

# **Einfluss bakterieller Erreger auf das Epigenom und die Seneszenz von Wirtszellen**

**Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)**

**eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von**

**Dipl.-Biol. Sabrina Janßen  
aus Staaken (Berlin)**

**2013**

"Data! Data! Data!" he cried impatiently. "I can't make bricks without clay."

Sherlock Holmes in *The Adventure of the Copper Beeches* von Arthur Conan Doyle

Die vorliegende Arbeit wurde von April 2008 bis April 2013 am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie Berlin in der Abteilung Molekulare Biologie unter Leitung von Prof. Dr. Thomas F. Meyer angefertigt.

**1. Gutachter: Prof. Dr. T. F. Meyer**

**2. Gutachter: Prof. Dr. R. Mutzel**

Disputation am: 18.10.2013

**Teile dieser Arbeit wurden oder werden unter folgendem Titel veröffentlicht:**

**Janßen S.**, Gasparoni N., Gasparoni G., Walter J., Meyer T.F. Global analysis of differential DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. (in Vorbereitung)

Padberg I.\*, **Janßen S.\***, Meyer T.F. 2013. *Chlamydia trachomatis* inhibits telomeric DNA damage signaling via transient hTERT upregulation. *International Journal of Medical Microbiology*. 303(8):463-474. (**\*geteilte Erstautorenschaft**)

Fehri L.F., Rechner C.\*, **Janßen S.\***, Mak T.N., Holland C., Bartfeld S., Brüggemann H., Meyer T.F. 2009. *Helicobacter pylori*-induced modification of the histone H3 phosphorylation status in gastric epithelial cells reflects its impact on cell cycle regulation. *Epigenetics*. 4(8):577-86. (**\*geteilte Zweitautorenschaft**)

Experimentelle Mitarbeit von Cindy Rechner [**CRE**], Lina Fassi Fehri [**LFF**] und Inken Padberg [**IPA**] sind in den entsprechenden Abbildungsunterschriften vermerkt.

# INHALTSVERZEICHNIS

## KAPITEL 1 | EINLEITUNG

1.1	Vorwort.....	2
1.2	Karzinogenese .....	3
1.2.1	Kennzeichen der Karzinogenese: p53.....	3
1.2.2	Pathogene und Karzinogenese .....	5
1.3	Zellsterben.....	6
1.3.1	Seneszenz.....	6
1.3.1.1	Telomere.....	6
1.3.2	Apoptose.....	8
1.4	Epigenetik.....	9
1.4.1	DNA-Struktur und Chromosomen.....	10
1.4.2	Epigenetische Mechanismen .....	10
1.4.2.1	Histon-Modifikationen.....	11
1.4.2.2	DNA-Methylierung.....	12
1.4.3	Karzinogenese und Epigenetik.....	13
1.4.4	Pathogene und Epigenetik.....	16
1.5	Humanpathogene.....	17
1.5.1	<i>Helicobacter pylori</i> .....	17
1.5.1.1	Pathogenese .....	18
1.5.1.2	Virulenzfaktoren .....	19
1.5.2	<i>Chlamydia trachomatis</i> .....	22
1.5.2.1	Pathogenese .....	22
1.5.2.2	Entwicklungszyklus .....	23
1.5.2.3	Virulenzfaktoren .....	26
1.6	Zielsetzung der Arbeit.....	27

## KAPITEL 2 | MATERIALIEN UND METHODEN

2.1	Methoden der Zellkultivierung.....	29
-----	------------------------------------	----

2.1.1	Eukaryotische Zelllinien .....	29
2.1.1.1	Inhibitor-Behandlung .....	29
2.1.2	Prokaryotische Kulturen .....	30
<b>2.2</b>	<b>DNA-Techniken .....</b>	<b>32</b>
2.2.1	Extraktion und Reinigung von DNA .....	32
2.2.1.1	Agarose-Gelelektrophorese .....	32
2.2.1.2	Telomerlängen-Assay .....	32
2.2.2	MAP-on-Chip .....	32
2.2.2.1	MBD-Protein-Affinitätsaufreinigung .....	32
2.2.2.2	Human DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promotor Array .....	33
2.2.3	Bisulfit-DNA-Sequenzierung .....	33
2.2.3.1	Bisulfit-Konvertierung .....	33
2.2.3.2	Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit .....	34
<b>2.3</b>	<b>RNA-Techniken .....</b>	<b>34</b>
2.3.1	Extraktion und Reinigung von RNA .....	34
2.3.2	Quantitative <i>real time</i> PCR .....	35
2.3.3	RNA-Interferenz .....	36
2.3.4	RNA-Microarray .....	36
<b>2.4</b>	<b>Protein-Techniken .....</b>	<b>37</b>
2.4.1	SDS-Gelelektrophorese .....	37
2.4.2	Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) .....	39
2.4.3	Kinase-Aktivitätsassay .....	39
2.4.4	<i>Telomere Repeat Amplification Protocol</i> -Assay .....	39
<b>2.5</b>	<b>Mikroskopie .....</b>	<b>40</b>
2.5.1	Immunfluoreszenz .....	40
2.5.1.1	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung .....	40
2.5.2	Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie .....	41
2.5.3	Automatische Mikroskopie und Zellzyklus-Assay .....	41
<b>2.6</b>	<b><i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> .....</b>	<b>42</b>
2.6.1	Propidiumiodid-Assay .....	42

2.7	Bioinformatische Analysen.....	42
2.8	Statistische Analysen .....	43
 <b>KAPITEL 3   ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b>		
3.1	VORWORT .....	45
3.2	Teil I: <i>Helicobacter pylori</i> -induzierte Histon-Modifikationen in Magenepithelzellen und deren Auswirkungen auf Zellzyklus-Regulation und Wirtszell-Genexpression.....	46
3.2.1	Phosphorylierungsstatus von Histon H3 Serin 10 .....	46
3.2.2	Phosphorylierung von Histon H3 Serin 10 und Mitose.....	47
3.2.3	Zellzyklusarrest .....	50
3.2.4	Phosphorylierungsstatus von Histon H3 Threonin 3, Threonin 11 und Serin 28.....	50
3.2.5	Rolle der mitotischen Histonkinase VRK1.....	51
3.2.6	Erhöhte <i>HDAC9</i> - und <i>CLDN1</i> -Expression.....	52
3.2.7	Deacetylierung von Histon H3 Lysin 9.....	53
3.2.8	Typ-IV-Sekretionssystem- und CagA-abhängige <i>HDAC9</i> -Expression .....	54
3.2.9	<i>HDAC9</i> -abhängige Claudin-1-Expression .....	54
3.3	Diskussion: Teil I .....	56
3.4	Teil II: MAP-on-Chip und Bisulfit-DNA-Sequenzierung: Zwei Ansätze der globalen Methylom-Analyse einer mit <i>Helicobacter pylori</i> infizierten gastrischen Epithelzelllinie .....	64
3.4.1	MAP-on-Chip.....	66
3.4.1.1	Qualitätskontrolle .....	66
3.4.1.2	Datenanalyse .....	69
3.4.1.3	Biologische Replikate .....	70
3.4.1.4	Globale Methylierungsanalyse.....	70
3.4.1.5	Regionale Methylierungsanalyse.....	73
3.4.1.6	Beispiele differenziell methylierter Regionen.....	75
3.4.1.7	Funktionelle Analysen.....	76
3.4.1.8	Vergleich zwischen Transkriptom und Methylom .....	79
3.4.2	Bisulfit-DNA-Sequenzierung.....	80

3.4.2.1	Qualitätskontrolle und Datenanalyse .....	80
3.4.2.2	Biologische Replikate .....	82
3.4.2.3	Globale und regionale Methylierungsanalysen .....	83
3.4.2.4	<i>DNase I hypersensitive sites</i> .....	85
3.4.2.5	Funktionelle Analysen.....	86
3.5	Diskussion: Teil II .....	88
3.6	Teil III: <i>Chlamydia trachomatis</i> beeinflusst die Alterung der Wirtszelle durch Aktivierung der humane Telomeraseuntereinheit hTERT.....	99
3.6.1	Erhöhte <i>hTERT</i> -Expression und enzymatische Aktivität .....	99
3.6.2	Ceramid-abhängige Genexpression von <i>hTERT</i> .....	101
3.6.3	Reduktion von DNA-Schäden an Telomerenden .....	102
3.6.4	Reduzierte p21-Expression .....	104
3.6.5	Reduktion der p53-Bindung an den <i>CDKN1A</i> -Promotor.....	105
3.6.6	Inhibierung der Apoptose .....	106
3.7	Diskussion: Teil III .....	109
3.8	Fazit und Ausblick .....	116
 <b>KAPITEL 4   ANHANG</b>		
4.1	Literaturverzeichnis .....	119
4.2	Abkürzungsverzeichnis.....	138
4.3	Ergänzendes Material .....	142
4.4	Danksagungen .....	143
4.5	Curriculum Vitae.....	144
4.6	Publikationen.....	145
4.7	Selbständigkeitserklärung .....	146



## ABSTRACT

The widespread human pathogenic bacterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*, *Hpy*) colonizes the human stomach and causes ulcer disease, tumors (including gastric adenocarcinoma), and sporadically gastric mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma. Although *H. pylori* is recognized as a carcinogen by the WHO [1], so far the mechanism of carcinogenesis remains poorly understood. Therefore, a closer examination of the host cellular components affected by *H. pylori* infection, is of great importance. The presented work opens a new field in current science that deals with pathogen-induced epigenetic modifications on both histone and DNA level and investigates their potential impact on pathogenesis and carcinogenesis. Here, changes in cellular processes such as apoptosis and senescence can lead to pathological transformations of the host cell.

**Posttranslational modifications of histones** are an important component of epigenetic regulation. Bacterial- or toxin-induced changes in histone phosphorylation and acetylation can have drastic effects on various cellular metabolic pathways. This work reveals that *H. pylori* infection of gastric epithelial cells leads to changes in the phosphorylation of histone H3. In particular, a transient type IV secretion system (T4SS)-dependent dephosphorylation of serine 10 and threonine 3 as well as deacetylation of lysine 9 of histone H3 was detected. Furthermore, immunofluorescence experiments show an *H. pylori*-induced cell cycle arrest prior to entry into mitosis, which is a cause of the observed histone-dephosphorylation. The expression of histone deacetylase HDAC9 and the epithelial tight junction component claudin-1 was also found to be activated by *H. pylori* infections. This work profoundly confirms the hypothesis that the chromatin-architecture of the host cell is modified by *H. pylori* and thereby influences essential cellular processes such as the cell cycle progression.

**Epigenetic modification of DNA** due to rearrangement of methylation signatures represents an effective mechanism of gene regulation. Global analyzes based on methylation microarrays show broad differences in genome-wide methylation patterns of *H. pylori*-infected cells compared with controls. Thus, the majority of the investigated cytosine-phosphatidyl-guanine (CpG) islands is hypermethylated *post infectionem* (*p.i.*). In contrast, hypomethylation occurs mainly in promoter regions which results in altered transcription of cellular genes. Notably, particularly genes related to cancer pathways, components of the DNA and chromatin assembly as well as the RNA polymerase are differentially methylated.

Further, there are epidemiological data that allow an association between infections with *Chlamydia trachomatis* (*C. trachomatis*, *Ctr*) and several types of gynecological cancers – however, cellular mechanisms have not been described so far. A cell culture model based on doxycycline treatment of *C. trachomatis* infections could be established, which allows **investigating the impact and outcome of this infection on subsequent cell populations**. Here, it was demonstrated that mRNA expression of the catalytic subunit of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) increases during acute infections and leads to long-term alterations of the host cell. Increased *hTERT* mRNA expression is positively regulated by cellular ceramide. *hTERT* upregulation is abolished by inhibition of intracellular ceramide. Further, it could be demonstrated that in previously infected cells telomeres are present in an extended state and DNA damage signaling is reduced. Decreased DNA binding of p53 to the promoter region of the cell cycle regulator p21 and reduced p21 protein levels are found in cells cleared of the infection. This cell population develops an interesting phenotype: It exhibits an increased resistance towards etoposide-induced DNA damage and apoptosis. Thus, *C. trachomatis* is rigorously influencing host cellular aging, apoptosis and survival signaling pathways.

In conclusion, this work successfully identified pathogen driven (epi-)genetic alterations of the host cell. The data point to an implication for future treatment strategies in the race against pathogen-induced development of disease, inflammation and cancer, and give insights into the dynamic interplay of host and pathogen.

## ZUSAMMENFASSUNG

Das weltweit verbreitete humanpathogene Bakterium *Helicobacter pylori* (*H. pylori*, *Hpy*) besiedelt den menschlichen Magen und verursacht dort Ulkuserkrankungen, Tumore (u.a. das gastrische Adenokarzinom) und vereinzelt auch Lymphome des Mukosa-assoziierten lymphoiden Gewebes (MALT, *mucosa-associated lymphoid tissue*). Auch wenn *H. pylori* von der WHO als Karzinogen anerkannt ist [1], bleibt der Mechanismus der Karzinogenese bislang weitgehend unverstanden. Daher ist eine genauere Untersuchung der zellulären Komponenten des Wirts, die von der Infektion betroffen sind, von großer Bedeutung. Mit dieser Arbeit wird ein Wissenschaftsfeld erweitert, das sich mit Pathogen-induzierten epigenetischen Modifikationen auf Histon- und DNA-Ebene befasst und deren möglichen Einfluss auf Pathogenese und Karzinogenese nachgeht. Dabei tragen Veränderungen zellulärer Prozesse wie Apoptose und Seneszenz zu krankhaften Transformationen der Wirtszelle bei.

**Posttranslationale Modifikationen von Histonen** stellen eine wichtige Komponente der epigenetischen Regulation dar. Dabei können bakterielle oder Toxin-induzierte Veränderungen der

Histon-Phosphorylierung und -Acetylierung drastische Auswirkungen auf verschiedenste zelluläre Stoffwechselwege haben. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass die *H. pylori*-Infektion gastrischer Epithelzelllinien zu Veränderungen des Phosphorylierungsstatus von Histon H3 führt. Dabei findet insbesondere eine transiente, Typ-IV-Sekretionssystem(T4SS)-abhängige Dephosphorylierung von Serin 10 und Threonin 3 und eine Deacetylierung von Lysin 9 statt. Des Weiteren zeigen Immunfluoreszenz-Experimente einen *H. pylori*-induzierten Zellzyklusarrest vor Eintritt in die Mitose, der eine Ursache für die beobachtete Histondephosphorylierung darstellt. Die Expression der Histondeacetylase HDAC9 und der epithelialen Zellverbindungskomponente Claudin-1 wird ebenfalls durch die *H. pylori*-Infektion aktiviert. Damit erhärtet diese Arbeit die Hypothese, dass *H. pylori* das Wirtszellchromatin modifiziert und somit zentrale zelluläre Prozesse, wie beispielsweise den Zellzyklusverlauf beeinflusst.

Die **epigenetische Veränderung der DNA** aufgrund von Methylierungssignaturen stellt einen weiteren wirksamen Mechanismus der Genregulation dar. Globale Analysen, basierend auf Methylierungsmicroarrays, zeigen enorme genomweite Unterschiede im Methylierungsmuster *H. pylori*-infizierter Zellen im Gegensatz zu den Kontrollen. So ist die Mehrheit der untersuchten Cytosin-phosphatidyl-Guanin(CpG)-Inseln *post infectionem (p.i.)* hypermethyliert. Hypomethylierung tritt hingegen stark gehäuft in Promotorregionen auf, was eine veränderte Transkription zellulärer Gene zur Folge hat. Bemerkenswerterweise sind vor allem Gene von Krebssignalwegen, Komponenten des DNA- und Chromatinaufbaus sowie der RNA-Polymerase differenziell methyliert.

Darüber hinaus existieren epidemiologische Daten, die eine Verbindung zwischen der Infektion mit *Chlamydia trachomatis (C. trachomatis, Ctr)* und gynäkologischen Krebserkrankungen zulassen, jedoch sind auch hier bisher keine zellulären Mechanismen nachgewiesen. Basierend auf einer mittels Doxycyclin-behandelten *C. trachomatis*-infizierten Zellkultur wird in dieser Arbeit ein Modell beschrieben, das die Untersuchung der **Auswirkungen dieser Infektion auf nachfolgende Zellpopulationen** zulässt. Dabei zeigt sich, dass die mRNA-Expression der katalytischen Untereinheit der humanen Telomerase (*human telomerase reverse transcriptase, hTERT*) zum akuten Zeitpunkt der Infektion ansteigt und langfristige Veränderungen für die Wirtszelle nach sich zieht. Die dabei erhöhte hTERT-Expression wird positiv durch zelluläres Ceramid reguliert, sodass eine gesteigerte hTERT-Regulation durch Inhibition des zellulären Ceramid-Transports aufgehoben wird. In ehemals infizierten Zellen kann nachgewiesen werden, dass Telomere verlängert vorliegen und DNA-Schädigungen reduziert sind. Auch die DNA-Bindung von p53 an den Zellzyklus-Regulator p21 und dessen Proteinlevel ist in ehemals infizierten Zellen verringert. In Folge dessen entwickelt diese Zellpopulation eine verstärkte Resistenz gegenüber Etoposid-induzierten Schädigungen der DNA und Apoptose. *C. trachomatis* beeinflusst somit Apoptose und Alterung der Wirtszelle sowie entscheidende Signalwege für das Überleben der Wirtszelle.

Zusammenfassend erweitern die Ergebnisse dieser Arbeit unser Wissen über Pathogen-induzierte (epi-)genetische Modifikationen der Wirtszelle. Die Daten liefern einen Beitrag für zukünftige Behandlungsstrategien beim Wettlauf gegen Pathogen-bedingte Krankheits- und Krebsentstehung sowie tiefe Einblicke in die dynamische Wechselwirkung von Wirt und Pathogen.

**KAPITEL 1**  
**EINLEITUNG**

---

## 1.1 Vorwort

Das Dogma der Molekularbiologie, dass Vererbung ausschließlich auf der Ebene genetischer Informationen der DNA-Basensequenz stattfindet, ist gebrochen. Heutzutage weiß die Wissenschaft um eine zweite Dimension vererbbarer Botschaften, die neben der genetisch kodierten existiert: die Epigenetik. In den letzten Jahren hat dieses Wissenschaftsfeld immer mehr an Bedeutung gewonnen und es ist unverkennbar, dass epigenetische Modifikationen gleichermaßen für die Ausbildung von Phänotypen verantwortlich sind wie die genomische DNA-Sequenz. Darüber hinaus konnten Veränderungen der epigenetischen Landschaft wie die Methylierung von DNA und die damit einhergehende Stilllegung von Genen mit verschiedensten Krankheitsbildern bis hin zur Krebsentstehung in Verbindung gebracht werden.

Weitere epigenetische Mechanismen wurden in Anlehnung an den genetischen Code Histon-Code genannt und beziehen sich auf die DNA-Organisation und posttranslationale Veränderungen der Histone. Histon-Modifikationen wirken sich auf die Architektur des Chromatins und damit die DNA-Transkription aus, aber auch auf deren Reparatur, Rekombination und Replikation. Der Histon-Code kontrolliert eine große Bandbreite zellulärer Funktionen sowohl gesunder als auch kranker Zellen. Insbesondere die Erforschung der Krankheitszustände ist hier von großer Bedeutung, da dies für die Wissenschaft eine Fülle an möglichen Therapieansätzen bietet.

Die Hauptmechanismen der Epigenetik, DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen, sind demnach von Bedeutung für die Kontrolle des Chromatins. Chromatin-Modifikationen sind wichtige Regulatoren von Telomeren, die das molekulare Alter einer Zelle bestimmen.

Derzeit ist weitgehend unbekannt, welche Umwelteinflüsse den epigenetischen Code verändern können. Mit dieser Arbeit wird der Einfluss humanpathogener, karzinogener Bakterien auf die unterschiedlichen Ebenen der Epigenetik und Alterungsprozesse der Zelle untersucht und damit Modelle zu Krankheitsentstehung und möglichen Therapien geschaffen. Die Untersuchungen konzentrieren sich dabei auf *H. pylori* und *C. trachomatis*, zwei Pathogene, welche bezüglich ihrer Bedeutung für nationale Überwachungsbehörden und die epidemiologische Forschung vom Robert Koch-Institut zu den zehn wichtigsten Humanpathogenen gezählt werden [2].

## 1.2 Karzinogenese

Krebserkrankungen in ihren unterschiedlichsten Ausprägungen sind eine der ältesten Geißeln der Menschheit. Erste Beschreibungen von Brustkrebs sind auf das Jahr 3.000 vor Christus (v. Ch.) datiert und ziehen sich seither durch die Menschheitsgeschichte. Derartige Gewebewucherungen wurden von Hippocrates um 400 v. Ch. *carcinomas* (griechisch: Krebs) benannt [3]. Im Jahr 2008 wird die erschreckende Bilanz deutlich: weltweit wurden 12,7 Millionen Krebsfälle gemeldet; 7,6 Millionen Menschen starben an den Folgen einer Krebserkrankung [4].

Die verschiedenen Krebsmerkmale, die allesamt genetische Instabilität erzeugen, bilden sich im Verlauf der Tumorgenese heraus. Dazu gehört die Erhaltung proliferativer Signalwege, die Verhinderung von Wachstumssuppression und Zelltod, die replikative Unsterblichkeit, die Aktivierung von Invasion und Metastasierung und die Induktion von Angiogenese [5].

Auffällig sind gewisse Ähnlichkeiten zwischen einer Krebszelle und einer Pathogen-infizierten Zelle. So kann es beispielsweise in beiden Systemen zur Aktivierung mitogener und antiapoptotischer Signalwege, verstärkter Proliferation und Motilität sowie zur Hochregulation von Krebsmarkern kommen. Auch Krebserkrankungen und das Altern von Zellen zeigen in ihrer biologischen Ausprägung viele Gemeinsamkeiten, primär resultieren beide aus der Akkumulation von Zellschäden [6].

Krebs kann als genetische Erkrankung betrachtet werden, die durch einen Auslöser (physikalische, chemische oder biologische Substanz) induziert wird, zu einer zellulären Veränderung führt und unverhältnismäßig viele Mutationen nach sich zieht. Dabei können Apoptoseresistenz, verzögerte Seneszenz und Verlust der Zellzykluskontrolle sowie des DNA-Reparaturprozesses auftreten und als Auslöser unkontrollierter Proliferation und damit Anhäufung von fehlerhaftem Gewebe wirken. Bereits 1983 wurden die ersten Veränderungen im Epigenom von Krebsgewebe beschrieben. Feinberg und Vogelstein beobachteten eine Gen-spezifische Demethylierung [7, 8]. Unabhängig von diesen Ergebnissen beschreiben Gama-Sosa *et al.* eine globale Abnahme des Gehalts an 5-Methylcytosin (5mC) in Tumor-Proben [9-11]. Diese Untersuchungen zeigen die Bedeutung der DNA-Methylierung für die Krebsentstehung und liefern die Basis für weiterführende Untersuchungen.

### 1.2.1 Kennzeichen der Karzinogenese: p53

Ein charakteristisches und gut untersuchtes Kennzeichen von Krebs ist das Tumorsuppressorgen *TP53* (*tumor protein p53*), das für den Transkriptionsfaktor p53 kodiert, welcher in entarteten Zellen dereguliert oder mutiert vorliegt. Als Antwort auf Stress induziert p53 sowohl über den intrinsischen als auch extrinsischen Signalweg Apoptose, Zellzyklusarrest und Seneszenz. Der Verlust der p53-Funktion ist somit ein zentrales Kennzeichen bei humanem Krebs. Die Hemmung des programmierten Zelltods geht mit einer zellulären Unsterblichkeit einher. Mutationen des p53-Gens treten in über 50 % aller humanen Tumore auf [12].

Dem Protein p53 kommt eine unabkömmliche globale Rolle in der humanen Zelle zu. Besonders deutlich wird dies in genomweiten Chromatin-Immünpräzipitations(ChIP)-Experimenten, welche die Bindung von p53 an Tausende von Genen demonstrieren [13]. In der Regel tritt p53 als Tumorsuppressor auf. In der gesunden Zelle ist p53 an seinen negativen Regulator Mdm2 (*murine double minute 2*) gebunden, der die Aktivität des Proteins inhibiert und es vom Nukleus ins Zytoplasma transportiert. Die Ubiquitinligase Mdm2 fördert die Degradation von p53 durch das Proteasom, indem es p53 markiert. Gleichzeitig wird p53 regelmäßig nachgebildet. Kommt es zu zellulärem Stress wie Schädigungen der DNA, Verkürzung von Telomeren, Expression von Onkogenen, Nährstoff- und Sauerstoffmangel, wird p53 aktiviert. Zum einen wird es posttranslational stabilisiert [14] und akkumuliert in der Zelle. Zum anderen wird p53 N-terminal phosphoryliert und durch Konformationsänderung zum aktiven Transkriptionsregulator. Der Weg zur Stimulation von p53 durch Stressoren vollzieht sich über die Aktivierung von Kinasen wie ATM (*ataxia telangiectasia mutated*) oder ATR (*ataxia telangiectasia and Rad3 related*) [15-17]. Sind diese Kinasen aktiviert, phosphorylieren sie nachgeschaltete Faktoren der Signalkaskade wie die Serin/Threonin-Proteinkinasen Chk1 und Chk2 (*cell cycle checkpoint kinase 1 und 2*), die daraufhin p53 phosphorylieren [18]. Auf alternativem Weg kann p53 auch direkt durch ATM oder ATR phosphoryliert werden. Die Phosphorylierung von p53 hat die Verdrängung des an p53 gebundenen Regulators Mdm2 zur Folge. Das p53-Protein zeichnet sich durch verschiedene Domänen aus, die für Sequenz-spezifische DNA-Bindung und transkriptionelle Aktivierung verantwortlich sind. Entsprechend ist im Krebsfall die p53-DNA-Bindedomäne am *CDNK1A*-Promotor häufig mutiert [19]. Weitere Möglichkeiten zur Modifikation von p53 sind die Phosphorylierung, Ubiquitylierung, Acetylierung, SUMOylierung oder Methylierung der C-terminalen Lysine [14].

Nach Schädigung der Zelle reguliert p53 die Transkription diverser Gene, veranlasst Zellzyklusarrest, setzt Reparaturmechanismen in Gang und verhindert so genomische Instabilität [20]. Der Stopp des Zellzyklus ist nur transient und gibt der Zelle Zeit, die entstandenen Schäden zu reparieren und damit deren Weitergabe an Tochterzellen zu verhindern.

Aktiviertes p53 stimuliert die Transkription von p21, dem universellen Inhibitor von Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDKs) und dadurch negativer Regulator des Zellzyklus [21, 22]. Eine Funktion der CDKs ist auch die Phosphorylierung und Inaktivierung des Tumorsuppressorproteins Rb (Retinoblastom), dessen Dysfunktion ein weiteres Krebsmerkmal ist [23]. Das Tumorsuppressorprotein Rb reguliert unter anderem den Zellzyklus und rekrutiert verschiedene Enzyme des Chromatinumbaus, wie z.B. Methylasen und Acetylasen [24].

Werden Onkogene aktiviert, kommt es zur Expression von Arf (*alternate reading frame*), das mit Mdm2 stabile Komplexe bildet und es dabei inhibiert. Dadurch wird abermals die Interaktion von p53 und Mdm2 zerstört, sodass folglich p53 akkumuliert, stabilisiert und aktiviert wird [20, 25].

Studien mit Mäusen zeigen, dass dysfunktionale Telomere p53-abhängige Apoptose aktivieren können [26, 27]. Sind die Schäden der Zelle irreparabel, akkumuliert p53 und aktiviert Mitglieder der BCL2(*B-cell lymphoma 2*)-Familie, wie den proapoptotischen Proteinen Puma (*p53 upregulated modulator of apoptosis*) oder Bax (*BCL2-associated X protein*), die wiederum in Form einer Signalkaskade Caspasen aktivieren und so zur Apoptose führen.



In vielen Formen von Krebs ist die aktivierende Regulation des Enzyms Telomerase involviert, welches die Chromosomenenden erhält. Darüber hinaus stellt die Expressionsstärke des Proteins hTERT, der katalytischen Untereinheit der Telomerase, einen Indikator für die biologische Aggressivität der Tumorgenese dar und wird damit zum potenziellen diagnostischen Marker [28, 29].

### 1.2.2 Pathogene und Karzinogenese

Die *American Cancer Society* gibt an, dass 15-20 % der weltweiten Krebsfälle infektionsbedingt hervorgerufen werden [30]. Viele dieser humanen Pathogene sind dafür bekannt, dass sie Langzeitinfektionen im Wirt auslösen, das Immunsystem unterdrücken und direkt die zelluläre DNA modifizieren. Jede dieser Veränderungen kann zu einer erhöhten Prävalenz für Krebs führen [31].

Krebsauslösende Wirkungen sind vor allem bei Viren wissenschaftlich untersucht und bestätigt, nicht jedoch bei Bakterien. Beispiele sind das humane Papillomavirus (HPV), das Epstein-Barr-Virus (EBV), Hepatitis-B- und Hepatitis-C-Viren, das humane Herpesvirus 8 (HHV-8) und das humane T-lymphotrope Virus 1 (HTLV-1). Auch der Zusammenhang viraler Erkrankungen mit der Entstehung von Krebs war lange Zeit umstritten, bis im Jahr 1976 eine klare Kausalität von Harald zur Hausen hergestellt wurde. Er konnte zeigen, dass HP-Viren (insbesondere HPV-16 und -18) Zervixkarzinome verursachen [32, 33].

Gerade weil es sich bei der Untersuchung der krebserregenden Fähigkeit von Bakterien um ein neues und wenig untersuchtes Wissenschaftsfeld handelt, ist es umso erstaunlicher, dass bereits im Jahr 1890 der Pathologe William Russell (1852-1940) Indizien einer bakteriellen Ursache für die Tumorentstehung fand [34]. Lediglich für ein humanpathogenes Bakterium ist dieser Zusammenhang von der WHO seit 1994 anerkannt: *Helicobacter pylori* [1]. Auch die folgenden Bakterien wurden mit Krebs assoziiert, sind formal allerdings nicht als Karzinogen bestätigt: *Salmonella spp.*, *Chlamydia spp.*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Streptococcus bovis*, *Mycoplasma genitalium* und *Propionibacterium acnes* [35, 36]. Salmonellen-Infektionen sind durch eine relativ starke Assoziation mit Gallenblasen- und Leber-Gallen-Karzinomen charakterisiert [37, 38]. Chronische *Chlamydia pneumoniae*-Infektion erhöht das Risiko von Lungenkrebs in starkem Maße [39]. Auch von *Chlamydia trachomatis* und *Mycoplasma genitalium* konnte gezeigt werden, dass sie die weiblichen Reproduktionsorgane schädigen und potenziell zu epithelialen Eileiterkrebs führen [40]. Erkrankungen durch *Streptococcus bovis* werden sowohl mit Kolon-Neoplasien als auch extrakolonischer Malignität assoziiert [41]. Auch Mycoplasmen der Arten *M. genitalium* und *M. hyorhinis* wurden erstmals mit malignen Transformationen humaner Epithelzellen in Verbindung gebracht und könnten daher eine Verbindung zwischen Prostatitis und Prostatakrebs herstellen [42]. Interessanterweise konnte *Propionibacterium acnes* in Prostatakrebsgewebe nachgewiesen und mittels *in vitro*-Studien eine infektionsbedingte Überexpression von Wachstums- und Proliferationsgenen demonstriert werden [43]. Auch *Mycobacterium tuberculosis* wurde bereits mit Lungenkrebs und Kaposi-Sarkomen in Verbindung gebracht, allerdings nur mit geringer Inzidenz [36].

Als allgegenwärtiges kommensales Bakterium kommt *Escherichia coli* in diesem Zusammenhang eine herausragende Stellung zu. Eine kürzlich veröffentlichte Studie der Universität von North

Carolina zeigt, dass Entzündungen der Darmflora die Proliferation von genotoxischen Kommensalen begünstigen. Des Weiteren fördert das *E. coli*-Genotoxin Colibaktin bei Mäusen die Entstehung von Darmkrebs [44]. Aber auch vorangegangene Studien verweisen auf eine Assoziationen zwischen schweren Erkrankungen des Darms wie Morbus Crohn oder kolorektalen Karzinomen einerseits und *E. coli* andererseits [45-48].

Ferner ist auch bei humanpathogenen Parasiten ein Zusammenhang zwischen Infektion und Karzinogenese dokumentiert, beispielsweise werden *Schistosoma spp.* mit Blasenkrebs und der Leberegel *Opisthorchis viverrini* mit Gallengangskarzinom assoziiert [36].

Das junge Wissenschaftsfeld der Pathogen-induzierten Karzinogenese bedarf noch weiterer Untersuchungen und stellt spannende Erkenntnisse zur Ursache und Entstehung von Krebs bereit.

## 1.3 Zellsterben

Der Zelltod stellt einen kontrollierten Mechanismus dar, welcher unabdingbar für die Entwicklung eines Organismus, die Immunregulation sowie die Homöostase der Zelle ist. Mechanismen des Zelltods werden aufgrund ihrer Morphologie klassifiziert: Apoptose, Autophagie und Nekrose [49]. Um den Organismus vor Tumorbildung zu bewahren, können Zellen, deren DNA stark geschädigt ist, in den programmierten Zelltod (Apoptose) eintreten oder durch einen vorzeitigen Alterungsprozess (Seneszenz) ihre Zellteilungsaktivitäten einstellen [50].

### 1.3.1 Seneszenz

Zelluläre Seneszenz wird durch oxidativen Stress, DNA-Schäden oder onkogene Aktivierung induziert [51]. Im Zustand der Seneszenz wird die Teilungsaktivität der Zelle beständig gehemmt, sodass sich die Zellen in einem Ruhezustand befinden [50]. *In vivo* stellt der Mechanismus der Seneszenz einen wichtigen Prozess bei der Suppression von Tumoren dar. Senescente Zellen zeichnen sich durch ihre zunehmende Größe und abgeflachte Form aus. Außerdem kommt es zur Expression verschiedener Seneszenz-assoziiierter Marker wie  $\beta$ -Galactosidase, p21 und p53 [51]. Signalgeber der Seneszenz-Aktivierung sind die sich bei jeder Zellteilung verkürzenden Telomerenden der Chromosomen. Dieses Phänomen wird als *Hayflick limit* [52] bezeichnet.

#### 1.3.1.1 Telomere

Telomere sind Tandem-Wiederholungen der Sequenz TTAGGG (in Vertebraten), die an den Enden von linearen eukaryotischen Chromosomen auftreten. Ist das Enzym Telomerase aktiv, fügt es diese DNA-Sequenzwiederholungen an das 3'-Ende des DNA-Stranges an, der sich in der Telomerregion befindet. Die natürliche Expression der Telomerase ist auf die Zellen der Keimbahn und Stammzellen beschränkt [53]. Die Expression der katalytischen Untereinheit hTERT ist die wichtigste Determinante der Telomerase-Aktivität [54, 55].

Die Aufgaben der Telomere umfassen den Schutz der Chromosomenenden vor Degradation und Fusion; sie verhindern, dass diese fälschlicherweise als Doppelstrangbrüche erkannt werden. Des Weiteren ermöglichen Telomere die Replikation der Chromosomen und positionieren diese im Nukleus [56, 57]. Der Schutz der Chromosomenenden wird möglich, da die repetitiven Sequenzen der Telomere von Doppelstrang- und Einzelstrang-DNA-bindenden Proteinen, dem sogenannten Shelterin-Komplex, sichernd umgeben werden. Dieser Komplex kontrolliert die Telomer-Struktur und -Aktivität an den finalen Telomeren. Die Telomere enden mit 3'-Einzelstrang-Überhängen, die als Schlaufe zurückgeschlagen mit sich selbst hybridisieren und so die protektive Schleifenstruktur erzeugen [58-60].

Die Aktivität der Telomerase ist durch die Expression des humanen Gens hTERT definiert. Diese reverse Transkriptase ist Bestandteil der Telomerase. Die katalytische Untereinheit nutzt ihr eigenes RNA-Molekül als Vorlage für die Verlängerung der Telomere und produziert Einzelstrang-DNA [61]. Mit dieser Funktion kommt der Telomerase, insbesondere der limitierenden katalytischen Untereinheit hTERT, eine Schlüsselrolle bei der zellulären Immortalisierung und Karzinogenese zu [62].

Im Verlauf der Replikation des DNA-Leitstranges erfolgt die Verlängerung der Primer in Richtung des 3'-Endes. An den Enden der Chromosomen hinterlässt der terminale Primer (3'-Ende) einen DNA-Bereich, der nicht repliziert werden kann [63]. Mit jedem Zellzyklus gehen dadurch bis zu 200 Nukleotide an den Chromosomenenden verloren, was jedoch noch nicht zur Schädigung der Wirts-DNA führt. Je nach Zellart wird nach etwa 60-70 Verdoppelungen ein kritischer Punkt erreicht [64], an dem die Telomeren nicht weiter verkürzt werden können, es zur Auslösung einer Antwort auf DNA-Schäden (*DNA damage response, DDR*) kommt [65] und dysfunktionale Telomere als DNA-Doppelstrangbrüche erkannt werden. Solche kritisch kurzen Telomere können die schützende Kappen-Struktur am Ende der Chromosomen nicht aufrechterhalten.

Diverse Transkriptionsfaktor-Bindestellen des hTERT-Promotors weisen darauf hin, dass dieser einer Vielzahl zellulärer Kontrollmechanismen unterworfen ist [54]. Ein wichtiger Aktivator von hTERT ist das proliferations- und wachstumsfördernde Protoonkogen c-Myc [66]. Auch eine direkte Interaktion mit p53 wurde beschrieben, bei der es zur Hemmung der p53-Aktivierung kommt [67, 68]. Die Zeit bis zur Seneszenz kann durch die Inaktivierung von p53 verlängert werden, was allerdings auch die Wahrscheinlichkeit einer Tumorentwicklung erhöht [69]. Doch während p53 aktivierend auf hTERT wirkt, fungiert das *CDKN1A*-Genprodukt p21 als Inhibitor. Die Überexpression von p21 führt zur Inhibierung der Telomerase-Aktivität und zur Reduktion der mRNA-Expression von hTERT [70]. Ein weiterer Repressor der hTERT-Expression ist zelluläres Ceramid, das über die Deacetylierung des Transkriptionsfaktors Sp3 und die Histondeacetylase 1 wirkt. Sp1 hingegen induziert die hTERT-Expression [71]. Da der hTERT-Promotor keine TATA- oder CAAT-Boxen besitzt, jedoch im Bereich des Startcodons CpG-Inseln aufweist, ist auch eine epigenetische Regulation über DNA-Methylierung möglich [72].

Freiliegende Chromosomenenden werden als DNA-Doppelstrangbrüche erkannt, die normalerweise durch Religation der gebrochenen Enden repariert werden. In Folge von Telomerverkürzungen können so die Enden verschiedener Chromosomen miteinander verknüpfen.

Für kurze Zeit wird damit das Problem des Telomerverlustes umgangen. In der Anaphase der Zellteilung werden die Chromosomen zufällig auseinander gerissen, daraus folgen Mutationen und chromosomale Abnormalitäten, die das Genom destabilisieren. Nun kann es durch die Anhäufung von Zellschäden zur Apoptoseinduktion kommen, es sind aber auch Mutationen möglich, welche die Telomerase-Funktion verstärken.

Beim vollständigen Verlust der Telomere tritt nicht direkt der Zelltod ein, es folgen weitere 20-30 Verdoppelungen der Zelle. Dieses als Krise bezeichnete Stadium ist durch hohe Apoptoseraten gekennzeichnet. Nur wenige Zellen entkommen der Krise und werden immortal [56]. Hier kommt es zur bisher ungeklärten Aktivierung der Telomerase. Telomerenden werden stetig aufgebaut, die Chromosomen stabilisiert und Apoptose inhibiert [73]. Damit umgehen diese Zellen das *Hayflick limit*. Weil ihre Telomeraktivierung sie theoretisch unsterblich macht, werden viele Krebszellen als immortalisiert betrachtet. So ist beispielsweise die 1951 von George Otto Gey (1899-1970) etablierte immortalisierte HeLa-Zelllinie durchgängig im Laborgebrauch [74].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass ähnliche Merkmale zwischen Krebs- und Alterungsprozessen bestehen. In Tumorzellen ist hTERT aktiviert und die p53- und Rb-Signalwege liegen gestört vor. In über 90 % aller Krebszellen kommt es zur gesteigerten Telomerase-Aktivität [29]; dies legt nahe, dass die Telomerase-Aktivität nahezu essentielle Voraussetzung für die Immortalisierung und die unbegrenzte Proliferation von Zellen ist. Daher ist das genauere Verständnis der Telomerase-Regulationsmechanismen von enormer wissenschaftlicher Bedeutung.

### 1.3.2 Apoptose

Apoptose ist eine Art des automatischen Zelltods, der in der Zelle die Balance zwischen Proliferation und Zellkonstanz schafft [75]. Charakteristisch hierfür ist das Schrumpfen der Plasmamembran, verbunden mit nukleärer und zytoplasmatischer Kondensation (Pyknose), Degradation der DNA und Kernfragmentierung (Karyorrhexis) sowie der Bildung apoptotischer Körperchen (*blebbing*) [76]. Beim programmierten Zelltod kommen benachbarte Zellen nicht zu Schaden, da die Auslösung einer Immunantwort inhibiert wird [77]. Apoptotische Zellkörperchen werden von Makrophagen aufgenommen und damit eine Entzündungsreaktion verhindert. Beim irreversiblen apoptotischen Zelltod kommt es zur Aktivierung der Caspase(*cysteiny-l-aspartate specific protease*)-Kaskade. Diese Familie zytosolischer Proteasen degradieren und aktiviert diverse Substrate wie proinflammatorische Zytokine und proapoptotische Substrate [78].

Hauptsächlich werden zwei Mechanismen der Apoptoseinduktion unterschieden: Der extrinsische und der intrinsische Weg. Während der extrinsische Weg durch externe Liganden ausgelöst wird, wird der intrinsische Weg (mitochondrialer Weg) durch intrazellulären Stress aktiviert. Der extrinsische Weg wird durch die Bindung von Liganden wie dem Tumornekrosefaktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und andere Zytokinen an einen TNF- oder Fas-Rezeptor vermittelt. Derart induzierte Caspase-8-Aktivierung [79] kann unter anderem die Spaltung der pro-Caspase-3 zur aktiven Caspase-3 initiieren.

Der intrinsische Weg wird durch externe Stimuli wie UV-Strahlung, Toxine, Hypothermie oder Infektionen induziert. Schädigung der DNA aktivieren auch den Transkriptionsfaktor p53, der die transkriptionelle Kontrolle proapoptotischer Gene, u.a. Mitglieder der *BH3-only*-Familie, kontrolliert. Dabei agieren *BH3-only*-Proteine als Stress-Sensoren und aktivieren die proapoptotisch wirkenden Mitglieder der BCL2(*B-cell lymphoma 2*)-Familie: Bax and Bak [80]. Die anschließende Oligomerisation von Bax (*BCL2-associated X protein*) und Bak (*BCL2-antagonist/killer*) in der mitochondrialen Außenmembran führt zur Freigabe von Cytochrom C ins Zytoplasma [81]. Das freigesetzte Cytochrom C bindet APAF-1 (*apoptosis activating factor-1*), verursacht dessen Konformationsänderung und bildet nun mit Caspase-9 [82] einen Komplex: das Apoptosom. Cytochrom C ist jedoch nicht stabil mit dem aktiven Komplex assoziiert. Autolytisch aktivierte Caspase-9 stimuliert die Caspase-Kaskade und regt beispielsweise die Effektorcaspase Caspase-3 an. Diese wird gespalten und bildet daraufhin eine aktive Form, welche die zelluläre Apoptose einleitet [83]. So wird unter anderem der Abbau von zellulärem Lamin und  $\beta$ -Aktin veranlasst, sekundäre Zielproteine wie DNasen aktiviert und die Caspase-vermittelte Unterdrückung der DNA-Reparatur bewirkt.

Der intrinsische Weg kann unter gegebenen Umständen in den extrinsischen übergehen, indem das Protein Bid (*BH3 interacting domain death agonist*) durch die aktivierte Caspase-8 geschnitten wird. Das C-terminale Spaltprodukt tBid (*truncated Bid*) wird in die Mitochondrien transloziert, vermittelt die Freisetzung proapoptotischer Faktoren und führt zur Aktivierung der Caspase-9 [84].

Es wird deutlich, dass die Apoptose wichtig für das zelluläre Gleichgewicht ist – gerät es durch Hemmung der Apoptose außer Kontrolle, kommt es zu schwerwiegenden Folgen für den ganzen Organismus.

## 1.4 Epigenetik

Der Begriff der Epigenetik als Verschmelzung der Worte Genetik und Epigenese wurde 1942 von C. H. Waddington geprägt [85]. Heutzutage beschreibt der Begriff reversible Modifikationen an DNA und Histonen mit erblicher Veränderung der Genfunktion [86]. Aus ihr resultiert phänotypische Diversität von Zellen und Adaptation von (Zell-)Populationen an die Umwelt. Die Veränderungen der Genexpression werden nicht durch Veränderungen der DNA-Sequenz verursacht, sondern durch nicht-genetische Mechanismen [87]. Solche zytoplasmatischen und extrazellulären Signale sind beispielsweise Nahrung, Stress und Schädigungen der Zelle. Die epigenetische Veränderung kann über mehrere Generationen weitergegeben werden. Dies entspricht den Prinzipien des Lamarckismus, welche davon ausgehen, dass Organismen Eigenschaften an ihre Nachkommen vererben können, die sie im Verlauf ihres Lebens erworben haben [88]. Die molekularen Grundlagen dafür waren Lamarck jedoch unbekannt. Epigenetische Veränderungen können die transkriptionelle sowie posttranskriptionelle Regulation beeinflussen. Die Hauptmechanismen der Epigenetik sind DNA-Methylierung und Histon-Modifikationen in Verbindung mit dem Umbau der Chromatin-

struktur. Diese molekularen Veränderungen haben für die Zelle Veränderungen zur Folge, welche die Zelldifferenzierung, Zellalterung und Krebsentstehung mit einschließen.

#### 1.4.1 DNA-Struktur und Chromosomen

Die Organisation eukaryotischer DNA erfolgt in Form von Chromosomen. Dieser hochorganisierte und kompakte Aufbau wird durch Proteinkomplexbildung ermöglicht. Die Strukturierung ist so optimiert, dass das gesamte Genom in den Nukleus einer Zelle passt, geschützt ist und dennoch funktional bleibt.

Chromatin liegt in zwei unterschiedlichen Zuständen vor: das aufgelockerte, transkriptionell aktive Euchromatin und das dicht gepackte und inaktive Heterochromatin. Soll ein Gen transkribiert werden, muss zuvor die Chromatinstruktur gelockert werden, um Transkriptionsfaktoren und der RNA-Polymerase den Zugang zur DNA zu ermöglichen [89, 90].

Die beachtliche Gesamtlänge des humanen Genoms einer Zelle von ca. 1,8 m wird um strukturbildende Einheiten – die Histone – gewickelt. Hierbei unterscheidet man Kernhistone, zu denen die Histone H2A, H2B, H3 and H4 gezählt werden, sowie die *linker*-Histone H1 und H5. Jeweils zwei Kopien der Kernhistonproteine bilden ein Oktamer, um den genau 146 Basenpaare (bp) der DNA gewickelt sind [91, 92]. Diese sogenannte Nukleosome werden durch die *linker*-Histone verbunden. Die DNA zwischen zwei Nukleosomen ist 50-60 bp lang. Damit wird eine höhere Verpackungseinheit, die Solenoid-Struktur, geschaffen. Während der Mitose und Meiose werden die Chromosomen durch Interaktionen zwischen Nukleosomen, DNA und regulatorischen Proteinen kondensiert. Dies geschieht über posttranslationale Modifikationen der Aminosäurereste an den langen N-terminalen Enden der Histone. Solche Modifikationen umfassen vor allem Methylierung, Acetylierung, Phosphorylierung, SUMOylierung, Ubiquitinylierung und deren Rückreaktionen [93].

Die Chromatinstruktur reguliert Kontrollpunkte des Zellzyklus und damit Wachstum und Duplikation. Um sich während des Zellzyklus vor DNA-Schädigung zu schützen, werden alle chromosomalen Vorgänge der Zelle streng überwacht. Kommt es dennoch zu Schäden, werden diese von Reparaturmechanismen behoben und damit auch das Potential der Tumorentstehung minimiert. Dennoch können Histon- und DNA-Modifikationen zur genomischen Instabilität beitragen, die wiederum eines der Kennzeichen von Krebs ist.

#### 1.4.2 Epigenetische Mechanismen

Die Gesamtheit der epigenetischen Veränderungen eines Organismus werden als epigenetischer Code bezeichnet. Im Gegensatz zum genetischen Code, der in jeder Zelle eines Organismus identisch ist, ist der epigenetische Code Zell- und Gewebe-spezifisch [94]. Epigenetische Veränderungen entstehen durch zwei Mechanismen: Histon-Modifikationen und DNA-Methylierung.

#### 1.4.2.1 Histon-Modifikationen

Histon-Modifikationen und deren Kombinationen bilden den Histon-Code. Zu den am besten untersuchten Histon-Modifikationen zählen die Methylierung, Acetylierung und Phosphorylierung sowie deren Rückreaktionen [93].

Die mono-, di- oder tri-Methylierung von Lysinen sowie mono- oder di-Methylierung von Argininen hat wenig Auswirkungen auf die Ladung der Histone [95]. Acetylierung von Lysinen hingegen neutralisiert die überwiegend positive Ladung von Histonen und führt damit zu einer verminderten Anziehung der negativ geladenen DNA; dies lockert die Chromatinstruktur auf und unterstützt die Transkription. Acetylierung von Histonen ist ein dynamischer Prozess, der nur an aktiv transkribiertem Chromatin stattfindet [96]. Acetylierungsmodifikationen erfolgen durch Histonacetyltransferasen (HATs). Ihre Gegenspieler, die Histondeacetylasen (HDACs), entfernen Acetylgruppen und verdichtet das Chromatin. HATs gelten als transkriptionelle Aktivatoren, HDACs hingegen fungieren als Repressoren der Genexpression [97]. Darüber hinaus werden extrazelluläre Signale durch Acetylierung und Deacetylierung von Histonen mit dem Genom orchestriert [98]. Die Histonmethyltransferase EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*), die zur Gruppe der Polycomb-Proteine zählt, ist ein epigenetischer Inhibitor. Zusammen mit HDACs und Histonmethyltransferasen (HMTs) ist sie Teil eines Proteinkomplexes, der für die langfristige Stilllegung von Genen verantwortlich ist, wie beispielsweise bei der X-Chromosomen-Inaktivierung während der Embryogenese [99].

Serin/Threonin-Proteinkinasen des Zellkerns wie MSK (*mitogen and stress activated protein kinase*) 1 und 2 oder Aurora-Kinasen, phosphorylieren Histon H3 Serin 10 (H3S10) während der Mitose [100]. Phosphorylierung kann an Serin-, Threonin- und Tyrosinen-Resten auftreten und führt, aufgrund der negativen Ladung, zu offenen Chromatinstrukturen. Damit korreliert die Phosphorylierung an H3S10 mit aktiver Transkription. Modifikationen wie H3S10-Phosphorylierung (pH3S10) und H3 Lysin 9-Trimethylierung (H3K9me<sup>3</sup>) werden vermehrt in der G2-Phase des Zellzyklus gefunden, erreichen ein Maximum in der Metaphase des Zellzyklus und nehmen dann, beim Eintritt in die folgende Interphase, schnell ab [101]. Des Weiteren kann der Modifikationsstatus von H3S10 direkt die H3K9-Methylierung beeinflussen, was die Komplexität von Histon-Modifikationen erhöht [102, 103].

Stark kondensierte Chromosomen sind Voraussetzung für eine erfolgreiche Zellteilung. Der Übergang vom transkriptionell aktiven zum inaktiven Stadium des Chromatins kann auf drei verschiedenen Mechanismen beruhen: Histon-Hypoacetylierung, Methylierung von H3K9 und DNA-Methylierung. Methylierung von CpG-Sequenzen der DNA werden von *methyl binding domain*(MBD)-Proteinen registriert, die wiederum Histondeacetylasen aktivieren, welche die inhibitorische Chromatinkonfiguration induzieren.

HDACs sind von entscheidender Bedeutung für die Umstrukturierung des zellulären Chromatins und die transkriptionelle Repression von Genen und tragen damit zu Veränderungen des Epigenoms bei. Die Familie der humanen Histondeacetylasen umfasst elf Mitglieder, die in drei Gruppen eingeteilt werden: Klasse I, II und IV [98, 104]. Gelegentlich werden die Sirtuine als HDACs der Klasse III bezeichnet [105]. Jede Klasse weist unterschiedliche strukturelle Charakteristika, Funktionen,

Lokalisierungen und Interaktionen in der Zelle auf. HDAC-Inhibitoren wirken nicht selektiv, sondern gegen mehrere oder alle Mitglieder der HDAC-Familien [105]. Sie wurden als vielversprechendes Mittel gegen Krebs entwickelt.

Das komplexe Zusammenspiel der Komponenten des Histon-Codes der Zelle bewirkt eine Feineinstellung der zellulären Gentranskription und wird durch Mechanismen der DNA-Methylierung komplementiert.

#### 1.4.2.2 DNA-Methylierung

Die Modifikation von DNA durch Methylierung bestimmt, wie eine DNA-Sequenz erkannt und exprimiert wird. Damit ist der Mechanismus der DNA-Methylierung an einer Vielzahl essentieller zellulärer Prozesse beteiligt: Genregulation, DNA-Protein-Interaktionen, zelluläre Differenzierung, Unterdrückung transposabler Elemente, Embryogenese, X-Chromosom-Inaktivierung, genomische Prägung und Tumorgenese [106, 107].

Die Methylierung von DNA, katalysiert durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs), erfolgt an Position fünf des Pyrimidinrings der Cytosin-Base (5mC) [108]. *De novo*-DNMTs (DNMT3A und DNMT3B) bauen in der frühen Embryogenese Methylierungsmuster auf. H3K4-Methylierung spielt eine essentielle Rolle beim Schutz der DNA vor *de novo*-DNA-Methylierung. Das Fehlen dieser Markierung kann zur Identifizierung genomischer DNA-Methylierung hilfreich sein [109]. DNMT1 fügt während jeder zellulären Teilung Methylgruppen an die während der Replikation neusynthetisierte, hemi-methylierte DNA an und sorgen damit für die Erhaltung von Methylierungsmustern [110]. Interessanterweise kann das Enzym DNMT1 mit Hilfe anderer Faktoren zwischen unmethylierter und hemi-methylierter DNA unterscheiden [111] und weist eine 10- bis 40-fache Präferenz für hemi-methylierte Substrate auf [112-114]. Damit kann diese epigenetische Modifikation langfristig beibehalten werden, auch wenn der ursprüngliche auslösende Faktor verschwunden ist. Dennoch gilt die Klassifizierung in Aufrechterhaltungs- oder *de novo*-DNMTs nicht zwangsläufig; alle drei Methyltransferasen können beide Ebenen der Methylierung prozessieren [115, 116].

Bei Säugetieren erfolgt DNA-Methylierung fast ausschließlich (zu 99,98 %) an CpG-Dinukleotiden, die im humanen Genom unterrepräsentiert sind [117]. Gehäuft treten diese Dinukleotide in sogenannten CpG-Inseln (CpGI) auf, welche innerhalb von 100 bp ca. fünf bis zehn CpGs aufweisen [109]. Diese Abschnitte können eine Gesamtlänge von 500 bp bis 2 kbp aufweisen, deren CG-Gehalt über 50 % liegt [117]. Von der CpG-Insel entfernt und funktionell mit dieser assoziiert liegen CpG-*shores* (bis zu 2 kb von der CpGI entfernt) sowie CpG-*shelves* (2 bis 4 kb von der CpGI entfernt). Weiter entfernte Bereiche werden als *open sea* bezeichnet [118, 119]. Charakteristischerweise findet man CpG-Inseln am Genpromotor oder im ersten Exon eines Gens; aber auch im Genkörper und der 3'-Region von Genen, insbesondere von Stammzellen, können diese Strukturen auftreten [107]. Zwischen Cytosinmethylierung und CpG-Dichte besteht eine inverse Korrelation: CpG-arme DNA, die den Großteil des Genoms ausmacht, weist ein starkes Niveau an Cytosinmethylierung auf, wohingegen CpG-Inseln meist unmethyliert bleiben [109]. Cytosinmethylierung kann jedoch auch im



Nicht-CpG-Kontext auftreten [120]. Hier liegt die Wahrscheinlichkeit der Methylierung nur bei ca. 25 %, also deutlich unter dem Methylierungslevel der CpGs. DNA-Methylierung an CpG-Motiven wird mit einer repressiven Wirkung auf die transkriptionelle Aktivität gleichgesetzt, wenn diese im Bereich der Genpromotoren auftritt [120, 121]. Im Gegensatz dazu wirkt die CpG-Methylierung in Genkörpern oder Nicht-CpG-Sequenzen aktivierend auf die Transkription [107, 122]. Eine Studie von Maunakea *et al.* untersucht Methylierungsmuster im humanen Gehirn und zeigt dabei, dass die Mehrzahl der methylierten CpG-Inseln in intra- und intergenen Regionen liegen, wohingegen CpG-Inseln von 5'-Promotoren zu weniger als 3 % methyliert vorliegen [123]. Diese Beobachtungen schwächen die Bedeutung der Methylierungsmodifikation von CpG-Inseln im Genpromotor. Noch unklar ist, wie sich die Methylierung im Genkörper auf die Transkription auswirken kann. Hypothetisch wird das Vorkommen alternativer Transkriptionsinitiationsregionen im Genkörper angenommen, aber auch der Einfluss auf das Spleißen von Genen wird diskutiert [123, 124]. Interessanterweise ist die DNA-Methylierung in Exons, im Gegensatz zu Introns, gesteigert [122].

Der Prozess der DNA-Demethylierung kann aktiv oder passiv stattfinden. Der passive Prozess findet bei der Neusynthese des DNA-Strangs während der Replikation statt, wenn DNMT1 nicht aktiv wird. Die Oxidation von 5mC zu 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC) wird durch TET(*Ten-eleven translocation*)-Proteine bewerkstelligt. 5hmC wird in weiteren Oxidationsreaktionen zu Cytosin konvertiert und stellt damit einen weiteren Mechanismus der passiven Demethylierung dar [125]. Das aktive Entfernen von Methylierungsmustern ist replikationsunabhängig. Aktive DNA-Demethylierung erfordert entweder den physikalischen Basenaustausch von 5mC gegen Cytosin oder das unwahrscheinlichere enzymatische Entfernen der Methylgruppe [126].

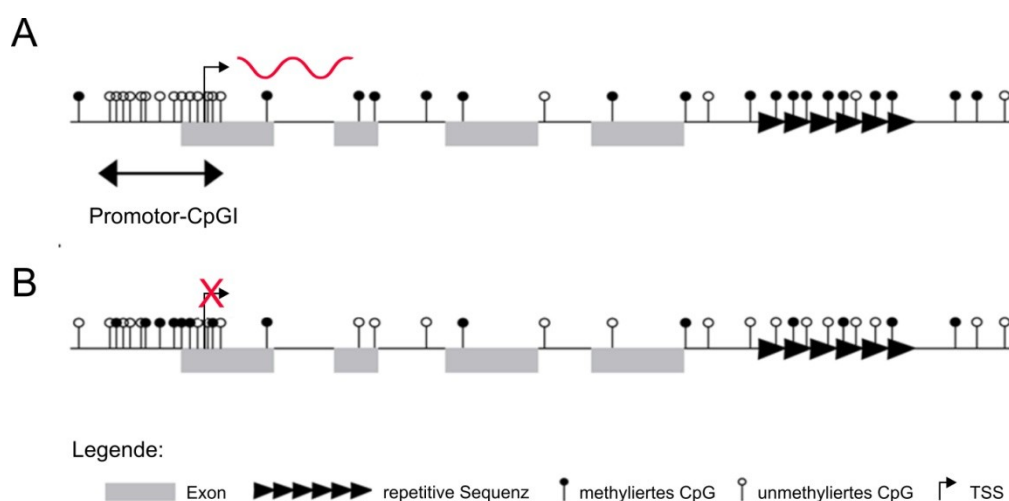
Es existiert ein direkter Zusammenhang zwischen Histon-Modifikation und DNA-Methylierung. Proteine, die an der DNA-Methylierung beteiligt sind, interagieren mit Enzymen, die für die Modifikation von Histonen sorgen. Der epigenetische Code der DNA-Methylierung wird von Methyl-CpG-bindenden Enzymen (z.B. *methyl CpG binding protein 2* (MeCP2), MBD-Proteine 1 bis 4) gelesen. MeCP2 und DNMTs rekrutieren HDAC-beinhaltende Komplexe zur hypermethylierten DNA, die zusätzlich die Chromatinkonformation modifizieren und damit die Transkription inhibieren. Die Stilllegung eines klassischen Tumorsuppressorgens erfordert die Rekrutierung einer transkriptionellen Repressormaschinerie an die entsprechende Promotor-CpG-Insel: Beispielsweise rekrutieren MBDs und DNMTs HMTs, die Lysin 9 des Histon H3 direkt modifizieren und zur transkriptionell inaktiven Chromatinstruktur führen.

### 1.4.3 Karzinogenese und Epigenetik

DNA-Methylierung stellt einen entscheidenden Regulator der Gentranskription dar. In gesunden Zellen liegen die CpG-Inseln von Promotorregionen unmethyliert vor, was eine aktive Gentranskription ermöglicht (Abb. 1.4.3 A). Der Genkörper kann methyliert vorliegen und schützt möglicherweise vor fälschlicher Initiierung der Transkription. Gene, welche in ihrer Promotorregion hypermethyliert sind, gelten als transkriptionell stillgelegt (Abb. 1.4.3 B). Diese erhöhte Cytosin-DNA-Methylierung hält ein inaktives Chromatinstadium aufrecht und bildet eine physikalische

Barriere, die die Bindung der RNA Polymerase II blockiert [127]. Die DNA-Methylierung wird von der Rekrutierung der MBD-Proteine und HDACs begleitet, die die Chromatinstruktur verdichten und so zur Inhibition der Expression beitragen. Neue Studien zeigen, dass auch Promotor-ferne Bereiche wie CpG-*shores* Auswirkungen auf die Genexpression haben [118]. Erstaunlicherweise kann die epigenetische Stilllegung durch Hypermethylierung auch große chromosomale Regionen betreffen (ca. 1 Mb) [128].

Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters, insbesondere in Promotorregionen und CpG-Inseln, werden mit der Krebsentstehung in Verbindung gebracht. Ein wichtiger epigenetischer Faktor der Krebsentstehung ist die Inaktivierung von DNA-Reparatur-Genen durch Hypermethylierung von Promotor-CpGI mit schwerwiegenden genetischen Folgen. So liegen bei Magenkrebs folgende Gene häufig hypermethyliert vor: das DNA-Reparatur-Gen *MGMT* (*methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase*), eine DNA-Methyltransferase, welche die Zelle vor G- zu A-Basen-Mutationen schützt; das DNA-Mismatch-Reparatur-Gen *hMLH1* und die Helikase *WRN* (*Werner syndrome, RecQ helicase-like*) [129]. Hypermethylierung und Stilllegung von Tumorsuppressor- und DNA-Reparatur-Genen sowie Hypomethylierung und Aktivierung von Protoonkogenen tragen, zusammen mit deregulierten Apoptosegenen, durch die Initiation unkontrollierter Zellproliferation zur Entstehung von Krebs bei [129].



**Abbildung 1.4.3 | Schematische Darstellung der Genexpression und ihre Stilllegung durch Methylierung von Promotorregionen. (A)** In normalem Gewebe liegen die CpG-Inseln von Promotorregionen unmethyliert vor, was die aktive Transkription dieser Gene ermöglicht. Die Methylierung des Genkörpers wird mit der Genexpression positiv korreliert. Möglicherweise schützt die Modifikation dort vor fälschlicher Initiierung der Transkription. In Krebszellen löst eine globale Hypomethylierung abnormale Transkriptionsinitiation aus, die beispielsweise zur aktiven Transkription von Protoonkogenen beiträgt. **(B)** Krebszellen weisen eine erhöhte Cytosin-DNA-Methylierung in Promotorregionen auf. Diese Hypermethylierung hält ein inaktives Chromatinstadium aufrecht und trägt zu einer stabilen Stilllegung der Promotor-Aktivität bei. Es kommt zur Rekrutierung von MBD-Proteinen und assoziierter Komplexe, die die Repression manifestieren. Dabei ist die Intensität der Stilllegung vom CpG-Gehalt der Promotorregion abhängig [127].

Das Krebs-Epigenom wurde ursprünglich als globale Hypomethylierung beschrieben, welche von einzelner Gen-spezifischer Hypermethylierung begleitet wird [130]. Neuere Untersuchungen weisen jedoch darauf hin, dass das Krebs-Methylom mehr spezifische Hypomethylierungen bestimmter DNA-Abschnitte und Hypermethylierung in repetitiven Sequenzen aufweist als ursprünglich angenommen [126]. Auch der Abgleich von Methylomdaten mit Transkriptionsdaten erweist sich als weitaus komplexer als erwartet [131].

Tumore weisen eine starke Heterogenität auf und können aufgrund ihrer differenziell methylierten DNA-Regionen Krebs-spezifisch charakterisiert werden. Des Weiteren finden sich in der Hälfte des humanen Genoms Hypomethylierungen, die eine starke Variabilität in der Genexpression bewirken. Dies begründet ein Modell der gesteigerten Methylierungsvariabilität definierter genomischer Domänen im humanen Krebsgenom [132]. Derzeit wird angenommen, dass DNA-Hypomethylierung in Verbindung mit Krebs genauso häufig auftritt wie DNA-Hypermethylierung. DNA-Hypomethylierung ist vermehrt in frühen Tumorstadien zu beobachten, kann aber auch in fortgeschrittenen Tumoren vorliegen. *GSTP1* (*Glutathione S-transferase pi 1*)-Hypermethylierung dient als Indikator der Prostata-Krebsdiagnose, *MGMT* ist therapeutisches Zielgen der Gliombehandlung [133]. Zusätzlich zur Hypermethylierung Gen-spezifischer DNA-Sequenzen, die als Marker der Tumorentwicklung herangezogen wird, kann in Zukunft auch die Hypomethylierung spezifischer DNA-Sequenzen, insbesondere Sequenzwiederholungen, als klinischer Marker dienen [126].

Die Zerstörung normaler Muster der Histon-Modifikationen ist ein weiteres Kennzeichen von Krebs. Der N-Terminus der Histone unterstützt die Aufrechterhaltung der Chromatinstabilität und ist Schauplatz vielfältiger Modifikationen. Auch hier wirken sich die Modifikationen vor allem auf die transkriptionelle Regulation von Zielgenen aus, die onkogenes Potential beinhalten. Die Bindung der adenoviralen Onkoproteine *E1A* und *SV40 T* (*simian vacuolating virus 40 TAg*) an die transkriptionellen Coaktivatoren *EP300* (*E1A binding protein p300*) und *CREBBP* (*CREB binding protein*) bewirken über die globale Hypoacetylierung von H3K18 und die gezielte Aktivierung von zellwachstums- und zellteilungsfördernden Genen die zelluläre Transformation [134, 135].

Auch Fehlregulationen der mitotischen Histon H3-Phosphorylierung, beispielsweise bedingt durch Aurora-Kinasen, sind bei der Krebsentstehung beteiligt [136]. Ein weiteres charakteristisches Beispiel ist die globale Abnahme der H4K20-Trimethylierung und Acetylierung von H4K16.

Sequenzierungsanalysen ergeben, dass epigenetisch aktive Enzyme wie HDACs, DNMTs, HATs, MBD-Proteine und viele weitere Chromatinfaktoren in humanen Tumoren durch Mutationen, Deletionen und/oder Überexpression oder Stilllegung der Genexpression gestört sind [133]. Auch die Überexpression von HDACs [137] und Sirtuinen [138] wird in diversen Tumoren beobachtet.

Das Zusammenspiel epigenetischer Mechanismen der DNA-Methylierung und Histon-Modifikation tragen somit zur Krebsentstehung bei, stellen aber auch potenzielle Ziele der klinischen Diagnostik und Therapie dar.

#### 1.4.4 Pathogene und Epigenetik

Histon-Modifikationen und die Methylierung genomischer DNA ermöglichen Pathogenen die Manipulation der Wirtszelle im Zuge einer Infektion [139].

Bakterien können Einfluss auf Histon-Modifikationen wie Acetylierung und Phosphorylierung bzw. Deacetylierung und Dephosphorylierung ausüben [139, 140]. *Shigella flexneri* beeinflusst die Chromatinstruktur spezifischer Gene der Immunantwort derart, dass der Zugang für den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) an die entsprechenden Promotoren blockiert ist. Das intrazelluläre Bakterium *Listeria monocytogenes* induziert in der frühen Infektionsphase die drastische Abnahme der Phosphorylierung von Histon H3 und Acetylierung von Histon H4. Dieser Effekt wird dem bakteriellen Cytolysin Listeriolysin zugeschrieben. Eine globale Abnahme von pH3S10 ist abhängig von der Membranbindung des Listeriolysins, allerdings nicht von dessen porenformender Aktivität. Die abnehmende H3S10-Phosphorylierung korreliert mit einer transkriptionellen Abnahme einer Gruppe von Wirts-Genen, die auch Schlüsselgene des Immunsystems wie Interleukin-8 (IL-8) mit einschließt [141].

Es gibt bisher nur wenige Studien, die davon berichten, dass das Bakterium *Helicobacter pylori* in der Lage ist, das Chromatin der Wirtszelle zu modifizieren. Es wird eine *H. pylori*-abhängigen H4-Hyperacetylierung und HDAC1-Freisetzung in Abhängigkeit vom p21-Promotor beobachtet [142]. Des Weiteren induziert *H. pylori* H3S10-Phosphorylierung am IL-6-Promotor. Vermittelt wird diese Reaktion vom sekretierten bakteriellen Faktor HP075, der die IL-6-Gentranskription TLR4 (*toll-like receptor 4*)-abhängig über NF- $\kappa$ B und MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) aktiviert [143]. Angrisano und Kollegen veröffentlichten, dass *H. pylori* Veränderungen in der Chromatinstruktur des iNOS- (*inducible nitric oxide synthase*)-Promotors hervorruft, die mit abnehmender H3K9- und H3K4-Methylierung sowie zunehmender H3-Acetylierung einhergehen [144]. Bereits im Jahr 2006 gab es erste Hinweise darauf, dass ein bakterieller Faktor u.a. die H3S10-Phosphorylierung am IL-6 Promotor einleitet [145].

Der Zusammenhang zwischen Infektion und DNA-Methylierung wird nur bei wenigen Pathogenen beschrieben. Das Humanpathogen *Campylobacter rectus* induziert die Promotor-Methylierung und transkriptionelle Stilllegung des zellulären Wachstumsfaktors Igf2 [146]. Kürzlich haben Tolg *et al.* gezeigt, dass bei *in vitro*-Infektion von uroepithelialen Zellen mit uropathogenen *E. coli* das Wirtszellepigenom u.a. durch die Hypermethylierung des Tumorsuppressorgens *CDKN2A* (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*) moduliert wird [147].

Von *H. pylori* wurde gezeigt, dass es abnormale DNA-Methylierung der gastrischen Mukosa gesunder Patienten induziert [148]. Basierend darauf konnten neue gastrische Biomarker identifiziert werden, die auch noch nach einer Infektion detektierbar sind [149]. Insbesondere die Hypermethylierung des Transkriptionsstarts von E-Cadherin und RUNX3 (*runt-related transcription factor 3*) wird mit der Aktivierung von Promotoren assoziiert [150, 151]. Globale DNA-Hypomethylierung ist ein frühes Ereignis in der *H. pylori*-induzierten Karzinogenese, wobei es vor allem zu Demethylierung von repetitiven Sequenzen wie Alu (*Arthrobacter luteus*) und LINE-1 (*long interspersed nuclear element 1*) kommt [152-154].

Die Theorie der Herausbildung einer Krebsvorläuferzelle bildet die Basis der *H. pylori*-induzierten Tumorgenese. Ein Teil der Pathogen-induzierten Hypermethylierung ist temporär und nimmt nach Beseitigung der Infektion ab. Dieser Prozess findet nicht durch aktive Demethylierung, sondern durch Zellerneuerung statt. Das Humanpathogen *H. pylori* infiziert gastrisches Gewebe. Der strukturelle Aufbau einer gastrischen Krypta aus Stammzelle, mehreren Vorläuferzellen und zahlreichen differenzierten Zellen bedingt die unterschiedliche Wahrscheinlichkeit, mit der die verschiedenen Zelltypen im Verlauf einer *H. pylori*-Infektion hypermethyliert werden. Ist die Stammzelle hypermethyliert, bleibt der Methylierungsstatus während der Zellteilung konserviert. Nach der Eliminierung des Keims und diversen Zellteilungen sind nur noch Krypten von der Methylierung betroffen, in denen ursprünglich die Stammzelle hypermethyliert wurde. Temporär ist die Hypermethylierung, wenn nur Vorläuferzellen und differenzierte Zellen von der Hypermethylierung betroffen sind. Hier kommt es zur ständigen Zellerneuerung ausgehend von der unmethylierten Stammzelle [155]. Aberrante Stammzellmethylierung kommt unter normalen Bedingungen aufgrund ihrer geschützten Lage nur selten vor und ist damit seltener als die Hypermethylierung von Vorläuferzellen.

Der Effekt, den bakterielle Pathogene auf den epigenetischen Code der Wirtszelle haben, rückt mehr und mehr in den Fokus der aktuellen Forschung. Die Veränderung des epigenetischen Codes stellt dabei einen Weg dar, das Transkriptionsprogramm der infizierten Wirtszelle permanent oder transient zu beeinflussen.

## 1.5 Humanpathogene

Die Infektionserreger *H. pylori* und *C. trachomatis* zählen bezüglich ihrer Bedeutung für nationale Überwachungsbehörden und die epidemiologische Forschung zu den zehn wichtigsten Humanpathogenen [2].

### 1.5.1 *Helicobacter pylori*

Hinweise darauf, dass eine bakterielle Infektion die Ursache für Magengeschwüre und Gastritis ist, gab es erstmals im 20. Jahrhundert aufgrund von Magenbiopsien. Erst aber der Nachweis der Koch'schen Postulate durch Barry Marshall im Jahre 1984 überzeugten die skeptischen Wissenschaftler weltweit. Zum Beweis der Hypothese züchtete Marshall aus Gewebeproben von Patienten eine Kultur des bis dahin unbekanntes Bakteriums, unterzog sich einer initialen Endoskopie und trank die Bakterienkultur, um damit den hypothesierten Krankheitsverlauf zu initiieren und nachzuweisen [156]. Bereits nach wenigen Inkubationstagen litt Marshall an Übelkeit und Erbrechen. Mit einer weiteren Biopsie zehn Tage nach der Bakterienaufnahme wurde eine Gastritis diagnostiziert. Ausgehend von den Biopsien wurde das Bakterium rekultiviert und konnte damit als Krankheitsursache definiert werden. Heute ist das Bakterium mehr als bekannt, nicht nur weil Marshall 2005 den Nobelpreis für seine Forschung erhielt. *Helicobacter pylori* ist seit mehr als 60.000 Jahren weltweit mit der Menschheit assoziiert, indem es den humanen Magen kolonisiert

[157, 158]. Derzeit sind schätzungsweise 50 % der Weltbevölkerung mit dem Keim infiziert, der damit zu einem der am weitesten verbreiteten Pathogene des Menschen zählt [159]. Auffällig ist die weltweit ungleichmäßige geographische Verbreitung [160]. So sind mehr als 70 % der Bevölkerung von Entwicklungsländern mit *H. pylori* infiziert, in Industrieländern liegt die Infektionsrate hingegen bei unter 20-30 % [161]. Infektionen mit diesem Humanpathogen werden normalerweise in der frühen Kindheit erworben, vor allem innerhalb der Familie, insbesondere von Mutter zu Kind, übertragen und verlaufen meist asymptomatisch [162]. Die Übertragung erfolgt über die oral-orale, gastrisch-orale oder fäkal-orale Route in den menschlichen Organismus [163]. Die *Helicobacter*-Prävalenz ist stark vom sozioökonomischen Status des menschlichen Wirts geprägt: Einkommen, Wohnungssituation, familiäres Umfeld und hygienische Bedingungen beeinflussen die Verbreitung des Pathogens [164].

Hervorhebenswert ist, dass *Helicobacter pylori* als einziges bakterielles Pathogen formal als Karzinogen anerkannt ist und mehr als eine halbe Million Fälle an Magenkrebs pro Jahr verursacht [1]. Zudem ist der Infektionserreger für eine Vielzahl gastrointestinaler Erkrankungen wie chronische Gastritis, Magengeschwüre, Adenokarzinom des Magens und gastrisches MALT-Lymphom verantwortlich [165].

Heutige Taxonomien zählen *Helicobacter pylori* zur Klasse der  $\epsilon$ -Proteobacteria, in die Ordnung der Campylobacterales, Familie der Helicobacteraceae, Genus *Helicobacter* [166]. Das spiralförmige, unipolar flagellierte und damit hoch mobile gram-negative Bakterium *H. pylori* kolonisiert vor allem die Mukus- und Epithelschicht des menschlichen Magens [167]. Aufgrund seines angepassten Lebensraums weist *H. pylori* ein Wachstumsoptimum unter mikroaerophilen Konditionen mit einem Sauerstoffgehalt um 5 % auf, ist auch gegenüber sehr geringen pH-Werten tolerant und kann dort eine gewisse Zeit überleben [167].

#### 1.5.1.1 Pathogenese

Eine langjährige Infektion mit *H. pylori* führt zu gastrointestinalen Erkrankungen wie Entzündungen der Mukosa und induziert die Entwicklung einer aktiven und chronischen Gastritis, die wiederum ursächlich für Magengeschwüre ist. Chronische Magengeschwüre sind häufig im Bereich des Antrums und des Pylorus nachzuweisen, welche auch die Hauptlokalisation der *H. pylori*-Infektion darstellen [168]. Das weitaus häufiger auftretende Zwölffingerdarmgeschwür kann ebenfalls auf eine Infektion mit *H. pylori* zurückgeführt werden [169]. Zudem verursachen chronische Entzündungen mit *H. pylori* Magenkarzinome und MALT-Lymphome [161]. Adenokarzinome des Magens sind maligne Tumore, die aus unkontrollierter Zellproliferation der Epithelschicht des Magens entstehen und mit einer geringen Säure-Produktion der Magenzellen einhergehen (Hypoazidität). Zwischen 50 und 60 % des gastrischen Krebses kommen in der Pylorus-Region des Magens oder in angrenzenden Bereichen des Antrums vor [170].

Im Gegensatz zum Magenkarzinom liegt dem peptischer Ulkus, also einem Magen- und Zwölffingerdarmgeschwür, primär eine Verwundung der Magenschleimhaut oder des Duodenums zugrunde, bei der die normalen Wundheilungsprozesse gestört sind. Allerdings kommt es beim

Zwölffingerdarmgeschwür im Gegensatz zum Magengeschwür und Magenkrebs zur gesteigerten Säureproduktion (Hyperazidität), die aus einer nicht-atrophischen Gastritis entsteht [171, 172].

Je nach Schwere und Lokalisation kommt es demnach zur antralen Gastritis, Pangastritis oder chronisch aktiven Gastritis. Aus der antralen Entzündung des Magens kann sich eine gastrische Metaplasie entwickeln, die wiederum förderlich auf die Entstehung von duodenalen Ulzera wirkt. Sich daraus entwickelnde Atrophie und intestinale Metaplasie führt langfristig zu gastrischen Ulzera oder auch vereinzelt zu gastrischem Krebs. Die atrophische Gastritis ist gekennzeichnet durch eine reduzierte Säuresekretion und begünstigt damit die Bildung von Magenkarzinomen [173]. Die Krebsentstehung wird vor allem durch freie Radikale, verstärkte Wirtszellmigration und beschleunigtes Wirtszellwachstum unterstützt [174]. Dies wird durch die *H. pylori*-Infektion gefördert, indem beispielsweise in die Zelle injizierte Effektoren intrazelluläre Signalwege verändern und für die Zerstörung des Zytoskeletts, die Verringerung der Adhäsion aneinanderliegender Zellen und Aufhebung der Zellpolarität verantwortlich sind [175]. Die Bildung freier Radikale wird durch proinflammatorische Zytokine der infizierten Zelle zusätzlich stimuliert.

#### 1.5.1.2 Virulenzfaktoren

Gelangt *H. pylori* in den menschlichen Magen, muss das Bakterium zunächst den dort vorherrschenden harschen pH-Bedingungen (etwa pH 2) entgegen wirken (Abb. 15.1.2). Dies wird durch die starke Expression des Enzyms Urease bewirkt, welche sekretiert oder durch Autolyse der Bakterien freigesetzt wird. Urease ist an der äußeren *H. pylori*-Membran lokalisiert und wandelt den in den Magen sezernierten Harnstoff zu Kohlendioxid und Ammoniak um. Ammoniak wird zu Ammoniumionen umgewandelt – dies lässt den pH-Wert in der Umgebung des Pathogens ansteigen [176].

Ein weiteres Hindernis bei der Besiedlung des menschlichen Magens ist das Passieren der Mucinreichen Schicht, die der Epithelschicht des Magens aufgelagert ist, um diese vor dem geringen pH-Wert im Magenlumen zu schützen. Hierbei nutzt das Pathogen seine Flagellierung und spiralförmigen Erscheinung, um diese Schicht zu durchdringen und eine pH-neutralere Umgebung zu erreichen [177, 178]. Nun kommen diverse bakteriellen Oberflächenproteine zum Einsatz, welche die Adhärenz an verschiedenste Blutgruppenantigene der Zelle vermitteln. Diese sind genetisch variabel, was eine schnelle Anpassung an die Wirtszelle ermöglicht [179]. Derartige Adhärenzfaktoren, die zur Unterstützung der Virulenz beitragen, sind beispielsweise Autotransporter wie *AlpA/B*, *BabA*, *SabA/B*, *HopZ*, *OipA* und *HorB* [180, 181].

Nicht nur die mechanischen Barrieren der Immunabwehr werden von *H. pylori* erfolgreich überwunden, auch entwickelten sich spezifische Strategien, um der Immunantwort des Wirtes zu entgehen oder diese zu manipulieren. Dabei ist die wichtigste Strategie die Anpassung sogenannter Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (*pathogen-associated molecular patterns*). Diese Struktur motive oder Moleküle sind charakteristisch für die Pathogene und ermöglichen dem Immunsystem, die Aufnahme dieser zu erfassen. Beispielsweise werden veränderte bakterielle Flagelline wie das Flagellin Protein A (FlaA) exprimiert, das vom Wirtszellrezeptor TLR5 (*toll-like*

*receptor 5*) nur mangelhaft erkannt wird und eine geringe Immunreaktion hervorruft [182]. Ein weiterer wichtiger Faktor der Immunevasion ist der Virulenzfaktor VacA (*vacuolating cytotoxin A*), der den Krankheitsverlauf wesentlich beeinflusst. Dieses aus einer katalytischen und einer Bindungs-Untereinheit bestehende AB-Toxin dringt in die Wirtszelle ein und verursacht zytoplasmatische Vakuolisierung [183, 184], induziert Apoptose [185] und vermittelt vorteilhafte Eigenschaften bei der Kolonisierung des Mageneithels [186]. VacA blockiert unter anderem die Reifung von T-Lymphozyten und B-Zellen [187, 188] sowie die phagosomale Reifung in Makrophagen [189] und verhindert damit eine erfolgreiche Immunreaktion und Eradikation des Pathogens im Wirtsorganismus. Dabei ist zu beachten, dass drei verschiedene Genotypen des VacA auftreten, deren Krankheitsbilder und Wirkungsstärken verschieden sind [190]. Das 88 kDa große VacA-Protein bindet an die Wirtszellmembran [191] und bildet eine hexamere Pore aus, die selektiv für Anionen und kleinere neutrale Moleküle wie Urea ist [192]. Endozytiertes VacA wird nach der Sekretion gespalten und als Ursache für die Vakuolisierung der Wirtszellen angesehen.

Interessanterweise produziert *H. pylori* ein Lipopolysaccharid (LPS), das im Vergleich zum LPS anderer gram-negativer Bakterien nur noch gering endotoxisch und immunbiologisch aktiv ist [193]. Durch die Inkorporation von Cholesterol in die *H. pylori*-Membran [194] und die Bindung von Plasminogen [195] kommt es zur molekularen Mimikri. Auch die genetische Variabilität und allelische Diversität des Bakteriums kann als Virulenz unterstützender Mechanismus betrachtet werden. Vor allem treten Punktmutationen und Rekombinationen mit DNA-Fragmenten anderer kolonisierender *H. pylori*-Stämme auf, die jeden Stamm einzigartig machen [196, 197] und eine Antibiotikaresistenzentwicklung erleichtern.

Die Fähigkeit, eine derartige genetische Diversität innerhalb und zwischen den Stämmen zu erzeugen, stellt eine bedeutende Komponente bei der langfristigen Kolonisation des Wirts dar [198].

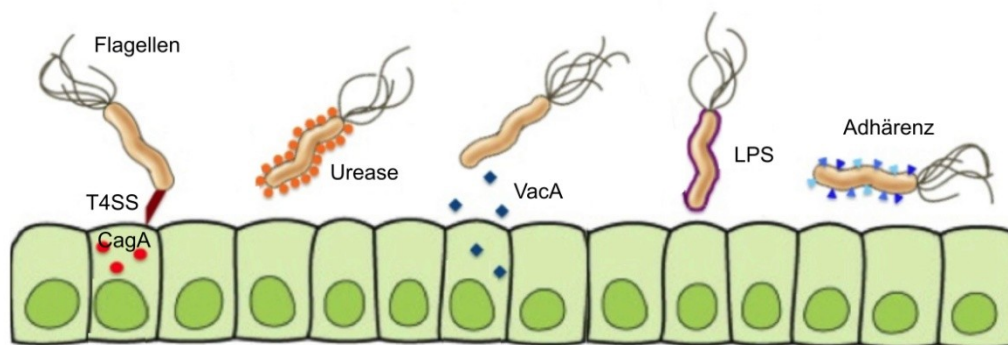
Es gibt zwei Hauptstämme von *H. pylori*: Typ I und Typ II. Vertreter des Typ I-Stammes haben durch horizontalen Gentransfer eine Pathogenitätsinsel (PAI) erworben, die für das Typ-IV-Sekretionssystem (T4SS) mit *cytotoxin-associated gene A* (*cagA*) kodieren. Diese *cag*-Pathogenitätsinsel (*cagPAI*) besteht aus einer etwa 40 kbp langen DNA-Sequenz. Dabei ermöglicht das T4SS dem Pathogen, mit Funktions- und Stoffwechselwegen der Wirtszelle zu interagieren. Das T4SS von *H. pylori* ist auf das Vir-System des pflanzenpathogenen Bodenbakteriums *Agrobacterium tumefaciens* zurückzuführen, zu dem es eine hohe Homologie aufweist [199]. Eine Vielzahl von Proteinen bilden einen Komplex, der durch beide bakterielle Membranen hindurch eine Verbindung zum extrazellulären Raum bzw. dem Zytoplasma der Wirtszelle schafft. Über diese Verbindung können Proteine in die Wirtszelle injiziert werden. Bislang konnten zwei T4SS-translozierbare Moleküle charakterisiert werden, das Effektorprotein CagA und Peptidoglykan. Transloziertes Peptidoglykan wird durch den Nod1(*nucleotide-binding oligomerization domain 1*)-Rezeptor der Wirtszelle erkannt und stimuliert die Expression von Zytokinen [200]. Mit dem Faktor CagA wird eine große Pathogenität assoziiert [201]. Hochpathogene *Helicobacter*-Stämme sind nahezu alle CagA-positiv und verursachen unter anderem duodendale Ulkuserkrankungen und Magenkarzinome [201, 202].



Vertreter des Typ II-Stammes von *H. pylori* sind *cagA*-negativ: entsprechend verlaufen deren Infektionen meist asymptomatisch und weisen eine geringere Pathogenität als Typ I-Stämme auf [203].

Einige der translozierten Effektoren unterlaufen weitere Modifikationen in der Wirtszelle. Das Effektorprotein CagA wird in der Zielzelle durch Src-Kinasen und c-Abl an einem EPIYA(Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala)-Motiv phosphoryliert [204], bindet an verschiedene intrazelluläre Liganden wie die Tyrosinphosphatase SHP-2 [205] und verursacht dadurch umgehend biochemische und morphologische Veränderungen der Wirtszelle. Beispielsweise kommt es zu Veränderungen der Anatomie des Zytoskeletts [206] und der Wirtszellpolarität [207] sowie zu Störungen der Zelladhäsion an die Matrix [208] und der Zell-Zell-Verbindungen selbst [209]. Ein weiteres interessantes Phänomen wird durch die Interaktionen von Rezeptor-Tyrosinkinasen oder Adapterproteinen mit CagA hervorgerufen, die sich so auf die Signaltransduktionskaskaden auswirken, dass es zur gesteigerten Migration und Invasion der Wirtszellen führt und die Tumorbildung unterstützt [210].

Gegenwertig kontrovers diskutiert wird die Rolle der *H. pylori*-Virulenzfaktoren auf die Wirtszell-Apoptose. Studien zeigen sowohl, dass die Effektoren VacA und CagA Apoptose induzieren [211-213], als auch, dass CagA Apoptose von Epithelzellen inhibiert [214-216]. Letzteres könnte eine bakterielle Strategie zur verstärkten Kolonisation des Magens darstellen, indem durch Hemmung der Apoptose die Selbsterneuerung des Darmepithels gestört wird.



**Abbildung 1.5.1.2 | Schematische Darstellung der wichtigsten Virulenzfaktoren von *Helicobacter pylori*.**

Flagellen ermöglichen die bakterielle Mobilität und Chemotaxis und damit die Kolonisierung der Mukosa des Magens. Die pilusartige Struktur des T4SS ermöglicht die Injektion von Effektorproteinen in die Wirtszelle. Einer dieser Effektoren ist CagA, ein Protein, das u.a. für eine Umstrukturierung des Zytoskeletts, die Induktion von IL-8 und die Apoptosemodulation verantwortlich ist. Urease neutralisiert die Magensäure. Das Exotoxin VacA sowie weitere sekretierte Proteine wie Proteasen und Lipasen induzieren Rearrangements der Wirtszellarchitektur durch Vakuolenbildung, Zerstörung epithelialer Verbindungen und Hemmung der Wirtszell-Antwort. LPS und andere Membranproteine induzieren die Immunantwort und sorgen zusammen mit Adhärenzfaktoren für die Anhaftung an die Wirtszelle. Abbildung entnommen und verändert von [217].

Dass *H. pylori* die Immunantwort nicht vollständig supprimieren kann, wird unter anderem daran deutlich, dass proinflammatorische Reaktionen zu beobachten sind: z.B. die gesteigerte Produktion

und Sekretion von Chemokinen und Zytokinen wie IL-8 [218] und humanen  $\beta$ -Defensinen wie hBD3 (*human  $\beta$ -defensin 3*) [219]. Die sekretierten Zytokine rekrutieren wiederum Neutrophile und Makrophagen zum Infektionsherd und bilden reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen, die zur Schädigung intrazellulärer Mikroorganismen führen. Werden die reaktiven Verbindungen jedoch über einen länger anhaltenden Zeitraum gebildet, verursachen sie die Schädigungen des Magenepithels [220].

### 1.5.2 *Chlamydia trachomatis*

Die Familie der *Chlamydiaceae* (Ordnung Chlamydiales) beinhaltet sowohl human- als auch tierpathogene Spezies und wird in zwei Gattungen unterteilt: *Chlamydophila* and *Chlamydia*. Zu ihnen gehören jeweils die beiden wichtigsten humanpathogenen Spezies *Chlamydia trachomatis* und *Chlamydophila pneumoniae*.

#### 1.5.2.1 Pathogenese

Ebenso divers wie das Spektrum der Wirtsorganismen von Chlamydien ist die Fülle an Krankheiten, die sie in ihren Wirten verursachen. Die Verbreitung von asymptomatischen *Chlamydia trachomatis*-Infektionen bei Frauen liegt in Europa im Bereich von 1,7 bis 17 % [221]. Ausgehend von Unterschieden in Pathologie, Infektionsort und Gewebetropismus kann zwischen mehr als 15 Serovarianten unterschieden werden [222]. So gibt es Serovarianten, die die Bildung okularer Trachome verursachen (Serovar A, B, Ba und C), andere Serovarianten infizieren den Urogenitaltrakt (Serovar D bis K) [78]. Die Serovare L1, L2 und L3 gehören zu den invasiveren Stämmen und verursachen Lymphogranuloma venereum (LGV) [223].

Chlamydien der Serovare A bis C infizieren Schleimhautzellen der Bindehaut, was zur Bildung eines Trachoms führt. Die Übertragung kann durch direkten Kontakt mit Sekreten der Augen, Nase oder des Rachen von infizierten Personen erfolgen. Wird die Infektion nicht mit Antibiotika behandelt, kann es zur chronischen Infektion des Augenlids und anschließender Blindheit durch Narbenbildung und Zerkratzen der Hornhaut kommen [224]. Das Trachom ist die weltweit wichtigste Erkrankung, die durch die Spezies *C. trachomatis*, Biovar Trachoma, verursacht wird [225]. In einigen Teilen der Welt, besonders in Entwicklungsländern, kommt es zu Infektionsraten von bis zu 90 % der Gesamtpopulation. Damit ist die Infektion mit *C. trachomatis* global die bakterielle Hauptursache für Erblindung [226].

Die urogenital vorkommenden Serovare D bis K verursachen sexuell übertragbare Erkrankungen (*sexually transmitted diseases*, STD), indem sie Schleimhautzellen des Urogenitaltraktes infizieren. Häufig verlaufen akute Infektionen asymptomatisch, wobei es zu einer chronischen Entzündung der Harnröhre (Urethritis), des Rektums (Proktitis) oder des Gebärmutterhalses (Zervizitis) kommen kann, wenn diese nicht behandelt werden. Schwere Folgen von unbehandelten aufsteigenden Chlamydieninfektionen sind entzündliche Erkrankungen des Unterleibs wie der Adnexitis, ektopische

Schwangerschaften sowie Unfruchtbarkeit durch Vernarbung und Verschluss des Eileiters. Diese Komplikationen sind heute die Hauptursache von Unfruchtbarkeit in Industrieländern [227].

Die invasiveren Serotypen L1 bis L3 verursachen eine sexuell übertragene Infektion der Lymphgefäße und Lymphknoten. Die LGV-Serovare infizieren Schleimhautzellen des Urogenitaltraktes. Zusätzlich kommt es allerdings im Vergleich zu den urogenitalen Serovaren zur Verbreitung auf die Lymphknoten, indem Makrophagen befallen werden; schließlich wird eine systemische Infektion des lymphatischen Gewebes verursacht. Chronische Entzündung dieser Gewebe kann zu lymphatischer Obstruktion und Zerstörung des Lymphgewebes führen [228].

Infektionen mit Chlamydien verlaufen zunächst weitgehend asymptomatisch und sind daher schwer diagnostizierbar. Werden sie jedoch erkannt, sind sie behandelbar. Chlamydien reagieren sensitiv auf eine Vielzahl von Antibiotika, die mit der DNA- und Protein-Synthese interferieren, u.a. Makrolidantibiotika (z.B. Erythromycin), Tetracycline (Doxycyclin) und Chinolone [229].

Es gibt kaum ein anderes sexuell übertragbares bakterielles Pathogen, das ähnlich viele Krankheiten verursacht wie *C. trachomatis*, was diesen Keim zu einem weltweiten Gesundheitsproblem macht. Eine detailliertere Untersuchung der chlamydialen Strategien zur Beeinflussung ihres Wirts ist demnach von großer biologischer und medizinischer Relevanz.

#### 1.5.2.2 Entwicklungszyklus

Das obligat intrazelluläre, gram-negative Bakterium *Chlamydia* hebt sich durch einen einzigartigen biphasischen Entwicklungszyklus hervor [230], der schematisch in Abbildung 1.5.2.2 dargestellt ist.

*Chlamydia* kann in zweierlei Formen auftreten: den sogenannten Elementarkörperchen (*elementary body*, EB) und den Retikularkörperchen (*reticulate body*, RB) [231]. Die infektiöse Form stellen die Elementarkörperchen dar. Diese metabolisch inaktiven Chlamydien weisen einen Durchmesser von bis zu 0,3  $\mu\text{m}$  auf [230], können sich an die Wirtszelle anheften und diese invadieren. Das Anheften stellt einen zweistufigen Prozess dar: ein erster, reversibler Kontakt, der auf elektrostatischen Wechselwirkungen mit Heparansulfat-ähnlichen Glykosaminoglykanen beruht [232], und ein zweiter Schritt, der zur irreversiblen Bindung an einen bisher noch unbekanntem Wirtszellrezeptors führt [233]. Nach der Bindung erfolgt die Aufnahme der infektiösen Partikel über Endozytose oder Phagozytose ins Zellinnere, bei der es durch Injektion von Effektorproteinen zur Umgestaltung des Aktinzytoskeletts und zur Aufnahme der Mikrobe kommt [234]. Dabei sind zwei Wege der chlamydialen Aufnahme beschrieben, ein Clathrin-abhängiger und ein Clathrin-unabhängiger Weg [233]. Nach Aufnahme in die Wirtszelle residieren die chlamydialen Elementarkörperchen im Inneren einer schützenden Vakuole, der sogenannten Inklusion [231]. Diese zeigen keine Marker des endozytotischen oder lysosomalen Stoffwechselwegs. Die Inklusionen sind effektiv von der Wirtszelle isoliert, jedoch nicht gänzlich, da sie mit einem Teil der exozytotischen Vesikel fusionieren können, um sich beispielsweise mit Sphingolipiden und Cholesterol vom Golgi-Apparat zu versorgen [235]. Von keinem anderen intrazellulären Parasiten konnte bisher gezeigt werden, dass es auf ähnliche Weise mit dem Vesikeltransport der Wirtszelle verstrickt ist. Sphingolipide werden zur Vakuolenmembran transportiert und in die bakterielle

Zellmembran inkorporiert [236]. Sowohl der Transport als auch die Aufnahme von Sphingolipiden sind von der frühen chlamydialen Proteinsynthese abhängig, was dafür spricht, dass Chlamydien die Inklusionsmembran aktiv modifizieren, auch um eine Fusion mit zellulären Endosomen oder Lysosomen zu verhindern [237, 238]. Damit wird der lysosomale Abbau sabotiert. Eine dieser frühen Modifikationen ist die Integration von bakteriellen Inklusionsmembran-Proteinen (Inc) mittels Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) [239].

Im Inneren der Zelle organisieren sich nun die Elementarkörperchen zu metabolisch aktiven Retikularkörperchen um: Acht bis zehn Stunden nach der Infektion differenzieren EBs in die größere (1 µm Durchmesser), replikative und metabolisch aktive Form der RBs, die jedoch im Unterschied zu EBs nicht infektiös ist. Parallel zum Wachstum der Inklusion teilen sich RBs durch binäre Spaltung [240]. Weiterhin werden Sphingolipide, Glycerophospholipide und Cholesterin exozytotisch auf dem Weg zwischen Golgi-Apparat und Wirtszellmembran abgefangen und zur Inklusion geleitet und essentielle Nährstoffe wie Aminosäuren, Nukleotide und Eisenionen erworben [241-243]. Auch die Aufnahme neutraler Vesikel zur Fettspeicherung in die Inklusion wurde gezeigt [244]. Darüber hinaus induziert *Chlamydia* die Fragmentierung des Golgi-Apparates, was zur Bildung sogenannter *ministacks* führt und den effizienten Bezug von Lipiden unterstützt [245].

Ein alternativer Weg im Entwicklungszyklus der Chlamydien kann bei bestimmten ungünstigen Umweltbedingungen auftreten und zur Bildung von persistenten Formen (*persistent bodies*, PB) mit einer veränderten Morphologie, reduzierter metabolischer Aktivität und inhibierter binärer Teilung führen [246]. Dies bewirkt eine chronische Langzeitinfektion der Wirtszelle. Persistente Infektionen können durch eine Vielzahl von Stimuli wie Antibiotika, Zytokinen und Nährstoffmangel hervorgerufen werden [247]. *In vitro*-Modelle zur Induktion chlamydialer Persistenz sind u.a. Antibiotika- und IFN- $\gamma$ -Gabe sowie Aminosäure- und Eisen-Mangel [246]. Chlamydien können über mehrere Monate und Jahre im Wirt persistieren und sind dabei gegen Antibiotika unempfindlich [248]. Eine der Spätfolgen persistenter Erkrankungen mit *C. trachomatis* ist die reaktive Arthritis [249]. Geht der Persistenz-induzierende Stimulus verloren, können Chlamydien wieder in den Entwicklungszyklus der akuten Infektion eintreten [247].

Nach Wiedereintritt bzw. 16 bis 20 h *p.i.* folgt eine erneute Redifferenzierung der RBs in infektiöse EBs. Dieser Prozess ist nicht synchronisiert, sodass es nun zum Vorkommen beider bakteriellen Formen in der chlamydialen Inklusion kommen kann. Die Freisetzung neuer infektiöser Partikel wird durch die Lyse der Wirtszelle [240] oder eine Form der Exozytose [250] 48 bis 72 h *p.i.* erreicht, abhängig vom chlamydialen Stamm und Spezies sowie den vorliegenden Wachstumsbedingungen. Freigesetzte EBs können nun erneut Zellen infizieren.

Bemerkenswerterweise kommt es während der chlamydialen Replikation zur Apoptoseinhibition. Chlamydien-infizierte Zellen sind gegenüber einer Vielzahl von proapoptotischen Stimuli wie Staurosporin, Etoposide, TNF- $\alpha$ , FAS-Antikörper resistent [251].

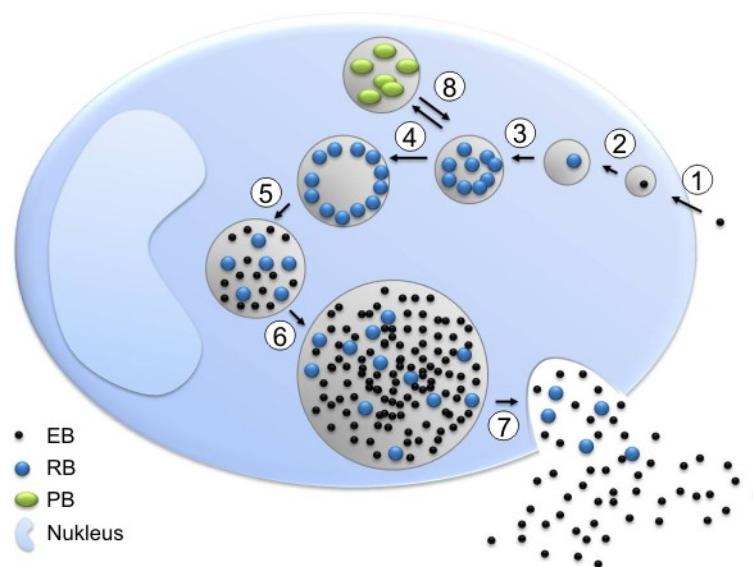
Während der späten chlamydialen Entwicklung konnte die Inhibition einer durch Chemikalien induzierten Apoptose nachgewiesen werden, wenn große *C. pneumoniae*-Inklusionen in Epithelzellen vorlagen [252]. Des Weiteren wurden diverse Chlamydien-Serovare von *Chlamydia trachomatis*, *Chlamydia psittaci* und *Chlamydia muridarum* in Bezug auf externe Apoptosestimuli

untersucht. Alle chlamydialen Serovare dieser Studie vermittelten Apoptoseresistenz, auch wenn deren Ausmaß variiert [253]. Genomweite DNA-Microarray-Studien bestätigen ebenfalls die antiapoptotische Wirkung von Chlamydien auf die Wirtszelle, wobei die verstärkte Transkription von Genen für Apoptose-inhibierende Faktoren nachgewiesen werden konnte [254].

Interessanterweise bleibt auch während des chlamydialen Persistenzstadiums die antiapoptotische Wirkung erhalten. Dieses Phänomen unterstützt die Annahme, dass auch in dieser chlamydialen Entwicklungsphase ein aktiver Metabolismus aufrechterhalten wird [255].

Mechanistisch konnte aufgedeckt werden, dass es zur Inhibierung der Apoptosom-Bildung kommt, indem das Hitzeschock-Protein-70 Apaf-1 bindet, sodass es die Procaspase-9 nicht aktiviert wird [256]. Des Weiteren inhibieren Chlamydien die Wirtszellapoptose, indem sie zur Degradierung proapoptotischer *BH3-only*-Proteine beitragen [257].

Aus den vorangegangenen Erläuterungen wird deutlich, dass sich Chlamydien durch ihre sehr enge und angepasste Wirt-Pathogen-Interaktion auszeichnen, welche durch ihre intrazelluläre Lebensweise bedingt ist. Eine enge Verknüpfung mit Wirtszell-Signalwegen und -Transportwegen stellt sowohl den Nährstoffwerb als auch die eigene Replikation sicher [258].



**Abbildung 1.5.2.2 | Schematische Darstellung des chlamydialen Entwicklungszyklus innerhalb der Wirtszelle.**

Der Entwicklungszyklus beginnt mit der Anheftung (1) und der Invasion (2) der sogenannten chlamydialen Elementarkörperchen (*elementary body*, EB, schwarz) an und in die Wirtszelle. In der Zelle folgt die Differenzierung der EBs in Retikularkörperchen (*reticulate body*, RB, blau) innerhalb eines intrazellulären Vesikels, der Inklusion (3-4). In der Inklusion folgt die intrazelluläre Vermehrung der RBs, die Redifferenzierung der RBs in EBs (5-6) und die endgültige Freisetzung von RBs und EBs aus der Wirtszelle (7). Ein alternativer Weg des Entwicklungszyklus kann auftreten, wenn sich beispielsweise Umweltbedingungen verändern, was zur Ausbildung von Persistenzkörperchen (*persistent body*, PB, grün) führt (8). Diese Option ist reversibel und entscheidend für die Ausbildung persistenter, chronischer Chlamydieninfektionen.

### 1.5.2.3 Virulenzfaktoren

*Chlamydia trachomatis* injiziert eine Vielzahl von Virulenzfaktoren ins Zytoplasma von Epithelzellen, um Wirtszellfunktionen zu manipulieren und damit das bakterielle Überleben zu sichern. Wie auch viele andere intrazelluläre gram-negative Pathogene weist *C. trachomatis* hierfür ein Typ-III-Sekretionssystem (T3SS) auf [259]. Dieses nadelartige Sekretionssystem ermöglicht es, Virulenz-assoziierte Effektorproteine von Chlamydien in das Wirtszellzytoplasma einzuschleusen. Den Prototyp dieses Systems stellt das *Yersinia*-System dar. Eine Vielzahl von Proteinen komplexiert sich dabei zu einer nadelartigen Struktur, die vom bakteriellen Zytoplasma durch beide Bakterienmembranen ragt.

Proteine der Inc-Familie waren die ersten chlamydialen Effektoren, die charakterisiert werden konnten und über das T3SS sekretiert werden. Repräsentativ ist ein langes hydrophobes Motiv, das in die Inklusionsmembran integriert [260]. Hackstadt *et al.* konnten zeigen, dass IncA bei der homotypischen Fusion mehrerer Inklusionen wesentlich beteiligt ist, nicht aber bei sphingolipidhaltigen Vesikeln [261].

Ein weiterer, gut untersuchter Effektor ist das sogenannte *translocated actin-recruiting phosphoprotein* (Tarp). Interessanterweise teilen sich die sonst nicht homologen T3SS-Effektoren Tarp und Tir (EPEC, enteropathogene *E. coli*) und die T4SS-Effektoren CagA (*H. pylori*) und BepD (*Bartonella*) ein sehr ähnliches Tyrosin-Phosphorylierungsmotiv– dies legt nahe, dass sie Substrate der Src-Kinase sind [262]. Tarp wird unmittelbar nach Translokation Tyrosin-phosphoryliert [263] und ist unter anderem für die Aktin-Polymerisation bei Eintritt der Bakterien in die Wirtszelle verantwortlich [264, 265].

Zusätzlich zu den T3SS-Effektoren kommen auch Typ-II-sekretierte Effektoren vor; ein Beispiel hierfür ist die Serin-Protease CPAF (*chlamydial protease-like activity factor*). Dieser Effektor wird zunächst in das Lumen der Inklusionen sekretiert, um dann vermutlich die Inklusionsmembran zu überwinden [266]. Die Funktionen des Virulenzfaktors CPAF sind vielseitig und umfassen u.a. die Erhaltung der Integrität der Inklusionen und die Verhinderung des frühzeitigen Absterbens der Wirtszelle [267].

Das Überleben im Zellinneren wird durch die Replikation innerhalb der Inklusionen gemeistert [235]. Apoptose der Wirtszelle wird inhibiert [251] und die bakterielle Ribonukleotid-Reduktase als Schutz vor Stickstoffmonoxid gebildet [268]. Auch außerhalb der Inklusion vermag das Pathogen durch die Präsentation diverser Oberflächenproteine die Antigenerkennung des Wirtes zu umgehen [269]. Des Weiteren wird die Entzündungsreaktion durch eine besondere LPS-Form reduziert [270]. Die Sekretion von Proteasen ins Zytoplasma der Wirtszelle degradiert Transkriptionsfaktoren der *major histocompatibility complex*(MHC)-Gene und schwächt damit die adaptive Immunantwort des Wirts [271].

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Chlamydien über diverse Mechanismen verfügen, die Abwehr der Wirtszelle zu umgehen und Nährstoffe zu gewinnen.

## 1.6 Zielsetzung der Arbeit

Um die Frage zu beantworten, wie Bakterien Krebs verursachen, müssen zunächst die infektionsbedingten Veränderungen zellulärer Prozesse analysiert werden. In dieser Arbeit liegt der Fokus der Untersuchung besonders auf der Bestimmung erblicher (epi-)genetischer Veränderungen wie DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und DNA-Mutationen in Form von DNA-Doppelstrangbrüchen *in vitro*. Die Umgestaltung von Chromatin, als Folge von Histon-Modifikationen und DNA-Methylierung, stellt ein Schlüsselereignis bei der Aufhebung der Transkriptionsinitiation dar. Die Hypermethylierung von Promotor-Bereichen der DNA bewirkt eine permanente Stilllegung von Genen, mit besonders schwerwiegenden Folgen, wenn es sich um Tumorsuppressorgene handelt. Das deutet darauf hin, dass die Methylierung von CpG-Inseln ein frühes Ereignis der Krebsentwicklung darstellt, welches in dessen Verlauf zunimmt. Darüber hinaus ist die DNA-Methylierung erblich und hinterlässt Fußabdrücke in der sich entwickelnde Krebszelle bis hin zur Tumor-spezifischen Kennung [272]. Aufbauend auf diesen Ergebnissen kommt es zu weiteren spannenden Fragen: Hat eine behandelte, von der Infektion befreite Wirtszelle ein nachhaltig verändertes Genom? Wird die Signatur an die Tochterzellen weitergereicht und verändert so den Phänotyp kommender Generationen? Wenn ja, welche Auswirkungen können solche initialen molekularen Ereignisse in Hinblick auf Krankheits- und Tumorentstehung des Wirtsorganismus haben?

Das Ziel dieser Arbeit ist es, mit Hilfe globaler Analysen von DNA-Methylierungsstatus und Histon-Modifikationen Vorhersagen über die Pathogen-bedingte Veränderung des Wirtszell-Epigenoms zu treffen. Die Folgen dieser infektionsbedingten Veränderungen auf Wirtszellsignalwege werden hierbei in Hinblick auf Krebsentstehung, Zellalterung und Apoptose detailliert beleuchtet.

Der erste Teil dieser Studie befasst sich mit spezifischen Modifikationen der Histonkomplexe und deren Auswirkungen auf den Zellzyklus und weiter Transformationen der Wirtszelle. Im zweiten Teil dieser Studie werden zwei globale Analyseansätze durchgeführt und verglichen. Dies ermöglicht genomweite, allgemeingültige Aussagen über die durch *H. pylori* veränderte Methylierungslandschaft und Hypothesen über deren Rolle bei der Pathogenese und Karzinogenese. Ergänzend dazu fokussiert der dritte Teil dieser Arbeit auf die Langzeitfolgen einer behandelten *C. trachomatis*-Infektion bezüglich Seneszenz, Zellalterung und Apoptose der Wirtszelle. Alle Teile vermitteln ein neuartiges Verständnis der Wirt-Pathogen-Interaktion auf dem Gebiet der (Epi-)Genetik.

**KAPITEL 2**  
**MATERIALIEN UND METHODEN**

---



## 2.1 Methoden der Zellkultivierung

### 2.1.1 Eukaryotische Zelllinien

Das Wachstum der humanen gastrischen Krebszelllinien AGS, MKN74, NCI-N87 und der humanen Zervixkarzinomzelllinie HeLa229 (siehe Tab. 2.1) wurde in RPMI 1640-Medium (Invitrogen), angereichert mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS (*fetal calf serum*) in einer wassergesättigten, mit 5 % CO<sub>2</sub> bereicherten Atmosphäre bei 37°C aufrechterhalten. Das Passagieren der Zellen erfolgte regelmäßig – entsprechend der Zelldichte – in einem Intervall von zwei bis drei Tagen, indem die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung für maximal 5 min bei 37°C inkubiert und in frisches Zellkulturmedium überführt wurden. Die maximale Passagenzahl betrug zehn Passagen. IMR90E1A-Zellen wurden in DMEM (Invitrogen), angereichert mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem FCS, 5 mM L-Glutamin und 1 mM Natriumpyruvat (Invitrogen) kultiviert.

Für die Konservierung eukaryotischer Zellen wurden kultivierte Zellen trypsiniert, bei 400 x g abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in Einfriermedium (10 % DMSO (v/v) in FCS) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Zur Rekultivierung wurden die gefrorenen Zellen bei 37°C aufgetaut, erneut bei 400 x g abzentrifugiert und das Zellpellet im jeweiligen Zellkulturmedium aufgenommen.

**Tabelle 2.1 | Eukaryotische Zelllinien.** Die verwendeten Zelllinien wurden von ATCC (*American Tissue Culture Collection*; [www.atcc.org](http://www.atcc.org)) bzw. JCRB (*Japanese Collection of Research Bioresources*; [cellbank.nibio.go.jp](http://cellbank.nibio.go.jp)) bezogen. IMR90E1A-Zellen wurden durch Prof. Yuri Lazebnik (Cold Spring Harbor Laboratory, Long Island, New York) bereitgestellt.

Name	Charakteristik	Quelle
AGS	humane gastrische Adenokarzinom-Epithelzelllinie	ATCC: CRL 1739
MKN74	humane gastrische Magenkarzinom-Epithelzelllinie	JCRB: JCRB0255
MKN28	humane gastrische Adenokarzinom-Epithelzelllinie	JCRB: JCRB0253
HeLa229	humane Zervixkarzinom-Epithelzelllinie	ATCC: CCL 2.1
NCI-N87	humane gastrische Karzinom-Epithelzelllinie	ATCC: CRL 5822
IMR90E1A	humane embryonale Lungen-Fibroblasten (Überexpression des adenoviralen Onkogens E1A)	Prof. Yuri Lazebnik [273, 274]

#### 2.1.1.1 Inhibitor-Behandlung

Zur Blockierung des Zellzyklus wurden AGS-Zellen für 12 h in serumfreiem Medium angereichert und mit Aphidicolin, Camptothecin, Vinblastin oder Paclitaxel in einer 10<sup>-4</sup>-Verdünnung entsprechend den Angaben des Herstellers (HCS211, Millipore) eingesetzt.

Zur Inhibition von Klasse I- und Klasse II-Histondeacetylasen wurden MKN74-Zellen mit 5 mM Trichostatin A (TSA) für 24 h behandelt.

Je nach Wirkungsweise wurden bei IMR90ER1A-Zellen diverse Inhibitoren zu unterschiedlichen Konditionen verwendet. Das Antibiotikum Brefeldin A (BFA, eBioscience) wird als Inhibitor des retrograden Transports vom Golgi-Apparat zum endoplasmatischen Retikulum in einer Endkonzentration von 1 µg/ml eingesetzt. Für quantitative *real time* PCR(qRT-PCR)-Analysen wurde Brefeldin A 2 h vor *C. trachomatis*-Infektion zum Zellkulturmedium gegeben, für Lebendzell-Mikroskopie 8 h *p.i.* Die behandelten Zellen wurden 24 h *p.i.* geerntet bzw. analysiert.

Zur Behandlung mit Etoposid (Merck) wurden die Zellen zuvor drei Tage lang in serumarmem Medium (0,5 % (v/v) FCS) kultiviert. Etoposid wurde dann in einer Endkonzentration von 120 µM für 16 h hinzugegeben.

## 2.1.2 Prokaryotische Kulturen

### 2.1.2.1 *Helicobacter pylori*

Alle verwendeten *H. pylori*-Stämme (siehe Tab. 2.2) wurden ausgehend von einem Glycerolstock (*brain heart infusion broth* (Sigma-Aldrich) mit 20 % (v/v) Glycerol und 10 % (v/v) FCS) auf GC-Agar-Platten (Remel) selektiv kultiviert, die 10 % (v/v) Pferdeserum (Biochrom), 10 µg/ml Vancomycin, 1 µg/ml Nystatin und 5 µg/ml Trimethoprim (jeweils Sigma-Aldrich) enthalten. Je nach Stamm wurden als Selektionsmarker die Antibiotika Chloramphenicol (4 mg/ml) oder Kanamycin (8 mg/ml) zugesetzt.

Die Kulturen wurde unter mikroaerophilen Bedingungen (5 % CO<sub>2</sub>; 4 % O<sub>2</sub>) bei 37°C angezogen, nach drei Tagen Inkubation auf frischen GC-Agar plattiert, am Folgetag replattiert und nun für die Infektion von Zellen eingesetzt.

**Tabelle 2.2 | *Helicobacter pylori*-Bakterienstämme.** Folgende Bakterienstämme wurden für die Experimente verwendet. <sup>1</sup>Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie, Berlin, Abteilung Molekulare Biologie.

Stamm / Bezeichnung	MPIIB <sup>1</sup> -interne Stammsammlung	Mutiertes Gen
P1	P213	-
P12	P215	-
P12Δ <i>vacA</i>	P216	<i>vacA</i>
P12Δ <i>PAI</i>	P387	<i>cagPAI</i>
P12Δ <i>aggT</i>	P345	γ-Glutamyltranspeptidase
P12Δ <i>cagL</i>	P454	<i>cagL</i>
P12Δ <i>cagA</i>	P378	<i>cagA</i>

Die Epithelzelllinien AGS, MKN74, NCI-60 und HeLa229 wurden zwei Stunden vor und während der Infektion unter serumfreien Bedingungen in Normalmedium kultiviert. Infektionen wurden mit angepassten MOIs (*multiplicity of infection*, Anzahl Bakterien pro Wirtszelle) in Abhängigkeit von Infektionszeitraum und Zelllinie durchgeführt. Die Infektionszeit betrug je nach experimentellem Ansatz 10 min bis 24 h. Dazu wurden die Bakterien vom GC-Agar gelöst, in entsprechendem Medium

ohne FCS resuspendiert, die Dichte der Bakteriensuspension ermittelt und entsprechend der Zellkonfluenz mit MOI 25 bis 100 infiziert. In AGS-Zellen wurde standardmäßig eine MOI von 100 verwendet, in MKN74 Zellen – die für bis zu 24 h infiziert wurden – eine angepasste MOI von 25 bis 50. Zur Bestimmung der MOI wurde eine Eichgerade generiert. Mittels Photometer wurde die optische Dichte bei 550 nm ( $OD_{550}$ ) ermittelt, die Bakterien wieder kultiviert und deren CFU (*colony forming unit*) durch serielle Verdünnungen und Auszählung mittels Hämozytometer bestimmt. Aufgrund der erstellten Kalibrationskurve konnte durch  $OD_{550}$ -Messung der Bakteriensuspension und der Bestimmung der Zellzahl die notwendige MOI ermittelt werden.

#### 2.1.2.2 *Chlamydia trachomatis*

*Chlamydia trachomatis* wurde in HeLa229-Zellen herangezogen. HeLa229-Zellen mit einer Konfluenz von 80 % wurden mit *Chlamydia trachomatis* LGV Biovar Stamm L2/434/Bu (ATCC Nr. VR-902B, Stammsammlungsnummer C2) in Infektionsmedium (DMEM, 5 % (v/v) FCS; 5 mM L-Glutamin; 1 mM Natriumpyruvat; 1 µg/ml Cycloheximid) infiziert. Nach zwei Stunden wurde das Medium mit Wachstumsmedium (10 % (v/v) FCS) ersetzt. Zwei Tage *p.i.* wurden die eukaryotischen Zellen mechanisch abgelöst und durch Vortexen mit Glaskügelchen aufgeschlossen, was zur Freisetzung der Chlamydien führt. Zur Beseitigung von Zellkernen und Zelltrümmern wurden die Lysate 10 min bei 1.000 x g und 4°C zentrifugiert. Die Chlamydien wurden nun durch Zentrifugation für 1 h bei 4°C und 48.000 x g pelletiert. Im Anschluss wurden die Bakterien in SPG-Puffer (220 mM Saccharose; 50 mM Natriumphosphat; 5 mM Glutamat, pH 7,4) resuspendiert und bei -80°C aufbewahrt.

Die Bestimmung der Infektiösität wird durch die serielle Verdünnungen des Stocks ermittelt. Auf Deckgläschen ausgesäte HeLa229-Zellen wurden mit verschiedenen Verdünnungen inkubiert. 24 h *p.i.* wurden die chlamydialen Inklusionen mikroskopisch detektiert und der Titer in IFU/ml bestimmt.

Für akute Infektionen wurden 50-60 % konfluente IMR90E1A-Zellen mit *C. trachomatis* L2 infiziert (MOI 1). Vor der Infektion wurde das Wachstumsmedium entfernt und in Infektionsmedium verdünnte Chlamydien auf die Zellen gegeben. Die infizierten Zellen wurden für 24 h bei 35°C in 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend geerntet.

Um eine Persistenz der Chlamydien in IMR90E1A-Zellen zu induzieren bzw. die Zellen von einer akuten Infektion zu befreien, wurden die Zellen infiziert und 24 h *p.i.* mit Doxycyclin (Sigma-Aldrich, Endkonzentration 75 ng/ml) behandelt. Die Zellen wurden daraufhin weitere acht bis zehn Tagen kultiviert, wobei Medienwechsel mit stetig sinkenden Doxycyclin-Konzentrationen vorgenommen wurden. Entsprechend wurde eine acht Tage oder länger infizierte Zellkultur als infektionsbereinigt definiert, wenn keine infektiösen Partikel bzw. aktiven Inklusionen mehr vorlagen.

## 2.2 DNA-Techniken

### 2.2.1 Extraktion und Reinigung von DNA

Das GeneJET Genomic DNA Purification Kit (Fermentas) ermöglicht eine schnelle Aufreinigung von genomischer DNA aus humanen Zellen über Silika-Säulchen. Es wurde entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Die DNA wurde in Wasser eluiert und Quantität und Qualität im NanoDrop ND-1000 UV-Vis Spektralphotometer (Thermo Scientific) überprüft.

#### 2.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Das Elektrophoresegel wurde aus Agarose (Roth) und TAE-Elektrophoresepuffer (40 mM TRIS-Acetat; 1 mM EDTA- $\text{Na}_2$ , pH 8,5) hergestellt und mit Ethidiumbromidlösung (5  $\mu\text{l}$  pro 100 ml) angereichert. Zum Laden der DNA wurde diese mit Ladepuffer (0,25 % Bromphenolblau; 0,25 % Xylencyanol; 30 % Glycerol; Fermentas) gemischt. Zur Kontrolle der DNA-Größe wurden Standardmarker der Firma Fermentas verwendet (beispielsweise GeneRuler 1 kb DNA Ladder oder GeneRuler 50 bp DNA Ladder) und die DNA im Gel mittels Geldokumentation (BioRad) aufgezeichnet.

#### 2.2.1.2 Telomerlängen-Assay

Die Länge von Telomeren wurde mit dem Telomerlängen-Assay TeloTAGGG der Firma Roche entsprechend der Herstellerangaben bestimmt. 4  $\mu\text{g}$  genomische DNA wurde enzymatisch verdaut, auf einem 0,8 % (w/v) Agarose-Gel mit TAE-Puffer getrennt und auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham) transferiert [275]. Die Hybridisierung erfolgte mit einer Digoxigenin-markierten Sonde spezifisch für telomere Sequenzwiederholungen. Nach diversen Waschschritten wurde die Membran mit einem Digoxigenin-spezifischen Antikörper inkubiert, der kovalent mit alkalischer Phosphatase verknüpft ist. Immobilisierte Telomer-Sonden wurden mit einem für alkalische Phosphatase sensitiven Chemilumineszenz-Substrat auf Hyperfilm (Amersham) sichtbar. Die Intensität wurde durch densitometrische Messung (AIDA Software 4.03, Raytest) ermittelt. Die Signalintensitäten einer einzelnen Position (in bp) wurde gegen die der gesamten Fraktion normalisiert und das Verhältnis der Daten aus Infektion und nicht infizierter Kontrolle zu jeder Position ermittelt.

### 2.2.2 MAP-on-Chip

#### 2.2.2.1 MBD-Protein-Affinitätsaufreinigung

Die Zelllinie MKN74 (Konfluenz von 60-70 %) wurde nach zweistündigem Serumentzug (Medium ohne FCS) für 24 h mit *H. pylori* P12 wie beschrieben infiziert (MOI 25) oder nicht infiziert. Nach Überprüfen der Zellvitalität wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen, mit einem Zellschaber geerntet und die DNA extrahiert. Als Ausgangsmaterial der MBD-Affinitätsaufreinigung

diente reine genomische DNA, die einem 30 minütigen RNase-Verdau bei Raumtemperatur (RNase (Fisher Scientific) in 50 mM TRIS-HCl und 50 % (v/v) Glycerol) unterzogen wurde. Die Reinheit der DNA wurde mittels NanoDrop und Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Dabei wies die genomische DNA ein  $OD_{260/280}$ -Verhältnis von mindestens 1,7 auf. Mit Hilfe des Agarosegels konnten zusätzlich Anzeichen einer Degradation ausgeschlossen werden. Die Qualität der DNA wurde des Weiteren mittels Agilent 2100 Bioanalyser überprüft.

Im Anschluss daran wurde die aufgereinigte DNA mit Hilfe des Wasserbad-Sonifiziergeräts Bioruptor (Diagenode) fragmentiert, um DNA-Fragmente einer mittleren Größe von 300-500 bp zu erhalten und abermals mittels Bioanalyser überprüft.

Der zentrale Schritt der Anreicherung methylierter DNA-Fragmente gelang mit Hilfe des MethylMiner Kits (Invitrogen) entsprechend der Angaben des Herstellers. Hierbei kommt es zur Anreicherung methylierter DNA über die Bindung an das Methyl-CpG-bindende Protein MBD2 (*Methyl-CpG-binding domain protein 2*). Für die Anreicherung wurden 500 ng fragmentierte DNA eingesetzt und mit 200 mM NaCl enthaltendem Puffer (*High-Salt Elution Buffer*, Invitrogen) eluiert.

#### 2.2.2.2 Human DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promotor Array

Der Erfolg der Anreicherung methylierter DNA-Sequenzen wurde mittels qRT-PCR überprüft. Dabei fungieren die genomische *imprinted region H19* (*imprinted maternally expressed transcript; non-protein coding*) als Positivkontrolle und das Haushaltsgen *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) als Negativkontrolle.

Um ausreichend DNA-Material für die Arrayhybridisierung zu verwenden, wurde eine sogenannte *whole genome*-Amplifikation (*GenomePlex Complete Whole Genome Amplification* (WGA)-Kit, Sigma-Aldrich) mit 20 ng DNA als Ausgangsmenge durchgeführt. Dieser Schritt wurde sowohl für die Kontroll-DNA (Input) als auch die MBD-affinitätsaufgereinigten DNA-Fragmente entsprechend der Herstellerangaben vollzogen. Die Amplifikation erfolgte innerhalb von 16 Reaktionszyklen und wurde anschließend mit einem Qiagen PCR-Purification-Kit entsprechend des Herstellerprotokolls aufgereinigt. Es folgte eine erneute Qualitätskontrolle mittels Bioanalyser sowie eine Kontrolle der Anreicherung mittels qRT-PCR (*H19* und *GAPDH*). Die Proben aus Input und MBD-Anreicherung wurden mit Cy5- bzw. Cy3-Farbstoff markiert. Im Anschluss an deren Hybridisierung folgte das Waschen und Scannen des Human DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promotor Arrays (NimbleGen). Die Extraktion der Daten erfolgte mittels NimbleScan Software (NimbleGen).

### 2.2.3 Bisulfit-DNA-Sequenzierung

#### 2.2.3.1 Bisulfit-Konvertierung

MKN74-Zellen mit einer Konfluenz von 60-70 % wurden nach zweistündigem Serumentzug (Medium ohne FCS) für 24 h mit *H. pylori* P12 (MOI 25) wie beschrieben infiziert (siehe auch 2.2.2.1). Die gleiche Behandlung erfolgte bei den nicht infizierten Kontrollzellen. Nach Überprüfung der Zellvitalität wurde das Zellkulturmedium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und mit einem

Zellschaber geerntet. Die extrahierte und gereinigte genomische DNA wurde mit Hilfe des EpiTect-Kits von Qiagen mit Bisulfit (Hydrogensulfit) behandelt, um methylierte Cytosine zu detektieren. Bei Inkubation von Einzelstrang-DNA mit Bisulfit wird Cytosin zu Uracil deaminiert. Methylierte Cytosine hingegen sind vor der Deaminierung geschützt und verbleiben als Cytosin-Basen. Um eine vollständige Bisulfit-Konvertierung zu erzielen, wurde entsprechend der Herstellerangaben vorgegangen und die aufgereinigte DNA in einer geringen Menge dH<sub>2</sub>O (15 µl) eluiert.

Zur Erfolgskontrolle der Bisulfit-Konvertierung wurde eine *nested*-PCR des CpG-methylierten CDKN2A-Genlokus durchgeführt. Als Positivkontrolle der Bisulfit-Konvertierung dienen folgende Primer für die sogenannte *outer*-PCR: 5'-GTAGGTGGGGAGGAGTTTAGTT-3' und 3'-TCTAATAACCAACCAACCCCTCC-5'. Das im Verhältnis 1:500 verdünnte Genprodukt diente als Ausgangsmaterial für die zweite, *inner*-PCR mit folgenden Primern: 5'-GGGGGAGATTTAATTTGG-3' und 3'-CCCTCCTCTTCTTCCTC-5'. Die Negativkontrolle wurde mit dH<sub>2</sub>O oder unkonvertierter DNA als Ausgangsmaterial durchgeführt.

Der Reaktionsansatz beinhaltete 4 µl Bisulfit-konvertierter DNA; 19,3 µl dH<sub>2</sub>O; 3 µl p16 *outer*-Primermix (je 10 pM), 0,5 µl dNTP-Mischung (je 10 mM), 3 µl 10x Standard-*Taq*-Reaktionspuffer (NEB), 0,2 µl (5 U/µl) *Taq*-DNA-Polymerase (NEB). Die Anreicherung erfolgte unter folgenden Reaktionsbedingungen: einmalig 94°C für 3 min, Zyklen aus 94°C für 30 s, 50°C für 30 s, 72°C für 30 s und abschließend 72°C für 4 min. Die PCR mit *outer*-Primerpaaren erforderte 20 Reaktionszyklen, die PCR mit *inner*-Primerpaaren 30 Reaktionszyklen in einem PCR GeneAmp 9700 Thermocycler (Applied Biosystems). Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese.

#### 2.2.3.2 Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit

Der Assay wurde entsprechend der Herstellerangaben (Infinium HumanMethylation450 BeadChip Kit, Illumina) durchgeführt. Es wurden 4 µl (1 µg) Bisulfit-konvertierter DNA eingesetzt. Nach Denaturierung und Amplifizierung der DNA wurden diese enzymatisch fragmentiert. Die präzipitierte DNA wurde sodann in Hybridisierungspuffer resuspendiert und auf dem HumanMethylation450 BeadChip verteilt. Nach erfolgter Hybridisierung (20 h) hatten sich die DNA-Fragmente an 50mer-Oligonukleotiden des Infinium Typ I oder II spezifisch angelagert. Nach Abwaschen der nicht-spezifischen und nicht-hybridisierten Fragmente wurde der Array weiter prozessiert, um Einzel-Basen Austausch zu detektieren. Dafür wurden die BeadChips mittels Laserscanning-Verfahren (Illumina iScan) abgelesen.

## 2.3 RNA-Techniken

### 2.3.1 Extraktion und Reinigung von RNA

Die standardmäßige Extraktion von RNA erfolgte mittels GeneJET RNA Purification Kit (Fermentas). Mit PBS (*phosphate buffered saline*, 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,4) gewaschene Zellen wurden geerntet und für 5 min bei 4°C und 5.000 x g zentrifugiert. Zur

Aufreinigung der RNA wurden die Proben entsprechend der Herstellerangaben behandelt. Um mögliche DNA-Kontaminationen auszuschließen, wurde die aufgereinigte RNA mit DNase I unter Verwendung des Turbo DNA-free Kits (Ambion) entsprechend den Herstellerinformationen verdaut. Die Konzentrations- und Qualitätsbestimmung der gereinigten RNA erfolgte mittels NanoDrop.

Die Aufreinigung größerer RNA-Mengen erfolgte mittels TRIzol-Methode. Mit PBS gewaschene Zellen wurden direkt in TRIzol (Invitrogen) lysiert und geerntet. Zur RNA-Aufarbeitung wurde 30 % (v/v) Chloroform zu den Proben hinzugegeben und stark gemischt. Nach Zentrifugation (4°C, 15 min, 13.000 x g) wurde die oberste flüssige Phase abgenommen und die RNA mit 1 Vol. Isopropanol für 10 min bei RT präzipitiert. Das RNA-Pellet wurde mit 70 % (v/v) kaltem Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser gelöst. DNA-Kontaminationen wurde entsprechend den Herstellerinformationen des Turbo DNA-free Kit (Ambion) entfernt und Konzentration und Qualität der RNA mittels Bioanalyzer überprüft.

### 2.3.2 Quantitative *real time* PCR

Die Analyse der mRNA-Expression bestimmter Gene erfolgte mittels quantitativer *real time* PCR (qRT-PCR) entsprechend des Herstellerprotokolls unter Verwendung spezifischer Primer (siehe Tab. 2.3.2). RNA dient hierbei als Transkriptionsvorlage für die PCR und wird durch den Zusatz von reverser Transkriptase in DNA umgeschrieben. Der DNA-Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green ermöglicht eine quantitative Erfassung der synthetisierten DNA-Moleküle durch die Messung laserinduzierter Fluoreszenzsignale.

Um mRNA mit der SYBR Green-Methode (Applied Biosystems) zu detektieren, wurden 10 ng RNA als Ausgangsmenge und jeder Primer in einer Endkonzentration von 10 µM pro PCR-Ansatz (25 µl) eingesetzt. Jeder PCR-Ansatz wurde als Triplikat durchgeführt unter Verwendung des folgenden qRT-PCR-Programms im ABI Prism 7900 HT Cycler (Applied Biosystems): 30 min 48°C, 10 min 95°C, 40 Zyklen von 15 s 94°C und 60 s bei 60°C.

Bestimmt wurde das relative Expressionslevel mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_t$  (*cycle threshold*)-Methode, wobei *GAPDH* als endogene Kontrolle diente. Die Analyse erfolgte mit Hilfe der Programme SDS (Applied Biosystems) und Excel (Microsoft).

Für die qRT-PCR-Analyse der Chromatin-Immunpräzipitation wurden angereicherte DNA und Input-DNA wie oben beschrieben unter Auslassung der reversen Transkription eingesetzt.

**Tabelle 2.3.2 | qRT-PCR-Primer.** Die Liste zeigt alle in dieser Arbeit verwendeten Primersequenzen in 5'-3'-Orientierung an, die für die Amplifikation mittels qRT-PCR verwendet wurden. <sup>1</sup>Diese Primer wurden ausschließlich bei der Qualitätskontrolle der Anreicherung methylierter DNA verwendet.

Genlokus	Sequenz
<i>CDKN1A</i>	ACTTCGACTTTGTCCACCGAG TCCTCTTGGAGAAGATCAGC
<i>CDKN1A</i> -Promotor (p53-Bindestelle 1)	CACCTTTCACCATTCCCCTA GCAGCCCAAGGACAAAATAG

<i>CDKN1A</i> -Promotor (p53-Bindestelle 2)	AGGTCAGCTGCGTTAGAGGA TCTGTGCCTGAAACATTTGC
<i>CLDN1</i>	TCACTCCCAGGAGGATGC GGCAGATCCAGTGCAAAGTC
<i>GAPDH</i>	GGTATCGTGAAGGACTCATGAC ATGCCAGTGAGCTTCCCGTTCAG
<i>GAPDH</i> <sup>1</sup>	TCGTATGGGGGCAGGGTAG GAAGGTGAAGGTCGGAGTC
<i>H19</i> <sup>1</sup>	GCGAGCCGTAAGCACAGC GCTGTGCTTACGGCTCGC
<i>HDAC9</i>	AGTGTGAGACGCAGACGCTTAG TTTGCTGTCGCATTGTCTTT
<i>hTERT</i>	CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA GGATGAAGCGGAGTCTGGA

### 2.3.3 RNA-Interferenz

Die Transfektion von siRNAs wurde unter Verwendung der HiPerFect-Transfektionsreagenz (Qiagen) in 12-Well-Zellkulturplatten durchgeführt. Entsprechend der Angaben des Herstellers wurden sowohl die siRNAs (human SMARTpool siRNA D-005241-09, HDAC9, Thermo Scientific) als auch die Kontroll-siRNA allstars (Qiagen) mit einer Endkonzentration von 10 nM transfiziert. Der Gen-*knockdown* wurde unter Anwendung der qRT-PCR-Methode oder per SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 72 h nach Transfektion für das entsprechende Gen überprüft.

### 2.3.4 RNA-Microarray

Die 60-70 % konfluente Zelllinie MKN74 wurde nach zweistündigem Serumentzug (Medium ohne FCS) für 24 h mit *H. pylori* P12 wie oben beschrieben infiziert (MOI 50) oder nicht infiziert belassen. Nach überprüfen der Zellvitalität wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und pelletiert. RNA wurde mittels TRIZOL-Methode aufgereinigt und deren Qualität mittels Bioanalyzer überprüft. RNA-Microarray-Experimente wurden als *two-color*-Hybridisierung durchgeführt. Ein unabhängiger *color-swap* der Farben findet ebenfalls Anwendung, um Farbstoff-spezifische Effekte zu kompensieren. RNA wurde mit dem *dual-color Quick-Amp Labeling Kit* (Agilent Technologies) gefärbt und erneut die Effizienz der Markierungsreaktion mit dem NanoDrop verifiziert. Dafür wurde die mRNA mittels reverser Transkriptase umgeschrieben und mit Hilfe von oligo-dT-T7-Promotor-Primern amplifiziert. Im Anschluss an Präzipitation, Reinigung und Quantifizierung der cRNA wurden 1,25 µg der markierten cRNA fragmentiert und entsprechend der Herstellerangaben mit einem *whole human genome 4x44K microarray* (Agilent Technologies) hybridisiert. Vor der Hybridisierung wurde die fragmentierte cDNA mit Kontroll-DNA und Hybridisierungspuffer gemischt. Die Hybridisierung erfolgte entsprechend den Herstellerangaben über Nacht (16 h) bei 60°C. Anschließend wurde der Array gewaschen und mit einem Laser in einer Auflösung von 5 µm abgetastet.



Die entstehenden Microarray-Bilddaten wurden mit Hilfe der Analysis-/Feature Extraction-Software (Version A.10.5.1, Agilent Technologies) unter Verwendung der Grundeinstellungen prozessiert. Die extrahierten MAGE-ML-Dateien wurden mittels Rosetta Resolver Software (Build 7.2.2 SP1.31, Rosetta Biosoftware) ausgewertet. Die Mittelwerte der *dye-swaps* wurden verrechnet und die Profile einzelner Hybridisierungen zueinander ins Verhältnis gesetzt. Für die Expressionsmuster der mRNA wurde eine 1,5-fache Änderung als Schwellenwert (*cut off*) gesetzt. Die Berechnung der Anti-Korrelation durch die Verwendung der *compare*-Funktion ermöglicht den Vergleich zweier verschiedener Hybridisierungspaare. Durch die Kombination beider Analyse-Kriterien werden Datenpunkte mit einem geringen p-Wert ( $p < 0,01$ ) herausgefiltert.

## 2.4 Protein-Techniken

### 2.4.1 SDS-Gelelektrophorese

Proteine können mit der SDS(*sodium dodecyl sulfat*)-Gelelektrophorese getrennt und sichtbar gemacht werden. Das verwendete System basiert auf übereinander geschichtetem Sammel- und Trenngel einer vertikalen SDS-PAGE nach Laemmli [276]. Je nach Molekulargröße der zu trennenden Proteine werden unterschiedlich konzentrierte Polyacrylamidgele verwendet. Für die Auftrennung von Gesamtproteinaufreinigungen werden Trenngele mit einer Acrylamidkonzentration von 7,5-12 % und Sammelgele mit einer Acrylamidkonzentration von 5 % verwendet (siehe Tab. 2.4.1 [A]). Für die Gelelektrophorese wurde das Mini-PROTEAN III Gelsystem (BioRad) verwendet. Pro Trennspur wurden etwa 25 µg Proteinlysat mit Ladepuffer (siehe Tab. 2.4.1 [A]) gemischt, aufgeköcht (3 min, 95°C) und aufgetragen. Zur Größenbestimmung diente die PageRuler Plus Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific).

Nach der Elektrophorese bei 80-140 V wurden die getrennten Proteinfractionen im Gel auf eine PVDF(Polyvinylidendifluorid)-Membran transferiert. Hier kam eine *semi dry*-Blotting-Kammer zur Verwendung. Die Membran wurde mit Methanol aktiviert und für den Transfer zusammen mit dem Gel nach Herstellerangaben geschichtet und zusammengebaut. Je nach Membran und Proteingröße wurden Transferzeiten von 1,5-2 h bei 70 mA pro Gel gewählt.

Mittels spezifischer Antikörper konnten die auf der Membran gebundenen Proteine nachgewiesen werden. Die folgenden Schritte wurden unter ständigem Schütteln bei Raumtemperatur (RT) durchgeführt. Die Membran wurde für 45 min mit 3 % BSA (w/v) in TBST blockiert und mit Antikörpern (in 3 % BSA (w/v) in TBST verdünnt) für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert (Tab. 2.4.1 [B]). Anschließend wurde die Membran dreimal für jeweils 10 min mit TBST gewaschen und mit dem *horseradish-peroxidase*-gekoppelten Zweitantikörper (ebenfalls in 3 % BSA (w/v) in TBST verdünnt) für eine weitere Stunde inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die spezifischen Proteine mittels Peroxidase-Substrat (ECL Solution, Amersham) chemilumineszent sichtbar gemacht. Die Dokumentation erfolgte über Hyperfilm ECL (Amersham) oder durch Quantifizierung mittels ImageQuant LAS4000 (GE Healthcare Life Sciences) bzw. AIDA Software 4.03

(Raytest). Dazu wurden alle Signale vergleichbar quantifiziert und mittels Excel (Microsoft) analysiert. Alle in dieser Arbeit gezeigten Blots sind – sofern nicht anders vermerkt – repräsentativ für mindestens drei unabhängige biologische Experimente. Bei Bedarf wurden die Membranen mit Restore Western Blot Stripping Buffer (Pierce) nach Herstellerangaben von Antikörpern befreit und mit weiteren Antikörpern erneut zu inkubieren.

**Tabelle 2.4.1 [A] | Puffer und Lösungen für die SDS-Gelelektrophorese.**

Puffer	Zusammensetzung
Ladepuffer (4-fach)	125 mM TRIS-HCl, pH 6,8; 6 % (w/v) SDS; 10 mM DTT; 10 % (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol; 40 % (v/v) Glycerol; 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
Sammelgelpuffer	120 mM TRIS-HCl, pH 6,8; 0,01 % (w/v) SDS
Sammelgel	10 ml 12 % Gel: 2,5 ml Sammelpuffer; 1 ml Bisacrylamid; 6,5 ml dH <sub>2</sub> O; 100 $\mu$ l 10 % (w/v) APS; 20 $\mu$ l TEMED
Trenngelpuffer	375 mM TRIS-HCl, pH 8,8; 0,01 % (w/v) SDS
Trenngel	10 ml 12 % Gel: 2,5 ml Trenngelpuffer; 4 ml Bisacrylamid; 3,5 ml dH <sub>2</sub> O; 75 $\mu$ l 10 % (w/v) APS; 7,5 $\mu$ l TEMED
Elektrodenpuffer (5-fach)	0,1 M TRIS-HCl, pH 8,3; 0,05 % (w/v) SDS; 1 M Glyzin
Transferpuffer	50 mM TRIS-HCl; 0,05 % (w/v) SDS; 40 mM Glyzin; 20 % (v/v) Methanol
TBST	50 mM TRIS; 150 mM NaCl, pH 7,5; 0,01 % (v/v) Tween 20

**Tabelle 2.4.1 [B] | Liste der verwendeten Antikörper.**

Zielprotein	Hersteller	Verdünnung
aH3K9	Cell Signaling	1:1.000
Aurora B	Cell Signaling	1:1.000
$\beta$ -Aktin	Sigma-Aldrich	1:5.000
Caspase-3	Cell Signaling	1:1.000
Zyklin B1	Millipore	1:1.000
$\gamma$ H2A.X (S139)	Millipore	1:1.000
H3	Cell Signaling	1:1.000
p21	Santa Cruz	1:1.000
p53	Santa Cruz	1:1.000
pan-mH3K9	Cell Signaling	1:1.000
pChk1 (S345)	Cell Signaling	1:1.000
pH3S10	Cell Signaling	1:1.000

pH3S28	Cell Signaling	1:1.000
pH3T3	Cell Signaling	1:1.000
pH3T11	Cell Signaling	1:1.000
VRK1	Sigma-Aldrich	1:1.000

#### 2.4.2 Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP)

Die Chromatin-Immunpräzipitation wurde unter Zuhilfenahme des ChIP-IT Express Chromatin Immunoprecipitation Kits (Active Motif) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Zur Fixierung der Zellen wurde Formaldehyd direkt zum Medium in die Zellkulturschalen gegeben (1 % (v/v) Endkonzentration), für 10 min unter leichtem Schütteln inkubiert und Glyzin hinzugefügt (125 mM Endkonzentration). Daraufhin wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen, mittels Zellschaber von der Platte gelöst und bei 2.000 x g für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde für den weiteren Gebrauch bei -80°C eingefroren.

Die vernetzten Protein-DNA-Komplexe wurden mit einem p53-spezifischen Antikörper sowie einem IgG-Kontroll-Antikörper (beide Santa Cruz Biotechnology) angereichert und die DNA mittels qRT-PCR analysiert (siehe 2.3.2).

#### 2.4.3 Kinase-Aktivitätsassay

AGS-Zellen wurden in Petrischalen (10 cm) ausgesät und mit *H. pylori* P12 infiziert. 2 h *p.i.* wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und in Zell-Lysepuffer (20 mM TRIS pH 7,5; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 % (v/v) Triton X-100; 2,5 mM Natrium-Pyrophosphat; 1 mM Glycerophosphat; 2 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> und *protease inhibitor cocktail* (PIC, GE Healthcare)) aufgelöst.

Nach Zentrifugation wurde der Überstand über Nacht bei 4°C mit Antikörper gegen VRK1 inkubiert. Für weitere 2 h wurde eine Mischung aus Protein A/G-Agarosekügelchen hinzugegeben. Nach Zentrifugation erhaltener Überstand wurde in einfachem Zell-Lysepuffer gelöst, erneut zentrifugiert und die erhaltenen Pellets für den Kinase-Aktivitätsassay eingesetzt. Der VRK1- Kinase-Aktivitätsassay wurde nach Lazaro *et al.* durchgeführt [277]: immunpräzipitiertes VRK1 wurde in Kinasepuffer mit 1 µg rekombinanten Histon H3 und 5 µCi <sup>32</sup>P γ-dATP für 30 min bei 30°C inkubiert. Die geladenen Proben wurden in einem denaturierenden 15 % SDS-Polyacrylamid-Gel separiert und bei 200 V für 4 h auf eine PVDF-Membran transferiert. Phosphoryliertes Histon H3 wurde unter Verwendung eines FLA-3000 Scanners (FujiFilm) detektiert, wobei VRK1 als Ladekontrolle diente.

#### 2.4.4 Telomere Repeat Amplification Protocol-Assay

Die Telomeraseaktivität wurde mit Hilfe des TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA<sup>PLUS</sup> Kits (Roche) nach Herstellerangaben bestimmt. Dafür wurden Zellen zu verschiedenen Infektionszeitpunkten nach der Infektion geerntet und lysiert. Der *Telomere Repeat Amplification Protocol* (TRAP)-Assay kann in zwei Teile gegliedert werden: Elongation und Amplifikation einerseits und Detektierung mittels ELISA

(*enzyme linked immunosorbent assay*) andererseits. Im ersten Abschnitt des Assays addiert die zelluläre Telomerase sogenannte *telomeric repeats* (TTAGGG) an die 3'-Enden Biotin-markierter Primer. In einem zweiten Teil werden die PCR-Produkte an Digoxigenin-markierte Detektionsproben gebunden, die spezifisch für die telomeren Wiederholungen sind. Die daraus erhaltenden Produkte binden mit der Biotin-Markierung an eine Streptavidin-bedeckte Mikrotiterplatte. Die nun immobilisierten Amplicons werden mit einem gegen Digoxigenin gerichteten Antikörper inkubiert, der mit *horseradish peroxidase* konjugiert ist. Die Quantifizierung der Aktivität wurde durch interne, im Kit integrierte Kontrollen ermöglicht. Dieses hoch sensitive ELISA ermöglicht damit eine genaue Quantifizierung der Telomeraseaktivität.

## 2.5 Mikroskopie

### 2.5.1 Immunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenz-Analysen spezifischer Proteine wurden die Zellen auf Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm kultiviert und entsprechend der zu untersuchenden Bedingungen behandelt bzw. infiziert. Im Anschluss wurden die Zellen mit 4 % (v/v) Paraformaldehyd (in PBS) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Auch die anschließenden Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Dafür wurden die einmal mit PBS gespülten Zellen für 15 Minuten mit 0,2 % (v/v) Triton X-100 permeabilisiert und erneut mit PBS gewaschen. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden die Zellen weitere 15 Minuten mit 2 % FCS in PBS inkubiert. Primärantikörper gegen pH3S10 und Zyklin B1 wurden in Verdünnung von 1:100 in Blockierlösung eingesetzt. Der darauffolgende Detektionsschritt wurde lichtgeschützt mit Cy2-, Cy3- oder Cy5-konjugierten IgG-Sekundärantikörpern (Jackson ImmunoResearch) durchgeführt (1 h), die im Verhältnis 1:500 in Blockierlösung verdünnt vorlagen. Nach Abspülen der Deckgläschen mit dH<sub>2</sub>O wurden diese in Mowiol-Lösung (13,3 g (w/v) Mowiol 4-88; 33 % (w/v) Glycerin in 0,15 M TRIS-HCl, pH 8,5) eingebettet und mit konfokaler *laser scanning*-Mikroskopie (Leica TCS NT/SPE, Leica LAS AF TCS SPE Software) oder Epifluoreszenz-Mikroskopie (Leica DM/R) untersucht. Die Bilder wurden unter Auswahl der Anregungs- und Emissionsfilter der entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffe aufgenommen. Überlagerungen der Bilder wurden mit Hilfe von Photoshop CS3 (Adobe) angefertigt.

#### 2.5.1.1 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Die Telomer-FISH (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung) und die Färbung von DNA-Schädigungen (*DNA damage*) basieren auf den Beschreibungen von Nakamura *et al.* [278]. Zunächst wurden Chromosomenausbreitungen (*metaphase spreads*) wie beschrieben angefertigt und in 4 % (v/v) Paraformaldehyd fixiert. Zum Permeabilisieren der Zellen wurde eine KCM (Kalium-Calcium-Magnesium)-Lösung verwendet. Vor der Antikörperfärbung wurden die auf Glas aufgetragenen Chromosomen für 15 min mit RNase A (New England Biolabs) behandelt. Antikörper gegen Phospho-

Histon H2A.X (S139) (Millipore) wurden in einer Verdünnung von 1:250 für 1 h bei Raumtemperatur eingesetzt. Die gewaschenen Deckgläschen wurden mit Cy2-konjugierten IgG-Sekundärantikörpern (Jackson ImmunoResearch) inkubiert. Vor der PNA(*peptide nucleic acid*)-FISH-Färbung wurden die Chromosomen abermals mit 4 % (v/v) Paraformaldehyd fixiert und anschließend weitere 10 min in Pepsin-Lösung angedaut. Nach Dehydrierung der Proben konnte die Telomer-FISH-Sonde (TelC-Cy3) der Firma Panagene hinzugegeben werden. Nun erfolgte eine Erhitzung der Glasträger für 3 min auf 80°C mit anschließender Hybridisierung für 2 h bei Raumtemperatur. Die Proben wurden mit Mowiol-Lösung, angereichert mit Hoechst 33342 (1:10.000), eingebettet und mit dem Epifluoreszenzmikroskop Leica DM/R visualisiert.

### 2.5.2 Lebendzell-Fluoreszenzmikroskopie

IMR90E1A-Zellen wurden in Zellkulturschalen mit Glasboden (3,5 cm<sup>2</sup>, MatTek Corporation) kultiviert und mit *C. trachomatis* (MOI 1) infiziert. Die Behandlung mit 1 µg/ml Brefeldin A (eBioscience) wurde 8 h *p.i.* gestartet, sodass diese 16 h andauerte. 24 h *p.i.* wurde ein Mediumwechsel mit RPMI-Medium durchgeführt, welches BSA-komplexiertes NBD-C<sub>6</sub>-Ceramid (Invitrogen) und Hoechst 33342 enthält. Die Zellen wurden in eine Inkubationskammer mit wassergesättigter Atmosphäre bei 37°C und 5 % (v/v) CO<sub>2</sub> mikroskopisch beobachtet. Die Bildaufnahme erfolgte mit 60-facher Vergrößerung (Olympus UPlanFL N 60x/1.25 NA) mit einem Olympus IX81 Fluoreszenz-Mikroskop, ausgestattet mit einer Hamamatsu C9100-02 CCD-Kamera. Die Bilder wurden mit Hilfe der Metamorph Software (Molecular Devices) bzw. Visitron Software (Visitron Systems) alle 20 min aufgenommen und mit Photoshop CS3 (Adobe) weiterverarbeitet.

### 2.5.3 Automatische Mikroskopie und Zellzyklus-Assay

Der *Phospho-Histone H3 (Ser 10) and Cyclin B1 Assay* (Millipore, HCS211) ermöglicht die Immunfluoreszenz-basierte Identifizierung und Quantifizierung der H3S10-Phosphorylierung und Zyklin B1-Expression. Der Assay wurde den Herstellerangaben entsprechend durchgeführt. Hierfür wurden AGS-Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und mit *H. pylori* infiziert. Die Zellen wurden zum angegebenen Zeitpunkt mit 4 % (v/v) PFA (Paraformaldehyd) fixiert und gefärbt. Für die Färbung wurden die vom Hersteller empfohlenen primären Antikörper anti-pH3S10 (Kaninchen) und anti-Zyklin B1 (Maus) und sekundären Antikörper (FITC-anti-Kaninchen-Ig und Cy3-anti-Maus-Ig) verwendet. Mit Hilfe des automatischen invertierten Fluoreszenz-Mikroskops (Olympus IX81 mit Scan<sup>R</sup>-System und Hamamatsu CCD-Kamera) wurden für jedes Well neun Bilder pro Kanal (FITC, Cy3, Hoechst) aufgenommen. Diese wurden mittels Scan<sup>R</sup>-Programm (Olympus) prozessiert und anschließend analysiert. Die Software-Einstellungen wurden so angepasst, dass die Identifizierung und Quantifizierung von pH3S10- und/oder Zyklin-B1-positiven Nuklei in Bezug auf alle Hoechst-gefärbten Nuklei erfolgte. Dafür wurde ein modifiziertes Protokoll nach Ding *et al.* verwendet [279].

Auch die Zellzyklus-Analyse wurde mittels automatisierter Mikroskopie vorgenommen. Dafür wurden AGS-Zellen in 96-Well-Platten ausgesät und mit *H. pylori* infiziert. 2 h und 8 h *p.i.* wurden die

Zellen in eiskaltem Methanol fixiert und zusätzlich Nuklei mit Hoechst 33342 gefärbt. Mit Hilfe des automatischen invertierten Fluoreszenz-Mikroskops wurden für jedes Well neun Bilder in 4-facher Vergrößerung angefertigt. Die Nuklei wurden aufgrund morphologischer Eigenschaften (Rundheit und Umfang) gruppiert und mit Hilfe der Bildanalyse-Software auf die Gesamtintensität der Hoechst-Färbung definierter Regionen bezogen. Die damit erhaltenen Daten wurden mittels Excel (Microsoft) statistisch ausgewertet.

## 2.6 Fluorescence Activated Cell Sorting

### 2.6.1 Propidiumiodid-Assay

Für FACS(*fluorescence activated cell sorting*)-Experimente wurden adhärenente, von der *C. trachomatis*-Infektion geheilte IMR90E1A-Zellen (siehe 2.1.2.2) und nicht infizierten Kontrollzellen 8 d *p.i.* mittels Trypsin abgelöst, in Medium resuspendiert, bei 340 x *g* abzentrifugiert (4°C) und anschließend in PBS aufgenommen.

Das Verfahren der Propidiumiodid(PI)-Färbung basiert auf dem ausführlichen Protokoll von Riccardi und Nicoletti [280]. Hierfür wurden 500 µl der in PBS resuspendierten Zellen mit 4,5 ml kaltem 70 % (v/v) Ethanol fixiert, gewaschen und für 5 min in DNA-Extraktionspuffer inkubiert. Im Anschluss wurden die Proben erneut abzentrifugiert, in RNase-haltiger PI-Färbelösung resuspendiert und lichtgeschützt für 30 min inkubiert. Nun konnten die Proben mittels FACS analysiert werden.

## 2.7 Bioinformatische Analysen

Die Auswertung der Rohdaten des *DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus RefSeq Promotor Array* erfolgte mit spezifischen Bioconductor-Paketen (Quelle: <http://bioconductor.org/biocLite.R>; für R: Ringo (`biocLite("Ringo")`), limma (`biocLite("limma")`), MEDME (`biocLite("MEDME")`)). Des Weiteren wurden die R-Bibliotheken "gplots" und "RColorBrewer" verwendet.

Die mit der Infinum Technologie generierten Methylierungsdaten wurden mit dem Methylierungs-Modul der GenomeStudio Software (Illumina; basierend auf *human Methylation450 15017482 v1.2 manifest*) prozessiert. Das Methylierungsniveau jedes CpG-Lokus wurde mit der Software GenomeStudio (Illumina) kalkuliert. Dabei wird der Grad der Methylierung als  $\beta$ -Wert definiert ( $\beta = \text{Intensität des methylierten Allels (M)} / (\text{Intensität des unmethylierten Allels (U)} + \text{Intensität des methylierten Allels (M)} + 100)$ ). Eine weitere Qualitätskontrolle der Rohdaten erfolgte mit dem R Programm minfi ("<http://bioconductor.org/biocLite.R>"; `biocLite("minfi")`).

Weiterführende Analysen wurden unter Zuhilfenahme folgender Programme möglich: GREAT (<http://bejerano.stanford.edu/great/public/html/index.php>) dient der hypergeometrischen Analyse, um Aussagen über *cis*-regulatorische Regionen zu treffen. Die statistische Signifikanz der Überlappung mehrerer *Gensets* wurde mittels „[http://nemates.org/MA/progs/overlap\\_stats.html](http://nemates.org/MA/progs/overlap_stats.html)“ ermittelt. Venn-Diagramme wurden mit Hilfe von BioVenny (<http://www.cmbi.ru.nl/cdd/biovenn/>)

generiert. Protein-Protein-Interaktionen wurden mit der STRING-Software (<http://string-db.org/>) identifiziert. Die Anreicherung von Genen wurde mittels WEBGESTALT-Software (<http://bioinfo.vanderbilt.edu/webgestalt/option.php>) ermittelt. Galaxy ermöglichte den Vergleich größerer Genomdatensätze (<https://main.g2.bx.psu.edu/>). Alle Genomanalysen basieren auf dem humanen Genom hg18, zu finden im Genombrowser der University of California, Santa Cruz (UCSC, <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgTracks?hgsid=327100171>).

## 2.8 Statistische Analysen

Als Streuungsmaß wurde der Streuungsfehler SD (Standardabweichung, *standard deviation*) bzw. SE (Standardfehler, *standard error*) berechnet und in Diagrammen als Fehlerbalken gekennzeichnet. Statistische Signifikanz wurde mittels gepaartem Student's t-Test bestimmt [281]. Beim Vergleich mehrerer Bedingungen wurde die einseitige ANOVA (*analysis of variance*)-Analyse angewandt und mit dem Tukey-Test (Konfidenzintervall von 95 %) kombiniert [282, 283]. Im Falle der *gene enrichment analysis* wurde der Exakte Fisher-Test verwendet [282]. P-Werte unter 0,05 wurde als signifikant angesehen. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  (\*) und  $p < 0,01$  festgelegt (\*\*).

## KAPITEL 3

### ERGEBNISSE UND DISKUSSION

---



### 3.1 VORWORT

Humanpathogene wie *Helicobacter pylori* und *Chlamydia trachomatis* haben vielseitige Strategien entwickelt, um ihre Replikation und Nahrungszufuhr wirtsassoziiert zu gewährleisten. Bisher wurde allerdings kaum Augenmerk auf epigenetische Phänomene im Zusammenhang mit der Wirt-Pathogen-Interaktion gelegt. Um dieses Forschungsgebiet zu erschließen, wurden die folgenden Ansätze – gegliedert in drei Teile – verfolgt und geben nun Einblick in dieses spannende Wissenschaftsfeld. Ein Projekt, das im **ersten Teil** dieser Arbeit präsentiert wird, konzentriert sich auf Histon-Modifikationen im Kontext der Infektion mit *Helicobacter pylori*. Ein weiterer Schwerpunkt, dessen Ergebnisse im **zweiten Teil** dieser Arbeit dargestellt werden, untersucht unter Verwendung neuer technologischer Möglichkeiten auf genomweiter Ebene die Veränderungen der DNA-Methylierung nach *Helicobacter pylori*-Infektion. Ein **dritter Ansatz** widmet sich anhand von *Chlamydia trachomatis* den funktionellen Konsequenzen infektionsbedingter genetischer Veränderungen für die Wirtszelle und deren Tochtergenerationen. Zusammenfassend tragen alle drei Teile dazu bei, Wirt-Pathogen-Interaktionen in Bezug auf epigenetische Phänomene aus verschiedenen Perspektiven besser zu verstehen.

### 3.2 Teil I: *Helicobacter pylori*-induzierte Histon-Modifikationen in Magenepithelzellen und deren Auswirkungen auf Zellzyklus-Regulation und Wirtszell-Genexpression

Wie bereits in der Einleitung dargestellt ist bekannt, dass Bakterien einen Einfluss auf die Acetylierung und Phosphorylierung des N-terminalen Abschnitts von Histon H3 und H4 der Wirtszelle haben [139, 140]. Auffällig jedoch ist, dass sich die meisten bisherigen Studien ausschließlich mit dem Zusammenhang von Histon-Modifikation und Gentranskription beschäftigen. Auch beschränken sich die beobachteten Modifikationen im Wesentlichen auf die Acetylierung und Methylierung von Histonen.

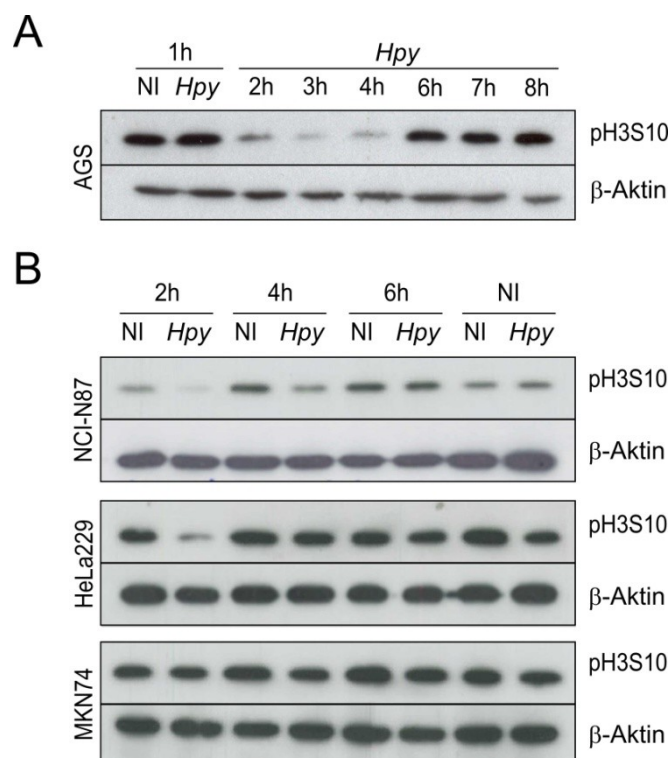
Die vorliegende Studie befasst sich hingegen mit der infektionsbedingten Veränderung des H3S10-Phosphorylierungszustandes sowie des H3K9-Acetylierungsstatus. Die Phosphorylierung und Acetylierung von Histonen spielt eine Hauptrolle in der Ausbildung der Chromatinstruktur und der damit verbundenen Genexpression. Die Untersuchung soll klären, ob diese Möglichkeit der Einflussnahme auf die Wirtszelle durch *H. pylori* erfolgt und zu funktionellen Veränderungen, insbesondere zur Beeinflussung des Zellzyklus führt. Darüber hinaus wird die Beteiligung und der Einfluss eines funktionstüchtigen T4SSs untersucht, das für die Induktion der Expression und Sekretion proinflammatorischer Zytokine verantwortlich ist und die Translokation des Effektors CagA in die Wirtszellen vermittelt.

Um weitere Einflüsse von *H. pylori* auf Komponenten der epigenetischen Landschaft von Wirtszellen aufzudecken, wird die Rolle von Histondeacetylasen, insbesondere der Klasse II Histondeacetylase 9 (*histone deacetylase 9*, HDAC9), genauer untersucht. Histondeacetylasen vermitteln die enzymatische Abspaltung von Acetylgruppen an Lysinresten der Histone. Damit sind sie, im Komplex mit anderen Proteinen, für die Umstrukturierung des Chromatins von entscheidender Bedeutung [284, 285]. Von ihnen verursachte Änderungen haben weitreichende Auswirkungen auf die Transkription von Genen und bewirken deren epigenetische Repression.

#### 3.2.1 Phosphorylierungsstatus von Histon H3 Serin 10

Um den Einfluss des humanpathogenen Bakteriums *H. pylori* auf die globale Phosphorylierung von Histonen zu untersuchen, wurden gastrische Magenepithelzellen infiziert und zunächst mit Hilfe von Immunblotanalysen untersucht. Dabei zeigten Zeitreihenexperimente, dass sich der Phosphorylierungsstatus des Histon H3 an der Position Serin 10 (pH3S10) in AGS-Zellen bedeutend veränderte (Abb. 3.2.1). In Abbildung 3.2.1 A wird deutlich, dass bereits nach zweistündiger Infektion eine starke Abnahme der H3S10-Phosphorylierung in AGS-Zellen zu verzeichnen ist. Entsprechende Beobachtungen wurden auch in anderen Zelllinien gemacht. Hier ist die Kinetik der Dephosphorylierung jedoch zeitlich etwas verschoben. Bei NCI-N87-Zellen wird der Effekt der *H. pylori*-induzierten Dephosphorylierung von H3S10 bereits nach zweistündiger Infektion sehr deutlich und es kommt, im Vergleich zu AGS-Zellen, erst später zur Rephosphorylierung (6 h *p.i.*). HeLa229-Zellen hingegen zeigen eine vergleichbare Kinetik wie AGS-Zellen. Bei MKN74-Zellen ist die

Dephosphorylierung erst nach vierstündiger Infektion auszumachen (Abb. 3.2.1 B). Die Kernaussage bleibt jedoch in allen verwendeten Zelllinien gleich: *H. pylori* verursacht eine deutliche Abnahme der globalen Histon H3-Phosphorylierung. Dieser Effekt ist transient und die Phosphorylierung von H3S10 steigt zu späteren Zeitpunkten der Infektion (5-6 h *p.i.*) wieder an. Diese Beobachtung gleicht im Wesentlichen den Ergebnissen einer Studie, welche mit anderen Humanpathogenen durchgeführt und in der gezeigt wurde, dass eine globale Dephosphorylierung von H3 durch die Toxine der CDC(*cholesterol-dependent cytolysine*)-Familie verursacht wird und mit der Repression von Immungenen des Wirts korreliert [141].



**Abbildung 3.2.1 | Immunblotanalyse der H3S10-Dephosphorylierung in *H. pylori*-infizierten Zellen.** (A) AGS-Zellen und weitere Epithelzelllinien wie (B) NCI-N87, HeLa229 und MKN-74 wurden zu ausgewählten Zeitpunkten von 1 bis 8 h nach Infektion mit *H. pylori* (P12, MOI 100) untersucht. Der Nachweis des Phosphorylierungszustandes von H3S10 erfolgte per Immunblot unter Verwendung eines phosphospezifischen Antikörpers gegen H3S10. Die *H. pylori*-induzierte Dephosphorylierung von H3S10 ist nicht auf AGS-Zellen beschränkt, sondern findet auch in anderen Epithelzelllinien statt.

### 3.2.2 Phosphorylierung von Histon H3 Serin 10 und Mitose

Histon H3 ist während der Mitose spezifisch phosphoryliert. Die Phosphorylierung von H3S10 steigt in der Interphase und G2-Phase des Zellzyklus an. In der späten Anaphase setzt die stufenweise Dephosphorylierung ein, die bis zur Dekondensation der Chromosomen – mit Abschluss der Telophase – abnimmt [286]. Daher zählt pH3S10 als mitotischer Marker. Dieser Sachverhalt führt zu der Frage, ob der beobachteten H3S10-Dephosphorylierung ein Zellzyklus-abhängiger Effekt

zugrunde liegt, welcher durch eine *H. pylori*-induzierten Zellzyklusverzögerung hervorgerufen wird, indem das Bakterium vorübergehend das Eintreten von Zellen in die mitotische Phase verhindert.

Um diese Annahme zu überprüfen, wurden infizierte Zellen in Immunfluoreszenz-Experimenten mit Antikörpern spezifisch gegen pH3S10 und Zyklin B1 gefärbt. Für diese Versuche wurde der Zeitpunkt 2 h *p.i.* gewählt, da hier die infektionsbedingte Abnahme der Phosphorylierung besonders deutlich und konsistent war (siehe auch Abb. 3.2.1 A). Auch Zyklin B1 ist ein Zellzyklusmarker. Inaktive Zyklin B1/CDC2-Komplexe akkumulieren während der späten S- und frühen G2-Phase des Zellzyklus im Zytoplasma. Nach Beendigung der DNA-Synthese wird der Komplex u.a. durch die Protein-Phosphatase CDC25 aktiviert. Der aktive Proteinkomplex besteht aus der dephosphorylierten Form der *cyclin-dependent kinase* CDK1, auch CDC2 genannt, und phosphoryliertem Zyklin B1 als regulatorische Untereinheit. In der frühen Mitose transloziert der Zyklin B1/CDC2-Komplex in den Zellkern, wo er bis zum Metaphase/Anaphase-Übergang aktiv bleibt. Der anschließende Abbauprozess signalisiert das Ende der Mitose. Die differenzielle Expression und Translokation von Zyklin B1 ermöglicht die gezielte Analyse der Zellzyklusphasen.

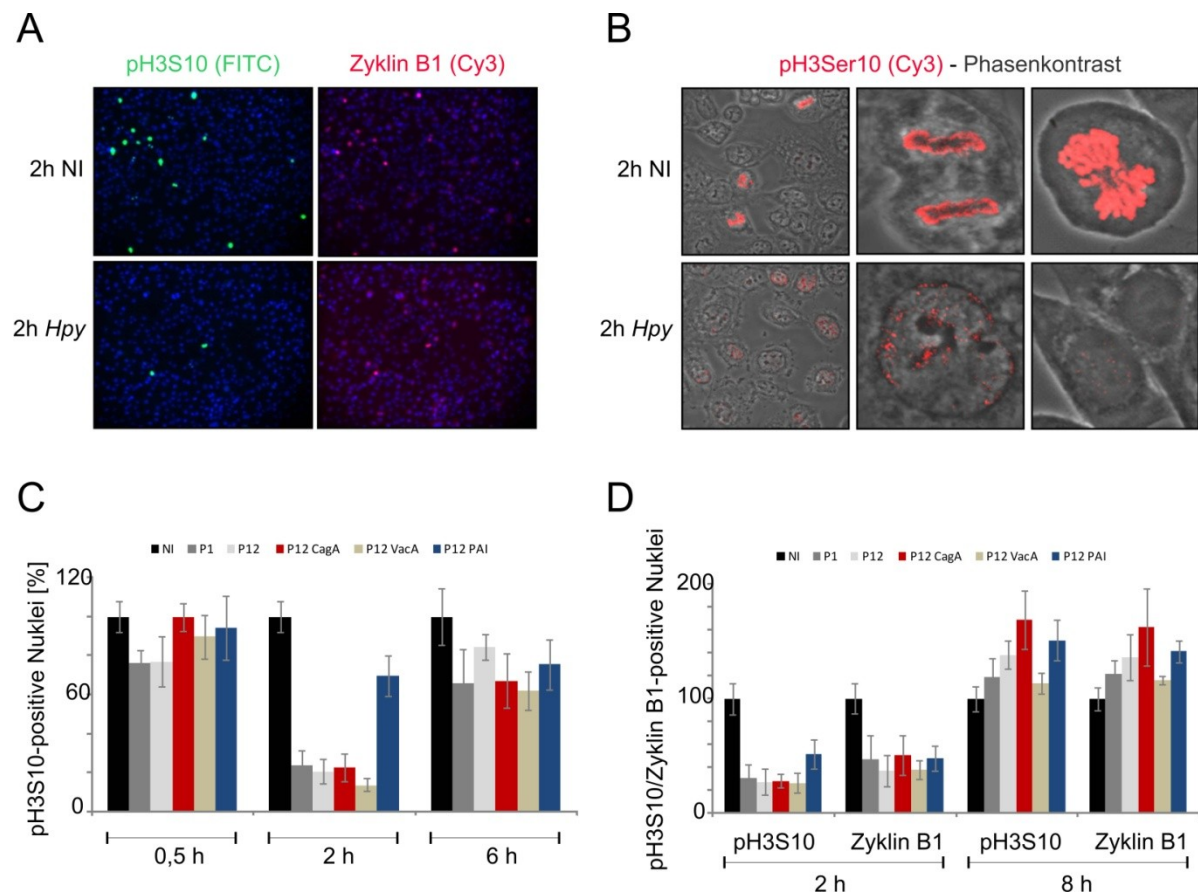
Durch den Abgleich der Immunfluoreszenz-Färbung von pH3S10-positiven Nuklei (grün, FITC) mit Zyklin B1-positiven Nuklei (rot, Cy3) war es möglich, die Abhängigkeit zwischen infektionsinduzierter Dephosphorylierung und Mitose zu bestimmen. Die konfokale Mikroskopie verdeutlicht die Anwesenheit sowie nukleäre Lokalisation des pH3S10 in der Telophase und frühen Anaphase der Mitose nicht infizierter Zellen (Abb. 3.2.2 B). Mit der Infektion (2 h *p.i.*) nimmt der Phosphorylierungszustand von H3S10 ab, das in der G2- und Prophase stark phosphoryliert ist. Des Weiteren verdeutlicht der Immunfluoreszenz-Assay, dass die Anzahl der pH3S10-positiven Nuklei infektionsabhängig abnimmt (Abb. 3.2.2 A). Parallel dazu kann das abnehmende Niveau des Mitose-Markers Zyklin B1 beobachtet werden. Die mikrobielle Infektion verursacht demnach einen Zellzyklusarrest, der mit der Abnahme von Zyklin B1 einhergeht. Die Blockade der Mitose verhindert die zunehmende Zyklin B1-Expression im Verlauf der S-Phase.

Zur Quantifizierung dieser Beobachtung wurde ein Immunfluoreszenz-Assay mittels automatisierter Mikroskopie etabliert und somit die Anzahl der pH3S10-positiven Nuklei vor und nach Infektion ermittelt (Abb. 3.2.2 C und D). Erwartungsgemäß war die Anzahl der pH3S10-positiven Nuklei in AGS-Zellen 2 h nach *H. pylori*-Infektion bis zu 75 % reduziert (Abb. 3.2.3 C). Diese drastische Reduktion der Phosphorylierung wurde auch bei Infektion mit VacA- und CagA-Mutanten beobachtet, wohingegen die cagPAI-Mutante diesen Phänotyp nur schwach zeigt (durchschnittliche Reduktion von 35 %). Zum Zeitpunkt 6 h *p.i.* ist der Anteil pH3S10-positiver Nuklei wieder nahezu auf dem Niveau nicht infizierter Zellen. Die Ergebnisse des Immunfluoreszenz-Assays bestätigen damit die bisherigen Beobachtungen: *H. pylori* verursacht eine transiente Pathogenitätsinsel-abhängige Dephosphorylierung von Histon H3 an Position Serin 10.

In Abbildung 3.2.2 A zeigen pH3S10-positive Nuklei auch eine Zyklin B1-Färbung. Entsprechend reduziert die Infektion mit *H. pylori* nicht nur die Anzahl der pH3S10-positiven Signale, sondern auch die Anzahl der Zyklin B1-positiven Nuklei (Abb. 3.2.3 D). Das deutet darauf hin, dass *H. pylori* die Zellzyklusabfolge in der mitotischen Phase behindert. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit

anderen Studien, die über *H. pylori*-induzierten G1/S- und G2/M-Zellzyklusarrest berichten [187, 287-290].

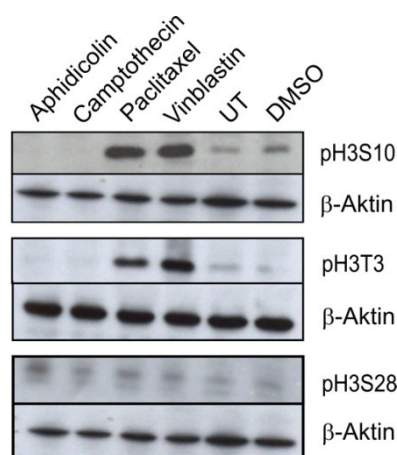
Mit Hilfe des Immunfluoreszenz-Assays konnte gezeigt werden, dass es nicht zu einer generellen Abnahme der Histone H3-Phosphorylierung kommt, sondern der Effekt durch eine deutliche Reduktion der Anzahl pH3S10-positiver Nuklei nach *H. pylori*-Infektion bedingt ist. Dies wird durch einen Pathogen-induzierten Arrest des Zellzyklus verursacht.



**Abbildung 3.2.2 | Anwesenheit und nukleäre Verteilung von pH3S10 und Zyklin B1 sowie Korrelation zwischen *H. pylori*-induzierter pH3S10-Abnahme und Reduktion mitotischer Zellen. (A)** Immunfluoreszenz-Mikroskopie: repräsentative Abbildungen zeigen pH3S10-positive (grün) oder Zyklin B1-positive (roten) Nuklei. Oben: nicht infizierte (NI) AGS-Zellen. Unten: *H. pylori* P12-Infektion von AGS-Zellen (2 h *p.i.*). **(B)** Konfokale Mikroskopie: repräsentative Abbildungen zeigen pH3S10 (rot) und dessen nukleäre Lokalisation. In nicht infizierten AGS-Zellen gibt es insgesamt mehr mitotische Nuklei als in infizierten Zellen. Die beiden Bilder zur linken Seite (erste Spalte) zeigen Überblicksaufnahmen nicht infizierter (oben) und infizierter Zellen (unten). Die Abbildungen der zweiten und dritten Spalte stellen Vergrößerungen mitotischer, pH3S10-positiver Zellen dar. In der zweiten Spalte oben ist die Telophase, in der dritten Spalte oben die Anaphase der Mitose zu erkennen. In der unteren Spalte ist die späte Telophase und Prophase der Mitose zu erkennen [Mitarbeit von CRE]. **(C, D)** Analyse der automatisierten Immunfluoreszenz-Mikroskopie: prozentualer Anteil von pH3S10-positiven **(C)** und pH3S10- und Zyklin B1-positiven Nuklei **(D)** in AGS-Zellen nach Infektion. Die Angaben sind relativ zu positiven Nuklei in nicht infizierten (NI) AGS-Zellen. Zwei *H. pylori*-Wildtypstämme (P1, P12) sowie drei Mutanten-Stämme ( $\Delta vacA$ ,  $\Delta cagA$ , und  $\Delta cagPAI$ ) wurden eingesetzt. Die Werte basieren auf Bildern, welche mit Hilfe des automatisierten Mikroskopsystems Scan<sup>AR</sup> (Olympus) aufgenommen und mittels Scan<sup>AR</sup> Software (Olympus) weiterverarbeitet wurden. Die Daten repräsentieren Mittelwert und Standardabweichung (SD) von drei unabhängigen Experimenten [Mitarbeit von CRE].

### 3.2.3 Zellzyklusarrest

Zur weiteren Untersuchung des Zusammenhangs zwischen Zellzyklus und Histon-Modifikationen wurde ein Zellzyklusarrest induziert, der die *H. pylori*-Infektion imitieren soll. Dazu wurden AGS-Zellen zwei Tage lang in RPMI-Medium mit 0,5 % FCS inkubiert, um den Zellzyklus der Wirtszellen zu synchronisieren. Im Weiteren wurde der Effekt chemischer Zellzyklusinhibitoren auf den Phosphorylierungsstatus von Histon H3 untersucht (Abb. 3.2.3). Aphidicolin, ein DNA-Polymerase  $\alpha$ -Inhibitor, sowie der DNA Topoisomerase I-Inhibitor Camptothecin verursachen einen Arrest in der frühen S-Phase des Zellzyklus. Im Gegensatz dazu führen das Mikrotubuli-stabilisierende Paclitaxel und der Mikrotubuli-Inhibitor Vinblastin zu einem G2/M-Arrest. Die Versuche zeigen, dass Zellen nach Behandlung mit Aphidicolin oder Camptothecin keine detektierbare H3S10-Phosphorylierung mehr aufweisen. Im Gegensatz dazu verursacht ein Arrest in der Mitose, ausgelöst durch Paclitaxel oder Vinblastin, einen starken Anstieg des pH3S10- und des pH3T3-Niveaus. Der Phosphorylierungsstatus von Histon H3 an Serin 28 bleibt hingegen unverändert. Es kann also angenommen werden, dass chemischen Inhibitoren, die den *H. pylori*-induzierten Zellzyklusarrest vor dem G2/M-Checkpoint imitieren, zu einer Reduktion mitotischer Zellen führen.

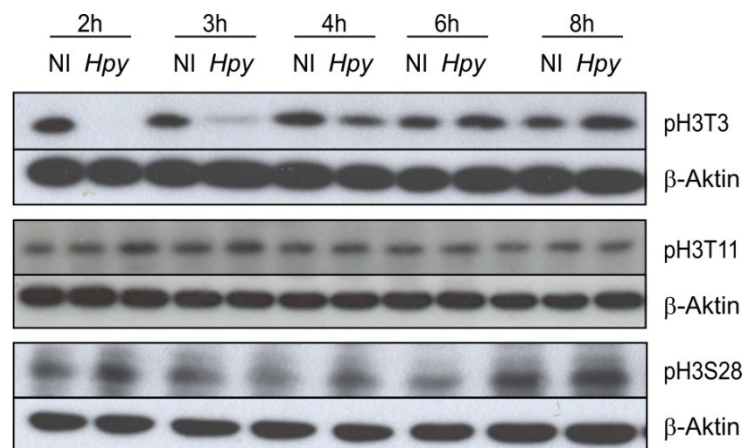


**Abbildung 3.2.3 | Eine chemisch induzierte Blockade des Zellzyklus imitiert den Effekt von *H. pylori* auf die Phosphorylierung von H3S10.** Um den Zellzyklus zu blockieren, wurden die Zellen für 13 h in serumfreiem Medium angereichert, mit Aphidicolin oder Camptothecin (beide G1/S-Arrest), Vinblastin oder Paclitaxel (beide G2/M-Arrest) in einer Verdünnung von  $10^{-4}$  (HCS211, Millipore) inkubiert. **(A)** pH3S10, pH3T3 und pH3S28 wurde mittels Immunblot analysiert. Zur Verdünnung der Inhibitoren wurde DMSO verwendet und dient damit als Kontrolle. Unbehandelte Zellen wurden mit UT (*untreated*) markiert.

### 3.2.4 Phosphorylierungsstatus von Histon H3 Threonin 3, Threonin 11 und Serin 28

Es ist nicht nur von H3S10 bekannt, dass es während der Mitose phosphoryliert wird; auch die Histonreste Threonin 3, Threonin 11 und Serin 28 können diesem Prozess unterliegen. Größtenteils schlecht verstanden ist die molekulare Funktion dieser phosphorylierten Aminosäuren. Einige von ihnen erhalten ihre Bedeutung erst in Kombination mit anderen Histonmarkierungen in einem bestimmten Chromatin-Kontext [291].

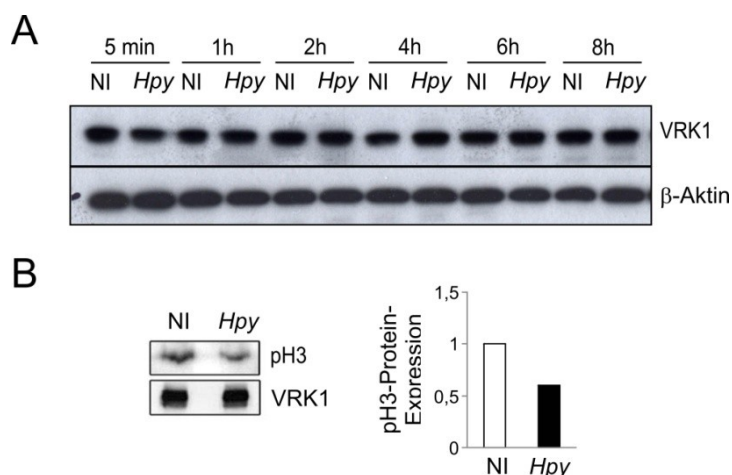
Da *H. pylori* den Eintritt in die Mitose der Wirtszelle unterdrückt, kann man davon ausgehen, dass auch anderen Phosphorylierungsstellen Veränderungen unterworfen sind, ähnlich wie es für H3S10 beobachtet wurde. Um dies zu untersuchen, wurden erneut Immunblotexperimente durchgeführt. Dabei zeigte sich für H3T3 eine starke Abnahme der Phosphorylierung zwei Stunden nach Infektion, ähnlich wie es bei pH3S10 beobachtet werden konnte (Abb. 3.2.4). Der Effekt ist bis zu vier Stunden nach Infektion deutlich erkennbar, verringert sich allerdings mit der Zeit. Im Gegensatz dazu war eine Dephosphorylierung an Threonin 11 nur sehr schwach auszumachen. Bei der Phosphorylierung von H3S28 konnte kein Unterschied zwischen Infektion und Kontrolle beobachtet werden (Abb. 3.2.4).



**Abbildung 3.2.4 | Immunblotanalysen zeigen die Dephosphorylierung von H3T3, nicht aber von H3T11 und H3S28 in *H. pylori*-infizierten Zellen.** Zeitreihenexperimente mit *H. pylori*-infizierten AGS-Zellen (P12, MOI 100) verdeutlicht eine drastische Abnahme der H3T3-Phosphorylierung. Im Gegensatz dazu kommt es infektionsbedingt nur zu einer schwachen Abnahme des pH3T11-Niveaus; keine Veränderung konnte beim Phosphorylierungsstatus von H3S28 festgestellt werden. β-Aktin dient in allen Experimenten als Ladekontrolle.

### 3.2.5 Rolle der mitotischen Histonkinase VRK1

Die vorangegangene Beobachtung der deutlichen H3S10- und H3T3-Phosphorylierung während der *H. pylori*-Infektion legte nahe, dass eine Wirtszellkinase infektionsabhängig reguliert wird. Es sind einige Kinasen bekannt, die in der mitotischen Regulation von Histon 3 involviert sind; dazu zählen Aurora A und B, Haspin, Pak1, Dlk/Zip und die *vaccinia-related kinase* VRK 1 und 2 [292]. Nur zwei von ihnen sind an der Phosphorylierung von Serin 10 beteiligt: Arora A bzw. B sowie VRK1, wobei alleinig VRK1 dazu in der Lage ist, auch Threonin 3 zu modifizieren [292]. Folglich wurde im Weiteren die Rolle von VRK1 in *H. pylori*-infizierten Epithelzellen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass das VRK1-Proteinlevel über einen Infektionszeitraum von 8 h nicht beeinflusst wurde (Abb. 3.2.5 A). Allerdings zeigte ein *in vitro*-Kinase-Aktivitätsassay, dass immunpräzipitiertes VRK1 aus infizierten AGS-Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Zellen eine Aktivitätsreduktion um etwa 40 % aufweist (Abb. 3.2.5 B).



**Abbildung 3.2.5 | Immunblotanalysen zeigen eine Abnahme der VRK1-Kinaseaktivität, nicht jedoch der Proteinmenge nach *H. pylori*-Infektion. (A)** Die VRK1-Gesamtproteinmenge in nicht infizierten (NI) und *H. pylori*-infizierten (*Hpy*) AGS-Zellen wurde mittels Immunblot untersucht. Im dargestellten Infektionszeitraum konnte keine Änderung beobachtet werden. **(B)** Die Kinaseaktivität von VRK1 wurde nach VRK1-Immunpräzipitation mittels Kinase-Aktivitätsassay bestimmt, indem rekombinantes Histon H3 als Substrat verwendet wurde. Phosphoryliertes H3 (pH3) dient der Quantifizierung, VRK1 als Ladekontrolle. Die Intensitäten der Banden wurde mit Hilfe der Software ImageJ (NIH) ermittelt und zeigt eine Abnahme der VRK1-Kinaseaktivität nach *H. pylori*-Infektion [LFF]. Die dargestellten Blots sind repräsentativ für zwei unabhängige Experimente.

### 3.2.6 Erhöhte *HDAC9*- und *CLDN1*-Expression

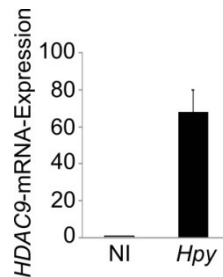
Zur globalen Untersuchung der Wirtszellantwort – in Hinblick auf Veränderungen der Gentranskription als Folge der epigenetischen Repression – wurden humane Genexpressionsmicroarrays (*whole human genome 4x44K microarray*, Agilent Technologies) hybridisiert und das Transkriptom infizierter MKN74-Zellen mit nicht infizierten Zellen verglichen. Von allen Histondeacetylasen zeigte *HDAC9* eine signifikant erhöhte Transkriptmenge *post infectionem* (Tab. 3.2.6 und Abb. 3.2.6). Auch das durch HDAC regulierte Transkript Claudin-1 [293] lag in infizierten Zellen signifikant erhöht vor.

**Tabelle 3.2.6 | Humane Expressionsmicroarray-Daten (*whole human genome 4x44K microarray*, Agilent Technologies) der Genprodukte *HDAC9* und *CLDN1* nach *H. pylori*-Infektion (P12, 24 h *p.i.*, MOI 100) in MKN74-Zellen.** Angegeben ist die x-fache Veränderung (*fold change*) der mRNA-Menge in Bezug zu nicht infizierten Kontrollzellen und deren Signifikanzniveau (p-Wert) zweier unabhängiger biologischer Replikate.

Gen	NCBI-Zugangsnummer	Experiment 1		Experiment 2	
		<i>fold change</i>	p-Wert	<i>fold change</i>	p-Wert
<i>HDAC9</i>	NM_058176	15,91	1,01E-29	14,92	4,61E-22
	NM_014707	31,20	1,26E-44	23,07	4,58E-34
	NM_058177	7,96	1,62E-18	11,02	2,17E-06
	NM_178423	23,51	0,00E+00	18,65	0,00E+00
<i>CLDN1</i>	NM_021101	8,94	4,18E-31	7,29	2,30E-43
	NM_021101	3,46	8,57E-18	4,50	1,40E-44



Zur Validierung der Daten des Expressionsmicroarrays wurden *HDAC9*-spezifische qRT-PCR-Analysen durchgeführt, die ebenso drastische Anstiege der *HDAC9*-mRNA nach *H. pylori*-Infektion in MKN74-Zellen zeigten (Abb. 3.2.6).

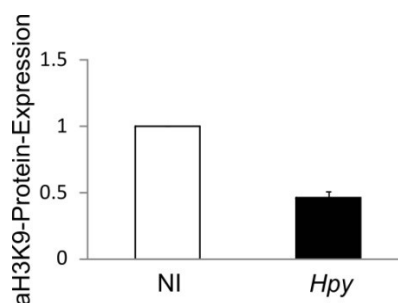


**Abbildung 3.2.6 | Quantitative RT-PCR-Daten machen eine starke Erhöhung der *HDAC9*-Expression nach *H. pylori*-Infektion in MKN74-Zellen deutlich.** MKN74-Zellen wurden für 24 h mit *H. pylori* (P12, MOI 50) unter serumfreien Bedingungen infiziert, RNA extrahiert und qRT-PCR-Analysen spezifisch für *HDAC9* durchgeführt. Im Diagramm dargestellt ist die relative x-fache Veränderung bezogen auf nicht infizierte Zellen (NI) dreier unabhängiger biologischer Experimente und deren Standardfehler (SE).

### 3.2.7 Deacetylierung von Histon H3 Lysin 9

Die Funktion von HDAC9 ist die NAD(Nicotinamidadenindinukleotid)-abhängige Deacetylierung von Histon H3 Lysin 14 und Lysin 9 sowie Histon H4 Lysin 16 [91, 294, 295]. Daher wurden Modifikationen dieser Reste mit Hilfe von Immunblots genauer untersucht. Auch die Acetylierung und Methylierung von Histonresten kann einen Effekt auf die Chromatinkonformation haben, indem die zunehmende negative Ladung die Bindungsstärke von Histonen und DNA herabsetzt.

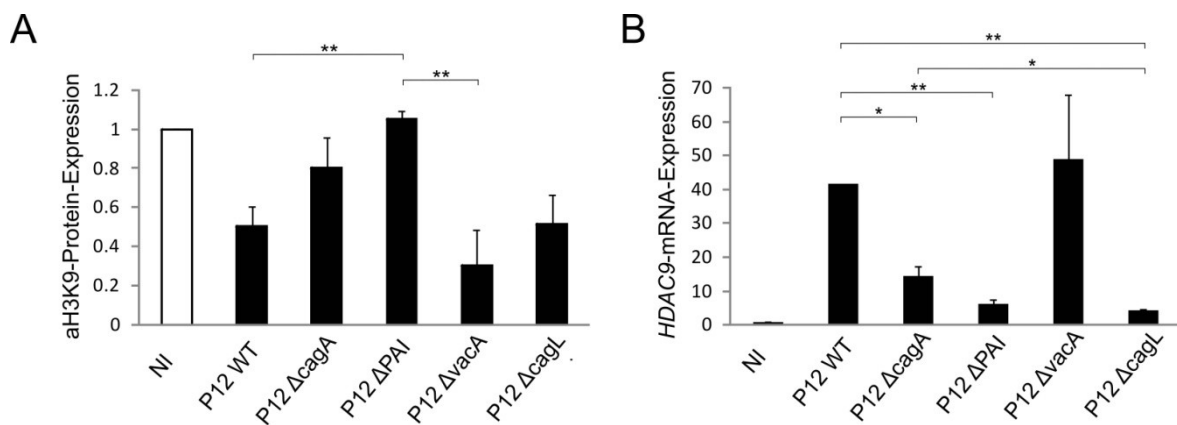
Die Ergebnisse zeigen eine bedeutsame Abnahme der Acetylierung von Histon H3 an Position Lysin 9 (Abb. 3.2.7), wohingegen die Methylierung dieses Histonrests zum gleichen Zeitpunkt kaum verändert ist (Daten nicht gezeigt). MKN74-Zellen weisen 24 h *p.i.* eine starken Abnahme des Acetylierungslevels auf die Hälfte des Normalniveaus auf (Abb. 3.2.7 B). Betrachtet man weitere mögliche Modifikationen – Acetylierung von H3K14 und H4K16 – werden unter gleichen experimentellen Bedingungen keine Änderungen deutlich (Daten nicht gezeigt).



**Abbildung 3.2.7 | Immunblots zeigen in Langzeitinfektionen mit *H. pylori* eine H3K9-Deacetylierung.** Die Immunblotquantifizierung nicht infizierter und *H. pylori*-infizierter (P12, 24 h *p.i.*, MOI 50) MKN74-Zellen erfolgte mittels AIDA-Software. Die spezifische Signalintensität von aH3K9 wurde auf  $\beta$ -Aktin normalisiert und der Mittelwert und Standardfehler (SE) von vier biologischen Replikaten ermittelt.

### 3.2.8 Typ-IV-Sekretionssystem- und CagA-abhängige HDAC9-Expression

*HDAC9* ist durch die Infektion mit *H. pylori* stark hoch reguliert. Interessanterweise ist die H3K9-Acetylierung abhängig vom Vorhandensein der *H. pylori*-Pathogenitätsinsel PAI (T4SS) und dem Effektorprotein CagA (Abb. 3.2.9 A). Ergebnisse der quantitativen RT-PCR-Analyse der *HDAC9*-Expression ergänzen diese Beobachtung: Die mit dem *H. pylori*-Wildtyp infizierten Zellen weisen im Vergleich zu *cagA*- und PAI-Mutanten eine stark erhöhte *HDAC9*-Expression auf (Abb. 3.3.4 B). Nach Infektion mit der *H. pylori* *VacA*-Mutante werden im Vergleich zur Wildtyp-Infektion erhöhte mRNA-Transkriptlevel von *HDAC9* detektiert (Abb. 3.2.9 B). Auch dies korreliert mit einer im Vergleich zur Wildtyp-Infektion nochmals reduzierten Acetylierung von H3K9 (Abb. 3.2.9 A). Lediglich die Infektion mit der *H. pylori* *CagL*-Mutante unterstützt die Hypothese eines funktionellen Zusammenhangs zwischen H3K9-Acetylierung und *HDAC9*-Expression nicht.



**Abbildung 3.2.8 | Quantifizierung von H3K9-Acetylierung und HDAC9-Expression nach Infektion von Epithelzellen mit *H. pylori*-Wildtyp und diversen Mutanten.** Der *H. pylori*-Stamm P12 und dessen Mutantenstämme  $\Delta$ cagA,  $\Delta$ PAI,  $\Delta$ vacA und  $\Delta$ cagL wurden bei der Infektion von MKN74-Zellen eingesetzt (24 h *p.i.*, MOI 25). **(A)** Quantifizierung der H3K9-Acetylierung: Die Daten wurden auf  $\beta$ -Aktin normalisiert und zeigen den Mittelwert dreier biologischer Replikate mit Standardfehler (SE) und Signifikanzniveau (\*\*  $p < 0,01$ ). **(B)** *HDAC9*-Expressionslevel wurden mittels qRT-PCR quantifiziert und auf *GAPDH* normalisiert. Die Daten präsentieren die relative x-fache Veränderung von *HDAC9* normalisiert auf mRNA-Expressionslevel in *H. pylori*-Wildtyp(WT)-infizierten und nicht infizierten (NI) MKN74-Zellen. Die Analyse zeigt die Ergebnisse von drei unabhängigen Experimenten mit Standardfehler (SE) und Signifikanzniveau (\*  $p < 0,05$  / \*\*  $p < 0,01$ ).

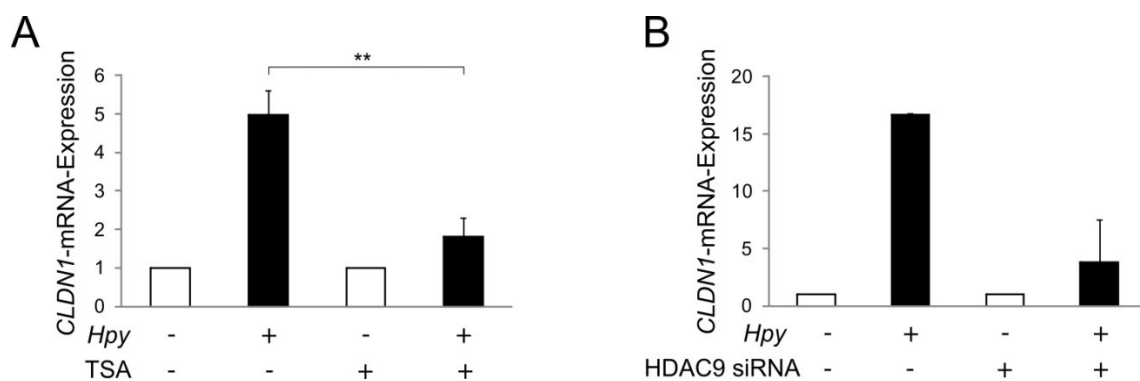
### 3.2.9 HDAC9-abhängige Claudin-1-Expression

Um die Auswirkung der erhöhten *HDAC9*-Expression auf die Regulation spezifischer Gene zu untersuchen, wurde die Expression von Claudin-1 (*CLDN1*) genauer betrachtet. Dieses Gen zeigte im Expressionsmicroarray eine 10-fach erhöhte Transkription im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollzellen (Tab. 3.2.6). Claudin-1 wurde bereits von Krishnan *et al.* als Gen beschrieben, welches durch HDACs reguliert wird [293]. Diese Auffälligkeit sowie die Genfunktion als integrales Membranprotein und Komponente der zellulären *tight junctions* machen es zu einem interessanten Untersuchungsobjekt während der *H. pylori*-Infektion. Claudine sind unter anderem für die Zell-Zell-

Adhäsion in epithelialen oder endothelialen Zellschichten verantwortlich, die charakteristischerweise durch *H. pylori* aufgelöst werden und die Zellelongation und Migration infizierter Epithelzellen *in vitro* unterstützen [296].

Zur Überprüfung der Expressionsmicroarraydaten wurden *CLDN1*-mRNA in nicht infizierten und *H. pylori*-infizierten (MOI 50) MKN74-Zellen quantifiziert. In diesem Zusammenhang wurde die Rolle zelleigener HDACs mittels Trichostatin A (TSA)-Behandlung kontrolliert. TSA inhibiert selektiv HDACs der Klasse I und II in Säugetierzellen, nicht aber HDACs der Klasse IV oder Sirtuine. Der pan-Inhibitor TSA hemmt u.a. HDAC9 besonders stark [105].

Quantitative RT-PCR-Analysen bestätigen die Hochregulation der *CLDN1*-mRNA in infizierten Zellen; diese wird jedoch durch TSA-Behandlung nahezu auf das Expressionsniveau uninfizierter Zellen reduziert (Abb. 3.2.9 A). Aus dieser TSA-abhängigen, signifikanten Reduktion kann geschlossen werden, dass sich Histondeacetylasen der Klasse I und/oder II aktivierend auf die Expression von Claudin-1 auswirken. Wie bereits gezeigt ist HDAC9, eine Histondeacetylase der Klasse II, verstärkt in *H. pylori*-infizierten Epithelzellen exprimiert. Folglich zeigt die siRNA-vermittelte HDAC9-Depletion den gleichen Effekt: die *H. pylori*-vermittelte Hochregulation der *CLDN1*-mRNA ist nach *knockdown* von *HDAC9* aufgehoben (Abb. 3.2.9 B). Dies deutet darauf hin, dass die *CLDN1*-Transkription direkt vom Vorhandensein von HDAC9 abhängig ist.



**Abbildung 3.2.9 | Abnehmende *CLDN1*-Expression nach HDAC-Inhibition bzw. *HDAC9* knockdown.** *CLDN1*-mRNA-Level in nicht infizierten (-) und *H. pylori*-infizierten (+) MKN74-Zellen (P12, 24 h *p.i.*, MOI 50). Isolierte mRNA wurde mittels qRT-PCR quantifiziert, auf *GAPDH* normalisiert und relativ zur nicht infizierten Kontrolle dargestellt. **(A)** HDAC-Inhibition mit 5 mM TSA für 24 h (+) hat die signifikante Abnahme der *CLDN1*-Expression, im Vergleich zur unbehandelten (-) Infektion, zur Folge. Die Balken präsentieren den Mittelwert aus vier biologischen Replikaten und deren Standardfehler (SE) und Signifikanzniveau (\*\*  $p < 0,01$ ). **(B)** Spezifische HDAC9-Depletion mittels siRNA-Transfektion verursacht, im Vergleich zur Kontroll-siRNA (AllStars, Qiagen) die reduzierte *CLDN1*-Expression in MKN74-Zellen. Die Balken geben den Mittelwert zweier biologischer Replikate und deren Standardfehler (SE) wieder.

### 3.3 Diskussion: Teil I

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass das humane Magenpathogen *H. pylori* einen starken Einfluss auf die Histon-Modifikationen der Wirtszelle ausübt. Nach Infektion kommt es in gastrischen epithelialen Zelllinien sowohl zur Umgestaltung der Phosphorylierungskonformation von H3S10 und H3T3, als auch zur Deacetylierung von H3K9. Die starke globale Abnahme der H3S10-Phosphorylierung konnte auf einen transienten *H. pylori*-induzierten Zellzyklusarrest zurückgeführt und in Abhängigkeit eines funktionstüchtigen T4SS beobachtet werden. Die ebenfalls von der Pathogenitätsinsel PAI (T4SS) und dem Effektorprotein CagA abhängige Deacetylierung konnte mit der gesteigerten transkriptionellen Aktivität von *HDAC9* assoziiert werden. *HDAC9* wiederum ist essentiell für die *H. pylori*-bedingte erhöhte Expression von Claudin-1.

Diese bereits 2008 in Teilen veröffentlichten Daten [297] konnten von Ding *et al.* im Jahr 2010 bestätigt werden [298]. Auch in der nachfolgenden Studie wurde gezeigt, dass *H. pylori* eine *cagPAI*-abhängige H3S10-Dephosphorylierung induziert. Jedoch wird die Modifikation zusätzlich in Zusammenhang mit der Transkriptionskontrolle von Genen gebracht und ein biphasischer Effekt postuliert, der einerseits den Zellzyklus, andererseits die Gentranskription beeinflusst. So fanden Ding *et al.* eine infektionsbedingt zunehmende mRNA-Menge und Phosphorylierung des Protoonkogens c-Jun sowie eine reduzierte HSP70 (70 kDa *heat shock protein*)-Transkription und interpretierten dies als pH3S10-abhängige Genexpression. Außerdem fanden sie H3K23 deacetyliert, H3K9 jedoch unverändert. Dies steht im Gegensatz zu den in dieser Arbeit vorgestellten Beobachtungen. Eine Erklärung hierfür ist möglicherweise die Verwendung einer anderen Zelllinie. Auch der genaue Zeitpunkt der Infektion ist nicht angegeben, sodass anzunehmen ist, dass eine Anpassung der Infektionsdauer zu ähnlichen Resultaten in AGS-Zellen führt.

Die in dieser Arbeit beobachtete Dephosphorylierung entspricht Studien mit anderen Humanpathogenen. So konnten Hamon und Kollegen beobachten, dass eine Infektion mit dem intrazellulären gram-positiven Pathogen *Listeria monocytogenes* zu einer drastischen Dephosphorylierung von H3S10 sowie zur globalen Deacetylierung von H4 führt [141]. Dafür konnten sie das bakterielle Toxin Listeriolysin verantwortlich machen. Interessanterweise können auch andere Toxine der CDC-Familie wie Perfringolysin von *Clostridium perfringens* und Pneumolysin von *Streptococcus pneumoniae* ähnliche Effekte hervorrufen [141]. Histon-Modifikationen und Chromatin-Umgestaltung wird auch von *Mycobacterium tuberculosis*-Infektionen initiiert. Hier konnte ein 19 kDa Lipoprotein charakterisiert werden, dass die IFN- $\gamma$ -induzierte Umgestaltung des Chromatins wichtiger Gene der Signaltransduktion und immunologisch wirksamer Gene inhibiert [299]. Teilweise kann damit die Persistenz chronischer Tuberkulose-Infektionen erklärt werden. Auch das Diarrhö-auslösende Bakterium *Shigella flexneri* sekretiert mit Hilfe seines T3SS den Effektor OspF, der eine Phosphothreoninlyase-Aktivität aufweist [300, 301]. Damit trägt OspF zur Repression von NF- $\kappa$ B-regulierten Genen durch Blockade der Histon H3-Phosphorylierung bei, was den Zugang von Transkriptionsfaktoren zum Chromatin behindert [302].

Des Weiteren wird das *Listeria nuclear targeted protein A* (LntA) von *Listeria monocytogenes* in Epithelzellen des Wirtes sekretiert und dringt in deren Nukleus ein. Dort verhindert es die Bindung

des Heterochromatin-Proteins BAHD1 (*bromo adjacent homology domain containing 1*) an den Promotor von Interferon-stimulierenden Genen, deren Expression durch den transkriptionellen Repressor gesteigert wird [303]. Auch ein bakterieller Effektor wurde beschrieben, dessen direktes Ziel Säugetier-Histone sind. So weist *C. trachomatis* Imitate Chromatin-verändernder Enzyme auf, welche direkt Histon-Modifikationen verursachen. Der T3SS-sekretierte Effektor NUE (*nuclear effector*) tritt in den Nukleus ein, assoziiert mit Chromatin und methyliert dort die Histone H2B, H3 und H4 [304]. Wie bei anderen Pathogenen kodiert auch das Genom von *C. pneumoniae* für ein SET-Domänen-Protein, welches als Lysin-Methyltransferase nicht nur chlamydiale Histone methyliert, sondern auch *in vitro* mit murinem Histon H3 interagiert [305].

Handelt es sich bei den Phänomenen der bakteriell induzierten Deacetylierung, Dephosphorylierung und Methylierung von Histonen um eine allgemeingültige Strategie von sowohl extra- als auch intrazellulären Bakterien, um die Wirtszellantwort zu stören und die Pathogenität zu modulieren? Vergleiche bakterieller Organismen legen diese Schlussfolgerung nahe, dennoch kann zum jetzigen Zeitpunkt keine allgemeingültige Aussage getroffen werden. Generell stehen pathogene Organismen – ob Bakterien, Protozoa oder Pilze – unter dem ständigen Druck, der Wirtszellabwehr zu entgehen. Hier spielt die antigene Variation eine entscheidende Rolle in der Immunevasion [306]. Chromatin-Modifikationen der Wirtszelle haben den Vorteil, dass sie reversibel und schnell sind. Dadurch ermöglichen sie die Reaktion auf sich verändernde Umweltbedingungen. Für Protozoen wie *Plasmodium falciparum*, *Toxoplasma gondii* oder *Trypanosoma brucei* ist ein Zusammenhang zwischen antigener Varianz und Virulenz einerseits und Histon-Modifikationen andererseits nachgewiesen [307-309]. Auch pathogene Pilze wie *Candida albicans* können über Veränderungen des Histon-Modifikationsstatus, beispielsweise über Histon-modifizierende Enzyme wie HDACs und HATs, Virulenz und antigene Varianz verändern [310, 311].

Bisher konnte kein Zusammenhang zwischen bakterieninduzierten Histon-Modifikationen und der Regulation des Wirts-Zellzyklus hergestellt werden. Nichtsdestotrotz konnte bereits eine Verknüpfung zwischen bakteriellen Toxinen und Zellzyklusabfolge beschrieben werden [312].

*H. pylori* ist dafür bekannt, den Zellzyklus der infizierten Zelle zu beeinflussen. So wurden Verzögerungen sowohl im G1/S- [287], als auch im G2/M-Stadium beobachtet [313]. Die Ergebnisse der hier vorliegenden Untersuchung unterstützen die Hypothese, dass in Wirtszellen ein *H. pylori*-induzierter G2/M-Arrest stattfindet. Eine Verzögerung im Zellzyklus, die noch vor dem Eintritt des G2/M-Übergangs stattfindet, blockiert den Eintritt in die Mitose und verhindert damit die Phosphorylierung von H3S10 und H3T3 durch mitotische Histonkinasen. Die Phosphorylierung von Histon H3, insbesondere an Serin 10, scheint entscheidend für den Fortgang der Mitose zu sein, da dies in Säugerzellen die späte G2-Phase initiiert. Ausgehend von der Perizentromer-Region breitet sich die Phosphorylierung über die sich kondensierenden Chromosomenarme aus [314, 315].

Ein weiteres Indiz für einen G2/M-Arrest ist die zytoplasmatische Zyklin B1-Akkumulation, welche zwei Stunden nach Infektion beobachtet wurde. Zyklin B1 ist ein Schlüsselprotein der Zellzyklusregulation. Der Zyklin B1/CDC2-Komplex ist bereits an frühen Ereignissen der Mitose (Chromosomenkondensation, Zellkernhüllenabbau und Spindelaufbau) beteiligt. Im Komplex mit

CDC25C akkumuliert er während der späten S- und frühen G2-Phase des Zellzyklus im Zytoplasma. Mit dem Abschluss der DNA-Synthese dirigiert die Phosphatase CDC25C den Komplex aktiv zum G2/M-Übergang, was zur nuklearen Translokation des Zyklin B1/CDC2-Komplex in der frühen M-Phase führt [316]. Die Akkumulation von Zyklin B1 im Zytoplasma spricht somit für einen *H. pylori*-induzierten G2-Arrest. Ein Grund für die Nicht-Initiation des Zyklin B1/CDC2-Komplexes ist der Effekt von *H. pylori* auf CDC25C: das Transkript- und Proteinlevel dieser Phosphatase ist genau zu dem Infektionszeitpunkt deutlich reduziert (Daten nicht gezeigt [297]), bei dem auch die zytoplasmatische Zyklin B1-Akkumulation auftritt.

Verschiedene Mechanismen der transkriptionellen Repression von CDC25C sind hier vorstellbar. Beispielsweise könnte *H. pylori* die folgenden Transkriptionsfaktoren direkt regulieren, deren Bindestellen *upstream* vom CDC25C-Promotor liegen: NF-Y (*nuclear transcription factor Y*), Sp1 und/oder p53 [317]. In diesem Zusammenhang wurde auch gezeigt, dass CDC25C ein direktes Ziel des Transkriptionsfaktors p53 darstellt und von diesem reprimiert wird [318].

Wie bereits erwähnt wurde in früheren Studien gezeigt, dass eine Infektion mit *H. pylori* den G2/M-Übergang im Zellzyklus inhibiert und damit eine Reduktion der Zellteilungsrate gastrischer Epithelzellen verursacht [288]. Dieser G2/M-Aufschub konnte mit der reduzierten Aktivität der CDC2-Kinase assoziiert werden. Des Weiteren erfordert der *H. pylori*-induzierte G2/M-Arrest direkten Kontakt von Bakterium und Wirtszelle, wie er auch in der hier vorliegenden Studie beobachtet wurde. Die Abhängigkeit der pH3S10-Abnahme vom T4SS selbst steht im Einklang mit aktuellen Publikationen [288].

Um den Ablauf des Zellzyklus beim Übergang von der G2- zur M-Phase zu unterbrechen, ist wahrscheinlich eine erfolgreiche Insertion des T4SS-Apparates in die Wirtszellmembran erforderlich. Bisher war es nicht möglich, den zugrunde liegenden Mechanismus genau aufzuklären. Vorstellbar ist die Wirkung des Effektorproteins CagA, das bei der Infektion in die Wirtszelle transloziert wird. Die Aktivierung des Wirtszellrezeptor Integrin  $\alpha 5\beta 1$  durch das T4SS von *H. pylori* [319] scheint dabei jedoch keine Rolle zu spielen. Vorläufige, nicht gezeigte Experimente, bei denen AGS-Zellen mit anti-Integrin  $\alpha 5\beta 1$ -Antikörper stimuliert wurden, zeigen nicht die erwartete Histon-Dephosphorylierung, wie sie bei Infektion mit dem Wildtyp zu beobachten ist.

Der beobachtete prä-mitotische Zellzyklusarrest führt möglicherweise dazu, dass mitotische Histonkinasen fehlerhaft oder gänzlich nicht aktiviert werden und es dadurch zu einer Abnahme der H3S10-Phosphorylierung kommt. Nur zwei Histon H3-Reste waren von der *H. pylori*-induzierten Dephosphorylierung betroffen, Serin 10 und Threonin 3. Die mitotische Haupt-Histonkinase Aurora B weist eine Phosphorylierungsaktivität für H3S10 und H3S28 auf, nicht aber für H3T3. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass diese Zellzykluskinase nicht für das beobachtete Phänomen verantwortlich gemacht werden kann, insbesondere da die H3S28-Phosphorylierung von der Infektion nicht beeinflusst wird. Entsprechend müssen andere mitotische Kinasen für den Effekt verantwortlich sein. In weiterführenden Untersuchungen wurde somit der Einfluss der mitotischen Histonkinase VRK1 auf das Phosphorylierungslevel von H3S10 und H3T3 untersucht. Von VRK1 ist bekannt, dass sie sowohl H3S10 als auch H3T3 phosphoryliert [292]. Weitere Histonkinasen wie Serin/Threonin-Proteinkinasen, Aurora-Kinasen, Haspin, Pak1 (*p21 protein (Cdc42/Rac)-activated*

kinase 1), Dlk/Zip (*DAP like kinase/zipper interacting protein kinase*) und VRK2 können ebenfalls an der mitotischen Phosphorylierung von H3 mitwirken, jedoch nicht an H3S10 und H3T3 gleichzeitig. Einige der erwähnten Kinasen vermögen nur einen Histon-Rest zu phosphorylieren: H3T3 durch Haspin [320], H3S10 durch Aurora A und Pak1 [321, 322] und H3T11 durch Dlk/Zip [323].

Die Serin/Threonin-Proteinkinase VRK1 gehört zu den *early response genes*, wird während der Zellteilung stark exprimiert [324] und steht in diesem Zusammenhang für die Expression von zellproliferationsrelevanten Genen wie Zyklin D1, Rb, CDK2 (*cyclin-dependent kinase-2*) und Survivin [325]. Des Weiteren phosphoryliert VRK1 die Transkriptionsfaktoren p53 [326], CREB (*cAMP response element-binding protein*) [327], c-Jun und ATF2 (*activating transcription factor 2*) [328] sowie das DNA-bindende Protein BAF (*barrier-to-autointegration factor*) [329]. In der späten G2-Phase kontrolliert VRK1 über die Phosphorylierung von Histonen die Chromatinkondensation sowie den Zusammenbau der Zellkernhülle und ist Teil der Signaltransduktionskette der Golgi-Fragmentierung [330]. Wird VRK1 mittels RNA-Interferenz depletiert, kommt es zur Blockierung der Zellzyklusabfolge in der G1-Phase und zum Verlust der spezifischen Phosphorylierung diverser Proliferationsmarker und damit zur Reduktion der Zellproliferation an sich [325].

In dieser Arbeit konnte mittels *in vitro*-Kinase-Aktivitätsassay gezeigt werden, dass bei *H. pylori*-infizierten AGS-Zellen eine Reduktion der Histon-Phosphorylierungsaktivität von VRK1 um ca. 40 % auftritt. Die Überexpression von VRK1, nicht aber Aurora B, verursachte eine Kompensation des *H. pylori*-bedingten Dephosphorylierungseffekts von Histon H3 an Serin 10 und Threonin 3 [297]. Beobachtungen deuten auf die Möglichkeit hin, dass die Überexpression von VRK1 direkt zur Phosphorylierung von H3S10 bzw. H3T3 führt.

Die dargestellten Ergebnisse eröffnen einen Einblick in ein noch junges Wissenschaftsfeld, das den Zusammenhang zwischen Störungen im Zellzyklusablauf und pathogenen Bakterien herstellt. Im Jahr 2011 veröffentlichten Fortier *et al.* Transkriptions- und Proteom-Analysen *Legionella*-infizierter Makrophagen [331]. Dabei wurde deutlich, dass *Legionella* vor allem Genen beeinflusst, die den Zellzyklus regulieren. Des Weiteren wurden zellzyklusregulierende CDTs (*cytolethal distending toxins*) in diversen gram-negativen Bakterien wie *Campylobacter jejuni* [332] und *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* [312, 333] nachgewiesen. Deren Untereinheit CdtB stellt eine DNase dar, die im Zellkern DNA-Doppelstrangbrüche verursacht. DNA-Reparaturmechanismen werden aktiviert und daraufhin über die Phosphorylierung von Chk2 und CDC25C Zellzyklusarrest und eventuell Apoptose induziert [334]. Die pathogenen *E. coli* Stämme EHEC und EPEC sekretieren das bakterielle Cyclomodulin Cif (*cycle inhibiting factor*) via T3SS [335]. Cif blockiert, ähnlich wie CDT, den Zellzyklus beim Übergang von der G2- zur M-Phase und hemmt damit die Zellteilung. Im Gegensatz zu CDT schädigt Cif jedoch nicht die DNA der Wirtszelle [335].

Die proliferationshemmende Eigenschaft von CDT aus *C. jejuni* sowie die des VacA-Toxin von *H. pylori* legen einen gemeinsamen Wirkungsmechanismus der beiden Toxine nahe. Untersuchungen zeigten jedoch, dass beide Toxine in unterschiedliche Signalwege eingreifen, um einen Zellzyklusarrest zu induzieren. Bei VacA wird der Zellzyklusarrest über die Aktivierung von NFAT (*nuclear factor of activated T-cells*) bewerkstelligt [336]. Hingegen ist die Wirkungsweise von Cif

bisher noch unbekannt. Es ist weder homolog zu CDT noch gibt es Hinweise darauf, dass es als DNase wirkt.

CDT, Cif und VacA werden zu den inhibitorisch wirkenden Cyclomodulinen gezählt, CagA hingegen zu den stimulierenden Cyclomodulinen. Im Gegensatz zu VacA wirkt CagA fördernd auf den Zellzyklusverlauf. Da der in dieser Arbeit beschriebene Effekt der H3S10-Dephosphorylierung zwar abhängig vom T4SS, nicht aber von CagA oder VacA ist, könnte ein weiteres, bisher unbekanntes Cyclomodulin für den beschriebenen G2/M-Arrest verantwortlich sein. Es ist vorstellbar, dass dieser unbekannte Faktor über das T4SS *in vivo* in die Wirtszellen, bspw. der gastrischen *Lamina propria* sekretiert wird und dort den Zellzyklusarrest auslöst. Folglich würde die Erneuerung der epithelialen Integrität sowie der Prozess der Zell-Abspaltung verhindert, was die bakterielle Kolonisation und chronische Infektion unterstützt.

Cyclomoduline, die die zelluläre Proliferation inhibieren, könnten als prädisponierende Faktoren für die Krebsentwicklung wirken [337-339]. Genetische Veränderungen können sowohl beim genotoxischen CDT als auch bei Cif Endoreduplikation induzieren, die zur Krebsentstehung beitragen. Auch das stimulierende Cyclomodulin CNF (*cytotoxic necrotizing factor*) von Prostatitisverursachenden *E. coli*-Stämmen [340] wird als einer der Faktoren für die Krebsentstehung postuliert [339].

Histondeacetylierung deutet auf epigenetische Repression hin und spielt eine wichtige Rolle bei der Genregulation, dem Ablauf des Zellzyklus und der zellulären Entwicklung. Der beobachtete starke transkriptionelle Anstieg der Histondeacetylasen nach *H. pylori*-Infektion sollte folglich Auswirkungen auf die Wirtszelle haben. Auch mit dem Rickettsien-Pathogen *Anaplasma phagocytophilum* infizierte Zellen aktivieren die HDAC1-Expression, die mit Histon H3-Deacetylierung und -Methylierung in Verbindung gebracht wird [341].

Im Gegensatz dazu wird die Expression von Histonacetyltransferasen wie HAT1 (*histone acetyltransferase 1*), Elp3 (*elongator acetyltransferase complex subunit 3*), TAF1 (*TATA box binding protein associated factor 1*), KAT2B (*K (lysine) acetyltransferase 2B*), SRC (*v-src sarcoma*) sowie Mitglieder der MYST-Familie unter gleichen Bedingungen nicht oder nur schwach differenziell reguliert (Daten nicht gezeigt). Die unterschiedlichen Funktionen dieser Enzyme wirken sich gegensätzlich auf die Chromatinstruktur und damit auch auf die Genexpression aus: Die Acetylierung von Histonen durch HATs lockert die DNA auf und ermöglicht damit Genexpression, wohingegen HDACs durch Entfernen der negativ geladenen Acetylgruppen die DNA-Histon-Bindung verstärken. Damit wird der Zugang zur DNA erschwert und die Expression von Genen unterdrückt [342]. Monero *et al.* publizierten, dass die differenzielle Expression von *HDAC3*, *HDAC7* und *HDAC9* mit akuter lymphatischer Leukämie in direktem Zusammenhang steht [343].

Wie auch die H3S10-Dephosphorylierung ist sowohl die gesteigerte *HDAC9*-mRNA-Expression als auch die H3K9-Deacetylierung mit der bakteriellen Pathogenitätsinsel assoziiert. So ist die infektionsbedingte Deacetylierung von H3K9 von CagA bzw. PAI abhängig: Infektionen mit diesen Mutanten führen zu keiner (ausgeprägten) H3K9-Deacetylierung. Die Stärke der *HDAC9*-Expression hängt wiederum von VacA, CagA und PAI ab, sodass deren Mutation zu einer verringerten *HDAC9*-



Expression im Vergleich zum Wildtyp führt. Die CagL-Mutante zeigt keine Veränderung der infektionsbedingten H3K9-Deacetylierung, weist jedoch nur noch eine schwache *HDAC9*-Expression auf. Das Pilus-Protein CagL bindet mit seinem Arginin-Glyzin-Aspartat(RGD)-Motiv an  $\alpha 5\beta 1$ -Integrine der Wirtszelle. Diese Interaktion bewirkt eine bessere Positionierung des T4SS und erleichtert die Translokation von CagA [319]. Die Aktivierung von HDAC9 ist von der CagA-Translokation abhängig, die durch CagL erleichtert wird. Der Hauptmechanismus der HDAC-Aktivierung vollzieht sich allerdings über den PAI-unabhängigen Effektor VacA, der auch über Porenbildung in die Wirtszelle gelangen kann.

H3K4-Trimethylierungen und H3K9-Acetylierungen werden mit Genpromotor-Aktivität in Verbindung gebracht [344]. Weber *et al.* zeigen, dass Promotoren inaktiver unmethylierter CpG-Inseln ein erhöhtes Level an H3K4-Dimethylierung aufweisen, was daraufhin deutet, dass dieser Chromatinmarker DNA vor Methylierung schützt [345]. Wenn die *H. pylori*-bedingte Deacetylierung von H3K9 zu verminderter Genaktivität führt, ist es im Weiteren ein spannendes Ziel, deren Auswirkungen zu untersuchen.

Eine Ursache für die beobachtete H3K9-Deacetylierung könnte die gesteigerte HDAC-Transkription sein, vor allem von *HDAC9*. Allerdings sind hier zur genaueren Untersuchung Inhibitor- und *knockdown*-Experimente nötig. Direkte Folge der erhöhten *HDAC9*-Expression könnte die Hemmung der Transkription bestimmter Gene sein. Die erhöhte HDAC9-Aktivität und damit einhergehende Deacetylierung von Histonen bewirkt eine geschlossene Chromatinstruktur mit verminderter Transkriptionsaktivität. Sind davon bspw. Repressoren von Claudin-1 betroffen, kann es zur Aktivierung dieser *tight junction*-Komponente kommen.

MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*) stellt ein direktes transkriptionelles Ziel von HDAC9 dar. Die Repression von MEF2 über HDAC9 wird durch die Rekrutierung von HDAC1 und/oder HDAC3 eingeleitet [346]. Da MEF2 einen Regulator der zellulären Differenzierung darstellt [347], sollte in weiterführenden Experimenten auch die Rolle dieses Transkriptionsfaktors bei der Infektion durch *H. pylori* untersucht werden.

Weitere Substrate der HDAC9-Deacetylierung, die nicht zu den Histonen gehören, sind ATDC (*ataxia telangiectasia group D-complementing*) [269] und MAP-Kinasen [348]. Yuan *et al.* fanden heraus, dass HDAC9 zur Deacetylierung von ATDC führt, was die Assoziation von ATDC und p53 verändert und letztendlich die Zellproliferation-fördernde und Apoptose-hemmende Aktivität von ATDC unterbindet [269]. Auch dieser Mechanismus würde den beobachteten und bereits diskutierten infektionsbedingten Zellzyklusarrest erklären und die antiapoptotische Wirkung von *H. pylori* stützen [214, 215]. Park *et al.* beobachteten eine H3K9-Deacetylation and H3K9-Trimethylation in mitotischen Zellen, was einen Hinweis darauf gibt, dass das in dieser Arbeit beobachtete Phänomen der H3K9-Deacetylierung Zellzyklus-spezifisch abläuft [103]. Hingegen wurde von Pero *et al.* eine Abnahme der H3K9-Dimethylierung beobachtet, während die Mono- und Dimethylierung von H3K9 während des Zellzyklusverlaufs nicht verändert wurden.

Die Frage bleibt offen, ob es sich bei der H3K9-Deacetylierung um einen transienten Effekt handelt, wie bei der Phosphorylierung von H3S10. Zur Klärung sollten ein Immunfluoreszenz-basierte Assays eines Zellzyklusmarkers und der Acetylierung von H3K9 durchgeführt werden.

In dieser Arbeit konnte Claudin-1 über *HDAC9-knockdown*-Experimente als ein indirektes Ziel der *HDAC9*-Expression nachgewiesen werden. Eines der Merkmale der *H. pylori*-Pathogenese ist die Zerstörung der *tight junctions* im gastrischen Epithel. Der Funktionsverlust von *tight junctions* in Metastasen ist zudem ein phänotypisches Merkmal von Krebs.

Die Proteinfamilie der Claudine bildet den Hauptbestandteil von *tight junctions*, kontrolliert den parazellulären Transport und sorgt für die Erhaltung der Zellpolarität [349]. Die Überexpression der Claudin-Proteine, wie sie in dieser Studie beobachtet wurde, erscheint als Ursache von Krebsentstehung zunächst unerwartet. Offensichtlich findet sie als ein frühes Ereignis der Karzinogenese statt und wurde in einigen Vorstufen von Krebs beobachtet [293]. Beispielsweise liegen *CLDN3*, *CLDN4*, und *CLDN7* in bestimmten malignen Erkrankungen verstärkt vor, so z.B. in Gewebe der Bauchspeicheldrüse, Blase, Schilddrüse, Eileiter, Eierstöcke, Magen, Dickdarm, Brust, Gebärmutter oder Prostata [350]. Die gesteigerte und auch abnehmende Proteinexpression von Claudin-1 wurde in bisherigen Studien im Zusammenhang mit der Entwicklung maligner Tumore beobachtet [351]. Funktionelle Studien haben gezeigt, dass Claudin-1 die Metalloproteinasen der Zellmembran aktiviert [352, 353]. Darmkrebszellen, die vermehrt Claudin-1 exprimieren, sind darüber in der Lage, Zellmigration und die Aktivität verschiedener Metalloproteasen zu steigern, die zur Spaltung von Lamininen der extrazellulären Matrix beitragen [353]. Des Weiteren führt die verstärkte Expression von Claudin-1 u.a. zu reduzierter Apoptose, unterstützt damit das Überleben von Krebszellen und führt zu vergleichsweise großen Tumoren [354, 355]. Dennoch sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch unklar. Möglicherweise generiert die Claudin-Expression Signale, die zu frühen und späten Stadien der Karzinogenese beitragen, indem Invasion, Motilität und Überleben dieser Zellen unterstützt werden [349]. Claudin-1-Expression wird u.a. auch in Zusammenhang mit Invasion und Metastasenbildung von Kolontumorzellen [354] und akuter lymphatischer Leukämie gebracht [343]. Die Autoren zeigen, dass Histondeacetylaseinhibitoren wie TSA die Expression von Claudin-1 in Darmkrebszellen inhibieren. Hier wird die mRNA-Stabilität von Claudin-1 am 3'-UTR durch HDAC2 spezifisch moduliert [293]. Ob dieser Mechanismus auch die in dieser Arbeit beobachtete HDAC9-abhängige Claudin-1-Regulation erklärt, muss in weiterführenden Experimenten geprüft werden. Da HDAC-Inhibitoren als vielversprechende Mittel gegen Krebs postuliert werden, demonstrieren derartige Beobachtungen die biologische Relevanz dieser Genfamilien in der Krankheits- und Krebsentstehung. Wiederum zeigen *in silico*-Analysen und qRT-PCR-Daten, dass viele Claudin-kodierende Gene in Krebsgewebe nur schwach exprimiert sind [350]. Die verminderte Claudin-Expression – auch von Claudin-1 – wird mit gesteigerter Invasion und Metastasenbildung in diversen Krebsformen in Verbindung gebracht [350, 356-358]. Interessanterweise wurde eine abnehmende Expression von Claudin-4 in *H. pylori*-infizierten gastrischen Epithelzellen beobachtet, welche – abhängig von Rho-Kinasen, CagA und VacA – zur Zerstörung der *tight junctions* beiträgt [359].

Weitere Studien sind erforderlich, um zu prüfen, ob Claudin-1-Deregulation zu Anomalitäten der *tight junctions* führt und ob diese zu Krankheits- und Krebsentstehung beitragen können. Anzunehmen ist das infektionsbedingte Zusammenspiel vieler Faktoren, die unter anderem den Zellverband des Wirts schädigen und damit unkontrolliertes Zellwachstum ermöglichen. Die kurzfristig aufgrund der erhöhten Claudin-1-Expression verstärkte Zelladhäsion führt zu Dedifferenzierung und schließlich Invasion und Metastasierung der Wirtszelle [293]. Um die Auswirkungen der gesteigerten Claudin-1-Expression auf die Dedifferenzierung und Invasion von *H. pylori*-infizierten Magenepithelzellen zu testen, könnten vorzugsweise Primärzellen für Invasions-Assays eingesetzt werden. Um hier relevant Effekte der Krankheits- und Krebsentstehung zu beobachten, ist eine Langzeitinfektion mit *H. pylori* Voraussetzung.

Auch wenn chronische *H. pylori*-Infektionen *in vivo* normalerweise mit zellulärer Proliferation und Magen-Darm-Krebs in Verbindung gebracht werden, weisen die vorliegenden *in vitro*-Studien auf einen Zellzyklusarrest der Wirtszelle hin. Das kann zu epithelialen Stillstand der Zellproliferation und zur Hemmung des Zell-Abbaus führen, was eine bakterielle Besiedlung begünstigt und eine chronische Entzündung fördert. Die Claudin-1-Aktivierung bewirkt ebenfalls eine Dedifferenzierung und Störung der zellulären Homöostase. Diese wiederum ist Voraussetzung für eine nachfolgende langwierige Entwicklung die mit der Bildung von Tumoren endet. Die Hemmung des Zellzyklus und das Rearrangement des Zellverbandes scheinen ein frühes Ereignis auf dem Weg der *H. pylori*-bedingten Pathogenese hin zur Karzinogenese darzustellen.

Mit der vorliegenden Untersuchung konnte das erste Mal ein Zusammenhang zwischen einer spezifischen infektionsbedingten Histon-Dephosphorylierung und deren Einfluss auf den Zellzyklus dargestellt werden [297]. Zudem wurde die Auswirkung der *H. pylori*-Infektion auf die Acetylierung und Methylierung weiterer Histon-Modifikationen untersucht sowie erstmalig der Zusammenhang zwischen *HDAC9*-Expression und Aktivierung von Claudin-1 nach *H. pylori*-Infektion gezeigt. Die Identifikation Wirtszell-spezifischer Faktoren liefert einen neuartigen Einblick in die Wirt-Pathogen-Interaktion und trägt zum besseren Verständnis epigenetischer Mechanismen und deren Auswirkung auf das Wirtszelle-Genom und potenzieller Mechanismen der Karzinogenese bei.

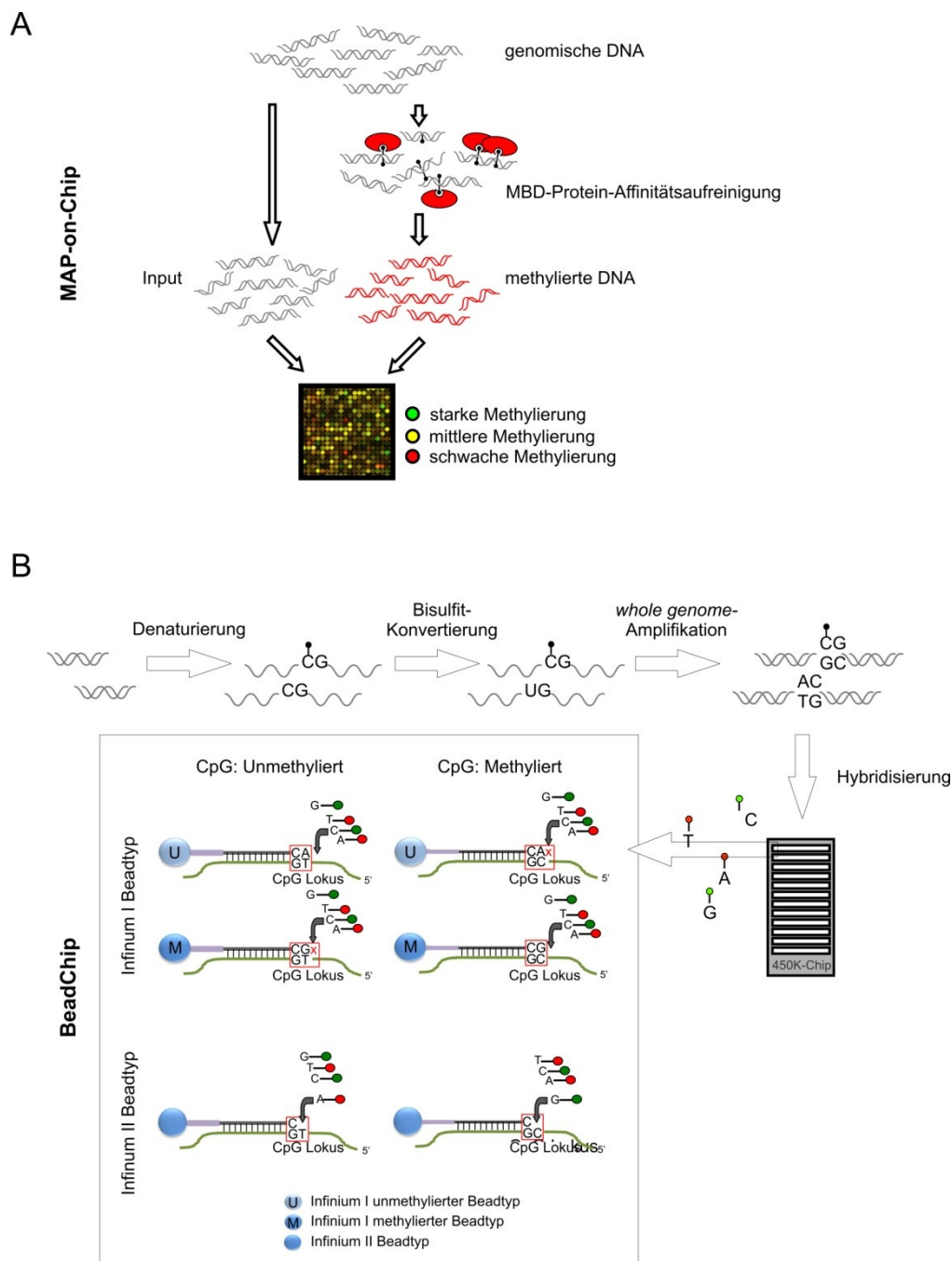
### 3.4 Teil II: MAP-on-Chip und Bisulfit-DNA-Sequenzierung: Zwei Ansätze der globalen Methylo-m-Analyse einer mit *Helicobacter pylori* infizierten gastrischen Epithelzelllinie

DNA-Microarray-Ansätze sind eine hervorragende Möglichkeit zur globalen Analyse von DNA-Methylierungssignaturen, weil sie die gleichzeitige Analyse einer größeren Anzahl an CpG-Inseln oder CpG-Positionen des humanen Genoms ermöglichen.

Die *Methylated DNA Affinity Purification* (MAP) ist ein genomweiter Ansatz zur Analyse methylierter DNA-Regionen. Basierend auf der Methode von Mohn *et al.*, bei der methylierte DNA mittels 5mC-spezifischer Antikörper angereichert wird, kommt es zur gezielten Präzipitation methylierter DNA-Fragmente [360]. Bei der MAP kommen *methyl CpG binding* (MBD)-Proteine für die Anreicherung methylierter DNA-Fragmente zum Einsatz, die mit der Gesamt-DNA (Input) verglichen werden. Im Anschluss erfolgt die Hybridisierung mit dem Microarray-Chip. Die Differenz der unterschiedlich methylierten Bereiche zwischen nicht infizierter und *H. pylori*-infizierter Probe gibt Auskunft über infektionsbedingt differenziell methylierte Regionen (*differentially methylated regions*, DMRs). Der methodische Ablauf eines MAP-Assays ist in Abbildung 3.4 A schematisch dargestellt. Der *human DNA Methylation 3x720K CpG Island Plus Chip* von NimbleGen (kurz: CpG-Island-Plus-Chip, MAP-on-Chip oder 3x720K-Array) deckt die wichtigsten regulatorischen Elemente inklusive RefSeq-Genpromotoren (*NCBI-Reference Sequence Database*) sowie 27.728 annotierte CpG-Inseln ab. Die Abdeckung jedes der insgesamt 22.532 RefSeq-Genpromotoren beginnt 2,4 kb *upstream* des Transkriptionsstarts und erstreckt sich *downstream* über 0,6 kb. Insgesamt werden 3 kb der Promotorregion jedes Gens sowie diverse Kontrollregionen abgedeckt.

Im Gegensatz dazu steht die Sequenz-spezifische Methylierungsanalyse des Infinium *HumanMethylation450 BeadChip* von Illumina (kurz: BeadChip oder 450K-Array), der mehr als 485.000 Einzelnukleotid-Methylierungsstellen abfragt. Der Array deckt 99 % der RefSeq-Gene des humanen Genoms mit durchschnittlich 17 CpG-Dinukleotiden pro Genregion ab. Die Verteilung erstreckt sich vom Promotor über die 5'-UTR, das erste Exon und den Genkörper bis hin zur 3'-UTR. Zusätzlich werden 96 % der CpG-Inseln abgedeckt. Dennoch entspricht das nur 0,0015 % der Basen des gesamten humanen Genoms (485.000 von 3,2 Mrd. bp). Der Array basiert auf der Kombination von DNA-Bisulfit-Konvertierung und Infinium-BeadChip-Technologie, welche die Aufdeckung von Methylierungsprofilen einzelner CpG-Positionen im Genom ermöglicht. Eine hohe Spezifität wird erreicht, weil 5'- und 3'-*linker* Gen-spezifische Sequenzen beinhalten. Der Ansatz des 450K-Arrays bietet die Möglichkeit, den Methylierungsstatus einzelner CpG-Positionen genomischer DNA nach Bisulfit-Konvertierung zu bestimmen. Der Methylierungsstatus der abgedeckten CpG-Positionen wurde durch ein Sequenzierungsverfahren bestimmt, bei dem es zum Einzelbasenaustausch von fluoreszenzmarkierten ddNTP-Basen kommt. Eine Kombination aus Infinium-Technologie I und II ermöglicht die Differenzierung zwischen methylierten und nicht methylierten CpG-Positionen. Für den abgefragten Locus kann der Grad der Methylierung durch Berechnen des Verhältnisses des fluoreszierenden Signals von methylierten und unmethylierten Position bestimmt werden. Der

methodische Ablauf und theoretische Hintergrund der Infinium BeadChip-Technologie ist schematisch in Abbildung 3.4 B dargestellt.



**Abbildung 3.4 | Graphische Darstellung des experimentellen Systems der Probenaufarbeitung und -weiterverarbeitung sowie deren Hybridisierung auf methylierungsspezifische Arrays. (A)** Schema des MAP-on-Chip-Assays, bei dem die genomische, durch Sonifizierung fragmentierte DNA in Input und MAP-Probe aufgeteilt wird. Im Zuge der MBD-Protein-Affinitätsaufreinigung (rot) kommt es zur Anreicherung methylierter DNA, die mit der Input-DNA verglichen wird. Beide Nukleinsäure-Proben werden unterschiedlich markiert (Cy5, Cy3) und auf denselben NimbleGen 3x720K-Array hybridisiert. Die Signalintensitäten ermöglichen Aussagen über die Stärke der Methylierung. **(B)** Die zu untersuchende genomische DNA wird einer Denaturierung und Bisulfit-Behandlung unterzogen, um methylierte (●) von unmethylierten CpG-Positionen zu unterscheiden. Nach längerer Inkubation von Einzelstrang-DNA mit Natrium-Bisulfit wird Cytosine zu Uracil

deaminiert. Methylierte Cytosine hingegen sind vor der Deaminierung geschützt und bleiben Cytosine. Im Anschluss an die Konvertierung erfolgt eine *whole genome*-Amplifikation der Bisulfit-konvertierten Probe und deren Hybridisierung auf einen Illumina 450K-Array. Dieser Array-Typ kombiniert zwei verschiedene Infinium-Technologien, die beide der Detektion von CpG-Methylierung dienen. Der Infinium I-Assay arbeitet mit zwei *bead*-Typen, von denen einer dem methylierten (M), der andere dem unmethylierten (U) CpG-Lokus entspricht. Dieses Proben-Design nimmt den gleichen Methylierungsstatus für benachbarte CpGs an. Hybridisiert der *bead*-Typ U mit der entsprechenden Sequenz, werden weitere markierte Nukleotide inkorporiert. Hybridisiert jedoch der für Methylierung spezifische *bead*-Typ M mit dem unmethylierten CpG-Lokus, kommt es zum Abbruch der Reaktion und es werden keine weiteren Nukleotide eingebaut. Entsprechendes gilt für eine methylierte Proben-Sequenz: Hybridisiert sie mit einem *bead*-Typ für methylierte DNA (M), kommt es zur Integration weiterer markierter Nukleotide, ist der *bead*-Typ spezifisch für eine nicht methylierte CpG-Position, kommt es zu keinem Einbau markierter Nukleotide. Beim Infinium II-Assay wird der Methylierungszustand durch Einzelbasen-Austausch ermittelt. Die Oligo-Sonde kann bis zu drei CpG-Positionen beinhalten. Es erfolgt der Einbau einer fluoreszenzmarkierten A-Base, die korrespondierend zu einer unmethylierten T-Base inkorporiert wird, oder der Einbau einer markierten G-Base, wenn es sich um eine methylierte Ausgangssequenz (C-Base) handelt. Durch unterschiedliche Markierung kann zwischen methylierter und unmethylierter Base unterschieden werden. Teile der Abbildung wurde von Bibikova *et al.* [361] übernommen und verändert.

Die beiden globalen Ansätze sind komplementäre Strategien, wobei die Bisulfit-DNA-Sequenzierung sensitiv für einzelne CpG-Positionen ist, während die MAP für starke Methylierung bei moderater CpG-Dichte sensitiv ist [106]. Der Abgleich aller CpG-Positionen des Illumina BeadChip mit den CpG-Inseln und Promotorregionen des NimbleGen-Arrays mittels Galaxy-Software ergibt ca. 250.000 Übereinstimmungen. Demnach befinden sich nur etwa die Hälfte der CpG-Positionen des Illumina-Arrays in Regionen, die mit dem NimbleGen-Array abgedeckt werden.

### 3.4.1 MAP-on-Chip

#### 3.4.1.1 Qualitätskontrolle

Die Beurteilung der Qualität von Rohdaten ist ein wichtiger Prozess, um Microarray-Ergebnisse miteinander zu vergleichen. Ziel ist es, Differenzen zwischen den verschieden behandelten Proben zu detektieren, die nicht auf zufälligen Fluktuationen, technischen Variationen oder Artefakten beruhen, sondern biologische Aussagen ermöglichen [362]. Die Durchführung technischer Replikate und die Analyse mittels R *Bioconductor*-Pakete wie Ringo, limma und MEDME gestatten es, solche Variationen zu erkennen. Die diagnostischen Plots in Abbildung 3.4.1.1 ermöglicht die visuelle Kontrolle.

Zuerst wurden Pseudo-Bilder der Cy3- und Cy5-Kanäle der hybridisierten 3x720K-Arrays angefertigt und überprüft, ob eine homogene Signal-Verteilung der geladenen Proben gegeben ist und technische Artefakte ausgeschlossen werden können (Daten nicht gezeigt). Die MAP-Anreicherung wird als log-Verhältnis zwischen angereicherter Fraktion und Input (Cy3/Cy5) berechnet und für jede hybridisierte Sequenz als Logarithmus zur Basis 2 ( $\log_2$ ) angegeben. Korrelationsanalysen ermöglichen Aussagen über die Reproduzierbarkeit der vorliegenden Datensätze. Die paarweise Korrelationsmatrix, die  $\log_2$ -Verhältnisse mittels Pearson's Korrelationskoeffizient miteinander vergleicht, sollte einem Wert über 0,8 entsprechen [362]. Aus

Abbildung 3.4.1.1 A wird deutlich, dass die beiden Experimente gut miteinander korrelieren. Die höchsten Übereinstimmungen ergaben die *H. pylori*-infizierte sowie nicht infizierte Analyse beider Experimente mit Korrelationskoeffizienten über 0,9. Vergleichsweise niedrig – mit einem Wert von 0,77 – ist die Korrelation zwischen *H. pylori*-infizierter Probe des ersten Experiments im Vergleich zur nicht infizierten Probe des zweiten Experiments. Diese geringere Übereinstimmung könnte als Indikator biologisch relevanter Unterschiede der Methylierungssignatur nach *H. pylori*-Infektion dienen.

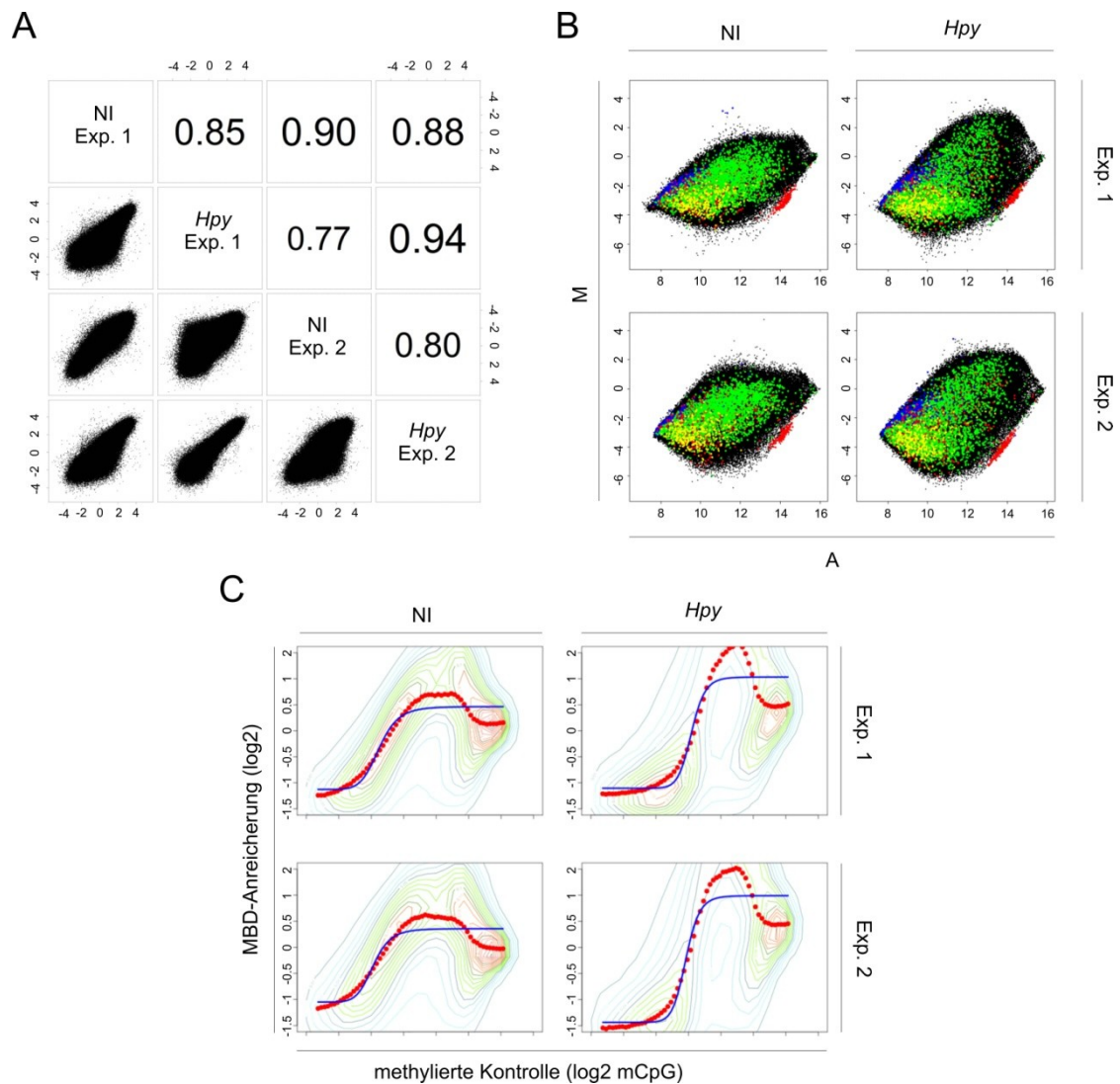
Um die Verteilung der Signalintensitäten für log<sub>2</sub>-Verhältnisse anzuzeigen, eignet sich der MA-Plot (Abb. 3.4.1 B). Dieses Streudiagramm trägt die Intensitätsdifferenz M [ $M = \log_2(\text{red}) - \log_2(\text{green})$ ] gegen die durchschnittliche Intensität A [ $A = \frac{1}{2}(\log_2(\text{red}) + \log_2(\text{green}))$ ] auf und bezieht so das Probensignal für den roten (*red*) und grünen (*green*) Kanal mit ein.

Im Falle einer RNA-Expressionsmicroarray-Analyse erwartet man von den zwei Proben, die mit den Oligonukleotid-Sonden auf dem Array hybridisiert sind, dass ihre Signalverteilung ausbalanciert ist. Die M-Werte sollten sich um den Nullwert verteilen. Im Gegensatz dazu vergleichen Immunpräzipitations-Experimente angereicherte Proben (MAP) und Kontrollproben (Input) auf demselben Array. Daher erwartet man hier nicht, dass sich die M-Werte um Null bewegen [362]. Das in Abbildung 3.4.1.1 B dargestellte MA-Streudiagramm verdeutlicht dieses Verhältnis. Die MA-Plots der einzelnen Experimente gleichen sich, wobei jeweils nicht infizierte und infizierte Proben ähnlicher sind. Bereits zu diesem frühen Schritt der Datenanalyse wird ein infektionsbedingter Unterschied im Methylierungsmuster der Wirtszelle deutlich. Auch die Signalverteilung der internen Kontrollen ist in den gleich behandelten Proben sehr ähnlich. Alle internen Chip-Kontrollen passierten die Qualitätsanalyse der Rohdaten zufriedenstellend (Daten nicht gezeigt).

Ein weiteres Analysemodell der MAP-Anreicherung betrachtet die Methylierung der DNA als Funktion. Dabei wird eine komplett methylierte genomische DNA als Referenz herangezogen und im Vergleich dazu der CpG-Inhalt jeder vom Chip abgedeckten Region bestimmt. Da die Referenzprobe vollständig methyliert ist, sind alle CpGs methyliert (mCpG) und die CpG- und mCpG-Level entsprechen einander. Die MAP-Anreicherung kann als Funktion des log<sub>2</sub> (mCpG) modelliert werden [363]. In Abbildung 3.4.1.1 C kann man das entsprechende Streudiagramm der zu vergleichenden Proben und den sigmoidalen Verlauf des Modells verfolgen. Die blaue Linie repräsentiert den Zusammenhang von MAP-log<sub>2</sub>-Verhältnissen methylierter DNA sowie des tatsächlich beobachteten Wert für log<sub>2</sub>. Die roten Punkte visualisieren den Median (log<sub>2</sub>) innerhalb jeder Gruppe über den gesamten gewichteten mCpG-Bereich [363].

Die Ergebnisse dieser Analyse wurden mit einer vollständig methylierte Probe simuliert, die nicht der hier verwendeten Zelllinie entspricht. Dennoch wird aus diesem Modell deutlich, dass die MAP-Anreicherung nicht linear mit dem Methylierungslevel korreliert. Deutlich ist der Unterschied zwischen Modell und der tatsächlichen Verteilung des infizierten Probenmaterials. Die Methylierungssignatur hat sich *post infectionem* im Vergleich zur nicht infizierten Probe aber auch zum theoretisch erwarteten Modell verändert. Aus der Verteilung der log<sub>2</sub>-Signale der *H. pylori*-infizierten Proben bilden sich zwei Populationen heraus: abgereicherte und angereicherte Methylierung.

Die Qualitätsanalyse der Rohdaten ermöglicht nicht nur die Beurteilung der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, sondern lässt auch erste globale Aussagen zu, die eine differenzielle Methylierung der Wirtszelle aufgrund einer *H. pylori*-Infektion indizieren.



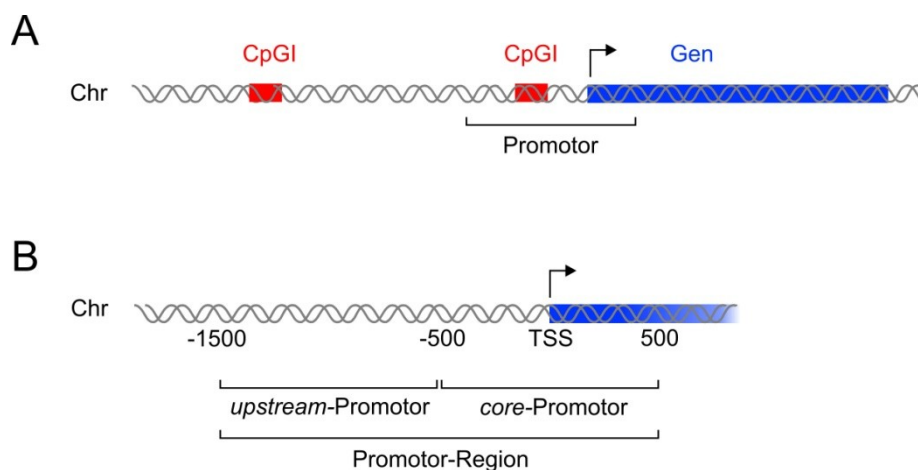
**Abbildung 3.4.1.1 | Qualitätsanalyse der MAP-on-Chip-Rohdaten des NimbleGen 3x720K-Arrays. (A)** Korrelationsmatrix zweier unabhängiger biologischer Replikate (Experiment 1 und 2) mit jeweils *H. pylori*-infizierter (*Hpy*) und nicht infizierter (NI) experimenteller Probe. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson ist für jede Korrelationsmöglichkeit angegeben. Die jeweiligen Streudiagramme geben die MAP-Anreicherung in log<sub>2</sub>-Werten von -4 bis 4 wieder. **(B)** Graphische Darstellung des Intensitätsverhältnisses M und der durchschnittlichen Intensität A in Form eines MA-Streudiagramms. Die Farben der Punkte entsprechen unterschiedlichen Oligonukleotid-Sequenzen: schwarz, Proben; blau, zufällige Hintergrundproben; rot, Negativkontrollen; grün, Positivkontrollen; gelb, Nicht-CpG-Kontrollen. **(C)** Das Modell der MAP-Anreicherung der einzelnen CpG-Dinukleotid-Sequenzen im Verhältnis zu einer artifiziellen vollständig methylierten Probe (log<sub>2</sub> (mCpG)). Die blaue Linie verdeutlicht den Zusammenhang von logistischer Funktion des log-Methylierungslevels und dem beobachteten Wert für log<sub>2</sub>. Die roten Punkte visualisieren den Median der logistischen Funktion des MAP-Methylierungslevels innerhalb jeder Gruppe im Verhältnis zum gesamten gewichteten Methylierungsniveau der CpG-Positionen (mCpGw).



### 3.4.1.2 Datenanalyse

Um kleinere technische Variabilitäten auszugleichen, die durch ungleiche Effizienzen bei Färbung und Hybridisierung des Probenmaterials hervorgerufen wurden, müssen die Microarray-Daten normalisiert werden [362, 364]. Die vorliegenden Daten wurden einer Normalisierung innerhalb des Arrays (*median centering*) mit Quantil-Normalisierung unterzogen. Beim *median centering* werden alle Messungen auf den Median des  $\log_2$ -Verhältnis-Werts bezogen, was alle Arrays um den Nullwert herum zentriert. Die Quantil-Normalisierung gleicht die Verteilung der M-Werte aller Quantile zwischen den Arrays ab.

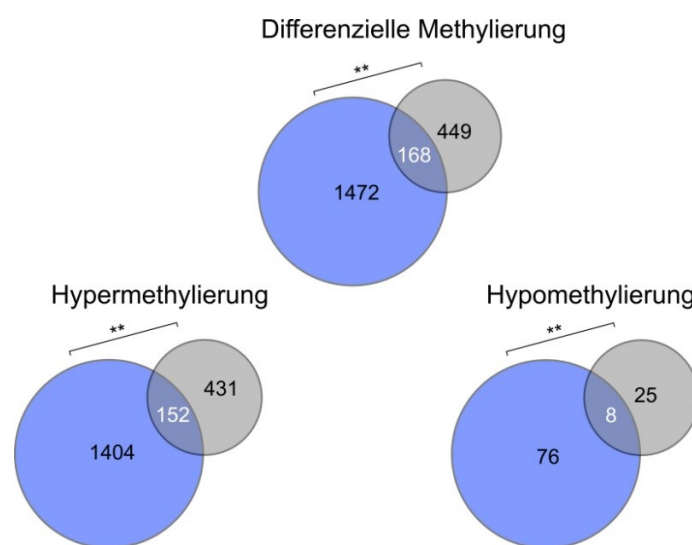
Für die Analyse angereicherter methylierter Regionen können nun signifikant angereicherte Bereiche identifiziert werden. Dafür wurde der Median der  $\log_2$ -Werte über gewisse definierte Regionen (Promotoren, CpG-Inseln) bestimmt und der Mittelwert der Replikate ermittelt. Dadurch konnten mehrere angrenzende Sequenzabschnitte gleichzeitig betrachtet werden, um eine Überinterpretation einzelner Sequenzen zu vermeiden. Abbildung 3.4.1.2 verdeutlicht die Einteilung der Promotor-Bereiche in Relation zum Transkriptionsstart (TSS) innerhalb einer 1 kb langen Region (Abb. 3.4.1.2 A). Die Promotorregion wurde des Weiteren in einen *upstream*- und einen *core*-Promotor-Bereich unterteilt. In jedem 1.000 bp-Abschnitt wurde der Median des  $\log_2$ -Verhältnisses der korrespondierenden Proben berechnet. Der Schwellenwert für die weitere Analyse wurde auf einen absoluten  $\Delta\log_2$ -Wert ( $ABS \Delta\log_2$ )  $\geq 1$  festgelegt. Das entspricht einem absoluten Unterschied von zwei.



**Abbildung 3.4.1.2 | Der NimbleGen 3x720K-Array deckt sowohl die annotierten CpG-Inseln als auch die Promotoren der definierten RefSeq-Gene ab.** Die graphische Darstellung zeigt die Einteilung der Promotorregion in definierte Abschnitte. Als Referenz dient die Transkriptionsstartstelle (TSS). CpGI sind rot hinterlegt, Gen-kodierende Bereiche blau. **(A)** Der insgesamt 2 kb große Promotor-Bereich liegt 1.500 bp *upstream* und 500 bp *downstream* des TSS. CpG-Inseln können definitionsgemäß innerhalb oder außerhalb des Promotors liegen. **(B)** Der *core*-Promotor macht den Bereich 500 bp *upstream* und 500 bp *downstream* vom TSS aus, der *upstream*-Promotor erstreckt sich von 1.500 bp bis zu 500 bp *upstream* des TSS. Entsprechend ihrer Orientierung zum TSS werden die Oligonukleotid-Proben des Arrays den einzelnen Kategorien zugeordnet.

### 3.4.1.3 Biologische Replikate

In den jeweiligen biologischen Replikaten sind unterschiedlich viele Gene differenziell methyliert. Um zu überprüfen, ob die biologischen Replikate die gleiche Methylierungstendenz aufweisen und dieselben genomischen Regionen betroffen sind, wurden die übereinstimmenden Regionen berechnet. Betrachtet man die Überlappung beider MAP-on-Chip-Experimente, wird eine signifikante Überschneidung bezogen auf alle im Array vorkommenden Regionen deutlich (Abb. 3.4.1.3). Ein sehr ähnliches Verhältnis ergibt sich bei der Berechnung der gemeinsamen hyper- bzw. hypomethylierten Regionen, deren Überlappung ebenfalls signifikant ist. Interessanterweise wurden Hypermethylierungen 20-fach häufiger als Hypomethylierungen detektiert.

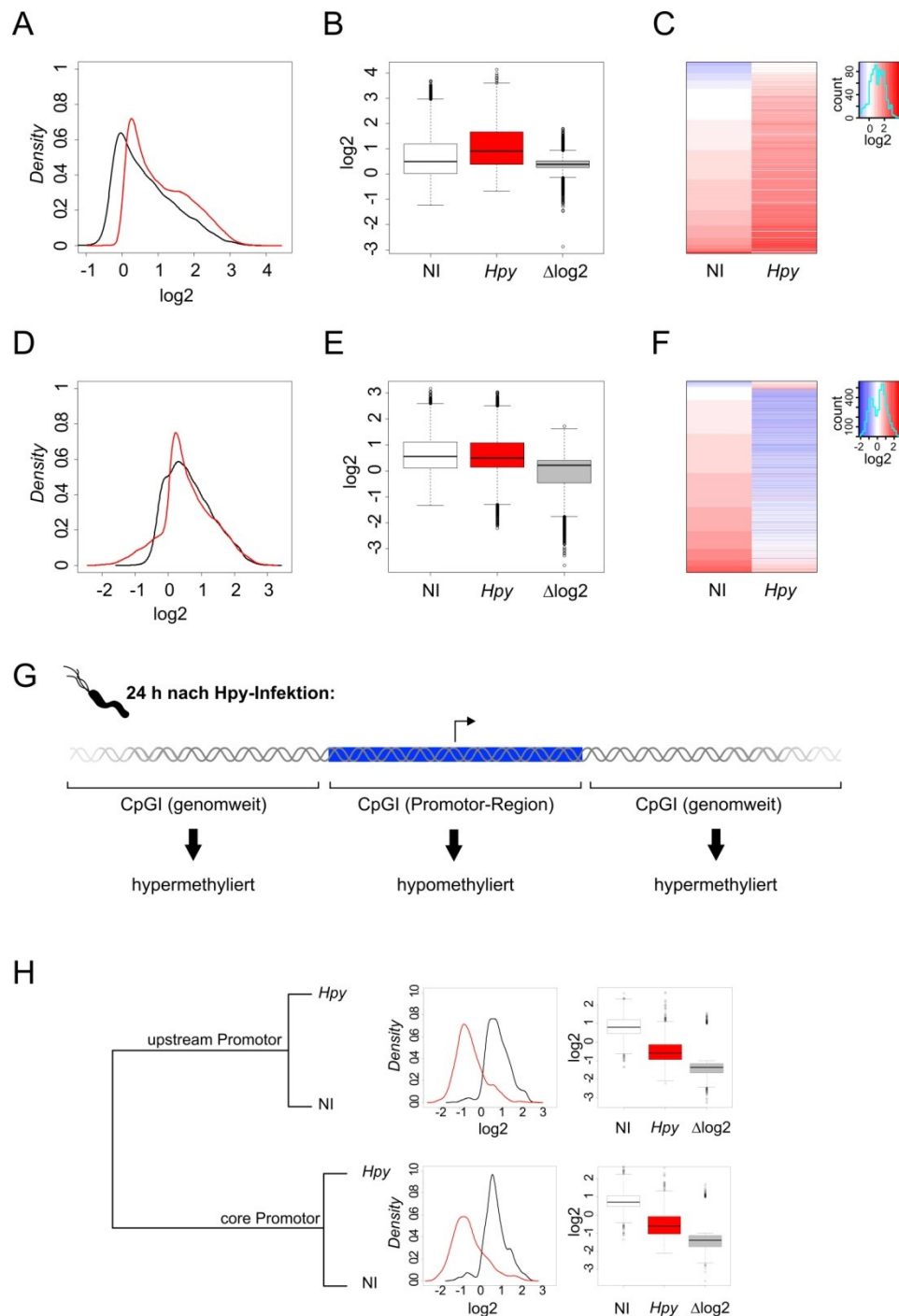


**Abbildung 3.4.1.3 | Venn-Diagramme zur Darstellung der Signifikanz der Überlappung der einzelnen biologischen Experimente und deren Methylierungsanalysen.** Die Berechnung der Signifikanz der übereinstimmenden Regionen erfolgt in Bezug auf alle vom Chip abgedeckten Sequenzen (\*\*  $p < 0,05$ ). Die unterschiedlichen Farben symbolisieren jeweils eines der biologischen Replikate (grau, Experiment 1; blau, Experiment 2). Das obere Venn-Diagramm repräsentiert alle differenziell methylierten Bereiche, unten links werden die hypermethylierten, unten rechts die hypomethylierten Sequenzen dargestellt ( $ABS \Delta \log_2 \geq 1$ ).

### 3.4.1.4 Globale Methylierungsanalyse

Mit der Hilfe analytischer Plottingverfahren wird die Verteilung der Signalintensitäten der CpG-Inseln des Arrays deutlich. Der *Density-Plot* gibt die Kerndichteschätzung (*kernel density estimation*) der  $\log_2$ -Werte von infizierter und nicht infizierter Probe zur Bewertung der Wahrscheinlichkeitsverteilung an. *H. pylori*-infizierte und nicht infizierte MKN74-Zellkulturen weisen bei der Betrachtung der CpG-Inseln einen unterschiedlichen Verlauf auf, wobei der Kurvenverlauf infizierter Proben hin zu höheren  $\log_2$ -Werten, also verstärkter Hypermethylierung der CpGI, verschoben ist (Abb. 3.4.1.4 A). Dieses Phänomen wird auch in der Verteilung des Box-Plots deutlich (Abb. 3.4.1.4 B). Der Median- $\log_2$ -Wert infizierter Proben liegt im weitaus positiveren Bereich im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle. Der  $\Delta \log_2$ -Wert, der das Verhältnis aus *H. pylori*-infizierter und nicht infizierter

Probe repräsentiert, bewegt sich somit im positiven Bereich. Demnach ist die Mehrzahl der differenziell methylierten CpG-Inseln mit  $\text{ABS } \Delta\log_2 \geq 1$  hypermethyliert. Besonders deutlich wird die überwiegende Hypermethylierung in der Heatmap (Abb. 3.4.1.4 C), in der sich abermals zeigt, dass die infizierten Proben vergleichsweise stark methyliert sind.



**Abbildung 3.4.1.4 | CpGI-Hypermethylierung und Promotor-Hypomethylierung nach *H. pylori*-Infektion.** (A-C) Methylierungsanalyse der CpG-Inseln: (A) Der Density-Plot vergleicht die Verteilung der DNA-Methylierungswerte ( $\log_2$ ) von *H. pylori*-infizierten (rot) und nicht infizierten Proben (weiß) und schätzt deren Wahrscheinlichkeitsverteilung. (B) Der Box-Plot repräsentiert die Verteilung der  $\log_2$ -Verhältnisse nicht

infizierter (NI, weiß) und *H. pylori*-infizierter (*Hpy*, rot) Proben sowie deren  $\Delta$ -Wert ( $\Delta\log_2$ , grau). Die Werte der infizierten Probe weisen eine verstärkte Hypermethylierung auf. **(C)** Die Visualisierung der  $\log_2$ -Werte in Form einer Heatmap verdeutlicht, dass die Mehrzahl sowohl der einzelnen Proben der nicht infizierten (NI) als auch der *H. pylori*-infizierten Probe (*Hpy*) hypermethyliert ist, wobei letztere Bedingung eine stärkere Ausprägung aufweist. Ein positiver  $\log_2$ -Wert ist rot dargestellt, ein negativer  $\log_2$ -Wert blau. Je weiter sich der Wert von Null (weiß) entfernt, desto dunkler wird die Farbe. **(D-F)** Methylierungsanalyse der Promotorregionen: **(D)** Der *Density*-Plot vergleicht die Verteilung der DNA-Methylierungswerte ( $\log_2$ ) von nicht infizierter (weiß) und *H. pylori*-infizierter (rot) Probe und schätzt deren Wahrscheinlichkeitsverteilung. **(E)** Der Box-Plot repräsentiert die Verteilung der  $\log_2$ -Verhältnisse von nicht infizierter (NI, weiß) und *H. pylori*-infizierter (*Hpy*, rot) Probe und gibt deren  $\Delta$ -Wert ( $\Delta\log_2$ , grau) an. Die  $\Delta\log_2$ -Werte verweisen auf eine starke, infektionsabhängige Hypomethylierung. **(F)** Die Heatmap verdeutlicht, dass die Mehrzahl der CpG-Positionen der nicht infizierten (NI) Probe hypermethyliert ist. Infolge der *H. pylori*-Infektion (*Hpy*) gehen die Methylierungssignaturen größtenteils verloren. Ein positiver  $\log_2$ -Wert ist rot dargestellt, ein negativer  $\log_2$ -Wert blau. Je weiter sich der Wert von Null (weiß) entfernt, desto dunkler wird die Farbe. **(G)** Kernaussagen der Methylierungsanalyse: 24 h nach einer Infektion mit *H. pylori* liegen CpGI in Promotor-Regionen überwiegend hypomethyliert vor. Hingegen sind alle weiteren, im Genom verteilten CpGI tendenziell hypermethyliert. **(H)** Das Dendrogramm der hierarchischen Clusteranalyse weist einen größeren Abstand zwischen *core*- und *upstream*-Promotorregionen auf, als zwischen nicht infizierter (NI) und *H. pylori*-infizierter (*Hpy*) Probe. Unterscheidet man die 2 kb-Promotorregion in *core*- und *upstream*-Region, wird im *Density*- und Box-Plot eine infektionsbedingte Hypomethylierung deutlich.

Aus der Verteilung der  $\log_2$ -Verhältnisse von Promotoren ist in *Density*- und Box-Plot (Abb. 3.4.1.4 D und E) zuerst kein deutlicher Unterschied ersichtlich. Betrachtet man jedoch die  $\Delta\log_2$ -Werte (Abb. 3.4.1.4 E), wird erkennbar, dass die Methylierungslevel in der infizierten Zelle abgereichert sind, der  $\Delta\log_2$ -Wert liegt im negativen Bereich. Eindeutig wird dieses Verhältnis in der Heatmap: Die Mehrzahl der Sequenzen der nicht infizierten Probe sind methyliert und liegen nach Infektion mit *H. pylori* abgereichert – also hypomethyliert – vor.

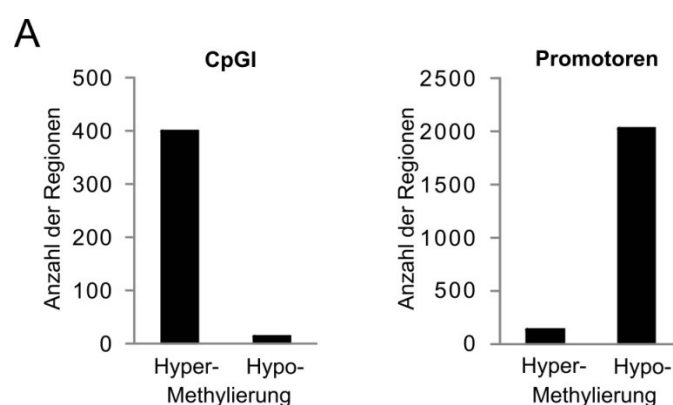
Unterscheidet man die 2 kb-Promotorregion in *core*- und *upstream*-Region, wird eine infektionsbedingte Hypomethylierung beider Bereiche deutlich (Abb. 3.4.1.4 H). Eine Clusteranalyse ist eine Ballungsanalyse, die der Aufdeckung von Ähnlichkeitsstrukturen dient. Interessanterweise verweist eine hierarchische Clusteranalyse auf einen größeren Abstand zwischen *core*- und *upstream*-Promotorregionen als zwischen nicht infizierter und *H. pylori*-infizierter Probe. Das bedeutet, dass sich die jeweils unterschiedlich behandelten Proben untereinander ähnlicher sind als *core*- zu *upstream*-Promotor gleichbehandelter Proben. Auch wenn beide Unterpromotorregionen hypomethyliert sind, muss es demnach einen statistisch und funktionell bedeutsamen Unterschied geben.

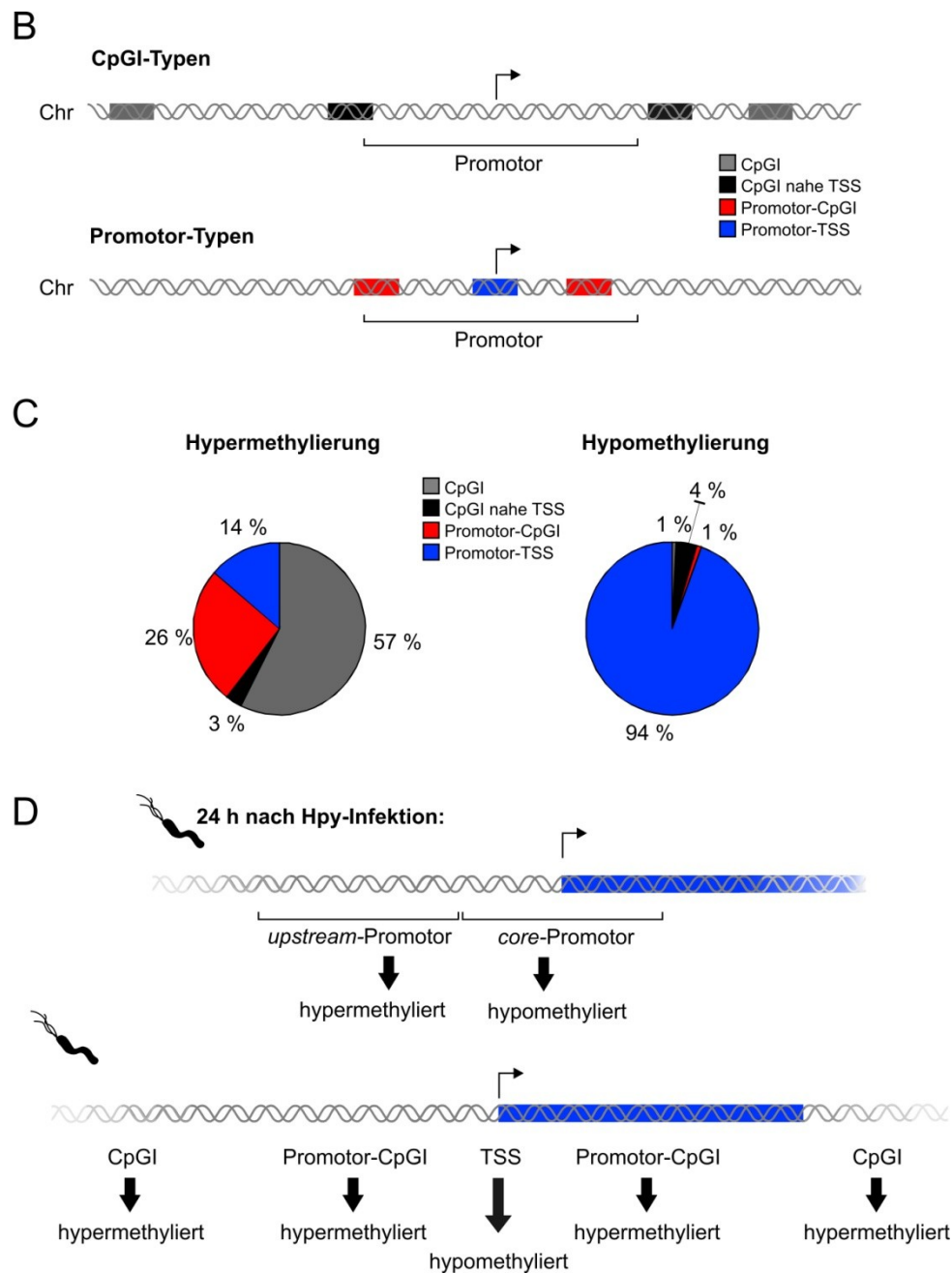
Der Vergleich dieser Ergebnisse mit denen der CpG-Inseln, die nicht in Promotorregionen liegen, vermitteln einen Einblick in die positionsbedingten Effekte einer *H. pylori*-Infektion auf die Methylierungsverteilung. Erstaunlicherweise induziert eine *H. pylori*-Infektion differenzierte Methylierungen, abhängig von der genomischen Lokalisation. Basierend auf diesen Ergebnissen lassen sich globale Aussagen über den Methylierungszustand der Wirtszell-DNA treffen: CpG-Inseln werden infektionsbedingt hypermethyliert, Promotorregionen werden demethyliert und *core*- und *upstream*-Regionen von Promotoren unterscheiden sich bezüglich ihres Methylierungsprofils.

### 3.4.1.5 Regionale Methylierungsanalyse

Mit der Analyse des MAP-on-Chip-Arrays konnte eine allgemeine, *H. pylori*-induzierte CpGI-Hypermethylierung und Promotor-Hypomethylierung detektiert werden. *Core*- und *upstream*-Promotorregion ähneln sich in der Clusteranalyse nicht. Im Folgenden werden die Daten weiter nach Regionen differenziert, um Unterschiede zu ermitteln.

Die Verteilung der an- und abgereichert methylierten Bereiche variiert je nach betrachteter Region. Im Gegensatz zu Promotor-Bereichen, also Regionen rund um den TSS eines Gens, sind CpG-Inseln, die nicht näher als 1,5 kp *upstream* oder 500 bp *downstream* eines TSS liegen, überwiegend hypermethyliert (Abb. 3.4.1.5 A). Des Weiteren wurden die Promotor- und CpGI-Bereiche in kleine Regionen unterteilt, wobei sich folgende Gruppen ergeben: Die Gruppe „CpGI nahe TSS“ beinhaltet CpG-Inseln, die nahe an der 2 kb-Promotorregion liegen. Die Überlappung mit dem Promotor ist hier jeweils <40 %. Im Gegensatz dazu werden nicht mit dem Promotor-Bereich überlappende CpG-Inseln mit „CpGI“ bezeichnet. CpG-Inseln, die sich innerhalb der Promotorregion befinden oder zum großen Teil mit dieser überlappen (>40 % Überlappung mit dem Promotor), werden als „Promotor-CpGI“ definiert (Abb. 3.4.1.5 B). Die Ergebnisse dieser Unterteilung der differenziell methylierten Regionen sind im Tortendiagramm der Abbildung 3.4.1.5 C dargestellt. Den Großteil der hypermethylierten Regionen machen CpGI aus, die abseits von Genpromotor-Bereichen liegen (Abb. 3.4.1.5 C, links). Einen etwa ebenso großen Anteil bilden die übrigen Regionen, die mit Genpromotoren assoziiert sind. Den größten Teil von ihnen (26 %) machen CpGI aus, die in der Promotorregion liegen oder stark mit dieser überlappen. Auffällig ist, dass hypomethylierte CpGI zu 94 % im Bereich des TSS von Genpromotoren liegen (Abb. 3.4.1.5 C, rechts). Die restlichen hypomethylierten Bereiche machen nur insgesamt 6 % aus. Diese Verteilung verdeutlicht, dass große regionale und damit auch funktionelle Unterschiede der differenziellen Methylierung von CpGI existieren.





**Abbildung 3.4.1.5 | Region-spezifische Verteilung der hyper- und hypomethylierten DNA-Bereiche des NimbleGen 3x720K-Arrays nach *H. pylori*-Infektion. (A)** Vorseite: Anzahl differenziell methylierter Bereiche, aufgeteilt nach CpGI (links) und Promotoren (rechts), verdeutlicht die gegenläufigen Effekte der Methylierung: Die Mehrzahl der CpGI-Regionen ist hypermethyliert, Promotor-CpG-Inseln werden nach *H. pylori*-Infektion vor allem hypomethyliert gefunden. **(B)** Graphische Darstellung der Unterteilung von CpGI- und Promotor-Typen. Erläuterungen zur Definition erfolgen im Text. Der hypothetische TSS ist mit einem Pfeil markiert. **(C)** Tortendiagramme zeigen die Unterschiede der Region-spezifischen Verteilung von hyper- und hypomethylierten CpGI- und Promotor-Typen. **(D)** Schematisch dargestellte Ergebnisse der Region-spezifischen Methylierungsanalyse. Oben: 24 h nach einer Infektion mit *H. pylori* liegen *upstream*-Promotoren überwiegend hypermethyliert vor, *core*-Promotoren hingegen hypomethyliert. Unten: Vergrößerte schematische Darstellung eines Gens im humanen Genom: CpGI weisen sowohl außerhalb als auch in Promotor-Regionen Hypermethylierung auf. Der TSS-Bereich des Promotors hingegen ist hypomethyliert.

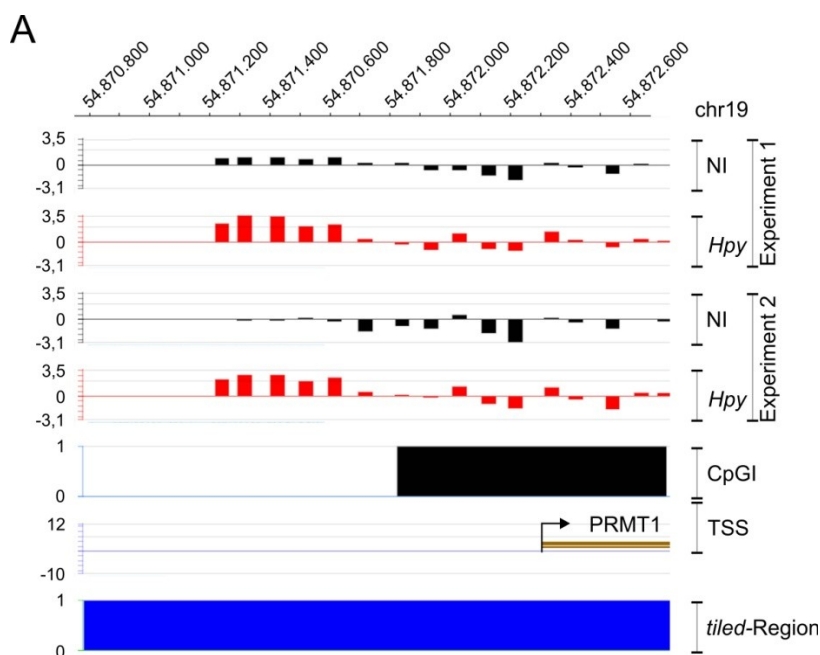
### 3.4.1.6 Beispiele differenziell methylierter Regionen

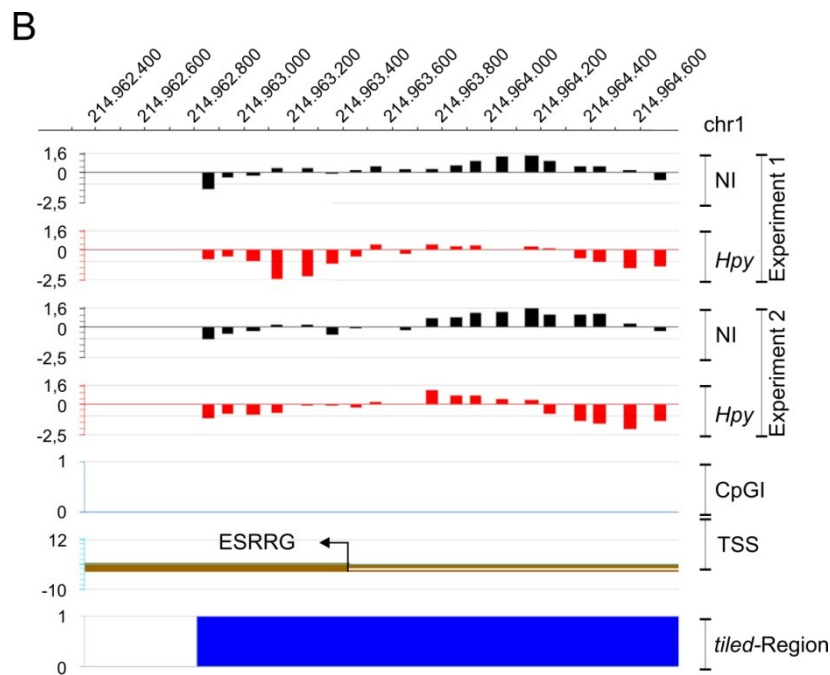
Die Weiterverarbeitung der Daten führt zu einer Liste genomischer Regionen, die *post infectionem* in MKN74-Zellen differenziell methyliert vorliegen. Mit Hilfe der SignalMap 1.9-Software (NimbleGen) lässt sich der Erfolg der verwendeten Vorhersage-Methode zur Identifikation differenziell methylierter Regionen der MAP-on-Chip-Analyse überprüfen. In Abbildung 3.4.1.6 A sind beispielhaft zwei Promotor-TSS-Regionen dargestellt.

Etwa 600 bis 100 bp *upstream* des TSS von *PRMT1* (*protein arginine methyltransferase 1*) wird mit einem Median-Wert von  $\Delta\log_2 = 1,4$  (ca. 2,7-fachen Anreicherung) Hypermethylierung detektierbar. *PRMT1* ist für die Mehrzahl der zellulären Arginin-Methylierungsaktivitäten verantwortlich, beispielsweise an Histon H2, H3 und H4. Zudem ist es das Hauptenzym der Histon H4-Methylierung am Arginin-Rest, ein spezifisches Ziel der epigenetischen transkriptionellen Aktivität [365]. Des Weiteren ist *PRMT1* an einer Vielzahl biologischer Prozesse wie DNA-Reparatur, Signaltransduktion und RNA-Prozessierung beteiligt [366]. Gesteigerte Expression dieses Gens spielt wahrscheinlich eine folgenschwere Rolle in vielen Krebsarten [366, 367].

Der Zellkern-Rezeptor *ESRRG* (*estrogen-related receptor gamma*) ist ein konstitutiv aktiver Transkriptionsaktivator [368]. Die Datenanalyse des MAP-on-Chip ergab für diese Promotor-TSS-Region einen Median-Wert von  $\Delta\log_2 = -1,97$  (ca. 4-fache Abreicherung). Die Hypomethylierung ist ca. 500 bp vor dem TSS erkennbar (Abb. 3.4.1.6 B).

Anhand der Beispiele wird deutlich, dass die verwendete Vorhersage-Methode der MAP-on-Chip-Analyse, die sowohl auf der Median-Bildung von  $\log_2$ -Werten biologischer Replikate, als auch der regionalen Unterscheidung beruht, erfolgreich ist.





**Abbildung 3.4.1.6 | Graphische Darstellung der MAP-on-Chip-Daten (Signalmap 1.9-Software, NimbleGen) zweier biologischer Experimente mit jeweils nicht infizierter (NI, schwarz) und *H. pylori*-infizierter (*Hpy*, rot) Probe.** Dargestellt sind der TSS (Pfeil), die vorhergesagte CpG-Insel (schwarz) sowie die vom Array abgedeckte Region (*tiled*-Region, blau). Die log<sub>2</sub>-Werte sind in Relation zu ihren genomischen Koordinaten und funktionellen Regionen als Balken (NI, schwarz und *Hpy*, rot) angegeben. Vorderseite: **(A)** Beispiel einer infektionsbedingt hypermethylierten Promotor-TSS-Region des *PRMT1*-Gens auf Chromosom (chr) 19. **(B)** Beispiel einer CpG-Hypomethylierung in der Promotorregion des *ESRRG*-Gens auf Chromosom (chr) 1.

### 3.4.1.7 Funktionelle Analysen

Um biologisch relevante funktionelle Netzwerke aufzudecken, die den differenziell methylierten CpGI- und Promotorregionen des NimbleGen 3x720K-Arrays zugrunde liegen, wurde eine Ontologie-Datenbank-Analyse durchgeführt. Die Gen-Ontologie (*Gene Ontology, GO*) deckt drei biologische Kategorien ab: Biologischer Prozess, zelluläre Komponenten und molekulare Funktion. Alle differenziell methylierten CpGI- und Promotorregionen des 3x720K-Arrays wurden mit Hilfe der GREAT *GO*-Analyse-Software untersucht (Abb. 3.4.1.7 A). Der Vorteil dieser Software ist, dass auch nicht-kodierenden genomischen Regionen ein biologischer Sinn zugewiesen wird, indem die Annotation naher Gene berücksichtigt wird. Damit ist GREAT besonders bei der Untersuchung *cis*-regulatorischer Regionen (z.B. CpGI, die nicht innerhalb einer kodierenden DNA-Sequenz liegen) zweckmäßig.

Interessanterweise haben alle signifikanten biologischen Prozesse, deren Gene durch die Infektion mit *H. pylori* differenziell methyliert werden, mit dem nukleosomalen Aufbau und der Transkription genomischer DNA zu tun. Vor allem sind Komponenten der epigenetischen Regulation betroffen. Entsprechend sind die signifikant häufig vorkommenden Zellkomponenten das



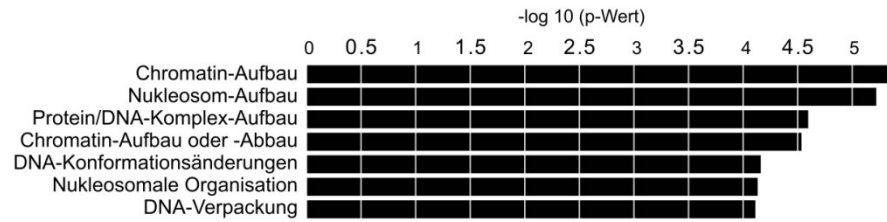
Nukleosom sowie der Protein-DNA-Komplex. Erstaunlicherweise betreffen die molekularen Mechanismen vor allem die Funktion der RNA-Polymerase, aber auch der Telomerenden. So sind viele der differenziell methylierten Gene bzw. Regionen nach *H. pylori*-Infektion an der Stabilisierung der Telomere beteiligt, was im direkten Zusammenhang mit Zellalterung und Überleben der Zelle steht. Ebenfalls signifikant angereicht ist die Kontrolle der Transkription, insbesondere der Vorgang der Promotor-Öffnung und -Freigabe. Bemerkenswert ist auch die Verbindung zum systemischen Lupus Erythematoses (SLE), dessen Pathogenese zunehmend mit epigenetischen Veränderungen assoziiert wird [369]. Diverse Blutzell-Populationen von SLE-Patienten sind durch einen globalen Verlust der DNA-Methylierungssignatur charakterisiert [370].

Mit Hilfe des *WEB-based GENE SeT Analysis Toolkit* (WEBGESTALT) ist die *GO*-Analyse signifikant angereicherter KEGG(*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)-*Pathways* als auch Krankheits-assoziiierter *GeneSets* nach *H. pylori*-Infektion möglich. Mit dieser Analyse werden epigenetisch gesteuerte biologisch relevante Zellprozesse deutlich (Abb. 3.4.1.7 B).

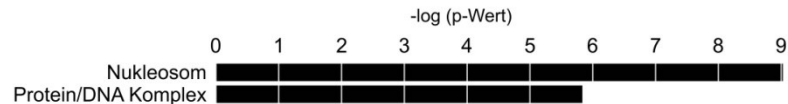
Stark von den anderen angereicherten Kategorien der KEGG-*Pathways* heben sich die metabolischen Wege ab, was darauf hindeutet, dass die Gesamtheit der biochemischen Vorgänge einer Zelle oder eines Organismus von der *H. pylori*-initiierten Veränderung des DNA-Methylierungsmusters betroffen sind. Die Anreicherung ist auch für den FcεRI-Signalweg signifikant. Der FcεRI-Komplex bildet einen Antikörper-Rezeptor. Dieser Rezeptor induziert verschiedenste Signalwege, u.a. die Zytokin-Gentranskription, die zur verstärkten Sekretion von Interleukinen, Interferon-γ und TNF-α führt [371]. Überdies sind weitere Chemokin- und Zytokin-Signalwege unter den angereicherten KEGG-*Pathways* zu finden. Der Signalweg JAK/STAT (*Janus kinase/signal transducers and activators of transcription*) reguliert ein breites Spektrum an Cytokinen und Wachstumsfaktoren. Die aktivierte Signalkaskade moduliert die Expression diverser Zielgene und rekrutiert andere Moleküle wie MAP-Kinasen. Diese Moleküle prozessieren *downstream* Signale, u.a. über den Ras(*Rat sarcoma*)-Raf(*rat fibrosarcoma*)-MAP-Kinase-Weg, und aktivieren damit weitere Transkriptionsfaktoren. Diese Signaltransduktion stellt einen der Schlüssel-Signalwege der humanen Tumorgenese dar [372].

A

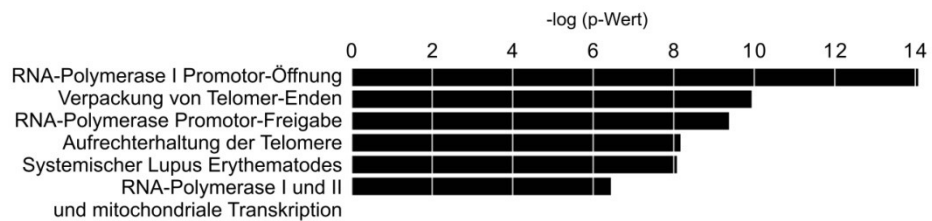
## GO: Biologischer Prozess



## GO: Zelluläre Komponenten

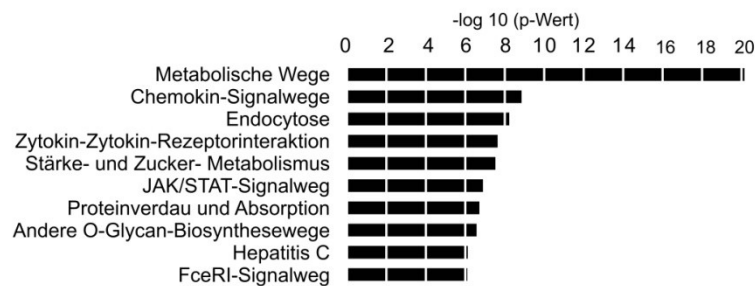


## GO: Molekulare Funktion



B

## GO: KEGG-Pathways



## GO: Gensets

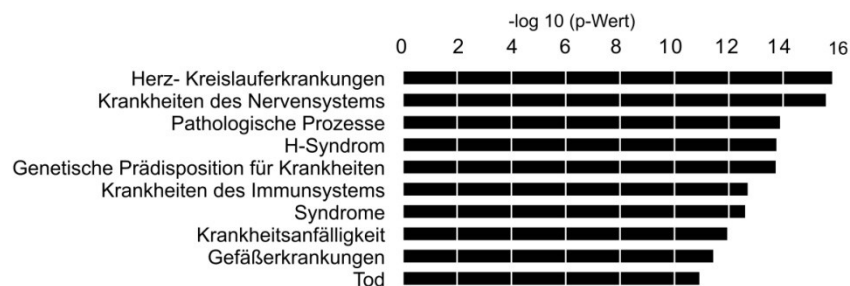


Abbildung 3.4.1.7 | Funktionelle Software-basierte GO-Analyse aller differenziell methylierten CpGI- und Promotorregionen, die mittels NimbleGen 3x720K-Array identifiziert wurden. (A) GREAT-Software ermöglicht die GO-Analyse der Bereiche: Biologischer Prozess (oben), zelluläre Komponenten (Mitte) sowie molekulare

Funktion (unten). Der negative log ( $-\log$ ) des p-Wertes jedes *GO*-Begriffs ist absteigend vom höchsten zum niedrigsten Wert abgebildet und zeigt das relative Signifikanz-Level in Form eines Balkendiagramms. Als Referenz dient das gesamte humane Genom. **(B)** WEBGESTALT-Software basierte Gen-Ontologie-Analyse der *GO*-Begriffe *KEGG-Pathways* und *Gensets*. Der negative log ( $-\log_{10}$ ) des p-Wertes jedes *GO*-Begriffs ist absteigend vom höchsten zum niedrigsten Wert abgebildet und zeigt das relative Signifikanz-Level in Form eines Balkendiagramms. Als Referenz dient das gesamte humane Genom (hg18).

Auffällig ist, dass ausschließlich krankheitsassoziierte *Gensets* identifiziert werden. Zu den stark angereicherten *Gensets* zählen diverse pathologische Prozesse wie Herz- und Kreislauferkrankungen, Gefäßerkrankungen sowie Krankheiten des Immunsystems (Abb. 3.4.1.7 B).

Zusammenfassend weisen die Ergebnisse der *GO*-Analyse auf charakteristische DMRs mit funktioneller Relevanz hin. Spezifische Netzwerke und Signalwege der Zelle sind betroffen. Diese Analyse demonstriert, dass die *H. pylori*-induzierten Veränderungen der Methylierungssignatur zielgerichtet ablaufen. Interessanterweise sind biologisch und funktionell vor allem der RNA- und DNA/Chromatin-Aufbau von der aberranten Methylierung betroffen. Aber auch pathologische Prozesse stellen eine signifikant angereicherte Kategorie der Analyse dar.

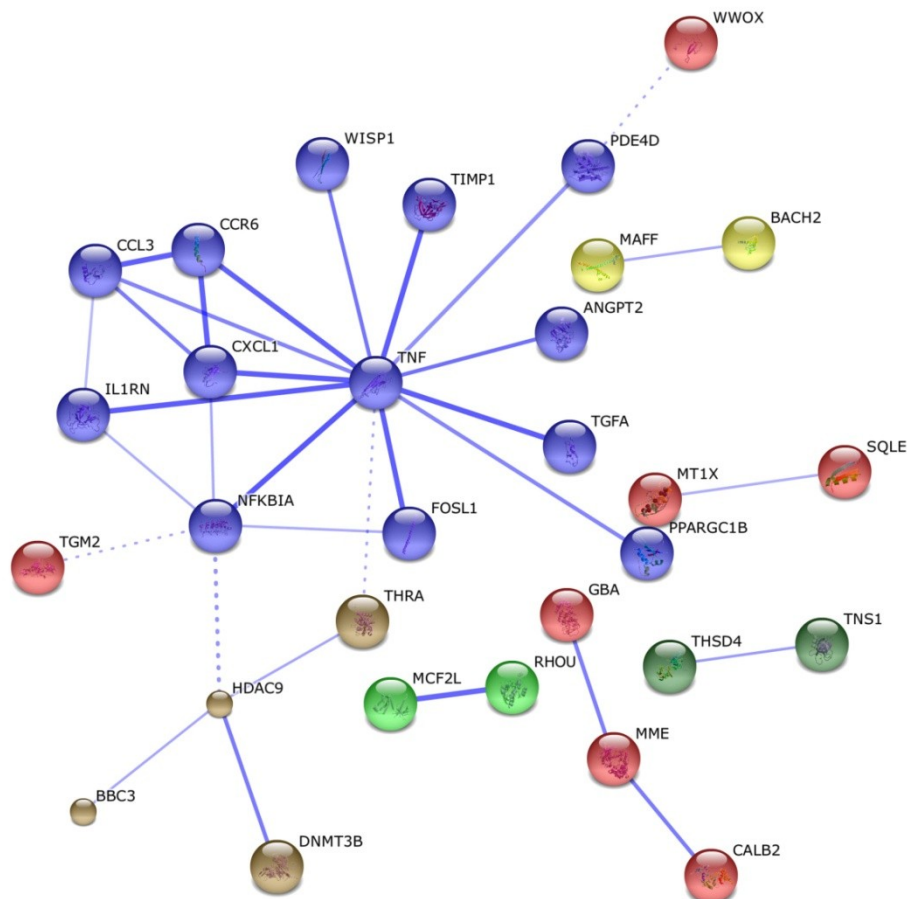
### 3.4.1.8 Vergleich zwischen Transkriptom und Methylo

Der Vergleich mit einem Transkriptionsdatensatz aus *H. pylori*-infizierten MKN74-Zellen dient der Korrelationsanalyse von DNA-Methylierung bzw. -Demethylierung mit der transkriptionellen Genaktivität. Dabei wurden keine signifikanten Übereinstimmungen gefunden, weder zwischen Transkriptom und MAP-on-Chip, noch zwischen Transkriptom und Bisulfit-DNA-Sequenzierung (Daten nicht gezeigt).

Dennoch konnte eine (wenn auch nicht signifikante) Überschneidung von 87 Regionen zwischen MAP-on-Chip und Expressionsmicroarray identifiziert werden. Dazu wurde von allen deregulierten Genen des MAP-on-Chip-Ansatzes (Experiment 1 und 2) und des Transkriptionsarrays (Experiment 1 und 2) die Überschneidung ermittelt. Von diesen 87 in DNA- und RNA-Profil differenziell angereicherten genomischen Regionen konnten 85 Proteine mittels Software identifiziert werden, von denen wiederum 44 bekannte Protein-Protein-Interaktionen aufweisen. Im Vergleich zu 22,3 theoretisch vorausgesagten Interaktionen der Clusteranalyse (*k*-Means-Algorithmus) ist diese Anreicherung mit einem p-Wert von  $3,52E-5$  hoch signifikant. Auffällig ist, dass auch hier Komponenten der epigenetischen Regulation auftreten. Beispielsweise findet sich Interaktion von HDAC9 und DNMT3B, deren Gene sowohl in Leukämie-Zellen als auch in Virusinfektionen differenziell methyliert sind [373, 374].

Einen Großteil der Proteine sind immunologisch wirksame Zytokine, insbesondere inflammatorische Chemokine wie TNF- $\alpha$ , NFKBIA (*NF- $\kappa$ B inhibitor  $\alpha$* ), CXCL1 (*chemokine (C-X-C motif) ligand 1*), CCL3 (*chemokine (C-C motif) ligand 3*), CCR6 (*chemokine receptor 6*) und IL1RN (*interleukin-1 receptor antagonist*) sowie TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor alpha*), ein Faktor, der in diversen humanen Krebsarten gefunden wird, so z.B. in Prostata- [375] und Pankreas-Krebs [376] (Abb. 3.4.1.8).

Auch wenn die Entsprechung zwischen Transkriptom und Methylohm nicht signifikant ist, weist die Netzwerk-Analyse signifikante Anreicherungen auf, die erneut epigenetisch wirksame und immunologisch relevante Komponenten der Wirtszelle einschließen.



**Abbildung 3.4.1.8 | STRING-Netzwerk zur Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen der miteinander überlappenden genomischen Bereiche zwischen MAP-on-Chip und Expressionsmicroarray.** Als Verfahren der Clusteranalyse wurde der *k*-Means-Algorithmus angewendet. Die Darstellung (*confidence view*) in STRING verdeutlicht die Stärke der Protein-Protein-Interaktionen mit Verwendung unterschiedlicher Linienstärken. Ausgehend von 87 in DNA- und RNA-Profil gemeinsam differenziell angereicherten genomischen Regionen (85 Regionen wurden von der Software erkannt) wiesen 44 Proteine Interaktionen auf. Die Clusteranalyse (*k*-Means-Algorithmus) sagte 22,3 Interaktionen ( $p$ -Wert =  $3,52E-5$ ) voraus.

### 3.4.2 Bisulfit-DNA-Sequenzierung

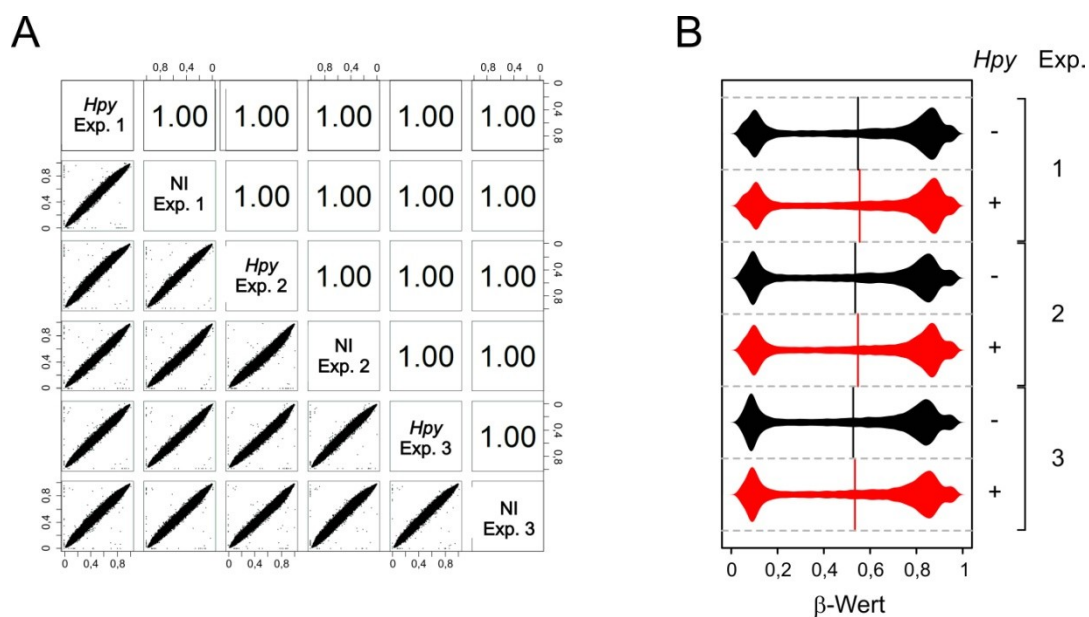
#### 3.4.2.1 Qualitätskontrolle und Datenanalyse

Die technische Qualitätsbeurteilung der BeadChip-Daten wird durch interne Kontrollen erleichtert, die beispielsweise die Färbung, Hybridisierung, Bisulfit-Konvertierung und Negativkontrollen mit einschließen. Die Qualitätskontrolle der Rohdaten des Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina) ergibt hervorragende Korrelationskoeffizienten für alle experimentellen Bedingungen, die bei  $k = 1$  liegen (Abb. 3.4.2.1 A). Auch andere Studien zeigen stets eine sehr hohe Reproduzierbarkeit

zwischen den Replikaten ( $k > 0,95$ ) [377-381]. Damit wird deutlich, dass die technische Reproduzierbarkeit bei der Sequenzierung Bisulfit-behandelter DNA im Vergleich zur Anreicherung methylierter DNA über Affinitätsaufreinigung äußerst hoch ist und sich die biologischen Replikate stark ähneln.

Schon aufgrund der Rohdaten können Aussagen über die Methylierungsverteilung nicht infizierter und *H. pylori*-infizierter MKN74-Zellen getroffen werden. Die graphische Darstellung der Verteilung der  $\beta$ -Werte aller Ansätze verdeutlicht deren leichte Verschiebung im Zuge einer *H. pylori*-Infektion hin zu höheren Werten (Abb. 3.4.2.1 B). Die horizontale Linie stellt den Mittelwert der  $\beta$ -Werte dar. Entsprechend liegen Allele infektionsbedingt vermehrt hypermethyliert vor.

Als differenziell methyliert wurden CpG-Positionen definiert, bei denen mindestens sechs Beads der gleichen DNA-Sequenz den Array erfolgreich passiert haben. Als Schwellenwert wurde ein  $p$ -Wert von unter 0,05 und ein  $\Delta$ -Verhältnis zwischen nicht infizierter und infizierter Probe von  $\geq 5\%$  festgelegt. Waren diese Kriterien erfüllt und gleichzeitig die Tendenz der Methylierung (An- oder Abreicherung) in allen drei Experimenten gleich, wurden die CpG-Positionen als differenziell methyliert klassifiziert.



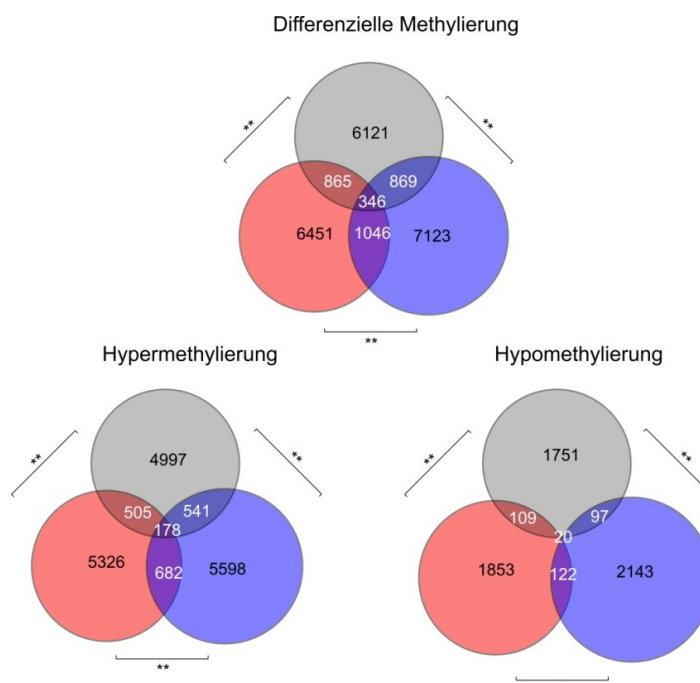
**Abbildung 3.4.2.1 | Qualitätsanalyse der Rohdaten des Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina).**

**(A)** Korrelationsmatrix dreier unabhängiger biologischer Replikate (Experiment 1, 2 und 3) mit jeweils *H. pylori*-infiziertem (*Hpy*) und nicht infiziertem (NI) Ansatz. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson ist für jede Korrelationsmöglichkeit angegeben. Das Streudiagramm jeder Korrelationsmöglichkeit repräsentiert die  $\beta$ -Werte der Dinukleotide. **(B)** Graphische Darstellung der Verteilung des  $\beta$ -Wertes, der das Verhältnis der Signalintensitäten methylierter und nicht methylierter Allele angibt. Im Durchschnitt ist der  $\beta$ -Wert der nicht infizierten Probe (NI, schwarz) geringer als bei der *H. pylori*-infizierten Probe (*Hpy*, rot), was allgemein auf eine Hypermethylierung der untersuchten CpG-Positionen nach einer *H. pylori*-Infektion hindeutet.

### 3.4.2.2 Biologische Replikate

Für die Datenanalyse des Illumina BeadChip standen drei experimentelle Replikate zur Berechnung der Überschneidung zur Verfügung (Abb. 3.4.2.2). Hier sind die Datenmengen der differenziell regulierten CpG-Positionen jedes Datensatzes vergleichbar groß. Die Überschneidung der Datensatzkombinationen der Replikate war signifikant. Wie auch beim MAP-on-Chip-Ansatz wurden die Daten weiter nach Methylierungstendenz unterteilt – diese Untergruppen zeigen ebenfalls eine signifikante Überlappung. Ähnlich wie beim MAP-on-Chip-Datensatz gibt es deutlich mehr hyper- als hypomethylierte CpG-Positionen – mit einem Verhältnis von etwa drei zu eins (Abb. 3.4.2.2).

Um zu überprüfen, ob in beiden globalen Ansätzen die gleichen genomischen Regionen differenziell methyliert gefunden werden, mussten die CpG-Positionen des BeadChips mit den CPGI- und Promotorregionen des MAP-on-Chip-Ansatzes verglichen werden. Die Übereinstimmung beider Ansätze ist abhängig von der Anzahl der Regionen, die auf beiden Arrays durch Oligonukleotid-Sonden abgedeckt werden. Es konnten ca. 250.000 CpG-Nukleotide des Illumina BeadChip-Arrays bestimmt werden, die in Regionen des MAP-on-Chip-Arrays vorkommen. Trotzdem ist die Überschneidung der differenziell methylierten Positionen beider globalen Ansätze nicht signifikant. Da allerdings die Überschneidung der Replikate des BeadChip sowie des MAP-on-Chip jeweils signifikant ist, wird deutlich, dass die *H. pylori*-induzierten Veränderungen der humanen DNA-Methylierungssignatur vor allem zielgerichtet ablaufen.



**Abbildung 3.4.2.2 | Venn-Diagramme zur Darstellung der Signifikanz der Überlappung der einzelnen biologischen Experimente und deren Methylierungsanalysen.** Die signifikante Übereinstimmung beruht auf allen vom BeadChip abgedeckten Sequenzen (\*\*  $p < 0,05$ ). Die unterschiedlichen Farben symbolisieren jeweils eines der drei biologischen Replikate (grau, Experiment 1; rot, Experiment 2; blau, Experiment 3). Es zeigt sich eine signifikante Überschneidung der infektionsbedingt differenziell methylierten CpG-Positionen dreier

biologischer Replikate. Die Daten basieren auf der Sequenzierung von Bisulfit-behandelter DNA, die mit einem Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina) hybridisiert wurden. Das obere Venn-Diagramm repräsentiert alle differenziell methylierten Bereiche. Die unteren Diagramme stellen hypermethylierte (links) und hypomethylierte (rechts) CpGs dar ( $p < 0,05$ ;  $\Delta$ -Verhältnis zwischen nicht infizierter und infizierter Probe von  $\geq 5\%$ ).

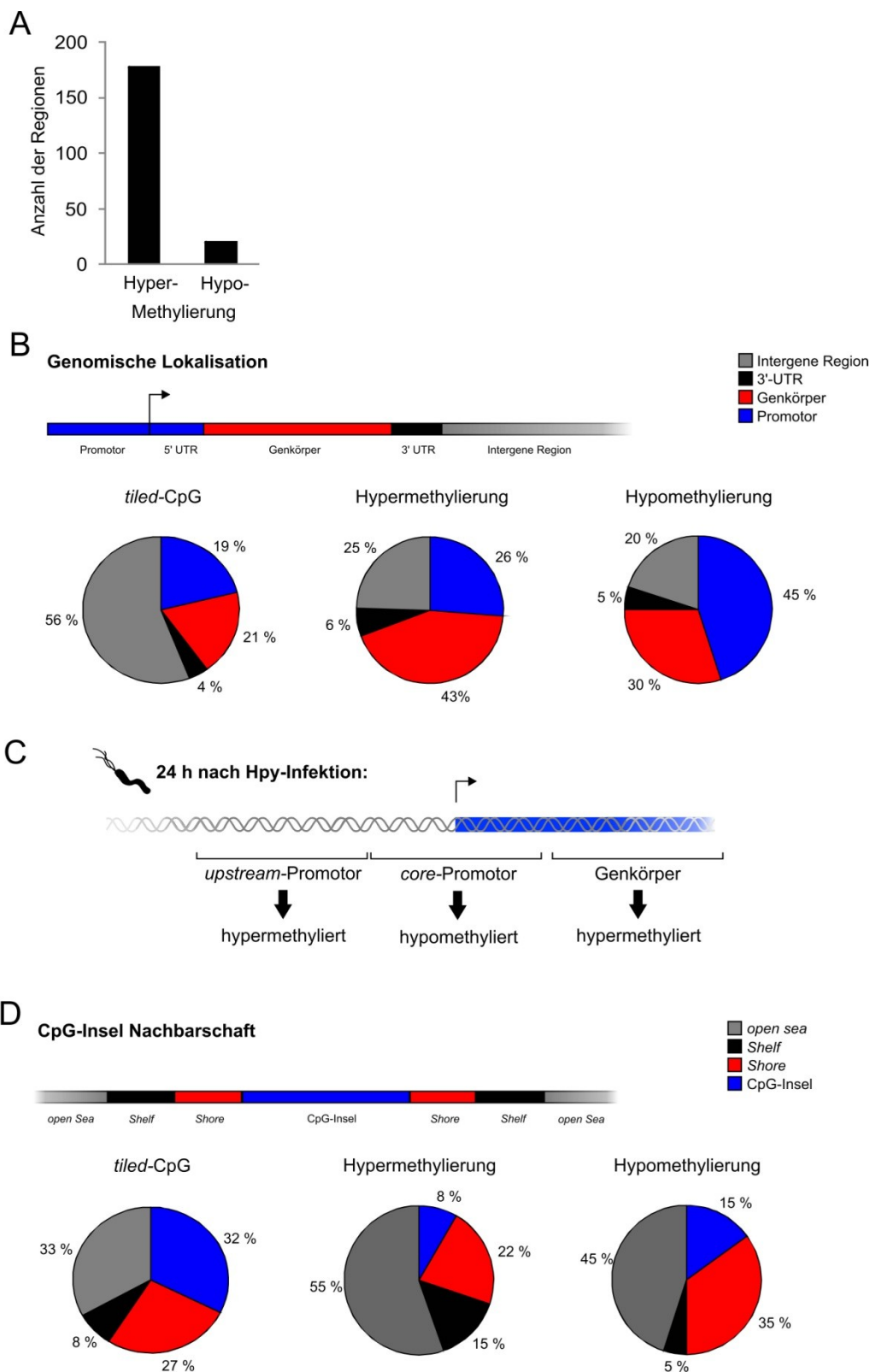
### 3.4.2.3 Globale und regionale Methylierungsanalysen

Der Illumina BeadChip gestattet die Identifizierung einzelner differenziell methylierter CpG-Positionen, ermöglicht jedoch nicht die Unterteilung in CpGI- und Promotor-Typen, wie sie mit der Analysestrategie beim MAP-on-Chip vorgenommen werden konnte. Dennoch ist eine Analyse globaler und regionaler Unterschiede der DNA-Methylierung auch hier möglich. Der Großteil der differenziell methylierten CpG-Positionen des BeadChip ist hypermethyliert (Abb. 3.4.2.3 A). Das entspricht dem Ergebnis der CpGI-Methylierung des MAP-on-Chip-Arrays.

Handelt es sich hierbei auch um CpGs, die in Promotorregionen oder gar im Bereich des TSS liegen? Der BeadChip-Array ermöglicht die Zuordnung der CpGs zu den Bereichen Promotor, 5'-UTR, Genkörper, 3'-UTR oder intergene Region. *Post infectionem* ist die Mehrheit (45 %) der Promotorregionen, inklusive TSS und 5'-UTR, hypomethyliert (Abb. 3.4.2.3 B, Tortendiagramm rechts). Hypermethylierte CpG-Dinukleotide finden sich vor allem in Genkörpern (Abb. 3.4.2.3 B, Tortendiagramm Mitte). Verglichen mit der prozentualen Verteilung aller auf dem Chip abgedeckten Bereiche bedeutet dies einen enormen Anstieg (Abb. 3.4.2.3 B, Tortendiagramm links). Unterschiede in der Methylierungsrichtung bilden sich zwischen Promotor (mit 5'-UTR) und Genkörpern heraus, wohingegen 3'-UTR und intergene Regionen kaum prozentuale Unterschiede zwischen infektionsbedingter Hyper- und Hypomethylierung aufweisen. Deutlich wird auch, dass CpG-Dinukleotide in intergenen Bereichen nur in geringem Maße von Methylierungsmodifikationen betroffen sind. Es liegen mehr als die Hälfte (56 %) der untersuchten Dinukleotide in Bereichen zwischen Genen, machen aber nur 25 % der hypermethylierten und 20 % der hypomethylierten Sequenzen aus. Das deutet auch darauf hin, dass hier keine Präferenz für eine der Methylierungstendenzen besteht.

Der Illumina BeadChip bietet eine weitere Möglichkeit der Unterteilung von CpG-Inseln und ihrer Nachbarschaft (Abb. 3.4.2.3 D): Sowohl bei hyper- als auch hypomethylierten CpGs machen die sogenannten *open sea*-Bereiche, die weit entfernt von der CpGI liegen, etwa die Hälfte der aberrant methylierten Sequenzen aus. Die prozentuale Verteilung zwischen Hyper- und Hypomethylierung unterscheidet sich nicht stark. Verglichen mit den vom Array abgedeckten Bereichen (Abb. 3.4.2.3 D, Tortendiagramm links) ist dieser Bereich verhältnismäßig stark differenziell methyliert. Starke Unterschiede der An- und Abreicherung sind zudem in *shelf*- und *shore*-Regionen zu finden. Hypomethylierte CpGs sind zu 35 % in den *shore*-Regionen und 15 % innerhalb der CpG-Inseln zu finden (Abb. 3.4.2.3 D, Tortendiagramm rechts). Im Gegensatz dazu kommen 8 % der Hypermethylierungen in CpG-Inseln, 22 % in den *shore*-Regionen und 15 % – dreimal mehr als hypomethylierte CpGs – in den *shelf*-Bereichen der CpG-Inseln vor (Abb. 3.4.2.3 D, Tortendiagramm Mitte). Sequenzen innerhalb von CpG-Inseln sind, verglichen mit ihrer Präsenz auf dem BeadChip,

bezüglich ihrer Hypermethylierung (8 %) und Hypomethylierung (15 %) erstaunlicherweise unterrepräsentiert. Trotzdem ist annähernd die doppelte Menge der CpG-Dinukleotide hypo- anstatt hypermethyliert.





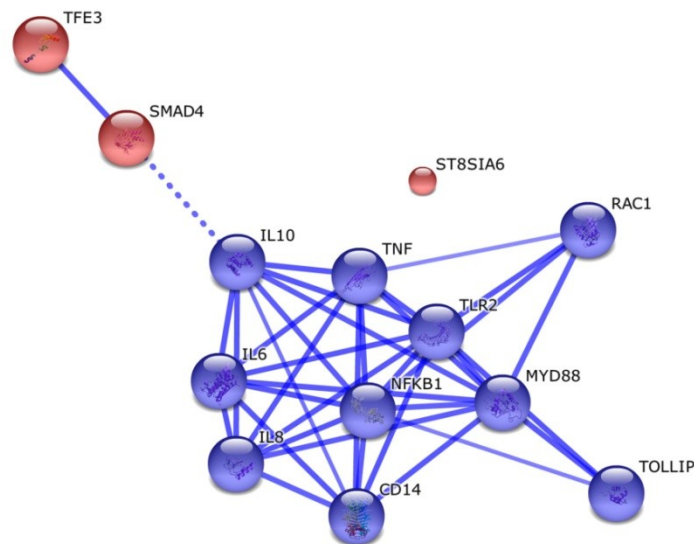
**Abbildung 3.4.2.3 | Vorderseite: Die Unterteilung der genomischen Lokalisation sowie der CpG-Inseln und ihrer Nachbarschaft verdeutlichen positionsbedingte Unterschiede der differenziell methylierten CpGs des Illumina BeadChip nach *H. pylori*-Infektion. (A)** Balkendiagramme verdeutlichen die Verteilung der hyper- und hypomethylierten Bereiche bezogen auf die Gesamtmenge differenziell methylierter CpG-Positionen. **(B)** Graphische Darstellung sowie prozentuale Verteilung der genomischen Lokalisation von hyper- (links) und hypomethylierten CpGs (rechts) bzw. auf dem Chip vorhandenen CpGs (Mitte). Ein hypothetischer TSS ist mit einem Pfeil markiert. **(C)** Schematische Darstellung der Kernaussagen der Region-spezifischen Methylierungsanalyse bezogen auf die genomische Lokalisation differenziell methylierter CpG-Nukleotide. 24 h nach einer Infektion mit *H. pylori* liegen Genkörper und *upstream*-Promotoren überwiegend hypermethyliert vor, *core*-Promotoren hingegen hypomethyliert. **(D)** Illustration der Unterteilung der CpGI und ihrer Nachbarschaft, sowie deren prozentuale Anteile an hyper- (Mitte) und hypomethylierten (rechts) CpGs bzw. auf dem Chip vorhandenen CpGs (links) in Form von Tortendiagrammen.

Die Datenanalyse bestätigt die CpGI-Hypermethylierung im genomischen Bereich des TSS. Bei der Analyse der differenziell methylierten CpG-Positionen des Illumina BeadChip kam es zum gleichen Ergebnis wie beim MAP-on-Chip-Ansatz: Im Vergleich mit allen auf dem Array abgedeckten CpG-Positionen sind die hypermethylierten CpGs verstärkt um den TSS anzutreffen. In Übereinstimmung mit dem MAP-on-Chip-Daten kommt es in CpG-Inseln und ihrer angrenzenden Regionen zur globalen Hypermethylierung, die sich vor allem auf Promotor-ferne Bereiche beschränkt. Auch in diesem globalen Ansatz wird ein prozentual großer Teil der CpG-Nukleotide in Promotor-Sequenzen demethyliert gefunden. Bereiche in der Nähe von CpG-Inseln (*shores*) und *upstream* vom TSS sind überwiegend hypomethyliert, weiter entfernte Regionen (*shelves*) und Bereiche *downstream* vom TSS tendenziell hypermethyliert. Beide genomweiten Arrays (BeadChip und MAP-on-Chip) lassen demnach vergleichbare globale Aussagen zu und dienen der gegenseitigen Validierung.

#### 3.4.2.4 DNase I hypersensitive sites

Regionen, die hypersensitiv auf einen Verdau durch DNase I reagieren, werden als *DNase I hypersensitive sites* (DHS) bezeichnet [382]. Diese Bereiche weisen eine abnormale nukleosomale Struktur auf, die nicht durch gebundene Proteine geschützt wird [383]. Diese offene Chromatinstruktur erleichtert die Expression von Genen. Unter den differenziell methylierten CpG-Dinukleotiden des BeadChip finden sich drei Gene mit sehr hohem CpG-Gehalt (*high*-CpG): TLR2 (*toll-like receptor 2*), TFE3 (*transcription factor binding to IGHM enhancer 3*) sowie ST8SIA6 (*ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 6*). Erstaunlicherweise waren zwei dieser Gene DNase I-hypersensitiv: TLR2 und ST8SIA6. Untersucht man diese Genprodukte mit Hilfe der STRING-Analyse-Software, wird ein erweitertes Netzwerk bekannter und vorhergesagter Protein-Protein-Interaktionen ausgebildet, welches auffällig eng mit dem TLR- und Zytokin-Signalwegen verbunden ist (Abb. 3.4.2.4). Diese Genprodukte haben eine fundamentale Rolle in der Pathogen-Erkennung sowie der Aktivierung der angeborenen Immunität. TLR2 ist über die Stimulation von NF- $\kappa$ B und der Zytokin-Sekretion ein Vermittler der Wirtszellantwort auf Gram-positive Bakterien und Hefen [384].

Die CpG-Sequenzierung mittels Illumina BeadChip ergab in den *H. pylori*-infizierten Proben eine Hypermethylierung im 5'-UTR-Bereichs des *TLR2*-Gens sowie eine besonders starke Hypermethylierung im ersten Exons von *ST8SIA6*. Das erste Exon des *TFE3* ist hingegen hypomethyliert. Hier wird die Rolle der differentiellen Genregulation über DNA-Methylierung besonders in Hinblick auf Krankheits- und Krebsentstehung deutlich.



**Abbildung 3.4.2.4 | STRING-Netzwerk zur Bestimmung von Protein-Protein-Interaktionen dreier differentiell methylierter CpG-Positionen (Illumina BeadChip) in Sequenzen mit hohem CpG-Gehalt: TLR2, TFE3, ST8SIA6.** TLR2 und ST8SIA6 beinhalten zudem DNase I-hypersensitive Sequenzen. Dargestellt ist die *confidence view* in STRING, bei der stärkere Protein-Protein-Interaktionen durch dickere Linien dargestellt sind. Die Standardeinstellung der Vorhersagemethoden in STRING wurden beibehalten und das Konfidenzintervall auf 0,4 festgelegt.

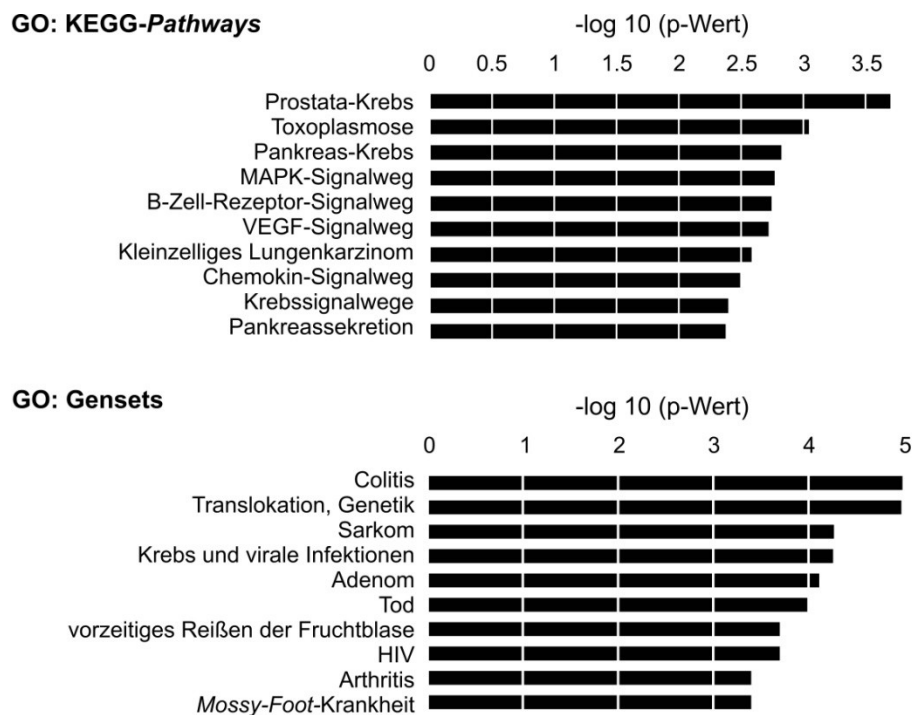
### 3.4.2.5 Funktionelle Analysen

KEGG-*Pathway*- und *Genset*-Analysen bringen funktionelle Zusammenhänge zwischen globalen Methylierungsdaten und der Krankheits- und Krebsentstehung des humanen Wirtsorganismus hervor. Das ergibt die mittels WEBGESTALT-Software durchgeführte Analyse der BeadChip-Daten differentiell methylierter DNA von *H. pylori*-infizierten MKN74-Zellen im Vergleich zu nicht infizierten Kontrollzellen.

Von differentieller Methylierung betroffene KEGG-*Pathways* und *Gensets* sind vor allem mit Krankheiten wie Krebs und Infektionen sowie wichtigen metabolische Signalwegen der Zelle assoziiert. Bei vielen zellulären Funktionen, z.B. bei Proliferation, Differenzierung und Migration, ist die MAPK-Kaskade involviert. Auch der VEGF(*vascular endothelial growth factor*)-Signalweg und Chemokinsignalweg sind an der Regulation von Genen beteiligt, welche Proliferation, Migration und das Überleben der eukaryotischen Zelle vermitteln. Die veränderte Regulation dieser Signalwege ist ein Schlüsselereignis bei der Entstehung von humanem Krebs [372]. Wichtige Komponenten der adaptiven Immunität wie B-Zellen sind für die Antigen-Erkennung erforderlich. Die Bindung eines

Antigens an den B-Zell-Rezeptor (*B cell antigen receptor*, BCR) bewirkt die Aktivierung diverser Kinasekaskaden, welche dereguliert zur Krankheitsentstehung beitragen können [385]. Hier wird die funktionelle Relevanz der infektionsbedingt veränderten Methylierungssignatur für die Pathogenese des Mikroorganismus deutlich (Abb. 3.4.2.5).

Der Vergleich beider globaler Methylierungsdatensätze (BeadChip und MAP-on-Chip) ergibt einige identische *GO*-Begriffe. Hervorzuheben sind die stark krebsassoziierten Ergebnisse der Illumina BeadChip-Analyse: Prostata-, Pankreas-, Lungenkrebs sowie Krebs-signalwege im Allgemeinen sind hier stark angereicherte *KEGG-Pathways*. Auch bei den angereicherten *Gensets* findet sich im BeadChip-Array die Annotationen Sarkom und Adenom. Überdies sind Chemokin- und Zytokin-Signalwege unter den angereicherten *KEGG-Pathways* beider Datensätze zu finden (Abb. 3.4.2.5).



**Abbildung 3.4.2.5 | Funktionelle Software-basierte *GO*-Analyse der *KEGG-Pathways* und *Gensets* mittels *WEBGESTALT-Software*.** Balkendiagramm des relativen Signifikanz-Niveaus. Der negative log ( $-\log_{10}$ ) des p-Wertes jedes *GO*-Begriffs ist absteigend vom höchsten zum niedrigsten Wert dargestellt. Als Referenz dient das gesamte humane Genom (hg18).

### 3.5 Diskussion: Teil II

In den letzten Jahren haben diverse Studien einen Zusammenhang zwischen einer *H. pylori*-Infektion der Magen-Schleimhaut, Veränderungen der DNA-Methylierungssignatur der Wirtszelle und dem Risiko einer Magenkrebskrankung hergestellt [148, 386-389]. Hypothetisch kann die DNA-Methylierung gastrischer Stammzellen, z.B. induziert durch eine *H. pylori*-Infektion, die Tumorgenese einleiten [390]. Dem gegenüber stehen Beobachtungen, die keine Assoziation zwischen erhöhter DNA-Methylierung, gastrischen Krebsrisiko und einer *H. pylori*-Infektion sehen [388, 391]. Entsprechend wichtig sind Untersuchungen wie die vorliegende Studie für die Analyse *H. pylori*-induzierter epigenetischer Mechanismen der Karzinogenese, da bisher nur wenig über den Zusammenhang von bakterieller Infektion und Wirtszell-Methylom bekannt ist. Die onkogenen Eigenschaften einer *H. pylori*-Infektion resultieren aus zwei Mechanismen: dem direkten genotoxischen Effekt der bakteriellen Virulenzfaktoren und Metabolite einerseits der Entzündungsreaktion der Zelle andererseits [392]. Dieses komplexe Wechselspiel wird u.a. durch epigenetische Mechanismen wie DNA-Methylierung und Histon-Modifikation dirigiert. Erst die Aufklärung des gesamten epigenetischen Netzwerks ermöglicht ein umfassendes Verständnis der Pathogen-induzierten Krebsentstehung.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine *H. pylori*-Infektion zu schwerwiegenden Veränderungen des Wirtszell-Methyloms beiträgt und u.a. krebsfördernde Prozesse moduliert [387, 393, 394]. Es ist anzunehmen, dass diese Veränderungen auch nach einer erfolgreichen klinischen Behandlung der Infektion bestehen bleiben. Hinweise darauf liefern Studien, die zeigen, dass die genomische Methylierung mit der *H. pylori*-Infektion ansteigt und mit der Eliminierung des Keims zwar abnimmt, jedoch der ursprüngliche DNA-Methylierungszustand nicht wiederhergestellt wird [394]. Daher sind auch ehemals *H. pylori*-infizierte Patienten von einem erhöhten Krebsrisiko betroffen. Zusätzlich zur Entzündung kann die Zellalterung auf molekularer Ebene CpGI-Methylierungen induzieren [395]. Mit zunehmenden Lebensalter steigt das Krebsrisiko; möglicherweise, weil Stamm- oder Vorläuferzellen molekulare Läsionen akkumulieren, die wiederum zu Zelltransformationen und Krebs beitragen [391, 396].

Die vergleichende globale Methylierungsanalyse ermöglicht einen validen Einblick in das Wirtszell-Epigenom. Auch wenn der methodische Ansatz nur ein kleines Fenster der Pathogenese beleuchtet, stellt dies einen wichtigen Schritt auf dem Weg zum Verständnis von *in vivo*-Systemen dar. Der Zeitpunkt – 24 h post *H. pylori*-Infektion – ist in Zellkultursystemen einer Langzeitinfektion gleichzusetzen, welche *in vivo*-Verhältnisse nachahmen soll. Als Infektionsmodell wurden MKN74-Zellen ausgewählt, u.a. da ihr Phänotyp dem von Primärzellen stark ähnelt: Sie zeichnen sich durch ihr langsames Wachstum aus; zudem sind sie für eine relativ lange Infektionszeit vital. Im Gegensatz zu anderen gastrischen Epithelzelllinien besitzen sie funktionales p53 und E-Cadherin. Da es während der Kultivierung zu Veränderungen der DNA-Methylierungssignatur kommt [397], wurden alle Experimente mit Zellen der gleichen, niedrigen Passagenzahl durchgeführt.

Das normale Vertebratengenom ist global methyliert, weist aber kaum CpGI-Methylierung auf. CpG-Inseln sind für Methylierungsmodifikationen zugänglich [398, 399]. Der Anteil unmethylierter

CpG-Positionen nimmt nur 1-2 % von der Gesamt-DNA ein [120]. Die globale DNA-Methylierung wird als Schutz vor Pathogen-induzierter Immunantwort und Autoimmunantwort gesehen, die von mosaikartig methylierten Genomen ausgelöst wird [120]. Tumorzellen sind durch ein von normalen Zellen abweichendes Methylohm charakterisiert. Die Mehrheit der publizierten Untersuchungsergebnisse des humanen Krebs-Epigenoms weist auf eine genomweite Hypomethylierung und Genpromotor-spezifische Hypermethylierung von CpGI hin [400]. Der globale Verlust des Methylcytosins kann über die Re-Expression von Onkogenen und Aktivierung viraler oder parasitischer Transposons zur genomischen Instabilität beitragen [401]. Methylierte repetitive genomische Sequenzen oder chromosomale Satelliten verleihen der Zelle genomische Stabilität: Kommt es in diesen Bereichen zu Hypomethylierungen, folgen unkontrollierte mitotische Rekombination, Transposon-Insertionen werden erleichtert und verursachen Mutationen [401, 402]. Die Demethylierung und Aktivierung der P-Cadherin-Transkription resultiert im Verlust der Zellpolarität und zeichnet sich durch eine erhöhte Mobilität, Migration und Invasion der Zelle im Bindegewebe aus. Dieser Phänotyp wird bei Brustkrebs beobachtet [402]. Bislang ist nur wenig über die Rolle der DNA-Hypomethylierung bei der Karzinogenese bekannt. Diese globale Studie weist darauf hin, dass die genomische Demethylierung für die Entwicklung der Krankheits- und Krebsentstehung wichtig ist.

CpGI-Hypermethylierung in Promotorregionen ist ein weiteres Kennzeichen von Krebs und kann die Stilllegung von Tumorsuppressorgenen bewirken [400, 403]. Beide Mechanismen der differenziellen DNA-Methylierung unterstützen die Entstehung von Krebs, indem sie zu zellulären Transformationen beitragen.

In der hier durchgeführten MAP-on-Chip-Analyse einer *H. pylori*-Infektion zeigte sich einen Anstieg der DNA-Methylierung im Vergleich zu nicht infizierten Zellen. Die globale Hypermethylierung wurde mit einer weiteren Methode bestätigt. In beiden Ansätzen (MAP-on-Chip und Bisulfit-DNA-Sequenzierung) befand sich die Mehrzahl der methylierten Regionen im Genkörper, nicht wie der Großteil der demethylierten Dinukleotide in der Promotor- und 5'-UTR-Region. Methylohmdate aus infektionsunabhängigen MeDIP-on-Chip-Studien zervikaler intraepithelialer Neoplasien (*cervical intraepithelial neoplasia*, CIN) zeigen im Vergleich zu normalen Zervixgewebe überwiegend Hypermethylierung [404]. Die Promotor-assoziierten CpG-Inseln der Zervix-Krebszellen sind zunehmend hypomethyliert [404]. Das weist darauf hin, dass die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie mit Untersuchungen des zervikalen Karzinoms korrespondieren. Eine 450K-Chip-Studie (Illumina) vergleicht kolorektale Karzinomzellen mit normaler Darm-Mukosa. Auch diese Studie weist eine ähnliche Verteilungen von Hyper- und Hypomethylierung auf. Die Autoren Sandoval *et al.* identifizieren 96-97 % der sequenzierten Dinukleotide als hypermethyliert und nur 2-4 % hypomethyliert. Das entspricht der hier beobachteten drastischen Verschiebung der Methylierungssignatur hin zur Hypermethylierung [399, 405]. Somit induziert die *H. pylori*-Infektion globale Modifikationen der DNA-Methylierung, die mit denen der Karzinogenese vergleichbar sind.

Betrachtet man die Nachbarschaft der CpG-Inseln genauer, stimmt die Verteilung der Hypomethylierung in *H. pylori*-infizierten MKN74-Zellen mit Zellen aus kolorektalen Karzinomen

überein [405]. Die Mehrheit der Hypomethylierungen findet im sogenannten *open sea*-Bereich statt, ist als mit der CpGI per se nicht assoziiert. Dennoch ist auffällig, dass die CpGI-*shores* im Ansatz von Sandoval *et al.* und Song *et al.* hypomethyliert vorliegen [405, 406]. In der hier vorliegenden Analyse gibt es ebenfalls eine starke Anhäufung von hypomethylierten *shore*-Regionen. Ein kontroverses Bild ergibt sich beim Vergleich der hypermethylierten CpGI und ihrer Nachbarschafts-Regionen. Beim hier vorliegenden Ansatz weisen mehr als die Hälfte der *open sea*-Regionen Hypermethylierung auf (55 %) – deutlich mehr als bei kolorektalen Krebszellen mit nur einem Bruchteil der Gesamtmenge (7,6 %) [405]. Dementsprechend gering fallen die Anteile anderer Nachbarschaftsregionen aus, wie beispielsweise die CpGI, die bei Sandovals *et al.* den gewaltigen Anteil von 66,5 % einnehmen. Warum es im Vergleich der beiden Analysen zu dieser Umverteilung kommt, ist unklar. Eine Erklärung könnte die Anwendung unterschiedlicher p-Werte ( $\geq 0,01$  vs.  $\geq 0,05$  in dieser Arbeit) und  $\beta$ -Werte ( $\geq 0,66$  vs.  $\geq 0,5$  in dieser Arbeit) liegen. Des Weiteren betrachten Sandoval *et al.* die biologischen Replikate der jeweiligen Kulturbedingung separat. Außerdem zeigen die dort dargestellten Ergebnisse nur ein biologisches und technisches Replikat der Krebszell-Probe, was zusätzlich zur Verschiebung des Datensatzes beiträgt. Mindestens zwei, besser drei Replikate sollten miteinander abgeglichen werden, um echte biologische Effekte von technischen Schwankungen zu unterscheiden. Daher wurden in dem hier vorgestellten Ansatz die übereinstimmenden Ergebnisse dreier biologischer Datensätze dargestellt.

Die *H. pylori*-Infektion wird mit CpGI-Hypermethylierung von Zellen des Magen-Darm-Trakts assoziiert; dies folgt aus dem Vergleich *H. pylori*-infizierter oder nicht infizierter Biopsien aus Krebsgewebe und gesundem Gewebe. Folgende hypermethylierte Tumorsuppressorgene, Transkriptionsfaktorgene sowie Gene der Entzündungsreaktion, DNA-Reparatur und der zellulären Architektur werden als Reaktion auf eine *H. pylori*-Infektion bei Gastritis und bei der frühen Krebsentstehung gefunden: USF (*upstream transcription factor*) 1 und 2, WWOX (*WW domain containing oxidoreductase*), APC (*adenomatous polyposis coli*), CDKN2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), RUNX3 (*runt-related transcription factor 3*), COX-2 (*cyclooxygenase 2*), TFF2 (*trefoil factor 2*), CDH1, DAP(*death-associated protein*)-Kinase, GSTP1 (*glutathione S-transferase pi 1*), LOX (*lysyl oxidase*), THBD (*thrombomodulin*), FLNc (*filamin C*), HAND1 (*heart and neural crest derivatives expressed 1*), MLH1 (*mutL homolog 1*) und MGMT (*O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*) [386, 387, 390, 407-416]. Die transkriptionelle Stilllegung dieser Gene, die mit Immunantwort, DNA-Reparatur, Zellzyklus, Proliferation und Adhäsion assoziiert sind, erleichtern die Karzinogenese. Da viel Gene von der Transkriptionsregulation durch DNA-Methylierung betroffen sind, kann man beim gastrischen Krebs von einer epigenetischen Erkrankung sprechen, die u.a. von einer *H. pylori*-Infektion verursacht wird.

Etlche Studien demonstrieren, dass eine *H. pylori*-Infektion mit der Hypermethylierung von Genpromotoren assoziiert ist, jedoch beschäftigen sich nur wenige Studien mit der Hypomethylierung spezifischer Gene, die mit der Entwicklung von gastrischem Krebs einhergeht [417, 418].

Shin *et al.* konnten eine größere Anzahl an CpG-Positionen mit Hilfe eines Illumina BeadChip bestimmen. Sie verglichen gesunde nicht-neoplastische Magen-Proben mit denen von Magen-Darm-Krebs-Patienten. Die Kategorisierung des *H. pylori*-Infektionsstatus (negativ, aktiv oder zurückliegende Infektion) basiert auf verschiedenen endoskopischen Tests. Von den 359 identifizierten differenziell methylierten Dinukleotiden waren ca. 81 % der *H. pylori*-infizierten Biopsien hypermethyliert, was mit den Ergebnissen dieser Arbeit vergleichbar ist. Erstaunlicherweise sind die meisten der infektionsbedingt hypermethylierten CpG-Positionen der gastrischen Krebs-Proben im Vergleich zu nicht infizierten Krebs-Proben nicht signifikant hypermethyliert [419]. Aus dieser Studie einen kausalen Zusammenhang zwischen *H. pylori*-Infektion und kolorektalen Karzinomen herzustellen ist demnach schwierig.

Ein Kennzeichen von Krebs ist eine verstärkte DNA-Hypomethylierung, vor allem in repetitiven Sequenzen [152-154]. Dennoch gibt es bis auf eine Studie von Compare *et al.* keine Untersuchungen, die einen Zusammenhang zwischen *H. pylori*-Infektion und globaler DNA-Hypomethylierung in nicht repetitiven Bereichen herstellen. Compare *et al.* untersuchten Biopsie-Material des Magens auf Indikatoren einer *H. pylori*-Infektion sowie den Grad der Erkrankung. Das 5mC-Level der Zell-Proben wurde mittels Immunhistochemie ermittelt [152]. Die Autoren konnten die *H. pylori*-Infektion signifikant mit der Methylierung von Cytosin in Verbindung bringen. Mit Zunahme des Schweregrads der Erkrankung nimmt die globale DNA-Methylierung der gastrischen Mukosa graduell ab, beginnend mit der Infektion über die *H. pylori*-positive Gastritis bis hin zur *H. pylori*-assoziierten chronisch atrophischen Gastritis. Allerdings kann nur zwischen *H. pylori*-negativer Kontrolle und *H. pylori*-positiver chronischer Gastritis ein signifikanter Unterschied detektiert werden. Interessanterweise beobachteten die Autoren zehn Jahre nach der Heilung einer *H. pylori*-Infektion eine Abnahme der 5mC-Konzentration. Dies stimmt mit Studien überein, die nach Eliminierung einer *H. pylori*-Infektion gastrische Karzinome damit assoziieren [420, 421]. Den Studien mangelt es jedoch, wie bei *ex vivo*-Studien häufig, an ausreichendem Strichprobenumfang und Signifikanz der Untersuchungsergebnisse. Des Weiteren können Umwelteinflüsse wie Zigarettenkonsum oder Medikamenteneinnahme die Ergebnisse verfälschen. Auch wenn Compare *et al.* ein global demethyliertes Genom mit der *H. pylori*-induzierten Karzinogenese in Verbindung bringen, widersprechen ihre Beobachtungen nicht der hier vorliegenden Studie. Auch sie assoziieren die Hypermethylierung mit einer *H. pylori*-Infektion, auf die eine konstante Abnahme des Methylierungslevels folgt. Das in dieser Arbeit verwendete Infektionsmodell kann nur frühe Ereignisse der Infektion detektieren, die zur Karzinogenese beitragen, nicht aber den malignen Zustand selbst.

Bislang ist nur ein weiteres bakterielles Pathogen, das wie *H. pylori* chronische Infektionen hervorrufen kann, mit der Veränderungen der DNA-Methylierungssignatur der Wirtszelle assoziiert: *Campylobacter rectus* [146]. Generell wird die Interpretation der Daten durch die schwere Unterscheidbarkeit von Pathogen-induzierten Effekten und allgemeinen Entzündungsprozessen beeinträchtigt. So können z.B. zelluläre Entzündungsreaktionen, die Stickstoffmonoxid(NO)-

Produktion oder bakterielles LPS eine Ursache der differentiellen DNA-Methylierung sein und nicht *H. pylori* selbst [394, 422].

Eine weitere Hürde der Analyse von DNA-Methylierungen ist der dynamische Wechsel zwischen CpG-Methylierung und Demethylierung. Die Signatur der DNA ist dynamisch und beruht nicht, wie lange Zeit angenommen, auf statischen Modifikationen [423-425]. Die Tatsache, dass alle weiteren Studien nur Momentaufnahmen der Infektion darstellen, könnte die Ursache kontroverser Untersuchungsergebnisse sein.

Die 3'-UTR und intergene Regionen scheinen weder beim MAP-on-Chip- noch beim BeadChip-Array Methylierungspräferenzen aufzuzeigen. Die differentielle Methylierung von intragenen und intergenen Bereichen tritt besonders bei der Analyse des BeadChip-Arrays prozentual in den Vordergrund. Methylierung von Genkörpern repräsentieren eine ursprüngliche Form der DNA-Methylierung, da ähnliche Muster der Methylierung sowohl in Pflanzen als auch Tieren gefunden werden. Im Gegensatz zu den UTR-Bereichen scheinen diese Regionen Ziel der infektionsbedingten Methylierungsmodulation zu sein.

Somit muss angenommen werden, dass alternative epigenetische Regulationsmechanismen existieren, die nicht den Transkriptionsstart selbst betreffen. Bisher ging die Mehrheit der Studien davon aus, dass relevante DNA-Methylierung vor allem Promotorregionen und CpG-Inseln betrifft. Diese Annahme wurde von Irizarry und Kollegen in Frage gestellt [118]. Sie fanden heraus, dass die meisten Veränderungen im Darmkrebs in den sogenannten CpGI-*shores* stattfinden und stark mit der Expression der betroffenen Genregion verknüpft sind.

Die Methylierung alternativer Promotoren bzw. Transkriptionsinitiatoren in Genkörpern spielt eine Hauptrolle bei der Regulation der Genexpression [123]. Methylierung ist nur zum geringen Teil (<3 %) in 5'-CpG-Inseln des Promotors präsent und weitestgehend bedeutungslos. Der prozentual größere Anteil spielt sich in Genkörpern (34 %) und zwischen Genen ab und ist konserviert [123]. Gewebe-spezifische intragene Methylierung kann die Transkriptionseffizienz entweder reduzieren [426] oder steigern [427, 428]. Ferner wird die Rolle der intragenen Methylierung in der Modulierung des Spleiß-Vorgangs diskutiert [124, 429]. Es wird beobachtet, dass die DNA-Methylierung in Exons der Säuger-DNA im Vergleich zu Introns erhöht ist. Die Methylierung kann die Assoziation von DNA-bindenden Faktoren stören und ein Pausieren der RNA-Polymerase und den Aufbau des Spleißosoms unterstützen [38, 109]. Eine spannende Frage bleibt dabei jedoch ungeklärt: Wie unterscheiden Methylasen Introns von Exons?

Jeder Krebstyp ist durch ein ihm eigenes spezifisches Methylom charakterisiert. Eine Erklärung dafür ist, dass jedes Organ mehr oder weniger starken externen karzinogenen Agenzien ausgesetzt ist [129]. Darüber hinaus stellt Krebs eine multifaktorielle Erkrankung dar, die unterschiedliche biochemische Stoffwechselwege beeinflusst. Allerdings sind epigenetische Veränderungen ebenfalls komplex und beeinflussen wiederum die DNA-Reparatur, Zell-Adhäsion, Apoptose, Zellzyklus und vieles mehr [129]. Die Frage, warum einzelne CpG-Inseln in Krebszellen hypermethyliert werden, andere hingegen frei von Methylierung bleiben, obwohl potenziell jedes CpG-Dinukleotid mit einem Methylrest versehen werden könnte, bleibt bislang unklar. Es ist anzunehmen, dass CpG-Inseln, die



hypermethyliert werden, ein besonderes Muster der Nukleotidverteilung aufweisen. Auch der Entwicklungsstand der Zelle ist für die Heterogenität der DNA-Methylierung entscheidend. Die Veränderung der Methylierungssignatur von Stammzellen gastrischer Krypten kann die Bildung einer Krebs-Vorläuferzelle initiieren [430].

Unklar ist, wie die Methylierungsveränderung während der Tumorentwicklung induziert wird. Aufgrund der in dieser Arbeit analysierten Methylierungsstruktur kann angenommen werden, dass eine Infektion mit dem humanen Pathogen *H. pylori* einer der Initiatoren der Ummodellierung der DNA-Methylierungssignatur ist. *H. pylori* transloziert Effektorproteine in die Wirtszelle und verändert zelluläre Signalwege derart, dass DNA-Methyltransferasen oder auch potenziell demethylierende Proteine wie Tet (*tet methylcytosine dioxygenase*) differenziell exprimiert werden. Aktuelle Studien zeigen, dass eine DNMT1-/DNMT3-defiziente Zelllinie phänotypisch normalem Gewebe ähnlicher ist als Krebszellgewebe. Im Gegenzug weist gastrisches Gewebe von Lymphknotenmetastasen eine Überexpression von DNMT1, DNMT3a und DNMT3b auf [431, 432]. Andere Studien zeigen, dass die beobachtete Hypermethylierung nicht mit der erhöhten Expression der DNA-Methyltransferasen in Zusammenhang steht [399]. Eine Veränderung der mRNA- oder Protein-Menge und Aktivität der DNMTs scheint somit nicht Hauptursache der differenziellen DNA-Methylierung im zellulären Genom zu sein [433].

In diesem Modell ist eine DNA-Methylierungssignatur vorstellbar, die die zellulären Enzyme an ihren Zielort rekrutiert. Die hier dargestellte signifikante Übereinstimmung zwischen den biologischen Replikaten jedes Ansatzes legt eine gezielte Modulation nahe, die gleiche DNA-Abschnitte betrifft. Eventuell zeichnen sich diese Bereiche durch besondere, bislang unbekannte Nukleotidabfolgen, Architektur oder Modifikationen aus. Die Abweichung der zellulären DNA-Sequenz durch Methylierung oder Demethylierung bringt gezielte oder zufällige Änderungen zellulärer Signalwege mit sich, die das Überleben des Pathogen im Wirt erleichtern können. Ein kontinuierlich wachsender Tumor bedeutet die schnelle Bildung neuer Wirtszellen und eine veränderte zelluläre Immunantwort. Die vorliegende Studie zeigt, dass Komponenten der Immunantwort, insbesondere des Zytokin-Signalwegs, von der differenziellen Methylierung betroffen sind. Die Gen-Ontologie-Analyse verweist, in Übereinstimmung mit anderen Studien, auf die zelluläre Entzündungsantwort, die aufgrund differenzieller DNA-Methylierung gestört ist. Auch Niwa und Kollegen beobachten, dass das Expressionslevel diverser Gene der Entzündungsreaktion parallel zur DNA-Methylierung ansteigt [394]. Bereits bekannt ist, dass als Reaktion auf eine Wirt-Pathogen-Wechselspiel die Interferon-Antwort auf Ebene der Chromatin-Modifikation moduliert ist [434].

Werden Krebszelllinien mit primären malignen Tumorzellen verglichen, findet man in den karzinogenen Zelllinien erstaunlicherweise vor allem hypermethylierte und nicht, wie erwartet, global hypomethylierte Phänotypen [397]. Hier tut sich ein fundamentales Problem epigenetischer Studien im Zellkulturmodell auf. Dient als Ausgangs- bzw. Kontroll-Material der Untersuchung eine Krebszelllinie, weist diese bereits veränderte Methylierungsmuster im Vergleich zu normalen Gewebe auf. Beide hier verwendeten genomweiten Ansätze (450K- und 3x720K-Chip) zeigen eine

infektionsbedingte Hypomethylierung des TSS von Promotorregionen. Dieses Ergebnis widerspricht bekannten Untersuchungen, bei denen Promotorregionen charakteristischerweise methyliert sind. Wie ist dieser Widerspruch zu erklären? Einerseits handelt es sich in dieser Arbeit um die Analyse der Infektion einer Krebszelllinie und nicht, wie in vielen anderen Studien, um den Vergleich von malignem mit normalem Gewebe. Andererseits lag der Fokus von Methylierungsstudien lange Zeit auf der Analyse von Hypermethylierungen – die Bedeutung der Hypomethylierung wird erst nach und nach verstanden und gewinnt zunehmend an Aufmerksamkeit.

Die MAP-on-Chip-Analyse erfasst eine Vielzahl an Hypomethylierungen entsprechend den publizierten Beobachtungen der Tumorgenese [400]. Im Widerspruch zu den bisherigen Beobachtungen steht die Promotor-assoziierte Hypomethylierung. Interessanterweise unterscheiden sich *upstream*- und *core*-Promotor voneinander: So ist der TSS spezifisch von Demethylierungsprozessen betroffen, CpGI in Promotorregionen hingegen sind überwiegend hypermethyliert. Derzeit fehlen vergleichbare Studien, die den Promotor-Bereich ähnlich exakt in Regionen einteilen. Dies mag die scheinbar gegensätzlichen Ergebnissen erklären, die letztlich nur auf unterschiedlich stringenten Analysen beruhen.

Des Weiteren ist bekannt, dass vor allem repetitive DNA-Sequenzen in Krebsfällen hypomethyliert sind [435]. Im Vergleich zu normalen, nicht infiziertem Gewebe werden die Gene *Alu* und *Stata* in *H. pylori*-infizierter gastrischer Mukosa hypomethyliert gefunden, Hypomethylierung von LINE-1 ist mit Krebs, nicht aber *H. pylori*-Infektion assoziiert [154]. Andere Studien bringen die CpGI-Hypomethylierung von LINE-1 mit *H. pylori*-bedingter Gastritis bzw. gastrischen Karzinom in Zusammenhang [153, 413]. Je nach betrachteter genomischer Position kann es zu unterschiedlichen Ergebnissen kommen. In der hier vorliegenden Studie konnte aus technischen Gründen nicht überprüft werden, ob es sich bei den hypomethylierten Regionen um repetitive Sequenzen handelt. Dies ist jedoch nahezu auszuschließen, da 94 % der infektionsbedingten Hypomethylierung in normalerweise nicht-repetitiven Promotor-Bereichen liegen.

Gen-Ontologie-Analysen weisen darauf hin, dass krankheits- und krebsassoziierte Signalwege von differenzieller Methylierung betroffen sind. So kommt es beim Abgleich mit KEGG-Signalwegen und *Gensets* zur signifikanten Anreicherung der *GO*-Begriffe Prostata- und Pankreas-Krebs sowie Krebs im Allgemeinen. Auch Komponenten diverser Signalwege (u.a. der MAP-Kinase- und JAK/STAT-Weg), die zur Tumorgenese beitragen, wurden differenziell methyliert gefunden [372, 436]. Über die Veränderung dieser Signalwege könnte *H. pylori* die Karzinogenese der eukaryotischen Wirtszelle ermöglichen.

*GO*-Begriff-Analysen der BeadChip-Studie von Sandoval *et al.*, der MeDIP-on-Chip-Analyse von Lendvai *et al.* sowie der hier vorliegenden Studie ergeben eine signifikante Anreicherungen der hypermethylierten Regionen in der Kategorie Transkriptionsregulation [404, 405]. Bei der Anreicherung der molekularen Funktionen ist die DNA-Bindung die stärkste Kategorie [404]. Unter den funktionellen Kategorien treten gehäuft „zelluläre Kommunikation“ und „Entwicklung“ auf [405]. Somit sind die Ergebnisse der hier vorliegenden Analyse und der Krebs-Studien miteinander vergleichbar. Sie verweisen auf Gene und Signalwege mit klinisch relevanten Parametern, die die

Rolle der Pathogen-induzierten Krankheits- und Krebsentstehung in Verbindung mit einer differenziellen DNA-Methylierung setzt.

Die Validierung der vorliegenden MAP-on-Chip-Studie mittels Bisulfit-DNA-Sequenzierung in Form des 450K-BeadChip war erfolgreich. Diese vergleichsweise schnelle Methode der Validierung bietet den Vorteil, dass sie einen großen Anteil der DMRs abdeckt. Eine Einschränkung dabei ist jedoch die Tatsache, dass nur etwa die Hälfte (ungefähr 250.000) der mehr als 450.000 CpG-Positionen des BeadChip in den CpGI- und Promotorregionen des MAP-on-Chip zu finden sind. Auffällig ist, dass der MAP-on-Chip-Array zehnmal so viel DMRs hervorbringt wie der BeadChip. Dieses Phänomen wurde auch in einer vergleichenden Studie von Clark *et al.* beobachtet, bei der eine MeDIP-Sequenzierung im Vergleich zum 450K-BeadChip zweimal so viele DMRs hervorbringt [437]. Da bei der MAP-on-Chip-Methode DNA-Bruchstücke betrachtet werden, ist die Methode ungenauer und deckt einen größeren Bereich des humanen Genoms ab.

Die hier verwendete Methode der Bisulfit-DNA-Sequenzierung ermöglicht nicht nur die Validierung von Einzelnukleotiden, sondern erlaubt auch die Bestätigung globaler Ergebnisse. Sandoval *et al.* bestätigen die Robustheit des BeadChip mit der Validierung einzelner, weniger Gene mittels Bisulfit-Konvertierung und Amplikon-PCR-Klonierung [405]. In der aktuellen Literatur findet man vor allem Hinweise zur Validierung von MeDIP-Chip-Daten, nicht aber MAP-on-Chip-Auswertungen. Die Methode der Wahl ist die Bisulfit-Sequenzierung, weil sie auch kleine Unterschiede des DNA-Methylierungsmusters detektieren kann. Pälme *et al.* finden eine generell gute Kohärenz zwischen Daten aus MeDIP-on-Chip und Bisulfit-Sequenzierung [362]. Clark *et al.* haben Ergebnisse des 450K-BeadChip mit MeDIP-Sequenzierungsdaten verglichen und finden eine angemessene positive Korrelation (Spearman's  $k = 0,68$ ) [437], die wie in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht signifikant ist.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die qualitative Analyse von Rohdaten in Form von Pseudo-Bildern der Hybridisierung, Korrelationsanalyse, MA-Plot u.v.m. sowohl die technische als auch biologische Beurteilung der Daten erleichtert. Bereits in diesem frühen Analyseschritt sind erste Tendenzen globaler Unterschiede detektierbar. So wurde im MA- und Anreicherungs-Plot der MAP-on-Chip-Proben und der Verteilung der  $\beta$ -Werte der BeadChip-Rohdaten ein Unterschied zwischen nicht infizierter und *H. pylori*-infizierter Probe deutlich. Um zu vermeiden, dass technische Variationen als biologische Effekte betrachtet werden, sind Qualitätsanalysen der Rohdaten von essentieller Bedeutung. Der Qualitätsvergleich der Rohdaten des MAP-on-Chip- und BeadChip-Arrays verdeutlicht, dass die Bisulfit-DNA-Sequenzierung, im Gegensatz zum MAP-on-Chip-Ansatz, ein hoch reproduzierbares System darstellt. Da für beide Ansätze die gleichen biologischen Replikate als Ausgangsmaterial dienten, ist eine biologische Variation auszuschließen. Auch Sandoval *et al.* finden sehr hohe Korrelationswerte zwischen ihren Replikaten [405], zudem traten sie den Vergleich zu etablierten Systemen an und fanden eine hohe Beständigkeit dieser relativ neuen DNA-Methylierungsplattform. Die Korrelation des 3x720k-Array war ausreichend. Im Gegensatz zur Bisulfit-DNA-Sequenzierung, bei der homogene genomische DNA mit Bisulfit behandelt, amplifiziert und sequenziert wird, beinhaltet die MAP-on-Chip-Technik diverse Probenverarbeitungsschritte, die

die Heterogenität des Probenmaterials verantworten. Daher sind amplifizierungsfreie Anreicherungsmethoden anzustreben, die das Problem der ungenauen Verteilung nicht entstehen lassen. Insbesondere der MAP-on-Chip-Ansatz ist von dieser Problematik betroffen, da er eine ungleiche Ausgangsmenge an DNA-Fragmenten der Anreicherung beinhaltet. Aber auch die Methode der Bisulfit-Konvertierung selbst birgt das Problem des Materialverlustes, der Degradierung und erschwert die Annotation der nun Bisulfit-konvertierten DNA auf das humane Genom.

Für die Methode der Bisulfit-DNA-Sequenzierung gibt es bisher keinen geeigneten Ersatz, um ein gesamtes Methylom zu erstellen, auch wenn MeDIP- oder MAP-Sequenzierung für die Anreicherung stark methylierter DNA-Sequenzen – zu einem Bruchteil der Kosten der Bisulfit-DNA-Sequenzierung – geeignet sind [106]. MeDIP- und MAP-Sequenzierung eignen sich eher zur Bestimmung von relativen als absoluten Unterschieden zwischen Proben [106]. Das Anreicherungssignal steht nicht im linearen Zusammenhang mit dem tatsächlichen Methylierungslevel [110]. Auch beim BeadChip gibt die Signalintensität nicht die tatsächliche Methylierungsstärke wieder. Daher wurde auf eine Darstellung einer Liste der Gene mit den stärksten Methylierungsunterschieden verzichtet. Die Problematik des absoluten und relativen Methylierungslevels muss bei allen Analysen beachtet werden: Das absolute Level repräsentiert die Dichte des 5mC, muss aber in Bezug zur totalen Anzahl der möglichen CpG-Inseln betrachtet werden [110]. Problematisch ist auch die Heterogenität des zu analysierenden Probenmaterials. Diesbezüglich ist die Analyse einer Zelllinie wie die hier verwendeten MKN74-Epithelzellen von Vorteil. Das größte Problem stellt *ex vivo*-Probenmaterial dar, da es immer heterogene Zellpopulationen beinhaltet, auch wenn diese nur einem Organ entstammen. Aber auch Zellkulturen, bei denen alle Zellen voneinander abstammende Klone darstellen, können individuelle Unterschiede aufweisen, hervorgerufen von Mutationen oder Positionseffekten. In naher Zukunft könnte die Einzelzell-Sequenzierung die Analyse und Interpretation von Methylierungsdaten erleichtern [438].

Zusammenfassend stellt die Technik des MAP-on-Chip eine kosteneffiziente Methode dar, um genomweite DNA-Methylierungsprofile zu generieren, auch wenn diese keine hohen Auflösung bieten. Ebenso kostengünstig ist die Bisulfit-DNA-Sequenzierung mittels 450K-BeadChip von Illumina, der zwar fast alle CpGI abdeckt, aber nur einen geringen Anteil am gesamten humanen Genom ausmacht. Einer der fundamentalen Unterschiede beider genomweiter Ansätze ist die Abdeckung des Genoms bzw. Methyloms. Der CpG-Island-Plus-Chip analysiert große CpGI-Bereiche, der BeadChip einzelne Dinukleotide. Letzterer hat also eine feinere Auflösung, vermag jedoch nicht größere differenziell methylierte Abschnitte zu identifizieren. Sein großer Vorteil liegt im geringen Bedarf an Ausgangsprobenmaterial. Beide Array-Typen unterscheiden sich stark in ihrer Spezifität, bringen allerdings dennoch vergleichbare globale Aussagen über die DNA-Methylierungssignatur nach *H. pylori*-Infektion hervor.

Auf der Basis einer „sanften“ Normalisierung, hier mittels *median centering* und Quantil-Normalisierung, können signifikante DMRs identifiziert werden. Zur Analyse der Daten des MAP-on-Chip stehen mehrere Möglichkeiten offen. Am häufigsten wird ein sogenannter *sliding-window*-

Algorithmus wie der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet [439]. Er erkennt DMRs über die Detektion von Signal-*Peaks* innerhalb größerer genomischer Bereiche. Vergleicht man mit diesem Ansatz unterschiedlich behandelte Proben, können kleinere bzw. weniger starke Unterschiede nicht detektiert werden [362]. Um dieser Problematik entgegen zu wirken wurde zur hier angewandten Analyse eine Medianberechnung aller log<sub>2</sub>-Werte einer definierten Region (z.B. Promotor, CpGI) durchgeführt. Die Berechnung des Median von log<sub>2</sub>-Verhältnissen individueller Oligonukleotide, die innerhalb der definierten Region liegen, ermöglicht die Bestimmung der Anreicherung, macht sie mit anderen Proben vergleichbar und bietet die Möglichkeit der differenziellen Methylierungseinstufung [362].

Der Abgleich des 4x44K-Expressionsmicroarrays (Agilent Technologies) und der Methylierungsarrays (NimbleGen und Illumina) erzielt keine signifikante Überschneidungen. Grundsätzlich existiert ein inverse Korrelation zwischen DNA-Methylierung von CpGI-Promotoren und Gen-Expression [440]. Andere Studien zeigen jedoch, dass CpG-arme Promotoren weiterhin exprimiert werden, auch wenn sie methyliert sind [345]. Nicht nur die Dichte der CpG-Positionen im Promotor, auch der Zeitpunkt der Probennahme ist für das Expressionsmuster wichtig. Daher ist eine signifikante globale Korrelation von DNA-Methylierungsstatus und Expressionsmuster schwer nachweisbar, insbesondere wenn wie in dieser Studie verschiedene Arrayplattformen und Gen-Annotationen verwendet wurden.

Nicht nur eine globale Auswertung der Daten, sondern auch die spezifische Analyse biologisch relevanter Gene, die von der differenziellen Methylierung betroffen sind, ist von Interesse. Besonders die Entschlüsselung der Krebsentstehung steht dabei im Vordergrund. Der CpGI-plus-Promotor-Chip weist eine starke *PRMT1*-Hypermethylierung in einem Bereich vor dem TSS des Gens auf – dies kann zur differenziellen Regulation dieses Gens beitragen. Östrogen-Rezeptoren wie *ESRRG* sind Mitglieder einer großen Familie von Steroidhormon-Rezeptoren des Zellkerns. Sie regulieren diverse physiologische biochemische Prozesse der Zelle, indem sie als Liganden-abhängige Transkriptionsfaktoren agieren [441]. Romancer *et al.* zeigen, dass Östrogen-Rezeptoren insbesondere durch die Arginin-Methyltransferase *PRMT1* (*protein arginine methyltransferase 1*) methyliert werden. Dieses Methylierungsereignis ist für die Vermittlung der extranukleären Funktion des Rezeptors und damit für die Proliferation und das Überleben der Zelle verantwortlich. Auch die Methylierung der Argininreste von Histon H2, H3 und H4 sind von *PRMT1* abhängig [442]. Je nach Tumortyp (u.a. Prostata-Krebs [443], Darmkrebs [366] und Brustkrebs [444]) ist die *PRMT1*-Expression verändert [445, 446]. Interessanterweise wird das humane *ESRRG*-Gen in beiden globalen Ansätzen im TSS der Promotorregion hypermethyliert gefunden (Illumina Z-Score = -14 und NimbleGen Median  $\Delta\log_2 = 1,97$ ). Auch die veränderte Expression vom *ESRRG* wird mit einem erhöhten Risiko der Erkrankung an Brustkrebs [447-449], Endometriumkarzinom [450] oder Prostatakrebs [451] in Verbindung gebracht. Das vom *ESRRG*-Gen kodierte Protein fungiert als transkriptioneller Aktivator der *DNMT1*-Expression, indem es direkt an das *response element* des *DNMT1*-Promotors bindet und die Zellproliferation und Östrogen-Signalwege moduliert [452]. Zukünftige Untersuchungen sollten die *H. pylori*-induzierte Auswirkungen auf das *ESRRG*-

Genprodukt genauer beleuchten. Verursacht die *H. pylori*-Infektion eine Hypomethylierung dieses TSS, kann es zur gesteigerten Expression des ESRRG-Genprodukts kommen, was die Tumorentstehung erleichtern würde [447-450, 453]. Die Aktivierung des DNMT1-Proteins könnte die Ursache der gesteigerten Methylierung von Cytosinresten nach *H. pylori*-Infektion sein, auch wenn diese auf mRNA- und Proteinebene nicht nachweisbar ist [433].

Um die biologische Relevanz dieser Genmethylierungen zu testen, sollten zunächst mRNA-Expressionsanalysen der entsprechenden Gene durchgeführt und deren Abhängigkeit von DNA-Methyltransferasen untersucht werden. Um detaillierte Methylierungsmuster größerer genomischer Abschnitte zu erhalten, bietet sich die Sequenzierung Bisulfit-konvertierter DNA-Amplifikate an. Des Weiteren sollte die Relevanz dieser Zellkultur-basierten Studie mit Hilfe homogener Primärzell- oder *ex vivo*-Modelle validiert werden.

Das klinisch relevante Ziel solcher Studien ist es, differenziell methylierte Regionen auszumachen, um frühzeitig Krebsentstehung zu identifizieren. Generell müssen Regionen *in vitro* und *in vivo* auf ihre Indikatorfunktion hin überprüft werden. Bislang liegt der Fokus solcher Studien auf der Analyse von Methylierungssignaturen. Schwerpunkt beider experimentellen Ansätze ist die Analyse von CpG-Inseln und Promotorregionen. Dennoch können ebenso Nicht-CpG-Dinukleotide für die Tumorgenese und Krankheitsentstehung von Bedeutung sein und sollten in zukünftigen Studien mit einbezogen werden [440]. Der Einsatz demethylierter DNA-Sequenzen als biologische Marker ist bislang nicht erprobt, potenziell jedoch möglich. Deutlich ist, dass bereits in einem relativ frühen Stadium Unterschiede der Methylierungssignatur von normalem und verändertem (infizierten oder karzinogen) Gewebe auftreten. Daher muss auch der Zeitpunkt der Krankheits- oder Krebsentstehung differenziert betrachtet werden. Epigenetische Modifikationen können zu unterschiedlichen Zeitpunkten mehr oder weniger stark ausfallen bzw. total ausbleiben. Dies muss auch beim Vergleich verschiedenster Studien untereinander als Ursache von Unterschieden in Betracht gezogen werden.

Diese Arbeit präsentiert erstmalig die Kombination aus MAP-on-Chip und BeadChip, um Einblicke in die Wechselwirkung von *H. pylori*-Infektion und Wirtszellepigenom zu erhalten. Beide Ansätze sind geeignete Methoden, um vergleichbare genomweite DNA-Methylierungsprofile mehrerer biologischer Proben zu generieren. Die Techniken sind mit anderen klassischen und epigenetischen Analysemethoden kompatibel, besonders unter Verwendung gleicher Array-Plattformen. Die Untersuchung epigenetischer Faktoren stellt einen wichtigen Schlüssel zur Erforschung von Krankheits- und Krebsentstehung dar.

### 3.6 Teil III: *Chlamydia trachomatis* beeinflusst die Alterung der Wirtszelle durch Aktivierung der humane Telomeraseuntereinheit hTERT.

Dieser Teil widmet sich den *C. trachomatis*-induzierten Veränderungen der Wirtszelle, insbesondere in Hinblick auf deren Alterung und Überleben während der akuten Infektion und der Zeit nach der Ausheilung einer akuten Infektion. Hierzu wurde die Fibroblastenzelllinie IMR90E1A verwendet, die sich besonders für derartige Studien eignet, da sie mit dem adenoviralen Onkogen E1A immortalisiert ist. Derartig veränderte Zellen sind weiterhin für die p53-abhängige Zellantwort auf DNA-Schäden und Apoptose sensitiv [454, 455]. Die vorliegende Arbeit zeigt, dass eine akute Infektion (24 h *p.i.*) mit *C. trachomatis* die Genexpression und enzymatische Aktivität der katalytischen Untereinheit der Telomerase (hTERT) induziert. Werden infizierte Zellen kontinuierlich mit dem Antibiotikum Doxycyclin behandelt und somit von der akuten Infektion befreit, geht die Aktivität von hTERT kontinuierlich verloren. Derart geheilte Zellen weisen weniger telomere DNA-Schäden sowie reduzierte p21-Proteinmengen auf. Längerfristig zeigen diese Zellen einen spannenden Phänotyp: Sie sind zunehmend resistent gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose – dies trägt potenziell zur Akkumulation weiterer zellulärer Transformationen bei.

#### 3.6.1 Erhöhte hTERT-Expression und enzymatische Aktivität

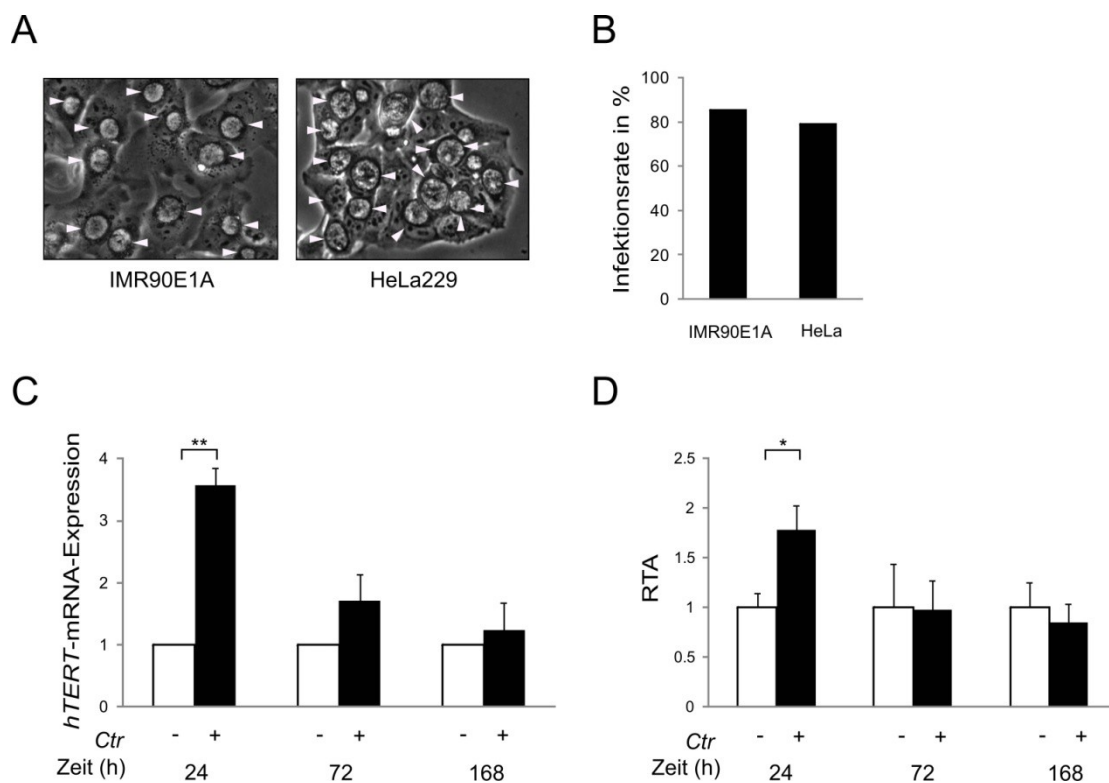
Um die Auswirkung einer *C. trachomatis*-Infektion auf das zelluläre Überleben zu untersuchen, wurden späte Passagen der IMR90E1A-Fibroblasten infiziert. Aufgrund der E1A-Insertion sind die Zellen weniger sensitiv, nicht aber komplett vor Seneszenz geschützt [455]. Die Überprüfung der Seneszenz mit Hilfe einer  $\beta$ -Galactosidase-Färbung zeigt wenige positiv gefärbte Zellen, während die Mehrheit der Zellen ungefärbt bleibt (Daten nicht gezeigt).

Um die Verwendbarkeit der IMR90E1A-Zellen für eine Infektion mit *C. trachomatis* zu prüfen, wurden vergleichende Experimente mit HeLa229-Zellen, einem häufig verwendeten Zelltyp bei *C. trachomatis*-Infektionen, durchgeführt. Die Infektions- und Inklusionsbildung verhält sich in beiden Zelllinien sehr ähnlich. Inklusions-Größe und Anzahl variieren bei gleichen Infektionsbedingungen (24 h *p.i.*, MOI 1) kaum zwischen den beiden Modellen (Abb. 3.6.1 A und B).

Interessanterweise sind zu einem frühen Zeitpunkt der akuten Infektion (24 h *p.i.*) die mRNA-Level der katalytischen Untereinheit der Telomerase in infizierten Zellen im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle 3- bis 4-fach erhöht (Abb. 3.6.1 C). Um zu untersuchen, ob die gesteigerte hTERT-Regulation nach einer initialen Infektion aufrecht erhalten wird, wurden die *C. trachomatis*-infizierten Zellen und Kontrollen zum Zeitpunkt 24 h *p.i.* mit einer geringen Konzentration (75 ng/ml) des Antibiotikums Doxycyclin behandelt. Diese Menge beeinflusst nicht die Apoptoseeigenschaften der Wirtszelle [456] und bewirkt nach länger andauernder Inkubationszeit die Eliminierung der chlamydialen Retikularkörperchen. Wurde das Antibiotikum aus dem Medium entfernt, konnten sich bis zum Zeitpunkt 72 h *p.i.* eine akute Infektion reetablieren, zu späteren Zeitpunkten der Inkubation war dies nicht mehr möglich. Spätere Zeitpunkte, nach Ausheilung der *C. trachomatis*-Infektion,

zeigen eine erneute Abnahme des *hTERT*-mRNA-Expressionslevels, das nach 72 h nur noch die Hälfte beträgt (1- bis 2-facher Anstieg) und 168 h *p.i.* (= 7 d *p.i.*) sein Ausgangsniveau erreicht.

Im Folgenden sollte nun untersucht werden, ob die gesteigerte *hTERT*-mRNA-Expression auch funktionelle Auswirkungen auf die infizierte Wirtszelle hat. Hierzu wurde die Aktivität der Telomerase mittels *Telomere Repeat Amplification Protocol* (TRAP)-Assay bestimmt. Es zeigt sich dabei, dass auch die enzymatische Aktivität der Telomerase in akut infizierten Zellen (24 h *p.i.*) signifikant erhöht ist. Sowohl Expressions- als auch Aktivitätsniveau fallen kontinuierlich im Verlauf der Antibiotika-Behandlung der Zellen ab (7 d *p.i.*), bis das Ausgangsniveau der Kontrollzellen erreicht wird (Abb. 3.6.1 C und D). Somit induziert die akute *C. trachomatis*-Infektion eine transiente *hTERT*-mRNA-Expression und Erhöhung der Telomerase-Aktivität, die mit zunehmender Eliminierung der Chlamydieninfektion zurückgeht.



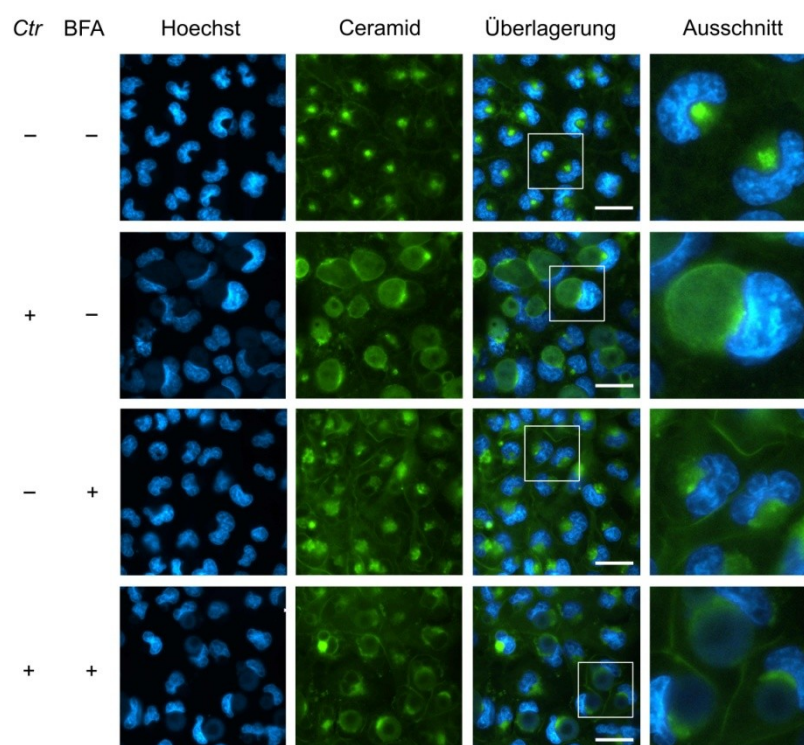
**Abbildung 3.6.1 | Infektionsraten von IMR90E1A- und HeLa229-Zellen sowie Quantifizierung der *hTERT*-mRNA-Expression und -Aktivität während akuter und Doxycyclin-behandelter *C. trachomatis*(Ctr)-Infektion.** (A) *C. trachomatis*-Infektionsraten in IMR90E1A- und HeLa229-Zellen. Die lichtmikroskopischen Bilder zeigen die chlamydialen Inklusionen (weiße Pfeile; 24 h *p.i.*, MOI 1). (B) Quantifizierung der Infektionsraten von IMR90E1A- und HeLa229-Zellen. (C) qRT-PCR-Analyse zur Quantifizierung der relativen *hTERT*-mRNA-Expression (normalisiert auf *GAPDH*). Die Daten zeigen die relative x-fache Veränderung normalisierter mRNA-Expressionslevel in Ctr-infizierten (+) und nicht infizierten (-) IMR90E1A-Zellen zum Zeitpunkt 24 h, 72 h und 168 h *p.i.* mit Standardfehler (SE) und Signifikanzniveau (\*\*  $p < 0,01$ ). (D) Die Telomerase-Aktivität der IMR90E1A-Zellysate wurde mittels TRAP-Assay bestimmt. Die y-Achse repräsentiert die relative Telomerase-Aktivität (RTA); diese ist auf interne Standardkontrollen normalisiert und stellt die x-fache Veränderung infizierter Zellen im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle dar. IMR90E1A-Zellen wurden für 24 h, 72 h und 168 h infiziert. Die Quantifizierung zeigt drei unabhängige biologische Replikate mit Standardfehler (SE) und Signifikanzniveau (\*  $p < 0,05$ ). Die antibiotische Bereinigung der Infektion wird durch die Gabe von Doxycyclin (75 ng/ml) zum Zeitpunkt 24 h *p.i.* erzielt (C und D).

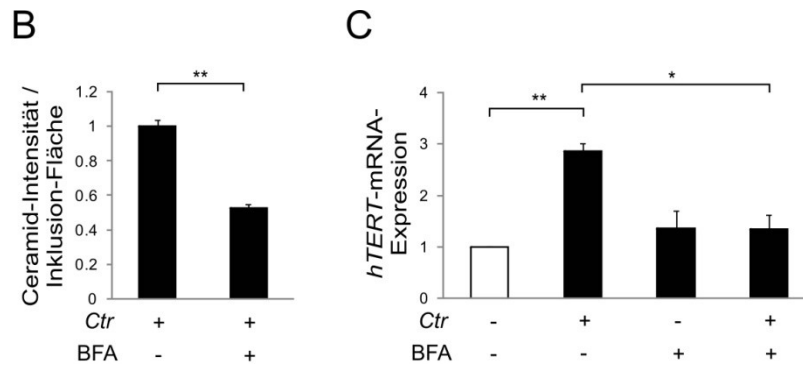


### 3.6.2 Ceramid-abhängige Genexpression von *hTERT*

Chlamydien sind dafür bekannt, Sphingolipide (u.a. Ceramide) der Wirtszelle aufzunehmen und in Inklusions- bzw. Bakterienmembranen zu inkorporieren [457-459]. Da Ceramide Inhibitoren der *hTERT*-Transkription sind [460, 461], sollte ein möglicher Zusammenhang zur *hTERT*-Genregulation überprüft werden. Dazu wurde der Ceramid-Transport zur chlamydialen Inklusion inhibiert. Brefeldin A ist ein Inhibitor des retrograden Golgi-Transports [462]. Eine akute *C. trachomatis*-Infektion in IMR90E1A-Zellen wurde mit dem Inhibitor inkubiert und dessen Wirkung auf den intrazellulären Lipidtransport mit Hilfe von Fluoreszenz-markierten Ceramiden überwacht. Es ist bekannt, dass sich Brefeldin A auf die Größe der chlamydialen Inklusion auswirkt, jedoch nicht auf die primäre Infektivität der Chlamydien [463]. Kontrollzellen verdeutlichen, dass das Ceramid im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Im Gegensatz dazu wird Ceramid in akut infizierten Zellen (24 h *p.i.*, MOI 1) zur chlamydialen Inklusion rekrutiert. Die Zugabe von Brefeldin A verhindert diesen Ceramid-Transport zur Inklusion (Abb. 3.6.2 A, links). Dies bestätigt auch die Quantifizierung der Fluoreszenz-Intensität des markiertem Ceramids nach Zugabe von Brefeldin A (Abb. 3.6.2 C). Quantitative RT-PCR-Analysen ergeben weiterhin, dass die Inhibitor-Behandlung eine Hochregulation der *hTERT*-mRNA-Expression verhindert (Abb. 3.6.2 B). Ähnliche Ergebnisse wurden durch Behandlung mit Golgicid A erreicht (Daten nicht gezeigt). Diese Substanz inhibiert den anterograden und retrograden Transport des Golgi-Apparats. Auch hier bewirkt der Inhibitor einen reduzierten Ceramid-Transport zur Inklusion und eine Verringerung der *C. trachomatis*-induzierten *hTERT*-mRNA-Expression.

A





**Abbildung 3.6.2 | Blockierung des Ceramid-Transports in IMR90E1A-Zellen inhibiert die verstärkte *hTERT*-Genexpression der frühen *Ctrl*-Infektion.** Vorderseite: **(A)** Infizierte und nicht infizierte Zellen (24 h *p.i.*) wurden für 16 h mit Brefeldin A (BFA, 1 µg/ml) behandelt. Die Zellen wurden mit BSA-komplexiertem NBD-C6-Ceramid inkubiert (grün). Nuclei und Inklusionen wurden mit Hoechst (blau) gefärbt. Der zelluläre Transport des NBD-C6-Ceramid wurde mittels Lebendzell-Mikroskopie verfolgt. Die Bilder wurden zum Zeitpunkt 80 min nach Zugabe des markierten Ceramids aufgenommen. Der Maßstab entspricht 20 µm. **(B)** qRT-PCR-Analyse der relativen *hTERT*-mRNA-Expression (normalisiert auf *GAPDH*) *Ctrl*-infizierter (+) und nicht infizierter (-) IMR90E1A-Zellen 24 h *p.i.* mit (+) und ohne (-) BFA-Behandlung (1 µg/ml) zeigt die Abhängigkeit der *hTERT*-Expression vom Ceramid-Transport. Die Balken repräsentieren den Mittelwert der normalisierten x-fachen Veränderung mit Standardfehler (SE) und Signifikanzniveau (\*\*  $p < 0,01$ ). **(C)** Die Rekrutierung des Ceramids zur Inklusion ist durch die BFA-Behandlung signifikant inhibiert. Die Quantifizierung des Mittelwerts (mit Standardfehler SE) der Ceramid-Fluoreszenzintensität pro Inklusion wurde von 100 unbehandelten und 92 BFA-behandelten *Ctrl*-infizierten Zellen vorgenommen und auf die nicht infizierte und nicht behandelte Kontrolle normalisiert.

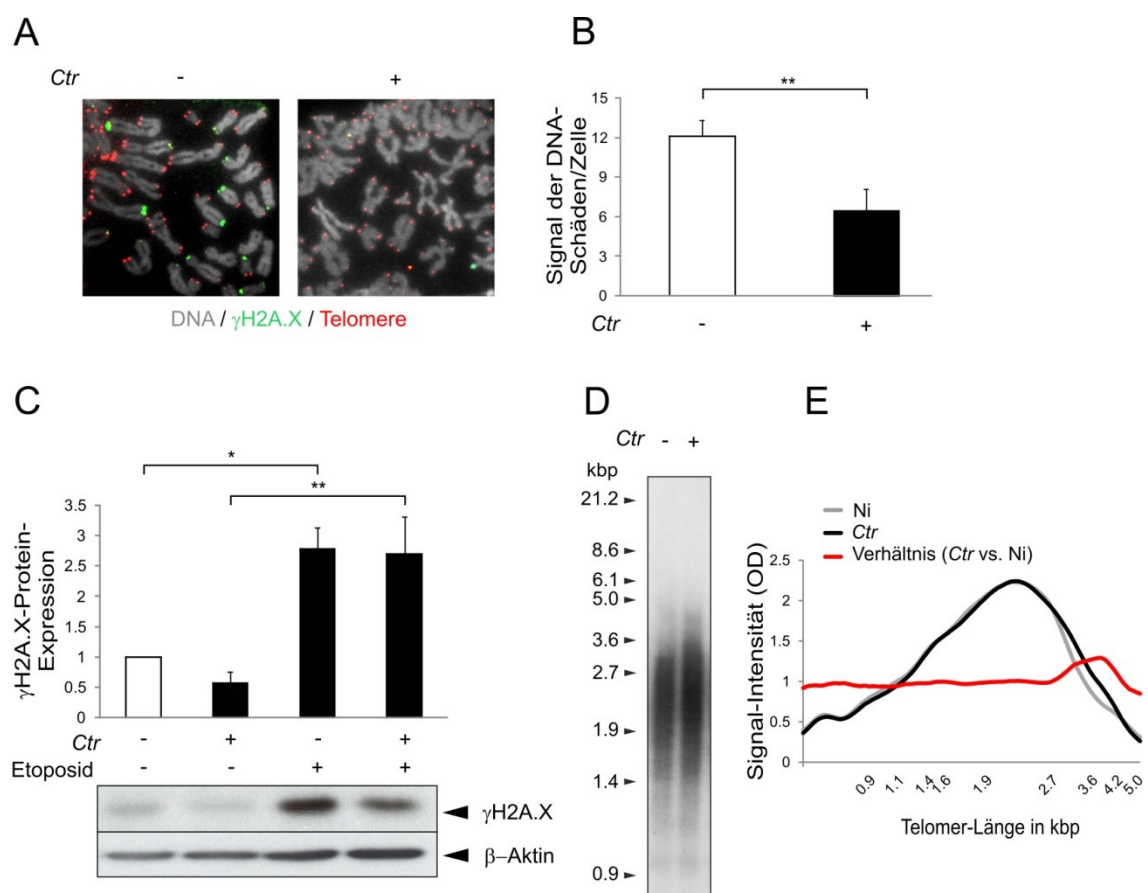
### 3.6.3 Reduktion von DNA-Schäden an Telomerenden

Telomerenden differenzierter Zellen verkürzen sich aufgrund einer verminderten *hTERT*-Expression von Zellteilung zu Zellteilung [464]. Die DNA-Schäden offener Telomerenden initiieren eine spezifische Zellantwort. Dabei kommt es zur Akkumulation von DNA-Schäden, hauptsächlich in Form von Fusionen und Brüchen der Chromosomenenden [62, 465]. Um potenzielle Effekte der *C. trachomatis*-Infektion auf die telomere Stabilität zu bestimmen, wurde das Vorkommen von zellulärem Phospho-H2A.X ( $\gamma$ H2A.X) – einem Marker für DNA-Schäden – untersucht. Nicht infizierte und *C. trachomatis*-infizierte IMR90E1A-Zellen wurden mit Hilfe des Antibiotikums Doxycyclin von der akuten Infektion befreit und acht Tage *p.i.* analysiert. Dafür wurde die Verteilung der Metaphase-Chromosomen mikroskopisch bestimmt (Abb. 3.6.3 A). Die Telomere wurden mit einer Telomer-spezifischen PNA(*peptide nucleic acid*)-Sonde gegengefärbt [278]. Waren die Telomere stark verkürzt und wiesen DNA-Schäden auf, konnte nur selten eine gleichzeitige Bindung der Telomer-spezifischen Sonde und des  $\gamma$ H2A.X-Antikörpers beobachtet werden (Abb. 3.6.3 A). Die Auszählung der  $\gamma$ H2A.X-Signale an den Telomerenden der Chromosomen ergab, dass das DNA-Schäden-Signal ursprünglich infizierter Zellen signifikant reduziert ist.

Dieses Phänomen der verringerten Anzahl an telomeralen DNA-Schäden sowie die Beobachtung der verstärkten *hTERT*-Expression akut infizierter Zellen weist darauf hin, dass die Infektion Zellen mit einer erhöhten telomeren Stabilität hervorbringt (Abb. 3.6.3 B). Auch Western Blot-Untersuchungen weisen auf ein geringeres  $\gamma$ H2A.X-Proteinlevel hin, wenn die Zellen von einer

Infektion befreit wurden. Werden hingegen zelluläre DNA-Schäden durch Etoposid-Gabe induziert, kommt es zur erhöhter  $\gamma$ H2A.X-Proteinmenge, die in ehemals infizierten und nicht infizierten Proben einander entspricht (Abb. 3.6.3 C). Des Weiteren zeigen Southern Blots einen leichten Anstieg der Telomerlänge nach Doxycyclin-bereinigter *C. trachomatis*-Infektion verglichen mit nicht infizierten IMR90E1A-Zellen. Die Berechnung des Verhältnisses der Telomerlänge beider experimenteller Bedingungen macht einen Unterschied bei langen Telomerenden (3-4 kbp) deutlich (Abb. 3.6.3 D und E).

Die Ergebnisse der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung, des Telomerlängen-Assay und der  $\gamma$ H2A.X-Immunblot-Auswertungen verweisen auf eine Reduktion der  $\gamma$ H2A.X-Signalantwort auf DNA-Schäden an Telomerenden von infektionsbereinigten Zellen.



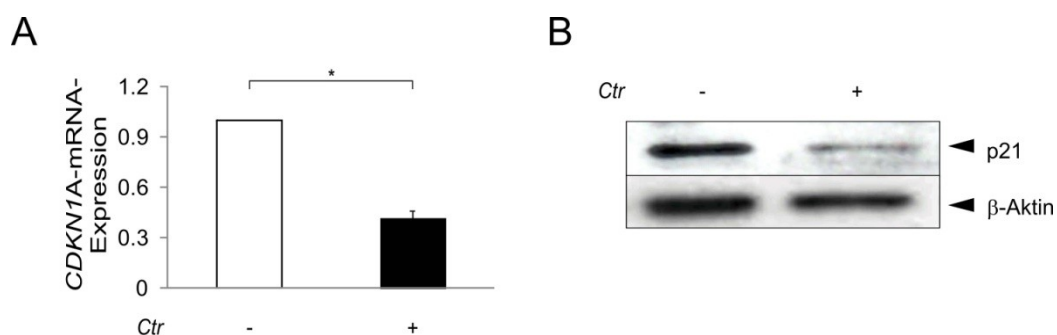
**Abbildung 3.6.3 | Reduktion der telomeren  $\gamma$ H2A.X-Signalantwort auf DNA-Schäden in infektionsbereinigten Zellpopulationen.** IMR90E1A-Zellen wurden nicht (-) oder *Ctrl*-infiziert (24 h *p.i.*, MOI 1) und mit Doxycyclin (75 ng/ml) für weitere 7 Tage behandelt und 8 d *p.i.* analysiert. **(A)** Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung von Metaphase-Chromosomen der Zelle. Die Telomere wurden mit einer spezifischen PNA-Sonde (rotes Signal) markiert, DNA-Schädigungen mit  $\gamma$ H2A.X-Antikörper (grün) angefärbt. [Mitarbeit von IPA] **(B)** Die Quantifizierung von DNA-Schäden ( $\gamma$ H2A.X) in infizierten IMR90E1A-Zellen und Kontroll-Populationen bestätigt die mikroskopischen Beobachtungen: Nach ausgeheilter *Ctrl*-Infektion kommt es zu weniger DNA-Schäden. [IPA] **(C)** Western Blot der  $\gamma$ H2A.X-Signalintensität in nicht infizierten und ehemals infizierten Zellen, mit und ohne Etoposid-Induktion für 5 h. Die Intensität ist auf die nicht infizierte Kontrolle ohne Etoposid-Induktion normalisiert. Die Balken zeigen den Mittelwert der biologischen und technischen Replikate mit Standardfehler

(SE) und Signifikanzniveau (\*  $p < 0,05$ ). **(D)** Enzymatisch verdaute DNA wurde durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und einer Southern-Blot-Analyse mit einer Sonde spezifisch für humane Telomere unterzogen. Längere Telomerabschnitte sind in Kontrollzellen unterrepräsentiert. **(E)** Signalintensitäten (OD) der Telomerlängen zwischen 0 und 5 kbp von Kontrollzellen (graue Linie) und ehemals *Ctr*-infizierten Zellen (schwarze Linie) wurden bestimmt und in Bezug auf das gesamte Telomersignal normalisiert. Das Verhältnis (rote Linie) zwischen normalisierter ehemals *Ctr*-infizierter und nicht infizierter Probe (Ni) verweist auf einen Unterschied bei längeren Telomeren (3-4 kbp).

### 3.6.4 Reduzierte p21-Expression

Das vom *CDKN1A*-Gen kodierte p21-Protein ist eine der wichtigsten molekularen Komponenten der zellulären Stress-Signalverarbeitung. Als Reaktion auf DNA-Schäden verursacht es Zellzyklusarrest, der in seneszenten Zellen permanent sein kann [466]. IMR90E1A-Zellen, die von einer *C. trachomatis*-Infektion geheilt sind, zeigen eine reduzierte zelluläre Antwort auf DNA-Schäden – folglich sollte nun untersucht werden, ob auch p21 bzw. *CDKN1A* in diesen Zellen differenziell reguliert ist. Dabei zeigt sich, dass von chlamydialen Inklusionen befreite Zellen (8-10 d *p.i.*) im Vergleich zur nicht infizierten Kontrolle eine 3-fach reduzierte *CDKN1A*-mRNA-Expression aufweisen (Abb. 3.6.4 A). Diese Beobachtung entspricht weiteren Untersuchungen auf Proteinebene: Western Blots zeigen für p21 eine deutliche Reduktion als Folge der geheilten Infektion (Abb. 3.6.4 B). Im Gegensatz dazu ist die p21-mRNA-Expression in akut infizierten Proben (24 h *p.i.*) 3-fach erhöht (Daten nicht gezeigt).

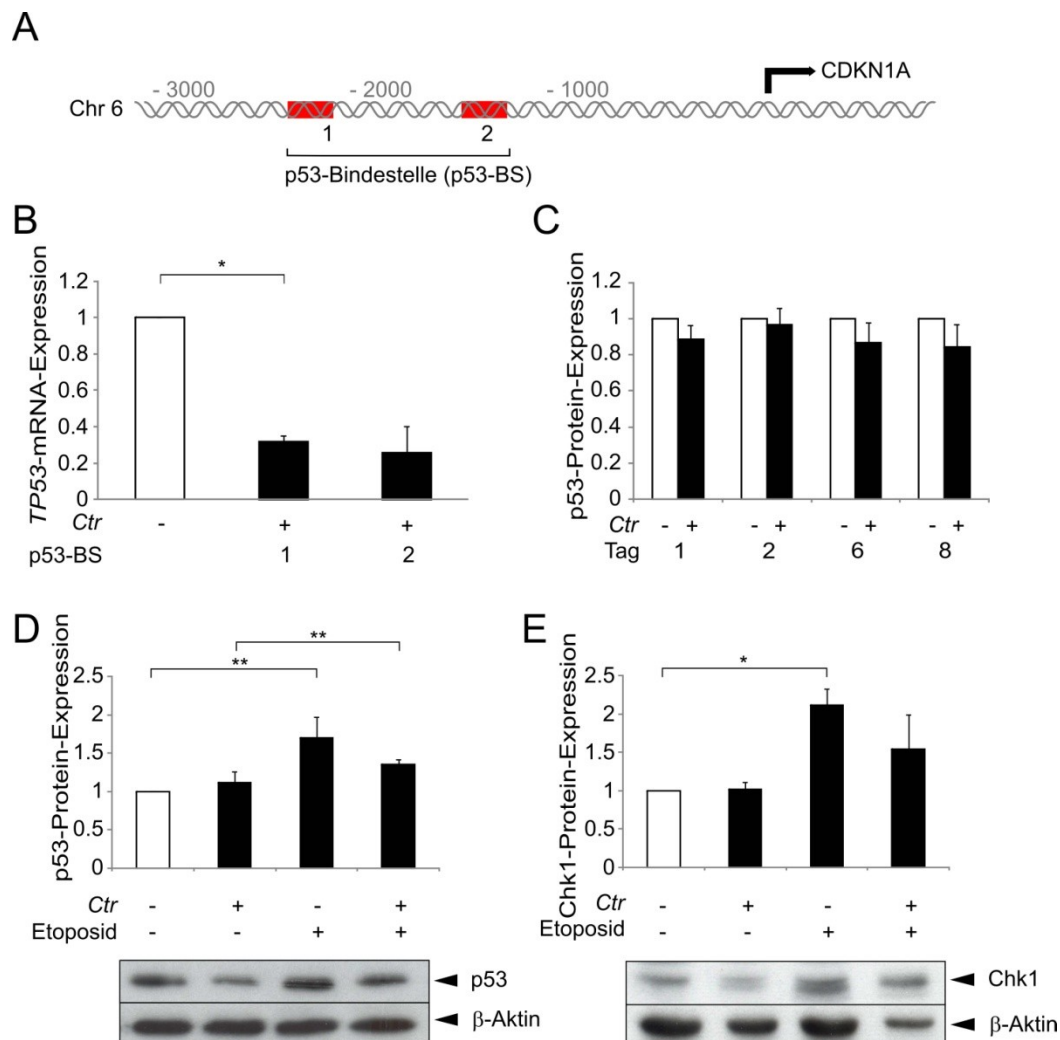
Die *CDKN1A*-mRNA-Expression, die vom Stress- und DNA-Schäden-Marker p53 aktiviert wird, ist nach geheimer *C. trachomatis*-Infektion reduziert und zieht eine verminderten p21-Expression nach sich.



**Abbildung 3.6.4 | Verminderte p21-Expression in Zellen, die von einer *Ctr*-Infektion geheilt wurden.** *CDKN1A*-mRNA- und Protein-Expression in IMR90E1A-Zellen, nicht infiziert (-) oder mit 75 ng/ml Doxycyclin-eliminierter *Ctr*-Infektion (10 d *p.i.*, MOI 1). **(A)** Die Expression der *CDKN1A*-mRNA wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Die *CDKN1A*-mRNA-Werte wurden (auf *GAPDH* normalisiert) relativ zur nicht infizierten Kontrolle dargestellt. Die Balken stellen den Mittelwert der Replikate mit Standardfehler (SE) und Signifikanzniveau (\*  $p < 0,05$ ) dar. [IPA] **(B)** Immunblot der p21-Protein-Expression im Vergleich zur  $\beta$ -Aktin-Konzentration. [IPA]

### 3.6.5 Reduktion der p53-Bindung an den *CDKN1A*-Promotor

DNA-Schäden, wie sie durch die Verkürzung der Telomere entstehen, vermitteln die p53-Aktivierung sowie die Akkumulation von p53 in der Zelle [467]. Zudem ist p53 einer der wichtigsten *trans*-Aktivatoren der *CDKN1A*-Transkription [468, 469]. Da Zellen, die von einer *C. trachomatis*-Infektion bereinigt wurden, ein reduziertes *CDKN1A*-mRNA- bzw. p21-Protein-Niveau aufweisen, sollte die p53-Bindung an zwei der *CDKN1A*-Promotor-Bindestellen untersucht werden. Fixierte DNA-Protein-Komplexe wurden bei der Chromatin-IP mit Hilfe eines p53-Antikörpers angereichert (10 d *p.i.*). Die aufkonzentrierten p53-bindenden DNA-Sequenzen wurden mittels qRT-PCR spezifisch für die beiden p53-Bindestellen im Promotor amplifiziert (Abb. 3.6.5 A). Dabei zeigt sich, dass die Bindung des Transkriptionsfaktors p53 an den *CDKN1A*-Promotor nach geheimer *C. trachomatis*-Infektion reduziert ist (Abb. 3.6.5 B).



**Abbildung 3.6.5 | Die p53-Bindung an den *CDKN1A*-Promotor ist nach Beseitigung der *C. trachomatis*(*Ctrl*)-Infektion reduziert. Etoposid-induzierte DNA-Schäden bewirken die Aktivierung der p53- und Chk1-mRNA-Expression, die in ursprünglich infizierten Zellen vermindert ist. Vergleich von nicht infizierten (-) und von der *Ctrl*-Infektion (MOI 1, +) mittels Doxycyclin (75 ng/ml, 24 h *p.i.*) geheilten IMR90E1A-Zellen (10 d *p.i.*). (A) Schematische Darstellung des down- und upstream-Bereichs der *CDKN1A*-Transkriptionsstartstelle (Pfeil). Die**

rot unterlegten Bereiche symbolisieren die Position der beiden untersuchten p53-Transkriptionsfaktor-Bindestellen, die bei der qRT-PCR-Analyse amplifiziert werden. **(B)** Protein-DNA-Komplexe wurden der Chromatin-Immunpräzipitation mit einem p53-spezifischen Antikörper unterzogen. Die Bindung von p53 an die CDKN1A-Promotor-Bindestellen wurde durch qRT-PCR spezifisch für die p53-Bindestellen (p53-BS 1 oder 2) quantifiziert. Das p53-mRNA-Level wurde auf GAPDH-mRNA normalisiert und die Daten relativ zur Kontrolle dargestellt. Der Mittelwert aller Replikate bezieht sich auf die unspezifische IgG-Kontrolle (Fehlerbalken +/- SE, \*  $p < 0,05$ ). **(C)** Quantifizierung des p53-Proteinlevels: Immunblot der p53-Protein-Expression ursprünglich infizierter IMR90E1A-Zellen (schwarze Balken) im Vergleich zu nicht infizierten Zellen (weiße Balken). Die Daten wurden auf die Ladekontrolle  $\beta$ -Aktin normalisiert und der Mittelwert sowie Fehlerbalken (+/- SE) dargestellt. **(D)** Western Blot zur Analyse des p53-Proteinsignals in nicht infizierten und von der akuten *Ctr*-Infektion geheilte IMR90E1A-Zellen mit (+) und ohne (-) Etoposid-Behandlung (5 h, 100  $\mu$ M). Die photometrische Quantifizierung zeigt den Mittelwert (+/- SE) der biologischen Replikate (\*  $p < 0,05$ ). Es konnte eine geringe Abreicherung des p53-Niveaus nach Bereinigung der Zellen beobachtet werden. **(E)** SDS-PAGE-Analyse des Chk1-Proteinsignals in nicht infizierten und von der *Ctr*-Infektion bereinigten IMR90E1A-Zellen mit (+) und ohne (-) Etoposid-Behandlung (5 h, 100  $\mu$ M). Die photometrische Quantifizierung zeigt den Mittelwert (+/- SE) der biologischen Replikate (\*  $p < 0,05$ ). Nach Etoposid-Gabe konnte ein moderater Abfall des Chk1-Levels der infektionsbereinigten Zellen beobachtet werden.

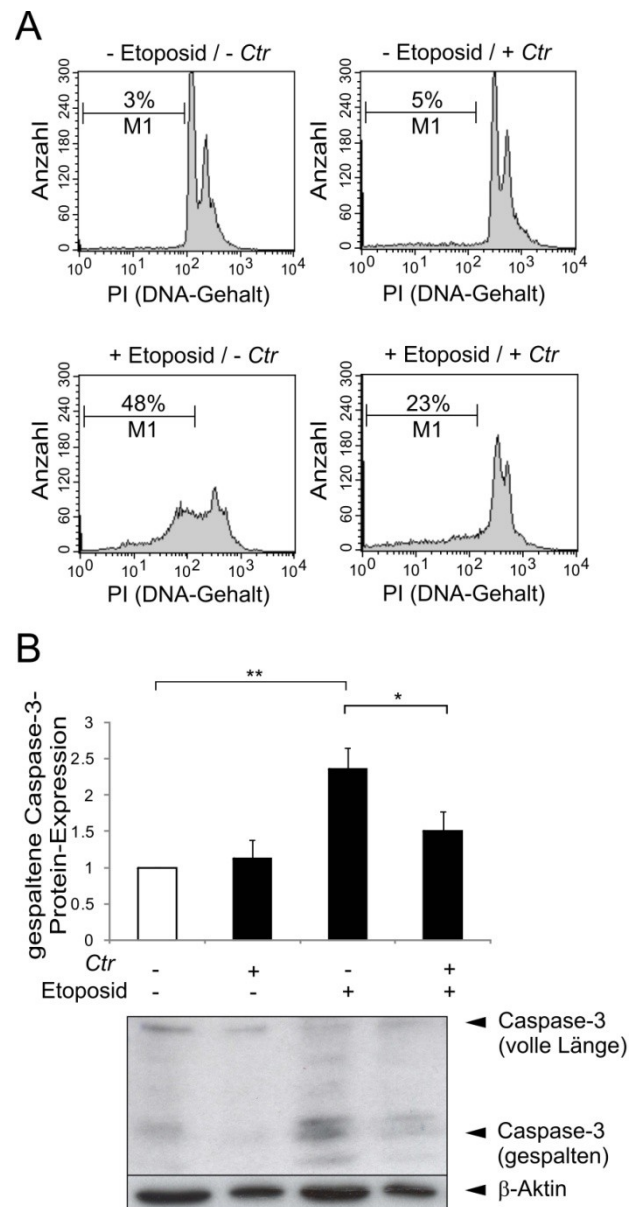
Immunblot-Experimente von Proben unterschiedlicher Infektionszeitpunkte zeigen keinen Unterschied des p53-Proteinniveaus von Kontrolle und bereinigter Infektion, dies kann somit die starke Abreicherung der p53-Bindung an den *CDKN1A*-Promotor nicht erklären (Abb. 3.6.5 C). Demnach weisen die ehemals infizierten Zellen eine verringerte Bindung des p53-Proteins an den *CDKN1A*-Promotor auf, wobei das zelluläre p53-Proteinlevel konstant bleibt. Immunblot-Analysen zeigen, dass Chk1 (*cell cycle checkpoint kinase 1*) durch Etoposid-induzierte DNA-Schäden aktiviert wird. Als Reaktion auf zelluläre DNA-Schäden ist diese Serin/Threonin-Proteinkinase für den Zellzyklusarrest und die Aktivierung von DNA-Reparatur-Prozessen verantwortlich. Nach Etoposid-Induktion ist das Chk1-Niveau von Zellen, die von der Infektion befreit sind, abgereichert (Abb. 3.6.5 E).

### 3.6.6 Inhibierung der Apoptose

p53 ist der wichtigste Modulator der zellulären Reaktion auf Stresssignale wie z.B. die Schädigung der genomischen DNA. Abhängig vom Zusammenhang und spezifischen Auslöser kann das p53-Protein zu Veränderungen im Zellzyklusablauf, der Apoptose oder Seneszenz beitragen [465, 470]. Um der Frage nachzugehen, ob von der *C. trachomatis*-Infektion bereinigte Zellen anders auf DNA-Schäden-induzierte Apoptose reagieren, wurden die Wirtszellen mit Etoposid behandelt.

In Übereinstimmung mit Beobachtungen anderer Autoren [471] induziert p53 die Aktivierung der p53-abhängigen Apoptose (Abb. 3.6.5 D). Ohne Etoposid-Behandlung ist die Apoptoserate der untersuchten Proben unabhängig der vorangegangenen Infektion gering (3-5 %, Abb. 3.6.6 A oben). Allerdings zeigen ehemals *C. trachomatis*-infizierte Zellen eine bis zu 2-fach gesteigerte Apoptoseresistenz gegenüber Etoposid: FACS-Analysen mit dem Nukleinsäureinterkalator Propidiumiodid (PI) ergeben in Etoposid-behandelten, nicht infizierten Zellen eine Apoptoserate von bis zu 48 %, wohingegen diese in ursprünglich infizierten Zellen stark abnimmt (23 %) (Abb. 3.6.6 A unten). Bestätigt wird die Etoposid-induzierte Apoptose mittels Immunblot-Analyse gegen

Caspase-3. Dieser Indikator zellulärer Apoptose unterliegt der Proteolyse, bei der das Protein in eine große und kleine Untereinheit gespalten wird. Die entstehenden Untereinheiten dimerisieren und bilden das aktive Enzym, das weitere Caspasen spaltet und aktiviert [472]. Im Vergleich zur Kontrolle kommt es bei ausgeheilten *C. trachomatis*-Infektionen zur Reduktion des gespaltenen Caspase-3-Proteinlevels nach Etoposid-Stimulation (Abb. 3.6.6 B). Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass eine vorangegangene *C. trachomatis*-Infektion die Wirtszelle in gewissem Maße vor DNA-Schäden-induzierter Apoptose bewahrt.



**Abbildung 3.6.6 | Abnehmende Apoptoserate von IMR90E1A-Zellpopulationen, die von der *Ctr*-Infektion befreit wurden. (A)** FACS-Analyse von Propidiumiodid(PI)-gefärbten Zellen. Die Fluoreszenz-Emission des PI ist proportional zur DNA-Menge. Apoptotische Zellen befinden sich in der post-mitotischen Phase des Zellzyklus (sub-G1). Charakteristisch ist der breite, hypodiploide Peak, der sich deutlich vom schmalen Peak der normalen, diploiden DNA unterscheidet. Zellen wurden für 16 h mit 120  $\mu$ M Etoposid inkubiert. Das Analysefenster M1 zählt die apoptotischen Zellen (sub-G1): 23 % der anfänglich infizierten Zellpopulation sind

apoptotisch im Gegensatz zu 48 % der nicht infizierten Kontrollpopulation. [Mitarbeit von IPA] **(B)** Immunblot der Caspase-3-Spaltung. Der Caspase-3-Antikörper detektiert das endogene Level des Caspase-3-Proteins (volle Länge, 35 kDa) und des langen gespaltenen Fragments (17 kDa). Die Quantifizierung der Caspase-3-Spaltung relativ zur Gesamtproteinmenge ist als Mittelwert der Replikate mit Standardfehler und Signifikanzniveau (\*  $p < 0,05$ ) dargestellt.

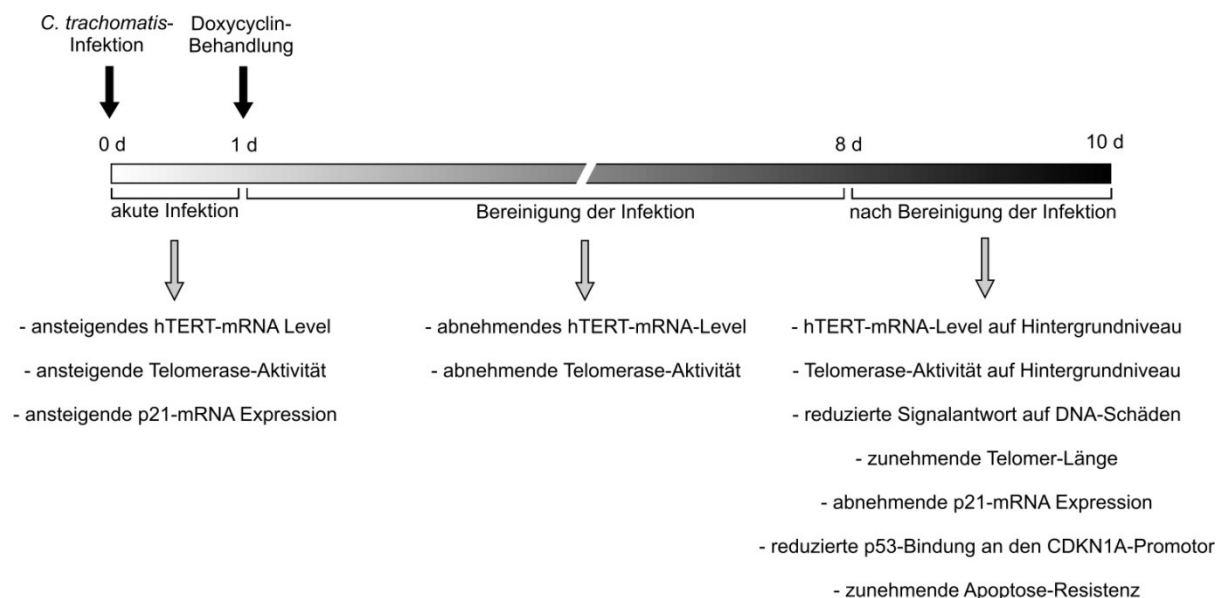
Hill *et al.* postulieren, dass Zellen während des Zellzyklusarrest und einer gesteigerten p21-Regulation vor Apoptose geschützt sind [473]. Die hier beobachtete Reduktion der p21-Expression verweist jedoch darauf, dass die Abnahme der Apoptose in IMR90E1A-Zellen nach kurierter *C. trachomatis*-Infektion nicht mit einem Arrest des Zellzyklus erklärt werden kann. Des Weiteren zeigt die PI-Färbung, dass die G1/G2-Zellzyklusverteilung infizierter und nicht infizierter Zellen ohne Etoposid-Behandlung ähnlich ist (Abb. 3.6.6 A). Um zu überprüfen, ob die beobachtete Abnahme der Apoptoserate nach Induktion von DNA-Schäden mit der Abnahme der p53-Stabilität in Zusammenhang steht, wurden die Konzentration der gesamten zellulären p53-Menge überprüft (Abb. 3.6.5 C und D). Nach Etoposid-Induktion ist das p53-Gesamtniveau in infektionsbefreiten und nicht infizierten Zellen ähnlich. Das Gleiche gilt für die Aktivierung von Chk1 (Abb. 3.6.5 E). Vergleichbar mit geheilten Zellen weisen akut infizierte Zellen eine signifikante Apoptosereduktion in Form einer abnehmenden Spaltung des Proteins Caspase-3 auf (Daten nicht gezeigt).



### 3.7 Diskussion: Teil III

Die hier vorliegende Studie postuliert einen Mechanismus, der das Überleben von *C. trachomatis*-infizierten Wirtszellen begünstigt. Die Proliferation einer Zelle mit geschädigter DNA-Struktur ist eine Voraussetzung für die Krebsentstehung. Durch Hemmung der Apoptose, wie sie in dieser Arbeit beobachtet wurde, können durch anhaltende Zellproliferation DNA-Schäden an Tochterzellen weitergegeben werden. Dadurch steigt das Mutationsrisiko u.a. von Tumorsuppressorgenen an und es kommt zur Einleitung der Tumorgenese.

Im frühen Stadium der Infektion aktiviert *C. trachomatis* über einen Ceramid-abhängigen Mechanismus die Expression von *hTERT* und reduziert die Zellantwort auf telomere DNA-Schäden. Des Weiteren ist eine Abnahme des globalen  $\gamma$ H2A.X-Levels nach Bereinigung der chlamydialen Infektion zu beobachten, nicht aber in akut infizierten Zellen. Die chronologische Reihenfolge der hier beobachteten Phänomene ist in Abbildung 3.7 dargestellt.



**Abbildung 3.7 | Chronologische Darstellung der *C. trachomatis*-induzierten Veränderungen im Phänotyp der Wirtszelle.** Die akute Infektion (0-1 d *p.i.*) zeichnet sich durch vermehrte *hTERT*-Expression und -Proteinaktivität sowie erhöhte p21-Expression aus. Die Infektion wird durch die Gabe des Antibiotikums Doxycyclin (75 ng/ml) langsam eliminiert (1-8 d *p.i.*). Nach Bereinigung der Infektion (8-10 d *p.i.*) kommt es im Vergleich zu nicht infizierten Zellen zur Abnahme der telomeren Signalantwort auf DNA-Schäden, zur Verlängerung der Telomere und zur Reduktion der p21-Expression, p53-Bindung an den *CDKN1A*-Promotor und Apoptose.

Bei den hier vorliegende Untersuchung konnte in akuten Infektionen keine Reduktion der zellulären Antwort auf DNA-Schäden nachgewiesen werden. Die infektionsbedingt gesteigerte Aktivität der katalytischen Untereinheit der Telomerase verhindert nachhaltig den Abbau der Telomere. Die verstärkte *hTERT*-Aktivität kann jedoch nicht die akuten DNA-Schäden verhindern, die von einer bakteriellen Infektion herrühren. Die Erzeugung reaktiver Sauerstoffspezies während der

Chlamydieninfektion kann die ausbleibende Reduktion der Zellantwort auf DNA-Schäden erklären [474, 475].

Nach Bereinigung der Infektion wurde eine reduzierte p53-Bindung an den *CDKN1A*-Promotor und die damit einhergehende Reduktion des p21-Proteinlevels beobachtet. Die *CDKN1A*-mRNA-Expression, die vom Stress- und DNA-Schäden-Marker p53 aktiviert wird, ist einige Tage nach Ausheilung der Infektion ebenfalls reduziert. Die p53-Promotorbindung könnte durch die infektionsbedingte Ausbildung einer inaktivierend wirkenden Heterochromatinstruktur verhindert werden. Die Acetylierung der Histonumgebung des *CDKN1A*-Promotors, aber auch die Methylierung der CpG-Nukleotide in diesem Bereich können die Transkriptionsfaktorbindung sterisch blockieren. Aber auch nicht-epigenetische Ursachen sind denkbar, wie z.B. die physikalische Blockade durch andere DNA-bindende Faktoren. Interessanterweise entwickelten zuvor infizierte Zellen, verglichen mit nicht infizierten Proben, eine erhöhte Resistenz gegenüber Etoposid-induzierter Apoptose. Der antiapoptotische Phänotyp ehemals infizierter Zellen ermöglicht somit Zellproliferation und prokarzinogene Bedingungen.

Das Infektionsmodell dieser Studie sind IMR90E1A-Fibroblasten, die über mehrere Passagen in Kultur gehalten werden können. Transformierte humane Zelllinien stellen nützliche Modelle für *in vitro*-Infektionsuntersuchungen dar. Eine der Schlüsselkomponenten der zellulären Immortalisierung ist die Expression der Telomerase [62]. Das Enzym ist oft dauerhaft in immortalisierten oder tumorigenen Zelllinien dereguliert. Die Expression des adenoviralen E1A-Protein macht diese Zellen besonders widerstandsfähig gegenüber der dauerhaften Unterbrechung der Proliferation, wie sie bei Alterungs- oder Seneszenz-Prozessen auftritt [454, 455, 476-478]. Allerdings reicht E1A nicht aus, um der Aktivierung von Seneszenz-Signalwegen vollständig zu entkommen [479]. Wichtig ist, dass die IMR90E1A-Zellen bei stark verkürzten Telomeren DNA-Schäden ausbilden und sensitiv auf die nachfolgende p53-Antwort reagieren. Damit stellen sie ein geeignetes Modell für die Untersuchung *C. trachomatis*-induzierter Veränderungen der Wirtszellantwort auf DNA-Schäden in alternden Zellen dar. Dennoch ist aufgrund der Expression des viralen Onkoprotein E1A, das auf die Regulation des Zellzyklus wirkt, die Proliferationskontrolle der IMR90E1A-Zellen gestört. E1A aktiviert zelluläre Schlüsselproteine, wie die Gruppe der Retinoblastoma-Proteine, die inhibitorisch auf Zyklin-abhängige Kinasen, Histonacetyltransferasen und andere Chromatinfaktoren der Zelle wirken [480]. Des Weiteren induziert E1A in IMR90E1A-Zellen die Veränderungen des Rb-Proteins und dessen Co-Faktoren – dies führt zum Eintritt in die S-Phase und zur epigenetischen Reprogrammierung der Zelle [134]. Dass der hier beobachtete Phänotyp der Apoptoseresistenz nicht zu stärkeren Unterschieden der Proliferationskapazität der Zelle führt, kann an der gestörten Funktion des Retinoblastoms liegen, das wichtig für die Inhibition des Zellzyklus ist [481, 482].

In der frühen Phase der chlamydialen Infektion (24 h *p.i.*) wurde eine gesteigerte mRNA-Expression von *hTERT* nachgewiesen. Dieses Phänomen konnte mit dem Lipid-Metabolismus der Wirtszelle assoziiert werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Inhibierung des zellulären Ceramid-Transports den Effekt der infektionsbedingt verstärkten *hTERT*-Expression aufhebt. Wie ist

dies zu verstehen? Ist eine *C. trachomatis*-Infektion etabliert, wird zelluläres Ceramid in Bakterien- und Inklusionsmembranen aktiv replizierender Bakterien inkorporiert [457]. Ceramid steht somit zur Inhibierung der *hTERT*-Expression nicht mehr zur Verfügung. Basierend darauf kann der Anstieg der *hTERT*-mRNA-Expression in der akuten Infektion erklärt werden. Während der persistenten Infektion repliziert *C. trachomatis* nicht, sodass Ceramid zur Inhibierung der *hTERT*-mRNA-Expression zur Verfügung steht. Daher kann man annehmen, dass nach der Persistenz-Induktion bzw. Befreiung der Zellen von der akuten Infektion durch Doxycyclin die Ceramid-Rekrutierung zu den Inklusionen abnimmt und die *hTERT*-Expression wieder auf das Hintergrundniveau abfällt.

Diverse Methoden weisen nach, dass es in ehemals *C. trachomatis*-infizierten Zellen zu einer Reduktion der  $\gamma$ H2A.X-Signalantwort auf DNA-Schäden an Telomerenden kommt und die Telomere weniger schnell abgebaut werden. Der Verschleiß von Telomeren alternder Zellen kann zwei widersprüchliche Auswirkungen auf die Zelle haben: Genetische Instabilität und Tumorsuppression [482]. Telomere Dysfunktion fördert die genetische Instabilität der Chromosomen [483, 484]. Eine Folge der genetischen Instabilität ist die Abnahme der Telomerlänge und die Schädigung der DNA als Folge maligner Transformationen [485-487]. Andererseits induzieren stark verkürzte Telomere DNA-Schäden, die zur Apoptose und Seneszenz führen, was wiederum die Tumorgenese hemmt. Im Laufe der Telomerverkürzung können Anaphase-Brücken und deren Brüche die genomische Umlagerung der DNA bewirken. Sind Bereiche von Tumorsuppressoren wie *TP53* oder *ATM* betroffen, kann es zum Verlust der Heterozygotie kommen [484]. Neueste Untersuchungen legen nahe, dass DNA-Schäden, die durch genomische Rearrangements an offenen Telomerenden verursacht werden, nicht repariert werden können [488]. In alternden Zellen resultieren DNA-Schäden in einer gesteigerten Apoptoserate sowie eine Abnahme der Proliferation.

Nicht nur die *hTERT*-mRNA-Expression, auch die Enzymaktivität der Telomerase wird in Folge einer *C. trachomatis*-Infektion aktiviert. Eine moderate Telomeraseaktivität ist für die Entwicklung maligner Transformationen entscheidend. Hier kommt es zu einer leichten Verschiebung der Balance zwischen telomerer Degradation und Elongation in Richtung Elongation. Die daraus resultierende moderate Reduktion der zellulären Antwort auf DNA-Schäden, verkürzte und dysfunktionale Telomere könnte die Zellen vor einem kompletten Block der Proliferation oder Apoptose bewahren. Damit wird das Risiko erhöht, dass diese Zellen weitere Mutationen akkumulieren [489]. In diesem Zusammenhang spielt die Reaktivierung der Telomerase eine entscheidende Rolle, um apoptotische und proliferatorische Blockaden zu überwinden und die maligne Entwicklung zu unterstützen [490].

Um das Phänomen der Telomerstabilisierung und die veränderte Zellantwort auf DNA-Schäden genauer zu untersuchen, wurde die Rolle weiterer Schlüsselproteine der Antwort auf DNA-Schäden (*DNA damage response*, DDR), wie H2A.X und Chk1 auf Proteinebene untersucht.  $\gamma$ H2A.X-Immunblot-Analysen zeigen eine geringere Proteinkonzentration, wenn die Zellen zuvor infiziert wurden (p-Wert = 0,07). Das könnte eine globale Reduktion der DDR darstellen, da sich das  $\gamma$ H2A.X-Signal spezifisch an den Telomerenden von Metaphasechromosomen verändert. Derartige Modifikationen finden auch während der normalen Replikation statt, wenn es versehentlich zu Brüchen in der Replikationsgabel kommt [491]. In der akuten Infektion erwartet man aufgrund des

Anstiegs reaktiver Sauerstoffspezies eine Zunahme des  $\gamma$ H2A.X-Signals [474, 475]. Da dies in späten Passagen der IMR90E1A-Zellen nicht der Fall ist, kann es möglich sein, dass die erhöhte hTERT-Aktivität dem entgegenwirkt. Ähnliche Ergebnisse lieferten Protein-Quantifizierungen der zellulären Ser/Thr-Proteinkinase Chk1. Immunblot-Analysen zeigen, dass die Chk1-Konzentration durch Etoposid-induzierte DNA-Schäden erhöht wird. Dieses Enzym vermittelt die Aktivierung von DNA-Reparatur-Prozessen und Zellzyklusarrest, sobald DNA-Schäden oder unreplizierte DNA detektiert wird. Die Zellantwort auf Doppelstrang-DNA-Brüche bewirkt die gezielte Phosphorylierung der CDC25-Protein-Phosphatasen durch Chk1, was einen Zellzyklusarrest veranlasst. Das Chk1-Proteinsignal nimmt in der Etoposid-induzierten Probe stark ab, wenn diese zuvor von einer *C. trachomatis*-Infektion befreit wurde. Eine initiale Infektion schützt die Zellen somit vor einer Zellzyklus-Blockade und reduziert die Signalantwort auf DNA-Schäden.

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass  $\gamma$ H2A.X als Indikator für DNA-Schäden in IMR90E1A-Zellen im gesamten Zellkern insbesondere an den Telomerenden von Metaphasechromosomen reduziert vorliegt, wenn eine *C. trachomatis*-Infektion vorausgegangen ist. Solch eine Reduktion von DNA-Schäden ermöglicht den Zellen eine Zunahme an mitotischen Teilungen, bevor es zu alterungsassoziierten DNA-Schäden kommt, die wiederum zelluläre Apoptose induzieren. Verdun *et al.* beobachten, dass es im Anschluss an die Replikation während der G2-Phase des Zellzyklus auch zu  $\gamma$ H2A.X-Signalen an funktionalen Telomeren kommt [492]. Während der Metaphase signalisiert  $\gamma$ H2A.X an den Enden der Telomere, das diese kurz, ungeschützt oder beschädigt sind [17, 488, 493-496].

Die erhöhte hTERT-Expression im verwendeten Modell ist transient und kann nur in der frühen Phase der Infektion beobachtet werden. Wie kann die Hochregulation zum Zeitpunkt 24 h *p.i.* langfristig zu telomeren Dysfunktionen beitragen? Die hier dargestellten Ergebnisse legen die Hypothese nahe, dass *C. trachomatis*-Infektionen zur mangelhaften Antwort auf DNA-Schäden führen. Mechanistisch ist dieses Phänomen u.a. durch die Verlängerung der Telomere zu erklären. Die hier beschriebene mäßige Stabilisierung der Telomerlänge als Resultat einer *C. trachomatis*-Infektion kann die reduzierte Signalantwort auf DNA-Schäden nur partiell erklären. Ein Kennzeichen vieler Krebsarten ist die erhöhte Länge der Chromosomen. Dennoch zeigen Studien, dass unabhängig von der Telomerlänge eine konstitutive Überexpression von hTERT maligne Transformationen erleichtert [497]. Entgegen der Erwartungen werden bei Krebs, auch wenn die Telomeraseaktivität ausbleibt, Chromosomen mit stark verlängerten heterogenen Telomeren beobachtet [498].

Gleichwohl verändert hTERT die zelluläre Antwort auf DNA-Schäden. Ein denkbarer Mechanismus stellt die Veränderungen der Chromatinstruktur dar, die über mehrere Zellteilungen hinweg auch zu malignen Transformation beitragen kann. Veränderungen der Chromatinstruktur des hTERT-Promotors könnten durch eine Infektion mit *C. trachomatis* verursacht werden. Eine offene Struktur ermöglicht die Gentranskription von hTERT, wenn weitere Repressoren ausgeschlossen werden können. Mögliche Mechanismen stellen Chromatin-Modifikationen wie Acetylierung und Phosphorylierung, aber auch DNA-Methylierung dar, die epigenetisch an die Tochterzellen

weitergegeben werden. Interessanterweise ist auch ein Rückkoppelungsmechanismus denkbar, bei dem hTERT selbst zur Modellierung der Chromatin-Architektur führt und somit für seine eigene Regulation verantwortlich ist [499].

Abnehmende Signale von DNA-Schäden, wie sie hier bereits einige Tage nach Beseitigung einer *C. trachomatis*-Infektion beobachtet wurden, können den Schwellenwert einer Apoptoseinduktion erhöhen und zur Inhibition des programmierten Zelltodes beitragen.

Die Regulation der p53-Aktivität als Reaktion auf DNA-Schäden ist überaus komplex und beinhaltet ein weites Spektrum posttranslationaler Modifikationen, welche die Expression der p53-Zielgene deutlich lenken. Die Bindung von DNA- und Protein-Komplexen sowie die Konformation und Lokalisation von Proteinen wird, unabhängig vom p53-Niveau, durch verschiedenartige Modifikationen beeinflusst. Modifiziert wird die p53-Aktivität durch die Phosphorylierung von Serinen und/oder Threoninen und Acetylierung, Ubiquitinylierung und SUMOylierung von Lysin-Resten [500]. Mutante p53-Proteine zeigen in der Regel intensive Phosphorylierung und Acetylierung an Stellen, die bekannt dafür sind, p53 im Normalfall zu stabilisieren. Damit wird die Anhäufung des dysfunktionellen mutierten p53 im Zellkern erleichtert [500].

Das p53-Level ist nach Etoposid-Behandlung nur gering reduziert. Die Infektion mit *C. trachomatis* verändert den Wirtszellmetabolismus so, dass es unter anderem zur Aktivierung der Deacetylase Sirtuin 1 (Sirt1) kommt. Ihre Expression ist in Alterungsprozesse der Zelle involviert und nimmt mit zunehmender Zeit ab [501]. Sirt1 reguliert die p53-Aktivität, indem es die p53 Acetylierung hemmt, die p53 stabilisiert und aktiviert. Apoptose und Seneszenz werden nicht induziert und die Lebensdauer der Zelle erhöht [502, 503]. Während der zellulären Seneszenz kommt es über Sirt1 zur Hemmung der p53-Aktivität und damit zur Tumorsuppression [51]. Ist das p53-Level nach Etoposid-Behandlung nur gering reduziert, könnte dies mit einer inaktivierenden Wirkung der Deacetylase assoziiert sein. Die Inaktivierung von p53 über dessen Deacetylierung bewirkt eine abnehmende Apoptoserate.

Die Gabe von Etoposid kann auch in ehemals *C. trachomatis*-infizierten Wirtszellen DNA-Reparaturprozesse aktivieren, die einen p53-abhängigen Zellzyklusarrest initiieren. Aber auch Reparaturprozesse der DNA können fehleranfällig sein, was das Risiko maligner Transformationen weiter erhöht [504]. Antibiotika-behandelte, von der Infektion befreite Zellen, die die Etoposid-Behandlung überstehen, können aufgrund fehlerhafter DNA-Reparaturprozesse Punktmutationen akquirieren. Besonders verhängnisvoll sind die Auswirkungen auf den Organismus, wenn aufgrund einer *C. trachomatis*-Infektion die transformierten Wirtszellen nicht dem Zellzyklus-Stopp unterworfen sind und weiter proliferieren, was die Basis für ein unkontrolliertes Zellwachstum bildet.

ChIP-Experimente zeigen, dass eine vorausgehende *C. trachomatis*-Infektion unabhängig vom gesamten p53-Niveau eine reduzierte Bindung von p53 an den p21-Promotor zur Folge hat. Diese abnehmende Promotor-Assoziation kann einige Zeit nach der Induktion von DNA-Schäden den Wiedereintritt in den Zellzyklus erleichtern. Besonders in Hinblick auf DNA-Schäden erfordert es weitere Untersuchungen zu späteren Zeitpunkten nach Infektion, um den Mechanismus der

unterdrückten Apoptose und potenziellen Veränderung des Zellzyklus und der Proliferation zu untersuchen. Bislang mangelt es an fundierten Langzeitexperimenten, um die Hypothese der verlängerten Lebensdauer zu untermauern. Dafür würde sich die Infektion und anschließende Heilung der nicht transformierten parentalen Zelllinie IMR90 eignen, die der replikativen Seneszenz unterworfen ist. In Langzeitexperimenten könnte untersucht werden, ob die *C. trachomatis*-Infektion bei einer konstant gesteigerten Regulation von hTERT die Anzahl der Zellpassagen erhöht. Diese Untersuchung ist wichtig, um die biologische Relevanz der beobachteten Effekte weiter zu untermauern. Leider ist dieses Experiment schwer realisierbar, da die untransformierten Lungenfibroblasten bis zu 50 Passagen benötigen, um ins Stadium der Seneszenz überzutreten. Ein Vergleich über einen langen Zeitraum ist somit kritisch, da die Wachstums- und Kultivierungskonditionen mit der Zeit in den zu vergleichenden experimentellen Bedingungen divergieren könnten. Langzeitexperimente sollten kontinuierliche Reinfektionen [505], bevorzugt von Primärgewebe, einschließen. Kessler *et al.* publizierten ein zweckdienliches *ex vivo*-Infektionsmodell humaner Eileiter-Proben [506]. Solche Infektionsmodelle, die den natürlichen Bedingungen im Patienten sehr nahe kommen, sollten die hier beschriebenen Beobachtungen rekapitulieren.

FACS-Analysen präsentieren eine gesteigerte Zellproliferation und abnehmende Apoptoserate von IMR90E1A-Zellpopulationen, die mittels Doxycyclin von einer *C. trachomatis*-Infektion befreit wurden. Die Verkürzung von Telomeren beeinträchtigt die Proliferation transformierter Zellen, führt aber auch zur Initiation von Krebs, indem chromosomale Instabilität induziert wird. Die schützenden Shelterin-Komponenten unterdrücken illegitime Rekombination und DNA-Reparatur an den Chromosomenenden. Zusätzlich kommt den Telomeren eine sensorische Rolle zu – sie erkennen unpassende Replikationssignale wie die Onkogen-Aktivierung [507].

Zusätzlich zur gesteigerten Proliferation erinnert die Veränderungen der zelluläre Homöostase während einer *C. trachomatis*-Infektion in mehreren Punkten an Krebs [5]. Während der akuten Infektion induziert *C. trachomatis* einen antiapoptotischen Phänotyp der Wirtszelle [508-511], aktiviert präkanzeröse Signalwege einschließlich Erk (*extracellular signal-regulated kinase*) [512, 513], PI3K (*phosphatidylinositol-3 kinase*) [514] und  $\beta$ -Catenin sowie Komponenten des Wnt(*wingless-type MMTV integration site family*)-Signaltransduktionswegs [506]. Außerdem werden die Amplifikation der Zentrosomenzahl [515] sowie chromosomale Aberrationen induziert, die auch nach der Antibiotika-vermittelten Beseitigung der Infektionserreger in der Wirtszelle bestehen bleiben [516].

Replikative Zellalterung ist eng mit der Länge der chromosomalen Telomere verknüpft [517]. Damit verbunden ist auch die differenzielle Genexpression von Komponenten der DNA-Reparatur-Maschinerie. Altern und Methylierungsveränderung stehen im Zusammenhang mit der Prävalenz zur Krankheits- und Krebsentstehung. Das Altern an sich stellt das höchste Risiko einer Krebserkrankung dar [518]. Unlängst veröffentlichten Hannum *et al.* ein Alters-Methylom [519], das eine erhöhte Alterungsrate in Tumorgeweben aufzeigt und demonstriert, dass altersassoziierte Veränderungen des Methyloms mit der Zeit zu Veränderungen des Transkriptionsmusters führen.

Die vorliegenden Daten zeigen, dass die *C. trachomatis*-Infektion über die vermehrte Expression von hTERT zur Entstehung von Tumoren beiträgt, indem sie Signalwege des Wirts stört und die Zelle vor DDR-induzierter Apoptose schützt. Damit tragen diese Transformationen zum Überleben genetisch instabiler Zellen bei. Außerdem kann auch das Überleben der Zellen, die *C. trachomatis*-induzierte DNA-Schäden tragen, erleichtert werden. Besonders bei chronischen, unbehandelten Infektionen *in vivo* kann dieses Phänomen schwerwiegende Folgen haben. Auch die Reinfektion solcher Zellen bzw. der Infekt ursprünglich infizierter Tochterzellen kann zur folgeschweren Akkumulation von Schäden beitragen. Einige Zeit nach der Bereinigung der Infektion kann eine Störung der p53-abhängigen p21-Expression die Wirtszellproliferation erhöhen und damit eine Grundlage für eine erfolgreiche Reinfektion liefern. Das kann entscheidend zum Überleben der Chlamydien *in vivo* beitragen. Insbesondere in Situationen, in denen Chlamydien in das Stadium der Persistenz übergehen, verbessert die erhöhte Zellteilung und Inhibition der Wirtszell-Seneszenz die Bedingungen für eine reaktivierte Infektion. *In vivo* werden sich wiederholende Reinfektionen häufig bei chlamydialen Infektionen beschrieben [520] und können im gewissen Maße auch in dem hier verwendeten *in vitro*-Infektionsmodell vorkommen.

Primär sind HPV-Infektionen die Ursache einer Zervixkarzinom-Entwicklung [521, 522]. Dennoch wurde *C. trachomatis* im Zusammenhang mit Gebärmutterhalskrebs bzw. mit persistierenden karzinogenen HP-Viren assoziiert [523]. Das Risiko einer zervikalen Krebsentstehung nimmt mit einer *C. trachomatis*-Infektion stetig zu [524]. Ob das Pathogen allein auch zur Tumorgenese beitragen kann, müssen künftige Studien klären. Die Etablierung neuartiger *in vitro*-Reinfektionsmodelle bzw. viraler Co-Infektionsmodelle, vorzugsweise von Primärzellen, würde die Forschungsarbeit an klassischen Seneszenz-Signalwegen bereichern. Auch die epidemiologische Assoziation der chlamydialen Infektion in Verbindung mit Krebsentstehung, besonders im Zusammenhang mit viralen Co-Infektionen, könnte damit weiter aufgeklärt werden.

### 3.8 Fazit und Ausblick

Das Zusammenspiel von Wirtsorganismus und infektiösem Agens bestimmt das Ausmaß einer Infektionskrankheit. Eine mikrobielle Attacke manipuliert u.a. die Immunantwort, den Zelltod, das Überleben sowie die Adhäsion und Motilität der Wirtszelle. Infektionserregern stehen dabei diverse Strategien zu Verfügung: Eine bislang wenig untersuchte ist die der epigenetischen Modifikation. Basierend auf Hinweisen, dass Pathogene auf das Epigenom der Wirtszelle wirken [523], befasst sich der **erste und zweite Teil** dieser Arbeit mit dem karzinogen wirkenden Magenpathogen *H. pylori*. Dabei war es Ziel dieser Arbeit, zu analysieren, ob *H. pylori* einen Einfluss auf das humane Wirtszellepigenom hat und damit der Prozesse der Pathogenese und Karzinogenese erleichtert. Dabei wurden die beiden zentralen molekularen Mechanismen der Epigenetik betrachtet: Histonmodifikation und DNA-Methylierung.

**Histon-Modifikationen** stellen ein relativ verbreitetes Phänomen bakterieller Infektionen dar. Mit dieser Arbeit wird gezeigt, dass die *H. pylori*-Infektion gastrischer Epithelzelllinien vielseitig auf die Modifikationen von Histon H3 wirkt: Es konnte die T4SS-abhängige Dephosphorylierung von H3S10 und H3T3 sowie die Deacetylierung von H3K9 nachgewiesen werden. Als Ursache der H3S10-Dephosphorylierung wurde ein *H. pylori*-induzierter Zellzyklusarrest identifiziert. Die Aktivierung der *HDAC9*-Expression und der epithelialen Zellverbindungskomponente Claudin-1 lässt auf schwerwiegende morphologische und krankheitsassoziierte Folgen für den Wirt schließen. Offen bleibt, wie Chromatin-Modifikationen spezifisch im Genom verteilt und verankert werden. In zukünftigen Untersuchungen sollte die funktionelle Rolle der bakteriellen Effektorproteine genauer betrachtet werden.

Neu entwickelte Technologien ermöglichen einen umfassenden Einblick in das humane **Methylom**. Mit Hilfe des MAP-on-Chip-Ansatzes und dessen globale Validierung mittels BeadChip war es möglich, genomweite Veränderungen des DNA-Methylierungsmusters nach *H. pylori*-Infektion zu bestimmen. Interessanterweise konnte mit der vorliegenden Studie eine globale Hypermethylierung, vor allem in Genkörpern, sowie eine Promotor- bzw. TSS-Hypomethylierung in Abhängigkeit von *H. pylori* identifiziert werden. Diese Effekte ermöglichen dem Pathogen – über die Regulation der zellulären Transkription – einen gezielten Eingriff in die Wirtszellmaschinerie aus Überleben und Abwehr. Differenzielle Methylierung wird mit Phänomenen der Karzinogenese assoziiert. Die hier beeinflussten Komponenten – Immunantwort, epigenetische Mechanismen, DNA- und Chromatin-Aufbau, Genregulation sowie krebsassoziierte Gene – weisen deutlich auf die klinische Relevanz dieser Studie hin. Anhaltspunkte für eine zielgerichtete differentielle DNA-Methylierung werfen die Frage auf, wie diese Modifikationen auf molekularer Ebene gesteuert werden. Hier könnte eine weiterführende Studie die Rolle der Virulenz-assoziierten Gene und des T4SSs untersuchen. Der Vergleich mit weiteren Methylomdaten anderer Humanpathogene könnte helfen, allgemeine pathogene Mechanismen von Pathogen-spezifischen zu unterscheiden. Des Weiteren ist für klinische Studien relevant, dass der Methylierungsstatus von CpG-Inseln mit Krebstyp, Tumorstadium und Krebsprognose assoziiert werden kann.



Der **dritte Teil** dieser Arbeit befasst sich mit der Manipulation von **Apoptose und Seneszenz**. Ziel dieses Projekts war es, Langzeitauswirkungen der Infektion mit *C. trachomatis* auf die molekulare Antwort auf DNA-Schäden und die proliferative Kapazität der Wirtszelle aufzudecken. Die Untersuchung verdeutlichen dabei, dass eine durch Antibiotika geheilte Infektion noch lange Zeit den Wirtszellmetabolismus beeinträchtigt. Die gesteigerte mRNA-Expression und enzymatische Aktivität von hTERT schützt langfristig vor dem Abbau der Telomere und der Initiation der Zellantwort auf DNA-Schäden. Um eine dauerhafte Proliferationskapazität zu erlangen und genetisches Chaos, induziert durch telomere Dysfunktion, zu vermeiden, sind Krebszellen von der Aufrechterhaltung der chromosomalen Enden abhängig.

Die Veränderungen der *hTERT*-mRNA-Expression, p53-Aktivität und der Hemmung des p53-abhängigen Zellzyklus- und Seneszenz-Regulators p21 haben eine große Bedeutung für die Pathologie der Chlamydieninfektion. Die Antwort auf DNA-Schäden wird durch die Infektion langfristig abgeschwächt und diese Abschwächung mit jeder Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Damit wird das Risiko für die Entstehung maligner onkogener Transformationen erhöht. Die Auswirkungen könnten mit Zell-Invasionsassays untersucht werden. Bislang sind Deletionsmutanten chlamydialer Virulenzfaktoren wohl nur schwierig zu generieren – gelingt dies, kann die Abhängigkeit des beobachteten Effekts von chlamydialen Faktoren überprüft werden. *In vivo* könnte mittels hTERT-Überexpressionsversuchen im Mausmodell das onkogene Potential bestimmt werden.

Den thematischen Ansätzen ist gemeinsam, dass sie die längerfristigen Auswirkungen einer mikrobiellen Infektion auf die Wirtszelle untersuchen. Zukünftige Experimente sollten die Erforschung von primären Zellen bzw. Gewebe mit einschließen und sich auf Langzeitinfektionen, Reinfektionen oder späte Stadien nach Ausheilung einer Infektion konzentrieren. Da epigenetische Signaturen vererbbar sind, wären Veränderungen auch nach Ausheilung der Infektion konstant präsent.

Zusammenfassend bietet die hier dargestellte Forschungsarbeit neue Modelle, um epigenetische Modifikationen und Langzeitfolgen einer mikrobiellen Infektion effektiv zu untersuchen. Die Ergebnisse dieser Arbeit tragen zur Aufklärung der Wirt-Pathogen-Wechselwirkungen bei. Dadurch werden neue Einblicke in die Pathogenitätsmechanismen, die Entwicklung von Krebs, aber auch dessen Diagnose und Therapie ermöglicht.

**KAPITEL 4**

**ANHANG**

---

## 4.1 Literaturverzeichnis

1. World Health Organization, I.A.F.R.O.C., *Schistosomes, liver flukes and Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 1994. **61**: p. 177-179.
2. Balabanova, Y., et al., *Communicable diseases prioritized for surveillance and epidemiological research: results of a standardized prioritization procedure in Germany, 2011*. PLoS one, 2011. **6**(10): p. e25691.
3. Hajdu, S.I., *A note from history: landmarks in history of cancer, part 1*. Cancer, 2011. **117**(5): p. 1097-102.
4. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. CA: a cancer journal for clinicians, 2011. **61**(2): p. 69-90.
5. Hanahan, D. und R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. **144**(5): p. 646-74.
6. Finkel, T., M. Serrano, und M.A. Blasco, *The common biology of cancer and ageing*. Nature, 2007. **448**(7155): p. 767-74.
7. Feinberg, A.P. und B. Vogelstein, *Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers*. Biochemical and biophysical research communications, 1983. **111**(1): p. 47-54.
8. Feinberg, A.P. und B. Vogelstein, *Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts*. Nature, 1983. **301**(5895): p. 89-92.
9. Gama-Sosa, M.A., et al., *Tissue-specific differences in DNA methylation in various mammals*. Biochimica et biophysica acta, 1983. **740**(2): p. 212-9.
10. Gama-Sosa, M.A., et al., *The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors*. Nucleic acids research, 1983. **11**(19): p. 6883-94.
11. Gama-Sosa, M.A., et al., *The 5-methylcytosine content of highly repeated sequences in human DNA*. Nucleic acids research, 1983. **11**(10): p. 3087-95.
12. Levine, A.J., *p53, the cellular gatekeeper for growth and division*. Cell, 1997. **88**(3): p. 323-31.
13. Smeenk, L., et al., *Characterization of genome-wide p53-binding sites upon stress response*. Nucleic acids research, 2008. **36**(11): p. 3639-54.
14. Brooks, C.L. und W. Gu, *Ubiquitination, phosphorylation and acetylation: the molecular basis for p53 regulation*. Current opinion in cell biology, 2003. **15**(2): p. 164-71.
15. Caspari, T., *How to activate p53*. Current biology, 2000. **10**(8): p. R315-7.
16. Guo, X., et al., *Dysfunctional telomeres activate an ATM-ATR-dependent DNA damage response to suppress tumorigenesis*. The EMBO journal, 2007. **26**(22): p. 4709-19.
17. Herbig, U., et al., *Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a)*. Molecular cell, 2004. **14**(4): p. 501-13.
18. Yang, J., Y. Yu, und P.J. Duerksen-Hughes, *Protein kinases and their involvement in the cellular responses to genotoxic stress*. Mutation research, 2003. **543**(1): p. 31-58.
19. Brosh, R. und V. Rotter, *When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field*. Nature reviews cancer, 2009. **9**(10): p. 701-13.
20. Biegging, K.T. und L.D. Attardi, *Deconstructing p53 transcriptional networks in tumor suppression*. Trends in cell biology, 2012. **22**(2): p. 97-106.
21. Brugarolas, J., et al., *Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation*. Proceedings of the national academy of sciences, 1999. **96**(3): p. 1002-7.
22. el-Deiry, W.S., et al., *WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression*. Cell, 1993. **75**(4): p. 817-25.
23. Murphree, A.L. und W.F. Benedict, *Retinoblastoma: clues to human oncogenesis*. Science, 1984. **223**(4640): p. 1028-33.
24. Dimova, D.K., *RB regulation of developmental transcriptional programs*. Fly, 2011. **5**(2): p. 115-8.
25. Brady, C.A. und L.D. Attardi, *p53 at a glance*. Journal of cell science, 2010. **123**(Pt 15): p. 2527-32.
26. Chin, L., et al., *p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis*. Cell, 1999. **97**(4): p. 527-38.
27. Sahin, E., et al., *Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise*. Nature, 2011. **470**(7334): p. 359-65.
28. Lam, A.K., K. Ong, und Y.H. Ho, *hTERT expression in colorectal adenocarcinoma: correlations with p21, p53 expressions and clinicopathological features*. International journal of colorectal disease, 2008. **23**(6): p. 587-94.
29. Chen, C.H. und R.J. Chen, *Prevalence of telomerase activity in human cancer*. Journal of the formosan medical association, 2011. **110**(5): p. 275-89.
30. Phelps, W.C., *Viruses, Bacteria, and Cancer, or It's Not All Smoke and Sunlight*. Zugriff am 04.03.2012 unter <http://www.cancer.org/cancer/news/expertvoices/post/2012/03/04/viruses-bacteria-and-cancer-or-ite28099s-not-all-smoke-and-sunlight.aspx>, 2012.

31. American Cancer Society, *Infectious Agents and Cancer*. Zugriff am 22.02.2013 unter <http://www.cancer.org/cancer/cancercauses/othercarcinogens/infectiousagents/infectiousagentsandcancer/infectious-agents-and-cancer-intro>, 2013.
32. zur Hausen, H., *Cervical carcinoma and human papillomavirus: on the road to preventing a major human cancer*. Journal of the national cancer institute, 2001. **93**(4): p. 252-3.
33. zur Hausen, H., *Human papillomavirus & cervical cancer*. Indian journal of medical research, 2009. **130**(3): p. 210-211.
34. Russell, W., *An Address on a Characteristic Organism of Cancer*. British medical journal, 1890. **2**(1563): p. 1356–1360.
35. Mager, D.L., *Bacteria and cancer: cause, coincidence or cure? A review*. Journal of translational medicine, 2006. **4**(14).
36. Samaras, V., et al., *Chronic bacterial and parasitic infections and cancer: a review*. Journal of infection in developing countries, 2010. **4**(5): p. 267-81.
37. Kumar, S., S. Kumar, und S. Kumar, *Infection as a risk factor for gallbladder cancer*. Journal of surgical oncology, 2006. **93**(8): p. 633-9.
38. Shukla, V.K., et al., *Carcinoma of the gallbladder-is it a sequel of typhoid?* Digestive diseases and sciences, 2000. **45**(5): p. 900-3.
39. Kocazeybek, B., *Chronic Chlamydomphila pneumoniae infection in lung cancer, a risk factor: a case-control study*. Journal of Medical Microbiology, 2003. **52**(8): p. 721-726.
40. Quirk, J.T. und J.M. Kupinski, *Chronic infection, inflammation, and epithelial ovarian cancer*. Medical hypotheses, 2001. **57**(4): p. 426-8.
41. Gold, J.S., S. Bayar, und R.R. Salem, *Association of Streptococcus bovis Bacteremia With Colonic Neoplasia and Extracolonic Malignancy*. Archives of surgery, 2004. **139**(7): p. 760-5.
42. Namiki, K., et al., *Persistent exposure to Mycoplasma induces malignant transformation of human prostate cells*. PloS one, 2009.
43. Fassi Fehri, L., et al., *Prevalence of Propionibacterium acnes in diseased prostates and its inflammatory and transforming activity on prostate epithelial cells*. International journal of medical microbiology, 2011. **301**(1): p. 69-78.
44. Arthur, J.C., et al., *Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota*. Science, 2012. **338**(6103): p. 120-3.
45. Uronis, J.M., et al., *Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility*. PloS one, 2009. **4**(6): p. e6026.
46. Shen, X.J., et al., *Molecular characterization of mucosal adherent bacteria and associations with colorectal adenomas*. Gut microbes, 2010. **1**(3): p. 138-47.
47. Martin, H.M., et al., *Enhanced Escherichia coli adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer*. Gastroenterology, 2004. **127**(1): p. 80-93.
48. Masseret, E., et al., *Genetically related Escherichia coli strains associated with Crohn's disease*. Gut, 2001. **48**(3): p. 320-5.
49. Kroemer, G., et al., *Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009*. Cell death and differentiation, 2009. **16**(1): p. 3-11.
50. Untergasser, G., et al., *Characterization of epithelial senescence by serial analysis of gene expression: identification of genes potentially involved in prostate cancer*. Cancer research, 2002. **62**(21): p. 6255-62.
51. Jang, S.Y., S.Y. Kim, und Y.S. Bae, *p53 deacetylation by SIRT1 decreases during protein kinase CKII downregulation-mediated cellular senescence*. FEBS letters, 2011. **585**(21): p. 3360-6.
52. Hayflick, L. und P.S. Moorhead, *The serial cultivation of human diploid cell strains*. Experimental cell research, 1961. **25**: p. 585-621.
53. Wright, W.E., et al., *Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells*. Developmental genetics, 1996. **18**(2): p. 173-9.
54. Cong, Y.S., J. Wen, und S. Bacchetti, *The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter*. Human molecular genetics, 1999. **8**(1): p. 137-42.
55. Meyerson, M., et al., *hEST2, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization*. Cell, 1997. **90**(4): p. 785-95.
56. Mathon, N.F. und A.C. Lloyd, *Cell senescence and cancer*. Nature reviews cancer, 2001. **1**(3): p. 203-13.
57. O'Sullivan, R.J. und J. Karlseder, *Telomeres: protecting chromosomes against genome instability*. Nature reviews molecular cell biology, 2010. **11**(3): p. 171-81.
58. de Lange, T., *Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres*. Genes & development, 2005. **19**(18): p. 2100-10.
59. Diotti, R. und D. Loayza, *Shelterin complex and associated factors at human telomeres*. Nucleus, 2011. **2**(2): p. 119-35.
60. Sfeir, A. und T. de Lange, *Removal of shelterin reveals the telomere end-protection problem*. Science, 2012. **336**(6081): p. 593-7.

61. Shippen-Lentz, D. und E.H. Blackburn, *Functional evidence for an RNA template in telomerase*. Science, 1990. **247**(4942): p. 546-52.
62. Daniel, M., G.W. Peek, und T.O. Tollefsbol, *Regulation of the human catalytic subunit of telomerase (hTERT)*. Gene, 2012. **498**(2): p. 135-46.
63. Podlevsky, J.D. und J.J. Chen, *It all comes together at the ends: telomerase structure, function, and biogenesis*. Mutation research, 2012. **730**(1-2): p. 3-11.
64. Hayflick, L., *The Limited in Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains*. Experimental cell research, 1965. **37**: p. 614-36.
65. Wright, W.E. und J.W. Shay, *The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization*. Experimental gerontology, 1992. **27**(4): p. 383-9.
66. Grandori, C., et al., *The Myc/Max/Mad network and the transcriptional control of cell behavior*. Annual review of cell and developmental biology, 2000. **16**: p. 653-99.
67. Cao, Y., et al., *TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity*. Oncogene, 2002. **21**(20): p. 3130-8.
68. Li, H., et al., *Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in vitro*. Oncogene, 1999. **18**(48): p. 6785-94.
69. Donehower, L.A., et al., *Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours*. Nature, 1992. **356**(6366): p. 215-21.
70. Kyo, S. und M. Inoue, *Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: how can we apply them for cancer therapy?* Oncogene, 2002. **21**(4): p. 688-97.
71. Wooten, L.G. und B. Ogretmen, *Sp1/Sp3-dependent regulation of human telomerase reverse transcriptase promoter activity by the bioactive sphingolipid ceramide*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(32): p. 28867-76.
72. Cong, Y.S., W.E. Wright, und J.W. Shay, *Human telomerase and its regulation*. Microbiology and molecular biology reviews, 2002. **66**(3): p. 407-25.
73. Zimmermann, S. und U.M. Martens, *Telomeres and telomerase as targets for cancer therapy*. Cellular and molecular life sciences, 2007. **64**(7-8): p. 906-21.
74. Scherer, W.F., J.T. Syvertson, und G.O. Gey, *Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix*. The Journal of experimental medicine, 1953. **97**(5): p. 695-710.
75. Jaattela, M., *Programmed cell death: many ways for cells to die decently*. Annals of medicine, 2002. **34**(6): p. 480-8.
76. Kerr, J.F., A.H. Wyllie, und A.R. Currie, *Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics*. British journal of cancer, 1972. **26**(4): p. 239-57.
77. Fink, S.L. und B.T. Cookson, *Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells*. Infection und immunity, 2005. **73**(4): p. 1907-16.
78. Byrne, G.I. und D.M. Ojcius, *Chlamydia and apoptosis: life and death decisions of an intracellular pathogen*. Nature reviews microbiology, 2004. **2**(10): p. 802-8.
79. Kaufmann, S.H. und M.O. Hengartner, *Programmed cell death: alive and well in the new millennium*. Trends in cell biology, 2001. **11**(12): p. 526-34.
80. Bouillet, P. und A. Strasser, *Bax and Bak: back-bone of T cell death*. Nature immunology, 2002. **3**(10): p. 893-4.
81. Wei, M.C., et al., *Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death*. Science, 2001. **292**(5517): p. 727-30.
82. Hill, M.M., et al., *Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes*. The EMBO journal, 2004. **23**(10): p. 2134-45.
83. Faherty, C.S. und A.T. Maurelli, *Staying alive: bacterial inhibition of apoptosis during infection*. Trends in microbiology, 2008. **16**(4): p. 173-80.
84. Shelton, S.N., C.D. Dillard, und J.D. Robertson, *Activation of caspase-9, but not caspase-2 or caspase-8, is essential for heat-induced apoptosis in Jurkat cells*. The Journal of biological chemistry, 2010. **285**(52): p. 40525-33.
85. Waddington, C.H., *The epigenotype. 1942*. International journal of epidemiology, 2012. **41**(1): p. 10-3.
86. Holliday, R., *Epigenetics: an overview*. Developmental genetics, 1994. **15**(6): p. 453-7.
87. Bird, A., *Perceptions of epigenetics*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 396-8.
88. Handel, A.E. und S.V. Ramagopalan, *Is Lamarckian evolution relevant to medicine?* BMC medical genetics, 2010. **11**: p. 73.
89. Workman, J.L. und A.R. Buchman, *Multiple functions of nucleosomes and regulatory factors in transcription*. Trends in biochemical sciences, 1993. **18**(3): p. 90-5.
90. Beato, M., *Chromatin structure and the regulation of gene expression: remodeling at the MMTV promoter*. Journal of molecular medicine, 1996. **74**(12): p. 711-24.

91. Hayashi, H., et al., *The structure of nucleosome core particles as revealed by difference Raman spectroscopy*. Nucleic acids research, 1986. **14**(6): p. 2583-96.
92. Luger, K., et al., *Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution*. Nature, 1997. **389**(6648): p. 251-60.
93. Wu, R.S., et al., *Histones and their modifications*. CRC critical reviews in biochemistry, 1986. **20**(2): p. 201-63.
94. Turner, B.M., *Defining an epigenetic code*. Nature cell biology, 2007. **9**(1): p. 2-6.
95. McGee, S.L. und M. Hargreaves, *Histone modifications and exercise adaptations*. Journal of applied physiology, 2011. **110**(1): p. 258-63.
96. Perry, M. und R. Chalkley, *Histone acetylation increases the solubility of chromatin and occurs sequentially over most of the chromatin. A novel model for the biological role of histone acetylation*. The Journal of biological chemistry, 1982. **257**(13): p. 7336-47.
97. de Ruijter, A.J., et al., *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family*. The Biochemical journal, 2003. **370**(Pt 3): p. 737-49.
98. Clayton, A.L., C.A. Hazzalin, und L.C. Mahadevan, *Enhanced histone acetylation and transcription: a dynamic perspective*. Molecular cell, 2006. **23**(3): p. 289-96.
99. Reik, W., *Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 425-32.
100. Prigent, C. und S. Dimitrov, *Phosphorylation of serine 10 in histone H3, what for?* Journal of cell science, 2003. **116**(Pt 18): p. 3677-85.
101. McManus, K.J. und M.J. Hendzel, *The relationship between histone H3 phosphorylation and acetylation throughout the mammalian cell cycle*. Biochemistry and cell biology, 2006. **84**(4): p. 640-57.
102. Duan, Q., et al., *Phosphorylation of H3S10 blocks the access of H3K9 by specific antibodies and histone methyltransferase. Implication in regulating chromatin dynamics and epigenetic inheritance during mitosis*. The Journal of biological chemistry, 2008. **283**(48): p. 33585-90.
103. Park, J.A., et al., *Deacetylation and methylation at histone H3 lysine 9 (H3K9) coordinate chromosome condensation during cell cycle progression*. Molecules and cells, 2011. **31**(4): p. 343-9.
104. Montgomery, R.L., et al., *Maintenance of cardiac energy metabolism by histone deacetylase 3 in mice*. The Journal of clinical investigation, 2008. **118**(11): p. 3588-97.
105. Witt, O., et al., *HDAC family: What are the cancer relevant targets?* Cancer Letters, 2009. **277**(1): p. 8-21.
106. Li, N., et al., *Whole genome DNA methylation analysis based on high throughput sequencing technology*. Methods, 2010. **52**(3): p. 203-12.
107. Lister, R., et al., *Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences*. Nature, 2009. **462**(7271): p. 315-22.
108. Chiang, P.K., et al., *S-Adenosylmethionine and methylation*. FASEB journal, 1996. **10**(4): p. 471-80.
109. Auclair, G. und M. Weber, *Mechanisms of DNA methylation and demethylation in mammals*. Biochimie, 2012. **94**(11): p. 2202-11.
110. Pelizzola, M. und J.R. Ecker, *The DNA methylome*. FEBS letters, 2011. **585**(13): p. 1994-2000.
111. Bestor, T.H., *Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain*. The EMBO journal, 1992. **11**(7): p. 2611-7.
112. Pradhan, S., et al., *Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation*. The Journal of biological chemistry, 1999. **274**(46): p. 33002-10.
113. Pradhan, S., et al., *Baculovirus-mediated expression and characterization of the full-length murine DNA methyltransferase*. Nucleic acids research, 1997. **25**(22): p. 4666-73.
114. Yoder, J.A., et al., *DNA (cytosine-5)-methyltransferases in mouse cells and tissues. Studies with a mechanism-based probe*. Journal of molecular biology, 1997. **270**(3): p. 385-95.
115. Rhee, I., et al., *DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells*. Nature, 2002. **416**(6880): p. 552-6.
116. Rhee, I., et al., *CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1*. Nature, 2000. **404**(6781): p. 1003-7.
117. Bird, A.P., *CpG-rich islands and the function of DNA methylation*. Nature, 1986. **321**(6067): p. 209-13.
118. Irizarry, R.A., et al., *The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores*. Nature genetics, 2009. **41**(2): p. 178-86.
119. Qu, Y., et al., *Genome-Wide DNA Methylation Analysis Shows Enrichment of Differential Methylation in "Open Seas" and Enhancers and Reveals Hypomethylation in DNMT3A Mutated Cytogenetically Normal AML (CN-AML)* ASH Annual Meeting and Exposition, 2012. **54**.

120. Suzuki, M.M. und A. Bird, *DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics*. Nature reviews genetics, 2008. **9**(6): p. 465-76.
121. Ballestar, E. und M. Esteller, *Methyl-CpG-binding proteins in cancer: blaming the DNA methylation messenger*. Biochemistry and cell biology, 2005. **83**(3): p. 374-84.
122. Laurent, L., et al., *Dynamic changes in the human methylome during differentiation*. Genome research, 2010. **20**(3): p. 320-31.
123. Maunakea, A.K., et al., *Conserved role of intragenic DNA methylation in regulating alternative promoters*. Nature, 2010. **466**(7303): p. 253-7.
124. Young, J.I., et al., *Regulation of RNA splicing by the methylation-dependent transcriptional repressor methyl-CpG binding protein 2*. Proceedings of the national academy of sciences, 2005. **102**(49): p. 17551-8.
125. Tahiliani, M., et al., *Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1*. Science, 2009. **324**(5929): p. 930-5.
126. Ehrlich, M. und M. Lacey, *DNA hypomethylation and hemimethylation in cancer*. Advances in experimental medicine and biology, 2013. **754**: p. 31-56.
127. Tost, J. und I.G. Gut, *Chapter 14 - Molecular Techniques for DNA Methylation Studies*. Molecular Techniques for DNA Methylation Studies Molecular Diagnostics, 2010. **2**(1): p. 199-228.
128. Frigola, J., et al., *Epigenetic remodeling in colorectal cancer results in coordinate gene suppression across an entire chromosome band*. Nature genetics, 2006. **38**(5): p. 540-9.
129. Esteller, M., *Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome*. Human molecular genetics, 2007. **16 Spec No 1**: p. R50-9.
130. Bedford, M.T. und P.D. van Helden, *Hypomethylation of DNA in pathological conditions of the human prostate*. Cancer research, 1987. **47**(20): p. 5274-6.
131. Sultan, M., et al., *A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome*. Science, 2008. **321**(5891): p. 956-60.
132. Hansen, K.D., et al., *Increased methylation variation in epigenetic domains across cancer types*. Nature genetics, 2011. **43**(8): p. 768-75.
133. Rodriguez-Paredes, M. und M. Esteller, *Cancer epigenetics reaches mainstream oncology*. Nature medicine, 2011. **17**(3): p. 330-9.
134. Ferrari, R., et al., *Epigenetic reprogramming by adenovirus e1a*. Science, 2008. **321**(5892): p. 1086-1088.
135. Rasti, M., et al., *Recruitment of CBP/p300, TATA-binding protein, and S8 to distinct regions at the N terminus of adenovirus E1A*. Journal of virology, 2005. **79**(9): p. 5594-605.
136. Santos-Rosa, H. und C. Caldas, *Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer*. European journal of cancer, 2005. **41**(16): p. 2381-402.
137. Bolden, J.E., M.J. Peart, und R.W. Johnstone, *Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors*. Nature reviews drug discovery, 2006. **5**(9): p. 769-84.
138. Saunders, L.R. und E. Verdin, *Sirtuins: critical regulators at the crossroads between cancer and aging*. Oncogene, 2007. **26**(37): p. 5489-504.
139. Hamon, M.A. und P. Cossart, *Histone modifications and chromatin remodeling during bacterial infections*. Cell host & microbe, 2008. **4**(2): p. 100-9.
140. Arbibe, L., *Immune subversion by chromatin manipulation: a 'new face' of host-bacterial pathogen interaction*. Cellular microbiology, 2008. **10**(8): p. 1582-90.
141. Hamon, M.A., et al., *Histone modifications induced by a family of bacterial toxins*. Proceedings of the national academy of sciences, 2007. **104**(33): p. 13467-72.
142. Xia, G., et al., *Helicobacter pylori regulates p21(WAF1) by histone H4 acetylation*. Biochemical and biophysical research communications, 2008. **369**(2): p. 526-31.
143. Pathak, S.K., et al., *TLR4-dependent NF-kappaB activation and mitogen- and stress-activated protein kinase 1-triggered phosphorylation events are central to Helicobacter pylori peptidyl prolyl cis-, trans-isomerase (HP0175)-mediated induction of IL-6 release from macrophages*. Journal of immunology, 2006. **177**(11): p. 7950-8.
144. Angrisano, T., et al., *Helicobacter pylori regulates iNOS promoter by histone modifications in human gastric epithelial cells*. Medical microbiology und immunology, 2012. **201**(3): p. 249-57.
145. Pathak, S.K., et al., <Pathak\_J of Immunol\_2006.pdf>.
146. Bobetsis, Y.A., et al., *Bacterial infection promotes DNA hypermethylation*. Journal of dental research, 2007. **86**(2): p. 169-74.
147. Tolg, C., et al., *Uropathogenic E. coli infection provokes epigenetic downregulation of CDKN2A (p16INK4A) in uroepithelial cells*. Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology, 2011. **91**(6): p. 825-36.
148. Nakajima, T., et al., *Higher methylation levels in gastric mucosae significantly correlate with higher risk of gastric cancers*. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention, 2006. **15**(11): p. 2317-21.

149. Nanjo, S., et al., *Identification of gastric cancer risk markers that are informative in individuals with past H. pylori infection*. Gastric cancer, 2012. **15**(4): p. 382-8.
150. Chan, A.O., et al., *Promoter methylation of E-cadherin gene in gastric mucosa associated with Helicobacter pylori infection and in gastric cancer*. Gut, 2003. **52**(4): p. 502-6.
151. Kitajima, Y., et al., *Helicobacter pylori infection is an independent risk factor for Runx3 methylation in gastric cancer*. Oncology reports, 2008. **19**(1): p. 197-202.
152. Compare, D., et al., *Global DNA hypomethylation is an early event in Helicobacter pylori-related gastric carcinogenesis*. Journal of clinical pathology, 2011. **64**(8): p. 677-82.
153. Yamamoto, E., et al., *LINE-1 hypomethylation is associated with increased CpG island methylation in Helicobacter pylori-related enlarged-fold gastritis*. Cancer epidemiology, biomarkers & prevention, 2008. **17**(10): p. 2555-64.
154. Yoshida, T., et al., *Alu and Satalpha hypomethylation in Helicobacter pylori-infected gastric mucosae*. International journal of cancer, 2011. **128**(1): p. 33-9.
155. Perrin, D., H.J. Ruskin, and T. Niwa, *Cell type-dependent, infection-induced, aberrant DNA methylation in gastric cancer*. Journal of theoretical biology, 2010. **264**(2): p. 570-7.
156. Marshall, B.J., et al., *Attempt to fulfil Koch's postulates for pyloric Campylobacter*. Medical journal of australia, 1985. **142**(8): p. 436-9.
157. Moodley, Y., et al., *The peopling of the Pacific from a bacterial perspective*. Science, 2009. **323**(5913): p. 527-30.
158. Moodley, Y., et al., *Age of the association between Helicobacter pylori and man*. PLoS pathogens, 2012. **8**(5): p. e1002693.
159. Pounder, R.E. und D. Ng, *The prevalence of Helicobacter pylori infection in different countries*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 1995. **9**(2): p. 33-9.
160. Taylor, D.N. und M.J. Blaser, *The epidemiology of Helicobacter pylori infection*. Epidemiologic Reviews, 1991. **13**: p. 42-59.
161. World Health Organization, I.A.F.R.O.C., *Helicobacter pylori*. Zugriff am 01.11.2012 unter [http://www.who.int/vaccine\\_research/documents/Helicobacter\\_pylori/en/](http://www.who.int/vaccine_research/documents/Helicobacter_pylori/en/), 2013.
162. Feldman, R.A., A.J. Eccersley, und J.M. Hardie, *Epidemiology of Helicobacter pylori: acquisition, transmission, population prevalence and disease-to-infection ratio*. British Medical Bulletin, 1998. **54**(1): p. 39-53.
163. Brown, L.M., *Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission*. Epidemiologic reviews, 2000. **22**(2): p. 283-97.
164. Malaty, H.M., et al., *Prevalence of Helicobacter pylori infection in Korean children: inverse relation to socioeconomic status despite a uniformly high prevalence in adults*. American journal of epidemiology, 1996. **143**(3): p. 257-62.
165. Basso, D., M. Plebani, und J.G. Kusters, *Pathogenesis of Helicobacter pylori infection*. Helicobacter, 2010. **15** Suppl 1: p. 14-20.
166. Gupta, R.S., *Molecular signatures (unique proteins and conserved indels) that are specific for the epsilon proteobacteria (Campylobacterales)*. BMC genomics, 2006. **7**: p. 167.
167. Owen, R.J., *Helicobacter - species classification and identification*. British Medical Bulletin, 1998. **54**(1): p. 17-30.
168. Suerbaum, S. und P. Michetti, *Helicobacter pylori Infection*. The New England journal of medicine, 2002. **347**(15): p. 1175-86.
169. Malfertheiner, P., F.K. Chan, und K.E. McColl, *Peptic ulcer disease*. Lancet, 2009. **374**(9699): p. 1449-61.
170. Furuta, T. und J.C. Delchier, *Helicobacter pylori and non-malignant diseases*. Helicobacter, 2009. **14** Suppl 1: p. 29-35.
171. Bauer, B. und T.F. Meyer, *The Human Gastric Pathogen Helicobacter pylori and Its Association with Gastric Cancer and Ulcer Disease*. Ulcers, 2011. **2011**: p. 1-23.
172. Malfertheiner, P., *The intriguing relationship of Helicobacter pylori infection and acid secretion in peptic ulcer disease and gastric cancer*. Digestive diseases and sciences, 2011. **29**(5): p. 459-64.
173. Peek, R.M., Jr. und M.J. Blaser, *Helicobacter pylori and gastrointestinal tract adenocarcinomas*. Nature reviews cancer, 2002. **2**(1): p. 28-37.
174. Tsuji, S., et al., *Review article: inflammation-related promotion of gastrointestinal carcinogenesis-a perigenetic pathway*. Alimentary Pharmacology & Therapeutics, 2003. **18** Suppl 1: p. 82-9.
175. Tegtmeyer, N. und S. Backert, *Role of Abl and Src family kinases in actin-cytoskeletal rearrangements induced by the Helicobacter pylori CagA protein*. European journal of cell biology, 2011. **90**(11): p. 880-90.
176. Hong, W., et al., *Medium pH-dependent redistribution of the urease of Helicobacter pylori*. Journal of medical microbiology, 2003. **52**(Pt 3): p. 211-6.
177. Sycuro, L.K., et al., *Peptidoglycan crosslinking relaxation promotes Helicobacter pylori's helical shape and stomach colonization*. Cell, 2010. **141**(5): p. 822-33.
178. Haas, R., T.F. Meyer, und J.P. van Putten, *Aflagellated mutants of Helicobacter pylori generated by genetic transformation of naturally competent strains using transposon shuttle mutagenesis*. Molecular microbiology, 1993. **8**(4): p. 753-60.



179. Aspholm-Hurtig, M., et al., *Functional adaptation of BabA, the H. pylori ABO blood group antigen binding adhesin*. Science, 2004. **305**(5683): p. 519-22.
180. Maeda, S. und A.F. Mentis, *Pathogenesis of H. pylori*. Helicobacter, 2007. **12 Suppl 1**: p. 10-4.
181. Backert, S., M. Clyne, und N. Tegtmeyer, *Molecular mechanisms of gastric epithelial cell adhesion and injection of CagA by Helicobacter pylori*. Cell communication and signaling, 2011. **9**(28).
182. Andersen-Nissen, E., et al., *Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria*. Proceedings of the national academy of sciences, 2005. **102**(26): p. 9247-52.
183. Cover, T.L. und M.J. Blaser, *Helicobacter pylori and gastroduodenal disease*. Annual review of medicine, 1992. **43**: p. 135-45.
184. de Bernard, M., et al., *Low pH activates the vacuolating toxin of Helicobacter pylori, which becomes acid and pepsin resistant*. The Journal of biological chemistry, 1995.
185. Rassow, J., *Helicobacter pylori vacuolating toxin A and apoptosis*. Cell communication and signaling, 2011. **9**(26).
186. Salama, N.R., et al., *Genetic analysis of Helicobacter pylori strain populations colonizing the stomach at different times postinfection*. Journal of bacteriology, 2007. **189**(10): p. 3834-45.
187. Gerbert, B., *Die Funktion des vakuolisierenden Cytotoxins (VacA) und die Prozessierung des Cytotoxin-assoziierten Antigens (CagA) von Helicobacter pylori in Immunzellen*. Dissertation, 2003.
188. Torres, V.J., et al., *Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin inhibits activation-induced proliferation of human T and B lymphocyte subsets*. Journal of immunology, 2007. **179**(8): p. 5433-40.
189. Zheng, P.Y. und N.L. Jones, *Helicobacter pylori strains expressing the vacuolating cytotoxin interrupt phagosome maturation in macrophages by recruiting and retaining TACO (coronin 1) protein*. Cellular microbiology, 2003. **5**(1): p. 25-40.
190. Letley, D.P. und J.C. Atherton, *Natural diversity in the N terminus of the mature vacuolating cytotoxin of Helicobacter pylori determines cytotoxin activity*. Journal of bacteriology, 2000. **182**(11): p. 3278-80.
191. Torres, V.J., et al., *Functional properties of the p33 and p55 domains of the Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin*. The Journal of biological chemistry, 2005. **280**(22): p. 21107-14.
192. McClain, M.S., et al., *Essential role of a GXXXG motif for membrane channel formation by Helicobacter pylori vacuolating toxin*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(14): p. 12101-8.
193. Muotiala, A., et al., *Low biological activity of Helicobacter pylori lipopolysaccharide*. Infection and immunity, 1992. **60**(4): p. 1714-6.
194. Wunder, C., et al., *Cholesterol glucosylation promotes immune evasion by Helicobacter pylori*. Nature medicine, 2006. **12**(9): p. 1030-8.
195. Ringner, M., K.H. Valkonen, und T. Wadstrom, *Binding of vitronectin and plasminogen to Helicobacter pylori*. FEMS immunology & medical microbiology, 1994. **9**(1): p. 29-34.
196. Akopyanz, N., et al., *DNA diversity among clinical isolates of Helicobacter pylori detected by PCR-based RAPD fingerprinting*. Nucleic acids research, 1992. **20**(19): p. 5137-42.
197. Suerbaum, S., et al., *Free recombination within Helicobacter pylori*. Proceedings of the national academy of sciences, 1998. **95**(21): p. 12619-24.
198. Logan, R.P. und D.E. Berg, *Genetic diversity of Helicobacter pylori*. Lancet, 1996. **348**(9040): p. 1462-3.
199. Censini, S., et al., *cag, a pathogenicity island of Helicobacter pylori, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors*. Proceedings of the national academy of sciences, 1996. **93**(25): p. 14648-53.
200. Viala, J., et al., *Nod1 responds to peptidoglycan delivered by the Helicobacter pylori cag pathogenicity island*. Nature immunology, 2004. **5**(11): p. 1166-74.
201. Atherton, J.C., et al., *Mosaicism in vacuolating cytotoxin alleles of Helicobacter pylori. Association of specific vacA types with cytotoxin production and peptic ulceration*. The Journal of biological chemistry, 1995. **270**(30): p. 17771-7.
202. Blaser, M.J., et al., *Infection with Helicobacter pylori strains possessing cagA is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach*. Cancer research, 1995. **55**(10): p. 2111-5.
203. Figura, N., *Progress in defining the inflammatory cascade*. European journal of gastroenterology & hepatology, 1995. **7**(4): p. 296-302.
204. Stein, M., et al., *c-Src/Lyn kinases activate Helicobacter pylori CagA through tyrosine phosphorylation of the EPIYA motifs*. Molecular microbiology, 2002. **43**(4): p. 971-80.
205. Yamazaki, S., et al., *The CagA protein of Helicobacter pylori is translocated into epithelial cells and binds to SHP-2 in human gastric mucosa*. The Journal of infectious diseases, 2003. **187**(2): p. 334-7.
206. Backert, S., et al., *Phosphorylation of tyrosine 972 of the Helicobacter pylori CagA protein is essential for induction of a scattering phenotype in gastric epithelial cells*. Molecular microbiology, 2001. **42**(3): p. 631-44.
207. Saadat, I., et al., *Helicobacter pylori CagA targets PAR1/MARK kinase to disrupt epithelial cell polarity*. Nature, 2007. **447**(7142): p. 330-3.

208. Moese, S., et al., *The Helicobacter pylori CagA protein disrupts matrix adhesion of gastric epithelial cells by dephosphorylation of vinculin*. Cellular microbiology, 2007. **9**(5): p. 1148-61.
209. Amieva, M.R., et al., *Disruption of the epithelial apical-junctional complex by Helicobacter pylori CagA*. Science, 2003. **300**(5624): p. 1430-4.
210. Churin, Y., et al., *Helicobacter pylori CagA protein targets the c-Met receptor and enhances the motogenic response*. The Journal of cell biology, 2003. **161**(2): p. 249-55.
211. Galmiche, A., et al., *The N-terminal 34 kDa fragment of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release*. The EMBO journal, 2000. **19**(23): p. 6361-70.
212. Wandler, A.M. und K. Guillemin, *Transgenic Expression of the Helicobacter pylori Virulence Factor CagA Promotes Apoptosis or Tumorigenesis through JNK Activation in Drosophila*. PLoS pathogens, 2012. **8**(10): p. e1002939.
213. Yamasaki, E., et al., *Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin induces activation of the proapoptotic proteins Bax and Bak, leading to cytochrome c release and cell death, independent of vacuolation*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(16): p. 11250-9.
214. Buti, L., et al., *Helicobacter pylori cytotoxin-associated gene A (CagA) subverts the apoptosis-stimulating protein of p53 (ASPP2) tumor suppressor pathway of the host*. Proceedings of the national academy of sciences, 2011. **108**(22): p. 9238-43.
215. Mimuro, H., et al., *Helicobacter pylori dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach*. Cell host & microbe, 2007. **2**(4): p. 250-63.
216. Koch, M., et al., *Induction of microRNA-155 is TLR- and type IV secretion system-dependent in macrophages and inhibits DNA-damage induced apoptosis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2012. **109**(19): p. E1153-62.
217. Morales-Guerrero, S.E., et al., *The Role of CagA Protein Signaling in Gastric Carcinogenesis — CagA Signaling in Gastric Carcinogenesis*. Current Topics in Gastritis, Zugriff am 14.01.2013 über <http://www.intechopen.com/books/current-topics-in-gastritis-2012/the-role-of-caga-protein-signaling-in-gastric-carcinogenesis-caga-signaling-in-gastric-carcinogenesi>, 2012.
218. Sharma, S.A., et al., *Interleukin-8 response of gastric epithelial cell lines to Helicobacter pylori stimulation in vitro*. Infection and immunity, 1995. **63**(5): p. 1681-87.
219. Bauer, B., et al., *The Helicobacter pylori Virulence Effector CagA Abrogates Human beta-Defensin 3 Expression via Inactivation of EGFR Signaling*. Cell host & microbe, 2012. **11**(6): p. 576-86.
220. Dallegri, F. und L. Ottonello, *Tissue injury in neutrophilic inflammation*. Inflammation research, 1997. **46**(10): p. 382-91.
221. Wilson, J.S., et al., *A systematic review of the prevalence of Chlamydia trachomatis among European women*. Human reproduction update, 2002. **8**(4): p. 385-94.
222. Grayston, J.T. und S. Wang, *New knowledge of chlamydiae and the diseases they cause*. The Journal of infectious diseases, 1975. **132**(1): p. 87-105.
223. Thomson, N.R. und I.N. Clarke, *Chlamydia trachomatis: small genome, big challenges*. Future microbiology, 2010. **5**(4): p. 555-61.
224. Gambhir, M., et al., *Trachoma: transmission, infection, and control*. Lancet infectious diseases, 2007. **7**(6): p. 420-427.
225. Wright, H.R., A. Turner, und H.R. Taylor, *Trachoma*. Lancet, 2008. **371**(9628): p. 1945-1954.
226. Brunham, R.C. und J. Rey-Ladino, *Immunology of Chlamydia infection: implications for a Chlamydia trachomatis vaccine*. Nature reviews immunology, 2005. **5**(2): p. 149-61.
227. Haggerty, C.L., et al., *Risk of sequelae after Chlamydia trachomatis genital infection in women*. The Journal of infectious diseases, 2010. **201** Suppl 2: p. S134-55.
228. Mabey, D. und R.W. Peeling, *Lymphogranuloma venereum*. Sexually transmitted infections, 2002. **78**(2): p. 90-2.
229. Hammerschlag, M.R. und S.A. Kohlhoff, *Treatment of chlamydial infections*. Expert opinion on pharmacotherapy, 2012. **13**(4): p. 545-52.
230. Abdelrahman, Y.M. und R.J. Belland, *The chlamydial developmental cycle*. FEMS Microbiol Rev, 2005.
231. Moulder, J.W., *Interaction of chlamydiae and host cells in vitro*. Microbiology reviews, 1991. **55**(1): p. 143-9.
232. Zhang, J.P. und R.S. Stephens, *Mechanism of C. trachomatis attachment to eukaryotic host cells*. Cell, 1992. **69**(5): p. 861-9.
233. Dautry-Varsat, A., A. Subtil, und T. Hackstadt, *Recent insights into the mechanisms of Chlamydia entry*. Cellular microbiology, 2005. **7**(12): p. 1714-22.
234. Dunn, J.D. und R.H. Valdivia, *Uncivil engineers: Chlamydia, Salmonella and Shigella alter cytoskeleton architecture to invade epithelial cells*. Future microbiology, 2010. **5**(8): p. 1219-32.
235. Fields, K.A. und T. Hackstadt, *The chlamydial inclusion: escape from the endocytic pathway*. Annual review of cell and developmental biology, 2002. **18**: p. 221-45.

236. Hackstadt, T., M.A. Scidmore, und D.D. Rockey, *Lipid metabolism in Chlamydia trachomatis-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion*. Proceedings of the national academy of sciences, 1995. **92**(11): p. 4877-81.
237. Scidmore, M.A., E.R. Fischer, und T. Hackstadt, *Restricted Fusion of Chlamydia trachomatis Vesicles with Endocytic Compartments during the Initial Stages of Infection*. Infection and immunity, 2003. **71**(2): p. 973-984.
238. Scidmore, M.A., et al., *Vesicular interactions of the Chlamydia trachomatis inclusion are determined by chlamydial early protein synthesis rather than route of entry*. Infection and immunity, 1996. **64**(12): p. 5366-72.
239. Subtil, A., C. Parsot, und A. Dautry-Varsat, *Secretion of predicted Inc proteins of Chlamydia pneumoniae by a heterologous type III machinery*. Molecular microbiology, 2001. **39**(3): p. 792-800.
240. Abdelrahman, Y.M. und R.J. Belland, *The chlamydial developmental cycle*. FEMS microbiology reviews, 2005. **29**(5): p. 945-59.
241. Al-Younes, H.M., et al., *Low iron availability modulates the course of Chlamydia pneumoniae infection*. Cellular microbiology, 2001. **3**(6): p. 427-37.
242. Harper, A., C.I. Pogson, und J.H. Pearce, *Amino acid transport into cultured McCoy cells infected with Chlamydia trachomatis*. Infection and immunity, 2000. **68**(9): p. 5439-42.
243. Tipples, G. und G. McClarty, *The obligate intracellular bacterium Chlamydia trachomatis is auxotrophic for three of the four ribonucleoside triphosphates*. Molecular microbiology, 1993. **8**(6): p. 1105-14.
244. Cocchiari, J.L., et al., *Cytoplasmic lipid droplets are translocated into the lumen of the Chlamydia trachomatis parasitophorous vacuole*. Proceedings of the national academy of sciences, 2008. **105**(27): p. 9379-84.
245. Heuer, D., et al., *Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction*. Nature, 2009. **457**(7230): p. 731-5.
246. Hogan, R.J., et al., *Chlamydial persistence: beyond the biphasic paradigm*. Infection and immunity, 2004. **72**(4): p. 1843-55.
247. Beatty, W.L., R.P. Morrison, und G.I. Byrne, *Persistent chlamydiae: from cell culture to a paradigm for chlamydial pathogenesis*. Microbiological reviews, 1994. **58**(4): p. 686-99.
248. Hammerschlag, M.R., *The intracellular life of chlamydiae*. Seminars in pediatric infectious diseases, 2002. **13**(4): p. 239-48.
249. Carter, J.D. und R.D. Inman, *Chlamydia-induced reactive arthritis: hidden in plain sight?* Best practice & research. Clinical rheumatology, 2011. **25**(3): p. 359-74.
250. Hybiske, K. und R.S. Stephens, *Mechanisms of host cell exit by the intracellular bacterium Chlamydia*. Proceedings of the national academy of sciences, 2007. **104**(27): p. 11430-5.
251. Fan, T., et al., *Inhibition of apoptosis in chlamydia-infected cells: blockade of mitochondrial cytochrome c release and caspase activation*. The Journal of experimental medicine, 1998. **187**(4): p. 487-96.
252. Rajalingam, K., et al., *Epithelial cells infected with Chlamydia pneumoniae (Chlamydia pneumoniae) are resistant to apoptosis*. Infection and immunity, 2001. **69**(12): p. 7880-8.
253. Greene, W., et al., *Chlamydia-infected cells continue to undergo mitosis and resist induction of apoptosis*. Infection and immunity, 2004. **72**(1): p. 451-60.
254. Xia, M., et al., *Chlamydia trachomatis infection alters host cell transcription in diverse cellular pathways*. The Journal of infectious diseases, 2003. **187**(3): p. 424-34.
255. Dean, D. und V.C. Powers, *Persistent Chlamydia trachomatis infections resist apoptotic stimuli*. Infection and immunity, 2001. **69**(4): p. 2442-7.
256. Saleh, A., et al., *Negative regulation of the Apaf-1 apoptosome by Hsp70*. Nature cell biology, 2000. **2**(8): p. 476-83.
257. Pirbhai, M., et al., *The secreted protease factor CPAF is responsible for degrading pro-apoptotic BH3-only proteins in Chlamydia trachomatis-infected cells*. The Journal of biological chemistry, 2006. **281**(42): p. 31495-501.
258. Saka, H.A. und R.H. Valdivia, *Acquisition of nutrients by Chlamydiae: unique challenges of living in an intracellular compartment*. Current opinion in microbiology, 2010. **13**(1): p. 4-10.
259. Peters, J., et al., *Type III secretion a la Chlamydia*. Trends in microbiology, 2007. **15**(6): p. 241-51.
260. Fields, K.A., et al., *Chlamydia trachomatis type III secretion: evidence for a functional apparatus during early-cycle development*. Molecular microbiology, 2003. **48**(3): p. 671-83.
261. Hackstadt, T., et al., *The Chlamydia trachomatis InCA protein is required for homotypic vesicle fusion*. Cellular microbiology, 1999. **1**(2): p. 119-30.
262. Backert, S. und M. Selbach, *Tyrosine-phosphorylated bacterial effector proteins: the enemies within*. Trends in microbiology, 2005. **13**(10): p. 476-84.
263. Jewett, T.J., et al., *Chlamydia trachomatis tarp is phosphorylated by src family tyrosine kinases*. Biochemical and biophysical research communications, 2008. **371**(2): p. 339-44.
264. Clifton, D.R., et al., *Tyrosine phosphorylation of the chlamydial effector protein Tarp is species specific and not required for recruitment of actin*. Infection and immunity, 2005. **73**(7): p. 3860-8.

265. Clifton, D.R., et al., *A chlamydial type III translocated protein is tyrosine-phosphorylated at the site of entry and associated with recruitment of actin*. Proceedings of the national academy of sciences, 2004. **101**(27): p. 10166-71.
266. Chen, D., et al., *Secretion of the chlamydial virulence factor CPAF requires the Sec-dependent pathway*. Microbiology, 2010. **156**(Pt 10): p. 3031-40.
267. Jorgensen, I., et al., *The Chlamydia protease CPAF regulates host and bacterial proteins to maintain pathogen vacuole integrity and promote virulence*. Cell host & microbe, 2011. **10**(1): p. 21-32.
268. Høgbom, M., et al., *The radical site in chlamydial ribonucleotide reductase defines a new R2 subclass*. Science, 2004. **305**(5681): p. 245-8.
269. Brunham, R.C., F.A. Plummer, und R.S. Stephens, *Bacterial antigenic variation, host immune response, and pathogen-host coevolution*. Infection and immunity, 1993. **61**(6): p. 2273-6.
270. Ingalls, R.R., et al., *The inflammatory cytokine response to Chlamydia trachomatis infection is endotoxin mediated*. Infection and immunity, 1995. **63**(8): p. 3125-30.
271. Zhong, G., et al., *Degradation of transcription factor RFX5 during the inhibition of both constitutive and interferon gamma-inducible major histocompatibility complex class I expression in chlamydia-infected cells*. The Journal of experimental medicine, 2000. **191**(9): p. 1525-34.
272. Nephew, K.P. und T.H. Huang, *Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression*. Cancer Letters, 2003. **190**(2): p. 125-133.
273. Duelli, D.M. und Y.A. Lazebnik, *Primary cells suppress oncogene-dependent apoptosis*. Nature cell biology, 2000. **2**(11): p. 859-62.
274. Fearhead, H.O., et al., *Oncogene-dependent apoptosis is mediated by caspase-9*. Proceedings of the national academy of sciences, 1998. **95**(23): p. 13664-9.
275. Southern, E.M., *Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis*. Journal of molecular biology, 1975. **98**(3): p. 503-17.
276. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
277. Lazaro, J.B., et al., *Cyclin dependent kinase 5, cdk5, is a positive regulator of myogenesis in mouse C2 cells*. Journal of cell science, 1997. **110** ( Pt 10): p. 1251-60.
278. Nakamura, A.J., et al., *Telomere-dependent and telomere-independent origins of endogenous DNA damage in tumor cells*. Aging, 2009. **1**(2): p. 212-218.
279. Ding, G.J., et al., *Characterization and quantitation of NF-kappaB nuclear translocation induced by interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. Development and use of a high capacity fluorescence cytometric system*. The Journal of biological chemistry, 1998. **273**(44): p. 28897-905.
280. Riccardi, C. und I. Nicoletti, *Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry*. Nature protocols, 2006. **1**(3): p. 1458-61.
281. Student, *The probable error of a mean*. Biometrika, 1908. **6**: p. 1-24.
282. Fisher, R.A., *Statistical Methods for Research Workers*. Oliver and Boyd, 1932. **4**(44).
283. Tukey, J.W., *Exploratory data analysis*. Addison-Wesley, 1977.
284. Shahbazian, M.D. und M. Grunstein, *Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation*. Annual review of biochemistry, 2007. **76**: p. 75-100.
285. Haberland, M., R.L. Montgomery, und E.N. Olson, *The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy*. Nature reviews genetics, 2009. **10**(1): p. 32-42.
286. Hans, F. und S. Dimitrov, *Histone H3 phosphorylation and cell division*. Oncogene, 2001. **20**(24): p. 3021-7.
287. Ahmed, A., et al., *Helicobacter pylori inhibits gastric cell cycle progression*. Microbes and Infection, 2000. **2**(10): p. 1159-69.
288. Chiou, C.C., et al., *Helicobacter pylori inhibits activity of cdc2 kinase and delays G2/M to G1 progression in gastric adenocarcinoma cell line*. Scandinavian journal of gastroenterology, 2003. **38**(2): p. 147-52.
289. Ding, S.Z., M.F. Smith, Jr., und J.B. Goldberg, *Helicobacter pylori and mitogen-activated protein kinases regulate the cell cycle, proliferation and apoptosis in gastric epithelial cells*. Journal of gastroenterology and hepatology, 2008. **23**(7 Pt 2): p. e67-78.
290. Schmees, C., et al., *Inhibition of T-cell proliferation by Helicobacter pylori gamma-glutamyl transpeptidase*. Gastroenterology, 2007. **132**(5): p. 1820-33.
291. Cerutti, H. und J.A. Casas-Mollano, *Histone H3 phosphorylation: universal code or lineage specific dialects?* Epigenetics, 2009. **4**(2): p. 71-5.
292. Kang, T.H., et al., *Mitotic histone H3 phosphorylation by vaccinia-related kinase 1 in mammalian cells*. Molecular & cellular biology, 2007. **27**(24): p. 8533-46.
293. Krishnan, M., et al., *HDAC inhibitors regulate claudin-1 expression in colon cancer cells through modulation of mRNA stability*. Oncogene, 2010. **29**(2): p. 305-12.

294. Petrie, K., et al., *The histone deacetylase 9 gene encodes multiple protein isoforms*. The Journal of biological chemistry, 2003. **278**(18): p. 16059-72.
295. Yan, K., et al., *Histone deacetylase 9 deficiency protects against effector T cell-mediated systemic autoimmunity*. The Journal of biological chemistry, 2011. **286**(33): p. 28833-43.
296. Schneider, S., C. Weydig, und S. Wessler, *Targeting focal adhesions: Helicobacter pylori-host communication in cell migration*. Cell communication and signaling, 2008. **6**(2).
297. Fehri, L.F., et al., *Helicobacter pylori-induced modification of the histone H3 phosphorylation status in gastric epithelial cells reflects its impact on cell cycle regulation*. Epigenetics, 2009.
298. Ding, S.Z., et al., *Helicobacter pylori-induced histone modification, associated gene expression in gastric epithelial cells, and its implication in pathogenesis*. PloS one, 2010. **5**(4): p. e9875.
299. Pennini, M.E., et al., *Mycobacterium tuberculosis 19-kDa lipoprotein inhibits IFN-gamma-induced chromatin remodeling of MHC2TA by TLR2 and MAPK signaling*. The Journal of immunology, 2006. **176**(7): p. 4323-30.
300. Reiterer, V., et al., *Shigella flexneri type III secreted effector OspF reveals new crosstalks of proinflammatory signaling pathways during bacterial infection*. Cellular signalling, 2011. **23**(7): p. 1188-96.
301. Zurawski, D.V., et al., *OspF and OspC1 are Shigella flexneri type III secretion system effectors that are required for postinvasion aspects of virulence*. Infection and immunity, 2006. **74**(10): p. 5964-76.
302. Arbibe, L., et al., *An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF-kappaB to alter transcription of host genes involved in immune responses*. Nature immunology, 2007. **8**(1): p. 47-56.
303. Lebreton, A., et al., *A bacterial protein targets the BAHD1 chromatin complex to stimulate type III interferon response*. Science, 2011. **331**(6022): p. 1319-21.
304. Pennini, M.E., et al., *Histone methylation by NUE, a novel nuclear effector of the intracellular pathogen Chlamydia trachomatis*. PLoS pathogens, 2010. **6**(7): p. e1000995.
305. Murata, M., et al., *Chlamydial SET domain protein functions as a histone methyltransferase*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 2): p. 585-92.
306. Robertson, B.D. und T.F. Meyer, *Genetic variation in pathogenic bacteria*. Trends in genetics, 1992. **8**(12): p. 422-7.
307. Croken, M.M., S.C. Nardelli, und K. Kim, *Chromatin modifications, epigenetics, and how protozoan parasites regulate their lives*. Trends in parasitology, 2012. **28**(5): p. 202-13.
308. Lopez-Rubio, J.J., L. Riviere, und A. Scherf, *Shared epigenetic mechanisms control virulence factors in protozoan parasites*. Current opinion in microbiology, 2007. **10**(6): p. 560-8.
309. Sullivan, W.J., Jr., A. Naguleswaran, und S.O. Angel, *Histones and histone modifications in protozoan parasites*. Cellular microbiology, 2006. **8**(12): p. 1850-61.
310. Trojer, P., et al., *Histone deacetylases in fungi: novel members, new facts*. Nucleic acids research, 2003. **31**(14): p. 3971-81.
311. Wurtele, H., et al., *Modulation of histone H3 lysine 56 acetylation as an antifungal therapeutic strategy*. Nature medicine, 2010. **16**(7): p. 774-80.
312. Frisan, T., X. Cortes-Bratti, und M. Thelestam, *Cytolethal distending toxins and activation of DNA damage-dependent checkpoint responses*. International journal of medical microbiology, 2002. **291**(6-7): p. 495-9.
313. Ge, R., et al., *Histidine-rich protein Hpn from Helicobacter pylori forms amyloid-like fibrils in vitro and inhibits the proliferation of gastric epithelial AGS cells*. Biochimica et biophysica acta, 2011. **1813**(8): p. 1422-7.
314. Hendzel, M.J., et al., *Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation*. Chromosoma, 1997. **106**(6): p. 348-60.
315. Van Hooser, A., et al., *Histone H3 phosphorylation is required for the initiation, but not maintenance, of mammalian chromosome condensation*. Journal of cell science, 1998. **111 ( Pt 23)**: p. 3497-506.
316. Egloff, A.M., L.A. Vella, und O.J. Finn, *Cyclin B1 and other cyclins as tumor antigens in immunosurveillance and immunotherapy of cancer*. Cancer research, 2006. **66**(1): p. 6-9.
317. Zwicker, J. und R. Muller, *Cell cycle-regulated transcription in mammalian cells*. Progress in cell cycle research, 1995. **1**: p. 91-9.
318. St. Clair, S. und J.J. Manfredi, *The Dual Specificity Phosphatase Cdc25C is a Direct Target for Transcriptional Repression by the Tumor Suppressor p53*. Cell Cycle, 2006. **5**(7): p. 709-13.
319. Kwok, T., et al., *Helicobacter exploits integrin for type IV secretion and kinase activation*. Nature, 2007. **449**(7164): p. 862-6.
320. Markaki, Y., et al., *Phosphorylation of histone H3 at Thr3 is part of a combinatorial pattern that marks and configures mitotic chromatin*. Journal of cell science, 2009. **122**(Pt 16): p. 2809-19.
321. Ding, J., J.E. Swain, und G.D. Smith, *Aurora kinase-A regulates microtubule organizing center (MTOC) localization, chromosome dynamics, and histone-H3 phosphorylation in mouse oocytes*. Molecular reproduction and development, 2011. **78**(2): p. 80-90.

322. Li, F., et al., *p21-activated kinase 1 interacts with and phosphorylates histone H3 in breast cancer cells*. The EMBO journal, 2002. **3**(8): p. 767-73.
323. Preuss, U., G. Landsberg, und K.H. Scheidtmann, *Novel mitosis-specific phosphorylation of histone H3 at Thr11 mediated by Dlk/ZIP kinase*. Nucleic acids research, 2003. **31**(3): p. 878-85.
324. Nezu, J., et al., *Identification of Two Novel Human Putative Serine/Threonine Kinases, VRK1 and VRK2, with Structural Similarity to Vaccinia Virus B1R Kinase*. Genomics, 1997. **45**(2): p. 327-31.
325. Valbuena, A., I. Lopez-Sanchez, und P.A. Lazo, *Human VRK1 is an early response gene and its loss causes a block in cell cycle progression*. PloS one, 2008. **3**(2): p. e1642.
326. Lopez-Borges, S. und P. A Lazo, *The human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) phosphorylates threonine-18 within the mdm-2 binding site of the p53 tumour suppressor protein*. Oncogene, 2000. **19**(32): p. 3656-64.
327. Kang, T.H., et al., *VRK1 phosphorylates CREB and mediates CCND1 expression*. Journal of cell science, 2008. **121**(Pt 18): p. 3035-41.
328. Sevilla, A., et al., *Human vaccinia-related kinase 1 (VRK1) activates the ATF2 transcriptional activity by novel phosphorylation on Thr-73 and Ser-62 and cooperates with JNK*. The Journal of biological chemistry, 2004. **279**(26): p. 27458-65.
329. Nichols, R.J., M.S. Wiebe, und P. Traktman, *The vaccinia-related kinases phosphorylate the N' terminus of BAF, regulating its interaction with DNA and its retention in the nucleus*. Molecular biology of the cell, 2006. **17**(5): p. 2451-64.
330. Valbuena, A., et al., *Roles of VRK1 as a new player in the control of biological processes required for cell division*. Cellular signalling, 2011. **23**(8): p. 1267-72.
331. Fortier, A., et al., *Global cellular changes induced by Legionella pneumophila infection of bone marrow-derived macrophages*. Immunobiology, 2011. **216**(12): p. 1274-85.
332. Lara-Tejero, M., *A Bacterial Toxin That Controls Cell Cycle Progression as a Deoxyribonuclease I-Like Protein*. Science, 2000. **290**(5490): p. 354-357.
333. Ohara, M., et al., *Topical application of Aggregatibacter actinomycetemcomitans cytolethal distending toxin induces cell cycle arrest in the rat gingival epithelium in vivo*. Journal of periodontal research, 2011. **46**(3): p. 389-95.
334. Elwell, C.A. und L.A. Dreyfus, *DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest*. Molecular microbiology, 2000. **37**(4): p. 952-63.
335. Marchès, O., et al., *Enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition*. Molecular microbiology, 2003. **50**(5): p. 1553-1567.
336. Gebert, B., *Die Funktion des vakuolisierenden Cytotoxins (VacA) und die Prozessierung des Cytotoxin-assoziierten Antigens (CagA) von Helicobacter pylori in Immunzellen* Dissertation, 2004.
337. Lax, A.J., *Bacterial toxins and cancer — a case to answer?* Nature Reviews microbiology, 2005. **3**(4): p. 343-9.
338. Nougayrede, J.P., et al., *Cyclomodulins: bacterial effectors that modulate the eukaryotic cell cycle*. Trends in microbiology, 2005. **13**(3): p. 103-10.
339. Oswald, E., et al., *Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression*. Current opinion in microbiology, 2005. **8**(1): p. 83-91.
340. Mitsumori, K., et al., *Virulence Characteristics of Escherichia coli in Acute Bacterial Prostatitis*. The Journal of infectious diseases, 1999. **180**(4): p. 1378-81.
341. Garcia-Garcia, J.C., et al., *Epigenetic silencing of host cell defense genes enhances intracellular survival of the rickettsial pathogen Anaplasma phagocytophilum*. PLoS pathogens, 2009. **5**(6): p. e1000488.
342. Mukherjee, K., R. Fischer, und A. Vilcinskas, *Histone acetylation mediates epigenetic regulation of transcriptional reprogramming in insects during metamorphosis, wounding and infection*. Frontiers in zoology, 2012. **9**(1): p. 25.
343. Moreno, D.A., et al., *Differential expression of HDAC3, HDAC7 and HDAC9 is associated with prognosis and survival in childhood acute lymphoblastic leukaemia*. British journal of haematology, 2010. **150**(6): p. 665-73.
344. Koch, C.M., et al., *The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines*. Genome research, 2007. **17**(6): p. 691-707.
345. Weber, M., et al., *Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome*. Nature genetics, 2007. **39**(4): p. 457-66.
346. Haberland, M., et al., *Regulation of HDAC9 gene expression by MEF2 establishes a negative-feedback loop in the transcriptional circuitry of muscle differentiation*. Molecular & cellular biology, 2007. **27**(2): p. 518-25.
347. Potthoff, M.J. und E.N. Olson, *MEF2: a central regulator of diverse developmental programs*. Development, 2007. **134**(23): p. 4131-40.
348. Saito, T., et al., *Histone deacetylase inhibitors suppress mechanical stress-induced expression of RUNX-2 and ADAMTS-5 through the inhibition of the MAPK signaling pathway in cultured human chondrocytes*. Osteoarthritis and cartilage, 2012. **21**(1): p. 165-74.

349. Oliveira, S.S. und J.A. Morgado-Diaz, *Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer*. Cellular and molecular life sciences, 2007. **64**(1): p. 17-28.
350. Hewitt, K.J., R. Agarwal, und P.J. Morin, *The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues*. BMC cancer, 2006. **6**: p. 186.
351. Myal, Y., E. Leygue, und A.A. Blanchard, *Claudin 1 in breast tumorigenesis: revelation of a possible novel "claudin high" subset of breast cancers*. Journal of biomedicine & biotechnology, 2010. **2010**: p. 956897.
352. Miyamori, H., et al., *Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(30): p. 28204-11.
353. Oku, N., et al., *Tight junction protein claudin-1 enhances the invasive activity of oral squamous cell carcinoma cells by promoting cleavage of laminin-5 gamma2 chain via matrix metalloproteinase (MMP)-2 and membrane-type MMP-1*. Cancer research, 2006. **66**(10): p. 5251-7.
354. Dhawan, P., et al., *Claudin-1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer*. The Journal of clinical investigation, 2005. **115**(7): p. 1765-76.
355. Morita, K., S. Tsukita, und Y. Miyachi, *Tight junction-associated proteins (occludin, ZO-1, claudin-1, claudin-4) in squamous cell carcinoma and Bowen's disease*. The British journal of dermatology, 2004. **151**(2): p. 328-34.
356. Michl, P., et al., *Claudin-4 expression decreases invasiveness and metastatic potential of pancreatic cancer*. Cancer research, 2003. **63**(19): p. 6265-71.
357. Ohtani, S., et al., *Expression of tight-junction-associated proteins in human gastric cancer: downregulation of claudin-4 correlates with tumor aggressiveness and survival*. Gastric cancer, 2009. **12**(1): p. 43-51.
358. Miyamoto, K., et al., *Decreased expression of claudin-1 is correlated with recurrence status in esophageal squamous cell carcinoma*. Biomedical research, 2008. **29**(2): p. 71-6.
359. Lapointe, T.K., et al., *Interleukin-1 receptor phosphorylation activates Rho kinase to disrupt human gastric tight junctional claudin-4 during Helicobacter pylori infection*. Cellular microbiology, 2010. **12**(5): p. 692-703.
360. Mohn, F., et al., *Methylated DNA immunoprecipitation (MeDIP)*. Methods in molecular biology, 2009. **507**: p. 55-64.
361. Bibikova, M., et al., *High density DNA methylation array with single CpG site resolution*. Genomics, 2011. **98**(4): p. 288-95.
362. Pålme, N., D. Santacruz, und J. Walter, *Comprehensive analysis of DNA-methylation in mammalian tissues using MeDIP-chip*. Methods, 2011. **53**(2): p. 175-84.
363. Pelizzola, M., et al., *MEDME: an experimental and analytical methodology for the estimation of DNA methylation levels based on microarray derived MeDIP-enrichment*. Genome research, 2008. **18**(10): p. 1652-9.
364. Bolstad, B.M., et al., *A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias*. Bioinformatics, 2003. **19**(2): p. 185-93.
365. Wang, H., et al., *Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor*. Science, 2001. **293**(5531): p. 853-7.
366. Mathioudaki, K., et al., *The PRMT1 gene expression pattern in colon cancer*. British journal of cancer, 2008. **99**(12): p. 2094-9.
367. Shin, D.M., et al., *Activation of ribosomal protein S2 gene expression in a hamster model of chemically induced oral carcinogenesis*. Carcinogenesis, 1993. **14**(1): p. 163-6.
368. Matsushima, A., et al., *Structural evidence for endocrine disruptor bisphenol A binding to human nuclear receptor ERR gamma*. Journal of biochemistry, 2007. **142**(4): p. 517-24.
369. Javierre, B.M. und B. Richardson, *A new epigenetic challenge: systemic lupus erythematosus*. Advances in experimental medicine and biology, 2011. **711**: p. 117-36.
370. Javierre, B.M., et al., *Changes in the pattern of DNA methylation associate with twin discordance in systemic lupus erythematosus*. Genome research, 2010. **20**(2): p. 170-9.
371. Kawakami, T. und S.J. Galli, *Regulation of mast-cell and basophil function and survival by IgE*. Nature reviews immunology, 2002. **2**(10): p. 773-86.
372. Vogelstein, B., et al., *Cancer genome landscapes*. Science, 2013. **339**(6127): p. 1546-58.
373. Cahill, N., et al., *450K-array analysis of chronic lymphocytic leukemia cells reveals global DNA methylation to be relatively stable over time and similar in resting and proliferative compartments*. Leukemia, 2013. **27**(1): p. 150-8.
374. Luo, J., et al., *DNA Methylation Fluctuation Induced by Virus Infection Differs between MD-resistant and -susceptible Chickens*. Frontiers in genetics, 2012. **3**: p. 20.
375. Das, K., et al., *Differential expression of steroid 5alpha-reductase isozymes and association with disease severity and angiogenic genes predict their biological role in prostate cancer*. Endocrine-related cancer, 2010. **17**(3): p. 757-70.
376. Yang, D., et al., *Expression profiles analysis of pancreatic cancer*. European review for medical and pharmacological sciences, 2013. **17**(3): p. 311-7.
377. Joubert, B.R., et al., *450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy*. Environmental health perspectives, 2012. **120**(10): p. 1425-31.

378. Touleimat, N. und J. Tost, *Complete pipeline for Infinium((R)) Human Methylation 450K BeadChip data processing using subset quantile normalization for accurate DNA methylation estimation*. Epigenomics, 2012. **4**(3): p. 325-41.
379. Dedeurwaerder, S., et al., *Evaluation of the Infinium Methylation 450K technology*. Epigenomics, 2011. **3**(6): p. 771-84.
380. Pan, H., et al., *Measuring the methylome in clinical samples: improved processing of the Infinium Human Methylation450 BeadChip Array*. Epigenetics, 2012. **7**(10): p. 1173-87.
381. Marabita, F., et al., *An evaluation of analysis pipelines for DNA methylation profiling using the Illumina HumanMethylation450 BeadChip platform*. Epigenetics, 2013. **8**(3): p. 333-46.
382. Gross, D.S. und W.T. Garrard, *Nuclease hypersensitive sites in chromatin*. Annual review of biochemistry, 1988. **57**: p. 159-97.
383. Hesselberth, J.R., et al., *Global mapping of protein-DNA interactions in vivo by digital genomic footprinting*. Nature methods, 2009. **6**(4): p. 283-9.
384. Zhang, G. und S. Ghosh, *Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity*. The Journal of clinical investigation, 2001. **107**(1): p. 13-9.
385. Dal Porto, J.M., et al., *B cell antigen receptor signaling 101*. Molecular immunology, 2004. **41**(6-7): p. 599-613.
386. Maekita, T., et al., *High levels of aberrant DNA methylation in Helicobacter pylori-infected gastric mucosae and its possible association with gastric cancer risk*. Clinical cancer research, 2006. **12**(3 Pt 1): p. 989-95.
387. Perri, F., et al., *Aberrant DNA methylation in non-neoplastic gastric mucosa of H. Pylori infected patients and effect of eradication*. The American journal of gastroenterology, 2007. **102**(7): p. 1361-71.
388. Park, S.Y., et al., *Comparison of CpG island hypermethylation and repetitive DNA hypomethylation in premalignant stages of gastric cancer, stratified for Helicobacter pylori infection*. The Journal of pathology, 2009. **219**(4): p. 410-6.
389. Alves, C.S., et al., *Interaction of antimicrobial peptides, BP100 and pepR, with model membrane systems as explored by Brownian dynamics simulations on a coarse-grained model*. Biopolymers, 2012. **98**(4): p. 294-312.
390. Sepulveda, A.R., et al., *CpG methylation and reduced expression of O6-methylguanine DNA methyltransferase is associated with Helicobacter pylori infection*. Gastroenterology, 2010. **138**(5): p. 1836-44.
391. Tahara, T. und T. Arisawa, *Potential usefulness of DNA methylation as a risk marker for digestive cancer associated with inflammation*. Expert review of molecular diagnostics, 2012. **12**(5): p. 489-97.
392. Touati, E., *When bacteria become mutagenic and carcinogenic: lessons from H. pylori*. Mutation research, 2010. **703**(1): p. 66-70.
393. Ding, S.Z., J.B. Goldberg, und M. Hatakeyama, *Helicobacter pylori infection, oncogenic pathways and epigenetic mechanisms in gastric carcinogenesis*. Future oncology, 2010. **6**(5): p. 851-62.
394. Niwa, T., et al., *Inflammatory processes triggered by Helicobacter pylori infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells*. Cancer research, 2010. **70**(4): p. 1430-40.
395. Esteller, M., *The necessity of a human epigenome project*. Carcinogenesis, 2006. **27**(6): p. 1121-5.
396. Houghton, J., et al., *Gastric cancer originating from bone marrow-derived cells*. Science, 2004. **306**(5701): p. 1568-71.
397. Smiraglia, D.J., et al., *Excessive CpG island hypermethylation in cancer cell lines versus primary human malignancies*. Human molecular genetics, 2001. **10**(13): p. 1413-9.
398. Lethe, B., et al., *LAGE-1, a new gene with tumor specificity*. International journal of cancer, 1998. **76**(6): p. 903-8.
399. Song, J.Z., et al., *Hypermethylation trigger of the glutathione-S-transferase gene (GSTP1) in prostate cancer cells*. Oncogene, 2002. **21**(7): p. 1048-61.
400. Jones, P.A. und S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nature reviews genetics, 2002. **3**(6): p. 415-28.
401. Kulis, M. und M. Esteller, *DNA methylation and cancer*. Advances in genetics, 2010. **70**: p. 27-56.
402. Ribeiro, A.S., et al., *Extracellular cleavage and shedding of P-cadherin: a mechanism underlying the invasive behaviour of breast cancer cells*. Oncogene, 2010. **29**(3): p. 392-402.
403. Paz, M.F., et al., *A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines*. Cancer research, 2003. **63**(5): p. 1114-21.
404. Lendvai, A., et al., *Genome-wide methylation profiling identifies hypermethylated biomarkers in high-grade cervical intraepithelial neoplasia*. Epigenetics, 2012. **7**(11): p. 1268-78.
405. Sandoval, J., et al., *Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome*. Epigenetics, 2011. **6**(6): p. 692-702.
406. Song, M.A., et al., *Elucidating the landscape of aberrant DNA methylation in hepatocellular carcinoma*. PloS one, 2013. **8**(2): p. e55761.
407. Peterson, A.J., et al., *Helicobacter pylori infection promotes methylation and silencing of trefoil factor 2, leading to gastric tumor development in mice and humans*. Gastroenterology, 2010. **139**(6): p. 2005-17.
408. Yan, J., et al., *Helicobacter pylori infection promotes methylation of WWOX gene in human gastric cancer*. Biochemical and biophysical research communications, 2011. **408**(1): p. 99-102.



409. Tamura, G., *Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer*. World journal of gastroenterology, 2006. **12**(2): p. 192-8.
410. Ushijima, T. und E. Okochi-Takada, *Aberrant methylations in cancer cells: where do they come from?* Cancer science, 2005. **96**(4): p. 206-11.
411. Suzuki, H., et al., *DNA methylation and cancer pathways in gastrointestinal tumors*. Pharmacogenomics, 2008. **9**(12): p. 1917-28.
412. Tahara, T., et al., *Increased number of methylated CpG islands correlates with Helicobacter pylori infection, histological and serological severity of chronic gastritis*. European journal of gastroenterology & hepatology, 2009. **21**(6): p. 613-9.
413. Yoo, E.J., et al., *Helicobacter pylori-infection-associated CpG island hypermethylation in the stomach and its possible association with polycomb repressive marks*. Virchows Archiv : an international journal of pathology, 2008. **452**(5): p. 515-24.
414. Qian, X., et al., *E-cadherin promoter hypermethylation induced by interleukin-1beta treatment or H. pylori infection in human gastric cancer cell lines*. Cancer Letters, 2008. **263**(1): p. 107-13.
415. Miyazaki, T., et al., *E-cadherin gene promoter hypermethylation in H. pylori-induced enlarged fold gastritis*. Helicobacter, 2007. **12**(5): p. 523-31.
416. Bussiere, F.I., et al., *H. pylori-induced promoter hypermethylation downregulates USF1 and USF2 transcription factor gene expression*. Cellular microbiology, 2010. **12**(8): p. 1124-33.
417. Arisawa, T., et al., *Promoter hypomethylation of protease-activated receptor 2 associated with carcinogenesis in the stomach*. Journal of gastroenterology and hepatology, 2007. **22**(6): p. 943-8.
418. Shin, C.M., et al., *Prediction of the risk for gastric cancer using candidate methylation markers in the non-neoplastic gastric mucosae*. The Journal of pathology, 2012. **226**(4): p. 654-65.
419. Shin, C.M., et al., *Genome-wide DNA methylation profiles in noncancerous gastric mucosae with regard to Helicobacter pylori infection and the presence of gastric cancer*. Helicobacter, 2011. **16**(3): p. 179-88.
420. Wong, B.C., et al., *Helicobacter pylori eradication to prevent gastric cancer in a high-risk region of China: a randomized controlled trial*. The Journal of the American Medical Association, 2004. **291**(2): p. 187-94.
421. Yanaoka, K., et al., *Eradication of Helicobacter pylori prevents cancer development in subjects with mild gastric atrophy identified by serum pepsinogen levels*. International journal of cancer, 2009. **125**(11): p. 2697-703.
422. Katayama, Y., M. Takahashi, und H. Kuwayama, *Helicobacter pylori causes runx3 gene methylation and its loss of expression in gastric epithelial cells, which is mediated by nitric oxide produced by macrophages*. Biochemical and biophysical research communications, 2009. **388**(3): p. 496-500.
423. Pero, R., et al., *Chromatin and DNA methylation dynamics of Helicobacter pylori-induced COX-2 activation*. International journal of medical microbiology, 2011. **301**(2): p. 140-9.
424. Kangaspeska, S., et al., *Transient cyclical methylation of promoter DNA*. Nature, 2008. **452**(7183): p. 112-5.
425. Metivier, R., et al., *Cyclical DNA methylation of a transcriptionally active promoter*. Nature, 2008. **452**(7183): p. 45-50.
426. Lorincz, M.C., et al., *Intragenic DNA methylation alters chromatin structure and elongation efficiency in mammalian cells*. Nature structural & molecular biology, 2004. **11**(11): p. 1068-75.
427. Ball, M.P., et al., *Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells*. Nature biotechnology, 2009. **27**(4): p. 361-8.
428. Flanagan, J.M. und L. Wild, *An epigenetic role for noncoding RNAs and intragenic DNA methylation*. Genome biology, 2007. **8**(6): p. 307.
429. Shukla, S., et al., *CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing*. Nature, 2011. **479**(7371): p. 74-9.
430. Feinberg, A.P., R. Ohlsson, und S. Henikoff, *The epigenetic progenitor origin of human cancer*. Nature reviews genetics, 2006. **7**(1): p. 21-33.
431. Yang, J., et al., *Clinical significance of the expression of DNA methyltransferase proteins in gastric cancer*. Molecular medicine reports, 2011. **4**(6): p. 1139-43.
432. Kanai, Y., et al., *DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and peri-centromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers*. International journal of cancer, 2001. **91**(2): p. 205-12.
433. Nakajima, T., et al., *The presence of a methylation fingerprint of Helicobacter pylori infection in human gastric mucosae*. International journal of cancer, 2009. **124**(4): p. 905-10.
434. Lebreton, A., P. Cossart, und H. Bierne, *Bacteria tune interferon responses by playing with chromatin*. Virulence, 2012. **3**(1): p. 87-91.
435. Ehrlich, M., *DNA methylation in cancer: too much, but also too little*. Oncogene, 2002. **21**(35): p. 5400-13.
436. Multhoff, G., M. Molls, und J. Radons, *Chronic inflammation in cancer development*. Frontiers in Inflammation, 2012. **2**(98).

437. Clark, C., et al., *A comparison of the whole genome approach of MeDIP-seq to the targeted approach of the Infinium HumanMethylation450 BeadChip(R) for methylome profiling*. PloS one, 2012. **7**(11): p. e50233.
438. Kantlehner, M., et al., *A high-throughput DNA methylation analysis of a single cell*. Nucleic acids research, 2011. **39**(7): p. e44.
439. Scacheri, P.C., G.E. Crawford, and S. Davis, *Statistics for ChIP-chip and DNase hypersensitivity experiments on NimbleGen arrays*. Methods in enzymology, 2006. **411**: p. 270-82.
440. Han, H., et al., *DNA methylation directly silences genes with non-CpG island promoters and establishes a nucleosome occupied promoter*. Human molecular genetics, 2011. **20**(22): p. 4299-310.
441. Le Romancer, M., et al., *Methylation, a key step for nongenomic estrogen signaling in breast tumors*. Steroids, 2010. **75**(8-9): p. 560-4.
442. Wysocka, J., C.D. Allis, and S. Coonrod, *Histone arginine methylation and its dynamic regulation*. Frontiers in bioscience, 2006. **11**: p. 344-55.
443. Seligson, D.B., et al., *Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence*. Nature, 2005. **435**(7046): p. 1262-6.
444. Goulet, I., et al., *Alternative splicing yields protein arginine methyltransferase 1 isoforms with distinct activity, substrate specificity, and subcellular localization*. The Journal of biological chemistry, 2007. **282**(45): p. 33009-21.
445. Nicholson, T.B., T. Chen, and S. Richard, *The physiological and pathophysiological role of PRMT1-mediated protein arginine methylation*. Pharmacological research, 2009. **60**(6): p. 466-74.
446. Bedford, M.T. and S. Richard, *Arginine methylation an emerging regulator of protein function*. Molecular cell, 2005. **18**(3): p. 263-72.
447. Ariazi, E.A., G.M. Clark, and J.E. Mertz, *Estrogen-related receptor alpha and estrogen-related receptor gamma associate with unfavorable and favorable biomarkers, respectively, in human breast cancer*. Cancer research, 2002. **62**(22): p. 6510-8.
448. Sangrajrang, S., et al., *Genetic polymorphisms of estrogen metabolizing enzyme and breast cancer risk in Thai women*. International journal of cancer, 2009. **125**(4): p. 837-43.
449. Sun, P., et al., *Expression of estrogen receptor-related receptors, a subfamily of orphan nuclear receptors, as new tumor biomarkers in ovarian cancer cells*. Journal of molecular medicine, 2005. **83**(6): p. 457-67.
450. Gao, M., et al., *Expression of estrogen receptor-related receptor isoforms and clinical significance in endometrial adenocarcinoma*. International journal of gynecological cancer, 2006. **16**(2): p. 827-33.
451. Yu, S., et al., *ERRgamma suppresses cell proliferation and tumor growth of androgen-sensitive and androgen-insensitive prostate cancer cells and its implication as a therapeutic target for prostate cancer*. Cancer research, 2007. **67**(10): p. 4904-14.
452. Zhang, Y. and L. Wang, *Nuclear receptor SHP inhibition of Dnmt1 expression via ERRgamma*. FEBS letters, 2011. **585**(9): p. 1269-75.
453. Alekseev, O.M., et al., *Depletion of the histone chaperone tNASP inhibits proliferation and induces apoptosis in prostate cancer PC-3 cells*. Reproductive biology and endocrinology, 2011. **9**: p. 50.
454. de Stanchina, E., et al., *E1A signaling to p53 involves the p19(ARF) tumor suppressor*. Genes & development, 1998. **12**(15): p. 2434-2442.
455. Berk, A.J., *Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus*. Oncogene, 2005. **24**(52): p. 7673-85.
456. Son, K., et al., *Doxycycline induces apoptosis in PANC-1 pancreatic cancer cells*. Anticancer research, 2009. **29**(10): p. 3995-4003.
457. Hackstadt, T., et al., *Chlamydia trachomatis interrupts an exocytic pathway to acquire endogenously synthesized sphingomyelin in transit from the Golgi apparatus to the plasma membrane*. The EMBO journal, 1996. **15**(5): p. 964-977.
458. Heuer, D., et al., *Chlamydia causes fragmentation of the Golgi compartment to ensure reproduction*. Nature, 2009. **457**(7230): p. 731-735.
459. Moore, E.R., et al., *The chlamydial inclusion preferentially intercepts basolaterally directed sphingomyelin-containing exocytic vacuoles*. Traffic, 2008. **9**(12): p. 2130-2140.
460. Ogretmen, B., et al., *Role of ceramide in mediating the inhibition of telomerase activity in A549 human lung adenocarcinoma cells*. The Journal of biological chemistry, 2001. **276**(27): p. 24901-24910.
461. Wooten-Blanks, L.G., et al., *Mechanisms of ceramide-mediated repression of the human telomerase reverse transcriptase promoter via deacetylation of Sp3 by histone deacetylase 1*. FASEB journal, 2007. **21**(12): p. 3386-97.
462. Doms, R.W., G. Russ, and J.W. Yewdell, *Brefeldin A redistributes resident and itinerant Golgi proteins to the endoplasmic reticulum*. The Journal of cell biology, 1989. **109**(1): p. 61-72.

463. Hackstadt, T., M.A. Scidmore, und D.D. Rockey, *Lipid metabolism in Chlamydia trachomatis-infected cells: directed trafficking of Golgi-derived sphingolipids to the chlamydial inclusion*. Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 1995. **92**(11): p. 4877-4881.
464. Yang, Q., *Cellular senescence, telomere recombination and maintenance*. Cytogenetic and genome research, 2008. **122**(3-4): p. 211-218.
465. Artandi, S.E. und L.D. Attardi, *Pathways connecting telomeres and p53 in senescence, apoptosis, and cancer*. Biochemical and biophysical research communications, 2005. **331**(3): p. 881-890.
466. Cmielova, J., et al., *DNA damage caused by ionizing radiation in embryonic diploid fibroblasts WI-38 induces both apoptosis and senescence*. Physiological research, 2011. **60**(4): p. 667-677.
467. Shieh, S.Y., et al., *DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2*. Cell, 1997. **91**(3): p. 325-34.
468. Millau, J.F., et al., *p53 Pre- and post-binding event theories revisited: stresses reveal specific and dynamic p53-binding patterns on the p21 gene promoter*. Cancer research, 2009. **69**(21): p. 8463-8471.
469. Nozell, S. und X. Chen, *p21B, a variant of p21(Waf1/Cip1), is induced by the p53 family*. Oncogene, 2002. **21**(8): p. 1285-1294.
470. Gu, B. und W.G. Zhu, *Surf the post-translational modification network of p53 regulation*. International Journal of biological sciences, 2012. **8**(5): p. 672-684.
471. Karpinich, N.O., et al., *The course of etoposide-induced apoptosis from damage to DNA and p53 activation to mitochondrial release of cytochrome c*. The Journal of biological chemistry, 2002. **277**(19): p. 16547-16552.
472. Fernandes-Alnemri, T., G. Litwack, und E.S. Alnemri, *CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme*. The Journal of biological chemistry, 1994. **269**(49): p. 30761-4.
473. Hill, R., et al., *DNA-PKCS binding to p53 on the p21WAF1/CIP1 promoter blocks transcription resulting in cell death*. Oncotarget, 2011. **2**(12): p. 1094-1108.
474. Abdul-Sater, A.A., et al., *Enhancement of reactive oxygen species production and chlamydial infection by the mitochondrial Nod-like family member NLRX1*. The Journal of biological chemistry, 2010. **285**(53): p. 41637-45.
475. Rivera, J., et al., *Chlamydia pneumoniae induces a pro-inflammatory phenotype in murine vascular smooth muscle cells independently of elevating reactive oxygen species*. Clinical and experimental pharmacology and physiology, 2012. **39**(3): p. 218-26.
476. Braithwaite, A.W., et al., *Adenovirus-induced alterations of the cell growth cycle: a requirement for expression of E1A but not of E1B*. Journal of virology, 1983. **45**(1): p. 192-199.
477. Kolli, S., et al., *Antisense-mediated depletion of p300 in human cells leads to premature G1 exit and up-regulation of c-MYC*. Proceedings of the national academy of sciences, 2001. **98**(8): p. 4646-4651.
478. Spindler, K.R., C.Y. Eng, und A.J. Berk, *An adenovirus early region 1A protein is required for maximal viral DNA replication in growth-arrested human cells*. Journal of virology, 1985. **53**(3): p. 742-750.
479. Shay, J.W., W.E. Wright, und H. Werbin, *Defining the molecular mechanisms of human cell immortalization*. Biochimica et biophysica acta, 1991. **1072**(1): p. 1-7.
480. Dazard, J.E., et al., *The dynamics of E1A in regulating networks and canonical pathways in quiescent cells*. BMC research notes, 2011. **4**(160).
481. Howe, J.A. und S.T. Bayley, *Effects of Ad5 E1A mutant viruses on the cell cycle in relation to the binding of cellular proteins including the retinoblastoma protein and cyclin A*. Virology, 1992. **186**(1): p. 15-24.
482. Manning, A.L. und N.J. Dyson, *pRB, a tumor suppressor with a stabilizing presence*. Trends in cell biology, 2011. **21**(8): p. 433-441.
483. Artandi, S.E. und R.A. DePinho, *Telomeres and telomerase in cancer*. Carcinogenesis, 2010. **31**(1): p. 9-18.
484. Rampazzo, E., et al., *Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers*. British journal of cancer, 2010. **102**(8): p. 1300-1305.
485. Jones, C.H., C. Pepper, und D.M. Baird, *Telomere dysfunction and its role in haematological cancer*. British journal of haematology, 2012. **156**(5): p. 573-587.
486. Lin, T.T., et al., *Telomere dysfunction and fusion during the progression of chronic lymphocytic leukemia: evidence for a telomere crisis*. Blood, 2010. **116**(11): p. 1899-1907.
487. Martinez-Delgado, B., et al., *Genetic anticipation is associated with telomere shortening in hereditary breast cancer*. PLOS genetics, 2011. **7**(7): p. e1002182.
488. Fumagalli, M., et al., *Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation*. Nature cell biology, 2012. **14**(4): p. 355-365.
489. Stadler, G., et al., *Low telomerase activity: possible role in the progression of human medullary thyroid carcinoma*. European journal of cancer, 2008. **44**(6): p. 866-875.

490. Ding, Z., et al., *Telomerase Reactivation following Telomere Dysfunction Yields Murine Prostate Tumors with Bone Metastases*. Cell, 2012. **148**(5): p. 896-907.
491. Szilard, R.K., et al., *Systematic identification of fragile sites via genome-wide location analysis of gamma-H2AX*. Nature structural & molecular biology, 2010. **17**(3): p. 299-305.
492. Verdun, R.E., et al., *Functional human telomeres are recognized as DNA damage in G2 of the cell cycle*. Molecular cell, 2005. **20**(4): p. 551-61.
493. d'Adda di Fagagna, F., et al., *A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence*. Nature, 2003. **426**(6963): p. 194-8.
494. Jullien, L., et al., *Eroded human telomeres are more prone to remain uncapped and to trigger a G2 checkpoint response*. Nucleic acids research, 2013. **41**(2): p. 900-11.
495. Nakamura, A.J., C.E. Redon, und O.A. Sedelnikova, *Where did they come from? The origin of endogenous gamma-H2AX foci in tumor cells*. Cell Cycle, 2009. **8**(15): p. 2324.
496. Takai, H., A. Smogorzewska, und T. de Lange, *DNA damage foci at dysfunctional telomeres*. Current biology, 2003. **13**(17): p. 1549-56.
497. Blasco, M.A. und W.C. Hahn, *Evolving views of telomerase and cancer*. Trends in cell biology, 2003. **13**(6): p. 289-94.
498. Cesare, A.J. und J.D. Griffith, *Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops*. Molecular & cellular biology, 2004. **24**(22): p. 9948-57.
499. Masutomi, K., et al., *The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses*. Proceedings of the national academy of sciences, 2005. **102**(23): p. 8222-7.
500. Bode, A.M. und Z. Dong, *Cancer prevention by food factors through targeting signal transduction pathways*. Nutrition, 2004. **20**(1): p. 89-94.
501. Sasaki, T., et al., *Progressive loss of SIRT1 with cell cycle withdrawal*. Aging Cell, 2006. **5**(5): p. 413-22.
502. Bosch-Presegue, L. und A. Vaquero, *The dual role of sirtuins in cancer*. Genes & Cancer, 2011. **2**(6): p. 648-62.
503. Peck, B., et al., *SIRT inhibitors induce cell death and p53 acetylation through targeting both SIRT1 and SIRT2*. Molecular cancer therapeutics, 2010. **9**(4): p. 844-855.
504. Heisig, P., *Type II topoisomerases--inhibitors, repair mechanisms and mutations*. Mutagenesis, 2009. **24**(6): p. 465-9.
505. Officer, J.E. und A. Brown, *Serial changes in virus and cells in cultures chronically infected with psittacosis virus*. Virology, 1961. **14**: p. 88-99.
506. Kessler, M., et al., *Chlamydia trachomatis disturbs epithelial tissue homeostasis in fallopian tubes via paracrine Wnt signaling*. American journal of pathology, 2012. **180**(1): p. 186-198.
507. Gunes, C. und K.L. Rudolph, *The role of telomeres in stem cells and cancer*. Cell, 2013. **152**(3): p. 390-3.
508. Mehlitz, A., et al., *Tarp regulates early Chlamydia-induced host cell survival through interactions with the human adaptor protein SHC1*. The Journal of cell biology, 2010. **190**(1): p. 143-157.
509. Paba, P., et al., *Co-expression of HSV2 and Chlamydia trachomatis in HPV-positive cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia lesions is associated with aberrations in key intracellular pathways*. Intervirology, 2008. **51**(4): p. 230-234.
510. Rodel, J., et al., *Persistent Chlamydia trachomatis infection of HeLa cells mediates apoptosis resistance through a Chlamydia protease-like activity factor-independent mechanism and induces high mobility group box 1 release*. Infection and immunity, 2012. **80**(1): p. 195-205.
511. Sharma, M., et al., *HIF-1alpha is involved in mediating apoptosis resistance to Chlamydia trachomatis-infected cells*. Cellular microbiology, 2011. **13**(10): p. 1573-1585.
512. Buchholz, K.R. und R.S. Stephens, *The extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway induces the inflammatory factor interleukin-8 following Chlamydia trachomatis infection*. Infection and immunity, 2007. **75**(12): p. 5924-5929.
513. Rajalingam, K., et al., *Mcl-1 is a key regulator of apoptosis resistance in Chlamydia trachomatis-infected cells*. PLoS one, 2008. **3**(9): p. e3102.
514. Verbeke, P., et al., *Recruitment of BAD by the Chlamydia trachomatis vacuole correlates with host-cell survival*. PLoS pathogens, 2006. **2**(5): p. e45.
515. Johnson, K.A., M. Tan, und C. Sutterlin, *Centrosome abnormalities during a Chlamydia trachomatis infection are caused by dysregulation of the normal duplication pathway*. Cellular microbiology, 2009. **11**(7): p. 1064-1073.
516. Grieshaber, S.S., et al., *Chlamydia trachomatis causes centrosomal defects resulting in chromosomal segregation abnormalities*. Traffic, 2006. **7**(8): p. 940-949.
517. Harley, C.B., A.B. Futcher, und C.W. Greider, *Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts*. Nature, 1990. **345**(6274): p. 458-60.
518. Ershler, W.B. und D.L. Longo, *Aging and cancer: issues of basic and clinical science*. Journal of the national cancer institute, 1997. **89**(20): p. 1489-97.

- 
519. Hannum, G., et al., *Genome-wide methylation profiles reveal quantitative views of human aging rates*. Molecular cell, 2013. **49**(2): p. 359-67.
  520. Hosenfeld, C.B., et al., *Repeat infection with Chlamydia and gonorrhea among females: a systematic review of the literature*. Sexually transmitted diseases, 2009. **36**(8): p. 478-89.
  521. Bosch, F.X., et al., *The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer*. Journal of clinical pathology, 2002. **55**(4): p. 244-65.
  522. Walboomers, J.M., et al., *Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide*. The Journal of pathology, 1999. **189**(1): p. 12-9.
  523. Bierne, H. und P. Cossart, *When bacteria target the nucleus: the emerging family of nucleomodulins*. Cellular microbiology, 2012. **14**(5): p. 622-33.
  524. Madeleine, M.M., et al., *Risk of cervical cancer associated with Chlamydia trachomatis antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors*. International journal of cancer, 2007. **120**(3): p. 650-5.

## 4.2 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µm	Mikrometer
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ABS	absolut
ANOVA	engl. <i>analysis of variance</i>
APS	Ammoniumpersulfat
ATCC	engl. <i>American Type Culture Collection</i>
BCR	engl. <i>B cell receptor</i>
BFA	Brefeldin A
bp	Basenpaar
BS	Bindestelle
BSA	engl. <i>bovine serum albumin</i>
C	Cytosin
Cag	engl. <i>cytotoxin-associated gene</i>
CagA	engl. <i>cytotoxin-associated gene A</i>
CagL	engl. <i>cytotoxin-associated gene L</i>
cfu	engl. <i>colony forming unit</i>
Caspase	<i>cysteinyI-aspartate specific protease</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
CIN	<i>cervical intraepithelial neoplasia</i>
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
CpGI	Cytosin-phosphatidyl-Guanin-Insel(n)
C <sub>t</sub>	engl. <i>threshold cycle</i>
<i>Ctr, C. trachomatis</i>	<i>Chlamydia trachomatis</i>
d	engl. <i>day(s)</i>
ddNTP(s)	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat(e)
DDR	engl. <i>DNA damage response</i>
DHS	engl. <i>DNase I hypersensitive sites</i>
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMR(s)	engl. <i>differentially methylated region(s)</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	engl. <i>deoxyribonucleic acid</i>
DNMT(s)	DNA-Methyltransferase(n)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
E1A	engl. <i>(Adenovirus) early region 1A</i>
EB	engl. <i>elementary body</i>
ELISA	engl. <i>enzyme linked immunosorbent assay</i>

EPIYA	Glu-Pro-Ile-Tyr-Ala
FACS	engl. <i>fluorescence activated cell sorting</i>
FAK	fokale Adhäsionskinase
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G	Guanin
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
GCA	Golgicid A
GO	engl. <i>gene ontology</i>
h	Stunde(n)
H	Histon
H3K4	Histon H4 Lysin 4
H3K9me <sup>3</sup>	Histon H3 Lysin 9-Trimethylierung
H3S10	Histon H3 Serin 10
H3S28	Histon H3 Serin 28
H3T3	Histon H3 Threonin 3
H3T11	Histon H3 Threonin 11
HAT(s)	Histonacetyltransferase(n)
HDAC(s)	Histondeacetylase(n)
HMT(s)	Histonmethyltransferase(n)
<i>Hpy, H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
I.F.U.	engl. <i>inclusion forming units</i>
k	Korrelationskoeffizient
kb	Kilobase
kbp	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KEGG	engl: <i>Kyoto encyclopedia of genes and genomes</i>
L2	Serovar L2
log	Logarithmus
LPS	Lipopolysaccharid
M	methyliert
<i>M. genitalium</i>	<i>Mycoplasma genitalium</i>
<i>M. hyorhinis</i>	<i>Mycoplasma hyorhinis</i>
mA	Milliampere
MALT	engl. <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>
MAP	engl. <i>MBD affinity purification</i>
MAPK	engl. <i>mitogen-activated protein kinase</i>
MBD	engl. <i>methyl-CpG-binding domain</i>
Mbp	Megabasenpaar
mCpG	methylierte CpG
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MOI	engl. <i>multiplicity of infection</i>

Mrd.	Milliarde
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NI	nicht infiziert
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
<i>p.i.</i>	lat. <i>post infectionem</i>
PAI	Pathogenitätsinsel
PB	engl. <i>persistent body</i>
PBS	engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	lat: <i>pondus Hydrogenii</i>
PI	Propidiumiodid
PIC	engl. <i>proteases inhibitor cocktail</i>
PNA	engl. <i>peptide nucleic acid</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
p-Wert	engl. <i>probability</i> , Wahrscheinlichkeits-Wert
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> PCR
RB	engl. <i>reticulate body</i>
RNA	engl. <i>ribonucleic acid</i>
RPMI	engl. <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	Raumtemperatur
RTA	relative Telomerase Aktivität
RT-PCR	<i>real time</i> PCR
S	Synthese
s	Sekunde(n)
SD	Standardabweichung (engl. <i>standard deviation</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SE	Standardfehler (engl. <i>standard error</i> )
siRNA	engl. <i>small interfering RNA</i>
SPG	Saccharose-Natriumphosphat-Glutamat
spp.	lat. <i>species pluralis</i>
Src	engl. <i>Sarc</i> (Kurzform für <i>sarcoma</i> )
STD	engl. <i>sexually transmitted diseases</i>
T	Thymin
T3SS	Typ-III-Sekretionssystem
T4SS	Typ-IV-Sekretionssystem
Tab.	Tabelle
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS	engl. <i>TRIS-buffered saline</i>
TBST	engl. <i>TRIS-buffered saline-tween</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRAP	engl. <i>Telomeric Repeat Amplification Protocol</i>



---

TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
TSS	Transkriptionsstart
U	unmethyliert
u.a.	unter anderem
UTR	engl. <i>untranslated region</i>
UT	engl. <i>untreated</i>
UV	Ultraviolett
v/v	engl. <i>volume per volume (Volumen pro Volumen)</i>
VacA	engl: <i>vacuolating toxin A</i>
Vol.	Volumen
vs.	lat. <i>versus</i>
w/v	engl. <i>weight per volume (Masse pro Volumen)</i>
WHO	engl. <i>World Health Organization</i>
WT	Wildtyp

### 4.3 Ergänzendes Material

Auf einer CD-ROM im Anhang befinden sich die Daten der Microarrays und die für die Datenauswertung verwendete R-Skripte. Das ergänzende Material ist nicht in der Online-Version dieser Dissertation erhältlich.

## 4.4 Danksagungen

Meinem Doktorvater Prof. Dr. Thomas F. Meyer gilt mein erster Dank: Er hat mir nicht nur die Möglichkeit gegeben, in einem inspirierenden Umfeld wie dem Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie an einer sehr spannenden und zeitgemäßen Fragestellung zur Wirt-Pathogen-Interaktion zu arbeiten, sondern meine Arbeit mit seinem Wissen und seiner Erfahrung geleitet, unterstützt und dabei alle Freiheiten für wissenschaftliches Vorgehen gewährt.

Sehr herzlich möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Rupert Mutzel von der Freien Universität Berlin bedanken, der mich nun über einige Lehrjahre hinweg begleitet: Er hat sich nicht nur bereit erklärt, meine Diplomarbeit zu begutachten, sondern nun auch meine Doktorarbeit.

In der Abteilung Molekulare Biologie am Max-Planck-Institut für Infektionsbiologie habe ich viele kompetente und hilfsbereite Kollegen kennenlernen dürfen, deren Vielseitigkeit ich im beruflichen und im privaten Sinne schätze. Mein ganz persönlicher Dank gilt all jenen, mit denen ich zusammen arbeiten und fachsimpeln durfte: Dr. Sebastian Banhart, Dr. Holger Brüggemann, Dr. Fernando Garcia, Dr. Kate Holden-Dye, Dr. Mirjana Kessler, Dr. Hans-Joachim Mollenkopf, Dr. Inken Padberg, Manuela Peuker, Dr. Klaus-Peter Pleißner und Dr. Rike Zietlow. Dagmar Frahm, Anja Greiser, Angela Hamann, Angela Hecker, Kirstin Hoffmann und Ina Wagner gilt ein besonderer Dank für die äußerst freundliche und kompetente technische Unterstützung.

Auch außerhalb Berlins habe ich eine enge Zusammenarbeit erfahren dürfen: für fruchtbare Diskussionen und zahlreichen Ideen und ihre Gastfreundschaft danke ich besonders Dres. Nina und Gilles Gasparoni von der Universität des Saarlandes aus der Arbeitsgruppe um Prof Dr. Jörn Walter.

Für die herzliche Unterstützung außerhalb des Instituts möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken.

## 4.5 Curriculum Vitae

Aufgrund datenschutzrechtlicher Bestimmungen ist der Lebenslauf in der Online-Version dieser Dissertation nicht verfügbar.

## 4.6 Publikationen

**Janßen S.**, Gasparoni N., Gasparoni G., Walter J., Meyer T.F. Global analysis of differential DNA methylation in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. (in Vorbereitung)

Padberg I.\*, **Janßen S.\***, Meyer T.F. 2013. *Chlamydia trachomatis* inhibits telomeric DNA damage signaling via transient hTERT upregulation. *International Journal of Medical Microbiology*. 303(8):463-474. (**\*geteilte Erstautorenschaft**)

Fehri L., Rechner C.\*, **Janßen S.\***, Mak T.N., Holland C., Bartfeld S., Brüggemann H., Meyer T.F. 2009. *Helicobacter pylori*-induced modification of the histone H3 phosphorylation status in gastric epithelial cells reflects its impact on cell cycle regulation. *Epigenetics*. 4(8):577-86. (**\*geteilte Zweitautorenschaft**)

## 4.7 Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln erstellt habe.

Berlin, Juni 2013

Sabrina Janßen

---