

Epigenetische Regulation durch 5-Azacytidin in myeloischen Neoplasien

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Anja Gawlitza

geboren am 10.09.1990 in Hamm

Gutachter

- 1. apl. Prof. Dr. med. Thomas Ernst, Jena**
- 2. apl. Prof. Dr. med. Bernd Gruhn, Jena**
- 3. Prof. Dr. med. Daniel Nowak, Mannheim**

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.06.2021

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Zusammenfassung	VI
1 Einleitung	1
1.1 Myeloische Neoplasien	1
1.2 Epigenetik	3
1.2.1 Epigenetische Modifikationen	3
1.2.2 Epigenetik und Tumorprogression	7
1.2.3 Epigenetische Therapien	8
1.2.4 Epigenetische Therapie mit 5-Azacytidin (Vidaza®)	8
1.3 Einordnung des Projektes in Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe	12
2 Ziele der Arbeit	13
3 Publierte Originalarbeit	14
 <i>5-Azacytidine modulates CpG methylation levels of EZH2 and NOTCH1 in myelodysplastic syndromes. Gawlitza AL, Speith J, Rinke J, Sajzew R, Muller EK, Schafer V, Hochhaus A, Ernst T. J Cancer Res Clin Oncol. 145(11):2835-2843. 2019.</i>	
4 Diskussion	24
4.1 Limitationen der Studie – eine kritische Evaluation	24
4.1.1 Methodik – Pyrosequenzierung	24
4.1.2 Untersuchungen an Zellkulturen	27
4.1.3 Untersuchungen an Patientenmaterial	27
4.2 Neue Erkenntnisse der Studie	28
4.3 Zusatzuntersuchungen/unpublizierte Daten	31
5 Schlussfolgerungen	36

Literatur- und Quellenverzeichnis _____	37
Tabellenverzeichnis _____	42
Abbildungsverzeichnis _____	43
Anhang _____	44

Abkürzungsverzeichnis

5-AzaC	5-Azacytidin
5hmC	5-Hydroxymethylcytosin
5mC	5-Methylcytosin
AML	Akute myeloische Leukämie
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CGI	<i>CpG island</i>
ChIP-Seq	<i>chromatin immunoprecipitation followed by sequencing</i>
CMML	Chronische myelomonozytäre Leukämie
CpGs	Cytosin-Guanin-Dinukleotide
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNMTs	DNA-Methyltransferasen
FCS	Fetales Kälberserum
G	Guanin
IC ₅₀	Halbmaximale Hemmkonzentration
IPSS	<i>International Prognostic Scoring System</i>
<i>LINE-1</i>	<i>Long Interspersed Nuclear Element-1</i>
MDS	myelodysplastische Syndrome
MPN	myeloproliferative Neoplasien
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
s.c.	subkutan
sAML	sekundäre akute myeloische Leukämie
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SZT	Stammzelltransplantation
TET	<i>Ten-eleven translocation</i>

Zusammenfassung

Die demethylierende Substanz 5-Azacytidin (5-AzaC, Vidaza®) ist für Patienten mit myelodysplastischen Syndromen (MDS), chronischer myelomonozytärer Leukämie (CMML) und akuter myeloischer Leukämie (AML) zugelassen, die nicht für eine Stammzelltransplantation (SZT) geeignet sind. Neben einer allogenen SZT als kurativem Therapieansatz, der bei älteren Patienten aufgrund von Komorbiditäten allerdings meist nicht in Frage kommt, stellt 5-AzaC die einzige zugelassene Therapieoption dar. Die molekulare Wirkweise der Substanz ist nur unzureichend aufgeklärt. Gegenwärtig gibt es weder diagnostische Möglichkeiten Patienten, die von einer solchen epigenetischen Therapie profitieren würden, vor Therapiebeginn zu selektieren, noch einen klinisch evaluierten Biomarker, mit dem ein Therapiemonitoring möglich wäre.

Im Vorfeld dieses Projektes wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. Thomas Ernst die Mutationskinetik bei Patienten mit MDS und CMML unter Therapie mit 5-AzaC untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass ein Therapieansprechen mit einer Stabilisierung der klonalen Architektur assoziiert ist. Daher ist die quantitative Bestimmung der Mutationslast, im Gegensatz zu anderen hämatologischen Erkrankungen, nicht für ein Therapiemonitoring geeignet. Die detektierten Mutationen betrafen vorwiegend epigenetische Regulatorgene. Dieser Sachverhalt legt eine enge Beziehung zwischen Genetik und Epigenetik nahe.

Die vorliegende Promotionsarbeit befasste sich mit der funktionellen Untersuchung zur molekularen Wirkweise von 5-AzaC. Dies könnte zukünftig dazu beitragen, neue Therapie- und Prognosemarker für Patienten mit myeloischen Erkrankungen unter 5-AzaC zu identifizieren.

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde zunächst ein Methylierungsscreening leukämieassoziiertes Gene in mehreren myeloischen Zelllinien und gesunden Probanden durchgeführt. An zwei myeloischen Zelllinien (ELF-153 und MOLM-13) wurde das Methylierungsverhalten potenzieller Zielgene nach einmaliger Inkubation

mit der jeweiligen zelllinienspezifischen IC_{50} von 5-AzaC über 72 h charakterisiert. Abschließend wurden in einer klinisch und molekulargenetisch sehr gut charakterisierten Patientenkohorte aus MDS- (n = 10) und CMML-Patienten (n = 5) zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und des besten zytologischen Ansprechens globale Methylierungslevel anhand von *LINE-1* als Surrogatmarker bestimmt, und basierend auf den genannten Voruntersuchungen mögliche Zielgene von 5-AzaC evaluiert. Methodisch erfolgte die quantitative Bestimmung der CpG-Methylierung mittels Pyrosequenzierung.

In dieser Promotionsarbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass bei Patienten mit MDS und CMML spezifische CpGs von *EZH2* und *NOTCH1* als mögliche Zielgene eines epigenetischen Ansprechens auf 5-AzaC signifikant demethyliert wurden, wohingegen sich die globalen Methylierungslevel als stabil erwiesen.

Trotz der bislang unzureichend verstandenen funktionellen Rolle von CpG-Methylierungen stehen diese im Fokus klinischer Forschung, da sie sich als Biomarker eignen. Die quantitative Bestimmung von Methylierungsveränderungen könnte zukünftig einen neuen diagnostischen Ansatz für epigenetische Therapien darstellen. Ob die detektierten Veränderungen als Biomarker für klinisches Ansprechen geeignet sind, muss zukünftig in einer größeren klinischen Studie überprüft werden.

1 Einleitung

1.1 Myeloische Neoplasien

Nach Revision der WHO-Klassifikation hämatologischer Neoplasien von 2016 zählen folgende Krankheitsentitäten zu den myeloischen Neoplasien: myeloproliferative Neoplasien (MPN), die Mastozytose, myeloisch/lymphatische Neoplasien mit Eosinophilie, myelodysplastische/myeloproliferative Neoplasien (MDS/MPN), myelodysplastische Syndrome (MDS), und die akute myeloische Leukämie (AML) (Arber *et al.* 2016). Im Folgenden werden die für die Promotionsarbeit relevanten Entitäten näher erläutert:

Myelodysplastische Syndrome (MDS)

MDS sind klonale Knochenmarkserkrankungen, die durch eine insuffiziente Hämatopoese mit peripherer Zytopenie (meist Anämie) gekennzeichnet sind und eine Tendenz zur leukämischen Transformation aufweisen. Das Risiko der Entwicklung einer sekundären akuten myeloischen Leukämie (sAML) liegt bei ca. 30 %. MDS treten bevorzugt in höherem Lebensalter auf und gehören zu den häufigsten malignen hämatologischen Erkrankungen. Die Inzidenz liegt bei 4 - 5/100.000/Jahr und steigt im Alter über 70 Jahre auf > 30/100.000/Jahr an. Pathogenetisch wird eine schrittweise Akkumulation genomischer Schäden und epigenetischer Veränderungen als ursächlich diskutiert. Dabei kommt es zur Selektion maligner Stammzellen, die das Knochenmark klonal besiedeln und die gesunde Hämatopoese zunehmend verdrängen. Die myeloischen Vorläuferzellen sind reifungsgestört, besitzen allerdings eine relative Fähigkeit zur Differenzierung. Im Gegensatz zu akuten Leukämien besteht somit keine Differenzierungsblockade (Haferlach 2014, Hofmann *et al.* 2019, Porwit und Saft 2011). Historisch betrachtet wurde lange Zeit eine uneinheitliche Terminologie in Zusammenhang mit dieser Krankheitsentität verwendet. MDS wurden in Beschreibung von Fallberichten bis in die 1970er Jahre als „refraktäre Anämie“ oder „Präleukämie“ bezeichnet (Steensma 2012).

Chronische myelomonozytäre Leukämie (CMML)

Die CMML ist eine seltene maligne Erkrankung, gehört zu den MDS/MPN-Überlappungssyndromen und zeichnet sich ebenfalls durch eine klonale Hämatopoese aus. Diagnostische Kriterien sind eine persistierende Monozytose über drei Monate, Dysplasiezeichen im Knochenmark und Ausschluss anderer Ätiologien. CMML können sich wie MDS mit Monozytose als hämatopoetische Insuffizienz oder wie MPN mit Organomegalie präsentieren (Germing *et al.* 2019, Elmariah und DeZern 2019). Bei ca. 15 - 30 % der Patienten transformiert die CMML im Verlauf in eine sAML.

Akute myeloische Leukämie (AML)

Die AML ist eine maligne klonale Erkrankung hämatopoetischer Stammzellen und die häufigste akute Leukämieform bei Erwachsenen (Inzidenz ca. 4/100.000/Jahr, bei über 70-Jährigen auf > 100/100.000/Jahr steigend). Durch zytogenetische Aberrationen und Mutationen kommt es zur Differenzierungsblockade myeloischer Vorläuferzellen, einer massiven Vermehrung von Blasten und damit zur Depletion der gesunden Hämatopoese. Die Erkrankung kann auf dem Boden einer hämatologischen Grunderkrankung (z.B. MDS oder CMML), durch vorhergehende Chemotherapie, oder Bestrahlung als sAML entstehen, entwickelt sich aber zumeist *de novo* bei ansonsten Gesunden. Unbehandelt führt die Erkrankung innerhalb kurzer Zeit zum Tod (die Mortalität liegt unbehandelt bei 50 % innerhalb der ersten 5 Monate und bei 100 % innerhalb eines Jahres nach Beginn der ersten Symptome). Auch unter den aktuell zur Verfügung stehenden Therapiemöglichkeiten versterben ca. 70 % der über 65-Jährigen innerhalb eines Jahres nach Diagnosestellung (De Kouchkovsky und Abdul-Hay 2016, Röllig *et al.* 2019).

1.2 Epigenetik

Der Wissenszweig der Epigenetik beschäftigt sich mit vererbaren Veränderungen der Genexpression, die nicht durch die Abfolge der Basenpaare in der Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Sequenz kodiert sind (Baylin 2015). Der Begriff „Epigenetik“ wurde 1940 erstmalig von C.H. Waddington geprägt, der damit die Beziehung zwischen Genotyp und Phänotyp beschrieb (Van Speybroeck 2002). Die Epigenetik befasst sich dabei mit den Mechanismen, die dazu führen, dass aus identischem Erbgut (jede Zelle beinhaltet mit wenigen Ausnahmen identisches Erbmaterial) unterschiedlich differenzierte Zellen mit völlig unterschiedlicher Funktion entstehen können.

1.2.1 Epigenetische Modifikationen

Bislang wurden zahlreiche epigenetische Modifikationen identifiziert, darunter DNA-Methylierung, Nukleosomremodelling, Veränderungen nicht-kodierender RNA und posttranslationale Modifikation von Histonen (Baylin und Jones 2016).

Letztere beschreibt die Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung von Histonproteinen (Cedar und Bergman 2009), welche von Strahl und Allis als „*Histone Code*“ bezeichnet wurde (Strahl und Allis 2000). Diese Modifizierungen modulieren den Grad der Chromatinkondensation und regulieren dadurch die Transkriptionsaktivität eines Genabschnittes (Paluch *et al.* 2016). Bekannte Modifikationen sind beispielsweise H3K27ac und H3K4me1 (Acetylierung von Lysin 27, bzw. Monomethylierung von Lysin 4 des Histonproteins 3), die mit Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und distalen Enhancern assoziiert sind, sowie H3K4me3 (Trimethylierung von Lysin 4 des Histonproteins 3), welche im Bereich von aktiven Promotoren liegt (Calo und Wysocka 2013). Nach dem erfolgreich abgeschlossenen „*Human Genome Project*“ und Sequenzierung des gesamten menschlichen Genoms gibt es nun große Anstrengungen funktionelle Elemente der DNA zu identifizieren (*epigenomic profiling*). Das „*ENCODE*“-Projekt gilt als eines der größten seiner Art und zielt auf die Annotation sämtlicher funktioneller Elemente des menschlichen Genoms. Unter anderem können Histonmodifikationen, die mittels

ChIP-Seq (*chromatin immunoprecipitation followed by sequencing*) ermittelt und einzelnen Zelllinien bzw. Geweben zugeordnet wurden, öffentlich zugänglich eingesehen werden (Stanford University 2019).

Von allen epigenetischen Mechanismen am besten untersucht ist jedoch die DNA-Methylierung. Diese tritt in Säugetiergenomen normalerweise im Bereich von Cytosinen (C) auf, die von Guaninen (G) gefolgt werden, sogenannten CpG-Dinukleotiden (Paluch *et al.* 2016). Methylierung außerhalb des 5'-CG-3'-Kontextes konnte in embryonalen Stammzellen nachgewiesen werden (Lister *et al.* 2009). Die Übertragung von Methylgruppen auf das 5'-Kohlenstoffatom des Cytosins wird durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert. Das dabei entstehende 5-Methylcytosin (5mC) wird auch als „fünfte Base“ der DNA bezeichnet (Lister und Ecker 2009) und macht ca. 1 % der Nukleotide des menschlichen Genoms aus (Paluch *et al.* 2016). Die Erhaltungsmethylierung während der Replikationsphase konnte beim Menschen vorrangig DNMT1 zugeordnet werden. Dabei wird, bedingt durch eine Präferenz von DNMT1 für hemimethylierte DNA-Stränge, während der Zellteilung das Methylierungsmuster des Mutterstrangs auf den Tochterstrang übertragen (Jones und Liang 2009, Schermelleh *et al.* 2005). DNMT3a und DNMT3b sind in erster Linie *de novo* Methyltransferasen und werden vor allem in undifferenzierten Zellen exprimiert. Nach neuesten Erkenntnissen sind die Funktionen der DNMTs allerdings nicht strikt trennbar und nachweislich überlappend (Gujar *et al.* 2019). Ca. 50 % aller CpGs liegen in repetitiven Elementen, einschließlich der Promotorregion von *Long Interspersed Nuclear Element-1 (LINE-1)* (Lander *et al.* 2001, Xie *et al.* 2009). Methylierungen im Bereich repetitiver Elemente sind wichtig für die chromosomale Stabilität (Ma *et al.* 2013). Im Bereich von CpGs kommt es durch spontane hydrolytische Desaminierung gehäuft zu Punktmutationen mit Austausch von Cytosin gegen Thymin (Paluch *et al.* 2016). Dies führt dazu, dass der Gesamtanteil von CpGs am menschlichen Genom auf ca. 20 % des statistisch zu erwartenden Wertes sinkt (Gujar *et al.* 2019). Von den verbliebenen CpGs liegen ca. 70 % in methylierter Form vor (Liang und Weisenberger 2017). Regionen mit einer hohen CpG-Dichte werden CpG-Inseln (*CGI*) genannt. Nach Jones umfassen diese eine Sequenz von ca. 1000 Basenpaaren (bp) und liegen häufig im Bereich von Transkriptionsstartstellen,

innerhalb des Genkörpers (*gene body*) und in intergenischen Regionen (Jones 2012). Ca. 70 % aller annotierten Promotoren liegen im Bereich von CpG-Inseln, sodass sogenannte *CGI*-Promotoren den häufigsten Promotortyp ausmachen (Deaton und Bird 2011). Die meisten CpG-Inseln liegen hypomethyliert vor. Der Gesamtanteil hypermethylierter CpG-Inseln liegt studienabhängig bei 9 - 25 %, wobei in genomweiten Methylierungsanalysen hypermethylierte CpG-Inseln vorrangig distal von Promotorregionen zu finden sind (Illingworth und Bird 2009). Die exakte Definition von CpG-Inseln wird in der aktuellen Literatur weiterhin kontrovers diskutiert (Illingworth und Bird 2009) und ist nicht einheitlich. Genomweite Methylierungsanalysen haben den lange bestehenden wissenschaftlichen Fokus auf *CGI*-assoziierte Promotorregionen erweitert um *CGI-Shores* (Regionen in geringem Abstand zu CpG-Inseln), *CGI-Shelves* (Regionen mit einem größeren Abstand zu CpG-Inseln) und der *Open sea*-Region (Regionen ohne erhöhte CpG-Anreicherung) (Ma *et al.* 2013). Dabei gibt es Evidenz dafür, dass differentiell methylierte Regionen von krebs- und gewebespezifischen CpGs vor allem in *CGI-Shores* mit vergleichbar niedriger CpG-Dichte auftreten (Doi *et al.* 2009). DNA-Methylierungen regulieren physiologische Prozesse wie X-Chromosom-Inaktivierung, *Imprinting*, oder *Silencing* von repetitiven Elementen wie Retrotransposons, sind aber auch mit pathologischen Prozessen assoziiert, wie aberranter CpG-Methylierung bei malignen Erkrankungen (Jones und Liang 2009). Krebserkrankungen zeichnen sich durch eine genomweite Hypomethylierung mit lokus-spezifischer Hypermethylierung aus (Liang und Weisenberger 2017). Die genaue Funktion von CpG-Methylierungen ist aktueller Forschungsgegenstand. Neue Studienergebnisse lassen einen komplexen Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Genexpression vermuten. Promotorhypermethylierung kann im „Abschalten“ von Genen resultieren (*gene silencing*), wohingegen die Methylierung des Genkörpers mit erhöhter Genexpression korrelieren kann. Allerdings führen nicht alle Veränderungen der DNA-Methylierung zu Änderungen der Genexpression. Ma *et al.* konnten zeigen, dass in einigen Genen die Methylierung von Promotor oder Genkörper die Genexpression nicht beeinflusst (Ma *et al.* 2013). Lay *et al.* weisen DNA-Methylierung eine kontextabhängige Rolle zu und legen größeren Wert auf die Unterscheidung zwischen Methylierungen von

Promotoren in beziehungsweise außerhalb von CpG-Inseln (*CGI*-Promotor versus *non-CGI*-Promotor). Aktuelle Evidenz zeigt, dass der größte Effekt von DNA-Methylierung im Bereich von *CGI*-Promotoren und Enhancern liegt bei dort nachweislichem Nukleosomremodelling (Lay *et al.* 2015). Liang *et al.* gehen so weit, den Großteil von Methylierungsveränderungen in Krebserkrankungen hinsichtlich Expressionsveränderungen als bloße Zusatzerscheinung („passenger event“) zu bezeichnen (Liang und Weisenberger 2017). Trotz der bislang unzureichend verstandenen funktionellen Rolle von CpG-Methylierungen stehen sie im Fokus klinischer Forschung, da sie sich als Biomarker eignen (Liang und Weisenberger 2017).

Im Jahr 2009 wurde eine weitere modifizierte Base, das 5-Hydroxymethylcytosin (5hmC), identifiziert und als „sechste Base“ der DNA bezeichnet (Munzel *et al.* 2011). Diese entsteht durch Oxydierung von 5mC durch *Ten-eleven translocation (TET)*-Enzyme. Nach dem aktuellen Wissensstand wird 5hmC als Stoffwechselprodukt eines aktiven DNA-Demethylierungsprozesses beschrieben und ist Ausdruck von Differenzierung und Redifferenzierung. 5hmC wurde in größerer Dichte in embryonalen Stammzellen und im Zentralnervensystem von Säugetieren nachgewiesen (Wen *et al.* 2014). Neueste Studienergebnisse weisen 5hmC außerdem eine Rolle in der Differenzierung der hämatopoetischen Stammzelle sowie der Determinierung der Linienzugehörigkeit zu (Szilvia Ecsedi 2018). Neue Evidenz belegt, dass 5hmC unter anderem mit aktiver Transkription, CpG-Inseln und der 5'-Region von *LINE-1* assoziiert ist. Es besitzt epigenetische Regulationsfunktion und erleichtert die Transkription, vermutlich indem es Chromatin in einen „offenen“ Zustand überführt. 5hmC scheint außerdem eine protektive Rolle zu haben, da in verschiedenen Tumorgeweben eine geringere CpG > T-Mutationsfrequenz nachgewiesen werden konnte (Munzel *et al.* 2011).

Die genannten epigenetischen Mechanismen arbeiten nicht unabhängig voneinander, sondern es gibt zunehmend Hinweise, dass es ein ausgeprägtes Zusammenspiel, einen sogenannten „*crosstalk*“, der genannten Modifikatoren gibt. Beispielsweise legen Studien nahe, dass Histonmodifizierungen DNA-Methylierungen induzieren

können. DNA-Methylierungen ihrerseits können als „Vorlage“ für Histonmodifikationen nach der Replikation dienen (Cedar und Bergman 2009).

1.2.2 Epigenetik und Tumorprogression

Die *Two-Hit*-Hypothese von Knudson besagt, dass es durch mutationsbedingte Inaktivierung beider Allele eines Tumorsuppressorgens zur Krebsentstehung kommen kann (Knudson 1971). Beispielsweise werden Mutationen in epigenetischen Regulatorgenen (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*), die in hämatopoetischen Stammzellen und Vorläuferzellen einen „präleukämischen“ Zustand induzieren, in myeloischen Neoplasien als „*first hit*“ bewertet (Paluch *et al.* 2016). Epigenetische Veränderungen wie Promotorhypermethylierung können sich anstelle von später hinzutretenden Mutationen (*cooperating mutations*) im Sinne eines „*second hit*“ verhalten, was für die Krankheitsprogression von MDS zur AML gezeigt werden konnte (Paluch *et al.* 2016, Jiang *et al.* 2009). Somit kann ein abnormales epigenetisches Ereignis als frühe Ursache abnormaler klonaler Expansion hin zur Tumorprogression angesehen werden (Abb. 1.1) (Baylin 2015). Die zunehmende Evidenz für epigenetische Faktoren in der Tumorgenese stärkte das Bewusstsein für ein „Krebs-Epigenom“ (Baylin und Jones 2016).

Insgesamt ist das Gebiet der Epigenetik ein rasant wachsendes Wissenschaftsgebiet, welches belegt, dass epigenetische DNA-Modifikationen einen tiefgreifenden Einfluss auf Zellfunktion, zelluläre Differenzierung und Karzinogenese haben, auch ohne jegliche Veränderung der Gensequenz.

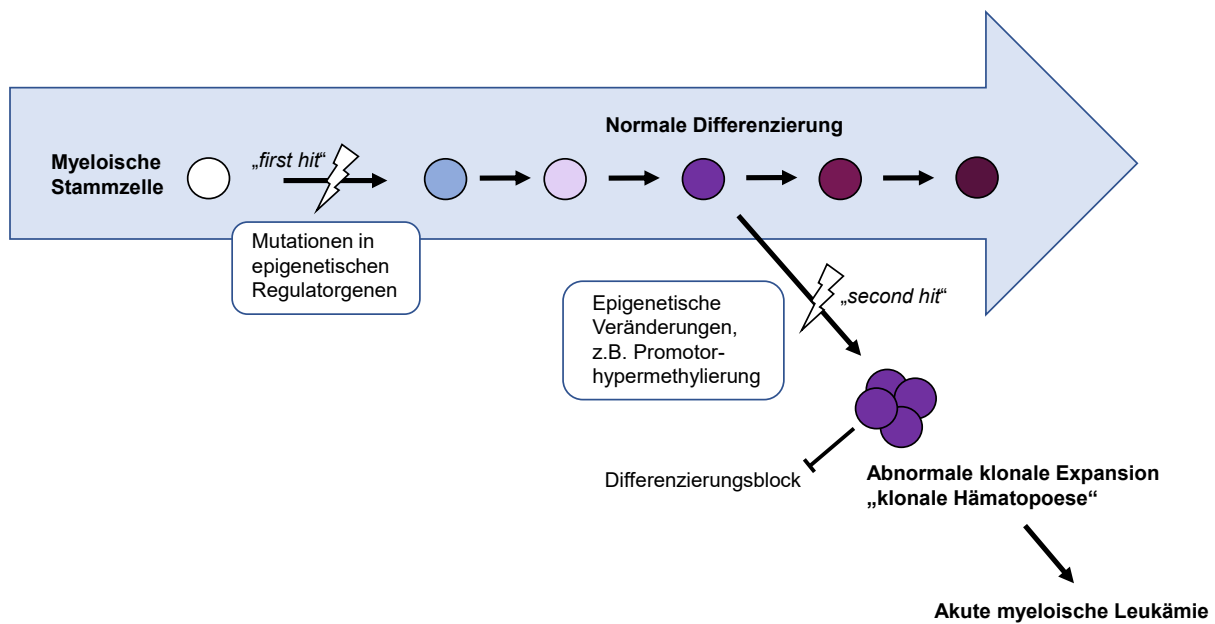


Abb. 1.1: Modell der Tumorprogression durch epigenetisches Gene-Silencing am Beispiel der leukämischen Transformation einer myeloischen Stammzelle.

Epigenetische Veränderungen können sich im Sinne eines „second hit“ nach Knudson verhalten und werden als frühe Ursache abnormaler klonaler Expansion hin zur Tumorprogression bewertet. (Quelle: Eigene Darstellung, modifiziert nach Baylin und Jones 2016)

1.2.3 Epigenetische Therapien

Erkenntnisse zum „Krebs-Epigenom“ wurden in der Vergangenheit zur Entwicklung einer Vielzahl von Krebstherapien herangezogen und haben Eingang in die klinische Routinepraxis gefunden. Beispiele für epigenetische Therapien sind demethylierende Substanzen wie 5-Azacytidin (Vidaza®) unter anderem im Einsatz bei MDS, Decitabin (Dacogen®) zugelassen bei AML und deacetylierende Substanzen wie Vorinostat (Zolinza®) bei kutanen T-Zell-Lymphomen und Panobinostat (Farydak®) bei Multiplen Myelomen (Baylin und Jones 2016, Paluch *et al.* 2016).

1.2.4 Epigenetische Therapie mit 5-Azacytidin (Vidaza®)

5-Azacytidin (5-AzaC) wurde im Jahr 1964 erstmalig synthetisiert und als hocheffektives Kanzerostatikum beschrieben (Šorm *et al.* 1964). Chemisch

unterscheidet sich 5-AzaC von dem Nucleosid Cytidin durch ein substituiertes Stickstoffatom an Position 5 des Pyrimidinrings (Abb. 1.2).

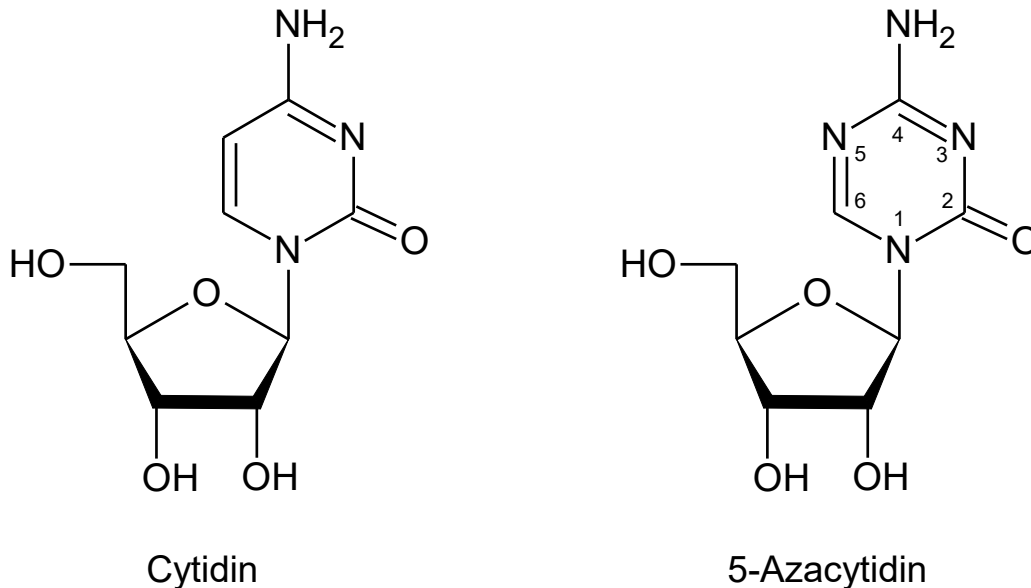


Abb. 1.2: Vergleich zwischen Cytidin und 5-Azacytidin (5-AzaC).

5-AzaC ist an Position 5 des Pyrimidinrings durch ein Stickstoffatom substituiert. Als Cytidinanalogon wirkt es als Antimetabolit. (Quelle: Eigene Darstellung).

Als Cytidin-Analogon wirkt es damit als Antimetabolit. Ca. 15 % der Substanz wird nach Aufnahme in die Zelle über Nucleosidtransporter und Metabolisierung (Triphosphorylierung zu 5-Aza-2'-Desoxycytidin-5'-Triphosphat) während der Replikation in der S-Phase in die DNA eingebaut, welches die Hemmung von DNMTs zur Folge hat (Paluch *et al.* 2016, Egger *et al.* 2004, Stresemann und Lyko 2008). Die demethylierende Eigenschaft von 5-AzaC wurde bereits 1980 von Jones und Taylor beschrieben (Jones und Taylor 1980). Schon der geringste Austausch von Cytosinen durch 5-AzaC (ca. 0,3 % 5-AzaC-Gehalt in der DNA) genügt, um mehr als 95 % der DNMTs in der Zelle zu inaktivieren (Creusot *et al.* 1982). Die kovalente Bindung zwischen 5-AzaC und DNA-Methyltransferasen führt zu einem stabilen DNA-Protein-Addukt (Santi *et al.* 1984, Schermelleh *et al.* 2005), aus welchem das Enzym nicht mehr freigesetzt werden kann. Der DNA-Schaden wird von postreplikativen

Reparaturmechanismen der Zelle erkannt und das Enzym im Verlauf degradiert (Abb.1.3) (Stresemann und Lyko 2008). Somit wird die Gesamtzahl an Methyltransferasen im Zytoplasma der Zelle gesenkt und die DNA-Methylierung während der folgenden DNA-Replikation gehemmt. Man spricht in diesem Zusammenhang auch von passiver Demethylierung oder auch Reduktion der Erhaltungsmethylierung (Hagemann *et al.* 2011). Die entstehenden DNA-Protein-Addukte sind direkt zytotoxisch und mutagen (Bhagwat und Roberts 1987, Christman 2002).

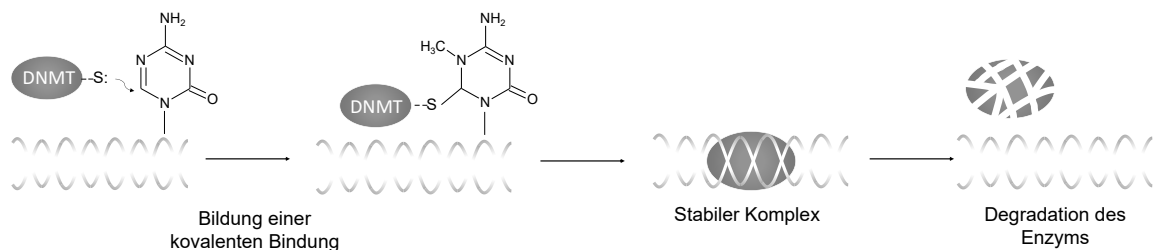


Abb. 1.3: Kovalente Bindung von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) durch 5-Azacytidin (5-AzaC).

Die kovalente Bindung zwischen 5-AzaC und DNMT führt zu einem stabilen DNA-Produkt, aus welchem das Enzym nicht mehr freigesetzt werden kann. Die DNMT wird im Verlauf degradiert. Es resultiert eine passive DNA-Demethylierung. (Quelle: Eigene Darstellung, modifiziert nach Schermelleh *et al.* 2005 und Stresemann *et al.* 2008)

Ghoshal *et al.* wiesen in einer Studie an 5-Aza-2'-Desoxycytidin (Decitabin), einem Metaboliten von 5-AzaC, auf einen medikamenten-induzierten proteosomalen Abbauweg von DNMTs hin, welcher unabhängig von der DNA-Replikation abläuft (Ghoshal *et al.* 2005). Dieser alternative Abbauweg erklärt die Beobachtung, dass die DNMT-Aktivität schneller sinkt als der Einbau von 5-AzaC in die DNA erfolgt (Creusot *et al.* 1982). Der Verlust von DNMTs kann als ein Schlüsselement therapeutischer Wirksamkeit von 5-AzaC bezeichnet werden (Baylin und Jones 2016). Der weitaus größere Anteil der Substanz, ca. 80 - 90 %, wird in die Ribonukleinsäuren (RNA) eingebaut und führt zur Hemmung der Proteinsynthese (Li *et al.* 1970). 5-AzaC hat einen dosisabhängigen dualen Wirkmechanismus: in höheren Dosierungen kommt es

zu Zytotoxizität bedingt durch den Einbau in DNA und RNA, in niedrigeren Dosierungen zu DNA-Hypomethylierung durch Depletion von DNMTs (Hollenbach *et al.* 2010).

Zurzeit ist 5-AzaC (internationaler Freiname des Arzneimittels: Azacitidin) in der Europäischen Union als „Orphan Drug“ bei erwachsenen Patienten zugelassen, die nicht für eine allogene Stammzelltransplantation geeignet sind und eine der folgenden drei Krankheitsentitäten aufweisen: MDS, AML oder CMML. Die genauen Indikationskriterien lauten (European Medicines Agency 2016):

- MDS mit intermediärem Risiko 2 oder hohem Risiko nach International Prognostic Scoring System (IPSS)
- AML mit 20-30 % Blasten und Mehrliniendysplasie gemäß WHO-Klassifikation
- AML > 30 % Blasten im Knochenmark gemäß WHO-Klassifikation
- CMML mit 10-29 % Knochenmarkblasten ohne myeloproliferative Störung

In einer randomisierten klinischen Studie von 2002 konnte für Hochrisiko-MDS-Patienten unter Therapie mit 5-AzaC subkutan (s.c.) ein verbessertes Überleben, ein niedrigeres Transformationsrisiko in eine akute Leukämie und eine verbesserte Lebensqualität im Vergleich zu rein supportiver Therapie belegt werden (Silverman *et al.* 2002). Bei Patienten der AZA-001-Studie (internationale, randomisierte, kontrollierte Phase-III-Studie) betrug die mediane Überlebenszeit 24,5 Monate im Vergleich zu 15 Monaten bei konventioneller Therapie (Fenaux *et al.* 2009, Khan *et al.* 2012). Die Behandlung erfolgt täglich als s.c.-Gabe ($75\text{mg}/\text{m}^2$) an sieben aufeinanderfolgenden Tagen, gefolgt von einer Behandlungspause von 21 Tagen (28-tägiger Behandlungszyklus) (Celgene Stand April 2019).

5-Azanuekleotide werden darüber hinaus zurzeit in klinischen Studien bei Patienten mit soliden Tumoren evaluiert (Liang und Weisenberger 2017).

Obwohl die Therapie mit 5-AzaC für oben genannte myeloische Neoplasien zum klinischen Standard geworden ist, sprechen nur etwa die Hälfte der Patienten auf die Therapie an und es gibt aktuell keine Möglichkeit Ansprechen oder Therapieversagen vorherzusagen (Paluch *et al.* 2016).

1.3 Einordnung des Projektes in Forschungsarbeiten der Arbeitsgruppe

Die Forschungsgruppe von Prof. Dr. med. Thomas Ernst beschäftigte sich im Vorfeld dieses Projektes mit der molekulargenetischen Architektur bzw. der Mutationskinetik von Patienten mit MDS und CMML unter Therapie mit 5-AzaC. Das Projekt konnte durch Betrachtung epigenetischer Faktoren derselben Patientenkohorte sinnvoll erweitert werden, und wurde um funktionelle *in vitro* Experimente an myeloischen Zelllinien ergänzt.

2 Ziele der Arbeit

Fokus dieser Forschungsarbeit lag auf epigenetischen Veränderungen unter der Therapie mit 5-AzaC. Ziel war es, das therapeutische Ansprechen hinsichtlich möglicher epigenetisch veränderter Zielgene zu untersuchen, welche zukünftig möglicherweise als Biomarker für ein Ansprechen auf die Therapie genutzt werden könnten. Dazu sollte die Wirkweise der Substanz hinsichtlich globaler Methylierungslevel und in Bezug auf CpG-Methylierungen leukämieassoziiierter Gene sowohl im Zellmodell als auch an Patientenproben mittels Pyrosequenzierung analysiert werden.

Hypothesen der Arbeit:

- (Hyper-)methylierte DNA-Regionen sind mögliche Targets der demethylierenden Substanz 5-AzaC.
- Der Krankheitsverlauf von Patienten unter Therapie mit 5-AzaC ist mit einer Veränderung des Epigenoms, insbesondere einer Veränderung der CpG-Methylierung, assoziiert.

Folgende Arbeitsschritte wurden zur Untersuchung der Hypothesen definiert:

1. Screening auf (hyper-)methylierte Regionen: quantitative Bestimmung der CpG-Methylierung leukämieassoziiierter Gene bei myeloischen Zelllinien im unbehandelten Grundzustand und bei einer gesunden Kohorte
2. Untersuchung der Wirkung von 5-AzaC im Zellmodell: Inkubation myeloischer Zelllinien mit 5-AzaC und anschließende Methylierungsanalyse von *LINE-1* als Surrogatmarker für globale Methylierung und von (hyper-)methylierten CpGs
3. Quantifizierung der *LINE-1*-Methylierung und Evaluation möglicher Zielgene in Patienten unter Therapie mit 5-AzaC zum Zeitpunkt der Erstdiagnose und des besten zytologischen Ansprechens

3 Publizierte Originalarbeit

5-Azacytidine modulates CpG methylation levels of EZH2 and NOTCH1 in myelodysplastic syndromes. Gawlitza AL, Speith J, Rinke J, Sajzew R, Muller EK, Schafer V, Hochhaus A, Ernst T. J Cancer Res Clin Oncol. 145(11):2835-2843. 2019.

The final publication is available at link.springer.com

<https://doi.org/10.1007/s00432-019-03016-9>

5-Azacytidine modulates CpG Methylation levels of EZH2 and NOTCH1 in Myelodysplastic Syndromes

Anja L. Gawlitza¹, Johanna Speith¹, Jenny Rinke¹, Roman Sajzew², Elena K. Müller¹, Vivien Schäfer¹, Andreas Hochhaus¹, Thomas Ernst¹

¹ Abteilung Hämatologie und Internistische Onkologie, Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Jena, Jena, Germany

² Otto Schott Institute of Materials Research, Friedrich Schiller University, Jena, Germany

Corresponding author: PD Dr. Thomas Ernst, Abteilung Hämatologie und Internistische Onkologie, Klinik für Innere Medizin II, Universitätsklinikum Jena, Am Klinikum 1, 07747 Jena, Germany. email: thomas.ernst@med.uni-jena.de

Abstract

Purpose: Molecular mechanisms of response to hypomethylating agents in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and chronic myelomonocytic leukemia (CMML) still remain largely unknown. Therefore, the effects of 5-Azacytidine (Aza) on clonal architecture and DNA methylation were investigated in this study.

Methods: Using next-generation sequencing (NGS), 30 myeloid leukemia-associated genes were analyzed in 15 MDS/CMML patients with excellent response to Aza. Effects on methylation levels were analyzed by quantitative methylation analysis using pyrosequencing for the global methylation marker *LINE-1* in patients and myeloid cell

lines. Various myeloid cell lines and a healthy cohort were screened for methylation levels in 23 genes. Selected targets were verified on the MDS/CMML cohort.

Results: The study presented here showed a stable variant allele frequency and stable global methylation levels in responding patients. A significant demethylation of *EZH2* and *NOTCH1* was revealed in patients with Aza response.

Conclusions: A response to Aza is not associated with eradication of malignant clones, but rather with a stabilization of the clonal architecture. We suggest changes in CpG methylation levels of *EZH2* and *NOTCH1* as potential targets of epigenetic response to Aza treatment which may also serve as useful biomarkers after clinical evaluation.

Keywords

5-Azacytidine, Azacitidine, Myelodysplastic syndromes, CpG methylation, *EZH2*, *NOTCH1*

Die publizierte Originalarbeit kann aufgrund von Urheberrechten an dieser Stelle nicht gezeigt werden.

Die publizierte Originalarbeit kann aufgrund von Urheberrechten an dieser Stelle nicht gezeigt werden.

Die publizierte Originalarbeit kann aufgrund von Urheberrechten an dieser Stelle nicht gezeigt werden.

Die publizierte Originalarbeit kann aufgrund von Urheberrechten an dieser Stelle nicht gezeigt werden.

Die publizierte Originalarbeit kann aufgrund von Urheberrechten an dieser Stelle nicht gezeigt werden.

Die publizierte Originalarbeit kann aufgrund von Urheberrechten an dieser Stelle nicht gezeigt werden.

Die publizierte Originalarbeit kann aufgrund von Urheberrechten an dieser Stelle nicht gezeigt werden.

4 Diskussion

4.1 Limitationen der Studie – eine kritische Evaluation

4.1.1 Methodik – Pyrosequenzierung

Basierend auf Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe wurden die häufigsten leukämieassoziierten Gene untersucht (Schafer *et al.* 2016). Aus 30 Genen, die im Vorfeld mittels *Next Generation Sequencing* (NGS) analysiert worden waren, wurden in diesem Projekt insgesamt 23 Gene mit kommerziell verfügbaren CpG-Assays von Qiagen untersucht. Pro Probe konnten somit 269 CpGs analysiert werden. In zukünftigen Untersuchungen wäre ein Vorgehen denkbar, bei dem die relativ aufwendige Pyrosequenzierung, mit der nur kurze DNA-Abschnitte bis 250bp sequenziert werden können (Poulin *et al.* 2018), zunächst um neuere Screeningmethoden zur Methylierungsanalyse ersetzt wird (analog zur Mutationsanalyse mittels NGS oder analog zur Expressionsanalyse mittels Genome-Wide Expression Arrays), um dann im Verlauf ausgewählte Targets mittels Pyrosequenzierung zu bestätigen. Beispielsweise wird gegenwärtig im „*Cancer Genome Atlas Project*“ die „Illumina Infinium 450 K Microarray Platform“ zur Methylierungsanalyse verwendet, mit der genomweit ca. 450.000 CpGs analysiert werden können (Baylin und Jones 2016). Trotz Hochdurchsatzmethode entspricht dies nur 1,5 % aller CpGs des menschlichen Genoms (Fan *et al.* 2019). Durch Anwendung eines solchen methodischen Vorgehens könnte möglicherweise eine größere Anzahl an Targets von 5-AzaC aufgedeckt werden.

Neben der begrenzten Sequenzierlänge aufgrund fehlender Möglichkeiten des Parallelsequenzierens unterscheidet die Technik des Pyrosequenzierens nicht zwischen 5mC und 5hmC. Die Methode basiert auf den entstehenden Sequenzunterschieden, die durch Exposition von DNA mit Natriumbisulfit resultieren. Die Bisulfitbehandlung konvertiert Cytosin zu Uracil, wohingegen 5mC als Cytosin bestehen bleibt. Die bisulfitbehandelte DNA wird dann mittels PCR amplifiziert, wobei

5mC als Cytosin amplifiziert wird und Uracil als Thymin (Abb. 4.1). Somit entstehen im Bereich von CpGs artifizielle C/T-SNPs (engl. single nucleotide polymorphism) (Delaney *et al.* 2015), die im Anschluss mittels Pyrosequenzierung quantitativ detektiert werden können.

5hmC reagiert mit Natriumbisulfit zu 5-Methylensulfonat, welches wie 5mC in der Sequenzierung als Cytosin „gelesen“ wird. Eine Unterscheidung zwischen 5mC und 5hmC ist somit nicht möglich (Munzel *et al.* 2011, Booth *et al.* 2013). Methylierungsanalysen mittels Pyrosequenzierung können daher fälschlicherweise hydroxymethylierte, statt methylierte DNA identifizieren (Paluch *et al.* 2016). Dennoch gilt Pyrosequenzierung aktuell weiterhin als Goldstandard in der quantitativen Methylierungsanalyse (Poulin *et al.* 2018).

Song *et al.* fanden mittels Glucosyltransferase-Assay, welcher eine selektive Markierung von 5hmC ermöglicht, eine erhöhte Dichte hydroxymethylierter DNA in intragenischen Regionen humaner Zelllinien (Song *et al.* 2011). Demnach wäre bei dem in unserem Projekt mittels Pyrosequenzierung identifizierten *NOTCH1*-Target, welches im Bereich einer intragenischen CpG-Insel liegt, eine Hydroxymethylierung anstelle einer Methylierung zumindest denkbar.

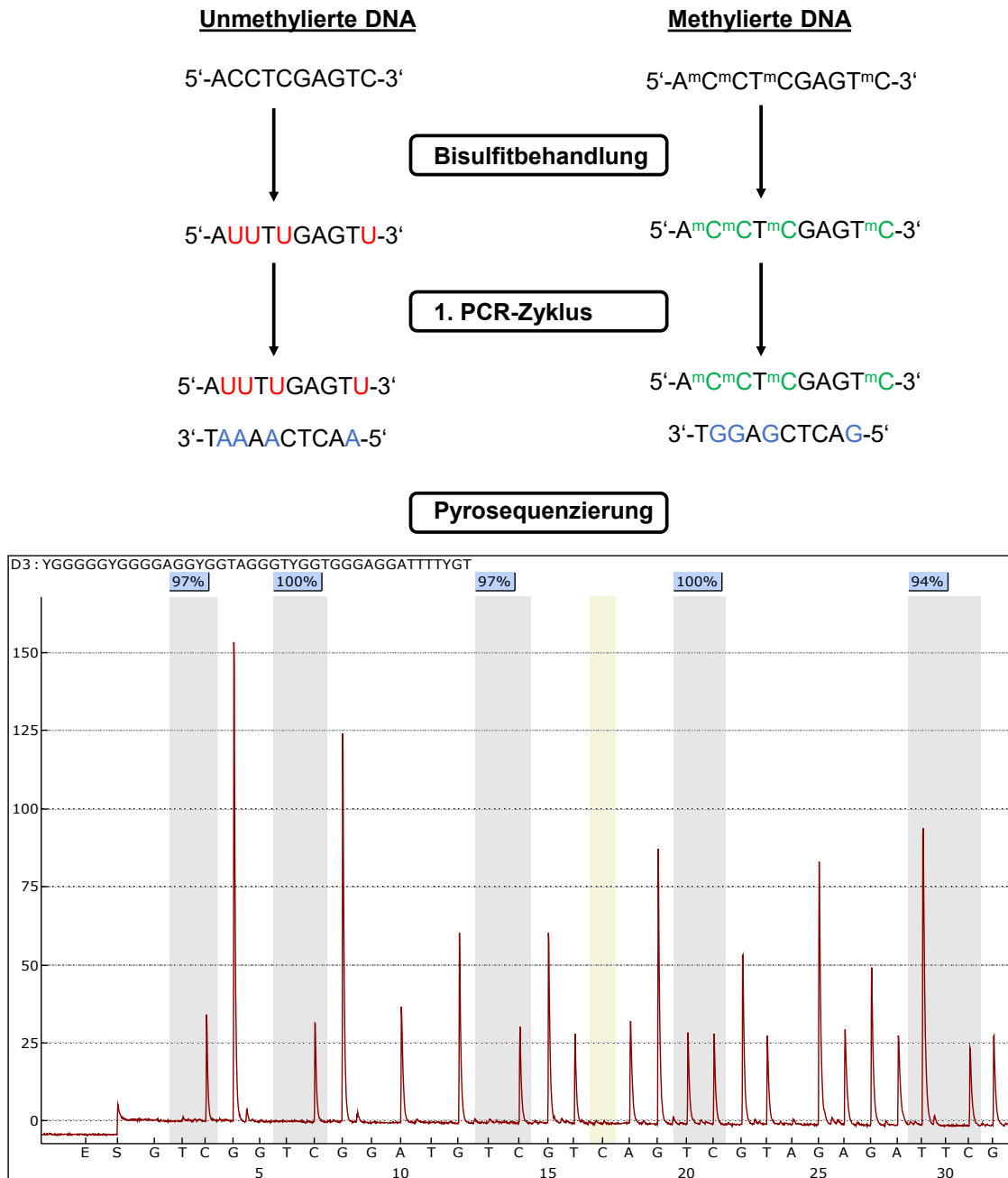


Abb. 4.1: Natriumbisulfitbehandlung, PCR und Pyrosequenzierung.

Die Bisulfitbehandlung konvertiert Cytosin zu Uracil, wohingegen Methylcytosin (mC) als Cytosin bestehen bleibt. In der PCR wird Uracil als Thymin und mC als Cytosin amplifiziert. Bei der folgenden Sequenzierung wird der artifizuell erzeugte C/T-Polymorphismus (im Pyrogramm grau hinterlegt) quantitativ ausgelesen. Eine Unterscheidung zwischen methylierten und hydroxymethylierten DNA-Abschnitten ist dabei nicht möglich. (Eigene Darstellung)

4.1.2 Untersuchungen an Zellkulturen

5-Azacytidin ist in wässrigen Lösungen (z.B. Ringer-Laktat) sehr instabil. Bei Raumtemperatur werden ca. 10 % der Substanz innerhalb von zwei bis drei Stunden degradiert (Sigma-Aldrich 2008). Daher wäre zu diskutieren, ob bei den durchgeführten Zellkulturexperimenten über 72 h ein täglicher Austausch des Zellkulturmediums mit Austausch von 5-AzaC aus der Stammlösung (analog einer täglichen therapeutischen Subkutangabe) sinnvoll wäre. Da es sich bei dem Inkubationsexperiment intentionell um ein Zellmodell handelt, mit dem die initiale Demethylierungsaktivität näher charakterisiert werden sollte, wurde auf den aufwendigeren Versuchsaufbau mit potenziell höherer Fehleranfälligkeit verzichtet. Allerdings wurde streng darauf geachtet, dass das Ansetzen der Verdünnungslösungen aus der Stammlösung auf Eis erfolgte, um eine Degradation der Substanz vor Hinzugabe zu den Zelllinien zu verhindern. Interessanterweise wurden bereits durch die einmalige Zugabe von 5-AzaC ausgeprägte Demethylierungseffekte nachgewiesen. Die bei den Zelllinien ELF-153 und MOLM-13 angewendeten Konzentrationen (jeweilige zellinienspezifische halbmaximale Hemmkonzentrationen (IC_{50}) von 5-AzaC) liegen im Maximalbereich der bei Patienten gemessenen Plasmakonzentrationen nach einmaliger subkutaner Applikation von 5-AzaC (Laille *et al.* 2011), sodass sich dennoch ein relevanter klinischer Bezug des Versuchsaufbaus herstellen lässt.

4.1.3 Untersuchungen an Patientenmaterial

In dem vorliegenden Projekt wurden Patienten mit einem sehr guten Therapieansprechen auf 5-AzaC untersucht. Die Ergebnisse der Arbeit erweitern den aktuellen Kenntnisstand hinsichtlich CpG-Methylierungen leukämierrelevanter Gene bei Respondern. Der Fokus auf Responder wurde bewusst gewählt, um zufällige Methylierungseffekte, die in keinem relevanten Zusammenhang mit dem Therapieansprechen stehen, zu minimieren. Dennoch wären in Zukunft ergänzende Untersuchungen sinnvoll, die Responder und Non-Responder gegenüberstellen,

insbesondere mit dem Ziel Biomarker für Therapieansprechen bzw. -versagen zu evaluieren.

Eine weitere Limitation der Studien ist die Kohortengröße. Bei den ausgewählten 15 Patienten handelt es sich zwar um eine klinisch und molekulargenetisch ausgezeichnet charakterisierte Kohorte, allerdings relativ kleiner Größe. Bereits im Verlauf des laufenden Projektes wurde die Kohortengröße sukzessive erhöht, worauf im Abschnitt 4.3 „unpublizierte Daten“ näher eingegangen werden soll.

Zuletzt handelt es sich bei dem gewonnenen Knochenmarkmaterial um intrinsisch heterogenes Zellmaterial. DNA aus Knochenmarkspiraten enthält statistisch gesehen sowohl mutierte Klone als auch Zellen mit normaler Hämatopoese. Die durchgeführten Methylierungsanalysen unterliegen demnach bedingt durch die genetische Heterogenität des gewonnenen Probenmaterials einem möglichen *Confounding*-Effekt (Schubeler 2015), dem in Zukunft mit Einzelzell-basierten Analysen begegnet werden könnte.

4.2 Neue Erkenntnisse der Studie

Trotz oben genannter Limitationen erbrachte das durchgeführte Projekt zahlreiche neue Erkenntnisse.

Bei Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe wurde die Mutationskinetik bei Patienten untersucht, die auf die Therapie mit 5-AzaC ansprachen. Dabei wurden bei insgesamt stabiler Mutationslast vorrangig Mutationen in epigenetischen Regulatorgenen detektiert (Gawlitza *et al.* 2019). Dies entspricht dem aktuellen Stand der Forschung; mittels Exomsequenzierung (engl. whole exome sequencing) konnten bereits in unterschiedlichen Tumorarten Mutationen in Genen gefunden werden, die für epigenetische Regulatorgene kodieren und in einem potenziell aberrant veränderten Epigenom resultieren. Diese Tatsache unterstützt die Hypothese eines *cross talks* zwischen Genetik und Epigenetik (Baylin und Jones 2016).

In dem Zellkultorexperiment an den humanen myeloischen Zelllinien ELF-153 und MOLM-13 konnte nach einmaliger Inkubation mit der zelllinienspezifischen IC_{50} von 5-AzaC eine ausgeprägte Demethylierungsaktivität bei allen untersuchten CpGs nachgewiesen werden. Auch die repetitive Sequenz *LINE-1* als Surrogatmarker für globale Methylierung wurde signifikant demethyliert. Bei *WT1* konnte bereits innerhalb von 72 h eine beginnende Remethylierung festgestellt werden.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Velicescu *et al.*, die die Blasenkrebs-Zelllinie T24 für 72 h mit Decitabin inkubierten (tägliches Austausch von Kulturmedium und Decitabin). Auch sie konnten bei allen untersuchten CpGs eine signifikante Demethylierung nachweisen. Diese „globale Hypomethylierung“ betraf gleichermaßen hypermethylierte Regionen, CpG-arme Regionen und repetitive Sequenzen wie Alu-Elemente. Bei allen CpGs (außer bei einer in einem Intron gelegenen Sequenz) konnte bis Tag 20 eine 60-80%ige Remethylierung in teilenden Zellen verzeichnet werden. Bei Hemmung der Zellteilung durch Kultivierung in 0,1%igem fetalem Kälberserum (FCS) konnte keine Remethylierung nachgewiesen werden (Velicescu *et al.* 2002).

Interessanterweise detektierten wir bei Patienten, die auf die Therapie mit 5-AzaC ansprachen, stabile globale (*LINE-1*-) Methylierungslevel bei signifikant demethylierten CpGs in den identifizierten Targetregionen *EZH2* und *NOTCH1*. Der Fokus auf Responder hat dabei nützliche und neue Informationen erbracht; bei Ansprechen unter 5-AzaC werden spezifische CpGs signifikant demethyliert. Dies ist die erste Studie, die Veränderungen der CpG-Methylierungen von *EZH2* und *NOCTH1* als mögliche Targets eines epigenetischen Ansprechens auf 5-AzaC postuliert. Ob sich diese Veränderungen als Biomarker für klinisches Ansprechen eignen, muss zukünftig in einer größeren klinischen Studie überprüft werden.

Die nach dem Zelllinienscreening ausgewählten potenziellen Target-Regionen von 5-AzaC (*EZH2*, *NOTCH1*, *RUNX1*, *WT1*) wurden regulatorischen Funktionen, die in der Ensembl-Datenbank hinterlegt sind, zugeordnet (Abb. 4.2, Abb. 4.3). Als annotierte Vergleichszelllinie wurde K562 als Repräsentant der myeloischen Reihe ausgewählt. Die bei Patienten bestätigten Targets *EZH2* und *NOTCH1* betreffen sowohl Promotor- als auch intragenische Regionen. Dabei liegt die untersuchte *EZH2*-Region im Bereich

eines aktiven Promotors mit H3K4me3-Markierung. Untersuchte CpGs von *NOTCH1* liegen intragenisch im Bereich einer Protein-kodierender Region und sind nicht mit einer regulatorischen Funktion assoziiert.

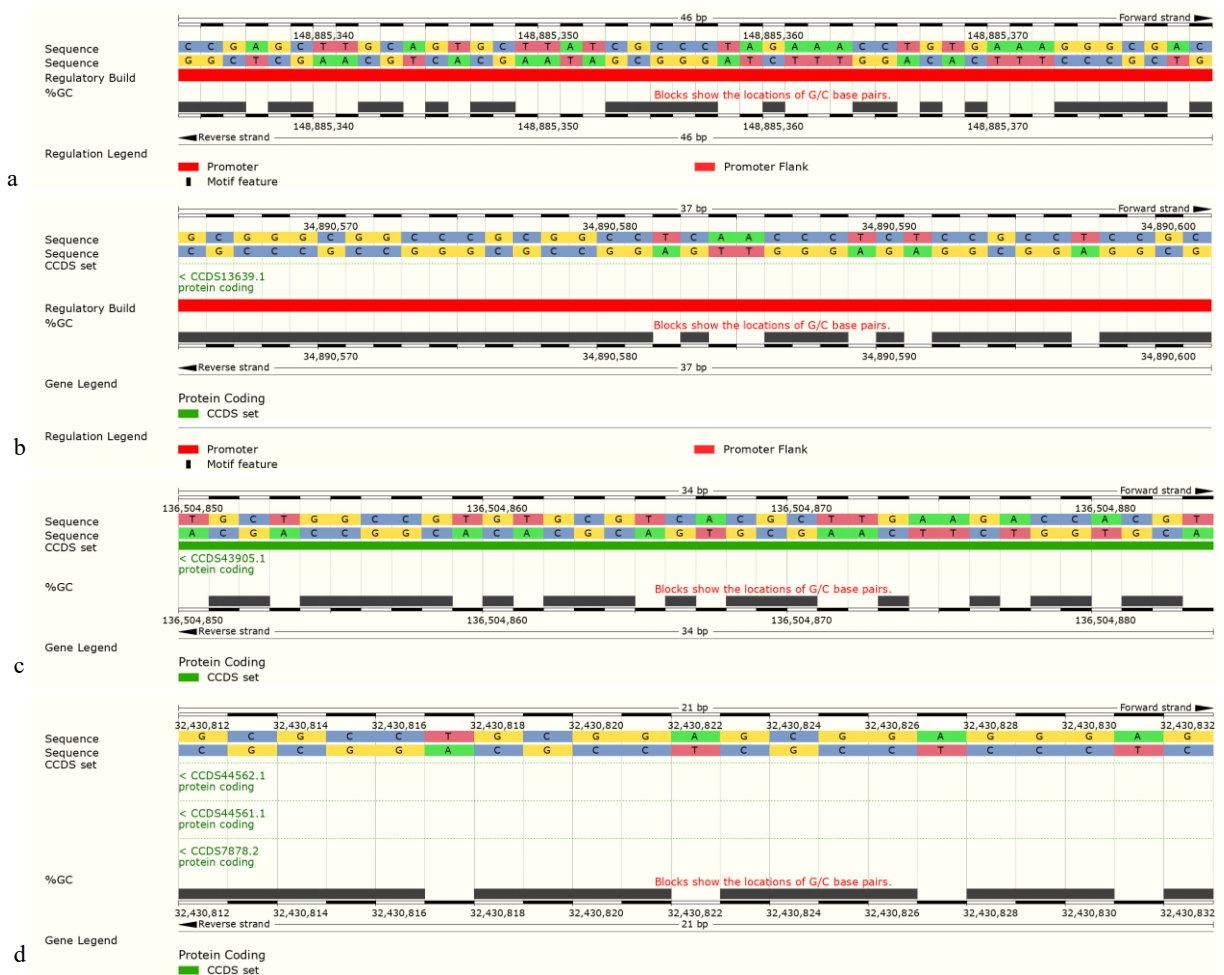


Abb. 4.2 Regulatorische Funktionen potenzieller Zielregionen von 5-Azacytidin. Annotationen für K562 als Repräsentant der myeloischen Reihe. Die untersuchten CpGs von *EZH2* (a) und *RUNX1* (b) liegen im Bereich von Promotorregionen. Die CpGs von *NOTCH1* (c) und *WT1* (d) liegen im Bereich intragenischer Regionen (*NOTCH1*: Protein-kodierend, *RUNX1*: nicht-Protein-kodierend). Die bei Patienten bestätigten Zielregionen *EZH2* und *NOTCH1* betreffen somit sowohl Promotor-, als auch intragenische Regionen. (Abbildung nach Ensembl database, release 91 - Dezember 2017)

4 Diskussion

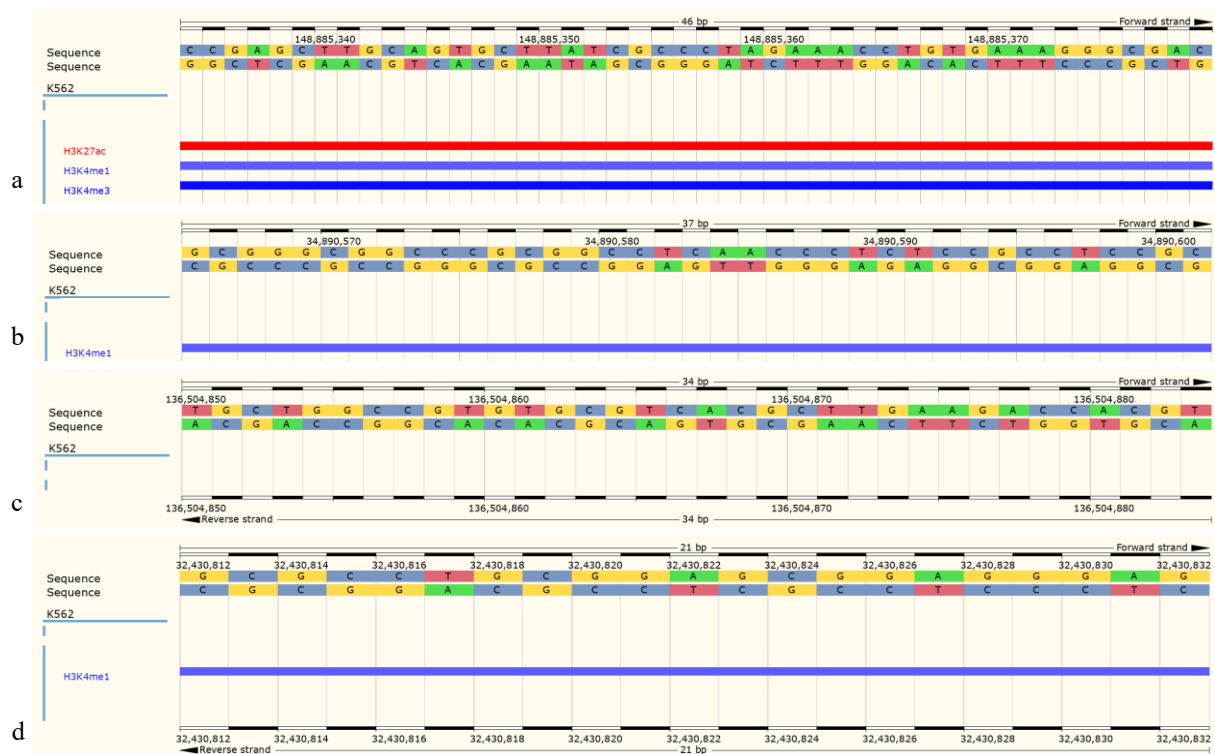


Abb. 4.3 Histonmodifikationen potenzieller Zielregionen von 5-Azacytidin.

Annotationen für K562 als Repräsentant der myeloischen Reihe. Die untersuchten CpGs der Region von *EZH2* (a) liegen im Bereich der genomischen Sequenz, die durch H3K4me3 markiert ist, welche für aktive Promotoren typisch ist. Weitere Markierungen der untersuchten *EZH2*-Sequenz sind H3K4me1 und H3K27ac, die mit Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren assoziiert sind. Die genomische Sequenz der untersuchten CpGs von *RUNX1* (b) und *WT1* (d) ist durch H3K4me1 markiert. Somit handelt es sich bei diesen Regionen a.e. um distale Enhancer. Die Sequenz der CpGs von *NOTCH1* (c) weist keine Histonmodifikation auf. (Abbildung nach Ensembl database, release 91 - Dezember 2017)

4.3 Zusatzuntersuchungen/unpublizierte Daten

4.3.1 Erweiterung der Patientenkohorte

Bei Erweiterung der Kohorte (inklusive Einschlusses von drei AML-Patienten, Tab. 1) konnte *WT1* als mögliches weiteres Target von 5-AzaC identifiziert werden (Abb. 4.4). Die Erweiterung der Kohorte für die genannten Zielgene war für 18 Patienten erfolgreich. (*EZH2* n = 21, *NOTCH1* n = 19, *RUNX1* n = 18, *WT1* n = 21).

Tab. 1: Patientencharakteristika der erweiterten Kohorte

Gesamt n = 21, Σ = 42 Proben			
<i>Alter, Jahre</i>			
Median:	69		
Spannweite:	48-85		
<i>Geschlecht</i>			
Männlich:	11		
Weiblich:	10		
<i>Diagnose, Patientenzahl</i>			
MDS:	12		
CMML:	6		
AML:	3		
<i>Behandlungszyklen mit 5-AzaC</i>			
Median:	4		
Spannweite:	1-11		
<i>Behandlungsdauer, Monate</i>			
Median:	8		
Spannweite:	1,5 - 23		
<i>Laufende Patienten-Nr.</i>	<i>Erstdiagnose (WHO 2016)</i>	<i>Diagnose bei bestem zytologischen Ansprechen auf 5-AzaC</i>	<i>Anzahl Zyklen 5-AzaC</i>
16	MDS EB2	Rückführung in MDS EB1	5
17	MDS EB1	Partielle Remission	4
18	CMML II	Rückführung in CMML I	7
19	AML	Partielle Remission	1
20	sAML	Rückführung in MDS EB1	4
21	AML	Komplette Remission	4
Abkürzung: 5-AzaC = 5-Azacytidin, Azacitidin (Vidaza®)			

4 Diskussion

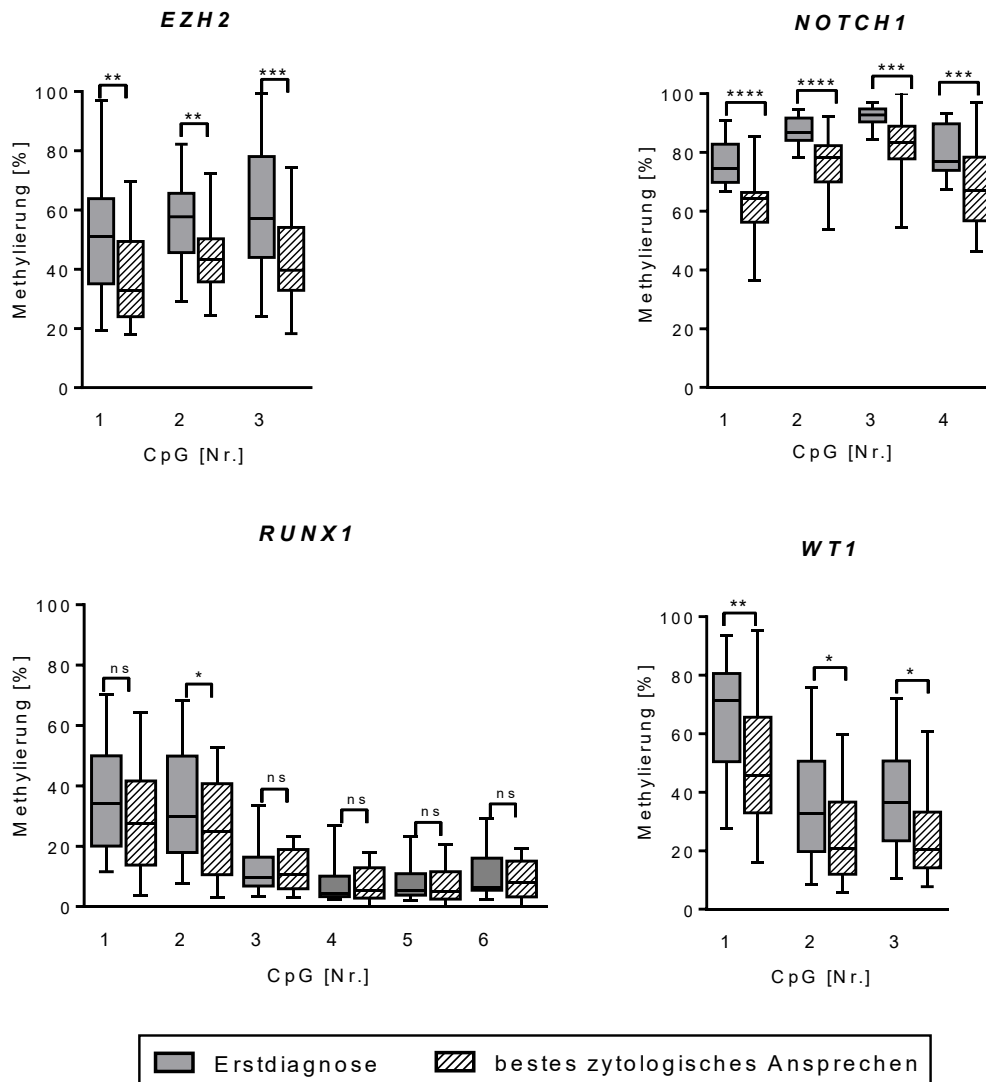


Abb. 4.4 Genspezifische Demethylierung von *EZH2*, *NOTCH1* und *WT1* bei Patienten zum Zeitpunkt des besten zytologischen Ansprechens auf die Therapie mit 5-Azacytidin.

Bei Erweiterung der Patientenkohorte konnte *WT1* als weiteres mögliches Target identifiziert werden. (*EZH2* n = 21, *NOTCH1* n = 19, *RUNX1* n = 18, *WT1* n = 21); * p ≤ 0.05, ** p ≤ 0.01, ***p ≤ 0.001, **** P ≤ 0.0001

4.3.2 *EZH2*-Methylierungsstatus – Therapieverläufe

Ergänzend zu den publizierten Daten wurde der Methylierungsstatus von *EZH2* (Assay *EZH2_1*) bei drei Patienten evaluiert, die nach initial sehr gutem Ansprechen auf die Therapie mit 5-AzaC einen Progress entwickelten (Tab. 2). Dabei konnten zwei verschiedene Mechanismen der Krankheitsprogression beobachtet werden. Zum Zeitpunkt des Progresses zeigte sich entweder eine Erhöhung der DNA-Methylierung über das Ausgangsniveau hinaus oder ein fast vollständiger Verlust der Methylierung (Abb. 4.4). Einer DNA-Demethylierung wird in der Literatur eine maßgebliche Rolle für genomische Instabilität zugeschrieben (Baylin und Jones 2016).

Tab. 2: Patientencharakteristika – Therapieverläufe

<i>Patient-Nr.</i>	<i>Alter (Jahre)</i>	<i>Geschlecht</i>	<i>Erst-diagnose</i>	<i>Bestes zytologisches Ansprechen</i>	<i>Verlauf unter Therapie mit 5-AzaC</i>
1	74	w	MDS EB2	Rückführung in MDS EB1	Progress in sAML
2	62	m	CMML II	Rückführung in CMML I	Progress in CMML II
3	85	m	MDS EB2	Rückführung in MDS EB1	Progress in sAML

Abkürzungen: weiblich = w, männlich = m

4 Diskussion

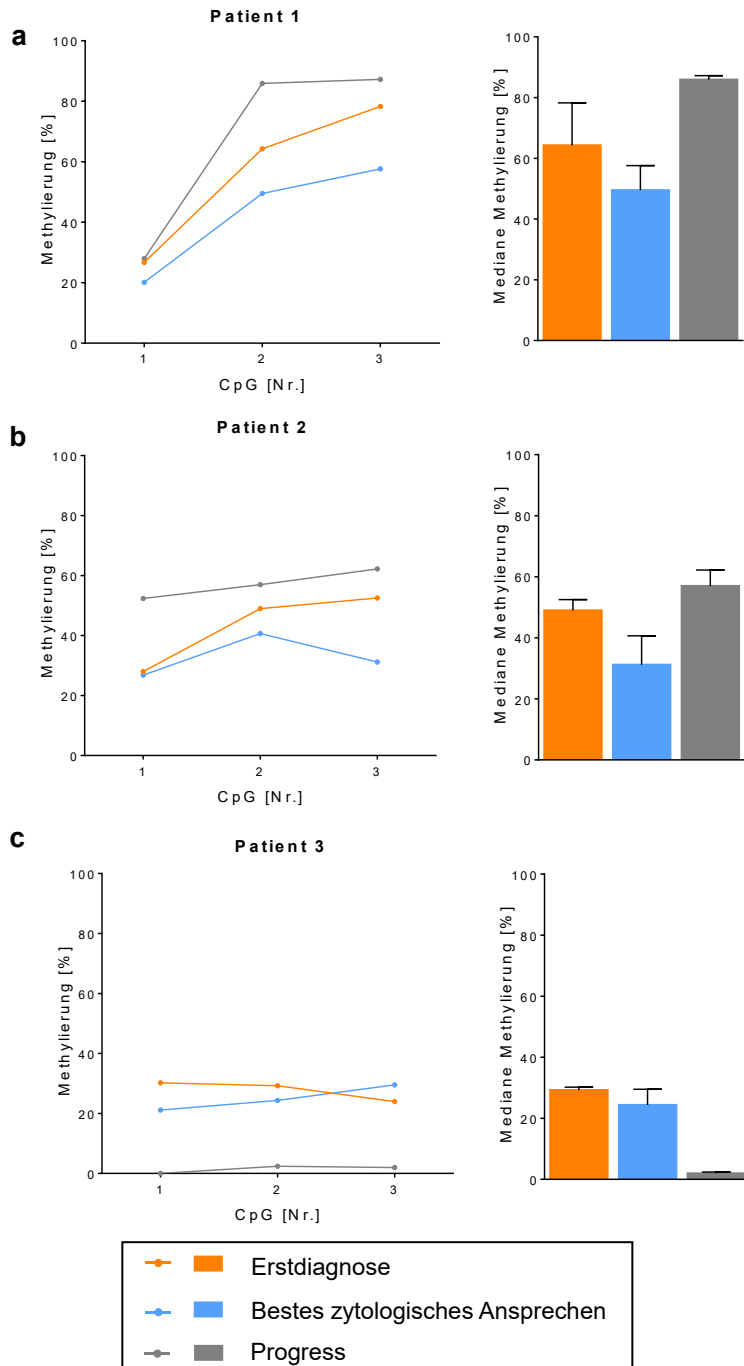


Abb. 4.5 EZH2-Methylierung – Therapieverläufe unter 5-Azacytidin (Erstdiagnose, bestes zytologisches Ansprechen, Progress). Es konnten zwei unterschiedliche Mechanismen der Krankheitsprogression beobachtet werden. Zum Zeitpunkt des Progresses zeigte sich entweder eine Erhöhung der *EZH2*-Methylierung über das Ausgangsniveau hinaus (a, b), oder ein fast vollständiger Verlust der Methylierung (c).

5 Schlussfolgerungen

Im Zellmodell an den myeloischen Zelllinien ELF-153 und MOLM-13 konnte gezeigt werden, dass die Inkubation der Zellen mit der jeweiligen zelllinienspezifischen IC_{50} von 5-AzaC zu einer Demethylierung (hyper-)methylierter Regionen führt, einschließlich des globalen Methylierungsmarkers *LINE-1*. Dabei wurden CpGs mit einer höheren Methylierung im Grundzustand (z.B. *EZH2*) stärker demethyliert, als Gene mit einem niedrigeren Methylierungslevel (z.B. *RUNX1*). Das Experiment belegt, dass (hyper-)methylierte DNA-Regionen mögliche Zielgene von 5-AzaC sein können, und qualifiziert diese Regionen grundsätzlich als Targets, da eine biologische Antwort auf 5-AzaC messbar ist.

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnte gezeigt werden, dass ein gutes Ansprechen auf die epigenetische Therapie mit 5-AzaC bei Patienten mit MDS und CMML einerseits mit stabilen globalen Methylierungsleveln, andererseits mit einer Modulierung der CpG-Methylierung von *EZH2* und *NOTCH1* einhergeht. Zum Zeitpunkt des besten zytologischen Ansprechens im Vergleich zur Erstdiagnose zeigten sich spezifische CpGs beider Zielgene in der untersuchten Patientenkohorte aus 15 MDS/CMML-Patienten signifikant demethyliert. In der auf 21 Patienten erweiterten Kohorte, in der auch AML-Patienten unter Therapie mit 5-AzaC eingeschlossen wurden, konnte außerdem *WT1* als weiteres mögliches Zielgen von 5-AzaC identifiziert werden (Daten unpubliziert).

Ein Therapiemonitoring auf Basis der Mutationslast ist bei Therapie mit 5-AzaC aufgrund einer stabilen klonalen Architektur bei Respondern nicht sinnvoll. Ob die in dieser Forschungsarbeit detektierten Methylierungsveränderungen als Biomarker für klinisches Ansprechen geeignet sind, muss zukünftig in einer größeren klinischen Studie überprüft werden. DNA-Methylierungen könnten in Zukunft als effizient nachzuweisende Marker Verwendung in der klinischen Routinediagnostik bei epigenetischen Therapien finden.

Literatur- und Quellenverzeichnis

- Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, Bloomfield CD, Cazzola M, Vardiman JW. 2016. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, 127 (20):2391-2405.
- Baylin SB. 2015. Epigenetics and Cancer. In: John Mendelsohn JWG PMH, Mark A. Israel, Craig B. Thompson, Hrsg. *The Molecular Basis of Cancer* (Fourth Edition). 4 Aufl, 67-78.e63.
- Baylin SB, Jones PA. 2016. Epigenetic Determinants of Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 8 (9).
- Bhagwat AS, Roberts RJ. 1987. Genetic analysis of the 5-azacytidine sensitivity of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 169 (4):1537-1546.
- Booth MJ, Ost TW, Beraldi D, Bell NM, Branco MR, Reik W, Balasubramanian S. 2013. Oxidative bisulfite sequencing of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Protoc*, 8 (10):1841-1851.
- Calo E, Wysocka J. 2013. Modification of enhancer chromatin: what, how, and why? *Mol Cell*, 49 (5):825-837.
- Cedar H, Bergman Y. 2009. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet*, 10 (5):295-304.
- Celgene. Stand April 2019. Fachinformation Vidaza
- Christman JK. 2002. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*, 21 (35):5483-5495.
- Creusot F, Acs G, Christman JK. 1982. Inhibition of DNA methyltransferase and induction of Friend erythroleukemia cell differentiation by 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine. *J Biol Chem*, 257 (4):2041-2048.
- De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. 2016. 'Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update'. *Blood Cancer J*, 6 (7):e441.
- Deaton AM, Bird A. 2011. CpG islands and the regulation of transcription. *Genes Dev*, 25 (10):1010-1022.
- Delaney C, Garg SK, Yung R. 2015. Analysis of DNA Methylation by Pyrosequencing. *Methods Mol Biol*, 1343:249-264.
- Doi A, Park IH, Wen B, Murakami P, Aryee MJ, Irizarry R, Herb B, Ladd-Acosta C, Rho J, Loewer S, Miller J, Schlaeger T, Daley GQ, Feinberg AP. 2009. Differential methylation of tissue- and cancer-specific CpG island shores distinguishes human induced pluripotent stem cells, embryonic stem cells and fibroblasts. *Nat Genet*, 41 (12):1350-1353.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. 2004. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429 (6990):457-463.

- Elmariah H, DeZern AE. 2019. Chronic Myelomonocytic Leukemia: 2018 Update to Prognosis and Treatment. *Curr Hematol Malig Rep*, 14 (3):154-163.
- European Medicines Agency. 2016. Vidaza, ANNEX I, SUMMARY OF PRODUCT CHARACTERISTICS
- Fan S, Tang J, Li N, Zhao Y, Ai R, Zhang K, Wang M, Du W, Wang W. 2019. Integrative analysis with expanded DNA methylation data reveals common key regulators and pathways in cancers. *npj Genomic Medicine*, 4 (1):2.
- Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Finelli C, Giagounidis A, Schoch R, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore SD, Seymour JF, Bennett JM, Byrd J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C, Silverman LR, International Vidaza High-Risk MDSSSG. 2009. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. *Lancet Oncol*, 10 (3):223-232.
- Gawlitza AL, Speith J, Rinke J, Sajzew R, Muller EK, Schafer V, Hochhaus A, Ernst T. 2019. 5-Azacitidine modulates CpG methylation levels of EZH2 and NOTCH1 in myelodysplastic syndromes. *J Cancer Res Clin Oncol*.
- Germing U, Blum S, Boch T, Lübbert M, Metzgeroth G, Platzbecker U, Pfeilstöcker M 22.10.2019. Chronische Myelomonozytäre Leukämien (CMML) <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/chronische-myelomonozytaere-leukaemie-cmml/@@guideline/html/index.html>.
- Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T, Jacob ST. 2005. 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol*, 25 (11):4727-4741.
- Gujar H, Weisenberger DJ, Liang G. 2019. The Roles of Human DNA Methyltransferases and Their Isoforms in Shaping the Epigenome. *Genes (Basel)*, 10 (2).
- Haferlach T. 2014. Myelodysplastische Syndrome von A bis Z. Thieme.
- Hagemann S, Heil O, Lyko F, Brueckner B. 2011. Azacitidine and decitabine induce gene-specific and non-random DNA demethylation in human cancer cell lines. *PLoS One*, 6 (3):e17388.
- Hofmann WK, Platzbecker U, Götze K, Stauder R, Passweg J, Germing U 21.10.2019. Myelodysplastische Syndrome (MDS) <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/myelodysplastische-syndrome-mds/@@guideline/html/index.html>.
- Hollenbach PW, Nguyen AN, Brady H, Williams M, Ning Y, Richard N, Krushel L, Aukerman SL, Heise C, MacBeth KJ. 2010. A comparison of azacitidine and decitabine activities in acute myeloid leukemia cell lines. *PLoS One*, 5 (2):e9001.

- Illingworth RS, Bird AP. 2009. CpG islands--'a rough guide'. *FEBS Lett*, 583 (11):1713-1720.
- Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, Mohan S, Rataul M, O'Keefe C, Sekeres M, Sauntharajah Y, Maciejewski JP. 2009. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood*, 113 (6):1315-1325.
- Jones PA. 2012. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. *Nat Rev Genet*, 13 (7):484-492.
- Jones PA, Taylor SM. 1980. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*, 20 (1):85-93.
- Jones PA, Liang G. 2009. Rethinking how DNA methylation patterns are maintained. *Nat Rev Genet*, 10 (11):805-811.
- Khan C, Pathe N, Fazal S, Lister J, Rossetti JM. 2012. Azacitidine in the management of patients with myelodysplastic syndromes. *Ther Adv Hematol*, 3 (6):355-373.
- Knudson AG, Jr. 1971. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 68 (4):820-823.
- Laille E, Mita AC, Goel S, Gabrail NY, Schwarz J, Beach C. 2011. A 2-Part Phase I Study in Patients with Solid or Hematologic Malignancies: Dose Proportionality of Subcutaneous (SC) Azacitidine (AZA) and Pharmacokinetics of SC AZA in Patients with Severe Renal Impairment. *Blood*, 118 (21):3480-3480.
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, *et al.*, International Human Genome Sequencing C. 2001. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409 (6822):860-921.
- Lay FD, Liu Y, Kelly TK, Witt H, Farnham PJ, Jones PA, Berman BP. 2015. The role of DNA methylation in directing the functional organization of the cancer epigenome. *Genome Res*, 25 (4):467-477.
- Liang G, Weisenberger DJ. 2017. DNA methylation aberrancies as a guide for surveillance and treatment of human cancers. *Epigenetics*, 12 (6):416-432.
- Lister R, Ecker JR. 2009. Finding the fifth base: genome-wide sequencing of cytosine methylation. *Genome Res*, 19 (6):959-966.
- Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo Q-M, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR. 2009. Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, 462:315.
- Ma X, Wang YW, Zhang MQ, Gazdar AF. 2013. DNA methylation data analysis and its application to cancer research. *Epigenomics*, 5 (3):301-316.
- Munzel M, Globisch D, Carell T. 2011. 5-Hydroxymethylcytosine, the sixth base of the genome. *Angew Chem Int Ed Engl*, 50 (29):6460-6468.
- Paluch BE, Naqash AR, Brumberger Z, Nemeth MJ, Griffiths EA. 2016. Epigenetics: A primer for clinicians. *Blood Rev*, 30 (4):285-295.

- Porwit A, Saft L. 2011. The AML–MDS interface—leukemic transformation in myelodysplastic syndromes. *Journal of Hematopathology*, 4 (2):69-79.
- Poulin M, Zhou JY, Yan L, Shioda T. 2018. Pyrosequencing Methylation Analysis. *Methods Mol Biol*, 1856:283-296.
- Röllig C, Beelen DW, Braess J, Greil R, Niederwieser D, Passweg J, Reinhardt D, Schlenk RF 22.10.2019. Akute Myeloische Leukämie (AML) <https://www.onkopedia.com/de/onkopedia/guidelines/akute-myeloische-leukaemie-aml/@@guideline/html/index.html#titID0EQIBG>.
- Santi DV, Norment A, Garrett CE. 1984. Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81 (22):6993-6997.
- Schafer V, Ernst J, Rinke J, Winkelmann N, Beck JF, Hochhaus A, Gruhn B, Ernst T. 2016. EZH2 mutations and promoter hypermethylation in childhood acute lymphoblastic leukemia. *J Cancer Res Clin Oncol*, 142 (7):1641-1650.
- Schermelleh L, Spada F, Easwaran HP, Zolghadr K, Margot JB, Cardoso MC, Leonhardt H. 2005. Trapped in action: direct visualization of DNA methyltransferase activity in living cells. *Nat Methods*, 2 (10):751-756.
- Schubeler D. 2015. Function and information content of DNA methylation. *Nature*, 517 (7534):321-326.
- Sigma-Aldrich I 20.10.2019. 5-Azacytidine - Product information https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/a2385pis.pdf.
- Silverman LR, Demakos EP, Peterson BL, Kornblith AB, Holland JC, Odchimar-Reissig R, Stone RM, Nelson D, Powell BL, DeCastro CM, Ellerton J, Larson RA, Schiffer CA, Holland JF. 2002. Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *J Clin Oncol*, 20 (10):2429-2440.
- Song CX, Szulwach KE, Fu Y, Dai Q, Yi C, Li X, Li Y, Chen CH, Zhang W, Jian X, Wang J, Zhang L, Looney TJ, Zhang B, Godley LA, Hicks LM, Lahn BT, Jin P, He C. 2011. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Biotechnol*, 29 (1):68-72.
- Šorm F, Pískala A, Čihák A, Veselý J. 1964. 5-Azacytidine, a new, highly effective cancerostatic. *Experientia*, 20 (4):202-203.
- Stanford University. 2019. ENCODE: Project overview. <https://www.encodeproject.org/help/project-overview/>.
- Steensma DP. 2012. Historical perspectives on myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*, 36 (12):1441-1452.
- Strahl BD, Allis CD. 2000. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 403 (6765):41-45.
- Stresemann C, Lyko F. 2008. Modes of action of the DNA methyltransferase inhibitors azacytidine and decitabine. *Int J Cancer*, 123 (1):8-13.

- Szilvia Ecsedi JRR-A, Héctor Hernandez-Vargas. 2018. 5-Hydroxymethylcytosine (5hmC), or How to Identify Your Favorite Cell. *Epigenomes*, 2 (1):3.
- Van Speybroeck L. 2002. From epigenesis to epigenetics: the case of C. H. Waddington. *Ann N Y Acad Sci*, 981:61-81.
- Velicescu M, Weisenberger DJ, Gonzales FA, Tsai YC, Nguyen CT, Jones PA. 2002. Cell Division Is Required for *de Novo* Methylation of CpG Islands in Bladder Cancer Cells. *Cancer Research*, 62 (8):2378-2384.
- Wen L, Li X, Yan L, Tan Y, Li R, Zhao Y, Wang Y, Xie J, Zhang Y, Song C, Yu M, Liu X, Zhu P, Li X, Hou Y, Guo H, Wu X, He C, Li R, Tang F, Qiao J. 2014. Whole-genome analysis of 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine at base resolution in the human brain. *Genome Biol*, 15 (3):R49.
- Xie H, Wang M, Bonaldo Mde F, Smith C, Rajaram V, Goldman S, Tomita T, Soares MB. 2009. High-throughput sequence-based epigenomic analysis of Alu repeats in human cerebellum. *Nucleic Acids Res*, 37 (13):4331-4340.

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Patientencharakteristika der erweiterten Kohorte _____ 32

Tab. 2: Patientencharakteristika, Therapieverläufe _____ 34

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Modell der Tumorprogression durch epigenetisches Gene-Silencing am Beispiel der leukämischen Transformation einer myeloischen Stammzelle	8
Abb. 1.2: Vergleich zwischen Cytidin und 5-Azacytidin (5-AzaC)	9
Abb. 1.3: Kovalente Bindung von DNA-Methyltransferasen (DNMTs) durch 5-Azacytidin	10
Abb. 4.1: Natriumbisulfitbehandlung, PCR und Pyrosequenzierung	26
Abb. 4.2: Regulatorische Funktionen potenzieller Zielregionen von 5-Azacytidin	30
Abb. 4.3: Histonmodifikationen potenzieller Zielregionen von 5-Azacytidin	31
Abb. 4.4: Genspezifische Demethylierung von <i>EZH2</i> , <i>NOTCH1</i> und <i>WT1</i> bei Patienten zum Zeitpunkt des besten zytologischen Ansprechens auf die Therapie mit 5-Azacytidin	33
Abb. 4.5: <i>EZH2</i> -Methylierung – Therapieverläufe unter 5-Azacytidin (Erstdiagnose, bestes zytologisches Ansprechen, Progress)	35

Anhang

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. med. Andreas Hochhaus für die Möglichkeit der Promotion im Forschungslabor der Klinik für Innere Medizin II, Abteilung Hämatologie/Internistische Onkologie am Universitätsklinikum Jena.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. Thomas Ernst für die Vergabe des Promotionsthemas, die umfassende Betreuung der Arbeit und die Unterstützung bei der Publikation der Forschungsergebnisse.

Ich bedanke mich herzlich bei Dr. Vivien Günther, Dr. Jenny Rinke und der gesamten Arbeitsgruppe des onkologischen Forschungslabors für die methodische Einarbeitung, die hilfreichen Anregungen und die Zusammenarbeit.

Dem Cusanuswerk danke ich für die finanzielle und ideelle Förderung, die mich sowohl in den Jahren des Studiums als auch in der Phase der Promotion persönlich und beruflich sehr geprägt hat.

Ein besonderer Dank gilt meinen Freunden Elena Müller, Anna Hinze, Susanne Möbius, Danica Midic, Dr. Akash Srivastava und Marie Seber für ihren stetigen Rückhalt.

Abschließend möchte ich meiner Familie für die uneingeschränkte und liebevolle Unterstützung danken.

Jena, im Februar 2020

Anja Gawlitza

Aus der Promotion hervorgegangene Publikation und Präsentationen:

Publikation:

5-Azacytidine modulates CpG methylation levels of EZH2 and NOTCH1 in myelodysplastic syndromes. Gawlitza AL, Speith J, Rinke J, Sajzew R, Muller EK, Schafer V, Hochhaus A, Ernst T. J Cancer Res Clin Oncol. 145(11):2835-2843. 2019.

Präsentationen:

Dez. 2017 Jahrestagung der Gesellschaft für Innere Medizin Thüringens, Universitätsklinikum Jena

Posterpräsentation in der Kategorie: Onkologie

Okt. 2017 Jahrestagung der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaften für Hämatologie und Medizinische Onkologie, Stuttgart

Vortrag in der Abstract-Kategorie: Myelodysplastische Syndrome

5-Azacytidine modulates EZH2 methylation in myeloid neoplasms

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: apl. Prof. Dr. med. Thomas Ernst, Dr. rer. nat. Jenny Rinke, Dr. rer. nat. Vivien Günther, Prof. Dr. med. Andreas Hochhaus,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift