

Summary

Post-translational modifications of histones and chromatin are crucial for regulation of gene expression. Here, the changes in histone acetylation or methylation manifested by different histone modifying enzymes are particularly important because they significantly influence gene expression. Amongst these histone modifiers, especially the lysine-specific demethylase 1 (LSD1) was shown to be highly overexpressed in many different tumours such as in prostate, the breast, and lung carcinoma as well as in neuroblastoma. LSD1 directs transcriptional activation and repression by modulating histone 3 lysine 4 and lysine 9 methylation levels. By recent studies we show that LSD1 expression correlates with tumour grade and invasive phenotypes in non-small cell lung cancer (NSCLC), which is one of the principal reasons of cancer related deaths worldwide. However, molecular and cellular mechanisms and underlying epigenetic features, driving NSCLC tumour development are still unknown. Therefore, this study aimed at determining the molecular mechanisms orchestrating LSD1 mediated oncogenic stress.

Tumour cell proliferation and migration analysis after LSD1 inhibition in the NSCLC cell line, PC9 using the LSD1 inhibitor HCI2509 (C12), demonstrated that LSD1 activity was essential for proliferation and migration capacities of tumour cells. Furthermore, the reduced proliferation rates after LSD1 inhibition were shown to be associated with a cell cycle arrest in the G2/M phase. A comprehensive expression profiling of the NSCLC cell line-PC9 by microarray hybridisation could further define the oncogenic function mediated by LSD1. Functional classification of the deregulated genes indicated that the genes regulating cell cycle were downregulated whereas genes related to inflammation were upregulated. Further pathway analysis indicated downregulation of the mitotic role of PLK1 pathway. Relative mRNA expression levels of PLK1 and its downstream targets that are critical for mitosis progression were shown to be decreased by quantitative PCR assays. Similarly, PLK1 mRNA repression upon LSD1 inhibition was observed in breast, liver, esophageal, neuroblastoma and lung tumour cell lines. Chromatin immunoprecipitation studies revealed that LSD1 occupied promoter sites of PLK1, illustrating a direct link between LSD1 and PLK1. These data point out that LSD1 positively regulates PLK1 and this regulation is necessary for efficient G2/M transition of cells and thereby conferring them with properties like rapid growth and proliferation.

Additionally, immunoprecipitation coupled mass spectrometry studies showed the interaction of LSD1 protein with the histone modification machinery as previously described, but also with many novel binding partners. Gene ontology (GO) term and pathway analysis indicated that majority of the proteins binding to LSD1 were involved in chromatin modification and in addition in RNA splicing. Exemplary immunoprecipitation and fluorescence microscopy studies showed

coimmunoprecipitation and colocalisation of RNA splicing factors with LSD1. Collectively these findings provide evidence of LSD1 interaction with the splicing machinery proteins and indicate a possible role in RNA splicing. Exon level transcriptome profiling showed differential splicing of RNA transcripts upon LSD1 inhibition. Many genes related with cell growth were displayed as alternatively spliced. Interestingly, exon 2 of the telomerase reverse transcriptase (TERT) RNA transcript was observed to be alternatively spliced after LSD1 inhibition. Lack of exon 2 in human TERT mRNA leads to premature termination of translation. Functional TERT protein is necessary for telomerase activity and the corresponding telomerase activity was shown to be reduced upon LSD1 inhibition. The presented data indicate that LSD1 plays a role in alternative splicing of TERT.

In conclusion, the study demonstrates that LSD1 plays a dominant role in tumour associated signalling leading to enhanced cell growth. In addition convincing evidence was collected that LSD1 is not only involved in transcriptional regulation, but also in alternative splicing.

Zusammenfassung

Für die Regulierung der Genexpression sind die posttranslationale Modifikationen von Histonen und Chromatin entscheidend. Hierbei spielen insbesondere Veränderungen in der Histonacetylierung oder -methylierung durch verschiedene histonmodifizierende Enzyme eine entscheidende Rolle, da sie die Genexpression signifikant beeinflussen. Stark überexprimiert zeigte sich unter diesen Histon-Modifikatoren in vielen verschiedenen Tumoren, wie in Prostata-, Brust- und Lungenkarzinomen sowie Neuroblastomen vor allem die Lysin-spezifische Demethylase 1 (LSD1). LSD1 steuert die Transkriptionsaktivierung und -repression durch die Veränderung der Histon 3 Lysin 4 und Lysin 9 Methylierungsspiegel. In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass in nicht-kleinzelligem Lungenkrebs (NSCLC) die LSD1-Expression mit hohen Tumorgraden und invasiven Phänotypen korreliert und so zu einer schlechten Krebsprognose beiträgt. Unbekannt sind bislang allerdings die molekularen und zellulären Mechanismen sowie zugrunde liegende epigenetische Merkmale, die die NSCLC-Tumorentwicklung antreiben. Daher ist das Ziel dieser Arbeit, die molekularen Mechanismen, die den LSD1-vermittelten onkogenen Stress steuern, zu verstehen.

In dieser Arbeit konnte zunächst gezeigt werden, dass die LSD1-Aktivität für die Proliferations- und Migrationskapazitäten von Tumorzellen essentiell ist. Denn durch die LSD1-Inhibierung in der NSCLC-Zelllinie PC9 unter Verwendung des LSD1-Inhibitors HCI2509 (C12) wurde die Zellproliferation sowie die Zellmigration reduziert. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die reduzierten Proliferationsraten nach der LSD1-Hemmung mit einem Zellzyklus-„Arrest“ in der G2/M-Phase assoziieren. Um die durch LSD1-vermittelte onkogene Funktionen zu definieren, wurde daher als nächstes eine umfassende Expressionsprofilanalyse der NSCLC-Zelllinie PC9 durch Mikroarray-Hybridisierung durchgeführt. Die funktionelle Klassifizierung der deregulierten Gene nach LSD1-Inhibierung zeigte, dass die Gene, die den Zellzyklus beeinflussen, herunterreguliert wurden, während Gene, die mit einer Entzündung in Zusammenhang stehen, hochreguliert wurden.

Mittels einer Signalweganalyse konnte dargelegt werden, dass die mitotische Rolle des PLK1-Weges, nach LSD1-Inhibierung herunterreguliert wurde. Daneben konnte durch quantitative PCR-Assays belegt werden, dass die Expression von PLK1 und den nachgeschalteten mitose-relevanten Effektoren reduziert waren. Interessanterweise konnte eine PLK1-mRNA-Repression nach der LSD1-Inhibierung ebenfalls in Brust-, Leber-, Ösophagus-, Neuroblastom- und Lungentumorzelllinien beobachtet werden. Anhand von Chromatin-Immunpräzipitationsversuchen konnten wir zudem darlegen, dass LSD1 die Promotorstellen von PLK1 besetzt, welches eine direkte Verbindung zwischen LSD1 und PLK1 bestätigt. Diese Daten weisen darauf hin, dass LSD1 PLK1 positiv reguliert. Diese positive Regulierung ist für

einen effizienten G2 / M-Übergang der Zellen notwendig und verleiht der Zelle so Eigenschaften wie schnelles Zellwachstum und -proliferation.

Zudem konnte in dieser Arbeit mittels Immunpräzipitation-gekoppelter Massenspektrometrie, die Wechselwirkung vom LSD1-Protein, wie zuvor beschrieben, mit der Histon-Modifikations-Maschinerie als auch mit vielen neuartigen Bindungspartnern gezeigt werden. Gene-Ontology (GO) Term und Pathway-Analyse zeigte, dass die Mehrheit der Proteine, die an LSD1 binden, an der Chromatin-Modifikation und zusätzlich am RNA-Spleißen beteiligt war. Mit Immunpräzipitations- und Fluoreszenzmikroskopie-Versuchen konnte eine Koimmunpräzipitation und Kolokalisierung von RNA-Spleißfaktoren mit LSD1 aufgezeigt werden.

Zusammengefasst demonstrieren diese Erkenntnisse zum einen eine LSD1-Interaktion mit den Spleiß-relevanten-Proteinen und zum anderen eine mögliche Rolle beim RNA-Spleißen. Exon-spezifische Transkriptom-Profilanalyse zeigte zudem ein differentielles Spleißen von RNA-Transkripten nach LSD1-Hemmung. Insbesondere viele Gene, die mit dem Zellwachstum zusammenhängen, wurden in der Signalweg- Analyse als alternativ gespleißt hervorgehoben. Interessanterweise wurde das Exon 2 des Telomerase-Reverse-Transkriptase- (TERT) -RNA-Transkripts nach der LSD1-Hemmung alternativ gespleißt. Der Verlust von Exon 2 in der menschlichen TERT-mRNA führt zum Verschieben des Offenen Leserasters und zum Abbruch der Translation. Funktionelles TERT-Protein ist für die Telomerase-Aktivität notwendig, und wir konnten zeigen, dass die entsprechende Telomerase-Aktivität durch die LSD1-Inhibierung reduziert wurde. Die dargestellten Daten zeigen daher, dass LSD1 beim alternativen Spleißen von TERT involviert ist. Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass LSD1 eine dominierende Rolle bei der Tumor-assozierten Signalkasade spielt, was zu einem erhöhten Zellwachstum führt. Darüber hinaus wurden erstmals umfassende Hinweise gesammelt, dass LSD1 nicht nur an der Transkriptionsregulation beteiligt ist, sondern auch am alternativen Spleißen.