibitor Assay Kit (Epigentek, NY, USA) eingesetzt.

Dieser, auf dem ELISA-Prinzip basierende Assay erlaubt die Detektion der Aktivität der DNA-Methyltransferasen (DNMTs) und wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Normierung erfolgte auf die Aktivität der DNMTs in unbehandelten Zellen.

Aktivitätsbestimmung der DNMT 1 und DNMT 3b

Die Aktivität der DNA-Methyltransferase 1 (DNMT 1) und der DNA-Methyltransferase 3b (DNMT 3b) wurde in *in vitro* Assays bestimmt. Die Firma Epigentek (NY, USA) benutzt in ihren, auf dem ELISA-Prinzip basierenden, EpiQuik™ DNA Methyltransferase 1 activity/ inhibitor screening assay kit und EpiQuik™ DNA Methyltransferase 3 activity/inhibitor screening assay kit, rekombinante Dnmts zur Aktivitätsbestimmung. Die Assays wurden nach den Herstellerprotokollen durchgeführt und auf die mitgelieferte Positivkontrolle normiert.

Massenspektrometrische Messung

DNA-Hydrolyse

Die Hydrolyse der DNA und die massenspektrometrische Messung basieren auf einem Protokoll von Song *et al.* (2005). Genomische DNA (3 µg) wurde bei 100°C für 3 min denaturiert.

Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 45°C mit 1/10 Volumen 0,1 M Ammoniumacetat (pH 5,3) und 6 U Nuklease P1 (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Deutschland). Danach wurden 1/10 Volumen 1 M Ammoniumbicarbonat und 0,006 U Venome Phosphodiesterase I (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) zu den Proben gegeben und 2 h bei 37°C inkubiert. Zuletzt erfolgte eine Zugabe von 1,5 U Shrimp Alkaline Phosphatase (Fermentas) für 1 h bei 37°C.

Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS)

Nach der Hydrolyse der DNA wurde diese 1:2 mit 60 % Methanol/ 1 % Ameisensäure verdünnt. Die Messung der Massenspektren erfolgte im Biologisch-medizinischem Forschungszentrum (HH-Universität, Düsseldorf) am Elektrospray Quadrupole Time-of-flight Mass Spektrometer (QSTAR Pulsar I; Applied Biosystems) mit einer Nanospray Quelle (Protana, Odense, Denmark). Die Massenspektren wurden manuell ausgewertet. Die Messungen wurden freundlicherweise mit Hilfe von Frau Dr. Sabine Metzger (BMFZ, Düsseldorf) durchgeführt.

Statistische Analyse

Die Daten sind als arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben. Die Signifikanz wurde mit Hilfe des Student-T-Testes (zweiseitig, ungepaart) berechnet. Als signifikant wurden $p < 0,05$ angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Bestimmungen der Cytotoxizität

Toxizität der Methylierungsinhibitoren 5-Aza-2'-deoxycytidine und Trichostatin A

Zur Unterdrückung der DNA-Methylierung setzt man den Zellkulturen die Methylierungsinhibitoren 5-Aza-2'-deoxycytidine (Aza) und Trichostatin A (TSA) zu. Eine gute Suppression der Methylierung erreicht man durch eine zweistufige Vorgehensweise. In einem ersten Schritt wurden die Zellen für zwei Tage in der Anwesenheit von Aza (hier: 5 μ M/ 2,5 μ M) kultiviert, gefolgt von einer 48stündigen Behandlung mit beiden Methylierungsinhibitoren (Aza; hier 5 μ M/ 2,5 μ M, TSA; hier 10 nM/ 20 nM). Üblicherweise wird Aza täglich ersetzt, obwohl seine Halbwertszeit 12 h beträgt (Christmann 2002). Einen signifikanten Unterschied zwischen eines täglichen und eines zwölfstündigen Wechsels konnten wir nicht feststellen (*Vorversuch, Daten hier nicht gezeigt*), daher ersetzten wir Aza alle 24 h. Mittels einer Neutralrotfärbung wurde die Zellproliferation nach dem –oben beschriebenen- zweistufigen Vorgehen bestimmt, da sowohl Aza (Oka *et al.* 2005) als auch TSA (Wu *et al.* 2010) cytotoxische Effekte zugeschrieben werden.

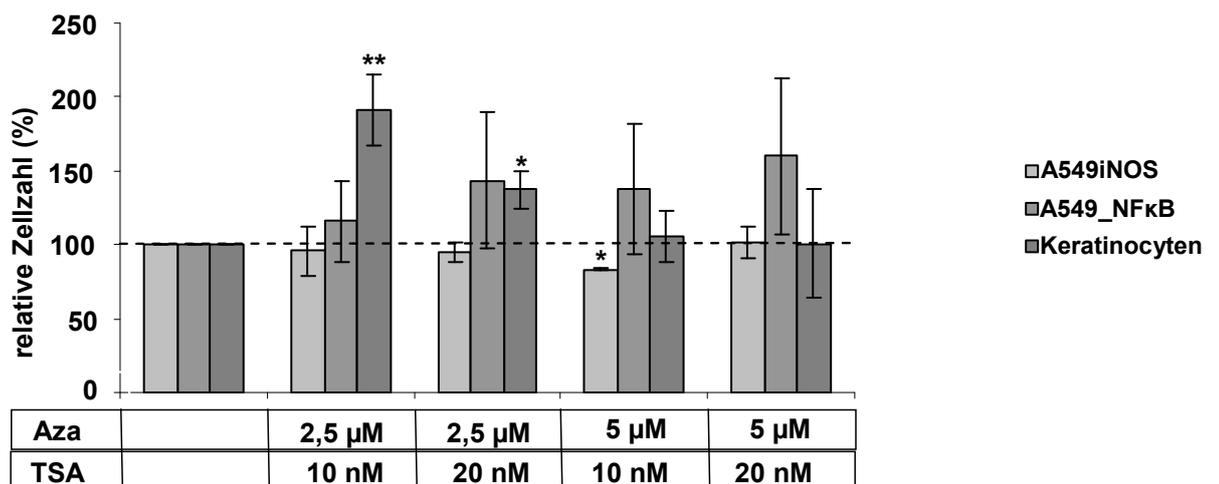


Abb. 4.1: Einfluss der Methylierungsinhibitoren (Aza und TSA) auf die Zellproliferation

10×10^4 Zellen wurden ausgesät und 24 h später mit Aza (2,5 μ M oder 5 μ M) für 48h behandelt. Es folgte eine 48 stündige Inkubation mit Aza (2,5 μ M; 5 μ M) und TSA (10 nM; 20 nM), bevor die Zellproliferation mittels Neutralrotfärbung ermittelt wurde. Es sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3-5 unabhängigen Experimenten angegeben (* $p \geq 0,05$, ** $p \geq 0,001$). Für die nachfolgenden Experimente wurde eine Kombination aus 5 μ M Aza und 20 nM TSA verwendet.

Primäre humane Keratinocyten zeigen eine Proliferationssteigerung bei der Behandlung mit 2,5 μM Aza (10 nM TSA/20 nM TSA) (**Abb. 4.1**). Ein vermindertes Zellwachstum findet man hingegen bei einer Kombination von 5 μM Aza und 10 nM TSA auf A549iNOS (**Abb. 4.1**). Bei allen untersuchten Zellen sind keine signifikanten Veränderungen in der Zellproliferation, im Vergleich zu unbehandelten Zellen, bei einer Kombination von 5 μM Aza und 20 nM TSA (**Abb. 4.1**) sichtbar. Eine weitere Überprüfung fand mit einer kombinierten Höchst/Propidiumiodid-Färbung statt.

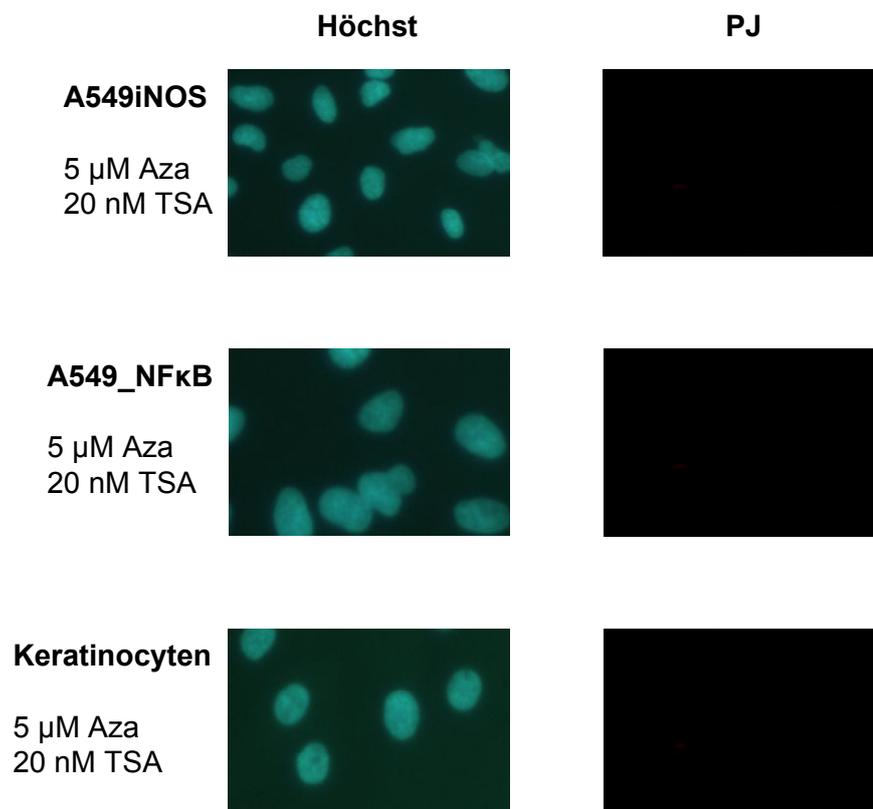


Abb. 4.2: Höchst/PI-Färbung nach Behandlung mit 5 μM Aza und 20 nMTSA

10×10^4 Zellen wurden ausgesät und 24 h später mit Aza (2,5 μM oder 5 μM) für 48h behandelt. Es folgte eine 48 stündige Inkubation mit Aza (2,5 μM ; 5 μM) und TSA (10 nM; 20 nM), bevor die Zellen mit Höchst/PJ gefärbt wurden. Gezeigt sind repräsentative Bilder von drei Versuchen. Keine PJ-Färbung deutet darauf hin, dass keine Nekrose vorliegt.

Die Färbung (**Abb. 4.2**) zeigt, dass es keine physiologischen Zellveränderungen in der Anwesenheit von 5 μM Aza und 20 nM TSA gibt. Daher wurden diese Konzentrationen für die weiteren Versuche verwendet.

Toxizität des Stickstoffmonoxid-Donors DetaNO

Wie schon einleitend erwähnt, vermutet man einen Effekt von Stickstoffmonoxid (NO) auf die DNA-Methylierung (Hmadcha *et al.* 1999). Aufgrund dessen wird in dieser Arbeit auch der Einfluss von NO, mittels des exogenen NO-Donors DetaNO, untersucht. *In vitro* Studien mit NO-Donoren an humanen Keratinocyten haben gezeigt, dass NO einen biphasischen Effekt auf die Proliferation und Differenzierung hat: während niedrige NO-Donor-Konzentrationen ($< 250 \mu\text{M}$) eine gesteigerte Proliferationsrate bewirken, führen hohe NO-Konzentrationen ($\geq 250 \mu\text{M}$) zur terminalen Zelldifferenzierung (Krischel *et al.* 1998). In Vorversuchen wurde ein tägliches Zusetzen von DetaNO, trotz seiner achtstündigen Halbwertszeit, als optimal ermittelt (*Daten hier nicht gezeigt*).

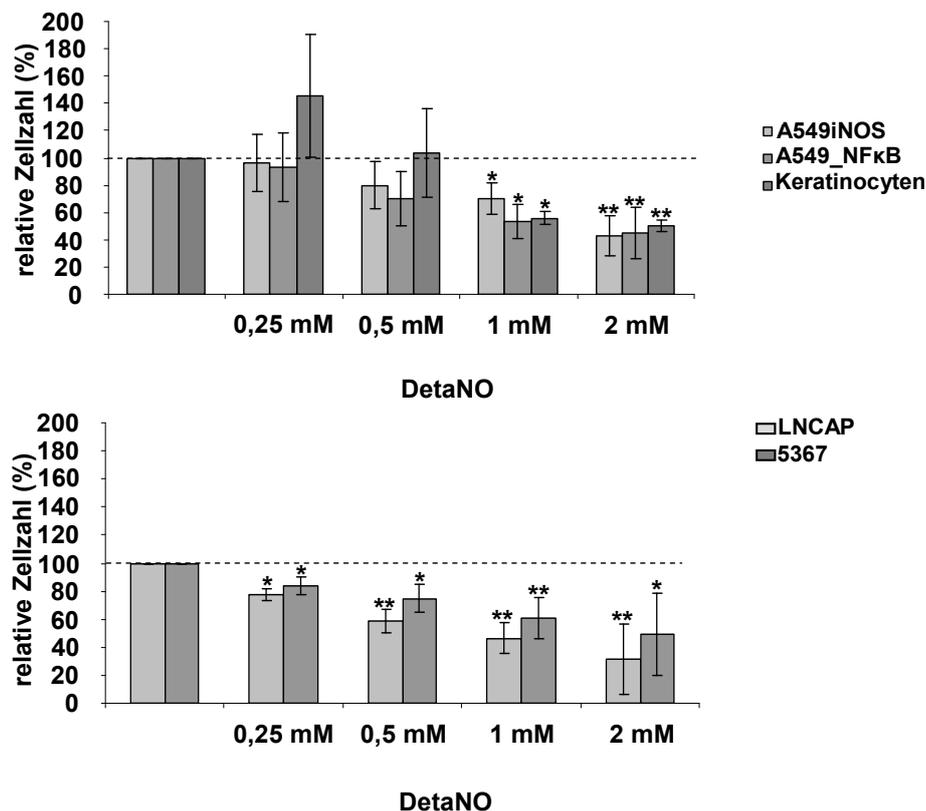


Abb. 4.3: Einfluss von NO auf die Zellproliferation

Die Zellen wurden in einer Dichte von 10×10^4 Zellen ausgesät und 24 h später für 48 h mit unterschiedlichen Konzentrationen (0,25 mM, 0,5 mM, 1 mM, 2 mM) des NO-Donors DetaNO behandelt, wobei DetaNO, aufgrund seiner Halbwertszeit von 8 h, alle 24 h zugegeben wurde. Die Proliferation wird auf die unbehandelten Zellen normiert. Aus drei unabhängigen Versuchen stammen die Mittelwerte und Standardabweichungen (* $p \geq 0,05$, ** $p \geq 0,005$). Für die weiteren Experimente wurde eine Konzentration von 1 mM DetaNO verwendet.

A549iNOS, A549_NFκB und primäre humane Keratinocyten werden durch 1 mM und 2 mM DetaNO in ihrem Wachstum gehemmt, wobei 2 mM DetaNO die Zellproliferation –im Vergleich zu unbehandelten Zellen- um die Hälfte senkt (**Abb. 4.3**). Auf DetaNO reagieren LNCAP und 5367 sensibler und zeigen schon bei einer Konzentration von 0,25 mM DetaNO eine verringerte Zellproliferation (**Abb. 4.3**).

Um zwischen einem DetaNO-medierten Wachstumsstopp oder einer cytotoxischen Wirkung zu unterscheiden wurde eine Färbung mit Höchst und Propidiumiodid durchgeführt. Ein leicht toxischer Effekt von 1 mM DetaNO auf die Zellen, ist durch Chromatinkondensationen im Zellkern sichtbar (**Abb. 4.4**). Da diese Konzentration den physiologischen Bedingungen entspricht (Kröncke and Carlberg 2000), wurde sie für die weiteren Versuche verwendet.

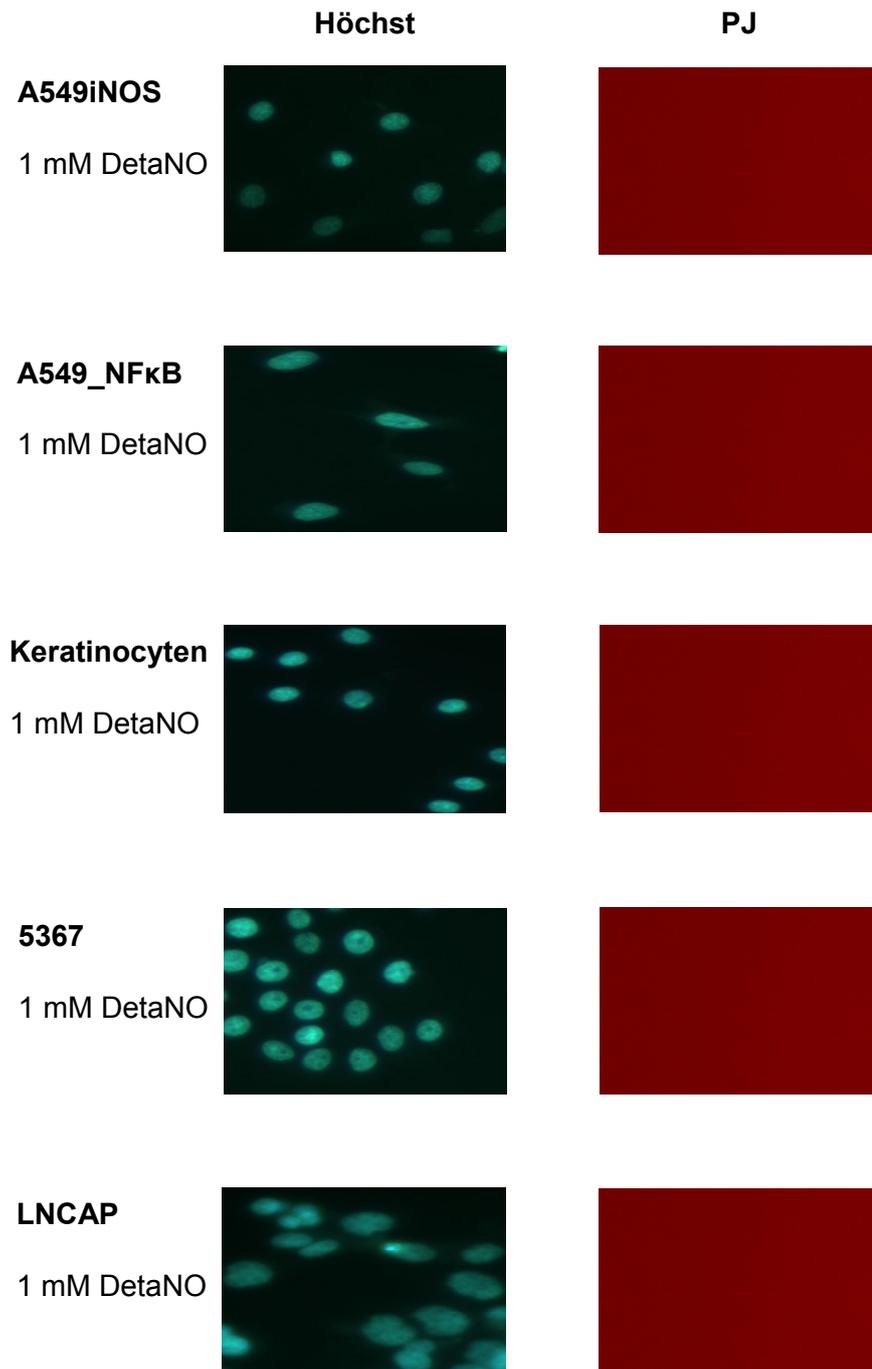


Abb. 4.4: Höchst/PI-Färbung nach Behandlung mit 1mM DetaNO

10×10^4 Zellen wurden ausgesät und 24 h später für 48 h mit 1 mM DetaNO behandelt, wobei DetaNO, aufgrund seiner Halbwertszeit von 8 h, alle 24 h zugegeben wurde, bevor die Zellen mit Höchst/PJ angefärbt wurden. Die gezeigten Abbildungen sind repräsentativ für drei Versuche.

4.2. DNA-Methylierung und Stickstoffmonoxid:

Einfluss auf die Aktivität der iNOS

Die Promotoraktivität der iNOS

Um die Aktivität des iNOS Promotors zu untersuchen, wurden A549 Zellen verwendet, die mit einem 16-kb Fragment der 5'-Sequenz des humanen iNOS Gen vor Luciferase stabil transfiziert sind (s. *Anhang*).

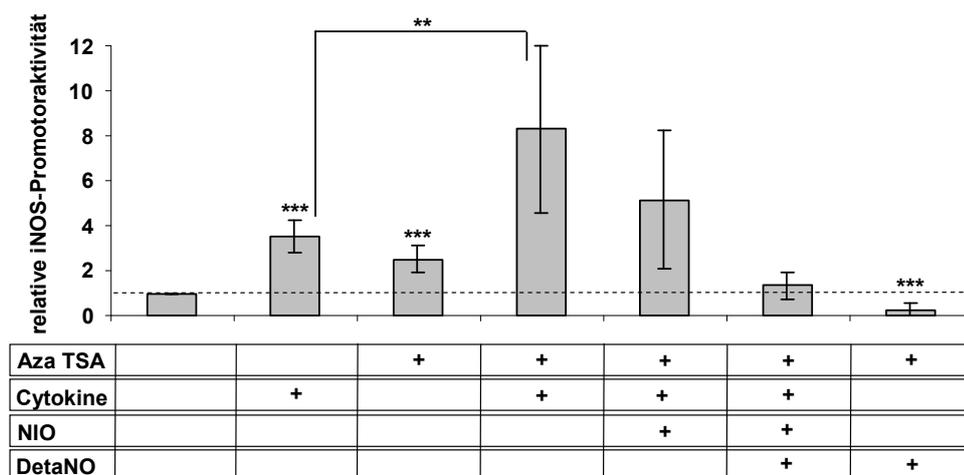


Abb. 4.5: Einfluss von Methylierungsinhibitoren und NO auf die iNOS-Promotoraktivität

A549iNOS wurden in einer Dichte von 50×10^4 Zellen auf eine 6-Well Kulturschale ausgesät. Nach einer 48stündigen Inkubation mit $5 \mu\text{M}$ Aza erfolgte eine Behandlung mit $5 \mu\text{M}$ Aza und 20 nM TSA für zwei Tage. Anschließend wurden die Zellen 6 h mit einem Cytokinmix (100 U/ml IFN- γ , 200 U/ml IL- 1β , 500 U/ml TNF- α) aktiviert. Um den Effekt von NO auf die Promotoraktivität der iNOS zu untersuchen, wurden die Zellen für weitere 48 h mit 1 mM DetaNO behandelt. Daraufhin wurden die Zellen für 6 h aktiviert (100 U/ml IFN- γ , 200 U/ml IL- 1β , 500 U/ml TNF- α). Aza und DetaNO wurden alle 24 h zu den Zellen gegeben. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten. (** $p \geq 0,005$, *** $p \geq 0,001$) Nach Inhibition der Methylierung und Aktivierung mit proinflammatorischen Cytokinen erhöht sich die Promotoraktivität der iNOS auf $8,30 \pm 3,72$. Eine Zugabe von DetaNO blockiert diesen Effekt.

Die iNOS wird in einer Entzündungsreaktion exprimiert, daher werden die Zellen mit proinflammatorischen Cytokinen behandelt (Liew *et al.* 1991). In Vorversuchen wurde die optimale Konzentration an proinflammatorischen Cytokinen (IL- 1β 200 U/ml , TNF- α 500 U/ml , IFN- γ 100 U/ml) als auch die Inkubationszeit von 6 h bestimmt (*Daten hier nicht gezeigt*), welche zu einer $3,54 (\pm 0,71)$ fachen Aktivierung der Promotoraktivität führt (**Abb. 4.5**). Eine Suppression der DNA-Methylierung führt zu einem geringen Anstieg der Promotoraktivität ($2,5 \times \pm 0,61$),

was in Anwesenheit von proinflammatorischen Reizen auf das $8,30 \pm 3,72$ fache gesteigert werden kann (**Abb. 4.5**). Die Induzierbarkeit des iNOS-Promotors durch Cytokine wird durch die Inhibition der Methylierung nicht verhindert (Chan *et al.*, 2005), sondern im Vergleich zur ausschließlichen Aktivierung mit proinflammatorischen Cytokinen, signifikant gesteigert (**Abb. 4.5**). Wird hingegen exogen Stickstoffmonoxid (1 mM DetaNO) zu den Zellen gegeben, sinkt die Aktivität des iNOS-Promotors auf bzw. unter die basalen Werte (**Abb. 4.5**). Es zeigt sich ein deutlicher Einfluss der DNA-Methylierung sowie von Stickstoffmonoxid auf den iNOS-Promotor, den wir im Weiteren genauer untersuchten.

Einfluss auf NFκB Bindungsstellen

Die iNOS-Promotorsequenz, mit welcher die Zelllinie A549 transfiziert wurde, enthält mehrere cytokininduzierbare Elemente. Es finden sich auch sieben NFκB Bindungsstellen in dieser Sequenz (*siehe Anhang, 6.1*), da NFκB eine essentielle für die Regulation der iNOS ist (Kleinert *et al.* 2000), wurde diese im Weiteren untersucht. Dazu wurden humane Lungenepithelzellen A549, welche mit mehreren Kopien der NFκB Bindungsstelle vor Luciferase stabil transfiziert sind (*siehe Anhang, 6.1*), verwendet.

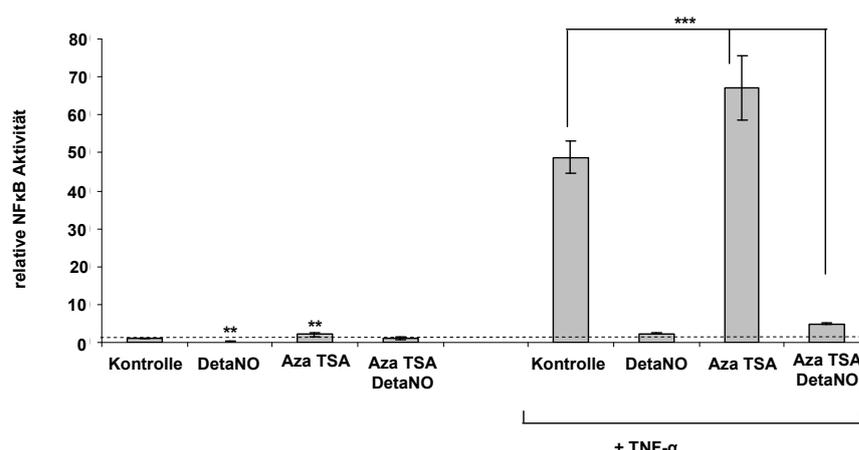


Abb. 4.6: Einfluss von Methylierungsinhibitoren und NO auf die Aktivierbarkeit von NFκB

A549 Zellen wurden mit mehreren Kopien der NFκB Bindungsstellen stabil transfiziert. Die Zellen wurden in einer Dichte von 50×10^4 Zellen auf eine 6-Well Kulturschale ausgesät. Auf eine Inkubation von 48 h mit $5 \mu\text{M}$ Aza erfolgte eine Behandlung mit $5 \mu\text{M}$ Aza und 20 nM TSA für zwei Tage. Um den Effekt von NO zu untersuchen, wurden die Zellen für weitere 48 h mit 1 mM DetaNO behandelt. Daraufhin wurden die Zellen für 8 h mit 500 U/ml TNF-α aktiviert. Aza und DetaNO wurden alle 24 h zu den Zellen gegeben. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten. (** $p \geq 0,005$, *** $p \geq 0,001$). Stickstoffmonoxid verhindert die Aktivierbarkeit von NFκB Bindungsstellen.

Die höchste Aktivität der NFκB Bindestellen zeigt sich bei einer achtstündigen Inkubation (*siehe Anhang, Abb. 6.2.1*) mit 500 U/ml TNF-α mit einer 45,24 (± 10,13)fachen Steigerung (**Abb. 4.6**). Bei einer Blockade der DNA-Methylierung erreicht man eine Zunahme der Aktivität um das 2,05 (± 0,64)fache, welche durch eine Behandlung mit TNF-α signifikant gesteigert (61,88× ± 16,94) werden kann (**Abb. 4.6**). Bei gleichzeitige Zugabe von exogenem Stickstoffmonoxid (5 μM Aza, 20 nM TSA, 1 mM DetaNO) sinkt die Aktivität wieder auf das 4,94 (± 0,195)fache (**Abb. 4.6**).

Die alleinige Anwesenheit von Stickstoffmonoxid verhindert eine Bindung an die NFκB Bindungsstelle und senkt somit die Aktivität (**Abb. 4.6**).

Wir konnten hier zeigen, dass eine Blockierung der DNA-Methylierung die Zugänglichkeit der NFκB Bindungsstelle für die Bindung von NFκB erhöht, während Stickstoffmonoxid diese reduziert.

Die mRNA-Expression und die Enzymaktivität der iNOS

Im nächsten Schritt wurde die mRNA-Expression der iNOS unter oben beschriebenen Bedingungen in den Zelllinien A549iNOS und A549_NFκB, mittels Real-Time PCR bestimmt.

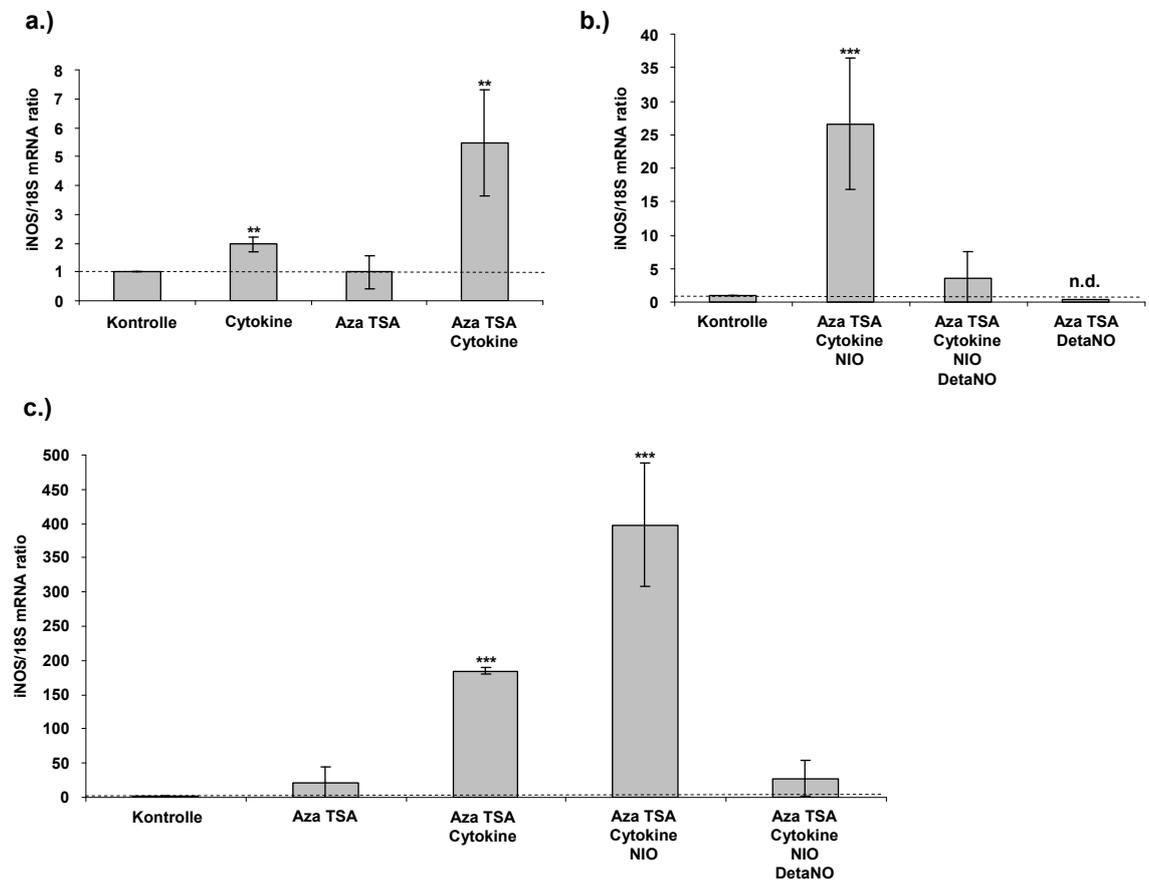


Abb. 4.7: Gleichzeitige Inhibition der Methylierung und der NO-Produktion führt zu einer stark erhöhten iNOS mRNA-Expression

Die mRNA-Expression der iNOS wurde mittels Real-Time PCR detektiert. A549iNOS (a.,b) und A549_NFκB (c.) wurden in einer Zelldichte von 50×10^4 Zellen pro Well in eine 6-Well Zellkulturplatte ausgesät. Nach einer Inhibition der Methylierung (48 h 5 μ M Aza; 48 h 5 μ M Aza, 20 nM TSA) erfolgte eine Behandlung mit Cytokinen (100 U/ml IFN- γ , 200 U/ml IL-1 β , 500 U/ml TNF- α), einem NO-Inhibitor (250 μ M NIO) und einem NO-Donor (1 mM DetaNO) für weitere 48 h. In obigen Abbildungen sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (** $p \geq 0,005$, *** $p \geq 0,001$; n.d. nicht detektierbar). Die iNOS mRNA-Genexpression wird bei Cytokinaktivierung und gleichzeitiger Inhibition der Methylierung erhöht, welches sich durch Blockade der NO-Synthese auf $26,61 \pm 9,85$ (A549iNOS) bzw. $398,10 \pm 89,57$ (A549_NFκB) erhöhen lässt.

Parallel wurden die Veränderungen auf Enzymaktivitätsebene mittels der Messung der NO-Verbindungen durch die Gas-Chemilumineszenz (siehe Anhang, 6.3) untersucht.

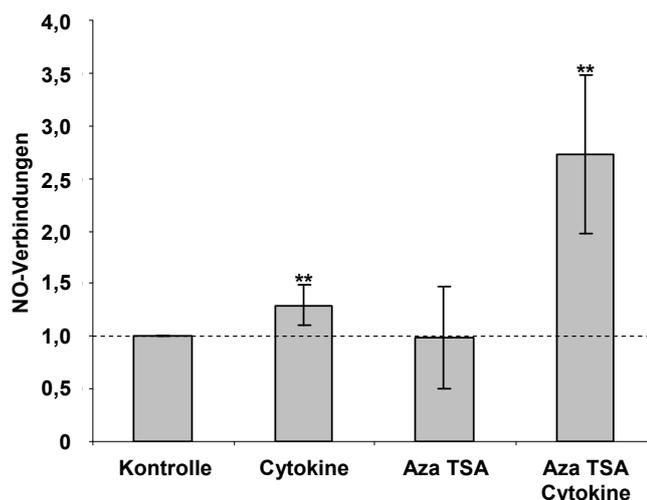


Abb. 4.8: NO-Freisetzung nach Blockierung der Methylierung und unter Entzündungsbedingungen

Die Bildung von NO-Verbindungen wurde mittel der Gas-Chemilumineszenz bestimmt und normiert auf die unbehandelten Zellen. A549iNOS wurden für 72 h mit 5 μ M Aza-CdR behandelt und anschließend zusätzlich für 24 h mit 20 nM TSA. Danach wurden die Zellen für 48 h mit proinflammatorischen Cytokinen (IL-1 β 200 U/ml, TNF- α 500 U/ml, IFN- γ 100 U/ml) behandelt. Der Versuch erfolgte in nitratfreiem Medium. In obiger Abbildung sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten gezeigt (** $p \geq 0,005$) (Daten aus meiner Diplomarbeit „DNA-Methylierung und die Kontrolle der iNOS-Expression in humanen Zellen“ angefertigt in der Forschungsgruppe Immunbiologie, 2006)

Bei einer sechsstündigen Behandlung mit proinflammatorischen Cytokinen zeigte sich die höchste iNOS-Promotoraktivität, wohingegen eine maximale mRNA-Expression der iNOS erst nach 48stündiger Anwesenheit von Entzündungsreizen erreicht wurde (Vorversuch, Daten hier nicht gezeigt). Dabei steigt die mRNA-Expression auf das 1,95 (\pm 0,24)fache (**Abb. 4.7**) und die Anzahl der NO-Verbindungen auf das 1,29 (\pm 0,19)fache im Vergleich zu unbehandelten Zellen (**Abb. 4.8**). Eine Blockierung der Methylierung resultiert jedoch in keiner Veränderung weder in der mRNA-Expression (**Abb. 4.7**) noch in der Enzymaktivität (**Abb. 4.8**). Eine gleichzeitige proinflammatorische Aktivierung steigert die iNOS-Genexpression auf das 5,45fache (\pm 1,48; A549iNOS) bzw. 184,92fache (\pm 4,98; A549_NF κ B) (**Abb. 4.7**) als auch die Anzahl an NO-Verbindungen ($2,73 \times \pm 0,75$) (**Abb. 4.8**). Bei einer Inhibition der endogenen NO-Produktion durch NIO zeigen sich eine drastische Steigerung der iNOS mRNA-Expression auf 26,61 \times (\pm 9,85; A549iNOS) bzw. 398,10 \times (\pm 89,57; A549_NF κ B) im Vergleich zu unbehandelten Zellen (**Abb. 4.7**).

Eine Zugabe von Stickstoffmonoxid (1 mM DetaNO) führt zu einer fast vollständigen Inhibierung der Genexpression (**Abb. 4.7**). Wir konnten hier zeigen, dass sowohl endogenes als auch exogenes Stickstoffmonoxid eine regulatorische Wirkung auf die iNOS, vermutlich über die Methylierung der DNA, aufweist.

4.3. DNA-Methylierung und Stickstoffmonoxid:

Einfluss auf den Methylierungsstatus

Etablierung einer massenspektrometrischen Messung von 5-Methylcytosin

Bis zu diesem Zeitpunkt haben wir indirekt durch Inhibition der Methylierung mit 5-Aza-2'-deoxycytidine und Trichostatin A den Einfluss der Methylierung untersucht. Uns interessierte nun die direkte Messung der Methylierung des gesamten Genoms. Es besteht die Möglichkeit einzelne repräsentative Elemente der DNA mittels Bisulfit-PCR (Yang *et al.* 2004) oder der Sequenzierung bisulfitumgewandelter DNA (Eads *et al.* 2000, Ibrahim *et al.* 2006) zu untersuchen, um auf den DNA-Methylierungsgrades des gesamten Genoms zu schließen. In der Literatur gibt es auch einige direkte Methoden zur Detektion des DNA-Methylierungsstatus des Genoms, welche auf dem enzymatischen oder chemischen Loslösen von Desoxynukleotiden oder Basen aus dem Genom, gefolgt von einer chromatographischen Auftrennung und Detektion, basieren. Diese Methoden umfassen hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (Betz *et al.* 2004), Dünnschichtchromatographie (Dahl and Guldborg 2003), Kapillarelektrophorese (Stach *et al.* 2003) oder Flüssigkeitschromatographie/Massenspektrometrie (Song *et al.* 2005). Aufbauend auf der Veröffentlichung von Song *et al.* (2005) haben wir eine Methode zur Bestimmung des globalen Methylierungsstatus etabliert. Nach der Denaturierung der DNA (3 min, 100°C) folgt eine enzymatische Hydrolyse der DNA. Die Desoxynukleotide werden in der Elektrospray-Massenspektrometrie aufgetrennt und detektiert. Zur Standardisierung wird Cytosin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) und 5-Methylcytosin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) eingesetzt.

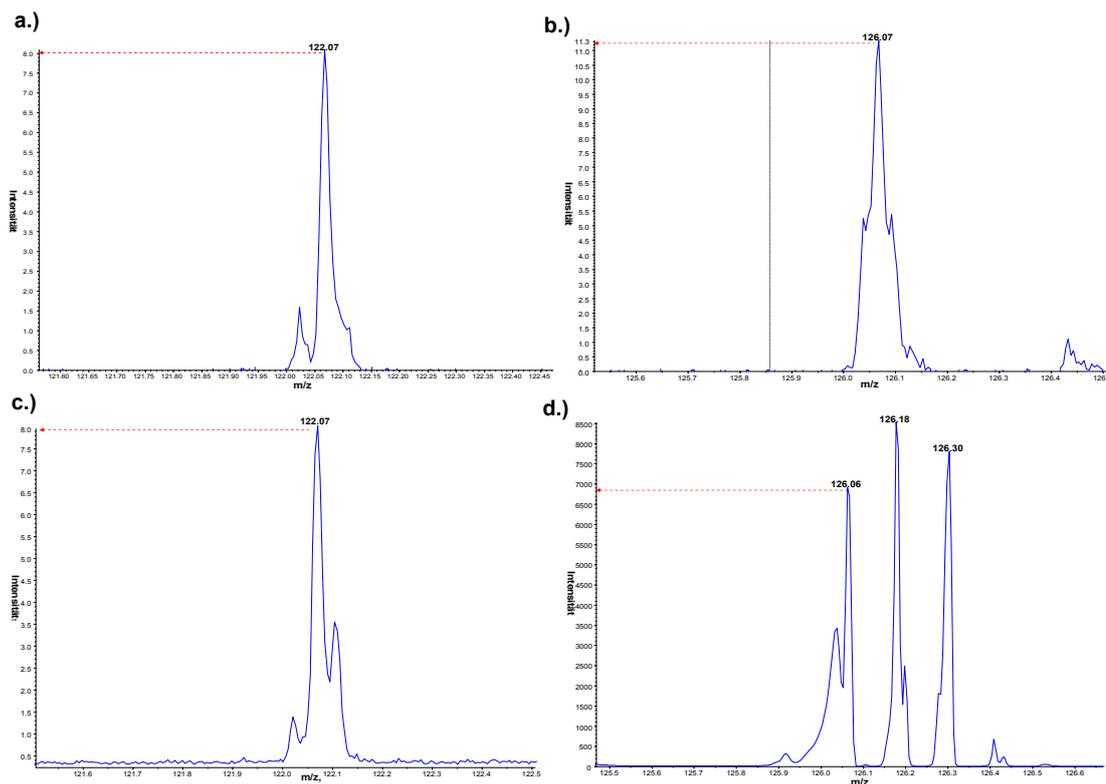


Abb. 4.9: Evaluierung der ESI-MC zur Feststellung der Methylierung

a./b) Spektrogramme von Cytosin (1 mM, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) c./d.) Spektrogramme von 5-Methylcytosin (1 mM, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland). Die gezeigten Spektrogramme sind repräsentativ für drei Versuche.

Die Masse $[+H]^+$ von 5-Methylcytosin liegt bei m/z 126,1, während sie bei Cytosin m/z 122,1 beträgt (Song *et al.* 2005). 5-Methylcytosin zeigt eine Intensität von 6700 im Vergleich zu Cytosin, was eine Intensität von 11,3 bei einer Masse von 126,1 zeigt (**Abb. 4.9**). Auffallend sind unterschiedliche Massen von 5-Methylcytosin bei m/z 126,08, 126,18 und 126,30 was auf eine Instabilität des Nukleotids hinweist (**Abb. 4.9**). Dies wird dadurch gestützt das im Spektrogramm von 5-Methylcytosin auch bei einer Masse von 122,1 eine Intensität von 8,0 angezeigt wird (**Abb. 4.9**). Diese Instabilität ist ein Grund für die Probleme bei der Quantifikation des Methylierungsgrades. Daher wurde im nächsten Schritt ein DNA-ELISA zur Quantifikation der Methylierung des Genoms etabliert.

Etablierung eines DNA-ELISA zur Quantifizierung des globalen Methylierungsstatus

In Ergänzung zu den chromatographischen Methoden gibt es noch andere Möglichkeiten wie den SssI Annahmeassay, den Chloracetaldehyde Assay, immunchemische Methoden und noch andere Techniken (Yang *et al.* 2004), den Methylierungsgrad des Genoms zu messen. Diese Methoden beruhen auf dem spezifischen Markieren und Detektieren von 5-Methylcytosin. Im Jahr 1990 wurde eine Publikation veröffentlicht (Reynaud and Niveleau 1990), welche erstmals die Generation eines Antikörpers gegen 5-Methylcytosin und den Einsatz dieses Antikörpers in einem Enzyme-linked Immunoassay (ELISA) zur Ermittlung der globalen DNA-Methylierung, beschrieb. Auf Basis dieser Publikation haben wir einen DNA-ELISA etabliert, welcher die Quantifizierung des Methylierungsgehaltes des Genoms erlaubt. Zuerst wurde die Menge an DNA bestimmt, die benötigt wurde. Dazu wurden unterschiedliche Mengen an DNA (0,5 ng, 1 ng, 5 ng, 10 ng, 25 ng, 50 ng) von A549iNOS und der monoklonale Maus-anti-5-Methylcytosin Antikörper von Eurogentec (Belgien) benutzt. Eine Korrelation zwischen Absorption und DNA-Konzentration ist sichtbar. Als Mittelweg zwischen niedriger DNA-Konzentration und hoher Absorption wurde für die folgenden Versuche eine DNA-Menge von 10 ng verwendet (**Abb. 4.10,a**). Im Weiteren wurde der monoklonale Maus-anti-5-Methylcytosin Antikörper von Calbiochem (USA) verwendet, da er eine bessere Stabilität und eine höhere Spezifität (*Daten hier nicht gezeigt*) zeigte. Der Denaturierungsschritt (94°C) ist essentiell um die DNA an die Microtiterplatte zu binden und die Offenheit der DNA für die Bindung des Antikörpers zu erhöhen. Ein Problem besteht darin, dass ein Aufheizen der DNA diese zerstören kann. Daher wurden 10 ng der DNA von A549iNOS für 1 min, 2 min, 4 min und 6 min auf 94° erhitzt und es zeigt sich das bei einem zweiminütigen Denaturieren die niedrigste Standardabweichung zu beobachten ist (**Abb. 4.10,b**). Für die weiteren Experimente wurde 10 ng DNA bei 94°C für 2 min denaturiert und auf eine Microtiterplatte (16h, 4°C) gebunden. Der Detektion von methyliertem CpG mit einem anti-5-Methylcytosin Maus monoclonalem Antikörper folgte dessen Markierung

mit einem HRP-gekoppelten Polyklonaler Ziege-anti-Maus Immunglobulin Antikörper. Durch eine Farbreaktion mit einer H_2O_2 /Tetramethylbenzidin-Substratlösung lässt sich die Menge an methyliertem CpG im Genom quantifizieren.

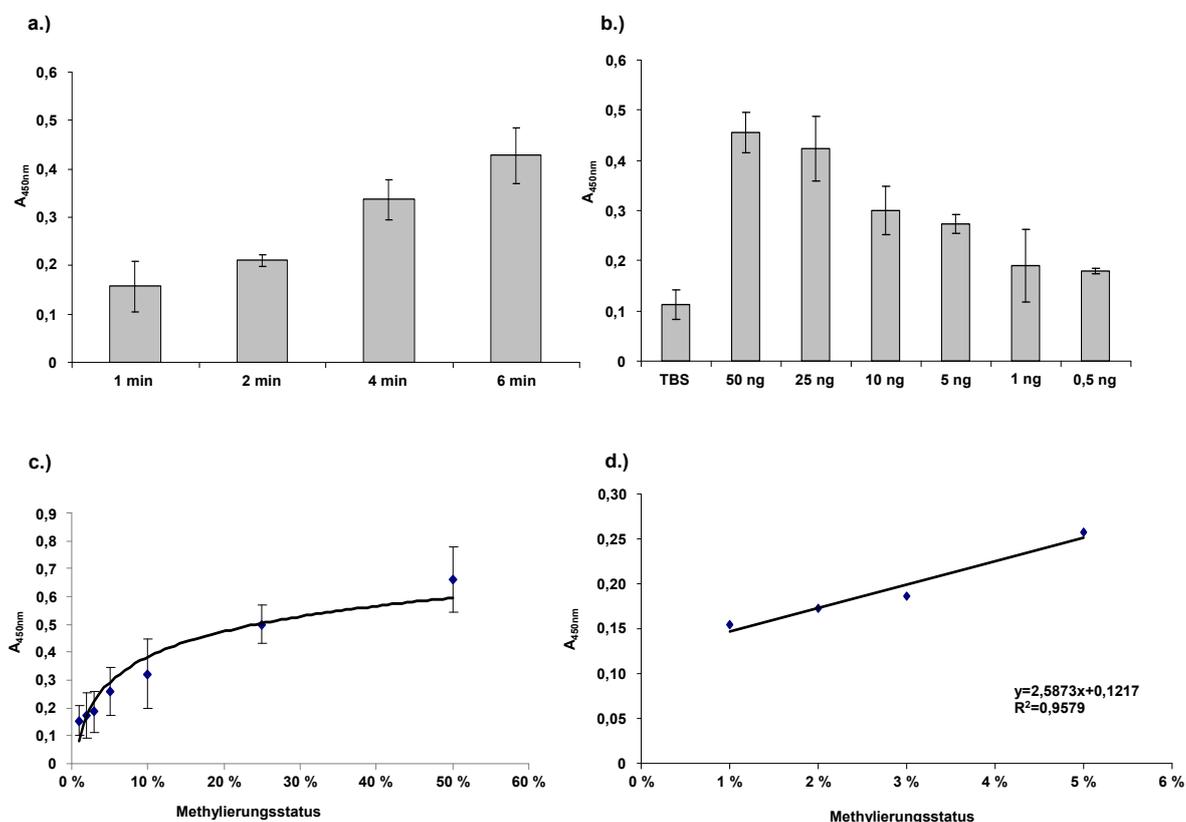


Abb. 4.10: Etablierung eines DNA-ELISA zur Quantifikation des genomischen Methylierungsstatus

(a.) DNA von A549iNOS wurde für 1 min, 2 min, 4 min und 6 min denaturiert. (b.) In den Konzentrationen von 0,5 ng, 1 ng, 5 ng, 10 ng, 25 ng und 50 ng wurde die DNA von A549iNOS für 2 min denaturiert und im ELISA gemessen, (c./d.) Aus humaner methylierter und nicht-methylierter DNA (Zymo Research) wurden unterschiedliche Methylierungsgrade (0 %, 1 %, 2 %, 3 %, 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 100 %) gemischt und in einer Konzentration von 10 ng im DNA-ELISA eingesetzt. Die Absorption bei 450 nm wurde gemessen und gegen den Methylierungsgrad aufgetragen. Alle Daten repräsentieren den Mittelwert \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten. Eine Linearität besteht zwischen 1 % bis 10 %.

Eine Standardkurve wurde aus nicht methylierter –aus einer hypomethylierten Zelllinie gewonnene- DNA (0 %) und vollständig methylierter -mittels MssI enzymatisch methyliert- DNA (100 %) zusammengestellt (**Abb. 4.10 c/d**). Eine absolute Bestimmung des Methylierungsgrades ist daher nicht möglich, da es jedoch –aus unserer Kenntnis- keine Alternative gibt, wurde der Methylierungsgrad so definiert.

Eine lineare Korrelation besteht zwischen 1 % bis zu 10 % (**Abb. 4.10 c/d**), welches auch dem Methylierungsgrad des humanen Genoms entspricht. Eine Methylierung unter 1 % kann nicht quantifiziert werden (**Abb. 4.10 c/d**).

Bestimmung der Veränderungen des Methylierungsstatus in A549iNOS

Nachdem zwei Methoden entwickelt wurden, um Aussagen über die Veränderungen des Methylierungslevels des Genoms machen zu können, wurden A549iNOS mit Methylierungsinhibitoren und exogenem Stickstoffmonoxid behandelt und mittels LC-MS und DNA-ELISA untersucht.

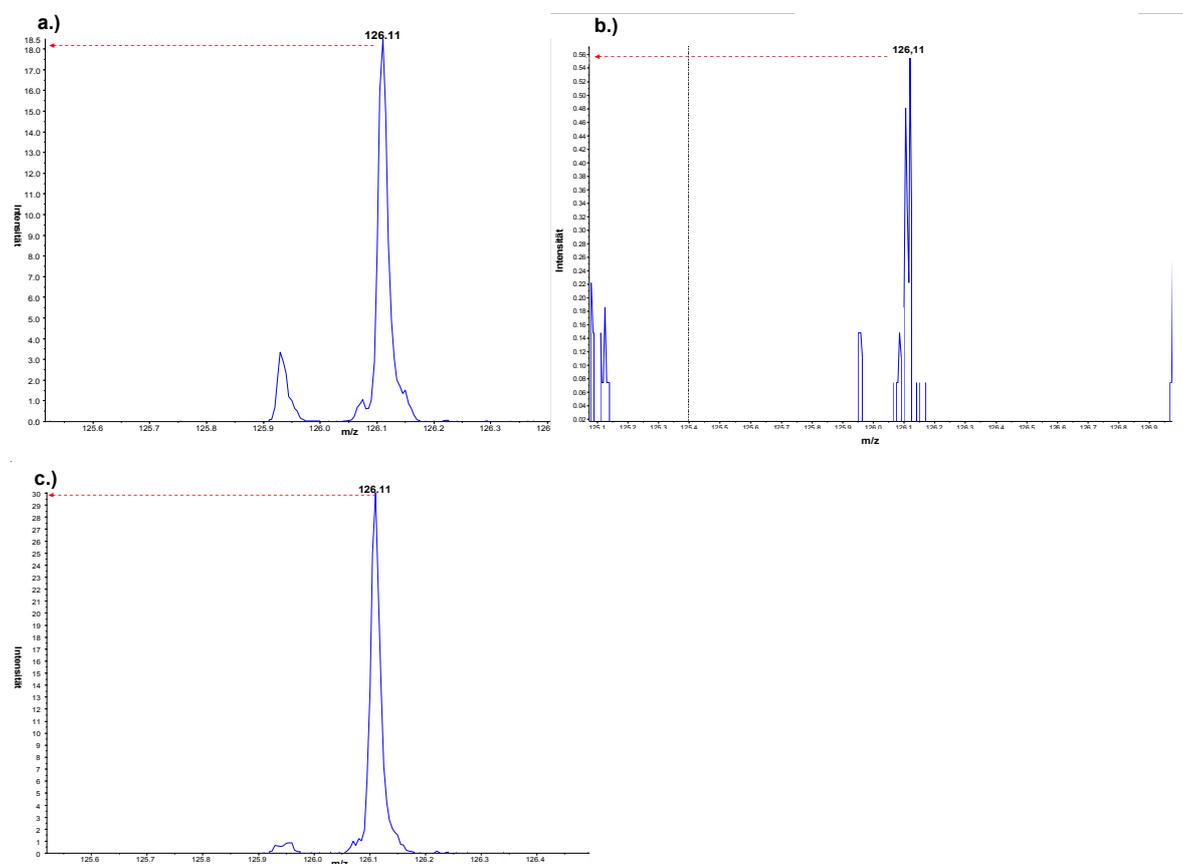


Abb. 4.11: Messung des DNA-Methylierungsstatus mittels ESI-MS

A549iNOS wurden in einer Zelldichte von 50×10^4 Zellen in eine 10 cm-Zellkulturplatte ausgesät. Neben den unbehandelten Zellen (a.), wurden Zellen nach einer Inhibition der Methylierung (48 h 5 μM Aza; 48 h 5 μM Aza, 20 nM TSA) (b.) und Zellen mit einer zusätzlichen Behandlung mit 1 mM DetaNO (c.), gezeigt. Die gezeigten Spektrogramme sind repräsentativ für drei Versuche.

Die Inhibition der Methylierung wird durch Stickstoffmonoxid aufgehoben

Eine Inhibition der Methylierung zeigt eine deutliche Abnahme an 5-Methylcytosin im Genom (**Abb. 4.11**). Durch Zugabe von Stickstoffmonoxid lässt sich der Gehalt an 5-Methylcytosin wieder steigern (**Abb. 4.11**). Die Quantifizierung erfolgte mittels DNA-ELISA.

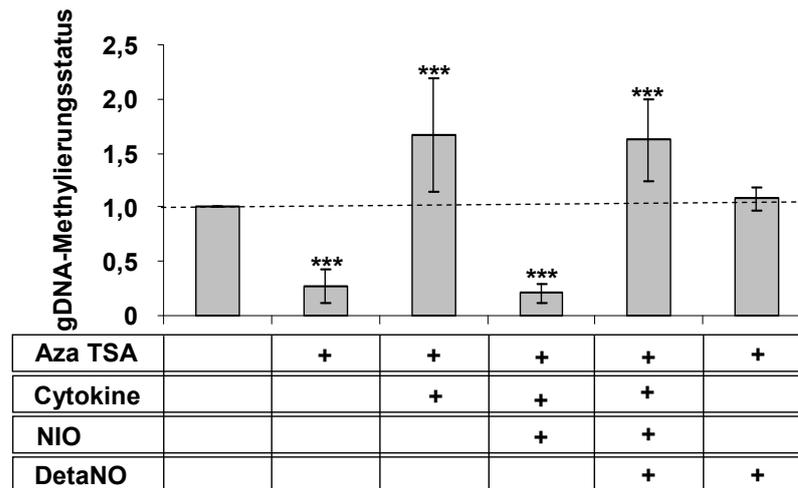


Abb. 4.12: Endogenes und exogenes Stickstoffmonoxid führen zu einer Remethylierung des Genoms

Die Ermittlung des DNA-Methylierungsstatus des gesamten Genoms erfolgte mittels eines DNA-ELISAs. A549iNOS wurden in einer Zelldichte von 50×10^4 Zellen in eine 10 cm-Zellkulturplatte ausgesät. Nach einer Inhibition der Methylierung (48 h 5 μ M Aza; 48 h 5 μ M Aza, 20 nM TSA) erfolgte eine Behandlung mit Cytokinen (100 U/ml IFN- γ , 200 U/ml IL-1 β , 500 U/ml TNF- α), einem NO-Inhibitor (250 μ M NIO) und einem NO-Donor (1 mM DetaNO) für weitere 48h. In obigen Abbildungen sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten abgebildet. (***) $p \geq 0,001$) NO führt zu einer Remethylierung des Genoms.

Die Blockierung der DNA-Methylierung reduziert effizient den globale DNA-Methylierungsstatus auf die Hälfte ($0,57 \pm 0,445$) (**Abb. 4.12**). Unter einer Entzündungssituation (48 h) und damit einhergehender NO-Produktion erfolgt eine Remethylierung des gesamten Genoms (**Abb. 4.12**). Verhindert man die NO-Produktion durch die Anwesenheit von NIO, vermindert sich der DNA-Methylierungsgrad auf das 0,25 ($\pm 0,081$)fache (**Abb. 4.12**) im Bezug zum basalen Status. Wird hingegen ein exogener Stickstoffmonoxid-Donor (1 mM DetaNO) zu den Zellen gegeben, kommt es zu einer Remethylierung des gesamten Genoms (**Abb. 4.12**). Hier zeigt sich, dass sowohl endogenes als auch exogenes Stickstoffmonoxid, trotz der ständigen Gegenwart von DNA-Methylierungsinhibitoren, zu einer Remethylierung des Genoms führt.

Bestimmung der Veränderungen des Methylierungsstatus in primären humanen Keratinocyten

Um der Situation *in vivo* näher zu kommen, haben wir den Effekt von Stickstoffmonoxid auf den DNA-Methylierungsstatus von primären humanen Keratinocyten untersucht.

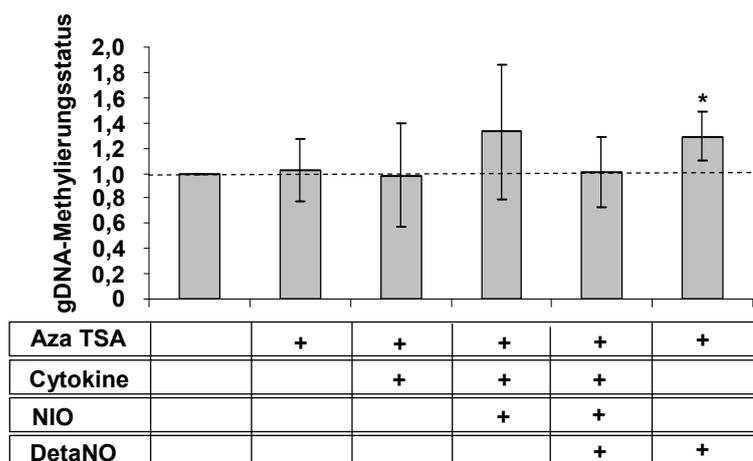


Abb. 4.13: Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die DNA-Methylierung in primären humanen Keratinocyten

Primäre humane Keratinocyten wurden in einer Zelldichte von 50×10^4 Zellen in eine 10 cm-Zellkulturplatte ausgesät. Nach einer Inhibition der Methylierung (48 h 5 μ M Aza; 48 h 5 μ M Aza, 20 nM TSA) erfolgte eine Behandlung mit Cytokinen (100 U/ml IFN- γ , 200 U/ml IL-1 β , 500 U/ml TNF- α), einem NO-Inhibitor (250 μ M NIO) und einem NO-Donor (1 mM DetaNO) für weitere 48h. (* $p \geq 0,05$) In obigen Abbildungen sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten abgebildet. Eine Blockierung der Methylierung in Kombination mit Stickstoffmonoxid erhöht den Methylierungsstatus des Genoms.

Es lässt sich kein Effekt der Behandlung mit Methylierungsinhibitoren auf den DNA-Methylierungsstatus erkennen (**Abb. 4.13**). Die gleichzeitige Zugabe von Stickstoffmonoxid führt zu einer Hypermethylierung ($1,29 \times \pm 0,18$) des Genoms (**Abb. 4.13**). Andere signifikante Veränderungen des Methylierungsstatus lassen sich nicht erkennen (**Abb. 4.13**). Hier zeigen sich auch die Schwierigkeiten des Arbeitens mit primären Keratinocyten, da die DNA-Methylierung altersabhängig (Veras *et al.* 1989) und abhängig von der während der Isolierung vorhandenen Calciumkonzentration (Rockwell *et al.* 1987), verändert ist. Dieses spiegelt sich auch in den obigen hohen Standardabweichungen wider. Aus diesen Gründen wurden die folgenden Untersuchungen an der Zelllinie A549iNOS durchgeführt.

4.4 DNA-Methylierung und Stickstoffmonoxid:

Einfluss auf die DNA-Methyltransferasen

Die Expression der DNA-Methyltransferasen

In den vorherigen Versuchen wurde eine remethylierende Wirkung von Stickstoffmonoxid auf das Genom gefunden. Die Frage stellte sich nun, welche Mechanismen hinter diesem Effekt stehen.

Ein Augenmerk liegt hierbei auf den DNA-Methyltransferasen, wobei die DNMT 3a und DNMT 3b für die *De novo* Methylierung zuständig sind, während die DNMT 1 die Methylierung zwischen den Zellgenerationen aufrecht hält. In einem ersten Schritt wird die mRNA-Expression der Dnmt 3a, Dnmt 3b und Dnmt 1 mittels Real-Time PCR bestimmt.

Widersprüchliche Hinweise gibt es über Gadd 45 α im Zusammenhang mit einer aktiven DNA-Demethylierung (Barreto *et al.* 2007, Jin *et al.* 2008), daher wurde auch die mRNA-Expression von Gadd 45 α ermittelt.

Nach Aktivierung mit proinflammatorischen Cytokinen wurde in unterschiedlichen Zeitabständen (6 h, 12 h, 24 h und 48 h) die mRNA-Expression gemessen und es zeigen sich Steigerungen sowie Erniedrigungen der Expression, aber eine eindeutige Aussage lässt sich nicht erkennen (**Abb. 4.14**).

Da die Expression der DnmTs mit dem Zellzyklus korreliert, können wir nur vermuten, dass sich ein Hauptteil der Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten in einem anderen Teil des Zellzyklus befand und daher diese unterschiedliche mRNA-Expression mit hohen Standardabweichungen aufweist.

Auch die Proteinexpression der DNMTs zeigt keine eindeutige Steigerung oder Inhibierung (*siehe Anhang, Abb. 6.2.2*).

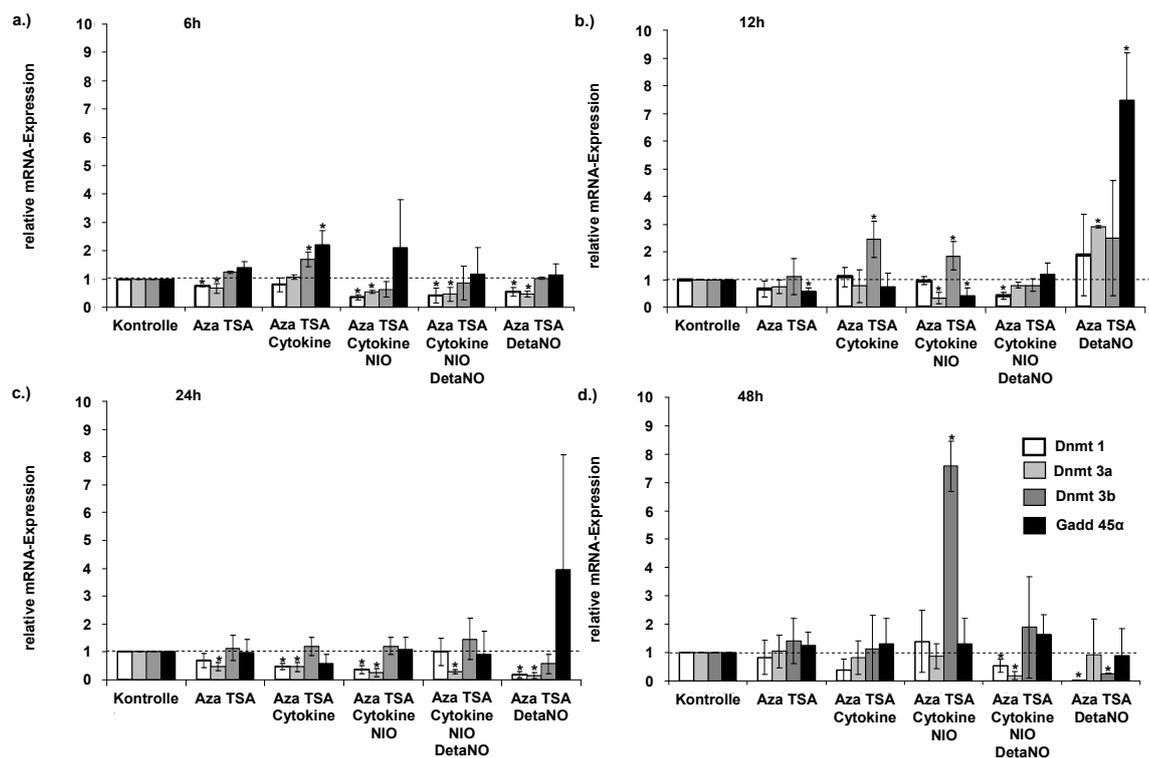


Abb. 4.14: mRNA-Expression der Dnmt 1, Dnmt 3a, Dnmt 3b und Gadd 45α

A549iNOS wurden in einer Zelldichte von 50×10^4 Zellen pro Well in eine 6-Well Zellkulturplatte ausgesät. Nachfolgend der Blockierung der Methylierung (48 h 5 μ M Aza; 48 h 5 μ M Aza, 20 nM TSA) erfolgte eine Behandlung mit Cytokinen (100 U/ml IFN- γ , 200 U/ml IL-1 β , 500 U/ml TNF- α), einem NO-Inhibitor (250 μ M NIO) und einem NO-Donor (1 mM DetaNO) für weitere 6 h, 12 h, 24 h oder 48 h. In den obigen Abbildungen sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten gezeigt. (* $p \geq 0,05$) Es kann keine eindeutige Aussage getroffen werden.

Die Aktivität der DNA-Methyltransferasen

Da die mRNA-Expression sowie die Proteinexpression der DNA-Methyltransferasen keinen regulatorischen Effekt gezeigt haben, wurde in einem nächsten Schritt die Aktivität der DNMTs im Kernextrakt der unterschiedlich behandelten Zellen bestimmt. Hierbei wurden die Zellen nach der zweistufigen Inhibition der DNA-Methylierung für zwei Tage mit proinflammatorischen Cytokinen, NIO und/oder DetaNO behandelt.

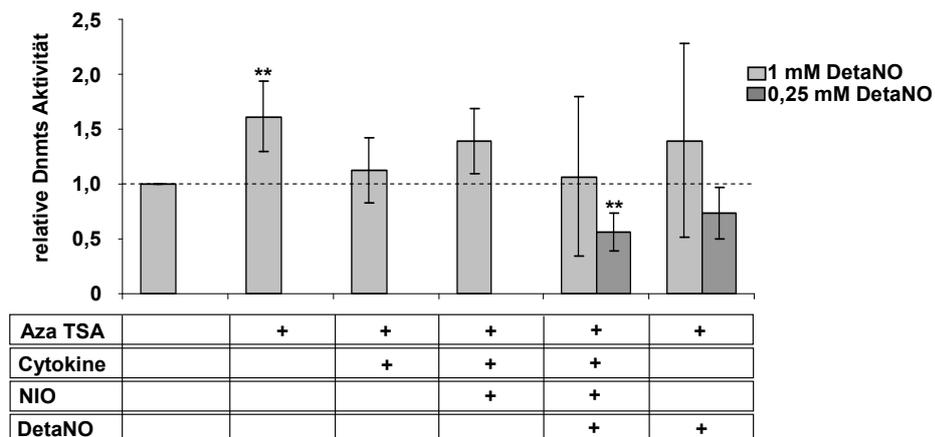


Abb. 4.15: relative DNMTs Aktivität in A549iNOS

A549iNOS wurden in einer Zelldichte von 50×10^4 Zellen in eine 10 cm-Zellkulturplatte ausgesät. Nach einer Inhibition der Methylierung (48 h 5 μ M Aza; 48 h 5 μ M Aza, 20 nM TSA) erfolgte eine Behandlung mit Cytokinen (100 U/ml IFN- γ , 200 U/ml IL-1 β , 500 U/ml TNF- α), einem NO-Inhibitor (250 μ M NIO) und einem NO-Donor (1 mM, 0,25 mM DetaNO) für weitere 48h. Die Aktivität der Dnmts wurde mithilfe des Epi Quick™ DNA Methyltransferase Activity/Inhibitin Assay Kit bestimmt. In der obigen Abbildung sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten abgebildet. (* $p \geq 0,05$) Eine Inhibition der Methylierung führt zu einer Aktivitätssteigerung der Dnmts *in vivo*.

Eine Blockierung der DNA-Methylierung führt zu einer 1,61 ($\pm 0,32$)fachen Steigerung der Aktivität der DNMTs (**Abb. 4.15**). Auffallend ist eine reduzierte Aktivität auf die Hälfte ($0,56 \pm 0,16$) bei einer Inhibition der DNA-Methylierung (5 μ M Aza, 20 nM TSA) und der NO-Synthese (250 μ M NIO), sowie einer Aktivierung mit proinflammatorischen Cytokinen (100 U/ml IFN- γ , 200 U/ml IL-1 β , 500 U/ml TNF- α) in Anwesenheit von Stickstoffmonoxid (0,25 mM DetaNO) (**Abb.4.15**). Die verwendete Methode lässt nur einen groben Einblick in die Aktivität aller DNMTs zu. Daher wurden die Aktivität der Dnmt1 und der Dnmt 3b im Einzelnen untersucht.

Einfluss von NO auf die DNA-Methyltransferase 1

Zur Bestimmung des Einflusses von NO auf die Aktivität der DNMT 1 benutzten wir einen *in vitro* Assay von der Firma Epigentek (USA).

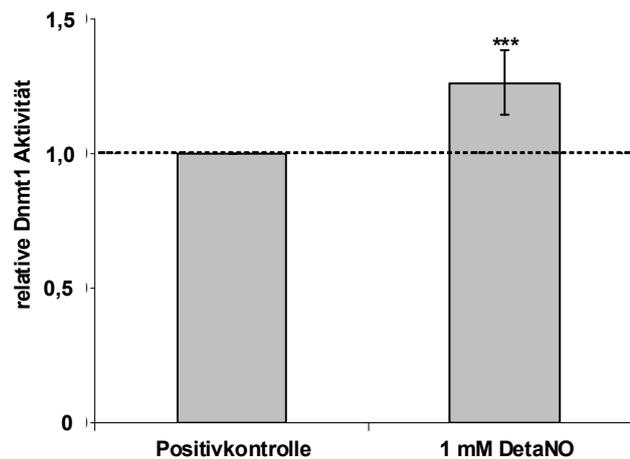


Abb. 4.16: NO steigert die Aktivität der DNMT 1

Den Einfluss von NO auf die Aktivität der DNMT1 lässt sich mittels des *in vitro* assays EpiQuik™ DNA Methyltransferase 1 activity/ inhibitor screening assay kit bestimmen. Die mitgelieferte DNMT 1 wurde 16 h bei 37°C mit dem NO-Donor DetaNO in einer Konzentration von 1 mM inkubiert und in den Assay eingesetzt. Die Normierung erfolgte auf eine unbehandelte DNMT 1. Die oben gezeigte Graphik zeigt den Mittelwert \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchen. NO steigert signifikant die Aktivität der DNMT 1.

Es wurde auf eine maximal aktive DNMT 1 normiert und die Aktivität der DNMT 1 erhöht sich auf das 1,32 (\pm 0,12) fache bei einer 16stündigen Vorinkubation der DNMT 1 in Anwesenheit von Stickstoffmonoxid (1 mM DetaNO) (**Abb. 4.16**).

Einfluss von NO auf die DNA-Methyltransferase 3b

Um zu testen ob dieser Effekt auf die DNMT 1 beschränkt ist oder auch auf die DNMT 3b zutrifft wurde auch deren Aktivität in einem *in vitro* Assay bestimmt.

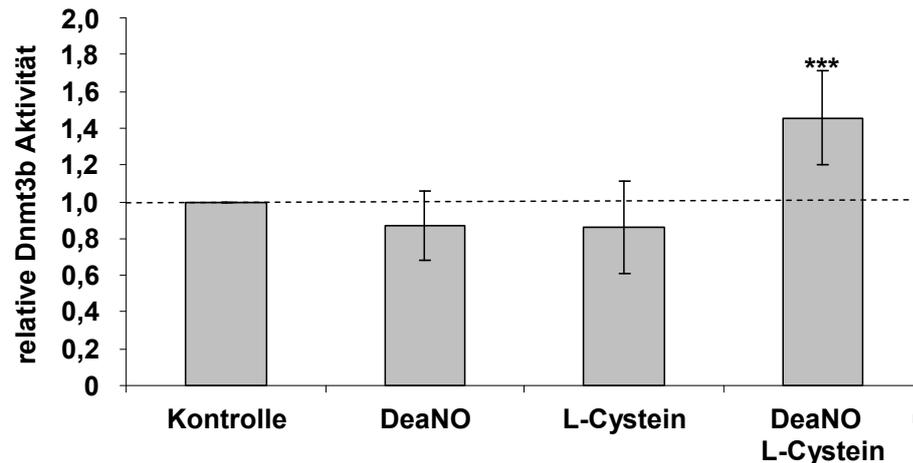


Abb. 4.17: NO in Kombination mit L-Cystein steigert die Aktivität der DNMT 3b

Die Aktivität der DNMT 3b wurde mithilfe des *in-vitro*-assays EpiQuik™ DNA Methyltransferase 3 activity/inhibitor screening assay kit, bestimmt. Die mitgelieferte Dnmt 3b wurde 1 h bei RT mit dem NO-Donor DeaNO (1 mM) und L-Cystein (1 M) inkubiert. Die Normierung erfolgte auf eine unbehandelte DNMT 3b. Die oben gezeigte Abbildung zeigt den Mittelwert \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Versuchen. NO in Kombination mit L-Cystein erhöht die Aktivität der DNMT 3b.

Aufgrund seiner Halbwertszeit von 8 h wurde DetaNO für 16 h bei einer Temperatur von 37 °C mit den DNMTs inkubiert und anschließend die Veränderungen in der Aktivität gemessen. Bei der DNMT 3b zeigte diese Behandlungsweise eine signifikante Reduktion der basalen Aktivität (*Vorversuch, Daten hier nicht gezeigt*). Als alternativer NO-Donor wurde daher DeaNO verwendet, welcher durch seine Halbwertszeit von ca. 2 min eine verkürzte Vorinkubation von 1 h erlaubt. Es zeigte sich jedoch keine Erhöhung der DNMT 3b Aktivität (**Abb. 4.17**). Bei einer kombinierten Behandlung mit DeaNO und L-Cystein steigt sich die Aktivität der Dnmt 3b auf das 1,45 ($\pm 0,25$)fache (**Abb. 4.17**).

Wir konnten zeigen, dass NO die Remethylierung des Genoms über eine Aktivierung der DNMT 1 und DNMT 3b bewirkt. Nun stellte sich die Frage, ob dies auch unter pathophysiologischen Bedingungen möglich ist.

Einfluss von NO auf hypomethylierte Zellen

Eine Veränderung der Methylierung findet man während der Tumorgenese, die durch globale Hypomethylierung gepaart mit einer lokalen Hypermethylierung charakterisiert ist.

Die humane Prostatakarzinomzelllinie LNCAP (Horoszewicz *et al.* 1983) sowie die humane Blasenkarzinomzelllinie 5367 (Welte *et al.* 1985) wurden hierfür als Modellzelllinien benutzt.

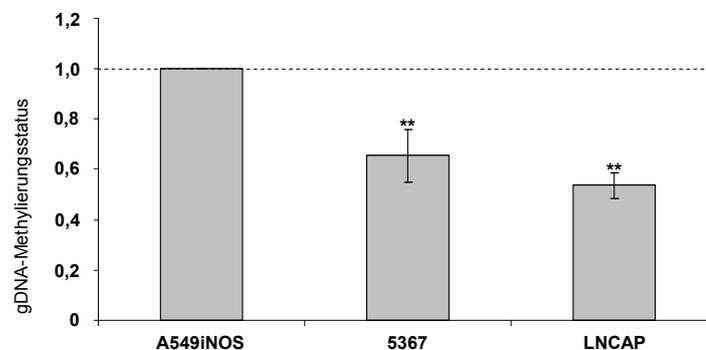


Abb. 4.18: Methylierungsstatus im Vergleich von A549iNOS, 5367 und LNCAP

50×10^4 Zellen wurden in einer 10-cm Kulturschale ausgesät und nach 48 h der globale DNA-Methylierungsgrad bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen. (** $p \geq 0,005$)

Beide Zelllinien weisen eine globale Hypomethylierung (5367: $0,65 \times \pm 0,10$; LNCAP: $0,54 \times \pm 0,05$) im Vergleich zu A549iNOS auf (**Abb. 4.18**).

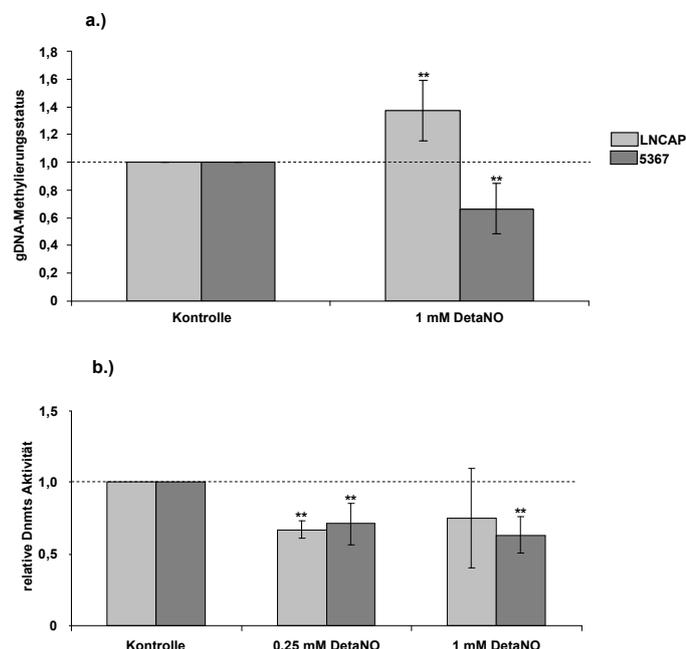


Abb. 4.19: Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die DNA-Methylierung und die Aktivität der DNMTs in LNCAP und 5367

50×10^4 Zellen wurden in einer 10-cm Kulturschale ausgesät und für 48 h mit 1 mM (und 0,25 mM) DETA-NO behandelt. Im Anschluss wurde der globale DNA-Methylierungsgrad (a.) und die Aktivität der DNA-Methyltransferasen (b.) bestimmt. Angegeben sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen. Stickstoffmonoxid erhöht den Methylierungsstatus in LNCAP, während die Aktivität der DNMTs reduziert wird.

Stickstoffmonoxid zeigt einen gegenteiligen Effekt auf die beiden Zelllinien, während der Methylierungsstatus des Genoms in 5367 gesenkt wird ($0,66 \times \pm 0,18$), erhöht er sich bei LNCAP ($1,37 \times \pm 0,21$) (**Abb. 4.19**). Hingegen wird die Aktivität der Dnmts in beiden Zelllinien durch exogen zugeführtes Stickstoffmonoxid gesenkt (**Abb. 4.19**).

Es konnte hier gezeigt werden, dass eine durch Stickstoffmonoxid vermittelte Remethylierung unter pathophysiologischen Bedingungen möglich ist.

5 Diskussion

Zur Untersuchung der Relevanz von epigenetischen Prozessen auf die Expression der iNOS und eines Einflusses von NO auf die DNA-Methylierung wurden humane Lungenkarzinomzellen (A549), primäre Endothelzellen, humane Prostatakarzinomzellen (LNCAP) und humane Blasenkarzinomzellen (5367) verwendet. Wichtig für unsere Untersuchungen war, dass man unter Zellkulturbedingungen in einem Überschuss an Folsäure, Vitamin B₁₂ und Vitamin B₆ arbeitet, sodass das Substrat SAM keinen limitierenden Faktor für die DNA-Methylierung darstellt (Kanai 2008).

5.1 Wie wird die DNA-Methylierung untersucht?

Um den DNA-Methylierungsstatus von humanen Zellen experimentell zu verändern, setzt man Substanzen ein, welche die DNA-Methylierung blockieren. Dies führt zu einer genomweiten Inhibition der Methylierung, eine selektive Demethylierung einzelner Gene ist nicht möglich. Zum einen verwendet man Cytosinanaloga wie 5-Azacytidine, 5-Aza-2'-deoxycytidine, 1-β-D-Arabinofuranosyl-5-azacytosine oder Dihydro-5-Azacytidine (Goffin & Eisenhauer 2002). In dieser Arbeit wurde 5-Aza-2'-deoxycytidine (Aza) benutzt, das während der Replikation anstelle von Cytosin in die DNA eingebaut wird (Christman 2002). Während der DNA-Methylierung bildet sich ein 5,6-Dihydropyrimidin Zwischenprodukt (Christman 2002), das zur Bildung eines stabilen Komplexes zwischen DNA und DNA-Methyltransferase (*siehe Anhang, Abb.6.4.1*) führt. Dieser Komplex verhindert die Ablösung der DNA-Methyltransferase und bewirkt folglich die Demethylierung des Genoms (Liu *et al.* 2003). Die DNA-Methyltransferase 1 kann direkt durch Aza blockiert werden, wobei diskutiert wird, ob dieser Effekt durch eine posttranskriptionelle Modifikation oder durch ein Festhalten der Dnmt1 in der Replikationsgabel (Milutinovic *et al.* 2003) mediiert wird. Die resultierende DNA-Demethylierung führt zur Aktivierung stillgelegter Gene, Dekondensation des Chromatins aber auch zur Induktion der Zelldifferenzierung (Jüttermann *et al.* 1994).

Es konnte gezeigt werden, dass der zytotoxischer Effekt von Aza hauptsächlich auf der Bildung des stabilen DNA-Dnmts Komplexes beruht (Oka *et al.* 2005). Eine weitere Substanz, Trichostatin A (TSA), verhindert zum einen die Histondeacetylierung (Marks *et al.* 2001) indem es in die katalytische Seite der Histondeacetylase interkaliert (Marks *et al.* 2001), andererseits reduziert es die mRNA Stabilität und Aktivität der Dnmt 3b. Ferner vermindert es die mRNA Stabilität und Proteinstabilität der Dnmt1 (Januchowski *et al.* 2007). Eine toxische Wirkung auf humane Zellen ist möglich, wobei der auslösende Mechanismus jedoch noch unbekannt ist (Januchowski *et al.* 2007). Da die Toxizität beider Substanzen zwischen Zellen unterschiedlichen Ursprungs variiert (Januchowski *et al.* 2007, Oka *et al.* 2005), werden die in dieser Arbeit verwendeten Zellen zunächst auf ihre Sensitivität gegen Aza und TSA geprüft.

Üblicherweise verwendet man eine kombinierte, schrittweise Behandlung der Zellen mit den beiden Methylierungsinhibitoren Aza und TSA. Auf eine zweitägige Behandlung mit Aza folgt eine weitere Inkubation mit Aza und TSA für weitere zwei Tage. Eine Kombination aus 5 μM Aza und 20 nM TSA zeigte weder einen cytotoxischen Effekt noch eine Inhibition des Zellwachstums (**Abb. 4.1**) in Kombination mit einer signifikanten Reduktion der DNA-Methylierung (**Abb. 4.12**) auf humane Lungenepithelzellen. Als weiteren Marker für die Toxizität der gewählten Behandlung wurde die mRNA-Expression von Gadd 45 α (Wachstumsstopp und DNA-Schädigungs-induziertes Gen 45 α) gemessen. Gadd 45 α hat Einfluss auf die Inhibition des Zellwachstums, die DNA Reparatur und die Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität (Hildesheim *et al.* 2002). Zudem findet man eine erhöhte Genexpression bei Aza-induzierter DNA-Schädigung (Schneider-Stock *et al.* 2005). Eine Verbindung zwischen der mRNA-Expression von Gadd 45 α und der globalen DNA Demethylierung wird kontrovers diskutiert (Jin *et al.* 2008, Barreto *et al.* 2007). Die Behandlung der Zellen mit 5 μM Aza und 20 nM TSA hat keine Veränderung der mRNA-Expression von Gadd 45 α zur Folge (**Abb. 4.14**). Dies unterstreicht dass die von uns verwendeten Konzentrationen nicht toxisch für die humanen Lungenepithelzellen sind.

Diese Voruntersuchungen schließen sowohl eine toxische Ursache als auch eine Zellzyklusinhibierung, als Ursache für die von uns gefundenen Veränderungen aus (Bestor 2000).

5.2 Welche Auswirkungen hat die Blockierung der Methylierung auf die iNOS?

Humane Lungenkarzinomzellen (A549) gehören zu den bestcharakterisierten *in vitro* Modellen der iNOS Induktion. Nach einer Aktivierung mit Cytokinen oder LPS zeigen sie eine moderate iNOS-Expression (Asano *et al.* 1994, Robbins *et al.* 1994). Chan *et al.* (2005) konnten zeigen das die moderate iNOS mRNA-Expression in A549iNOS mit einer moderaten DNA-Methylierung der -289 bp bis +117 bp spannenden Region des iNOS-Promotors korreliert. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass bei mehreren Zelllinien der Methylierungsgrad dieser Promotorregion mit der mRNA-Expression der iNOS korreliert, sowie das Inhibition der Methylierung in humanen Dickdarmkarzinomzellen (DLD-1) die Aktivierbarkeit mit Cytokinen (4h) reduziert (Chan *et al.* 2005). Eine effiziente aber untoxische Blockierung der DNA-Methylierung (**Abb. 4.1, Abb. 4.12**) erhöht signifikant die humane iNOS-Promotoraktivität (**Abb. 4.5**) und auch die Cytokininduzierbarkeit bleibt erhalten, da eine gleichzeitige Anwesenheit von proinflammatorischen Reizen die Promotoraktivität nochmals steigert (**Abb. 4.5**). Im Vergleich zur Studie von Chan *et al.* (2005) wurden die Zellen für sechs Stunden aktiviert und deren Promotoraktivität direkt gemessen. Für diese Messung wurden A549 Zellen verwendet, welche mit einer 16 kb Promotorsequenz der iNOS vor Luciferase transfiziert sind. Diese Promotorsequenz enthält die essentiellen cytokininduzierbaren Bindungsstellen (Yao *et.al.* 2003) und sieben NFκB Bindungsstellen. Der humane iNOS-Promotor enthält keine CpG-Inseln und hat einen geringen CpG-Gehalt (1:100), der typisch für gewebespezifisch exprimierte Gene ist (Antequera 2003). Je nachdem ob ein positiv oder negativ regulatorisches Element methyliert wird, erfolgt eine Steigerung oder Erniedrigung des Transkriptionslevels gewebespezifischer Gene (Dolinoy *et al.* 2007; Hanson and Gluckman, 2008).

Es stellte sich nun die Frage, ob und welche Bindungsstelle im iNOS-Promotor von der Regulation über die DNA-Methylierung betroffen ist. Da die transfizierte Promotorsequenz sieben NFκB Bindungsstellen enthält und im Mausmodell bereits gezeigt werden konnte, dass die Methylierung der DNA die Bindung von NFκB verhindert (Yu and Kone. 2004), wurden im weiteren Verlauf der Arbeit die NFκB Bindungsstellen untersucht. Zur direkten Messung der Veränderungen der DNA-Methylierung an den NFκB Bindungsstellen des iNOS-Promotors könnte man die Bisulfidsequenzierung benutzen. Bei dieser Methode nach Clark (Clark *et al.* 1994), werden alle unmethylierten Cytosine desaminiert und sulfoniert, was zu einer Umwandlung zu Uracil führt, während alle methylierten Cytosine unverändert bleiben. Der iNOS-Promotor weist nach der Desaminierung mehrere Thymidin-Wiederholungen in der Nähe der NFκB Bindungsstellen auf und verhindert somit die anschließende Amplifikation (*siehe Anhang*, 6.1.1). Es wurden daher A549, welche mit mehreren NFκB Bindungsstellen transfiziert sind, verwendet. Wir konnten zeigen, dass eine Behandlung mit Aza und TSA die Aktivität von NFκB und damit die Zugänglichkeit der NFκB Bindungsstelle deutlich erhöht, während exogen zugeführtes NO diese komplett verhindert (**Abb. 4.6**). Das stützt unsere Hypothese, dass die NFκB Bindungsstelle essentiell bei der Regulation der iNOS über die DNA-Methylierung ist. Aufgefallen ist, dass NO die NFκB Aktivität inhibiert. Die verwendete Konzentration von 1 mM DetaNO ist leicht toxisch für die Zellen (**Abb. 4.4**), eine DNA-Demethylierung aufgrund von DNA-Schädigung ist aber nicht sichtbar (**Abb.4.12**) (Panayiotidis *et al.* 2004). Von 1 mM DetaNO werden ~3 μM NO/min generiert, welches vergleichbar mit der basalen NO-Konzentration in unmittelbarer Umgebung eines aktivierten Zellmonolayers (Kröncke and Carlberg 2000) ist und somit einer physiologischen Freisetzung von NO entspricht. Eine Inhibierung der DNA-Methylierung alleine reicht nicht aus, um die mRNA-Expression der iNOS zu induzieren, aber eine gleichzeitige Aktivierung mit proinflammatorischen Cytokinen resultiert in einer erhöhten Expression (**Abb. 4.7**) als auch in einer erhöhten NO-Freisetzung (**Abb. 4.8**). Die Induzierbarkeit der humanen iNOS bleibt auch bei gleichzeitiger Blockierung der Methylierung bestehen.

Die Hemmung der endogenen NO-Produktion steigert drastisch die mRNA-Expression der iNOS, während exogenes NO diese wieder vollständig inhibiert (**Abb. 4.8**). Ein ähnliches Expressionsprofil zeigen auch A549_NFκB bei gleichem DNA-Methylierungsstatus (*Daten hier nicht gezeigt*), wobei die drastische Steigerung der Expression im Vergleich zu A549iNOS zurzeit nicht erklärbar ist (**Abb. 4.8**). Dies belegt unsere Hypothese, dass NO über die DNA-Methylierung eine autoregulatorische Funktion ausübt. Eine Aktivitätserhöhung der Dnmts über NO konnte in Mäusezellen schon gezeigt werden (Hmadcha *et al.* 1999).

5.3 Der Einfluss von NO auf das gesamte Genom

Da hier auch TSA, ein Histondeacetylase-Inhibitor verwendet wurde und eine Regulation über Histonmodifikationen bei der murinen iNOS (Yu and Kone, 2005) und der humanen eNOS (Fish *et al.* 2005) bekannt ist, können wir dies auch hier nicht ausschließen. Daher wurde zur Bestimmung der globalen DNA-Methylierung zum einen eine massenspektrometrische Messung sowie eine DNA-ELISA etabliert. Die massenspektrometrische Messung erlaubt keine Quantifizierung, wohingegen die DNA-ELISA die Bestimmung einer kleinen Menge DNA (50 ng) in einem Messrahmen von 1 % bis 10 % relativer DNA-Methylierung erlaubt. Die Behandlung der Zellen mit den Methylierungsinhibitoren zeigt eine deutliche Reduktion des DNA-Methylierungsstatus des gesamten Genoms (**Abb. 4.12**). Endogenes, durch iNOS produziertes NO, als auch exogen zugeführtes NO, bewirken eine Remethylierung des Genoms, auch in Anwesenheit der Methylierungsinhibitoren (**Abb. 4.12**). Die primären Keratinocyten können nach Aktivierung mit TNFα oder IL-1β die iNOS exprimieren (Rao 2000). Die durch NO-vermittelte DNA-Methylierung findet man auch in primären Keratinocyten (**Abb. 4.13**). Dies lässt vermuten, dass dieser Mechanismus nicht nur auf eine Zelllinie beschränkt ist. Dieser NO-Effekt kann einmal durch eine erhöhte Aktivität oder eine Zerstörung der Methylierungsinhibitoren vermittelt werden. Eine globale Hypomethylierung in Kombination mit einer regionalen Hypermethylierung ist charakteristisch für Karzinomzellen (Esteller 2008).

Bei der humanen Prostatakarzinomzelle (LNCAP) und der humanen Blasenkarzinomzelllinie (5367) findet man die tumorcharakteristische Hypomethylierung (**Abb. 4.18**). Durch Behandlung mit NO steigt die DNA-Methylierung bei LNCAP, während sie bei 5367 sinkt (**Abb. 4.19**). In 9 % aller Todesfälle durch Krebserkrankungen in Europa ist Prostatakrebs die Ursache. Bei Prostatakrebs wird die iNOS exprimiert, dabei korreliert die Expression mit einer schnelleren Proliferationsrate, Dedifferenzierung und einer schlechteren Prognose (Cronauer *et al.* 2007). Diese Effekte der iNOS werden hauptsächlich über den Androgen-Rezeptor vermittelt, welcher auch in der Zelllinie LNCAP vorhanden und induzierbar ist (Horoszewicz *et al.* 1983). Dies ist die erste Beschreibung, dass NO einen positiven Effekt auf die humane Prostatakarzinomzelllinie über die teilweise Aufhebung der pathophysiologischen Hypomethylierung hat. Im Gegensatz dazu, folgt bei 5367 eine weitere Demethylierung des Genoms. Blasenkarzinomzellen segregieren ständig Cytokine (Quentenmeier *et al.* 1997) und diese könnten daher schon andere Effekte ausgelöst haben, welche mit der NO-medierte Remethylierung korrelieren. Ein genauer Mechanismus bedarf der weiteren Aufklärung. Dies zeigt, zum einen dass die Remethylierung des Genoms direkt durch NO vermittelt wird und es in der Krebstherapie, jeweils abhängig vom Karzinomtyp eingesetzt werden könnte.

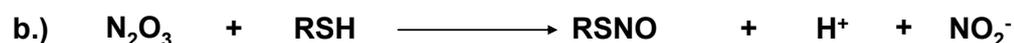
5.4 Welcher Mechanismus bewirkt die Remethylierung?

Nachdem NO einen remethylierenden Effekt auch in Abwesenheit der Methylierungsinhibitoren aufweist, kann dieser nicht durch eine Zerstörung von Aza und TSA mediiert sein. Daher wurden die DNA-Methyltransferasen genauer untersucht. Weder die mRNA-Expression (**Abb. 4.14**) noch die Proteinexpression (**Abb. 6.2.2**, Daten von Frau Dipl. Biol. Christina Klaus) zeigen eine deutliche Veränderung. Eine Publikation aus dem Jahre 1999 (Hdmadcha *et al.* 1999) zeigte, dass iNOS-produziertes NO eine Rolle bei der Aktivitätserhöhung der DNMTs in Rattenzellen spielt. In einem *in vivo* Versuch konnten wir zeigen, dass nur die Blockierung der Methylierung die Aktivität aller DNMTs steigert (**Abb. 4.15**).

Ein Problem bestand hierbei in der Kernextraktion, da die DNMTs sehr instabil sind, daher wurde die Aktivität der DNMT 1 und der DNMT 3b in einem *in vitro* Assay bestimmt. Die DNMT 1 ist in allen somatischen Zellen aktiv, da sie die Übertragung des Methylierungsmusters auf die Tochterstränge bewirkt (Chuang *et al.* 1997) und kann in ihrer Aktivität durch NO gesteigert werden (**Abb. 4.16**). Die Regulation der Aktivität der DNMTs ist weitestgehend unbekannt. Eine Erhöhung der Aktivität wurde in einigen Krebsarten beschrieben, aber ein funktioneller Zusammenhang mit der Tumorgenese ist nicht beschrieben (Rountree *et al.* 2001). Es stellt sich nun die Frage, wie NO die Aktivität der DNMT 1 erhöht. Ein Angriffspunkt für NO wäre die Cystein-reiche Zn²⁺ Bindungsdomäne der DNMT 1, was bei einer S-Nitrosylierung zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit an die DNA führen könnte (Kröncke *et al.* 1994). Dies würde eher zu einer Inaktivierung der DNMT 1 führen.

Auffallend ist, dass auch die DNMT 3b eine Aktivitätserhöhung bei gleichzeitiger Anwesenheit von NO und L-Cystein zeigt (**Abb.4.17**). In der Embryogenese ist die DNMT 3b hauptsächlich aktiv, wobei es jedoch immer mehr Hinweise auf eine Aktivität auch in somatischen Zellen gibt. Yu and Kone (2004) konnten zeigen, dass ein Ausschalten der DNMT 3b zu einer erhöhten iNOS-Expression in murinen Zellen führt. So könnte auch die DNMT 3 an dem remethylierenden Effekt von NO beteiligt sein.

Eine Möglichkeit der Reaktion von NO mit Proteinen ist die S-Nitrosierung von Thiolen, welche über drei Mechanismen erfolgen kann (Martinez-Ruiz ad Lamas 2007).



Eine direkte Reaktion ist nur bei einem vorliegenden Thyilradikal möglich (a.). Am wichtigsten ist hierbei die Reaktion von N₂O₃ welches zu einer S-Nitrosierung führt (b.). Bei der Aktivitätssteigerung der DNMT 3b vermuten wir, dass die Transnitrosierung (c.) am wichtigsten ist, da in Anwesenheit

von Cystein die Aktivität der DNMT 3b gesteigert werden kann. Mit der Bildung von R-S-H könnte die Thiolattacke erleichtert werden.

Es wurde auch gezeigt, dass während der Nitrosierung von Thiolen ein Thiylradikal (RS^*) als Zwischenprodukt gebildet wird, was die Thiolattacke und damit die DNA-Methylierung erleichtern würde (Handy and Loscalzo 2006).

Wenn man sich den Mechanismus der DNA-Methylierung anschaut, gibt es hier zwei mögliche Angriffsstellen für NO. Zum einen könnte die Thiolattacke der DNMT (a.) erleichtert werden oder die β -Elimination und die daraus erfolgende Freilassung der DNMT (d.).

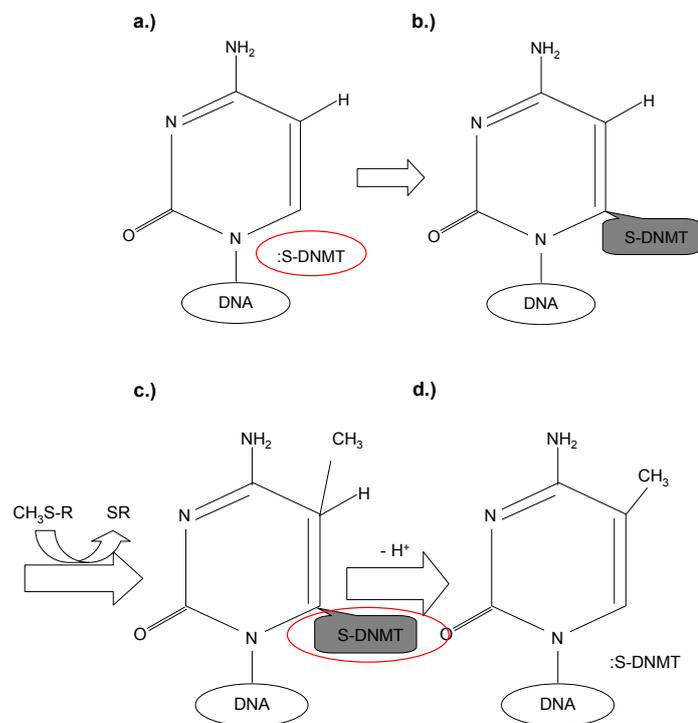


Abb. 5.1: Mechanismus der DNA-Methylierung und mögliche S-Nitrosylierung des Thiols

Die Enzymreaktion bei der DNA-Methylierung, modifiziert nach Bestor (2000).

a.) Thiolattacke am 6-Carbon (C6) des Substrates Cytosin b.) die Methylgruppe von S-Adenosylmethionin wird von Enamine attackiert c.) ein Proton aus dem 5-C (C5) des Substrates Cytosin wird freigesetzt d.) β -Elimination regeneriert das freie Enzym.

5.5 Der vollständige Regulationsmechanismus

Die Expression der iNOS korreliert mit dem Methylierungsstatus und eine Inaktivierung der DNA-Methylierung resultiert in einer gesteigerten Promotoraktivität derselbigen. Die Induzierbarkeit der iNOS bleibt hierbei bestehen und die Regulation über die DNA-Methylierung wird vermutlich über die NFκB Bindungsstellen vermittelt. Das durch die iNOS-produzierte NO führt zu einer Aktivitätssteigerung der DNMT 1 und DNMT 3b, vermutlich aufgrund einer erleichterten DNA-Methylierung durch s-Nitrosierung von Thiolen, welche bei der Reaktion beteiligt sind. Dies führt zu einer Remethylierung des gesamten Genoms (**Abb. 5.2**) und kann auch unter pathophysiologischen Bedingungen beobachtet werden. Da eine Regulation der NFκB Bindungsstelle gezeigt wurde, könnte der Mechanismus zudem regulatorische Effekte auf zahlreiche NFκB abhängige Gene haben. Ein neuer Bezug zwischen der Entzündungsreaktion und der epigenetischen Regulation konnte aufgedeckt werden. Bei einigen Krebsarten kommen Methylierungsinhibitoren zum Einsatz, zeigen jedoch starke individuelle Unterschiede in der Wirksamkeit und Toxizität. Der in dieser Arbeit gefundene Mechanismus stellt möglicherweise eine Erklärung dafür dar und könnte ein Angriffspunkt für die Krebstherapie sein.

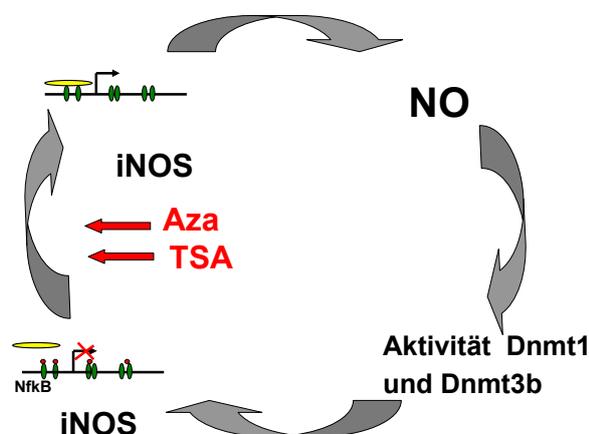


Abb.5.2: Feedback-Regulationsmechanismus

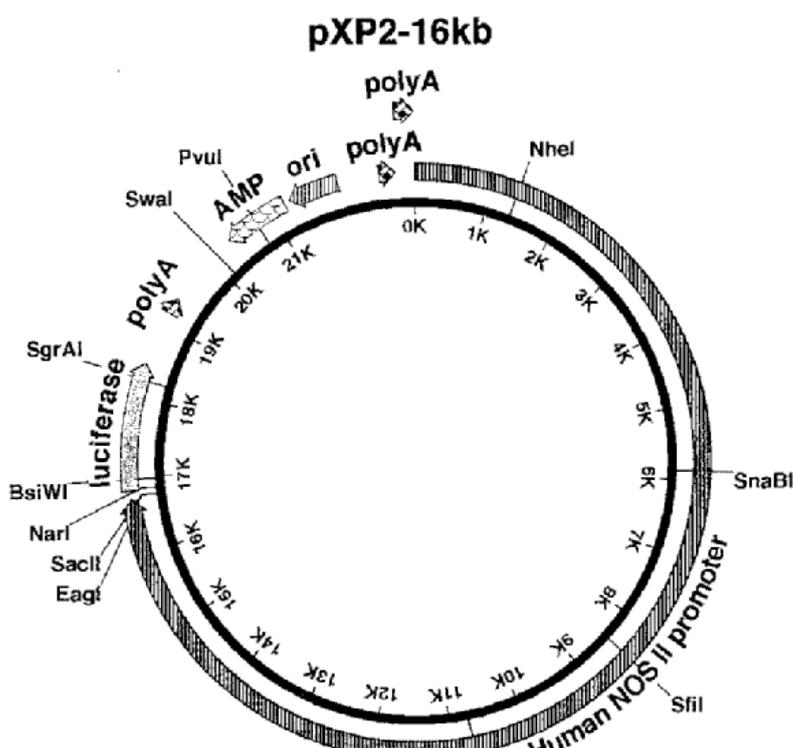
6. Anhang

6.1 Plasmide und Plasmidsequenzen

6.1.1 Plasmid für A549iNOS

Yao *et.al.* 2003

Plasmidsequenz



Die Zellen wurden mit einem 16 kb Promotorfragment der iNOS transfiziert, welches 7 NFκB Bindungsstellen enthält. Anbei ist der erste Teil (bis -8 kb), welcher 6 NFκB Bindungsstellen enthält, gezeigt. (Accession Nummer AF_017634)

```
cccgggagcccctgggaactcctgcatgtcagtccttctccagggccctgacagcatcacagatcatttcattgattttctgcctcttccc
aggagctgtcttgcctttaaacagttgtgtctacaagagcttggcttgggtgagagagggctgccttgagcctcagaccgggtgtccttaa
gatgctcctcccagaagcatttggaatcaaatggacctgaatcttggttctgcagcttagctgtatgatctgggaaaaattttaatcttctaag
cctcaattttgcatctgtaaaataggggtgacacagctcacctcacagtggtggtgtggaatgcatgagataacacataaaaaggccctgg
cagtcagctggcattgtttctgagctccagcatgtccaggtgtctgggagaatagcagtaggcagagccagcagctcgggtgctgctgctct
gctaaagctacagctacgctcgggctctggcaagataggagcgtgctcaagctgaaactgaggcaggtgctgctacatcctctcggctactc
ctcccaaggctgaggaggtgaggactctgtgattatccacacttacagataagcaaaactgaaacaaaagtaacctcctaagtgccaca
gatgaattaggtggcaggcctgagactgtcctgagctgctgacagtggtcctctgcgttattaatagcttgccccacagcctcccactc
aaatgctggaggaattacccttctccttctcccaattctccttaccacccaagagccagaccccacctgtttcaagagtgagccgctca
gcttgccaaccgctcctagcattttgatgcacttgccctgtccccctggtttcactctgttttaaggaggcagcccctgtcccccatacgaccg
cctcaacaggctctgggactcatctgcatctctattggcagcagagtggggagggagagagacagccagctgtctgcatcactacca
ctggatccccagggcccagcttgaaaaactcacggacgatgctcagaaaaaccgggtgaactcctgcagaacagccagggggctggggcag
ccgctctctgtgctcctgtaataaaaaggggctgagaggtcttttcttgggaaaggtaactgagcagccacacgctgtagatag
tatttcaaaaagtaaggagtcactttttatattataaaactaacatgacagatagcaatacagagaagggtaaagaaaagataactattg
```

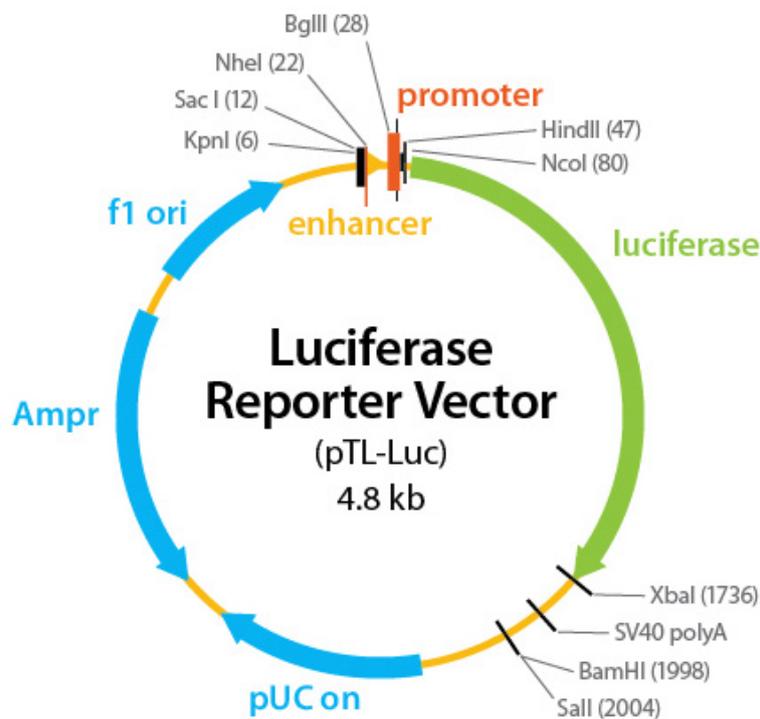
ccataattctaccacttttaaatatttagtattttctcacatttttctgtctttattttacatgttaggggtatcattttctactgatcatgaacattatt
cttatcataaagactcttttttttttaagagatcagagctcactgttgcttaggctggagagtgcaatgtgcaatcatagctcactgcggctctt
aattcctcagctcaagtgatctcccacctcagttagtagctaggctacagggtctgtcagatgccagctaaataaatccttttttgaaca
gggtctcactttgtgcccaggctgggtgcaatgtgataatcacagctcactgcagcatgacctcctgtctcaaggatctcccaccccag
cctctcgagtagctgggactgcagggttccaccacactggctaattttgtaattttgtattttgtacagacagggtttgcatgttggaag
gctgtctcaaactcctgggtcaagcaatctcccacttagctcccaaaatgctagaatttacaggcatgagctaccacacctggcaaaa
aattctaatacacttttttggccaagtaatggtaactataaagctggcctgtgtcctttctctatgtgatcactgggtttctgtgctcgt
gagagcgatgctccagacatctctgtgcacacagtggtcaggctctgcagaagtgccagctgtgctacattctgcttccaggggcactctgtt
gggaagataactttcaagagatcaagaccagatagtatgagtggtgggagactcagaagcccagataccacagctggaagggc
tcagagacccttaactgaggaagggggccggagggttatgtggcctaaccaaagatgcagccttcttaggaaggatacaagagg
gtggccttagctgaagctctggcatttagaactcttggatcagatccagcaccctcagaggctgtacctggggagggtacctctctct
cattgacccaattctaaacccctgtagcagtgactctgtctcgtctcattccagtgcaatttgaattctagaggggtttccagaaccaag
aaggctgtctgcccacagcaggccttgggaatttaacctccctgggagcagcctcaatgagtgatgctctggaactgctgggtcagtagccc
agccccctggccccctggatgggatcattgaagccctgttctgcaccattttcaagtccctgtggggctgagctggtgcaaatcgtgaaag
ctgccccatagcttttaccagctgctcccccttctgtctcacttctcattcccctctgatgtccccctgcactcccagatacactactgccccctg
aatctgccccctgaaccatcacacctgggactaccccagggtccactctgttgtttctcgcctagaaggacggggcaccaggaagca
aaacgggaggcagggaagggagggtgttctggggaggcctgacaagaaacggaggcttttaaaagaacagcagcaaatgcccaggcc
tgcaccagcagcttgagtcaactccagggtcagcaagctgtccacttctgtccaccctggcctgccaactctggagtaccacc
ggggcttccagtaaaatcccttcaacttccctcctcctcagctcctcagtgcaagagtggtggaaccgggggaagacctcagctcggagctg
ctggaattgtgtgactcaagccctcaggtgtcactgtgacaatgatagggctcagggctcgggactgtgagctgttagggctcagaacc
gggagggtccaggaatgccttctcaatgccttctttgacagctgagtgagtggaagggcccacaggacacgtgactgccacgggaca
tgcacacacacaaatagagagtaagagccagccctgtgttcttctcactgctccacccttatacattgtgtcacatctgcatgcaactactgtta
ttgcttaaacattttacctaactggctctctttaaacttaaatatattttaaataaaattttatcatttctgtagggcggggcacacagtagga
actcgtctcctcctcatggcctgtcacagagctggcaccagacactgacatggaggggagaacattcaacccaggtaatcctcagctct
acctgtatctcagtttcccactctctcattgtcacctcctgccccctgggtgactcacctgtagcaaaatgggtaagcacacagtgggcgaca
agtgggtccagtcaaggctcagacctgggtcagctctcagcttggcacttcaaaactgagtgacattgagctggtcgctcaaatcttctgtgtc
tggtttcttattgtgtaattgggatagattataatagctgccaacacagttgttggaggatgaactgagataataatggaaagcccag
ggcctggctgtattttaggagcaagcaccagagcaagtgaagctgggactccagggtgtgagccccaccacctgactgtgtgttggacttgg
caagctcattgctttagctcactcaattccccatctataaaatggggctagtgatattccccccataggaactgtgtgtgataatgctgg
tatgttaagtgcctgtcagtaaacgttagctctgatcaattgttttagaaaagcctcaaatgtgtaacttccgagggtactggtatgaa
ccatctcacagcctggcatagaaacagatcaaatcaatccagtggaataatccaggataatgagcccaagacattccctgtctgattg
ctgcagcatgtgtcctaggacagcctgggaaggcaggaggaggatctccacagcagcctgggaacctctatcgccaccctccggg
gggcccacctgtcccccgctgcccccaaggtgtctttgattctcccagcagaattcacctgtgcatccatcatcagaagaggccaggaa
tgtggcctgctgggtgggcaggccaagagaaggcagcctgtcaggcccagggaagcgttaggagactgccaacctccaggaggggg
ccagccctggaccctgcagacaggcctctgaggagggtaccagaagctcactgtttgtcccggctgaaggctgttctgtgtgacctgtgtg
agtctcctaacctgtgtatcatcaaatcattatcacttttactcctcctcctcctatttggcggttaagagaggatgggatagtggtcatggt
atacaacattgtgaatattctaaaaacattgcaatttactttaaataatgtaattgttaatttatttcaattaaataaa
aatacatacatgaattatgttacaagggagagagaggaccgggaatttaaagcagggtgtttgtggggacggggacctgtctgagga
aggatactcagaaggcaagtctggatccactgtcttgtcaaaagggaattgtactctgtactcccagcaaggataataaattcttact
tggctgacttttctcaatggctcaaagcatttctgtatctcgtttatttacttttataccctttgtcagagaaaagtcaggcccagagagaa
gtggctttccaagatcacatggtagtgagcagtgaaagctgtgcctggaacctgggacctttaggtaaggaaaccagaacatgccacg
ccagatagccgatatggcactctgattatctcagctgaaggcatttgagaagagcagctagagagagggtatctgaactgcctgtcctg
cctgcaagcaaacataaaccttggagaagatgttcccagcacaagatgagaagataacttttagcactcagagatggcaccaga
cctcactcaaaatacaaaacacactgtcctcactcctcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactcactc
tgcattcgtctgtcacttctcctt
ctt
ctt
attgatctcccacctgatcctcctgagtagctaggactacagtagctggccatgccagcataaccagtaatttttcaattttctgtagagatt
ggatctcactatgtgcccaggctgtctcgaactcctggcctcaagcaatctgcccacctcagcctcccgaattgtgggattccaggcatgaa
ccaccgtgcccagccatctgtcacttctaaaatgcattgtcttcatggcagatgtccataagccagattctaagccgagcattgagttact
tactgaggcttctcctgctgtgtgcatcacagacattaacaactgttttttcttattatctgtcttgttacagtgcttcccaacaat
aactaagatgattgaggagaattatatttcttccagctggctaattccaatgtgtcctcaagcctgggtgctggactcaaacctgcccacag
gtcaagaatgccacaccaagcagcagctgtgttagagggcaccctgagtgacatgtttgacagatcacataactgaataactgcatttctga
aggaaaatcaacgaagtgcttgaggccaagtagatgggattctgaggatccatgaatagcaaatagtagtatccccctcagaggctctgg
gtggggcattaaatgtgtaatacatgtttgtctgaggtatagccagaatgtgaaagcagctacaggaatagagtgtagcaaacctccta
atcattccctcaaacctgccccgtgtctcctt
cactacagatcactctgtactataaattatccattatttttaggcctgtcactccctcaagccaggattctgacttctccctgagtgctgttacctg
aactgaaccgggatgaaccaccagccccggccatctgtcacttctaaaatgcattgtctctcgtggcagatgtccataagccagagcttaa
gcccagcattgagccgagcattgagctgaagcctgaagggaagatggcttggatgtttaaactcattccagttactcctattttcattcatt
catccacacattcactcaaaagatccttgagctctgatccatgtctttgtggctcttagttatctttgacaaagttaatatattatgctgaatt
aactgggaaagacaagaaggaaatgagtgagcagtggtgcaaggtgtggagcgggtgagatcaagggtgactttttccttcttcttca
cttctccctaatgtatgttattttactttatgatggaaaaatgcatatgtatgggaactgtatctcaggcattataaggaatgaaattataggccg

ggcattgtggtaacccttgaatcctagcactttgagaggctgaagtgggcagatcacttgagcttcagagttcgagaccagcatggacaaca
tgggaaaccagctctaccataaaaacacaaaaatattagctgggtgtgggtgcatgcctgtagtccagctactcagggctgaggtgg
gaggatcgcttgagcctggaggcagaagtgcattgagcagagatcgtagccactccctccagctctggtgacagaatgagactccatctca
aaaataaataaataaaaataaatgaaatgaaattataagaaattaccacttttcattgtaagaagtgatcattccattataaggaaggaa
titaatcctacctgccattccaccaaagcttacctagtgtctaaaggaatgaggtgtagtaagaccaacatctcagaggcctctctgccaatagc
cttcctccttcccttccaaaacctaagtgactagttcagaggcctgtctggaataatggcatcatctaatcactggcctctggaacctggg
catttccagtggttccatactgtcaatattccccagctctctggactcctgtcacaagctggaaaagtgagaggatggacagggattaaccag
agagctccctgctgagaaaaaatcaccagatgctgaaagtgaggcattggtggtggcaaataaaacactggctccgtggtgctctgtctt
agcagccaccctgctgatgaactgccacctggactggaccagaaagaggtgggtgggtgagaggccacacagagtgatgtaac
agcaagatcaggtcaccacagggcctggcagtcacagtcataaattagtaactgtacacaagctg~~gggacact~~cccttggaacccaaa
aaaaaaaaaaaaaaaaaagagacctttatgcaaaaacaactctctgatggcatgggtgag~~tataaa~~

(CG unterstrichen, NFkB Bindungsstellen gelb unterlegt, tata Box grün unterlegt)

6.1.2 Plasmid A549_NFkB

Von der Firma Panomics (Fremont, USA)



Plasmidsequenz

von der Firma Panomics (Fremont, USA)

ggtaccgagctctaccgctgctagcagatctgggtatataatggaagcttggcattccggtactgttgtaagccaccatggaagacgccaa
aacataaagaaaggcccggcgccattctatccgctggaagatggaaccgctggagagcaactgcataaggctatgaagagatacgcctt
ggtcctggaacaattgctttacagatgcacatatcgagg~~ggaca~~tcaactacgctgagctcctgaaatgctcggttggcagaagctatg
aaacgatatgggtgaatacaaatcacagaatcgtcgtatgacgtaaaaactcctcaattcttatgccgggtggtggcgcggtatctatcggag
tgcagttgcccgcgaacgacattataatgaacgtgaattgtcaacagatgggacatttgcagcctaccggtggttctgttccaaaagg
ggtgcaaaaaattgaa~~cgt~~gcaaaaaagctcccaatcatcaaaaaatattatcatggattctaaaacggattaccagggattcagtcg
atgtacacg~~t~~ctcactctactcctcccgggttaataaatacgatttggcagagtcctcagatag~~ggaca~~agacaattgactgatcat
gaactcctcggatcactgtctgcttaaggtgctcctgcatagaaactgctgctgagattctccatgcccagagatcctattttggca
atcaaatattcgggatactgcgatttaaagtgttccattcatcagggttggaaatggttactacactcggatattgatatgtggattcagtcg
ctaatgatagattgaagaagagctgttctgaggacctcaggatcaagattcaagtgcgctgctggtgccaaccctattctccttcg
ccaaaagcactctgattgacaatac~~g~~atttactaattaca~~c~~gaaatgctctggtggcctccccctctaaggaagtcgggaaagcgggtg

ccaagagggtccatctgccaggtatcaggcaaggatggtggctcactgagactacatcagctattctgattacaccgaggggatgataaac
cgggcgcggtcggtaaagttgtccatttttgaagcgaagggttgatctggataaccgggaaaacgctggcgtaatacaagaggcgaact
gtgtgtgagaggctctatgattatgtccggtatgtaaacaatccggaagcgaccaacgccttgattgacaaggatggatggctacattctggag
acatagcttactggagcgaagacgaacacttctcatcgttgaccgctgaagtctctgattaagtacaaaggctatcaggtggctccgctgaa
ttggaatccatctgtccaacaccccaacatctcgacgcagggtgctcaggtctcccgacgatgacggcggtgaactccgcgcggtgtt
gtttggagcaccgaaagacgatgacggaaaaagagatcgtggattacgtcgcagcaagtaacaaccgcaaaaaagttgcgcgagg
agttgtttgtggacgaagaccgaaaggtctaccgaaaaactcgacgcaagaaaaatcagagagatcctcataaaggccaagaagg
cggaaagatcgccgtgtaattctagagtcggggcgccggcgttcgagcagacatgataagatacattgatgagttggacaaccacaa
ctagaatgcagtgaaaaaatgctttattgtgaaattgtgatgctattgctttattgtaaccattataagctgcaataacaagttaacaaca
attgcattcattttatgttcagggtcagggggaggtgtgggaggttttaagcaagtaaaacctctacaaatgtgtaaaaatcgataaggatc
gtcgaccccgcaaccagatgatctgttctcccgaaccagatgatctgtctcagtgccctgagagcctcaaccagtcagctcctccggt
ggggcgcgggcatgactatcgtcgcgcacttatgactgtctctttatcatgcaactcgtaggacaggtgcccgcagcgcctcctccgctctc
ctcactgactcgcctcggctcgttcggctgcccgcagcggatcagctcactcaaaaggcgtaatacggttatccacagaatcaggggat
aacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgtaaaaaggccgctgtggtggttttccataggctccg
ccccctgacgagcatcaaaaaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaaccgacaggactataaagataaccaggcgttccccctgg
aagctccctcgtgcctctcctgttccgacctgcccgttacggatacctgtcccctttctccctcgggaagcgtggcgctttctcatagctc
gctgtaggatctcagttcgggtgaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcaagacccccgctcagcccagccgctgcccctatccgga
actatcgtcttgagccaaccggtaagacacgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcggaggtatgtaggc
ggtctacagagttctgaagtggtggcctaactcggctacactagaaaggacagttattggtatctgctgctgtaagccagttacctcgg
aaaagagttgtagctctgatccggcaaacaccacccgctgtagcgggtgtttttgttgcaagcagcagattacggcgagaaaaaag
gatcacaagaagatccttttctacggggctgacgctcagtggaacgaaaactcacgttaagggtttggtcatgattatcaaaaa
ggatctcacctagatcctttaaataaaatgaagtttaaatcaatcctaaagtataatgagtaaaacttggtcagcagttaccaatgctaatca
gtgaggcacctatctcagcagatctgtctatttcgctcatccatagttgcctgactccccgctcgtgtgataactcagatacgggagggttaccatc
ggccccagtgctgcaatgataccgagacccaagcctcaccggctccagattatcagcaataaaccagccagcgggaaggccgagc
cagaagtggtcctgcaactttaccgctccatccagctctattaattgttgcgggaagctagagtaagtagttccgagtaaatgttgcgcaac
gtttgtccattgctacagcagcagctgtgtgcaagcctcgttggatggtctcattcagctccggttccaacgatcaaggccgagttacatgatc
ccccatgttgcaaaaaagcgttagctcctcggctcctccgatcgtgtgcaagaagtaagttggcgcagtgattacactcatggtatggcagca
ctgcataattcttactgtcatgccatccgtaagatgcttttctgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgatggggcagcc
agttgctctgcccggcgaatacgggataataccgcccacatagcagaactttaaagtgctcatattgaaaacgcttctcggggcgaa
aactctcaaggatctaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttcagcatctttacttccaccagcgttctg
ggtgagcaaaaacaggaaggcaaaaatgcccgaaaaaagggaataagggcgacacggaaatgtgaatactcactctccttttcaatat
tattgaagcattatcagggttattgtctcatgagcggatacatattgaatgtattgaaaaatacaaaataggggtccgcccacattccccg
aaaagtgccacctgacgcgacctgtagcggcgattaagcggcggggtgtggtggttacgcccagcgtgaccgctacactgcccagcgc
ctagcggccgctccttccgttctccctctctcgcacgctcgggcttccccgtcaagcttaaatcgggggctccctttaggggtccgatt
agtgcttacggcacctcgacccccaaaaaactgattaggggtgattggttacgtagtggccatcgccctgatagacgggttttcgccccttgacgt
tggagtcacggttcttaatagtgactctgttccaaaactggaacaacactcaaccctatctcggctattctttgattataagggattttgcccatt
cggcctattggttaaaaaatgagctgatttaaaaaatggaacgcaatttaaaaaatggaacggtttacaatttccattcgcattcagcgtg
cgcaactgttgggaaggcgatcgtgcccgcctctcgttattaccgagcccaagctaccatgataagtaagtaataataggtacgggag
gtactggagcggcgcaataaaatctttatttaccatctgtgtgtgtttttgtgtaatcgatagtaacatacgcctctccatcaaaac
aaaacgaaacaaacaaactagcaaaaataggctgtccccagtgcaagtcaggtgccagaacatttctctatcgata

(CG unterstrichen, NFκB Bindungsstellen gelb unterlegt)

6.2 Ergänzende Abbildungen

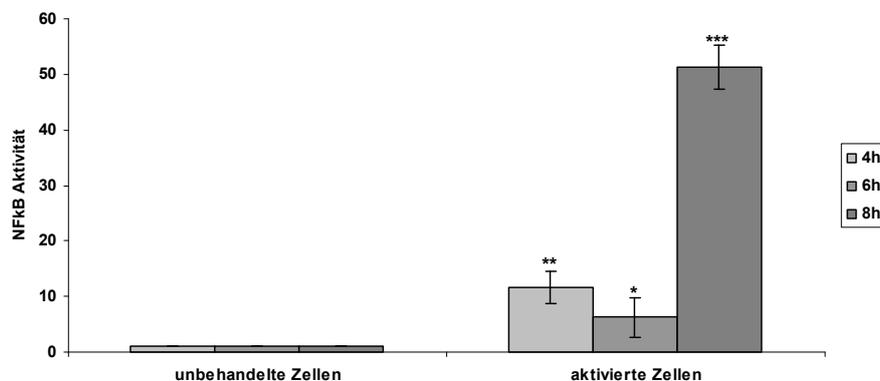


Abb. 6.2.1: Zeitreihe der TNF-α Aktivierung

A549 wurden mit mehreren Kopien der NFκB Bindungsstellen stabil transfiziert. Die Zellen wurden in einer Dichte von 50×10^4 Zellen auf eine 6-well Kulturschale ausgesät. Die Zellen wurden für 4h, 6h und 8 h mit 500 U/ml TNF-α aktiviert. Angegebenen sind Mittelwerte \pm Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten. (* $p \geq 0,05$, ** $p \geq 0,005$, *** $p \geq 0,001$) Eine optimale Aktivierung erhält man nach achtstündiger Behandlung mit TNF-α.

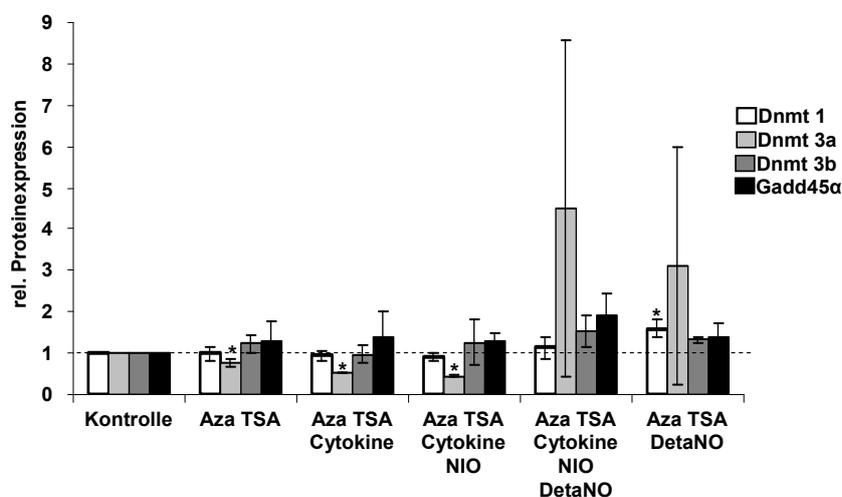


Abb. 6.2.2: Western Blot Analyse von DNMT 1, DNMT 3a, DNMT 3b und Gadd45 α

20 µg Protein der mit 5 µM Aza für 5 Tage, 20 nM TSA für 3 Tage, 200 U/ml IL-1β, 100U/ml IFN-γ, 500 U/ml TNF-α für 2 Tage, 250 µM NIO für 2 Tage und 1 mM DetaNO für 2 Tage behandelten Proben wurden mittels Western-Blot aufgetrennt und mit den Antikörpern Maus-anti-human-DNMT 1, anti-DNMT 3a, anti-DNMT 3b und anti-Gadd45α inkubiert. Alle Werte wurden relativ zur unbehandelten Kontrolle, bezogen auf β-Aktin, errechnet. N=3 * $p \geq 0,05$ (Daten mit freundlicher Zustimmung aus der Diplomarbeit „Modulierende Effekte von Stickstoffmonoxid auf Expression, Aktivität und subzelluläre Lokalisation der DNA-Methyltransferasen“ von Frau Dipl.-Biol. Christina Klaus, angefertigt in der Forschungsgruppe Immunbiologie, 2008)

6.3 Ergänzende Methoden

Für Abb. 4. 8: Gas-Chemilumineszenz

Material

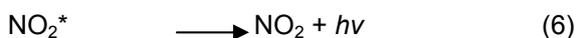
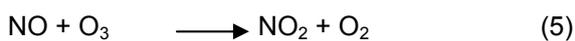
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Sigma-Alderich, Taufkirchen
Eisessig (konz. Essigsäure)	Merck, Darmstadt
Jodid (J ₂)	Sigma-Alderich, Taufkirchen
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt
Kaliumjodid (KJ)	Merck, Darmstadt
L-Lysin (free base 95-97%)	Sigma-Alderich, Taufkirchen
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Merck, Darmstadt
Phenolrot	Merck, Darmstadt
RPMI 1640 Medium mod. (ohne L-Glutamin, Ca(NO ₃) ₂ , L-Arginin)	Biochrom, Berlin
Tricine	Sigma-Alderich, Taufkirchen
Tris-Base	Roth, Karlsruhe

Methode

Mittels der Gas-Chemilumineszenz lässt sich äußerst sensitiv und spezifisch Stickstoffmonoxid bestimmen (Cox 1980, Hampl *et al.* 1996). Dabei werden Lichtquanten gemessen, welche stöchiometrisch bei der Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Ozon frei werden. Die Probe wird zunächst durch eine Jodid/Trijodid-Reduktionslösung geleitet, wodurch zuerst aus Nitrit Nitrosiumionen (1) frei werden und anschließend mit Jodid (I⁻) weiter zu NO reagieren (2, 3).



NO wird äquimolar aus Nitrit gebildet und ein konstanter Fluss an Helium erleichtert den Übertritt von NO in die Gasphase. Dem NO-Probengas wird Ozon zugesetzt, welches spezifisch mit NO zu Stickstoffdioxid reagiert, wobei 20 % in einen angeregten Zustand (NO₂^{*}) übergehen (4, 5). Diese Reaktion läuft sehr schnell ab (10⁻⁷ l × mol⁻¹ × s⁻¹ bei RT) (Hampl *et al.* 1996) und somit lassen sich auch schnelle Änderungen der NO-Konzentration erfassen. Die Energie des angeregten Zustandes kann durch Interaktion mit anderen Gasmolekülen oder als Photon (*hν*) abgegeben werden (6) (Hampl *et al.* 1996).



Es wird dabei Licht im Rot- und Infrarotbereich (600 – 3000 nm) mit einem Emissionsmaximum bei 1200 nm emittiert. Da höhere Stickoxide langsamer mit Ozon reagieren (Johnston *et al.* 1954), ist das emittierte Licht in einem großen Konzentrationsbereich linear proportional zum NO-Gehalt der Probe (Fontijn *et al.* 1970). Vor dem Detektor wird der Gasstrom durch eine 1 M Natriumhydroxidlösung (4 °C) geleitet, um Spuren von Jodid und Säure zu entfernen.

Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgt im Photoverstärker, welcher schwache Lichtsignale in elektrische Impulse umwandelt. Die Menge an Nitrit korreliert hierbei mit der Fläche des gemessenen Maximums, da die Höhe von anderen Faktoren, wie der Geschwindigkeit der Probeninjektion, abhängig ist (Marley *et al.* 2000).

Die Chemilumineszenzreaktion von NO und Ozon ist temperaturabhängig (Gorimar 1985), daher müssen die vorgegebenen Temperaturen exakt eingehalten werden.

Vor und während des Versuchs werden die Zellen in nitrat-freiem Medium (RPMI 1640 mod. (w/o Glutamin, w/o Arginin, w/o L-Lysin, w/o CaNO₂, w/o Phenolrot), 1 mM Natriumpyruvat, 60 U/ml Penicillin-Streptomycin, 2 mM GlutaMax, 1× nicht essentielle Aminosäuren, 10 mM Hepes, 10 % FCS hq (Endotoxingehalt ≤ 0,45 ng/ml), 0,1 mg/ml Phenolrot, 400 mg/l CaCl₂, 240 mg/l L-Arginin, 40 mg/l L-Lysin×HCl) kultiviert. Die Zellen werden mit PBS (4 °C) gewaschen und mit 350 µl Zell-Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 7,4), 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1 mM Neocuproine, 1 % Triton-X-100) lysiert. Anschließend werden die Proben kurz beschalt (3×, 10 sec, auf Eis) und vor Lichteinfall geschützt auf Eis aufbewahrt um thermolytische und photolytische Prozesse zu verhindern. Es werden 100 µl der Probe in die Gas-Chemilumineszenz-Anlage (Jodid/Trijodid-Reduktionslösung, 45 mM KJ, 10 mM J₂, 1,5 ml H₂O, 100 ml Eisessig) injiziert und die Fläche unterhalb des Maximums mittels des Eurochrom for Windows Programs ermittelt. Es wird zudem eine Standardkurve aus Natriumnitrat (50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 1000 nM) erstellt, um die Konzentrationen in den Proben zu quantifizieren. Die Proteinkonzentration der Proben wurde parallel mittels des Protein Bio Rad-Assays bestimmt und die Probenwerte auf den Proteingehalt normiert.

Für Abb. 6.2.2 Western Blot

Material

Antikörper Maus-anti-human-Dnmt 1 (monoklonal)	Imgenex, USA
Antikörper Maus-anti-human-Dnmt 3a (monoklonal)	Imgenex, USA
Antikörper Maus-anti-human-Dnmt 3b (monoklonal)	Imgenex, USA
Antikörper Maus-anti-human-Gadd45 α (monoklonal)	Santa Cruz Biotechnology, USA
Antikörper Ziege-anti-maus-HRP	Pierce, USA
Bicine	Sigma, Deutschland
Bis-Tris	Roth, Deutschland
NuPage 7% Tris-Acetat Gel 1.5 mm×10 well	Invitrogen, USA
NuPage Antioxidans	Invitrogen, USA
NuPage LDS Probenpuffer	Invitrogen, USA
NuPage Proben-reduzierendes Agens	Invitrogen, USA
SDS	Roth, Deutschland

Methode

Die Kernextraktion erfolgte mithilfe des „Nuclear Extraction Kit I“ der Firma Epigentek (USA), welches nach Herstellerangaben verwendet wurde. 20 µl der Probe werden mit 5 µl NUPAGE LDS Probenpuffer und 2 µl Reduktionsmittel versetzt und für 10 min bei 70 °C denaturiert. Die Proben werden in ein 7 % Tris-Acetat Gel geladen und bei 40 mA für ca. 1,5 Stunden aufgetrennt. Beim Blotting wird das Gel mit einer Nitrozellulosemembran in einem entsprechenden Blot-Modul fixiert und die Proteine von einem Tris-Acetat Gel bei 30 V auf die Nitrozellulosemembran übertragen

(NUPAGE Transferpuffer: 30,6 g Bicine, 39,37 g Bis-Tris, 2,25 g EDTA ad 375 ml bidest. H₂O; 20 × Tris-Acetat SDS Laufpuffer: 42 g Tricine, 28,4 g Tris, 4,7 g SDS ad 234,6 ml bidest. H₂O). Das Blocken der unspezifischen Antikörper-Bindungsstellen erfolgt mit der Blocklösung TBS/T_{0,05%} + 2 % BSA (ph 7,8) für 16 h bei 4°C (60 rpm). Die monoklonalen Antikörper Maus-anti-human-Dnmt 1, anti-Dnmt 3b, anti-Dnmt 3a und anti-Gadd45 α werden 1:200 mit TBS/T_{0,05%} + 0,5 % BSA (ph 7,8) verdünnt und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wird die Membran 3 × mit TBS/T_{0,05%} gewaschen. Der Zweitantikörper Ziege-anti-Maus-HRP wird 1:5000 mit TBS/T_{0,05%} + 0,5 % BSA verdünnt und 1 h bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit werden die Membranen 2 × mit TBS/T_{0,05%} gewaschen und für 5 min bei RT mit der Substratlösung benetzt. Die densitometrische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programms ImageJ.

6.4 Ergänzende Graphiken

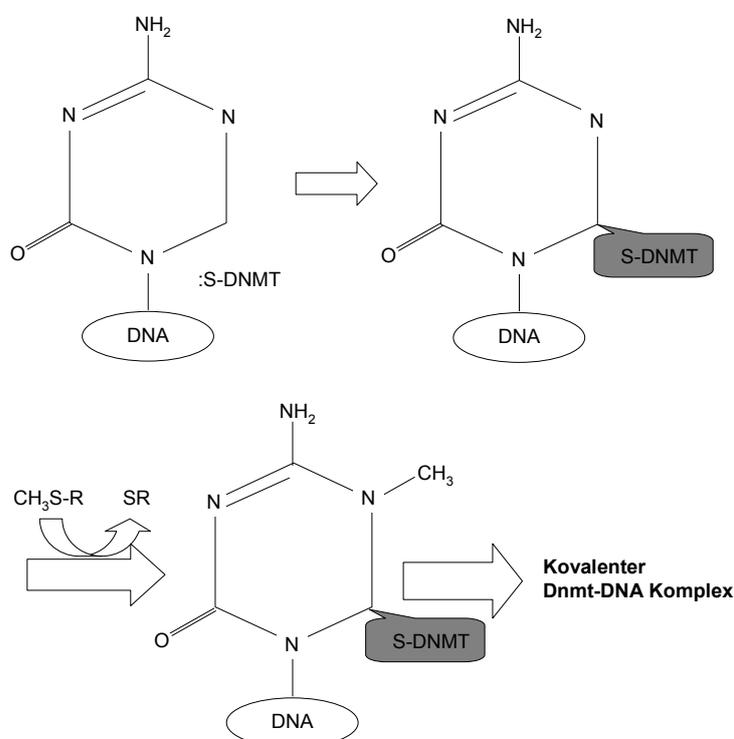


Abb. 6.4.1 DNA-Methylierungsreaktion mit Aza-substituierte DNA

Mechnismus der DNA-Methylierung mit Aza-substituierter DNA was zu einem Methylgruppentransfer an N-5 von Aza führt und zur Formierung eines stabilen Dnmt-DNA-Komplex führt. (Liu *et al.* 2003)

7.1 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 3.1.1: Verwendete Puffer und Lösungen
 Tabelle 3.1.2: Zellkulturmedien und Einfriermedien
 Tabelle 3.2.1: In dieser Studie verwendete Real-Time PCR Primer

7.2 Abbildungsverzeichnis

1. Einleitung

- Abb. 1.1: Mechanismus der DNA-Methylierung
 Abb. 1.2: Die drei Familien der DNMTs
 Abb. 1.3: Mechanismen der DNA-Methylierung,
 welche die Gentranskription behindern
 Abb. 1.4: Reaktionsprodukte von NO mit molekularem Sauerstoff
 Abb. 1.5: Schematische Reaktion der NOS
 Abb. 1.6: Struktur des humanen iNOS-Promotors

3. Material und Methoden

- Abb. 3.1.1: Strukturformel von DetaNO (a.) und DeaNO (b.)
 Abb. 3.1.2: Strukturformel von 5-Aza-2'-deoxycytidine (a.) und Trichostatin A (b.)

4. Ergebnisse

- Abb. 4.1: Einfluss der Methylierungsinhibitoren (Aza und TSA) auf die Zellproliferation
 Abb. 4.2: Höchst/PI-Färbung nach Behandlung mit 5 μ M Aza und 20 nMTSA
 Abb. 4.3: Einfluss von NO auf die Zellproliferation
 Abb. 4.4: Höchst/PI-Färbung nach Behandlung mit 1mM DetaNO
 Abb. 4.5: Einfluss von Methylierungsinhibitoren und NO auf
 die iNOS-Promotoraktivität
 Abb. 4.6: Einfluss von Methylierungsinhibitoren und NO auf die Aktivierbarkeit
 von NF κ B
 Abb. 4.7: Gleichzeitige Inhibition der Methylierung und der NO-Produktion führt zu
 einer stark erhöhten iNOS mRNA-Expression
 Abb. 4.8: NO-Freisetzung nach Blockierung der Methylierung und
 unter Entzündungsbedingungen

- Abb. 4.9: Evaluierung der ESI-MC zur Feststellung der Methylierung
- Abb. 4.10: Etablierung eines DNA-ELISA zur Quantifikation
des genomischen Methylierungsstatus
- Abb. 4.11: Messung des DNA-Methylierungsstatus mittels ESI-MC
- Abb. 4.12: Endogenes und exogenes Stickstoffmonoxid führen zu
einer Remethylierung des Genoms
- Abb. 4.13: Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die DNA-Methylierung
in primären humanen Keratinocyten
- Abb. 4.14: mRNA-Expression der Dnmt 1, Dnmt 3a, Dnmt 3b und Gadd 45 α
- Abb. 4.15: relative DNMTs Aktivität in A549iNOS
- Abb. 4.16: NO steigert die Aktivität der DNMT 1
- Abb. 4.17: NO in Kombination mit L-Cystein steigert die Aktivität der DNMT 3b
- Abb. 4.18: Methylierungsstatus im Vergleich von A549iNOS, 5367 und LNCAP
- Abb. 4.19: Einfluss von Stickstoffmonoxid auf die DNA-Methylierung und
die Aktivität der DNMTs in LNCAP und 5367

5. Diskussion

- Abb. 5.1: Mechanismus der DNA-Methylierung und mögliche S-Nitrosylierung
des Thiols
- Abb.5.2: Feedback-Regulationsmechanismus

6. Anhang

- Abb. 6.2.1: Zeitreihe der TNF- α Aktivierung
- Abb. 6.2.2: Western Blot Analyse von DNMT 1, DNMT 3a, DNMT 3b und Gadd45 α
(mit freundlicher Zustimmung aus der der Diplomarbeit „Modulierende Effekte von Stickstoffmonoxid auf Expression, Aktivität und subzelluläre Lokalisation der DNA-Methyltransferasen“ von Frau Dipl.-Biol. Christina Klaus, angefertigt in der Forschungsgruppe Immunbiologie, 2008)
- Abb. 6.4.1: DNA-Methylierungsreaktion mit Aza-substituierter DNA

7.3. Abkürzungsverzeichnis

A

AP-1	Aktivatorprotein 1
ATP	Adenosintriophosphat
Aza	5-Aza-2'-deoxycytidine

B

BH ₄	Tetrahydrobiopterin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin

C

CLD	Chemilumineszenzdetektion
-----	---------------------------

D

DeaNO	2-(N,N-Diethylamino)-diazolate-2-oxide diethylammoniumsalz
DetaNO	(Z)-1-[N-(2-aminoethyl)-N-(2-ammoniumethyl)amino]diazon-1-ium-1,2-diolat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DMSO	Dimethylsulfoxid

E

EDTA	Ethylendinitriol-tetraessigsäure Dinatriumsalz-Dihydrat
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest
eNOS	endotheliale NO-Synthase
EtOH	Ethanol

F

FCS	Fötales Kälber Serum
-----	----------------------

H

HIV	humaner Immunschwächevirus
-----	----------------------------

I

IFN	Interferon
IκB	Inhibitor von NFκB
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase

K

kB	kilobasen
kDa	Kilodalton

L

LPS	Lipopolysaccharid
-----	-------------------

N

NFκB	Nukleärerfaktor κB
NIO	L-N-(Iminoethyl)-ornithin-dihydrochlorid
nNOS	neuronale NO-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthasen

P

PBS	gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PI	Propidiumiodid

R

RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoff-Spezies
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur

S

SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
18s RNA	ribosomale NA

T

TBS	Tris-gepufferte Salzsäure
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSA	Trichostatin A
Tween 20	Polyoxyethyensorbitan Monolaurat

7.3 Publikationsverzeichnis

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

Publikationen

Kremer D., Schulz W., Kolb-Bachofen V. (2006)
 Increased NOS2 expression following DNA demethylation: A double-edged sword!
Nitric Oxide 14 (2006) A1-A16

Kremer D., Schulz W., Kolb-Bachofen V. (2008)
 No and epigenetics: New insights into the interplay between iNOS expression and
 DNA-methylation
Nitric Oxide 19 (2008) S20-S42

Kremer D., Klaus C., Schulz W. and Kolb-Bachofen V.
**INOS-generated NO and his essential role in the regulation of DNA-methylation
 in human endothelial cells (A549)**
In Vorbereitung

Kremer D., Metzger, S. and Kolb-Bachofen V.
Genomic DNA-methylation detection by an enzyme-linked assay
In Vorbereitung

Vorträge

Kremer D., Schulz W., Kolb-Bachofen V. (2005)
 DNA-Methylierung und die Expression der induzierbaren NO-Synthase in humanen
 Zellen
10. NO-Forum der deutschsprachigen Länder
 6.-7. Oktober 2005, Köln

Kremer D., Schulz W., Kolb-Bachofen V. (2005)
 DNA-Methylierung und die Expression der iNOS in humanen Epithelzellen
11. Workshop „Mechanismen der Zell- und Gewebeschädigung“
 8.-10. Dezember 2005, Xanten

Kremer D., Schulz W., Kolb-Bachofen V. (2006)
 iNOS-Expression und Methylierung: ein zweischneidiges Schwert!
12. Workshop „Zell- und Gewebeschädigung“
 7.-9. Dezember 2006, Xanten

Kremer D., Schulz W., Kolb-Bachofen V. (2007)

Wechselwirkungen zwischen DNA-Methylierung, Entzündung und NO-Synthese
2. Tag des wissenschaftlichen Nachwuchts, Düsseldorf
 22. Juni 2007, Düsseldorf

Kremer D., Schulz W., Kolb-Bachofen V. (2007)

iNOS - generated NO plays a critical role in DNA methylation
3rd International Symposium of the collaborative research Center 553 and 12th NO Forum of the German-speaking countries
 4-6. Oktober 2007, Mainz

Kremer D., Schulz W., Kolb-Bachofen V. (2008) *eingeladen*

NO and Epigenetics: New Insights into the Interplay between iNOS-Expression and DNA-Methylation
5th International Conference Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide
 24-28. August 2008, Bregenz, Österreich

Poster

Kremer D., Schulz W., Kolb-Bachofen V. (2006)

Increased NOS2 expression following DNA demethylation: a double-edged sword!
2nd Joint French-German Meeting on NO research
 5.-7. Oktober 2006, Hamburg

Kremer D., Schulz W., Kolb-Bachofen V. (2007)

Interaction between NOS2 Expression and Activity and DNA-Demethylation: A double-edged sword!
DMMC International Workshop: Epigenetics: From Mechanism to Medicine
 25.-26. Juni 2007, Dublin

Kremer D., Schulz W., Kolb-Bachofen V. (2007)

Inflammation and cancer: Is NO the common link?
1st International Conference on Nitric oxide (NO) and cancer
 26-28. November 2007, Paris

Kremer D., Schulz W., Kolb-Bachofen V. (2008)

iNOS – generated NO plays a critical role in DNA-Methylation
59. Mosbacher Kolloquium "Epigenetics-Molecular Principles and Mechanisms"
 26.-29. März 2008, Mosbach

7.5 Literaturverzeichnis

Ahn, K.S. and Aggarwal, B.B. (2005).

Transcription factor NFκB. *An.N.Y.Acad.Sci.*, 1056, 218-233

Alderton, W., Cooper, C.E. and Knowles, R.G. (2001).

Nitric oxide synthase: Structure, function and inhibition. *Biochem. J.*, 357, 593-615

Anstey NM., Weinberg JB., Hassanali MY., Mwaikambo ED., Manyenga D., Misukonis MA., Arnelle D.R., Hollis D, McDonald MI. and Granger DL. (1996).

Nitric oxide in tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression, *J.Exp.Med.*, 184, 557-567

Antequerra F. and Bird A. (1993).

Number of CpG islands and genes in human and mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90, 11995-11999

Asano, K., Chee, C.B., Gaston, B., Lilly, C.M., Gerard, C., Drazen, J.M. and Stamler, J.S. (1994).

Constitutive and inducible nitric oxide synthase gene expression, regulation and activation in human lung epithelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 91, 10089-10093

Attwood, J.T., Yung, R.L. and Richardson, B.C. (2002).

DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol. Life Sci.*, 59, 241-257

Bachman, K.E., Rountree, M.R. and Baylin, S.B. (2001).

Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localisation properties to heterochromatin. *J.Biol.Chem.* ,276, 3228-32287

Barreto, G., Schäfer, A., Marhold, J., Stach, D., Swaminathan, S.K., Handa, V., Döderlein, G., Maltry, N., Wu, W., Lyko, F. and Niehrs, C. (2007).

Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repair-mediated DNA demethylation. *Nature*, 445, 671-675

Berendji, D., Kolb-Bachofen, V., Meyer, K. L., Grapenthin, O., Weber, H., Wahn, V. and Kröncke, K.-D. (1997).

Nitric oxide mediates intracytoplasmic and intranuclear zinc release. *FEBS Letters*, 405, 37-41

Berkman, N., Robichaud, A., Robbins, R.A., Roesems, G., Haddad, E.B., Barnes, P.J. and Chung, K.F. (1996)

Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by interleukin-4 and interleukin-13 in human lung epithelial cells. *Immunology*, 89, 363-367

Bestor, T. H. (1992).

Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a zinc binding regulatory domain. *EMBO*, 11, 2611-2617

Bestor, T.H. (1998).

The host defence function of genomic methylation patterns. In: *Novartis Foundation Symposium vo. 214 Epigenetics pp 187-199*

Bestor, T.H. (2000).

The DNA methyltransferases of mammals. *Human Molecular Genetics*, 16, 2395-2402

Betz B., Florl A.R., Seifert H.-H., Dall P., Schulz W.A. and Niederacher D. (2004).

Denaturing high-performance liquid chromatography (DHPLC) as a reliable high-throughput prescreening method for aberrant promotor methylation in cancer. *Human Mutation*, 23, 612-620

Bogdanovic, O. and Veenestra, G.J. (2009).

DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: development requirements and function. *Chromosoma*, 118, 549-565

Boissel JP., Ohly D., Bros M., Godtel-Armbrust U., Forstermann U. and Frank S.(2004).

The neuronal nitric oxide synthase is upregulated in mouse skin repair and in response to epidermal growth factor in human HaCaT keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.*, 123, 132-139

Bourc'his, D., Xu, G.L., Lin, C.S., Bollman, B and Bestor, T.H. (2001).

Dnmt3l and the establishment of maternal genomic imprints. *Science*, 294, 2536-2539

Bruch-Gerharz, D., Schnorr, O., Suschek, C., Beck, K.-F., Pfeilschifter, J., Ruzicka, T. and Kolb-Bachofen, V. (2003)

Arginase 1 Overexpression in Psoriasis Limitation of Inducible Nitric Oxide Synthase Activity as a Molecular Mechanism for Keratinocyte Hyperproliferation. *American Journal of Pathology*, 162,1,203-211

Buechler, W.A. , Ivanova, K., Wolfram, G., Drummer, C., Heim, J.M. and Gerzer, R.(1994).

Soluble guanylyl cyclase and platelet function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 714,151-157.

Bult, H., Boeckxstaens, G.E., Pelckmans, P.A., Jordaens, F.H., Van Maercke, Y.M. and Herman, A.G. (1990).

Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic noncholinergic neurotransmitter. *Nature*, 345, 346-347.

Burnett, A.L., Lowenstein, C.J., Breddt, D.S., Chang, T.S. and Snyder, S.H. (1992).

Nitric oxide: a physiologic mediator of penile erection. *Science*, 257, 401-403

Caiafa P. and Zampieri M. (2005).

DNA methylation and chromatin structure: the puzzling CpG islands, *J. Cell. Biochem.*, 94, 257-265

Cedar, H. and Verdine, G.L. (1999).

Gene expression. The amazing demethylase. *Nature*, 397, 568-569

Chan, G.C, Fish, J.E., Mawji, I.A., Leung, D.D., Rachlis, A.C. and Marsden, P.A. (2005).

Epigenetic basis for the transcriptional hyporesponsiveness of the human inducible nitric oxide synthase gene in vascular endothelial cells. *J. Immunol*, 175 (6), 3846-3861

Chan, Y., Fish, J.E., D'Abreo, C.D., Lin, S., Robb, G.B., Teichert, A.-M., Karantzoulis-Fegaras, F., Keightly, A., Steer, B.M. and Marsden, P.A. (2004).

The cell-specific expression of endothelial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 279, 35087-35100

Chartrain N.A., Geller D.A., Koty P.P., Sitrin N.F., Nussler A.K., Hoffman E.P., Billiar T.R., Hutchinson N.I. and Mudgett J.S. (1993)

Molecular cloning, structure, and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.*, 269, 6765-6772

Christmann J. (2002).

5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their Implication for cancer therapy. *Oncogene*, 21, 5483-5495

Chu S.C., Marks-Konczalik J., Wu H.-P., Banks T.C. and Moss J. (1998).

Analysis of the cytokine-stimulated human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene: characterization of differences between human and mouse iNOS promoters. *Biochem. Biophysical. Res. Commun.*, 248, 871-878

Chuang, L.S., Ian, H.I., Koh, T.W., Ng, H.H., Xu, G. and Li, B.F. (1997).

Human DNA-(cytosine-5)methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF 1. *Science*, 277, 1996-2000

- Clark S. J., Harrison J., Paul C. J. und Frommer M. (1994).**
High sensitivity of methylated cytosines. *Nucleic Acids Research*. 22, 2990-2997
- Cox RD. (1980).**
Determination of nitrate and nitrite at the parts per billion level by chemiluminescence. *Anal. Chem.*, 52, 332-335
- Croen KD. (1993).**
Evidence for antiviral effect of nitric oxide. Inhibition of herpes simplex virus type 1 replication. *J.Clin.Invest.*, 91, 2446-2452
- Cronauer, M.V., Ince, Y., Engers, S. Rinnab, L., Weidemann, W., Suscheck, C.V., Burchardt, M., Kleinert, H., Wiedenmann, J., Sies, H., Ackermann, R. and Kröncke, K.D. (2007).**
Nitric oxide-mediated inhibition of androgen receptor activity : possible implications for prostate cancer progression. *Oncogene*, 26, 1875-1884
- Cvetkovic, I., Popadic, D., Vuckovic, O., Harhaji, L., Milijkovic, D. and Trajkovic, V (2004).**
5-aza-2'-deoxycytidine stimulates inducible nitric oxide synthase induction in C6 astrocytoma cells. *Brain Research*, 998, 83-90
- Dahl C. and Guldborg P. (2003).**
DNA methylation techniques. *Biogerontology*, 4, 233-250
- de Vera ME., Kim YE., Wong HR., Wang Q., Billiar TR., Geller DA. (1996).**
Heat shock response inhibits cytokine-inducible nitric oxide synthase expression in rat hepatocytes. *Hepatology*, 24, 1238-1245
- Denninger, J.W. and Marletta, M.A. (1999).**
Guanylate cyclase and the .NO/cGMP signaling pathway. *Biochim. Biophys. Acta*, 1411, 334-350.
- Desai, K.M., Sessa, W.C. and Vane, J.R. (1991).**
Involvement of nitric oxide in the reflex relaxation of the stomach to accommodate food or fluid. *Nature*, 351, 477-479.
- DeVera, M.E., Taylor, B.S., Wang, Q., Shapiro, R.H., Billiar, T.R. and Geller, D.A. (1997).**
Dexamethasone suppresses iNOS gene expression by upregulating I- κ B- α and inhibiting NF κ B. *Am.J.Physiol.*, 273, G1290-G1296
- Dolinoy DC, Huang D. and Jirtle RL (2007).**
Maternal nutrient supplementation counteracts bisphenol A-induced DNA hypomethylation in early development. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:13056-13061.
- Drapier JC., Wietzekin J. and Hibbs JB. (1988).**
Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.*, 18, 1587-1592
- Eads C.A., Danenberg K.D., Kawakami K., Saltz L.B., Blake C., Shibata D., Danenberg P.V. and Laird P.W. (2000).**
MethylLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 28, 32-39
- Ehrlich, M. and Wang, R.Y. (1981).**
5-Methylcytosine in eukaryotic DNA. *Science*, 212, 1350-1357
- Esteller, M. (2008).**
Epigenetics in cancer. *N. Engl. J. Med.*, 358, 1148-1159

Fatemi, M., Hermann, A., Pradhan, S. and Jeltsch, A. (2001).

The activity of murine DNA methyltransferase Dnmt 1 is controlled by interaction of the catalytic domain with the N-terminal part of the enzyme leading to an allosteric activation of the enzyme after binding to methylated DNA. *J. Mol. Biol.*, 309, 1189-1199

Finter, N.B. (1969).

Dye uptake methods of assessing viral cytopathogenicity and their application to interferon assays. *J. Gen Virol.*, 5, 419-425

Fish, J.E. and Marsden, P.A. (2006).

Endothelial nitri-oxide synthase: insight into the cell-specific gene regulation in the vsacular endothelium. *Cell Mol Life Sci*, 63, 144-162

Fish, J.E., Matouk, C.C., Rachlis, A., Lin, S., Tai, S.C., D'Abreo and Marsden, P.A. (2005).

The expression of endotehial nitric-oxide synthase is controlled by a cell-specific histone code. *J Biol Chem*, 280, 24824-24838

Fitzpatrick, D.R. and Wilson, C.B. (2003).

Methylation and demethylaton in the regulation of genes, cells and response in the immune system. *Clin Immun*, 109,37-45

Fontijn A., Sabadell AJ.and Ronco RJ. (1970).

Homogenous chemiluminescent measurement of nitric oxide with ozone. Implications for continuous selective monitoring of gaseous air pollutants. *Anal Chem*, 42, 579

Forrester, K., Ambs, S., Lupold, S.E., Kapust, R.B., Spillare, E.A., Weinberg, W.C., Felley Bosco, E., Wang, X.W. and Geller, D.A. (1996).

Nitric-oxide -induced p53 accumulation and regulation of inducible nitric oxide synthase expression by wildtype p53. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 93, 2442-2447

Ganster, R.W., Taylor, B.S., Shao, L. and Geller, D.A.(2001).

Complex regulation of human inducible nitric oxide synthase gene transcription by Stat1 and NFkB. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 98, 8638-8643

Gardiner-Garden M.and Formmer M. (1987).

CpG islands in vertebrate genomes, *J. Mol. Biol.*, 196, 261-282

Gaudet, F., Hodgson, J.G. and Eden, A. (2003).

Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science*, 300, 489-492

Ghosh, S., May, M.J. and Kopp, E.B. (1998).

NFkB and Rel proteins: evolutionary conserved mediators of immune response. *Annu.Rev.Immunol.*, 16,225-260

Goffin, J. and Eisenhauer, F. (2002).

DNA methyltransferase inhibitors-state of the art. *Anals of Oncology*, 13, 1699-1716

Goll, G.M., Kirpekar, F., Maggert, K.A., Yoder, J.A., Hsieh, C.L., Zhang, X., Golic, K.G., Jacobsen, S.E. and Bestor, T.H. (2006).

Methylation of tRNAsp by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science*, 311, 395-398

Gorimar TS. (1985).

Total nitrogen determination by chemiluminescence.

Van Dyke, 77-93, Boca Raton, FL, CRC Press. *Bioluminescence and Chemiluminescence*

- Haendeler, J., Hoffmann, J., Tischler, V., Berk, B.C., Zeiher, A.M., and Dimmler, S. (2002).**
Redox regulatory and anti-apoptotic functions of thioredoxin depend on S-nitrosylation at cysteine 69. *Nat Cell Biol*, 4, 743-749
- Hampf V., Walters CL. and Archer, SL. (1996).**
Determination of nitric oxide by the chemiluminescence reaction with ozone.
In: Methods in nitric oxide research Feelisch M, Stammler JS, John Wiley & Sons Ltd., Chichester
- Hanson MA and Gluckman PD (2008).**
Developmental origins of health and disease: new insights. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102:90-93.
- Hata, K., Okano, M., Lei, H. and Li, E. (2002).**
Dnmt3 cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, 129, 1983-1993
- Hemmerich K., Suschek CV., Lerzynski G. and Kolb-Bachofen V. (2003).**
iNOS activity is essential for endothelial stress gene expression protection against oxidative damage. *J. Appl. Physiol.*, 95, 1937-1946
- Hermann, A., Gowher, H. and Jeltsch, A. (2004).**
Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *CMLS*, 61, 2571-2587
- Hermann, A., Schmitt, S. and Jeltsch, A. (2003).**
The human Dnmt2 has residual DNA-(Cytosine-C5) methyltransferase activity. *J. Biol. Chem.*, 278, 31717-31721
- Hildesheim, J., Bulavin, D.V., Anver, M.R., Alvord, G., Hollander, M.C., Vardanian, L. and Fornace, A.J. (2002).**
Gadd45a protects against UV irradiation-induced skin tumors and promotes apoptosis and stress signaling via MAPK and p53. *Cancer Research*, 62, 7305-7315
- Hmadcha, A., Bedoya, F.J., Sobrino, F. and Pintado, E. (1999).**
Methylation-dependent gene silencing induced by interleukin 1 β via nitric oxide production. *J. Exp. Med.*, 11, 1595-1603
- Horoszewicz J.S., Leong S.S., Kawinski E., Karr J.P., Rosenthal H., Chu T.M., Mirand E.A. and Murphy G.P. (1983).**
LNCaP Model of human prostatic carcinoma. *Cancer research*, 43, 1809-1818
- Howell, C.Y., Bestor, T.H., Ding, F., Latham, K.E., Mertineit, C. and Tesler, J.M. (2001).**
Genomic imprinting disrupted by a maternal effect mutation in the Dnmt1 gene. *Cell*, 104, 829-838
- Hrabie, J.A., Klose, J.R., Wink, D.A. and Keefer, L.K. (1993).**
New nitric oxide-releasing zwitterions derived from polyamines. *J. Org. Chem.*, 58, 1472-1476
- Ibrahim A.E.K., Thorne N.P., Baird K., Barbosa-Morais N.L., Tavaré S., Collins V.P., Wyllie A.H., Arends M.J. and Brenton J.D. (2006).**
MMASS: an optimized array-based method for assessing CpG island methylation. *Nucleic Acids Research*, 34, 136-148
- Januchowski, R., Dabrowki, R., Ofori, H. and Jagodzinski, P.P. (2007).**
Trichostatin A down-regulates DNA methyltransferase 1 in Jurkat T cells. *Cancer Letters*, 246, 313-317
- Jelinic, P. and Shaw, P. (2007).**
Loss of imprinting and cancer. *J. Pathol.*, 211, 261-268

- Jeon, Y.J., Han, S.H., Lee, Y.W., Yea, S.S. and Yang, K.H. (1998).**
Inhibition of NFκB/Rel nuclear translocation by dexamethasone: mechanism of the inhibition of iNOS gene expression. *Biochem.Mol.Biol.Int.*, 45, 435-441
- Jin, S.-G., Guo, C. and Pfeifer, G.P. (2008).**
Gadd45a does not promote DNA demethylation. *PLoS Genetics*, 4, 3
- Jiricny J.(1996).**
Mismatch repair and cancer. *Cancer Surv.*, 28, 47-68
- Johnston HS. and Crosby HJ. (1954).**
Kinetics of the fast gas phase reaction between ozone and nitric oxide. *J. Chem. Phys.*, 22, 689-692
- Jones PA.and Rideout WM. (1992).**
Methylation, mutation and cancer. *Bioassays*, 14, 33-36
- Jourd'heuil, D., Jourd'heuil, F.L. and Feelisch, M. (2003).**
Oxidation and nitrosation of thiols at low micromolar exposure to nitric oxide. Evidence for a free radical mechanism. *J Biol Chem*, 278, 15720-15726
- Jüttermann, R., Li, E. and Jaenisch, R. (1994).**
Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 91, 11797-11801
- Kanai, Y. (2008).**
Alterations of DNA methylation and clinopathological diversity in human cancers. *Pathology International*, 58, 544-558
- Karupiah G., Xie QW., Buller RM., Nathan C., Duarte C.and MacMicking JD. (1993).**
Inhibition of viral replication by interferon-gamma-induced nitric oxide Synthase. *Science*, 261, 1445-1448
- Kim, J.K, Samaranayake M. and Pradhan, S. (2009).**
Epigenetic mechanism in mammals. *Cell. Mol. Life.Sci.*,66, 596-612
- Kleinert, H., Boissel, J.P., Schwarz, P.M. and Förstermann, U. (2000).**
Regulation of the expression of nitric oxide synthase isoforms.
In: Nitric Oxide: Biology and Pathobiology, pp. 105-128
- Kokura, K., Kaul, S.C., Wadhaw, R., Nomura, T., Khan, M.M., Shinagawa, T., Yasukawa, T., Colmenares, C. and Ishii, S. (2001).**
The ski protein family is required for MeCP2-mediated transcriptional repression. *J.Biol. Chem.*, 276, 34115-34121
- Kouzarides, T. (2007).**
Chromatin modifications and their function. *Cell*, 128, 693-705
- Krischel V., Bruch-Gerharz D., Suchek C., Kroncke KD., Ruzicka T. and Kolb-Bachofen V. (1998).**
Biphasic effect of exogenous nitric oxide on proliferation and differentiation in skin derived keratinocytes but not fibroblasts, *J. Invest. Dermatol.*, 111, 286-291
- Kröncke, K.D. (2003).**
Nitrosative stress and transcription. *Biol.Chem.*, 384, 1365-1377

Kröncke, K.D. and Carlberg, C. (2000).

Inactivation of zinc finger transcription factors provides a mechanism for a gene regulatory role of nitric oxide. *FASEB J.*, 13, 166-173

Kröncke, K.D., Fehsel, K., Schmidt, T., Zenke, T.F., Dasting, I., Wesner, J.R., Bettermann, H., Breunig, K.D. and Kolb-Bachofen, V. (1994).

Nitric oxide destroys zinc-sulfur clusters inducing zinc release from metallothionin and inhibition of the zinc finger-type yeast transcription activator LAC9. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 200, 1105-1110

Kröncke, K.D., Fehsel, K., Suschek, C. and Kolb-Bachofen, V. (2001).

Inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide in gene regulation, cell death and cell survival. *International Immunopharmacology*, 1, 1407-1420

Larsen, F., Gundersen, G. and Prydz, H.(1992).

Choice of enzymes for mapping based on CpG islands in the human genome. *Genet. Anal. Tech.Appl.*, 9, 80-85

Li, Y.-Q., Zhou, P.-Z., Zheng, X.-D., Walsh, C.P. and Xu, G.-L (2007).

Association of Dnmt3a and thymine DNA glycosylase links DNA methylation with base-excision repair. *Nucleic Acids Research*, 35, 390-400

Liew FY, Li Y, Severn A, Millott S, Schmidt J, Salter M and Moncada S (1991).

A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th2) cells of a Th1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages. *Eur J Immunol* 21:2489-94

Lin, I.G., Han, L., Taghva, A., OBrien, L.E. and Hsieh, C.L. (2002).

Murine de novo methyltransferase Dnmt3 demonstrates strand asymmetry and site preference in the methylation of DNA in vitro. *Mol. Cell. Biol.*, 22, 704-723

Liu, K., Wang, Y.F., Cantemir, C. and Muller, M.T. (2003).

Endogenous assay of DNA-methyltransferases: evidence for differential activities of DNMT1, DNMT2 and DNMT3 in mammalian cells in vivo. *Molecular and Cellular Biology*, 23, 2709-2719

Llovera, M., Pearson, J.D., Moreno, C. and Riveros-Moreno, V. (2001).

Impaired response to interferon- γ in activated macrophages due to tyrosine nitration of STAT1 by endogenous nitric oxide. *Br.J.Pharmacol.*, 132, 419-426

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.(1951).

Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. and Richmond, T.J. (1997).

Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389, 251-260

MacMicking J., Xie QW. and Nathan C. (1997).

Nitric oxide and macrophage function. *Annu.Rev.Immunol*, 15, 323-350

Maltseva, D.V., Bavkov, A.A., Jeltsch, A. and Gromova, S. (2009).

Impact of 7,8-Dihydro-8-oxoguanine on methylation of the CpG site by Dnmt 3a. *Biochemistry*, 48, 1361-1368

Marks P., Richon V., Breslow R. and Rifkind R.(2001).

Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Current Opinion in Oncology*, 13(6), 477-483

Marley R., Feelisch M., Holt S. and Moore K. (2000).

A chemiluminescence-based assay for S-nitrosoalbumin and other plasma S-nitrosothiols. *Free Radic Res*, 32, 1-9

- Marsden PA., Schapert ICT., Chen HS., Flowers M., Sundell CL., Wilcox JN., Camas S. and Michel T. (1992).**
Molecular cloning and characterization of human endothelial nitric oxide synthase, *FEBS Lett.*, 307, 287-293
- Martinez-Ruir, A. and Lamas, S. (2007).**
Signalling by NO-induced protein S-nitrosylation and S-glutathionylation: convergences and divergences. *Cardiovasc. Res.*, 75, 220-228
- McCall TB, Feelisch M., Palmer RM. and Moncada S. (1991).**
Identification of N-iminoethyl-L-ornithine as an irreversible inhibitor of nitric oxide synthase in phagocytic cells. *Br J Pharmacol*, 102, 234-8
- Milutinovic, S., Zhuang, Q., Niveleau, A. and Szyf, M. (2003).**
Epigenomic stress response. *J. Biol. Chem*, 278, 14985-14995
- Moncada S. and Higgs EA. (1991).**
Endogenous nitric oxide; physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Invest.*, 21, 361-374
- Morgan, H.D., Santos, F., Green, K., Dean, W. and Reik, W. (2005).**
Epigenetics reprogramming in mammals. *Hum. Mol. Genet.*, 14, R47-R58
- Morley, D., Maragos, C. M., Zhang, X.-Y., Boignon, M., Wink, D. and Keefer L. K. (1993).**
Mechanism of vascular relaxation induced by the nitric oxide (NO)/nucleophile complexes, a new class of NO-based vasodilators. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 21, 670-676
- Mukaida, N., Morita, M., Ishikawa, Y., Rice, N., Okamoto, S., Kasahara, T. and Matsushima, K. (1994).**
Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear-factor- κ B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression. *J. Biol. Chem.*, 269, 13289-13295
- Muller, P.Y., Janovjak, H., Miserez, A.R. and Dobbie, Z. (2002).**
Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. *Biotechniques*, 32, 1372-4, 1376, 1378-9
- Mulligan MS, Moncada S. and Ward PA. (1992).**
Protective effects of inhibitors of nitric oxide synthase immune complex-induced vasculitis. *Br J Pharmacol*. 107, 1159-62
- Nakane M., Schmidt HH., Pollock JS., Forstermann U. and Murad F. (1993).**
Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle. *FEBS Lett.*, 316, 175-180
- Nathan C. (1992).**
Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Lett.*, 6, 3051-3064
- Nunokawa, Y., Oikawa, S. and Tanaka, S. (1997).**
Expression of both promoter and 3'-regions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 233, 523-526
- Nunokawa, Y., Oikawa, S. and Tanaka, S. (1996).**
Human inducible nitric oxide synthase gene is transcriptionally regulated by nuclear factor- κ B dependent mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 223, 347-352
- Nussler A., Drapier JC., Renia L., Pied S., Miltgen F., Gentilini M. and Mazier D. (1991).**
L-arginine-dependent destruction of intrahepatic malaria parasites in response to tumor necrosis factor and/or interleukin 6 stimulation. *Eur. J. Immunol.*, 21, 227-230

- Oka, M., Meacham, A.M., Hamazaki, T., Rodic, N., Chang, L.-J. and Terada, N. (2005).**
De novo DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b primarily mediate the cytotoxic effect of 5-aza-2'-deoxycytidine. *Oncogene*, 24, 3091-3099
- Okano, M., Xie, S. and Li, E.(1998).**
Dnmt2 is not require for de novo and maintenance methylation of viral DNA in embryonic stemm cells. *Nucleic Acids Res.*, 26, 2536-1540
- Panayiotidies, M.I., Rancourt, R.C., Allen, C.B., Riddle, S.R., Schneider, B.K., Ahmad, S. and White, C.W. (2004).**
Hyperoxide-induced DNA damage causes decreased DNA methylation in human lung epithelial-like A549 cells. *Antioxidants & Redox Signalling*, 6, 129-136
- Peaston, A.E. and Whitelaw, E. (2006).**
Epigenetics and phenotypic variation in mammals. *Mamm. Genome*, 17, 365-374
- Pfaffl, M.W., Horgan, G.W. and Dempfle, L. (2002).**
Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30, e36
- Pfeifer, G.P., You, Y.H. and Besaratinia, A. (2005).**
Mutations induced by ultraviolet light. *Mutat.Res.*, 571, 19-31
- Quentmeier, H., Zaborski, M. and Drexler, H.G. (1997).**
The human bladder carcinoma cell line 5367 constitutivly secretes functional cytokines. *Leukemia Research*, 21, 343-350
- Rao, K.M.K. (2000).**
Molecular Mechanisms regulating iNOS expression invarious cell typer. *J.Tox.Env.Health*, 3, 27-58
- Razin, A. and Riggs, A.D. (1980).**
DNA methylation and gene function. *Science*, 210, 604-610
- Rees D.D., Palmer R.M., Schulz R., Hodson H.F.and Moncada S. (1990).**
Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, 101, 746-752
- Reik W.and Walter J. (2001).**
Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat. Rev. Genet.*, 2, 21-32
- Reynaud C. and Niveleau A. (1990).**
Methylated bases as tumor markers: detection and quantitation with a competitive enzyme-linked immunoassay. *Analytical letters*, 23, 31-45
- Richardson, B. (2003).**
DNA methylation and autoimmune disease. *Clin Immun*, 109, 72-79
- Robbins, R.A., Barnes, P.J., Springall, D.R., Warren, J.B., Kwon, O.J., Buttery, L.D.K., Wilson, A.J., Geller, D.A. and Polak, J.M.(1994).**
Expression of the inducible nitric oxide in human lung epithelial cells. *Biochem.Biophys.Res. Commun.*, 196, 274-279
- Robertson, K.D., Uzvolgyi, E., Liang, G., Talmadge, C., Sumegi, J., Gonzales, F.A. and Jones, P.A. (1999).**
The human methyltransferases (Dnmts) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissue and overexpression in tumors. *Nucleic Acis Research*, 27, 2291-2298

- Rockwell, G.A., Johnson, G. and Sibatani, A. (1987).**
In vitro senescence of human keratinocyte cultures. *Cell Struc Func*, 12, 539-548
- Roughi, A., Mager, D.L., Humphries, R.K. and Kuchenbauer, F. (2008).**
MiRNAs, epigenetics and cancer. *Mamm. Genome*, 19, 517-525
- Rountree, M.R., Bachman, K.E., Herman, J.G. and Baylin, S.B. (2001).**
DNA methylation, chromatin inheritance and cancer, *Oncogene*, 20, 3156-3165
- Saito, M. and Ishikawa, F. (2002).**
The mCpG-binding domain of human MBD 3 does not bind to mCpG but interacts with NuRD/Mi2 components HDAC 1 and MTB 2. *J.Biol.Chem.*, 277, 35434-35439
- Santos-Rosa, H. and Caldas, C. (2005).**
Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur.J.Cancer*, 41, 2381-2402
- Saura M., Zaragoza C., Bao C., McMillian A. and Lowenstein CJ. (1999).**
Interaction of interferon regulatory factor-1 and nuclear factor kappaB during activation of inducible nitric oxide synthase transcription. *J.Mol.Biol.*, 289, 459-471
- Scheule, R.K. (2000).**
The role of CpG motifs in immunostimulation and gene therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 44, 119-134
- Schmitz, M.L., Mattioli, I., Bus, H. and Kracht, M. (2004).**
NFkB: A multifaceted transcription factor regulated at several levels. *Chem. Bio. Chem.*, 5, 1348-1358
- Schneider-Stock R., Diab-Assef M., Rohrbeck A., Foltzer-Jourdainne C., Boltze C., Hartig R., Schönfel P., Roessner A., and Gali-Mohtasib H. (2005).**
5-azacytidine is a potent inhibitor of the DNA methyltransferase 3a and induces apoptosis in HCT -16 colon cancer cells via gadd45- and p53- dependent mechanisms.
The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 312,2,525-536
- Shiloh MU., MacMicking JD., Nicholson S., Brause JE., Potter S., Marino M., Fang F., Dinauer M. and Nathan C. (1999).**
Phenotype of mice and macrophages deficient in both phagocyte oxidase and inducible nitric oxide Synthase. *Immunity*, 10, 29-38
- Song L., James S.R., Kazim L.and Karpf A.R. (2005).**
Specific Method for the Determination of Genomic DNA Methylation by Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 77, 504-510
- Stach D., Schmitz O.J., Stilgenbauer S., Benner A., Döhner H., Wiessler M. and Lyko F. (2003).**
Capillary electrophoretic analysis of genomic DNA methylation levels. *Nucleic Acids Research*, 31, 2-8
- Stamler, J.S., Singel, D.J. and Loscalzo, J. (1992).**
Biochemistry of nitric oxide and its edox-activated forms. *Science*, 258, 1898-902.
- Sun, J., Stenbergen, C. and Murphy, E. (2006).**
S-Nitrosylation: NO-related redox signaling to protect against oxidative stress.
Antioxid Redox Signal., 8, 1693-1705
- Taylor, B.S., DeVera, M.E., Ganster, R.W., Wang, Q., Shapiro, R.A., Morris, S.M., Billiar, T.R. and Geller, D.A. (1998).**
Multiple NFkB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J.Biol.Chem.*, 273, 15148-15156

- Veras, D.A., Wilkins, L., Coble, D.W. and Lyon, S.B. (1989).**
DNA methylation and differentiation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 93, 687-690
- Waddington C.H. (1953).**
Epigenetics and evolution. *Sympo. Soc. Exp. Bio.*,7, 186-199
- Waddington, C.H. (1942).**
The Epigenotype. *Endeavour*, 1, 18-2035
- Welte K., Platzer E., Lu L., Gabilove J.L., Levi E., Mertelsmann R. and Moore M.A.S. (1985).**
Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 1526-1530
- Wink, D.A. and Mitchell, J.B. (1998).**
Chemical biology of nitric oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radic Biol Med*, 25, 434-56.
- Wong, A.H., Gottesman, I.I. and Petronis, A. (2005).**
Phenotypic differences in genetically identical organism: the epigenetic perspective. *Hum. Mol. Genet.*, 14, R11-R18
- Wu, J., Hu, C.-P., Gu, Q.-H., Li, Y.-P. and Song, M. (2010).**
Trichostatin A sensitizes cisplatin-resistant A549 cells to apoptosis by up-regulating death-associated protein kinase. *Acta Pharmacologia sinica*,31, 93-101
- Yang A.S., Estéicio M.R.H., Doshi K., Kondo Y., Tajara E.H. and Issa J.-P. (2004).**
A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements. *Nucleic Acids Research*, 32, 38-43
- Yin, J.H., Yan, D.I., Ku, G. and Hsu, C.Y. (2000).**
iNOS expression inhibits hypoxia-inducible-factor-1 activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 279, 30-34
- Yoder, J.A., Walsh, C.P. and Bestor, T.H. (1997).**
Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites. *Trends Genet.*, 13, 335-340
- Yu Z. and Kone BC. (2005).**
Targeted histone H4 acetylation via phosphoinositide 3-kinase and p70s6-kinase-dependent pathways inhibits iNOS induction in mesangial cells. *Am. J. Physiol Renal Physiol.*, 102, 13968-13973
- Yu, Z. and Kone, B.C. (2004).**
Hypermethylation of the inducible nitric-oxide synthase gene promoter inhibits its transcription. *J Biol. Chem.*, 279, 46954-46961
- Zhang, H., Teng, X., Snead, C. and Catravas, J.D. (2000).**
Non-NF-kappaB elements are required for full induction of the rat type II nitric oxide synthase in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*, 130, 270-8.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den 3.3.2010

Teile dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

Kremer D., Schulz W., Kolb-Bachofen V. (2006)

Increased NOS2 expression following DNA demethylation: A double-edged sword!
Nitric Oxide 14 (2006) A1-A16

Kremer D., Schulz W., Kolb-Bachofen V. (2008)

No and epigenetics: New insights into the interplay between iNOS expression and DNA-methylation
Nitric Oxide 19 (2008) S20-S42

Kremer D., Klaus C., Schulz W. and Kolb-Bachofen V.

iNOS-generated NO and his essential role in the regulation of DNA-methylation in human endothelial cells (A549)

In Vorbereitung

Kremer D., Metzger, S. and Kolb-Bachofen V.

Genomic DNA-methylation detection by an enzyme-linked assay

In Vorbereitung

Zur Ergänzung wurden die Abbildungen 4.8 (aus meiner Diplomarbeit „DNA-Methylierung und die Kontrolle der iNOS-Expression in humanen Zellen“ angefertigt in der Forschungsgruppe Immunbiologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf, 2006) und 6.2.2 (mit freundlicher Genehmigung aus der Diplomarbeit von Frau Dipl. Biol. Christina Klaus „Modulierende Effekte von Stickstoffmonoxid auf Expression, Aktivität und subzelluläre Lokalisation der DNA-Methyltransferasen“ angefertigt in der Forschungsgruppe Immunbiologie, Heinrich-Heine Universität, 2008) gezeigt und entsprechend markiert.

**Ein Gelehrter ist nicht nur ein Techniker;
er steht auch vor den Naturgesetzen wie ein Kind vor der Märchenwelt.**

Marie Curie

Das Erforschen dieser „Märchenwelt“ wäre ohne Hilfe nicht möglich, daher möchte ich danken:

Frau Prof. Dr. Viktoria Kolb-Bachofen (Forschungsgruppe Immunbiologie, HHU Düsseldorf) für die Bereitstellung der Mittel, die hilfreichen Tipps und Tricks im Laboralltag und die ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. Martin Beyè (Institut für Genetik, HHU Düsseldorf) für die Betreuung meiner Arbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät.

Herrn Prof. Dr. Wolfgang Schulz (Urologisches Forschungslabor, Universitätsklinik Düsseldorf) für die ständige Diskussionsbereitschaft in epigenetischen Fragen.

Frau Dr. Sabine Metzger (BMFZ, HHU Düsseldorf) für die Hilfe bei der Etablierung und den Messungen am Massenspektrometer.

Frau Dipl.-Biol. Christina Klaus für die Mitarbeit an diesem Thema und vielen vergnüglichen Stunden im Labor.

Sowie allen ehemaligen und aktuellen Mitgliedern der Forschungsgruppe Immunbiologie, welche auf die eine oder andere Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Danken möchte ich auch meinen Freunden für den Rückhalt in der „realen Welt“.

Ein großes Dankeschön geht an meine Familie, deren Liebe und Unterstützung mich immer trägt.

Lebenslauf

Daniela Kremer

Diplom-Biologin
geboren am 30.04.1981 in Meerbusch-Lank
ledig

Adresse

Aachener Strasse 50
40223 Düsseldorf

Schulbildung

1991-1994 Städtisches Meerbusch-Gymnasium
1994-2000 Ricarda-Huch-Gymnasium Krefeld

Hochschulstudium

2000-2001 Rheinische-Wilhelm Universität Bonn
Studienfach: Biologie

2001-2006 Heinrich-Heine Universität Düsseldorf
Abschluss: Diplom
Note: 1,77

Diplomarbeit:
DNA-Methylierung und die iNOS-Expression in
humanen Zellen
Note: 1,1

Seit 2006 Promotionsstudium
Projekt: Entzündung und epigenetische Regulation
der Genexpression-Funktion
durch Stickstoffmonoxid

Berufliche Tätigkeiten

2005-2006 Studentische Angestellte am Institut für molekulare
Medizin

Seit 2006 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für
molekulare Medizin