

Zusammenfassung

Simone Bauer

Dr. sc. hum.

The effects of *TMPRSS2:ERG* expression on epigenomic modifications and signaling pathways in prostate cancer cells

Einrichtung: DKFZ

Doktorvater: Prof. Dr. Holger Sültmann

Ziel dieser Arbeit war es Mechanismen zu untersuchen, die zu epigenetischen Veränderungen in *TMPRSS2:ERG* (T2E) fusionspositivem Prostatakrebs (PCa) führen und sowie die Folgen von veränderter Genexpression, DNA-Methylierung, H3K27ac Histonmodifikation und miRNA Expression zu charakterisieren. Rund 50 % der PCas besitzen die *T2E* Genfusion, welche mit einem bestimmten Genexpressionsprofil assoziiert ist. In RNA-Seq-Daten der Kohorten des *The Cancer Genome Atlas Prostate Adenocarcinoma* Prostataadenokarzinom (TCGA-PRAD) oder des *International Cancer Genome Consortium-Early Onset Prostate Cancer* (ICGC-EOPC) werden in T2E+ Tumoren Gene des WNT-, TGF- β - und NOTCH-Signalwegs angeschaltet. Der NOTCH-Signalweg wurde im Vorfeld in Zusammenhang mit veränderter H3K27ac-Modifizierung gebracht. Die ersten Experimente mit PCa Zelllinien zeigten einen Zellzyklus-Arrest und eine Reduktion der invasiven Eigenschaften unter NOTCH-Inhibition, was auf ein onkogenes Potential dieses Signalwegs hindeutet. Des Weiteren wurden LNCaP-Zellen verwendet, welche die T2E Fusionsvariante III mittels Doxycyclin-Induktion überexprimieren (LNCaP T2E). In induzierten LNCaP T2E-Zellen konnte eine erhöhte Aktivität des NOTCH-Signalwegs festgestellt werden. Zusätzlich konnte mittels eines Luciferase Reporter Assays eine ERG-Bindestelle im *NOTCH1* Promoter identifiziert werden. Die Interaktion von ERG mit dem *NOTCH1* und *HES1* Promotor wurde außerdem mittels Chromatin-Immunopräzipitations (ChIP)-qPCR verifiziert. Zwei weitere Mechanismen der ERG-vermittelten NOTCH Regulation via *ICAM-1* und via *miR-449a* wurden festgestellt. *ICAM-1* wird in LNCaP T2E-Zellen und den TCGA-PRAD RNA-Seq-Daten durch ERG verstärkt exprimiert. Zudem konnte ich die bereits publizierte *ICAM-1* vermittelte *NOTCH1*- und *HES1*-Regulation verifizieren. Die ICGC-EOPC miRNA-Seq-Daten wurden gemäß des T2E-Fusionsstatus in zwei Gruppen geteilt. Unter den miRNAs, die am stärksten in T2E+ versus T2E- Tumoren reprimiert sind, befanden sich fünf Transkripte, die zur miR-449 Familie gehören. Die vorhergesagten Zielgene für *miR-449a*, *miR-449b-5p* und *miR-449c-5p* zeigten in Signalweganalysen die stärkste Signifikanz für NOTCH. Im LNCaP T2E-Modell konnte die reprimierende Wirkung von ERG auf *miR-449a* ebenfalls nachgewiesen werden. Transfektion der PCa-Zelllinien PC-3 und LNCaP mit *miR-449a*

mimics hatte eine Repression der NOTCH-Gene *NOTCH1*, *HES1* und *HDAC1* zur Folge. Knockdown-Experimente der Histondeacetylase *HDAC1* in VCaP- und LNCaP-Zellen ergaben eine verminderte Expression von NOTCH Genen, wie *HES1*. Es konnte zudem gezeigt werden, dass HDAC1 mit KDM1A interagiert um die Expression von *HES1* zu erhöhen. Dies geschieht mittels Repression des transkriptionellen Repressors *HES6*. *HES1*-Knockdown-Experimente zeigten, dass *HES1* für klonogene Eigenschaften und die Proliferation in LNCaP Zellen verantwortlich ist, da HES1 den Zellzyklus-Inhibitor *CDKN1A/p21* reprimiert. Eine erhöhte Expression des HES1-Proteins konnte auch in T2E fusionspositiven Prostatakarzinomgewebeproben, sogenannten Gewebemicroarrays, nachgewiesen werden.

Als Transkriptionsfaktor kann ERG verschiedene Gene, und somit auch epigenetisch aktive Enzyme, deregulieren und so ein ERG-spezifisches epigenetisches Muster vermitteln. In den TCGA-PRAD-Daten wurden die Tumoren anhand ihres *ERG*-Expressionsniveaus in T2E+ und T2E- Gruppen unterteilt. Überexpression von *ERG* vermittelt ein spezifisches DNA Methylierungsmuster, wie mittels Hauptkomponentenanalyse (PCA) der 5 % am stärksten variabel methylierten CpG-Dinukleotide verifiziert werden konnte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das globale Methylierungsmuster dem anderer Gewebe, wie dem Endometrium, ähnelt. Im Bereich von CpG Inseln oder Promotorregionen gibt es eine Hypomethylierung. CpG-Dinukleotide die im adulten Prostatagewebe hypomethyliert sind, sind wie erwartet, mit prostataspezifischen Genen assoziiert. Dies wurde mittels bioinformatischer Gewebe-Anreicherungs-Analyse gezeigt.

Um abzuschätzen welche Mechanismen zur Veränderung der DNA-Methylierung führen, wurde ein Methylierungsprofil von LNCaP T2E-Zellen nach *ERG*-Überexpression erstellt. Das globale Methylierungsmuster war dem der TCGA-PRAD Kohorte ähnlich. Die Daten wiesen eine Hypomethylierung von Promotorregionen und CpG-Inseln auf. Schon nach 72 Stunden *ERG*-Überexpression konnten Methylierungsunterschiede in den LNCaP T2E-Zellen festgestellt werden, welche eine ähnliche Effektstärke wie 5-Aza behandelte Zellen aufwiesen. Um Auslöser für die Methylierungsänderungen zu identifizieren, wurde ein Expressionsprofil von LNCaP T2E-Zellen erstellt. Unter allen TET- und DNMT-Enzymen, wies *DNMT1* die stärkste Deregulation auf (fold change = 0,58). In Folge dessen konnte ein Androgenrezeptor (AR)-abhängiger Mechanismus, welcher zur DNMT1-Repression in Verbindung mit einem Zellzyklus-Arrest führt, festgestellt werden. Abschließend konnte gezeigt werden, dass das *ERG*-assoziierte Gen *HLA-DMB* *in vivo* und *in vitro* in Abhängigkeit von Methylierung reguliert wird sowie mit Tumordinfiltration von M1 Makrophagen assoziiert ist.

Insgesamt wurden in dieser Arbeit neue *ERG*-gesteuerte Mechanismen und Signalwegregulationen in der Prostatakrebszelle gefunden, um zur Klärung der Konsequenzen der *TMPRSS2:ERG*-Fusion bei Entwicklung und Verlauf des Prostatakrebs beizutragen.