

Aus dem Institut für Pathologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

Dissertation

Methylierungsanalyse von HLA-A, ULBP2 und ULBP3 in kolorektalen Karzinomzellen

Zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae

(Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Janine Conrad

aus Bernau bei Berlin

Gutachter/ -in:

1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Chr. Sers

2. Prof. Dr. med. T. Tüting

3. Priv.-Doz. Dr. A. Paschen

Datum der Promotion:

4. Februar 2011

*Meinem Vater, Manfred Conrad,
auf den ich sehr stolz bin.*

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis.....	VI
Abbildungsverzeichnis.....	X
Tabellenverzeichnis	XII
1 Einleitung	1
1.1 Einführung.....	1
1.2 Tumorpathologie.....	2
1.2.1 Onkogene	2
1.2.2 Tumorsuppressorgene	4
1.2.3 DNA-Methylierung	5
1.3 Tumorimmunologie.....	9
1.3.1 MHC-Klasse-I-Moleküle	10
1.3.2 MIC-Gen-Familie	11
1.3.3 UL-16 binding proteins	11
1.4 Ziel der Arbeit	13
2 Materialien und Methoden.....	15
2.1 Materialien.....	15
2.1.1 Zellen	15
2.1.2 Bakterien.....	16
2.1.3 Materialien für die Zellkultur	16
2.1.4 Materialien für die Bakterienkultur	17
2.1.5 Materialien für molekularbiologische Arbeiten	19
2.2 Methoden	26
2.2.1 Zellkultur	26
2.2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden.....	27
2.2.3 Bisulfitsequenzierung.....	28
2.2.4 Northern-Blot Analyse	37
2.2.5 Oberflächenexpressionsanalyse mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie	42
2.3 Hypothesen und statistische Auswertung.....	45
2.3.1 Hypothesen.....	45
2.3.2 Statistische Auswertung	47

3	Ergebnisse.....	48
3.1	Bisulfitsequenzierung von HLA-A, ULBP2 und ULBP3 ..	48
3.1.1	Methylierungsanalyse der Gene HLA-A, HCG4 und ULBP2, 3 ohne Mek/Erk-Inhibition durch U0126	49
3.1.2	Methylierungsanalyse der Gene HLA-A, HCG4 und ULBP2 nach Mek/Erk-Inhibition durch U0126	58
3.1.3	Lösungskontrollen HLA-A, HCG4 und ULBP2	63
3.2	RNA-Expression von ULBP2	67
3.2.1	Northern-Blot Analyse	67
3.3	Oberflächenexpression von HLA-A, ULBP1, 2 und 3 in parentalen HCT116	68
3.3.1	Einfluss der Mek/Erk-Inhibition auf die HLA-A, ULBP2 und 3 Oberflächenexpression	68
3.4	Statistische Auswertung für ULBP2	70
3.4.1	Einfluss der unterschiedlichen DNMT-Knockouts auf die Methylierung von ULBP2	70
3.4.2	Einfluss der Mek/Erk-Inhibition auf die Methylierung von ULBP2	73
3.4.3	Einfluss von DMSO auf die Methylierung von ULBP2.....	75
4	Diskussion.....	76
4.1	Ras und DNA-Methylierung.....	76
4.2	Regulation der HLA-A-Expression.....	79
4.3	Regulation der ULBP-Expression	80
4.4	Methodik.....	84
4.4.1	Arbeit mit der HCT116 Zelllinie	84
4.4.2	Bisulfitsequenzierung.....	85
4.5	Tumor- und Therapierelevanz	86
5	Zusammenfassung.....	89
	Literaturverzeichnis.....	91
	Curriculum Vitae	102
	Publikationen	103
	Selbständigkeitserklärung.....	104
	Danksagung	105

Abkürzungsverzeichnis

AP-1	Apetala 1
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATF6	Activation Transcription Factor 6
5-AzaC	5-Aza-2'-Deoxycytidine
BNC	Basonuclein
CD8+	Cluster of Differentiation 8
CpG	Cytosin-Phosphat-Guanin
CMV	Cytomegalievirus
DAPI0	auch HCST; Hematopoietic Cell Signal Transducer
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Desoxyribonukleinsäure)
DNMT	DNA-Methyltransferase
EGF	Epidermal Growth Factor
Erk	Extracellular-Signal Regulated Kinase
FAS	TNF Receptor Superfamily, Member 6
FCS	Fetal Calve Serum
FSC	Forward Scatter
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
ggf	gegebenenfalls
G-Protein	Guaninnucleotid-bindendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosindiphosphat
Grb2	Growth Factor Responder Protein 2
GTP	Guanosintriphosphat

GAP	GTPase aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde
HER2/neu	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HIV	Human Immunodeficiency Virus
HLA	Human Leucocyte Antigene (auch MHC)
H-Ras	Harvey Ras
HSF1	Heat Shock Transcription Factor 1
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JAK2	Janus Kinase 2
K-Ras	Kirsten-Ras
LB	Luria Bertani
LMP2	Large Multifunctional Peptidase 2
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
Mek	Map-Erk-Kinase
MHC-1	Major Histocompatibility Complex Class 1
MIC-A	MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A
MIC-B	MHC Class I Polypeptide-Related Sequence B
Miz1	Msx-Interacting-Zinc Finger
Mmp2	Matrix Metalloproteinase 2
Myc	Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
MZF1	Myeloid Zinc Finger 1
Nef-Protein	HI-Virus Protein
NF-Kappa-B	Nuclear Factor of Kappa Light Polypeptide Gene Enhancer in B-cells

NKG2D	C-Typ lektin-ähnlicher Rezeptor der Natürlichen Killerzelle
NKG2DL	NKG2D-Ligand
NOD	Non-Obese Diabetic Mouse
Par-4	Prader-Willi/Angelman Region Gene 4
p16	Tumorsuppressorprotein p16
p21	Tumorsuppressorprotein p21
p53	Tumorsuppressorprotein p53
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
PI-3	Phosphatidylinositol-3
PML-RAR	Fusionsprotein aus PML (Promyelocytic leukemia) und RAR (Retinoic Acid Receptor)
PTEN	Phosphatase And Tensin Homolog
RAF	v-raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
Ral	v-ral Simian Leukemia Viral Oncogene Homolog A
RalGDS	Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator
Ras	Rat Sarcoma Virus Homolog
RasSF2	Ras Association Domain Family Member 2
RB	Retinoblastom
RNA	Ribonucleic Acid (Ribonukleinsäure)
rpm	Rounds Per Minute
SDC4	Syndecan 4
SOS	Son of Sevenless
SSC	Side Scatter
STAT5	Signal Transducer and Activator of Transcription 5

Abkürzungsverzeichnis

TAP	Transporter
Thbs1	Thrombospondin 1
Timp	Tissue Inhibitor of Metalloproteases
Timp2	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 2
u.a.	Unter anderem
ULBP	UL-16 Binding Protein
z.B.	zum Beispiel

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: EGF-Signalweg	3
Abbildung 2: Schema zur DNA-Methylierung	6
Abbildung 3: Bindung von ULBP an NKG2D.....	12
Abbildung 4: Cytosin nach Bisulfitbehandlung	29
Abbildung 5: Schema I zur Bisulfitbehandlung	30
Abbildung 6: Schema II zur Bisulfitbehandlung.....	31
Abbildung 7: Markierung einer DNA-Sonde durch random priming.....	40
Abbildung 8: Schematische Lage der Gene HCG4 und HLA-A1/2 auf Chromosom 6p21.33.	50
Abbildung 9: HLA-A1 Promotor-Methylierung	51
Abbildung 10: HCG4 Promotor-Methylierung	52
Abbildung 11: Schematische Lage des ULBP2-Gens auf Chromosom 6q25.1.....	53
Abbildung 12: ULBP2 Promotor-Methylierung, Abschnitt II	54
Abbildung 13: ULBP2 Promotor-Methylierung, Abschnitt III.....	55
Abbildung 14: Schematische Lage des ULBP3-Gens auf Chromosom 6q25.	56
Abbildung 15: ULBP3 Promotor-Methylierung, Abschnitte I-III	57
Abbildung 16: HCG4 Promotor-Methylierung nach Mek/Erk-Inhibition	59
Abbildung 17: HLA-A1 Promotor-Methylierung nach Mek/Erk-Inhibition	60
Abbildung 18: ULBP2 Promotor-Methylierung nach Mek/Erk-Inhibition, Abschnitt II	61
Abbildung 19: ULBP2 Promotor-Methylierung nach Mek/Erk-Inhibition, Abschnitt III.....	62
Abbildung 20: HCG4 DMSO-Kontrolle	64
Abbildung 21: ULBP2 DMSO-Kontrolle, Abschnitt II.....	65
Abbildung 22: ULBP2 DMSO-Kontrolle, Abschnitt III.....	66

Abbildung 23: Northernblot-Analyse für ULBP2	67
Abbildung 24: Oberflächenexpression HLA-A1/2 auf parentalen HCT116	69
Abbildung 25: Oberflächenexpression ULBP1, 2 und 3 auf parentalen HCT116	69
Abbildung 26: ULBP2 Promotor-Methylierung in %, Abschnitte II und III; alle Zelllinien im Vergleich	72
Abbildung 27: ULBP2 Promotor-Methylierung in % vor und nach Mek/Erk-Inhibition, Abschnitte II und III; parentale HCT116	74
Abbildung 28: Synopsis der potentiellen Transkriptionsfaktor- Bindungsstellen innerhalb von NKG2DL-Promotoren	82
Abbildung 29: ULBP Signalweg	87

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Potentielle Tumorantigene haben verschiedene Ursprünge.....	10
Tabelle 2: Nomenklatur der HCT116 Zelllinien unter Behandlung mit U0126 und DMSO	26
Tabelle 3: Übersicht über HLA-A-, ULBP2-, ULBP3-Primersequenzen und -Eigenschaften	32
Tabelle 4: Pipettierschema Bisulfit-PCR.....	33
Tabelle 5: Cyclor-Einstellungen Bisulfit-PCR	33
Tabelle 6: Cyclor-Einstellungen Sequenzierungsreaktion	36
Tabelle 7: Cyclor-Einstellungen RT-PCR.....	39
Tabelle 8: Statistiken für ULBP2 II und III in parentalen HCT116, DNMT1-/-, DNMT3b-/-, DKO	71
Tabelle 9: Statistiken für ULBP2 II und III in parentalen HCT116 vor und nach U0126-Behandlung.....	73
Tabelle 10: Statistiken für ULBP2 II und III in parentalen HCT116 vor und nach DMSO-Behandlung.....	75
Tabelle 11: aktivierte Ras Onkogene in humanen Tumoren	76

1 Einleitung

1.1 Einführung

Die Diagnose Krebs wird pro Jahr allein in Deutschland rund 430.000 mal gestellt (1). Noch heute stirbt eine Vielzahl von Menschen an den Folgen des progressiven Wachstums einer einzigen transformierten Zelle. Die betroffene Zelle muss verschiedene Mutationen durchlaufen bis sich daraus eine bösartige Neubildung entwickeln kann (2). Die genetischen Alterationen betreffen immer Gene, die eine essentielle Rolle in der Zellzyklusregulation spielen. Zur Tumorentstehung kommt es dabei durch Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen und gleichzeitige Aktivierung von Onkogenen.

Neben den genetischen Alterationen beschäftigt sich die moderne, molekulare Epigenetik mit allen Variationen innerhalb der Chromatinstruktur. Eine wichtige Rolle konnte hierbei in den letzten Jahren der DNA-Methylierung im Zusammenspiel mit der Histon-Modifikation zugeschrieben werden. Die Modifikationen beeinflussen die Struktur des Chromatins und bestimmen, ob DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren zugänglich und Gene aktiv oder inaktiv werden. Da epigenetische Muster tendenziell reversibel sind, eröffnen sich für Erkrankungen mit epigenetischer Ätiologie völlig neue Therapiekonzepte im Hinblick auf Substanzen, die die DNA-Methylierung oder Histondeacetylierung inhibieren (Azacytidin, Trichostatin A, Valproinsäure u.a.) und mit deren Einsatz „abgeschaltete“ Gene wieder „angeschaltet“ werden können. Erste klinische Studien mit epigenetisch aktiven Arzneimitteln gibt es bereits (3).

1.2 Tumorpathologie

1.2.1 Onkogene

Onkogene kodieren häufig für Proteine, über die Apoptose und Zellproliferation reguliert werden, wie z.B. für G-Proteine, nukleäre Transkriptionsfaktoren oder Tyrosin-Kinase-Rezeptoren. Veränderungen solcher Gene in Form von Chromosomenaberrationen oder Punktmutationen, führen dazu, dass die betreffenden Proteine einer permanenten Aktivierung unterliegen („gain of function“ – Mutation). Dadurch ist es möglich, dass ein komplexer Signalweg außer Kontrolle gerät und nicht mehr differenziert reagieren kann. Zur Ausprägung des malignen Phänotyps reicht oft schon die Mutation innerhalb eines Allels (4).

Ras (Rat Sarcoma Virus Homolog)

Wichtige Vertreter der Protoonkogene sind die Gene, die für die Gruppe der Ras-Proteine kodieren. Die Gene H(Harvey)-, K(Kirsten)-, und N(Neuroblastoma)-Ras kodieren für Membran-assoziierte, 21kDa große GDP/GTP-bindende Proteine (5). Sie liegen an der Innenseite der Zytoplasmamembran und sind zentrale Schaltstellen für Signalwege von der Zelloberfläche zum Zellkern.

Normalerweise sind die Proteine zu fast 100% in einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand (6). Bindet jedoch ein Wachstumsfaktor wie z.B. EGF an den entsprechenden Rezeptor, kommt es über Grb2 zu einem durch SOS-vermittelten GTP-Austausch und zu einer Aktivierung von Ras (Abbildung 1).

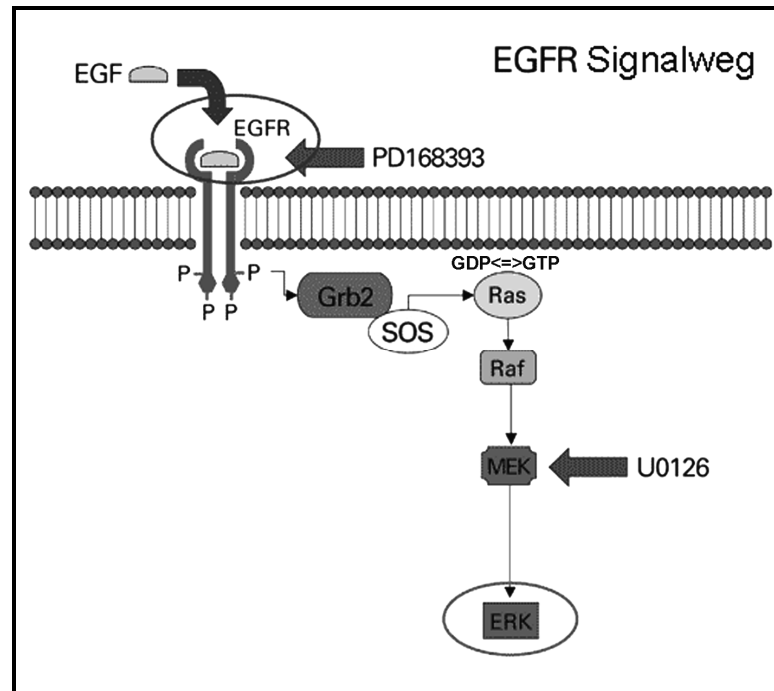


Abbildung 1: EGF-Signalweg

Der EGF-Rezeptor ist ein Transmembranrezeptor mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität, der beim Menschen in allen Zellarten vorkommt. Durch extrazelluläre Bindung von EGF kommt es zur Autophosphorylierung des Rezeptors und anschließend über Grb2 und einen SOS-vermittelten GTP-Austausch zur Aktivierung von Ras (Graphik modifiziert nach (7)).

Eine endogene GTPase und spezielle Aktivatoren der GTPase schalten das aktivierte Ras-Molekül normalerweise rasch wieder ab. Mutationen betreffen sowohl die endogene GTPase, als auch deren aktivierende Proteine.

In Ras Genen führen die häufigsten Mutationen zu einem Austausch der Aminosäuren 12, 13, 59 oder 61 und damit zu einer verminderten Sensitivität der endogenen GTPase gegenüber GTPase-stimulierenden Faktoren. Das mutierte Ras-Protein kann, einmal aktiviert, nicht mehr deaktiviert werden. Dadurch werden verschiedene intrazelluläre Kinasekaskaden unabhängig von externen Signalen permanent stimuliert. Ein aktiviertes Ras-Protein ändert seine Konformation und steuert eine Vielzahl von Effektorproteinen, wie z.B. die

Serin/Threonin Kinase Raf, RalGDS und die PI-3 Kinase. Über diese Proteine werden Phosphorylierungskaskaden aktiviert, die eine Modulation der Translation (8;9), eine direkte Veränderung des Zytoskeletts (10) und vor allem gravierende Veränderungen der Genexpression auslösen.

Ras-Gene sind in etwa 30% aller malignen humanen Tumoren mutiert (11). Innerhalb der verschiedenen Tumortypen gibt es jedoch signifikante Unterschiede hinsichtlich der Frequenz der Mutationen und der Isoform der Ras Proteine.

1.2.2 Tumorsuppressorgene

Man könnte die Tumorsuppressorgene auch als die „Guten“ bezeichnen, die wie z.B. p53 als Wächter des Genoms, dem „Bösen“ (Onkogenen) im Leben einer Zelle gegenüber stehen. Die Proteine der Tumorsuppressorgene überwachen die Mitose einer jeden Zelle und hemmen diese im Falle einer Schädigung des Erbmateri als (12). Wenn irreparable Schäden auftreten, können sie den programmierten Zelltod (Apoptose) der betreffenden Zelle einleiten. Daher wird ihnen eine sogenannte „gate-keeper“ Funktion zugeschrieben. Zu den wichtigsten Tumor-Suppressorgen zählen die Gene für das GTPase aktivierende Protein NF1, den humanen Transkriptionsfaktor p53, die Zellzyklusproteine RB und p16, sowie für den Signalketten-Inhibitor PTEN (13-16). Für den vollständigen Verlust der Suppressoraktivität müssen beide Allele eines Gens betroffen sein. Das kann nach der Two-Hit-Hypothese z.B. durch eine Punktmutation (1. Hit) und eine Deletion (2. Hit) geschehen, was immer zu einem „loss of function“ führt (4).

Mutieren solche Gene, werden in Tumoren keine funktionsfähigen Proteine mehr synthetisiert. Dieser Funktionsverlust hat meist den Ausfall weiterer wichtiger

Zellzyklusregulatoren und Tumorsuppressoren zur Folge (17). Ein mögliches Resultat ist auch hier ungehemmtes Zellwachstum.

1.2.3 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist ein wichtiges Charakteristikum humaner Tumore (18). Auch in gesunden Zellen ist sie ein bedeutender Mechanismus in der Regulierung der Genexpression. Gene werden vor allem während der Entwicklung mittels Methylierung an- und ausgeschaltet. Eine Promotor-Hypermethylierung führt meist dazu, dass das betreffende Gen in seiner Expression supprimiert wird.

Ein Vergleich der Methylierung normaler Zellen mit Krebszellen zeigt, dass Letztere allgemein **hypomethyliert** sind, andererseits jedoch eine ausgeprägte **Hypermethylierung** der CpGs innerhalb regulatorischer Genelemente (wie z.B. Promotoren) aufweisen (19;20). Innerhalb von Promotoren führt eine Hypermethylierung dazu, dass die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindert und das betreffende Gen in seiner Expression gehemmt wird (21). So auch im Falle der Tumorsuppressorgene p16 oder RB (22).

Die Methylierung erfolgt während der DNA-Synthese mittels DNA-Methyltransferasen (DNMTs), (Abbildung 2). Die DNMTs binden an PCNA und fügen als integraler Bestandteil des Replikationskomplexes Methylgruppen in alle neu synthetisierten DNA-Stränge ein. Cytosin wird dabei im Bereich der CpC-Inseln zu 5-Methyl-Cytosin methyliert. CpC-Inseln sind kurze DNA-Regionen, die einen hohen Gehalt an CpG-Dinucleotiden besitzen und stromaufwärts vor etwa der Hälfte aller menschlichen Gene liegen.

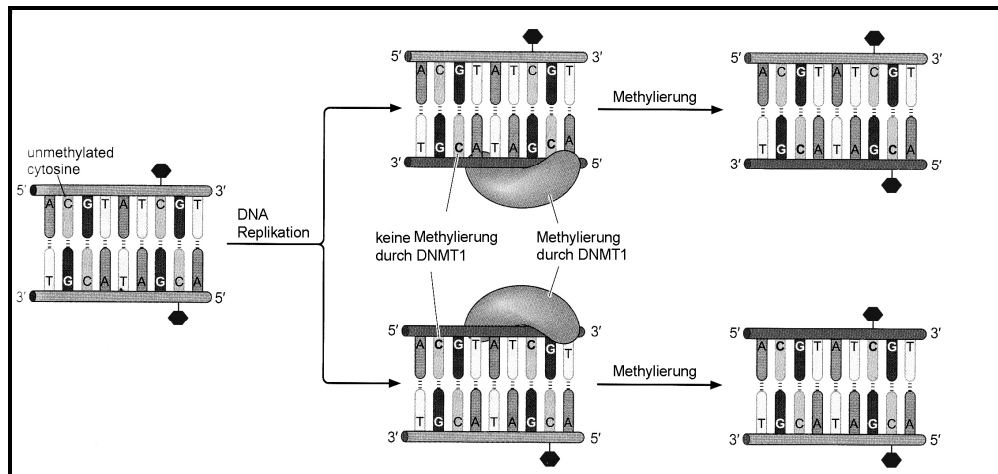


Abbildung 2: Schema zur DNA-Methylierung

Die initiale DNA-Methylierung erfolgt über de novo Methyltransferasen (DNMT3a/b). Das Methylierungsmuster kann während der Replikation beibehalten und an die Tochtergeneration weitergegeben werden. Dargestellt ist eine DNA-Sequenz mit zwei Cytosinen pro DNA-Strang. Ein Cytosin ist methyliert, das andere nicht. DNMT1 erkennt die hemimethylierte DNA und hängt eine Methylgruppe an das Cytosin des komplementären Stranges an. Die unmethylierte Sequenz wird durch das Enzym nicht erkannt und bleibt unverändert (Graphik modifiziert nach (7)).

Das Säugetiergenom beherbergt fünf verschiedene DNA-Methyltransferasen, DNMT1, 2, 3A, 3B und 3L (23). DNMT1 wird in drei unterschiedlichen Splicevarianten exprimiert. Ihr wird im Allgemeinen der größte Anteil an der Methylierungsarbeit zugeschrieben. Obwohl zahlreiche Studien in Mäusen die Rolle von DNMT1 in der Tumorigenese deutlich machen konnten, bleibt ihre Rolle in humanen Karzinomzellen weiterhin zum großen Teil unverstanden. DNMT1 gilt, aufgrund ihrer Präferenz für hemimethylierte DNA, als Methylierungs-Erhalter, spielt aber auch eine essentielle Rolle in der Proliferation und dem Überleben menschlicher Krebszellen (24). DNMT2 formt stabile DNA-Protein-Komplexe. Kürzlich konnte eine schwache CpG-Aktivität für die humane DNMT2 gezeigt werden, jedoch bleibt auch ihre Rolle in der DNA-Methylierung kontrovers (25). DNMT3a und DNMT3b sind vermutlich für die de novo

Methylierung während der embryonalen Entwicklung und eventuell auch während der Tumorigenese verantwortlich (26). Der durch genetische Rekombination erzeugte Verlust von DNMT1 und -3b führt in der humanen Kolonkarzinomzelllinie HCT116 zu einer fast kompletten Demethylierung und Wachstumssuppression (27). Das lässt vermuten, dass die zwei Enzyme kooperativ die DNA-Methylierung, folglich auch die „Stilllegung der Gene“ (gene silencing) in humanen Krebszellen aufrechterhalten und dadurch einen wichtigen Faktor für deren neoplastische Proliferation darstellen (28).

Schon früh wurde ein Zusammenhang zwischen Onkogen-Aktivierung und genspezifischer Methylierung vermutet, welcher erstmals 2002 anhand des PML-RAR Transkriptionsfaktors nachgewiesen werden konnte (29). Dieses Fusionsprotein entsteht in akuten promyeloischen Leukämien durch chromosomale Translokation. Es bindet in den Tumorzellen an den Promotor des RAR β Tumorsuppressorgens und führt über die Rekrutierung von Histon-Deacetylasen und DNA-Methyltransferasen zum Expressionsblock.

Das Myc-Onkogen, welches an der DNA einen Komplex mit Miz1 bildet führt über eine Rekrutierung von DNMT3a zur Methylierung und damit zur Inhibition des Zellzyklusregulators p21^{CIP1} (30).

Im Hinblick auf immunmodulatorische Gene konnte in humanen Plattenepithelzellkarzinomen eine deutliche Abregulierung der Expression von MHC-Klasse I Genen, aufgrund einer DNA-Hypermethylierung, gezeigt werden (31).

Diese Beobachtungen deuten auf eine wichtige Rolle aktivierter Onkogene in der durch Methylierung bedingten transkriptionellen Repression von wachstumshemmenden oder auch immunmodulatorischen Genen hin (32). Auch das zytoplasmatische, kleine GTP-bindende Ras Onkoprotein ist möglicherweise ein wichtiger Regulator der DNA-Methylierung und eventuell

an einer bezüglich Tumorzellen häufig zu beobachtenden inadäquaten Immunantwort beteiligt. Im Mausmodell wurde bereits ein Zusammenhang zwischen einer durch K-Ras vermittelten Transformation und der Abregulierung verschiedener Komponenten des MHC-Klasse-I prozessierenden Systems beschrieben. Um zu untersuchen ob dieser Zusammenhang auch in humanen Tumoren von Bedeutung ist, wurden u.a. primäre Tumoren und Lymphknoten-Metastasen von Patienten mit kolorektalem Karzinom hinsichtlich einer K-Ras Mutation und deren Auswirkung auf Komponenten des Antigenprozessierenden Systems, sowie der Tumorzellproliferation analysiert. Im Vergleich zur autologen kolorektalen Mukosa wurde in den primären Adenokarzinomen und in den dazugehörigen Lymphknotenmetastasen eine deutlich verminderte Expression von TAP1 und LMP2 gefunden. Mehr als 60% der kolorektalen Tumore mit einem Defekt in TAP1 und LMP2 zeigten dabei K-Ras Mutationen. Die genannten Zusammenhänge unterstützen die Hypothese, dass K-Ras Mutationen über Abregulierung der für die MHC-I-Expression wichtigen Komponenten zu einer verminderten Immunerkennung von Tumoren führen.

1.3 Tumorimmunologie

Eine komplexe Erkrankung wie Krebs erfordert eine komplexe Gegenwehr. Die Idee, das Immunsystem für Krebszellen zu sensibilisieren, klingt bestechend einfach. Es müsste eine Methode entwickelt werden, welche eine spezifische Immunantwort induziert, die zwischen Tumorzellen und dem gesunden benachbarten Gewebe differenzieren kann.

Tierversuche zeigen, dass einige Tumore spezifische Immunreaktionen auslösen, die wachstumslimitierend wirken können. Die Immunantworten richten sich dabei anscheinend gegen MHC-gebundene Peptide von Antigenen, die in den Tumorzellen mutiert, falsch exprimiert oder überexprimiert werden (sogenannte Tumorantigene; Tabelle 1). Trotzdem entwickeln sich bei Individuen ohne T-Zellen nicht mehr Tumoren als bei Gesunden. Ein Grund dafür ist möglicherweise, dass die meisten Tumoren keine speziellen Antigene erzeugen und außerdem keine für die Auslösung einer adaptiven Immunantwort notwendigen kostimulierenden Moleküle exprimieren. Bei manchen Tumoren, wie z.B. dem Kolon- und dem Zervixkarzinom, wird ein bestimmtes Molekül der MHC-Klasse-I nicht mehr exprimiert. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Ras mit der Suppression von MHC-I korreliert (33). Wie experimentelle Untersuchungen zeigen, kann ein Tumor, der überhaupt keine MHC-Klasse-I-Moleküle mehr exprimiert, von zytotoxischen T-Zellen nicht erkannt werden, ist dann aber für Angriffe durch natürliche Killerzellen anfällig. Natürliche Killerzellen binden über NKG2D-Rezeptoren an NKG2D-Liganden (z.B. ULBPs) der Zielzellen und sind dadurch in der Lage, diese zu zerstören. Einige Tumore exprimieren jedoch wenig oder gar keine ULBPs und entziehen sich auf diesem Wege einer Immunabwehr (34). Weiterhin werden in Tumoren bereits exprimierte NKG2D-Liganden von der Oberfläche abgelöst, was ebenfalls in einer verminderten Immunerkennung durch NK-Zellen resultiert (35).

Antigenklasse	Antigen	Art des Antigens	Tumortyp
Tumorspezifische mutierte Onkogene oder Tumorsuppressoren	Cyclin-abhängige Kinase 4	Zellzyklusregulator	Melanom
	β -Catenin	Relaisfunktion bei der Signalübertragung	Melanom
	Caspase-8	Regulator der Apoptose	Schuppenzellkarzinom
	Oberflächen-Ig	Spezifischer Antikörper nach Genumlagerungen in B-Zell-Klon	Lymphom
Anormale Genexpression	HER-2/neu	Rezeptortyrosinkinase	Mammakarzinom Ovarialkarzinom

Tabelle 1: Potentielle Tumorantigene haben verschiedene Ursprünge (36).

1.3.1 MHC-Klasse-I-Moleküle

Der Genlocus des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 des menschlichen Genoms und kodiert für eine Klasse von Molekülen, die beim Menschen als HLA (human leucocyte antigene) bezeichnet werden (37). Die MHC-Klasse-I-Moleküle werden im Menschen HLA-A, -B und -C genannt und auf allen Körperzellen exprimiert, mit Ausnahme von Erythrozyten, bestimmten Nervenzellen und Zellen des Auges (38). Die Produkte sind membrangebundene Glykoproteine, die $\alpha\beta$ -Heterodimere bilden, wobei lediglich die α -Kette vom MHC-Locus kodiert wird. Das β 2-Mikroglobulin liegt auf Chromosom 15. Die auf Klasse I Molekülen gebundenen Peptide repräsentieren Stichproben des zelleigenen Proteoms und bilden damit die Grundlage, auf der zytotoxische CD8+ T-Zellen zum einen transformierte oder infizierte Zellen eliminieren, zum anderen aber gesunde Zellen tolerieren können.

Neben den klassischen MHC-I-Molekülen gibt es eine Vielzahl von Genen, die Varianten von MHC-I-Molekülen kodieren. Sie sind mit der MHC-I-Region gekoppelt und kodieren wie MHC-I-Gene für Zelloberflächenmoleküle, die zum Teil auch β 2-Mikroglobulin-assoziiert sind. Einige werden von NK-Zell-Rezeptoren (NKG2D/DAP10) erkannt. Im Folgenden sind die für das Verständnis der vorliegenden Arbeit wichtigsten Vertreter beschrieben.

1.3.2 MIC-Gen-Familie

Es gibt 5 MIC-Gene, von denen jedoch nur zwei (MIC-A und MIC-B) vor allem in Epithelzellen und Fibroblasten exprimiert werden. Sie werden als Reaktion auf zellulären Stress induziert und sind möglicherweise an der angeborenen Immunität beteiligt. Der MIC-Rezeptor besteht aus NKG2D und DAP10.

1.3.3 UL-16 binding proteins

Der Genort für ULBPs liegt auf dem langen Arm des Chromosom 6 (6q25). ULBPs wurden als Zielrezeptoren für das humane CMV (Cytomegalievirus) Glykoprotein UL-16 identifiziert und stehen für „UL-16 binding proteins“. ULBP1, 2 und 3 bilden zusammen eine neue Familie der humanen MHC-I-Moleküle. Im Unterschied zu den MHC-I-Molekülen sind sie GPI-gebunden und verfügen weder über eine α 3-Domäne, noch sind sie β 2-Mikroglobulin-assoziiert.

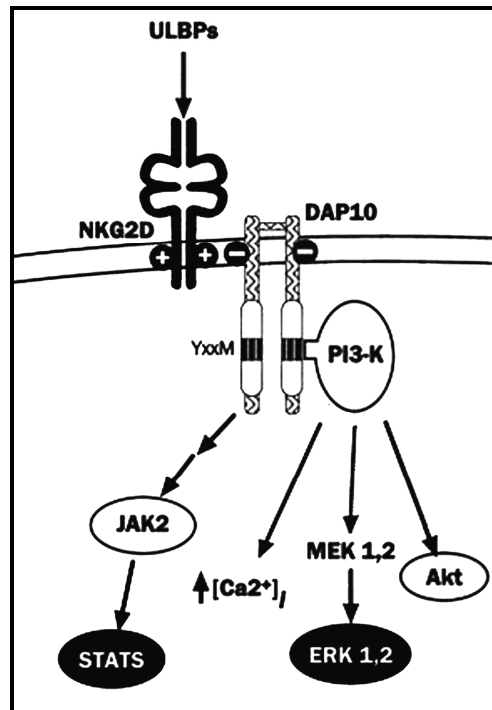


Abbildung 3: Bindung von ULBP an NKG2D

NKG2D-Liganden (ULBPs) aktivieren NK-Zellen über Bindung an NKG2D/DAP 10 Heterokomplexe. Die Signale werden durch Interaktion und Aktivierung intrazellulärer Proteintyrosinkinasen (PI3-K/Akt, Mek/Erk, JAK2/STAT5) ins Zellinnere geleitet.

Als NKG2D-Liganden aktivieren ULBPs NK-Zellen offenbar über Bindung an NKG2D/DAP 10 Heterokomplexe (Abbildung 3), die durch Interaktion und Aktivierung intrazellulärer Proteintyrosinkinasen das Signal ins Zellinnere leiten. Dadurch wird eine Zelle, die ULBPs auf ihrer Oberfläche exprimiert, sensitiv gegenüber NK-Zelltoxizität. Das CMV blockiert mit seinem Glykoprotein UL-16 ULBP und verhindert so die dadurch normalerweise induzierte NK-Zellantwort (39). Ausgehend davon wurden NKG2D-Liganden als „danger signals“ angenommen, die abnorme Zellen über NKG2D für zytotoxische Lymphozyten markieren (40;41).

1.4 Ziel der Arbeit

Forschungsschwerpunkt der Arbeitsgruppe ist die Untersuchung von Ras-Zielgenen (42).

In einem Zellmodell der Ratte wurde ein Zusammenhang zwischen Ras/MAPK-abhängiger und DNMT-abhängiger Genregulation gefunden. Das Modell verfügt über ein induzierbares H-Ras, worüber neoplastische Transformation und Zielpromotor-Hypermethylierung getriggert werden (43).

Um solche Effekte auch am menschlichen Modell zu untersuchen, arbeiteten wir mit der humanen Kolonkarzinom Zelllinie HCT116, welche über eine Mutation im K-Ras-Gen und dadurch über eine konstitutiv aktive Ras-Erk-Kaskade verfügt.

Auf Grundlage der parentalen Zelllinie wurden von Rhee et al. drei Knockout-Zelllinien generiert: HCT116 DNMT1^{-/-}, -DNMT3b^{-/-}, -DKO, welche die differenzierte Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen K-Ras Aktivierung und deren Auswirkung auf die beiden DNA-Methyltransferasen DNMT1 und -3b erlauben.

Im Vorfeld der Arbeit wurde der Einfluss von Mek/Erk auf das Proliferationsverhalten der HCT116 Zelllinie gezeigt und die unterschiedlichen Enzym-Knockouts (DNMT1^{-/-}, DNMT3b^{-/-} und DKO) mittels Westernblot verifiziert. Es wurden Genexpressionsprofile für HCT116 DNMT1^{-/-}, DNMT3b^{-/-} und DKO erstellt (MicroArray). Analysen wurden ebenfalls für U0126 (Mek/Erk-Inhibitor) und DMSO behandelte Zelllinien durchgeführt. Jeder unbehandelte (DMSO) und behandelte (U0126) Knockout wurde mit der parentalen Zelllinie verglichen. Eine anschließende GoStat-Analyse (44) ergab eine Gruppe unterschiedlich regulierter Gene, die im funktionellen Zusammenhang mit der Immunantwort standen (z.B. die Gene für HLA-A, HLA-B, HLA-G, FCGR1, ULBP2, ULBP3) (45). Die ermittelte Gruppe einer genaueren Analyse der DNMT-

und Mek/Erk-Abhängigkeit mittels Bisulfitsequenzierung zuzuführen, war Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit. Aus diesen Beobachtungen ergaben sich folgende Fragestellungen:

- Sind die Gene für HLA-A, ULBP2 und ULBP3 in den HCT116 Zellen methyliert?
- Hat der Knockout verschiedener DNA-Methyltransferasen einen unterschiedlichen Einfluss auf das Methylierungsmuster von HLA-A, ULBP2 und ULBP3?
- Besteht ein Zusammenhang zwischen dem Ras MAPK – Signalweg und der Methylierung von HLA-A, ULBP2 und ULBP3?
- Hat die Methylierung von HLA-A, ULBP2 und ULBP3 Einfluss auf deren Oberflächenexpression?
- Lässt sich ein Zusammenhang zwischen Methylierungsstatus und RNA-Expression für ULBP2 zeigen?

Für HLA-A, ULBP2 und ULBP3 erfolgten in allen HCT116 Zelllinien Methylierungsanalysen mittels Bisulfitsequenzierung. Um den hypothetischen Zusammenhang zwischen Mek-Erk und DNA-Methylierung zu untersuchen, wurden alle Zelllinien mit dem Mek1,2-spezifischen Inhibitor U0126 behandelt und die genannten Abschnitte erneut hinsichtlich ihres Methylierungsgrades analysiert (Bisulfitsequenzierung). Außerdem wurden in parentalen HCT116 und in parentalen HCT116 nach U0126-Behandlung zusätzlich Oberflächenexpressionsanalysen für die entsprechenden Abschnitte mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie durchgeführt. Eine Analyse des RNA-Expressionslevels erfolgte mittels Northernblot und anschließender Hybridisierung für ULBP2 in parentalen HCT116, in HCT116 DKO und in U0126-behandelten Zelllinien.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zellen

HCT116: Die HCT116 Zellen weisen eine epithelzellähnliche Morphologie auf. Der kanzerogene Phänotyp ist durch eine Beta-Catenin- und eine K-Ras-Mutation charakterisiert, was zu einer konstitutiv aktiven Ras-Erk-Kaskade führt. Dadurch kommt es zu einem gestörten Proliferationsverhalten, welches zusätzlich durch die Beta-Catenin-Mutation verstärkt wird. Beta-Catenin ist normalerweise für das Bilden adhärenter Zellverbindungen zuständig und beeinflusst daher auch Zellmorphologie und -wachstum (46).

Auf der Grundlage der parentalen HCT116 Zelllinie wurden drei Knockout-Zelllinien von Rhee et al. generiert (47):

- **DNMT1^{-/-}:** Knockout für die DNA-Methyltransferase 1 (DNMT1). Kürzlich wurde für DNMT1^{-/-} Zellen gezeigt, dass trotz des DNMT1-Knockouts, ein verkürztes DNMT1 exprimiert wird. Man spricht von hypomorphen DNMT1^{-/-} Zellen (48); im Folgenden als DNMT1^{-/-} bezeichnet.
- **DNMT3b^{-/-}:** Knockout für DNMT3b. Keine Aktivität für DNMT3b. Volle Aktivität für DNMT1.
- **DKO:** Knockout für DNMT1 und DNMT3b mit verkürztem DNMT1.

2.1.2 Bakterien

- **E. coli OneShot®TOP10** (Invitrogen): F-mcrA.(mrr-hsdRMS-mcrBC) Ö80lacZ.M15 .lacx74 recA1deoR araD139.(araleu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1nupG

2.1.3 Materialien für die Zellkultur

- **Zusätze**

U0126: U0126 ist ein künstlich synthetisierter, organischer Mek1/2-Inhibitor, der die Kinaseaktivität von Mek in vivo und in vitro effektiv inhibiert und dadurch eine weitere Signalweiterleitung innerhalb der Ras-Mek-Erk-Kaskade verhindert (49). 20mM U0126 wurden in 117µl DMSO gelöst.

DMSO: Da DMSO in hohen Konzentrationen das Zellwachstum negativ beeinflusst und außerdem Histone deacetyliert, wurde eine Lösungskontrolle mitgeführt (50).

- **Zellkulturmedien und Reagenzien**

Material	Firma
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom AG
Hygromycin	Roche
McCoy's Medium	Gibco
Trypsin	Gibco
U0126	Promega

- **Sonstige Materialien**

Material	Firma
Deckgläser	Menzel-Gläser

Kulturflaschen	FALCON, Becton Dickinson
Neubauer Zählkammer	Marienfeld
Objektträger	R. Langenbrinck
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One

2.1.4 Materialien für die Bakterienkultur

- **Bakterienkulturmedien und Reagenzien**

S.O.C. Medium (5% Bacto-Tryptone, NaCl 8,6mM, 0,5% Bacto-Hefe-Extrakt, KCl 2,5mM, MgSO₄ 20mM, Glucose 20mM): Die Komponenten wurden wie angegeben in sterilem H₂O gelöst und anschließend zum Transformationsansatz gegeben. Das Medium wurde bei -20°C gelagert.

LB-Medium (1% Bacto-Trypton, 0.1% NaCl, 0.5% Bacto-Hefe-Extrakt, pH 7.0): Zur Herstellung von LB-Medium wurden die einzelnen Komponenten in H₂O aufgelöst, pH mit NaOH eingestellt und das Medium anschließend autoklaviert. Die Aufbewahrung erfolgte bei Zimmertemperatur. Antibiotika (50µg/ml Ampicillin) wurden stets unmittelbar vor Beimpfung des Mediums zugesetzt. Alternativ wurde auch folgendes Fertigpulver verwendet: LB-Medium Gibco BRL/Invitrogen.

LB-Agarplatten (15g Bacto-Agar pro 1000ml LB-Medium, 50µg/ml Kanamycin, 40µg/ml x-Gal, 100mM IPTG): Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde 15g Bacto-Agar 1000ml LB-Medium vor dem Autoklavieren zugesetzt. Nach dem Abkühlen (ca. 55°C) wurden zu 15ml Medium 15µl Antibiotika, 60µl x-Gal und 30µl IPTG gegeben. Die Platten wurden gegossen und bei 4°C aufbewahrt.

STAB-Agar (10g Bacto-Tryptone, 5g NaCl, 5g Bacto-Hefe-Extrakt, pH 7,3): Die Zusätze wurden im angegebenen Verhältnis vermischt, in H₂O gelöst und anschließend in 500ml SCHOTT-Duran-Flaschen abgefüllt. 6g Stab-Agar auf 1000ml wurde vor dem Autoklavieren zugesetzt. Anschließend wurden 300µl Cystein (1mg/ml), 300µl Thymin (1mg/ml) und 30µl Kanamycin (50µg/ml) zu 30 ml Medium gegeben.

Material	Firma
Ampicillin, Natriumsalz	Merck
Bacto-Agar	Difco, Becton Dickinson
Bacto-Yeast-Extract	Difco, Becton Dickinson
Bacto-Tryptone	Difco, Becton Dickinson
D(+)-Glucose	Merck
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth
KCl	Merck
MgSO ₄	Merck
NaCl	Merck
S.O.C. Medium	Invitrogen

- **Sonstige Materialien**

Material	Firma
Mikrotiterplatten (96 Well Microtest Zellkulturplatte)	FALCON, Becton Dickinson
Röhrchen (12ml, sterile TC-Tube)	Greiner Bio-One
Petrischalen (100x20mm)	FALCON, Becton Dickinson

2.1.5 Materialien für molekularbiologische Arbeiten

- Chemikalien und Reagenzien

Material	Firma
Agarose	SERVA
Bromphenolblau	Sigma
Chloroform (reinst)	Merck
Coomassie Brillantblau R250	Sigma
³² P-Desoxycytidin-Triphosphat (DCTP)	Amersham
DEPC (Diethylprocarbonat)	Sigma
Destilliertes Wasser	eigene Herstellung
Ethanol (absolute)	J.T. Baker
Ethidium Bromide (10mg/ml)	Sigma
ExpressHyb Hybridisierungsmix	Clontech
Formaldehyd	J.T. Baker
Glycerol	Merck
Hydroquinon (minimum 99%)	Sigma
Isoamyl Alcohol	Sigma
Isopropanol (2-Propanol)	J.T. Baker
Kanamycin	Carl Roth
Ladepuffer für DNA (Loading Dye)	Fermentas
Flüssigwax, Liquid-Wax Chill Out	M J Research Incorporated
Mineral Oil (Light white oil)	Sigma
MOPS (Morpholinopropansulfonsäure)	Merck
Natriumacetat-Trihydrat	Merck
Natriumdisulfit	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck

NuSieve GTG Agarose	Biozym
Phenol (Roti Phenol)	Carl Roth
SDS	Sigma
Sea Plaque LMP Agarose (Low melting temperature agarose)	CAMBREX
Smart Ladder SF (small Fragment 1kb)	Eurogentec
Trizol Reagent	Invitrogen
Wasser (HPLC)	J.T. Baker

- **Puffer, Lösungen und Gele**

Puffer	Zusammensetzung
FACS-Puffer	1 x PBS 5% FCS 0,1% Natriumazid (NaN ₃)
FACS-Fixations-Puffer	1% PFA/1xPBS
Gel DNA (100ml)	1,8g Agarose 100ml TAE
Gel RNA (200ml)	1,6g Agarose 146ml DEPC Wasser 10,8ml 37% Formaldehyd 20ml 10 x MOPS
Ladepuffer für RNA	0,35ml DEPC 0,21ml 10xMOPS 0,35ml Formaldehyd 0,104ml 100% Glycerol 3µl Ethidiumbromid Bromphenolblau

PBS	150mM NaCl 8mM NaH ₂ PO ₄ x2H ₂ O 3mM KCl pH 7,4
Strippingpuffer Nytran-Membran (500ml)	2,5ml SSC 2,5ml 20% SDS
TAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer)	4,841g/l Trisbase 0,372g/l EDTA
TE-Puffer	10mM Tris-HCl 1mM EDTA

- **Enzyme**

Enzym	Firma
Bam H I Restriktionsenzym (10u/ml)	Promega
Restriktionspuffer (Buffer E 10)	Promega
Proteinase K (RNase-Free Dnase Set 50)	Qiagen

- **Primer**

Primer	Firma
Bisulfitprimer (ULBP2 I, ULBP2 II, ULBP2 III); Sequenz siehe Tabelle 3	MWG Biotech
Bisulfitprimer (HLA-A); Sequenz siehe Tabelle 3	MWG Biotech
RT-PCR Primer	MWG Biotech
Sequenzierprimer (M13 Universal(-20)) 5'-tgt aaa acg acg gcg agt-3'	MWG Biotech

Sondenprimer (ULBP2) F: 5'-ttt tgt ttg ttg ttt ttg taa taa a-3' R: 3'-aaa att ctc taa cct caa ctt cc-5'	MWG Biotech
---	-------------

- **Antikörper**

Antikörper	Firma
PE Antikörper (R-Phycoerythrin AffiniPure F(ab') ₂ Frag Goat Anti-Mouse IgG + IgM (H+L))	R&D Systems
HLA-A1 spezifischer mAb 0544HA (Maus IgM)	R&D Systems
HLA-A2 spezifischer mAb 117HB (Maus IgG2a) Hybridomüberstand --> 50 µl/96 well	R&D Systems
ULBP-1 spezifischer mAb1380 (Maus IgG2a) 5 µg/ml --> 40 µl/96 well	R&D Systems
ULBP2 spezifischer mAb 1298 (Maus IgG2a) 5 µg/ml --> 40 µl/96 well	R&D Systems
ULBP-3 spezifischer mAb 1517 (Maus IgG2a) 5 µg/ml --> 40 µl/96 well	R&D Systems
pan-HLA-I spezifischer mAb W6/32 (Maus IgG2a)	R&D Systems

- **Kits**

Kit	Firma
Access RT-PCR System	Promega
QIAprep Spin MiniPrep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Random Primed DNA Labeling Kit	Roche

Sequi Therm DNA-Sequencing Kit-LC	EXCEL Epicentre Biotechnologies
The Original TA Cloning Kit pCR 2.1 vector	Invitrogen

- **Sonstige Materialien**

Material	Firma
Messkolben	SCHOTT DURAN
Nitrozellulosemembranen Nytran	Schleicher & Schuell
Petrischalen (Tissue Culture Dish)	FALCON, Becton Dickinson
Pipetten	Eppendorf
Pipettboy	Integra Biosciences
Pipettenspitzen	Eppendorf
Reaktionsgefäße (0,5ml, 1,5ml, 2ml)	Eppendorf
Serologische Pipetten (2,5ml, 10ml, 25ml, Stripette)	Costar

- **Geräte**

Material	Firma
Absaugpumpe (Zellkulturbank)	Neuberger Laboport
Arbeitsbank mit Abzug	Köttermann
BD FACS Calibur	BD, Becton Dickinson
DNA Sequencer (model 4000)	MWG Biotech
Elektrophoresekammer (Power PAC 200)	Bio-Rad Laboratories
Hyperscreen	Kodak
Inkubator (Zellkultur)	Heraeus
Inkubator (37°C für Bakterienkultur)	Heraeus
Kühlschrank (6°C, profi line)	Liebherr

Kühlschrank (-20°C, Premium NoFrost)	Liebherr
Mikroskop	Leica DMIL
Mikrowelle	Samsung
PCR-Bench (Hera Safe)	Heraeus
PCR-Cycler (Genius)	Techne
PCR-Cycler (Progene)	Techne
Phospho-Imager, Molecular Imager	Pharos FX Plus
Phosphorschirm	Kodak
Photometer	Pharmacia Biotech
Präzisionswaage (BP 2100S)	Sartorius
Schüttler (Bakterie 225rpm, 37°C)	GFL (Gesellschaft für Labortechnik GmbH)
Sequenzier-Cycler (Touch Down)	Hybaid
Thermomixer (5436)	Eppendorf
UV-Crosslinker	Hoefer (Hoefer Scientific Instruments)
UV Gerät inklusive Kamera (one step ahead)	Biostep
UV Spektrometer	Pharmacia LKB Biochrom, England
Vortexer (REAX 2000)	Heidolph
Wasserbad	GFL (Gesellschaft für Labortechnik GmbH)
Wasserbad (42°C, Thermomix ME)	B. Braun Melsungen
Zellkulturbank (Class II)	NuAire
Zellschaber	TPP
Zentrifuge zur DNA-Präparation nach Zell-	Beckman Coulter

Trypsinierung (Allegra X-15 R)	
Zentrifuge zur RNA-Präparation (Avanti J-25)	Beckman Coulter
Zentrifuge zur Isolation von Plasmiden (RT, Centrifuge 5415C)	Eppendorf
Zentrifuge zur DNA-Fällung mit Isopropanol (4°C, Centrifuge 5417R)	Eppendorf

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Die Zellkultur und -behandlung wurde freundlicherweise von Cornelia Gieseler (AG Tumorpathologie Schäfer/Sers, Institut für Pathologie, Charité Berlin) durchgeführt.

Die Zellen wurden in McCoy's 5A Medium unter Zusatz von 10% FCS kultiviert. HCT116 DNMT1^{-/-} und HCT116 DKO wurden zusätzlich mit Hygromycin (20µg auf 10ml Medium) versetzt. Die HCT116 DNMT1^{-/-}, DNMT3b^{-/-} und DKO Zellen wurden mit einer Dichte von 1x10⁶ auf Petrischalen (10cm) ausplattiert. Die Dichte der HCT116 Zellen betrug 5x10⁵/10cm. Alle Zellen wurden für 48 Stunden mit 20mM U0126 und der Lösungskontrolle DMSO behandelt. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂. Die Zellzahl wurde mikroskopisch in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

Zelllinie	Nomenklatur der Zellen unter Behandlung
parentale HCT116 (PT/WT)	K-Ras-mutiert (G13) + Beta-Catenin-Mutation => konstitutiv aktives Ras (gilt für alle Folgenden)
HCT116PT DMSO	Lösungskontrolle parentale Zelllinie
HCT116PT U0126	U0126 behandelte parentale Zelllinie
HCT116 DNMT1 ^{-/-}	DNMT1 Knockout
HCT116 DNMT1 ^{-/-} DMSO	Lösungskontrolle DNMT1 Knockout
HCT116 DNMT1 ^{-/-} U0126	U0126 DNMT1 Knockout
HCT116 DNMT3b ^{-/-}	DNMT3b Knockout
HCT116 DNMT3b ^{-/-} DMSO	Lösungskontrolle DNMT3b Knockout
HCT116 DNMT3b ^{-/-} U0126	U0126 DNMT3b Knockout
HCT116 DKO	Knockout für DNMT1 und -3b

Tabelle 2: Nomenklatur der HCT116 Zelllinien unter Behandlung mit U0126 und DMSO

2.2.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

Für alle molekularbiologischen und biochemischen Arbeiten wurde Nuklease- und Protease-freies Wasser verwendet. Für Arbeiten mit RNA wurde Wasser oder Puffer mit DEPC behandelt. Für Bakterienmedien, Agarosegel-Elektrophorese-Puffer, sowie Transfer-Puffer und Waschlösungen wurde destilliertes Wasser verwendet.

- **DNA-Präparation**

Zur DNA-Präparation mittels Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol wurden die Zellen zur Vorbereitung mit 2ml Trypsin für 5 Minuten bei 37°C abgelöst, anschließend in 8ml McCoy's Medium aufgenommen und für 5 Minuten bei 800rpm und Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal in 5ml PBS gewaschen und die Suspension je 5 Minuten bei 600rpm erneut pelletiert. Anschließend wurde das Pellet in 500µl TE-Puffer aufgenommen, mit 2,5µl Proteinase-K versetzt und über Nacht bei 50°C verdaut.

Am nächsten Tag wurden 500µl Phenol zum Ansatz gegeben und vermischt. Anschließend wurde 10 Minuten bei 15.000rpm zentrifugiert. Bei diesem Schritt fallen die Proteine aus und die Nukleinsäuren befinden sich, aufgrund ihrer besseren Löslichkeit, in der oberen, wässrigen Phase. Zur Trennung der 2 Phasen erfolgten Waschschrte. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfggefäß überführt. Dann wurde je 1 Volumen (300µl) Phenol und Chloroform (1:1) hinzugegeben, gemischt und anschließend bei 10 Minuten und 15.000rpm zentrifugiert (2x). Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfggefäß gegeben, mit 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gemischt und erneut 10 Minuten bei 15.000rpm zentrifugiert.

- **Präzipitation genomischer DNA mit Isopropanol**

Um die DNA zu fällen, wurde die obere Phase (500µl) in ein frisches Eppendorfggefäß gegeben, mit 55µl 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 1ml Isopropanol versetzt, gemischt und für mindestens 30 Minuten auf -80°C gestellt. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation über 30 Minuten bei 4°C und 15.000rpm. Der Überstand mit den darin gelösten Salzen wurde vorsichtig abgesaugt. Das entstandene Pellet wurde mit 70% Ethanol gewaschen, 30 Minuten auf -20°C gestellt und dann 5 Minuten bei 15.000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50µl destilliertem Wasser gelöst und bei -20°C gelagert.

- **Restriktionsverdau von genomischer DNA**

Für den Verdau wurden 500ng der aufgereinigten, in Wasser gelösten DNA verwendet, mit 2,1µl Restriktionspuffer versetzt, mit destilliertem Wasser aufgefüllt und über Nacht mit 1µl BamHI bei 50°C verdaut.

2.2.3 Bisulfitsequenzierung

- **Bisulfitbehandlung der genomischen DNA**

Die Bisulfitbehandlung genomischer DNA mit anschließender Sequenzierung oder Spaltung (51-53) ermöglicht die Unterscheidung zwischen methylierten und unmethylierten Cytosinen. Unter der Behandlung werden unmethylierte Cytosine durch Desaminierung in Uracil umgewandelt. Die Base Uracil wird in der nachfolgenden PCR durch Thymin ersetzt und als dieses amplifiziert. Methylierte Cytosine liegen nach Bisulfitbehandlung weiterhin unverändert vor und tauchen in der PCR als Cytosine auf.

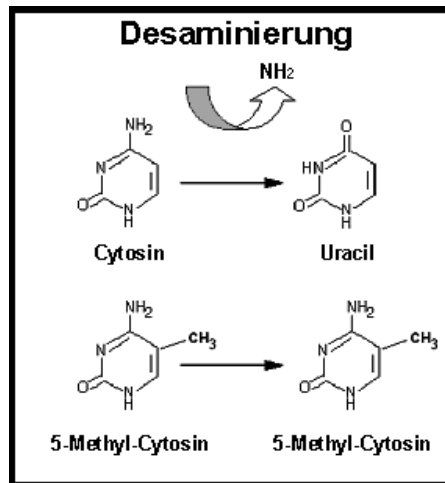


Abbildung 4: Cytosin nach Bisulfitbehandlung

oben: Unter der Natriumbisulfit-Behandlung werden unmethylierte Cytosine durch Desaminierung (-NH₂) in Uracil umgewandelt. unten: Methylierte Cytosine (5-Methyl-Cytosine) liegen nach Bisulfitbehandlung weiterhin unverändert vor und tauchen in der PCR als Cytosine auf.

Die technische Grundlage der hier angewandten Methode der Bisulfitbehandlung sind die durch das Pipettieren geformten Agarosekügelchen. Die Nutzung der Kügelchen minimiert den DNA-Verlust während der Behandlung, da sich die DNA im Inneren der Kügelchen befindet. Weiterhin liegt die DNA bei dieser Methode als Einzelstrang vor. Über die gesamte Dauer der Bisulfitbehandlung ist besonders auf die Lichtempfindlichkeit der benutzten Agenzien zu achten. Alle Protokollschritte wurden unter strengstem Lichtschutz durchgeführt. Sämtliche Gefäße wurden in Aluminiumfolie gewickelt. Zur Vorbereitung wurden 750µl einer 2,7M Bisulfit/Hydroquinon Lösung mit 750µl Mineralöl in einem 2ml Eppendorfgefäß überschichtet und für mindestens 30 Minuten auf Eis gestellt. Die DNA wurde 10 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Die gekühlten Proben wurden mit 4µl 2M NaOH versetzt und für 15 Minuten bei 50°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die zuvor auf 50°C erwärmte SeaPlaque LMP Agarose resuspendiert. In die kalte

Mineralölschicht wurden $6 \times 10 \mu\text{l}$ der DNA/Agarose-Mixtur, unter Formung je einer Agarosekugel pipettiert (Abbildung 5), (54).

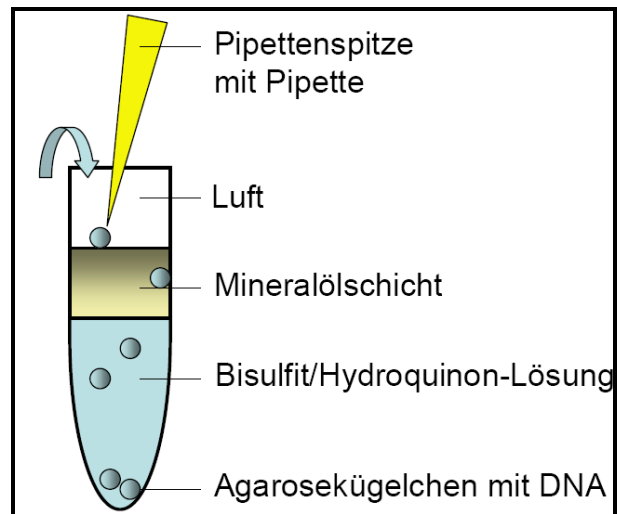


Abbildung 5: Schema I zur Bisulfitbehandlung

2ml Eppendorfgefäß mit Aluminiumfolie (zur Anschaulichkeit der Phasenschichtung nicht dargestellt) gefüllt mit Bisulfit/Hydroquinon-Lösung ($750 \mu\text{l}$) und Mineralöl ($750 \mu\text{l}$) unter Zugabe von 6 Agarosekügelchen à $10 \mu\text{l}$

Die Ansätze wurden für mindestens drei Stunden bei 50°C inkubiert. Dabei ist darauf zu achten, dass eine zu kurze Inkubationszeit zu einer unvollständigen Konvertierung führen kann.

- **Aufreinigung der Inkubationsansätze**

Nach der 3-4stündigen Inkubation wurden die Proben 3x für 15 Minuten mit je 1ml 1xTE-Puffer (pH 8.0) gewaschen (Abbildung 6). Nach jedem Inkubationsschritt wurde der gesamte Überstand vorsichtig aus dem Eppendorfgefäß entnommen. Übrig blieben die Agarosekügelchen, die für den folgenden Inkubationsschritt erneut mit TE-Puffer versetzt wurden etc.. Die Konversionsreaktion der DNA wurde im Anschluss durch zweimaliges Zugabe

von 0,2M NaOH, wiederholten 15 Minuten Inkubationszeit und durch die daraus resultierende Desulphonierung abgeschlossen. Nach weiteren 3 Waschschrinen mit 1xTE und 10 Minuten Inkubationszeit, wurden die Agarosekugeln in 20µl TE aufgenommen und bei 4°C gelagert.

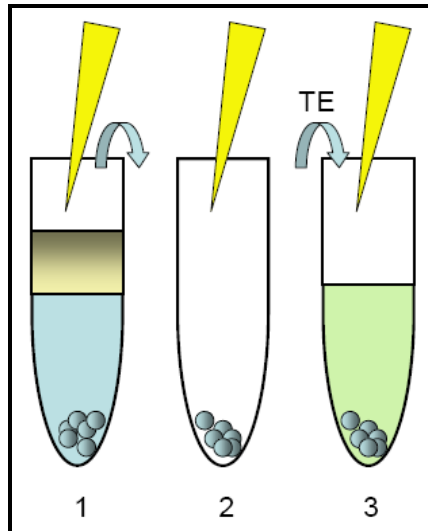


Abbildung 6: Schema II zur Bisulfitbehandlung

Die Agarosekugeln sammeln sich während der Inkubationszeit (3h) am Boden des Reaktionsgefäßes (1); Der gesamte Überstand wird abgenommen und die Agarosekugeln verbleiben im Reaktionsgefäß (2); Waschschrine mit TE-Puffer (3).

- **Primer für PCR**

Mit Hilfe der NCBI Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurden die Gensequenzen für die jeweilige GpC-Insel innerhalb des ULBP2-, ULBP3- und HLA-A1-Promotors identifiziert und anschließend für das Primerdesign mittels MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer>) verwendet. In der MethPrimer Datenbank konnten für ULBP2 und ULBP3 jeweils 3 Primerpaare und für HLA-A1 1 Primerpaar gefunden werden, die innerhalb der Promotoren lagen. Alle Primer wurden über MWG-Biotech bezogen und in 1xTE-Puffer

(100pmol/μl) gelöst. Für die anschließende PCR wurden die Primer in RNase-freiem Wasser 1:10 verdünnt.

Name	Sequenz (F: 5'-3, R:3'-5')	Prod. position bez. Exon1 (HLA-A/ULBP2/3)	Anzahl CpGs	Tm	Ta	Fragm. Größe bp	GC in %
HLA-A1F HLA-A1R	GGGTTTTAGAGAAGTTAATTAGTGT CCAAATCTAAATCAAACCAAAC	-93 bis 69	13	55,1 58,1	58	162	44,44 56,00
ULBP2 IF ULBP2 IR	TTTTGGGTTTTAATGGTAGTAGT TCACAACCCTCAAACCTTAATC	60 bis 213	10	55,5 58,1	58	153	58,33 63,64
ULBP2 IIF ULBP2 IIR	TTTTGTTTGTGTTTTGTAATAAA AAAATTCTCTAACCTCAACTCC	-794 bis -559	11	55,2 55,1	58	235	52,00 60,87
ULBP2 IIIF ULBP2 IIIR	TGTATTTAGTTTGGGTAATAAGAG AAAAACTTACAAAAAATATTCAAC	-514 bis -247	21	53,4 52,7	58	267	60,00 40,00
ULBP3 IF ULBP3 IR	TGGAGAGGTAAAGAAGTTTGTTT CCCCAATATAAACACTAATACACAAAAA	-584 bis -437	10	59,6 59,8	58	193	54,17 50,00
ULBP3 IIF ULBP3 IIR	TTTTTGTGTATTAGTGTTTATATTGGGG AAAAACCTATACCTACTATAACTCC	-419 bis -225	11	59,8 51,2	58	194	50,00 68,00
ULBP3 IIIF ULBP3 IIIR	TAGAGGAGGGAAGTTTTTTAGAAGG TCTACAACTTTTAACCCCTCCAC	+69 bis +258	12	59,7 59,8	58	189	56,00 58,33

Tabelle 3: Übersicht über HLA-A-, ULBP2-, ULBP3-Primersequenzen und -Eigenschaften.

- **PCR**

Die PCR wurde nach Bisulfitbehandlung der DNA folgendermaßen durchgeführt:

Chemikalie	Menge
HotStartTaq Master Mix	25µl
Primer forward	1,5µl
Primer reverse	1,5µl
Aqua dest.	19µl
DNA-Template (bisulfitmodifiziert)	3µl
Gesamt	50µl

Tabelle 4: Pipettierschema Bisulfit-PCR

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in Minuten	Zyklen
Denaturierung	95	15	1
Denaturierung	95	1	40
Annealing	58		
Elongation	72		
Elongation	72	10	1
Ende	4	∞	∞

Tabelle 5: Cycler-Einstellungen Bisulfit-PCR

- **Agarose-Gelelektrophorese**

Je 40µl der PCR-Produkte wurden unter Zugabe von 8µl Ladebuffer (6x) auf ein 1-2%iges Agarosegel aufgetragen und bei 50V eine Stunde lang getrennt. Die Größe der Banden wurde anhand des 1kb Smart-Ladders identifiziert.

- **DNA Isolation aus einem Agarosegel**

Die Banden wurden über UV-Licht ausgeschnitten und in Eppendorfgefäße überführt. Unter Verwendung des QIAquick Gel Extraction Kits wurde die DNA aus je mindestens 400mg Gel/DNA-Extrakt durch mehrmaliges Waschen und Aufreinigen mittels Säulen isoliert.

- **Ligation in einen Vektor**

Unter Verwendung des TA-Cloning Kits wurde das frische Isolationsprodukt in den Vektor pCR 2.1 Invitrogen ligiert.

- **Transformation in E. coli mittels Hitzeschock**

Um das Ligationsprodukt in E.coli zu transformieren wurden 50µl kompetente Bakterienlösung und 2µl der Ligation in einen Ansatz gegeben und 30 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden die Transformationsansätze für 30 Sekunden bei 42°C im Wasserbad erwärmt und anschließend sofort gekühlt.

Nach Zugabe von 250µl S.O.C. Mediums, wurden die Transformationsansätze zur Inkubation für ca. 60 Minuten bei 37°C und 225rpm geschüttelt. Abschließend wurden je 100 µl der fertigen Lösung unter sterilen Bedingungen auf LB-Agarplatten verteilt und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

- **Minipräparation von Plasmid-DNA**

Animpfen der Minipräparationen

Zur Vorbereitung der Minipräparationen wurden je 2ml LB-Medium mit 20µl Kanamycin unter einer Zellkulturbank in sterile Schraubdeckel-Röhrchen

gegeben. Anschließend wurden die mit einer sterilen Pipettenspitze gepickten Bakterienklone hinzugegeben (pro Reagenzglas ein Klon). Die Reaktionsansätze wurden über Nacht bei 37°C und 225rpm im Schüttler inkubiert.

Isolation von Plasmiden

Für die Isolation von Plasmiden zur Analyse mittels Restriktionsverdau wurde das QIAprep Spin MiniPrep Kit 250 von Qiagen benutzt. Hierzu wurden die Reaktionsansätze in 2ml Eppendorfgefäße überführt und für 10 Minuten bei ca. 20-25°C und 3.000rpm pelletiert. Das Pellet wurde in 250µl Puffer P1 (50mM Tris/HCl pH 8.0, 10mM EDTA, 100µg/ml RNase A) resuspendiert und der Ansatz in ein 1,5ml Eppendorfgefäß übertragen. Die Isolation der Plasmide erfolgte anschließend nach Angaben des Herstellers unter Verwendung der mitgelieferten Puffer über die Bindung an Säulen. Die so gewonnenen Plasmide wurden anschließend in H₂O aufgenommen und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

- **Sequenzierung**

Sequenzierautomat im eigenen Labor

Die Sequenzierung nach Sanger (55) erfolgte mit Hilfe des DNA Sequencing Kits von Epicentre Biotechnologies und wurde mit einem Hybaid-PCR-Cycler durchgeführt. Dabei wird die Polymerisationsreaktion der jeweiligen Nukleotide durch Didesoxyanaloga (ddNTPs) kontrolliert unterbrochen. Pro Reaktion wurden ca. 100ng Plasmid-DNA eingesetzt. Zur Herstellung eines Template-Premixes wurden 7µl Puffer, mit 1µl Polymerase, 2µl Primer und die DNA zusammengegeben und mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 17µl aufgefüllt. Anschließend wurde jedes Well einer Mikrotiterplatte mit 3,5µl des Template-Premixes und 2µl des A,C,G,T-Gemisches gefüllt und mit je 15µl Lipid Wax überschichtet. Die Sequenzierungsreaktion erfolgte nach folgendem Protokoll:

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in Minuten	Zyklen
Aktivierung	95	5	1
Denaturierung	95	0,3	30
Annealing	53		
Elongation	72		
Ende	4	∞	∞

Tabelle 6: Cycler-Einstellungen Sequenzierungsreaktion

Sequenzierung durch Medigenomix

Um die Menge der Sequenzierungen von insgesamt ca. 400 Bakterienklonen zu realisieren, wurde ein Teil der Klone von Medigenomix (München) analysiert. Die Sequenzen wurden uns anschließend zur Auswertung zur Verfügung gestellt. Dazu wurde eine 96-Well-Platte mit 250µl STAB-Agar unter Zusatz der genannten Aminosäuren und Antibiotika pro Well gefüllt und mit je einem Bakterienklon angeimpft. Dabei wurden pro PCR-Fragment ca. 15-20 Klone gepickt. Die Platte wurde bei 37°C über Nacht inkubiert und am darauffolgenden Tag verschickt.

- **Sequenzanalyse**

Die im Fasta-Format vorliegenden Sequenzen wurden mittels ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>) und NCBI-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/bl2seq/wblast2.cgi>) mit den Originalsequenzen verglichen. Anhand der Sequenzvergleiche konnte auf den Methylierungsgrad der verwendeten genomischen DNA ermittelt werden. Die Darstellung erfolgte graphisch.

2.2.4 Northern-Blot Analyse

Für das Northern-Blot-Verfahren wird isolierte RNA zunächst mittels Elektrophorese in einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Anschließend werden die Moleküle aus der Gelmatrix auf eine geeignete Trägerschicht (z.B. positiv geladene Nylonmembran) übertragen und fixiert. Durch Hybridisierung mit markierten Sonden können spezifische RNA-Moleküle qualitativ nachgewiesen werden (56).

- **RNA-Präparation**

Zur Probenvorbereitung wurden 1×10^6 Zellen mit 2ml Trizol versetzt, mittels eines Zellschabers vom Kulturgefäß gelöst und in Röhrchen überführt. Anschließend erfolgte unter Zugabe von 0,2ml Chloroform pro ml Suspension die RNA-Extraktion. Die wässrige, RNA-haltige Phase, wurde mit 0,5ml Isopropanol pro ml Trizol für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 10.000rpm und 4°C zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und die Chloroformbehandlung wiederholt, um restliches Phenol aus der RNA-Suspension zu entfernen. Danach wurde die präzipitierte RNA mit 0,5ml pro 1 ml Trizol versetzt und erneut bei 4°C, 10.000rpm für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt. Das RNA-Pellet wurde mit 75% Ethanol gewaschen, luftgetrocknet, anschließend in 100µl Wasser (Baker, für HPLC) aufgenommen und in einem frischem Eppendorfgefäß bei -80°C gelagert.

- **RNA-Gelelektrophorese**

Die RNA- und DNA-Konzentration wurde am UV-Spektrometer gemessen. Die RNA wurde unter Zugabe von DEPC Wasser auf $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ verdünnt. Je $10\mu\text{g}$ der RNA wurden anschließend im Verhältnis 1:3 mit Ladepuffer versetzt und 2 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Probenauftrennung erfolgte bei 50V für 3-4 h in einem 1,2%-igen Formaldehyd-MOPS-Agarosegel.

- **RNA-Fixierung auf Nylonmembran durch Blotting**

Vor dem Transfer der RNA vom Gel auf eine Nylonmembran wurde das Gel im UV-Licht fotografiert, für 5 Minuten in 5xSSC geschwenkt und anschließend in 2xSSC inkubiert. Der Transfer erfolgte über Nacht entlang des Diffusionsgradienten in Transferpuffer (20xSSC). Nach dem Transfer wurde die Membran zur Entfernung von Gelresten kurz in 2xSSC gewaschen. Die Effizienz und Qualität des Transfers wurde durch Kontrolle, sowohl des Gels, als auch der Membran, unter UV-Licht überprüft. Durch zweimalige Bestrahlung mit einem UV-Crosslinker wurde die RNA auf der Membran fixiert.

- **Gewinnung und Isolierung der Sonde**

Als Sonde diente ein Fragment der kodierenden Region von ULBP2. Die Sonde wurde unter Verwendung des Access RT-PCR System Kits durch eine RT-PCR aus RNA gewonnen und zur Kontrolle sequenziert. Für die RT-PCR wurden 100ng der aus HCT116 DKO Zellen isolierten RNA eingesetzt. Folgendes Protokoll wurde verwendet.

Schritt	Temperatur in °C	Zeit in Minuten	Zyklenanzahl
RNA in cDNA	45	45	1
Aktivierung	94	2	1
Denaturierung	94	0,3	30
Annealing	62		
Elongation	68	1	
Elongation	68	7	1
Ende	4	∞	∞

Tabelle 7: Cyclor-Einstellungen RT-PCR

Anschließend wurde das PCR-Produkt in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und über Säulen aufgereinigt (QIAquick Gel Extraction Kits).

- **Markierung von DNA-Sonden mit ^{32}P -Desoxycytidin-Triphosphat**

Die Sonde wurde mit Hilfe des Random Primed DNA Labeling Kits markiert (Abbildung 7). Die von Feinberg und Vogelstein (57) entwickelte Methode basiert auf der Hybridisierung eines Gemisches aus synthetisch hergestellten Hexanucleotiden mit dem zu markierenden DNA-Fragment. Die Oligomere und die denaturierte DNA-Sonde, die als Matrize dient, werden gemischt und anschließend die 4 Desoxyribonucleotide (dNTPs) und eine Untereinheit der E. coli-DNA-Polymerase-I, das sogenannte Klenow-Fragment, hinzugefügt. Unter den 4 dNTPs befindet sich auch radioaktiv markiertes Cytidin mit dem Isotop ^{32}P in der α -ständigen Phosphatgruppe. Sobald ein Hexanucleotid des Reaktionsgemisches als Primer an den DNA-Strang gebunden hat, wird der komplementäre Strang durch das Klenow-Fragment synthetisiert. Das Klenow-Fragment enthält sowohl die DNA-Polymerase- als auch die 3'-Exonuclease-Aktivität, während die 5'-Exonuclease-Aktivität der E.coli-DNA-Polymerase fehlt. Das verhindert den Abbau neusynthetisierter DNA. Beginnend an den 3'-

Hydroxy-Gruppen der angelagerten Zufallsprimer synthetisiert das Klenow-Fragment entlang dem Strang der Sonde neue DNA (58). Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 37°C werden die nicht inkorporierten Nukleotide durch Zentrifugation des Reaktionsansatzes mit Quick Spin Säulen abgetrennt.

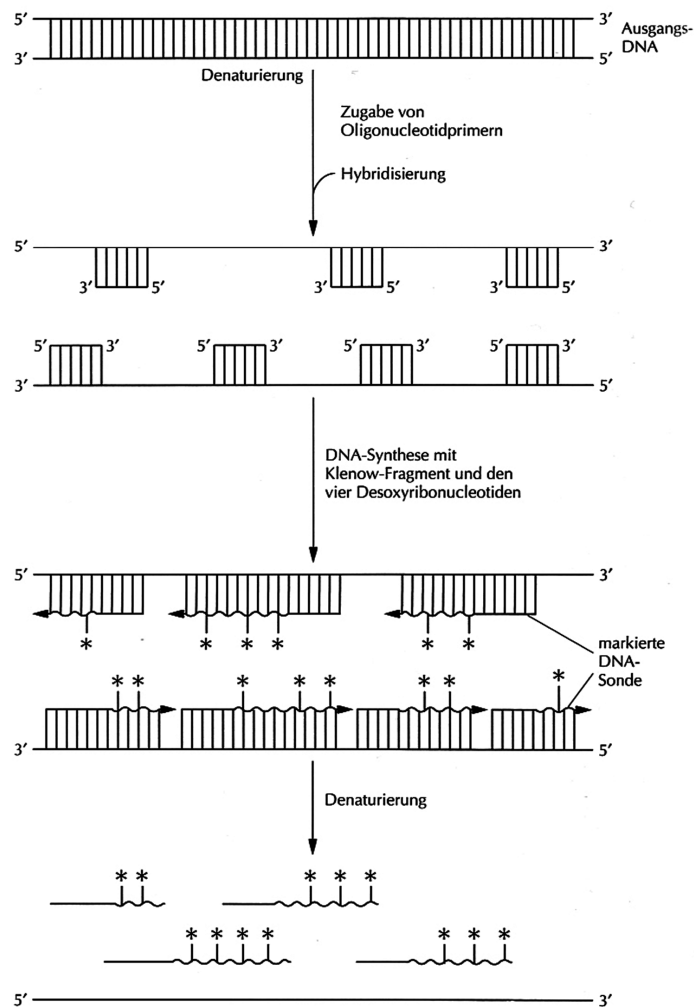


Abbildung 7: Markierung einer DNA-Sonde durch random priming.

Nachdem Zufallsprimer an die DNA-Matrize gebunden haben, synthetisiert das Klenow-Fragment, beginnend an den 3'-Hydroxy-Gruppen der angelagerten Zufallsprimer entlang dem Strang der Sonde neue DNA (58).

- **Vor- und Haupthybridisierung**

Die Vorhybridisierung minimiert das Auftreten unspezifischer Bindungen der Sonde auf der Membran und demzufolge spätere Störungen im Bildhintergrund. Die Membran wurde zunächst 3 Minuten in 2xSSC gewaschen. Die t-RNA wurde für 2 Minuten bei 95°C denaturiert. Die Membran wurde mit 100µl t-RNA (10 mg/ml) und 10 ml ExpressHyb (Clontech) Hybridisierungsmix bei 65°C für ca. 2 Stunden vorhybridisiert. Im Anschluss erfolgte die Haupthybridisierung über 24 Stunden bei 65°C mit der denaturierten Sonde in der Hybridisierungslösung.

- **Detektion, Quantifizierung und Beladungskontrolle**

Nach der Haupthybridisierung wurden die Membranen mit zwei verschiedenen Waschpuffern gereinigt. Zunächst wurde 2x für 20 Minuten mit Puffer N1 (0,1% SDS ad 2xSSC) bei 42°C und anschließend 2x mit Puffer N2 (0,1% SDS ad 0,1xSSC) bei 66°C gewaschen.

Nach dem Waschen erfolgte die Auswertung mit Hilfe eines Phospho-Imagers. Hierbei wird die Membran für 3-4 Tage mit einem Phosphorschirm bei Raumtemperatur in eine Kassette eingelegt. Diese aus Phosphor-Kristallen bestehenden Schirme ermöglichen eine erste Auswertung der markierten Membranen. Die densitometrische Auswertung wurde mit Hilfe des Programms Quantitiy One (Bio-Rad) durchgeführt. Die Membranen wurden im Anschluss an die Detektion mit 0,1% SDS in 0,1xSSC aufgekocht, um die gebundenen Sondenmoleküle zu entfernen. Anschließend folgte eine zweite Hybridisierung mit einer GAPDH-Gensonde. Die RNA dieses Haushaltsproteins diente als Beladungskontrolle.

2.2.5 Oberflächenexpressionsanalyse mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie

Mittels Durchflusszytometrie können einzelne Zellen basierend auf der Expression bestimmter Moleküle charakterisiert werden. Dafür werden Zellsuspensionen zunächst mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt, welche spezifische Moleküle auf der Oberfläche einzelner Zellen binden. Nachdem Reste ungebundenen Antikörpers gewaschen wurden, wird die Zellsuspension für die Messung zu einem Einzel-Zell-Strahl fokussiert und durch einen Laserstrahl geleitet. Dabei kommt es zur Anregung der Fluorophore und einer spezifischen Emission, welche mittels unterschiedlicher Detektoren gemessen wird. Neben der Detektion verschiedener Fluoreszenzen erhält man über die Streuung des Laserstrahls ebenfalls Informationen über die physikalische Beschaffenheit der Zelle. Dabei kann über das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) die relative Größe der Zellen ermittelt werden, wohingegen das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) Auskunft über die Granularität der Zellen gibt. Mittels dieser Parameter kann schon eine Vorauswahl der zu messenden Zellen nur anhand ihrer physikalischen Beschaffenheit getroffen werden. Im Falle heterogener Zellsuspensionen wird so meist die weitere Charakterisierung mittels Antikörperfärbung nur auf spezifische Zellpopulationen beschränkt.

Die Auswertung des Signals erfolgt als Messung der einzelnen Fluoreszenzintensitäten und kann entweder im Dot Plot oder auch als Histogramm dargestellt werden.

Die Oberflächenexpression von HLA-A1/2 und ULBP1, 2, 3 wurde unter Verwendung spezifischer biotinylierter Antikörper quantifiziert (siehe Tabelle Antikörper). Die Messung erfolgte nach Färbung mit den entsprechenden

Streptavidin-Fluorophor-Konjugaten (PE: Streptavidin-Phycoerythrin). Die Gesamtexpression von MHC-Klasse-I wurde mittels des monoklonalen W6/32 Antikörpers bestimmt (spezifisch für HLA-A/B/C).

- **Zellkultur und Fluoreszenzmarkierung der Zellen**

Die Zellkultur, Behandlung und der FACS-Beladungsassay wurden von Stephanie Seibt (AG Tumorpathologie Schäfer/Sers am Institut für Pathologie, Charité Berlin) in Zusammenarbeit mit der AG von Christine Falk (National Center for Tumor Diseases, Institut für Immunologie, Heidelberg) durchgeführt. Es wurden drei Ansätze mit parental HCT116 Zellen für 72h auf Petrischalen kultiviert* (Tag 0). Nach der Aussaat wuchsen die Zellen über Nacht. Am Tag 1 wurde zu einem der Ansätze U0126 gegeben, ein weiterer diente als Lösungskontrolle und wurde nur mit DMSO versetzt. Die U0126 und DMSO-Behandlung erfolgte zweimalig (Tag 1 und Tag 3). Bei allen Ansätzen erfolgte nach 48h ein Mediumwechsel mit den entsprechenden Reagenzien. Am 4. Tag, nach Ablauf der 72-stündigen Inkubationszeit, wurden die Zellen trypsinisiert und die Zellzahl bestimmt ($3,1 \times 10^6$). Die benötigte Menge an Zellsuspension wurde in ein steriles Falcon-Röhrchen überführt und 8 Minuten bei 1.500rpm pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in FACS-Puffer resuspendiert. In eine 96-Well Platte mit Rundböden wurde pro Well der erste biotinylierte Antikörper vorgelegt (40µl aus Hybridomüberstand bei einer Antikörper-Konzentration von 5µg/ml). Anschließend wurden in jedes Well 50µl (entspricht 200.000 Zellen) der in FACS-Puffer resuspendierten Zellen gegeben. Nach 30minütiger Inkubation bei 4°C im Dunkeln erfolgte ein Waschschriff mit erneuter Zentrifugation bei 1.500rpm und 8 Minuten, um nicht gebundenen Antikörper zu entfernen. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurde

* Dichte der Aussaat für die Referenz der parental Zelllinie: 40%; Dichte für spätere U0126/DMSO-Behandlung: 80%

das Zentrifugat mit dem Streptavidin-PE-Konjugat inkubiert. Die Zellen wurden für ca. 30 Minuten bei 4°C gefärbt und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen. Zur nachfolgenden Analyse wurden die Zellen in 200µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Messung und Auswertung erfolgte am BD FACSCalibur mit der *CellQuestPro* Software. Für die Auswertung der Daten in *Microsoft Excel* wurde der MFI (mean fluorescence index) verwendet.

2.3 Hypothesen und statistische Auswertung

2.3.1 Hypothesen

HLA-A und ULBP3

Für die Promotoren von HLA-A und ULBP3 ergab sich nach Bisulfitsequenzierung keine Methylierung in parental HCT116. Folglich wurde auf eine Hypothesenformulierung zur statistischen Auswertung verzichtet.

ULBP2

Hypothese A

Zur Präzisierung der Fragestellung, ob die unterschiedlichen DNA-Methyltransferasen einen voneinander abweichenden Effekt auf die Promotormethylierung von ULBP2 haben, wurden folgende Hypothesen formuliert.

- **H_{A0}**: Die Methylierung von ULBP2 unterscheidet sich nicht hinsichtlich des Knockouts der unterschiedlichen DNA-Methyltransferasen.
- **H_{A1}**: Die Methylierung von ULBP2 unterscheidet sich hinsichtlich des Knockouts der unterschiedlichen Methyltransferasen.

Hypothese B

Zur Präzisierung der Fragestellung, ob Mek/Erk einen Einfluss auf die Methylierung des ULBP2 Promotors hat, wurden folgende Hypothesen formuliert.

- **H_{B0}**: Mek/Erk hat keinen Einfluss auf die Methylierung von ULBP2
- **H_{B1}**: Mek/Erk hat einen Einfluss auf die Methylierung von ULBP2

Hypothese C

Zur Präzisierung der Fragestellung, ob das Lösungsmittel DMSO einen Einfluss auf die Methylierung des ULBP2 Promotors hat, wurden folgende Hypothesen formuliert.

- **H₀**: DMSO hat keinen Einfluss auf die Methylierung von ULBP2
- **H₁**: DMSO hat einen Einfluss auf die Methylierung von ULBP2

2.3.2 Statistische Auswertung

Die Daten liegen auf Ordinaldatenniveau vor. Zur Prüfung der Hypothesen im Sinne eines Vergleiches der zentralen Tendenz zwischen den verschiedenen Stichproben wird folglich auf nonparametrische Verfahren zurückgegriffen (59).

Die statistischen Hypothesen sind ungerichtet, d.h. konservativ formuliert (zweiseitige Testung mit Reduktion des α -Niveaus auf $p=0,025$).

Zur Prüfung der Hypothese A wird als erstes ein Kruskal-Wallis-Test gerechnet. Sollten sich in diesem grundlegende Unterschiede in der zentralen Tendenz, d.h. inhaltlich ein Einfluss des Knockouts der unterschiedlichen DNA-Methyltransferasen finden lassen, werden in einem nächsten Schritt Einzelkontraste mittels Mann-Whitney U-Tests gerechnet. Hieraus resultieren dann 6 Einzelvergleiche. Zur Vermeidung einer α -Fehlerakkumulierung wird eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt, was in einem korrigierten α -Fehlerniveau von $0,025/6=0,004$ resultiert.

Die Hypothesen B und C werden ebenfalls zweiseitig mittels Mann-Whitney U-Test geprüft (kritisches α bei 0,025).

3 Ergebnisse

3.1 Bisulfitsequenzierung von HLA-A, ULBP2 und ULBP3

In der vorliegenden Arbeit werden die Ergebnisse zur Analyse des Methylierungsmusters der Promotoren für die Gene HLA-A und ULBP2/-3 auf Chromosom 6 innerhalb der Zelllinien HCT116PT, DNMT1^{-/-}, DNMT3b^{-/-} und DKO vorgestellt. Alle Zelllinien wurden zusätzlich mit dem Mek/Erk-Inhibitor U0126 (für 48h, bzw. 96h) behandelt und mit den unbehandelten Zelllinien verglichen. Da U0126 in DMSO gelöst wird und DMSO Einfluss auf das Methylierungsmuster haben kann, wurde für jede Zelllinie eine DMSO-Lösungskontrolle mitgeführt.

Aus den HCT116 Zelllinien wurde genomische DNA gewonnen und mit Natriumbisulfit behandelt. Die behandelte DNA wurde mittels ULBP bzw. HLA-A spezifischer PCR vervielfältigt und aus dem Gel isoliert. Danach wurde das Produkt in einen Vektor kloniert, in kompetente E.coli transformiert und anschließend sequenziert.

3.1.1 Methylierungsanalyse der Gene HLA-A, HCG4 und ULBP2, 3 ohne Mek/Erk-Inhibition durch U0126

- **HLA-A und HCG4**

Die Bisulfitsequenzierung ergab keine Methylierung für den HLA-A1/2-Promotor in der parentalen Zelllinie (Abbildung 8, 9).

HLA-A1 und -A2 werden während der Sequenzierung in einer Sequenz gelesen. Die beiden Allele unterscheiden sich innerhalb der CpC-Insel lediglich in einem CG an Position 5 (Abbildung 8). Beide Allele waren in ihrem Methylierungsgrad identisch. Die detaillierte graphische Auswertung erfolgte nur für HLA-A1.

Die HLA-A Amplifizierung und Sequenzierung wurde durch HCG4 erschwert, ein mit HLA-V verwandtes Pseudogen, welches sich in der Nachbarschaft des HLA-A-Locus auf Chromosom 6q21.3 befindet (Abbildung 8).

Die von uns für die Bisulfit-PCR verwendeten HLA-A-spezifischen Primer erkannten neben HLA-A auch HCG4 . Das Exon1 des HCG4 war in parentalen HCT116 deutlich methyliert (Abbildung 10). Anfänglich gingen wir deshalb davon aus, dass es sich bei der gefundenen Methylierung um den HLA-A-Promotor handelte. Ein späterer Abgleich mit der IMGT-Datenbank brachte Aufschluss über die Herkunft des Gens.

In den DKO-Zellen ging die Methylierung von HCG4 komplett verloren (Abbildung 10). Das Methylierungsmuster wurde durch die Mek/Erk-Inhibition nicht signifikant beeinflusst.

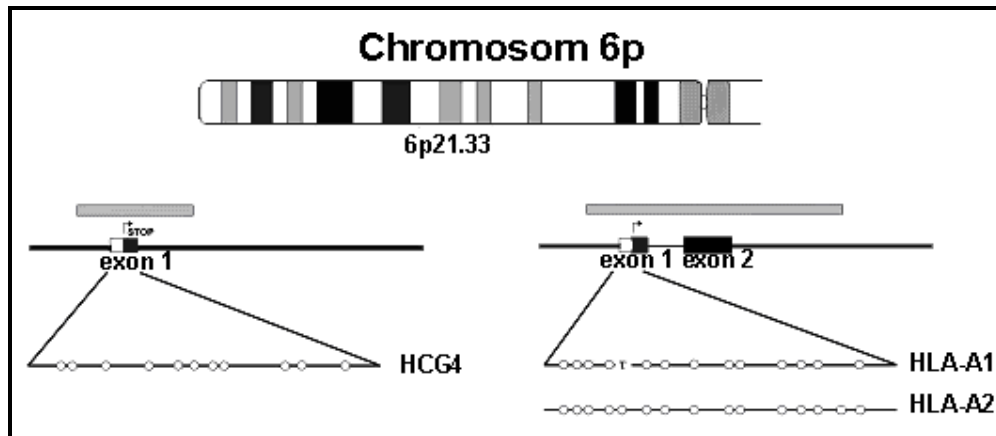


Abbildung 8: Schematische Lage der Gene HCG4 und HLA-A1/2 auf Chromosom 6p21.33.

Die CpG-Inseln sind durch die grauen Balken markiert. Die Pfeile markieren den Translationsstart in Exon 1. Vergrößert dargestellt sind die amplifizierten und sequenzierten Regionen für HCG4 und HLA-A1/2 nach Bisulfitbehandlung (Graphik modifiziert nach (60)).

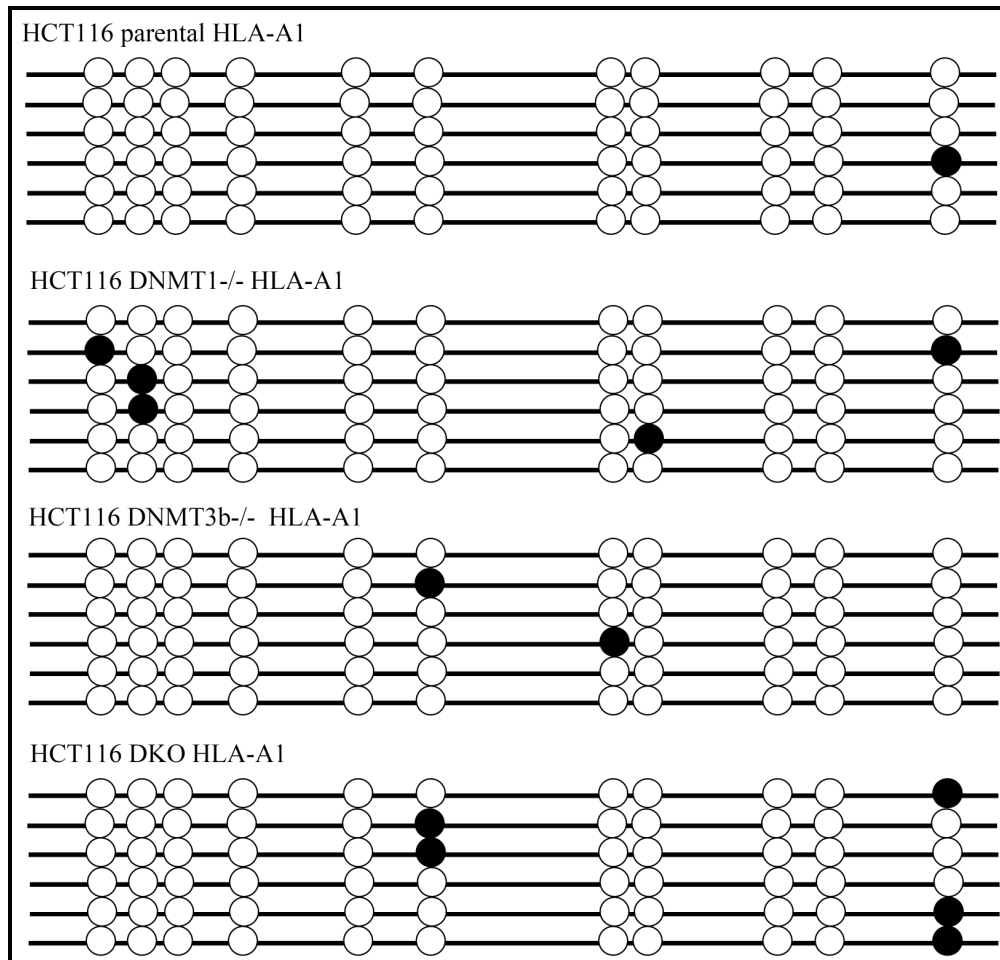


Abbildung 9: HLA-A1 Promotor-Methylierung

parentale HCT116, DNMT1-/-, DNMT3b-/-, DKO; Die CpGs sind durch Kreise markiert: (●) methyliertes CpG, (o) nicht methyliertes CpG; Der HLA-A1-Promotor zeigt in keiner der untersuchten Zelllinien eine Methylierung.

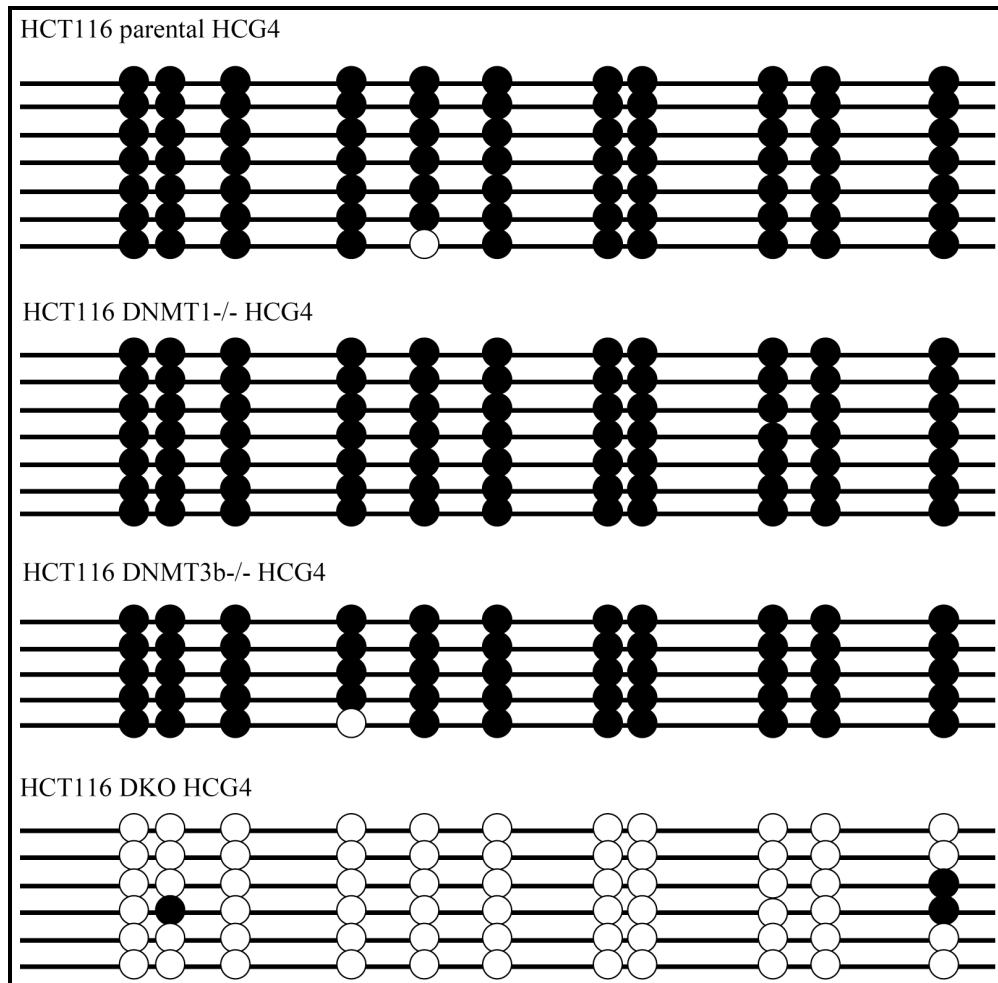


Abbildung 10: HCG4 Promotor-Methylierung

parentale HCT116, DNMT1^{-/-}, DNMT3b^{-/-}, DKO; Die CpGs sind durch Kreise markiert: (●) methyliertes CpG, (○) nicht methyliertes CpG;. Der HCG4-Promotor zeigt sowohl in parentalen HCT116, als auch im Knockout nur einer DNA-Methyltransferase (1^{-/-} oder 3b^{-/-}) eine Methylierung. Im Doppelknockout ist der Promotor fast vollständig demethyliert.

- **ULBP2**

Insgesamt wurden innerhalb des ULBP2-Promotors drei (I-III) Regionen untersucht (Abbildung 11). Die Region ULBP2 I zeigte keinerlei Methylierung und wurde daher vernachlässigt.

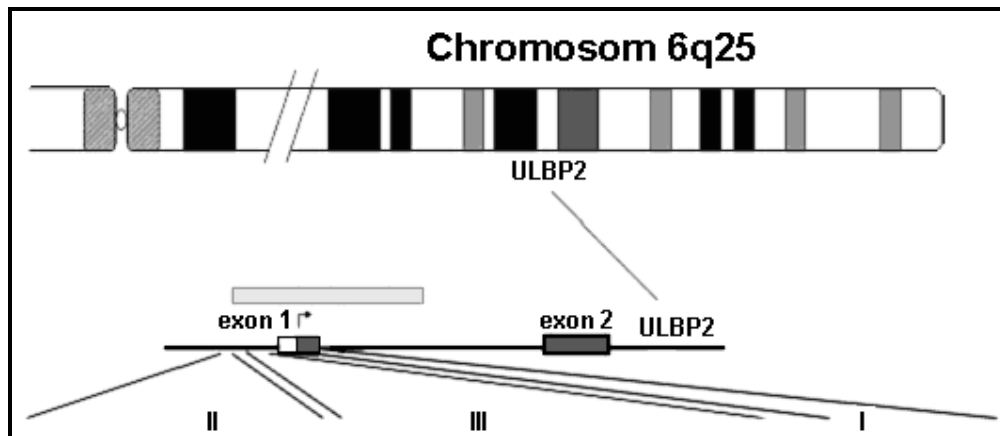


Abbildung 11: Schematische Lage des ULBP2-Gens auf Chromosom 6q25.1.

Die GpC-Insel ist durch den grauen Balken markiert. Der Pfeil markiert den Translationsstart in Exon1 (Graphik modifiziert nach (61)).

Die Regionen ULBP2 II und ULBP2 III wiesen in der unbehandelten parentalen Zelllinie eine sehr starke Methylierung auf (Abbildungen 12 und 13). In HCT116 DNMT1^{-/-} ging die Methylierung beider Regionen zurück. In HCT116 DNMT3b^{-/-} waren ULBP2 II und ULBP2 III im Vergleich zur parentalen Zelllinie ebenfalls weniger methyliert. Dennoch ist die Demethylierung in den Einzelknockout-Zelllinien nicht deutlich, wohingegen im Doppelknockout für beide Abschnitte eine fast komplette Demethylierung erfolgte. Auffällig ist, dass die Demethylierung innerhalb eines Abschnittes nicht homogen erfolgt. Sowohl für den Abschnitt ULBP2 II, als auch für den Abschnitt ULBP2 III lassen sich die hinteren CpGs in HCT116 DNMT1^{-/-} und DKO scheinbar leichter demethylieren als die übrigen CpGs (Abbildungen 12 und 13).

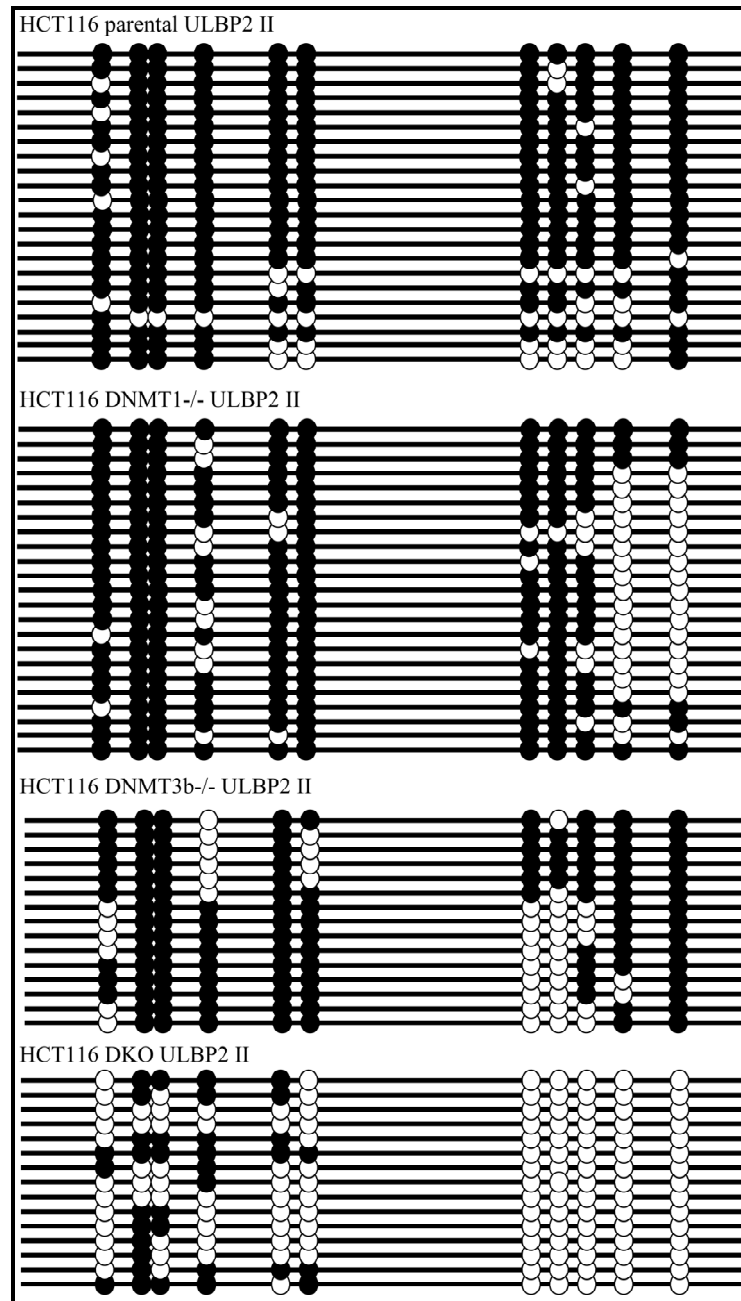


Abbildung 12: ULBP2 Promotor-Methylierung, Abschnitt II

parentale HCT116, DNMT1^{-/-}, DNMT3b^{-/-}, DKO. Die CpGs sind durch Kreise markiert: (●) methyliertes CpG; (○) nicht methyliertes CpG; Der ULBP2-Promotor Abschnitt II zeigt in der parentalen Zelllinie, sowie in DNMT1^{-/-} und 3b^{-/-} eine starke Methylierung; Im Doppelknockout ist die Region nicht methyliert.

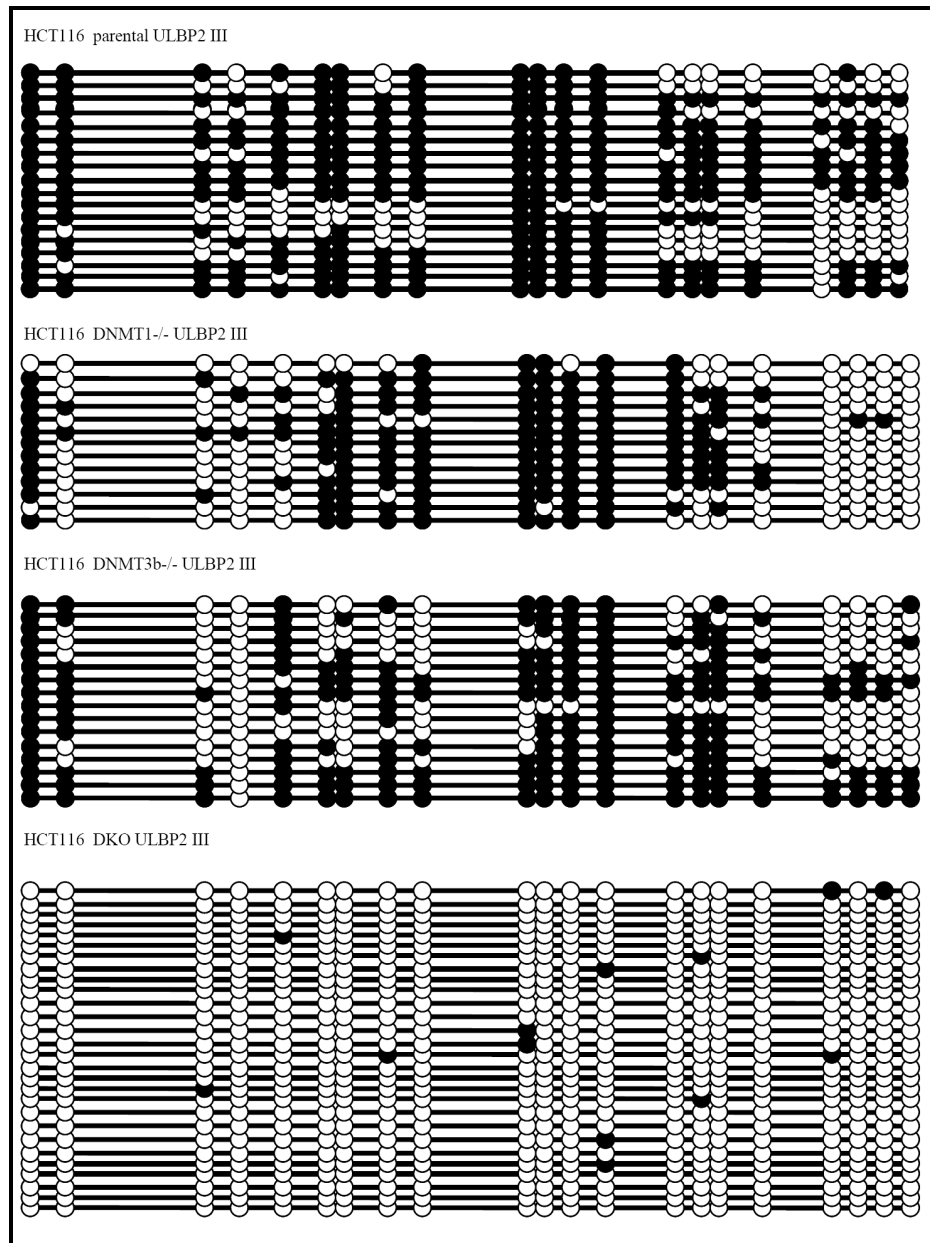


Abbildung 13: ULBP2 Promotor-Methylierung, Abschnitt III

parentale HCT116, DNMT1^{-/-}, DNMT3b^{-/-}, DKO. Die CpGs sind durch Kreise markiert: (●) methyliertes CpG; (○) nicht methyliertes CpG; Der ULBP2-Promotor Abschnitt III zeigt in der parental Zelle, sowie in DNMT1^{-/-} und 3b^{-/-} eine starke Methylierung; Im Doppelknockout zeigt sich erwartungsgemäß keine Methylierung.

- ULBP3

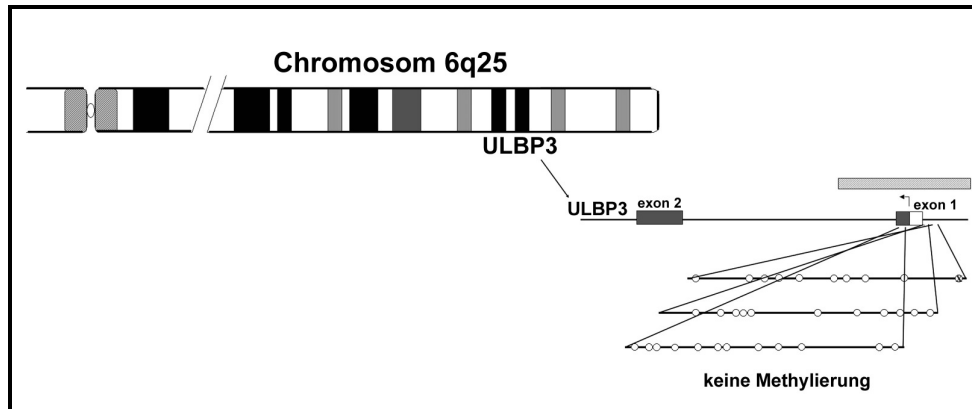


Abbildung 14: Schematische Lage des ULBP3-Gens auf Chromosom 6q25.

Die GpC-Insel ist durch den grauen Balken markiert. Der Pfeil markiert den Translationsstart in Exon 1. Vergrößert dargestellt sind ULBP3 I, II und III. Keiner der 3 Abschnitte war methyliert (Graphik modifiziert nach (62)).

Innerhalb des ULBP3-Promotors wurden drei Regionen untersucht (Abbildung 14).

Der ULBP3 Promotor ist für parentale HCT116 in keinem der drei analysierten Abschnitte (I-III) methyliert (Abbildung 14 und 15). Auf eine Methylierungsanalyse in den anderen Zelllinien (HCT116 DNMT1^{-/-}, -3b^{-/-}, -DKO) wurde verzichtet. Ebenso auf eine Untersuchung der Mek/Erk-Abhängigkeit.

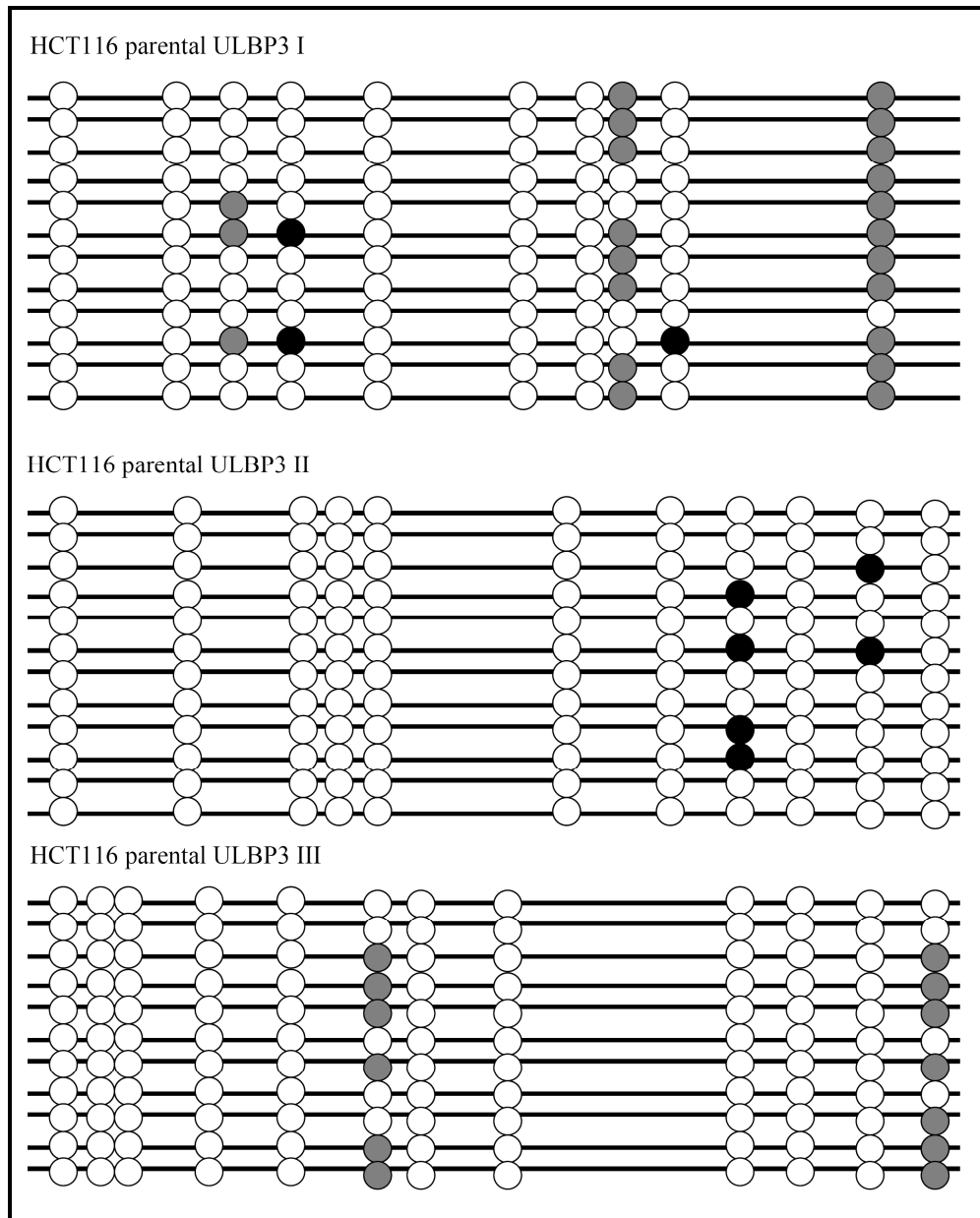


Abbildung 15: ULBP3 Promotor-Methylierung, Abschnitte I-III

parentale HCT116. Die CpGs sind durch Kreise markiert: (●) methyliertes CpG; (o) nicht methyliertes CpG; (grau) CpG nicht auswertbar (Sequenz nicht lesbar); Die 3 ULBP3-Promotor- Abschnitte (I-III) zeigen in der parentalen Zelllinie keine Methylierung.

3.1.2 Methylierungsanalyse der Gene HLA-A, HCG4 und ULBP2 nach Mek/Erk-Inhibition durch U0126

- **HCG4 und HLA-A1**

Die DNA-Methylierung von HCG4 ließ sich in den parentalen HCT116- und in DNMT1-/- Zellen unter U0126-Behandlung um 2,4% (parental) bzw. 9% (DNMT1-/-) reduzieren (Abbildung 16). Als Konsequenz der verlängerten U0126-Inkubationszeit, zeigen die DNMT1-/- Zellen nach 96stündiger Behandlung eine noch etwas stärkere Demethylierung. Die U0126-Behandlung in DNMT3b-/- zeigte keinen Effekt (0%). Da HLA-A1 in parentalen HCT116 keine Methylierung zeigte, war erwartungsgemäß unter U0126-Behandlung auch keine weitere Demethylierung zu erreichen (Abbildung 17).

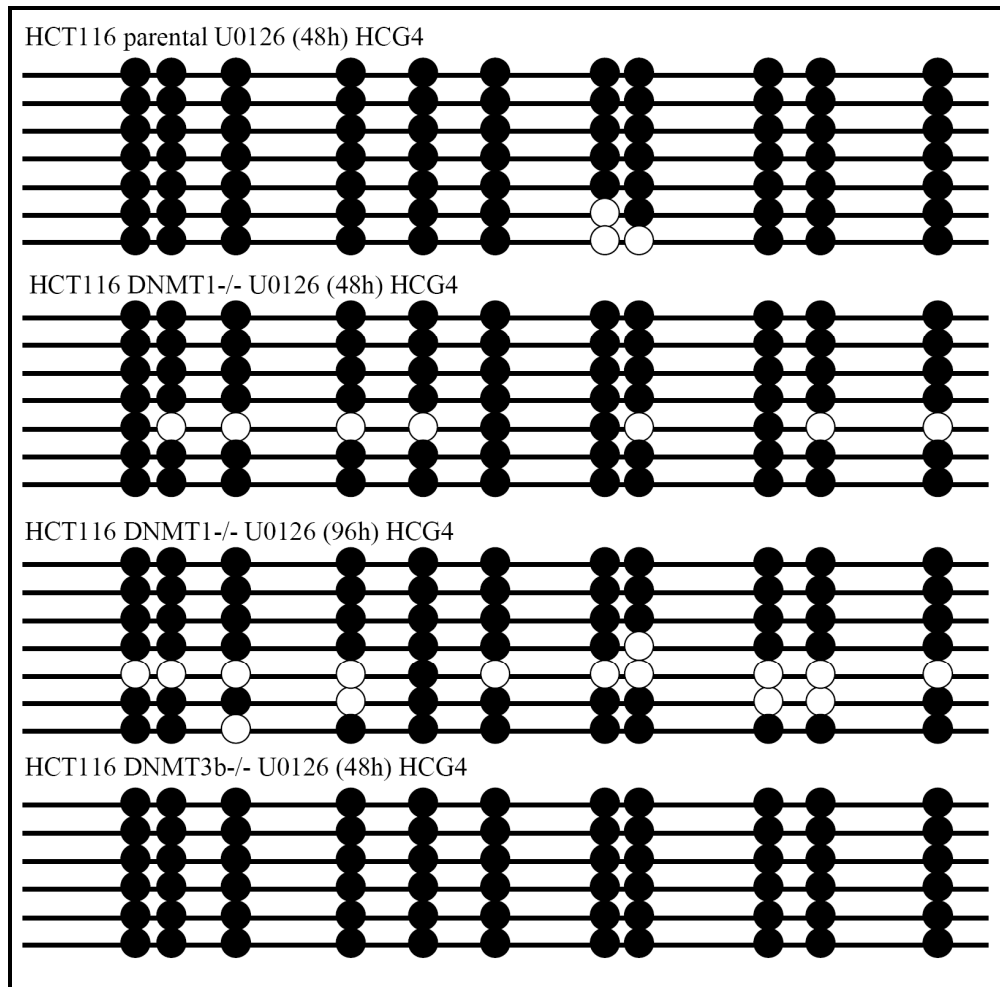


Abbildung 16: HCG4 Promotor-Methylierung nach Mek/Erk-Inhibition

parentale HCT116 + U0126 (48h), DNMT1^{-/-} + U0126 (48h und 96h), DNMT3b^{-/-} + U0126 (48h); ein Kreis steht für ein CpG; (●) methyliertes CpG, (○) nicht methyliertes CpG

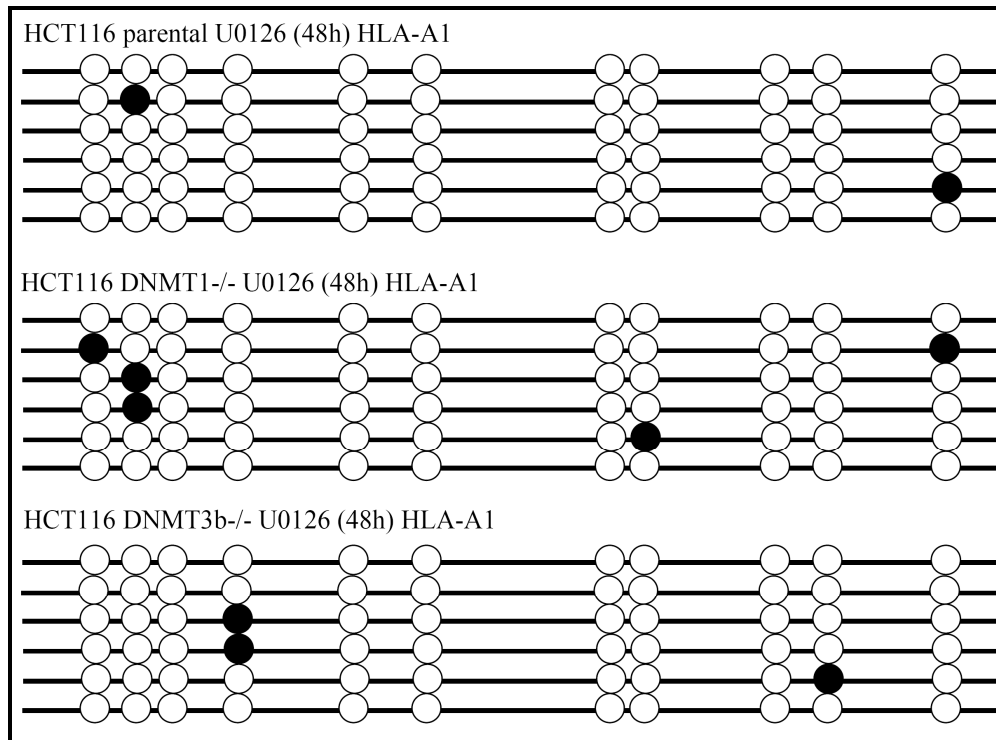


Abbildung 17: HLA-A1 Promotor-Methylierung nach Mek/Erk-Inhibition

parentale HCT116 + U0126 (48h), DNMT1^{-/-} + U0126 (48h), DNMT3b^{-/-} + U0126 (48h); ein Kreis steht für ein CpG; (●) methyliertes CpG, (○) nicht methyliertes CpG; Da der HLA-A1-Promotor bereits innerhalb der parentalen Zelllinie nicht methyliert war, ändert sich der Methylierungsgrad auch unter U0126 Behandlung nicht.

- **ULBP2**

Für die parentale HCT116 Zelllinie führte die Inhibition des Mek/Erk-Signalweges mittels U0126 zu einer deutlichen Demethylierung der Regionen II und III des ULBP2-Gens (Abbildung 18, 19). Auch in DNMT1^{-/-} zeigte die U0126 Behandlung eine Demethylierung für ULBP2 III (Abbildung 19). Der Abschnitt ULBP2 II konnte für HCT116 1^{-/-} trotz mehrmaliger Wiederholung der Bisulfitbehandlung, aufgrund einer anhaltend schlechten Konvertierungsrate von <70%, nicht in die Analyse mit einbezogen werden. Für HCT116 3b^{-/-} ließen sich ebenfalls keine auswertbaren Ergebnisse erzielen. Das Problem hier war eine beständige Klondominanz, so dass keine repräsentative Schnittmenge an unterschiedlichen Klonen vorlag.

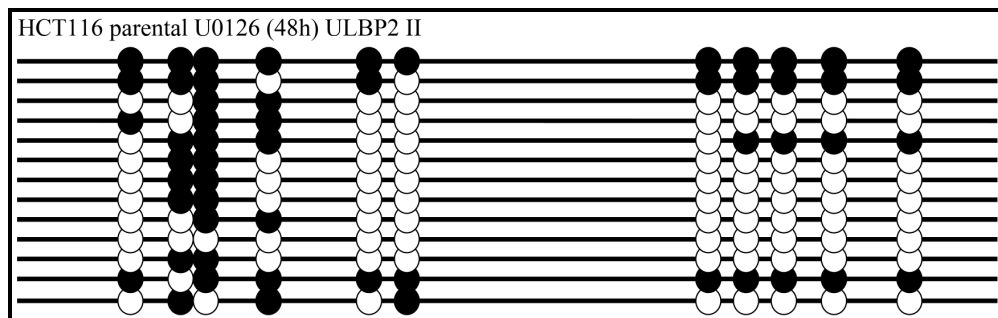


Abbildung 18: ULBP2 Promotor-Methylierung nach Mek/Erk-Inhibition, Abschnitt II

parentale HCT116 + U0126 (48h); ein Kreis steht für ein CpG; (●) methyliertes CpG, (○) nicht methyliertes CpG; Unter U0126-Behandlung zeigt sich für den Abschnitt II des ULBP2-Promotors eine deutliche Demethylierung im Vergleich zur unbehandelten parentalen Zelllinie

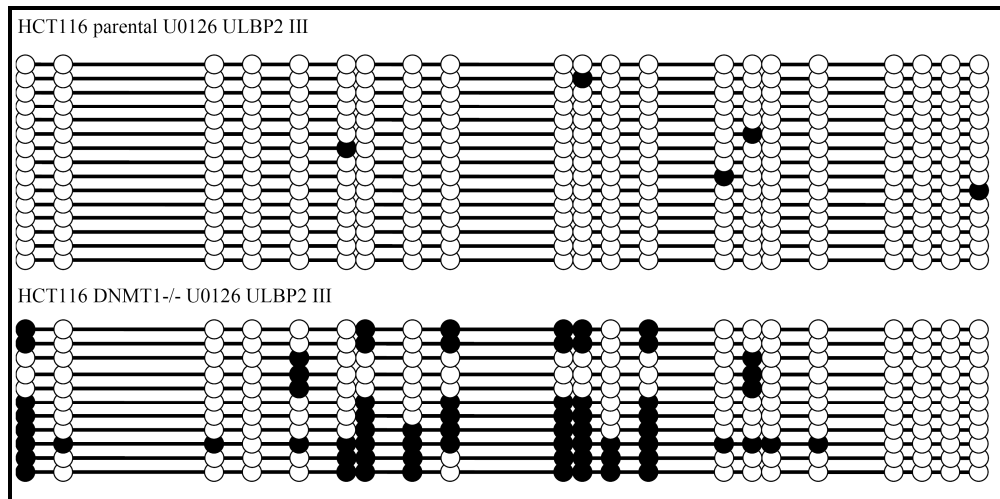


Abbildung 19: ULBP2 Promotor-Methylierung nach Mek/Erk-Inhibition, Abschnitt III

parentale HCT116 + U0126 (48h) und DNMT1-/- + U0126 (48h); ein Kreis steht für ein CpG; (●) methyliertes CpG, (o) nicht methyliertes CpG; Unter U0126-Behandlung zeigt sich für den Abschnitt III des ULBP2-Promotors sowohl für die behandelte parentale Zelllinie, als auch für den behandelten DNMT1-Knockout eine deutliche Demethylierung im Vergleich zu den unbehandelten Zelllinien.

3.1.3 Lösungskontrollen HLA-A, HCG4 und ULBP2

HLA-A war in der parentalen HCT116 Zelllinie nicht methyliert. Unter U0126-Behandlung zeigte sich erwartungsgemäß kein Effekt auf den Grad der Methylierung. Demzufolge wurde auf eine Lösungskontrolle für HLA-A verzichtet.

- **HCG4**

Unter DMSO änderte sich das Methylierungsmuster von HCG4 nicht (Abbildung 20). Damit kann ein Einfluss des Lösungsmittels auf das Methylierungsmuster ausgeschlossen werden und die Effekte sind U0126 und der daraus resultierenden Mek/Erk-Inhibition zuzuordnen.

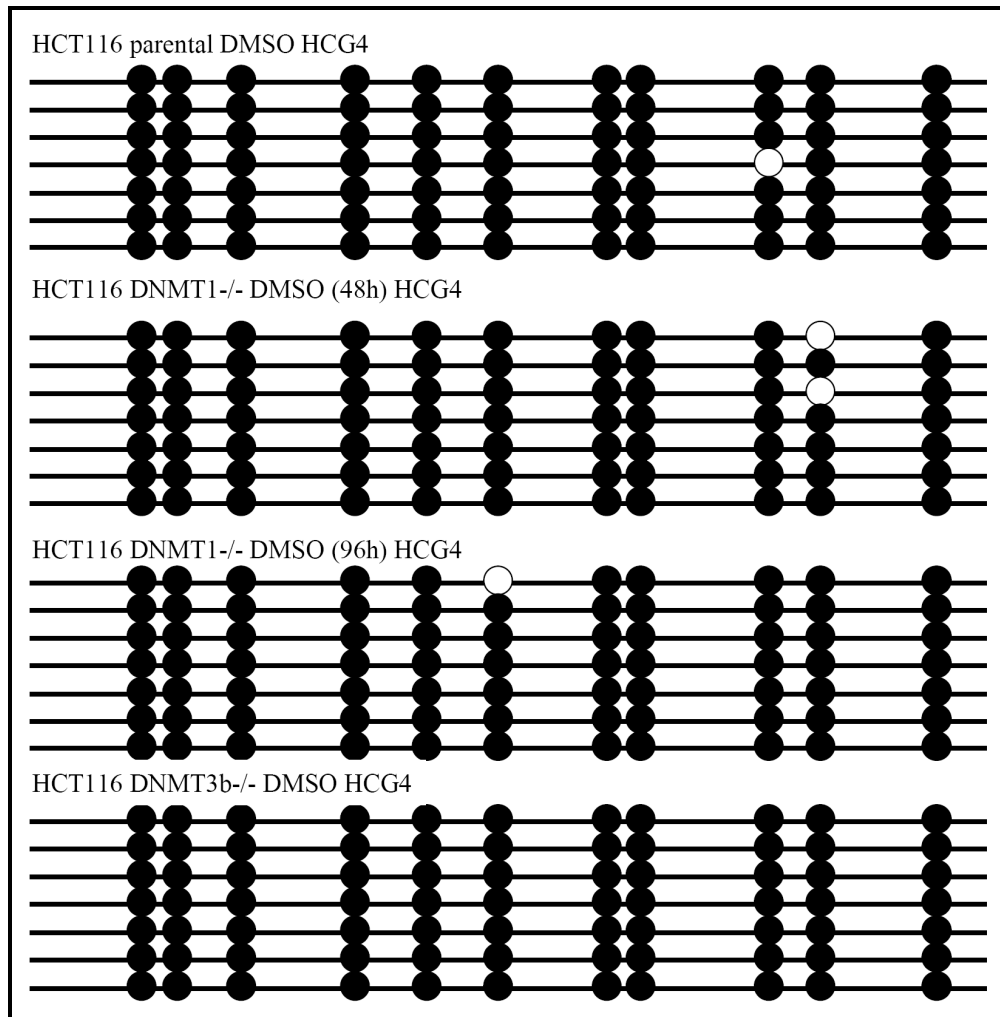


Abbildung 20: HCG4 DMSO-Kontrolle

parentale HCT116 + DMSO, 1^{-/-} + DMSO (48h) und (96h), 3b^{-/-} + DMSO; ein Kreis steht für ein CpG; (●) methyliertes CpG, (○) nicht methyliertes CpG; DMSO hat auf den Grad der Methylierung keinen Einfluss. Der Promotor bleibt stark methyliert.

- ULBP2

Die DMSO-Kontrolle für parentale HCT116 zeigte keine Änderung des Methylierungsmuster für den ULBP2 Promotor in den Abschnitten II und III (Abbildung 21, 22). Lediglich in HCT116 1-/- ist für ULBP2 III eine leichte Demethylierung im Vergleich zur unbehandelten Zelllinie zu erkennen (Abbildung 22). Diese Beobachtung muss bei der Interpretation einer Demethylierung, ausgelöst durch eine Mek/Erk-Inhibition mittels U0126 berücksichtigt werden.

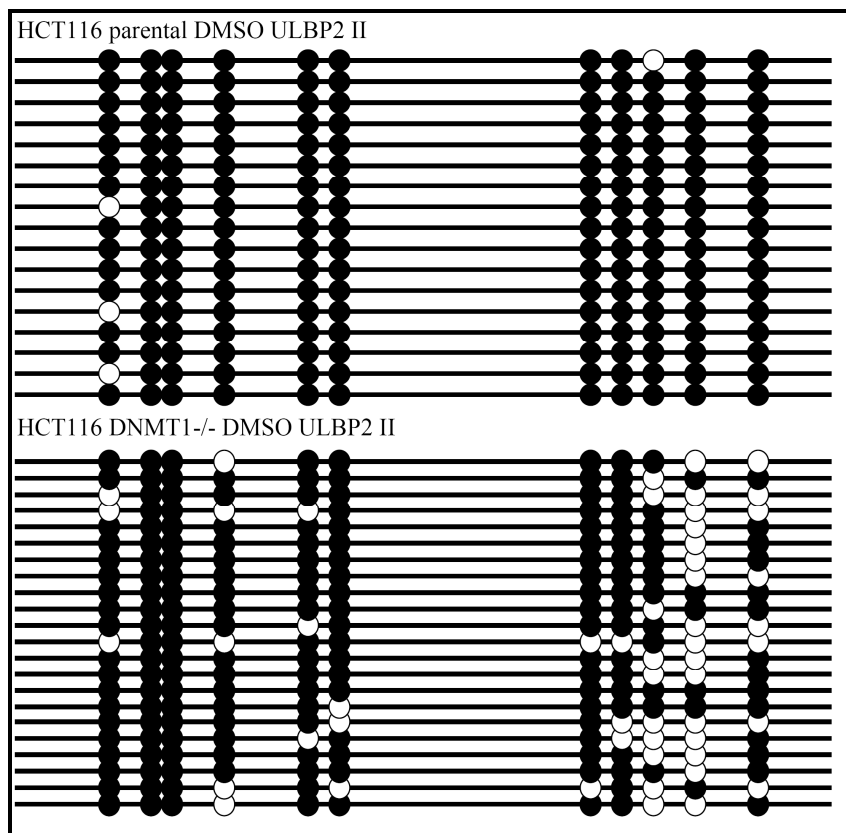


Abbildung 21: ULBP2 DMSO-Kontrolle, Abschnitt II

parentale HCT116 + DMSO, DNMT1-/- + DMSO; ein Kreis steht für ein CpG; (●) methyliertes CpG, (○) nicht methyliertes CpG; DMSO hat auf den Grad der Methylierung keinen Einfluss. Der Promotor bleibt in den untersuchten Zelllinien stark methyliert.

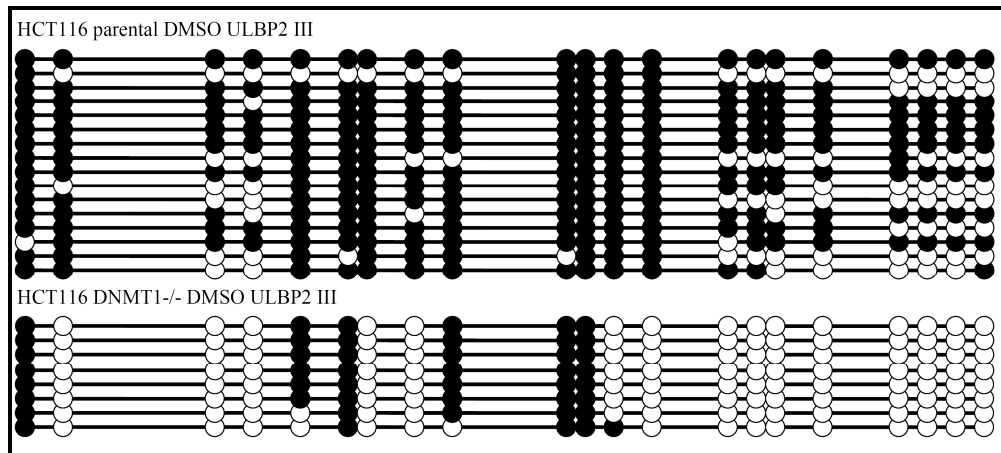


Abbildung 22: ULBP2 DMSO-Kontrolle, Abschnitt III

parentale HCT116 + DMSO, DNMT1^{-/-} + DMSO; ein Kreis steht für ein CpG; (●) methyliertes CpG, (○) nicht methyliertes CpG; Der Promotor bleibt unter DMSO in der parentalen Zelllinie stark methyliert und damit unverändert. Für die DNMT1^{-/-} Zelllinie ist eine leichte Demethylierung unter DMSO zu erkennen.

3.2 RNA-Expression von ULBP2

3.2.1 Northern-Blot Analyse

Um den Zusammenhang zwischen Promotormethylierung, RNA-Expression und Mek/Erk-Abhängigkeit von ULBP2 zu untersuchen, führten wir eine Northern-Blot-Analyse für ULBP2 in parentalen HCT116, DNMT1^{-/-}, DNMT3b^{-/-} und DKO, jeweils mit DMSO und U0126 behandelt, durch.

ULBP2 war in den parentalen HCT116 Zellen nur wenig exprimiert (Abbildung 23). Unter U0126 Behandlung der parentalen HCT116 Zelllinie zeigte sich kein Effekt auf die RNA-Expression. Eine deutliche Abhängigkeit der ULBP2-Expression vom DNMT-Status zeigte sich im Doppelknockout. Hier stieg die Expression erheblich an. Die Ergebnisse korrelieren mit der Aussage der SAM-Analyse, welche zeigte, dass die ULBP2-Expression nicht signifikant über Mek/Erk reguliert wird, jedoch deutlich DNMT-abhängig ist (63). Dennoch lässt sich eine Regulation des ULBP2-Promotors, wie die Ergebnisse der Methylierungsanalyse zeigen, nicht verneinen, da es unter Mek/Erk-Inhibition zumindest auf DNA-Ebene zu einer signifikanten Demethylierung innerhalb der Promotorregion kam (s.o.). Welche detaillierten Faktoren letzten Endes für einen Wiederanstieg der ULBP2-Expression eine Rolle spielen bleibt unklar.

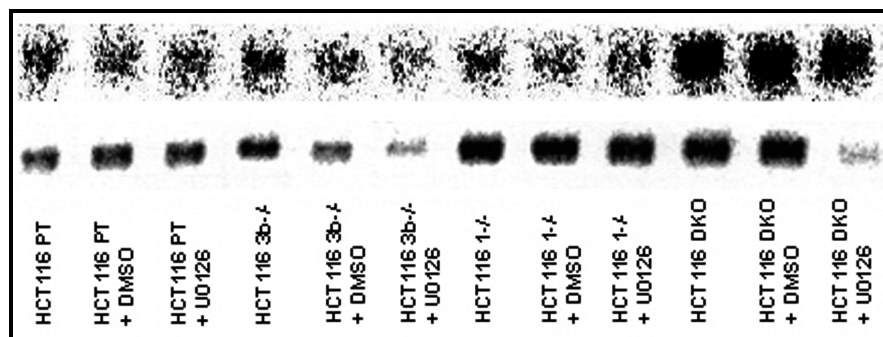


Abbildung 23: Northernblot-Analyse für ULBP2

oben: 1.-3. Reihe: parentale HCT116; + DMSO; + U0126; 4.-6. Reihe: HCT116 DNMT3b^{-/-}; + DMSO; + U0126; 7.-9. Reihe: HCT116 DNMT1^{-/-}; + DMSO; + U0126; 10.-12. Reihe: HCT116 DKO; + DMSO; + U0126 unten: GAPDH-Kontrolle

3.3 Oberflächenexpression von HLA-A, ULBP1, 2 und 3 in parentalen HCT116

3.3.1 Einfluss der Mek/Erk-Inhibition auf die HLA-A, ULBP2 und 3 Oberflächenexpression

Um den Zusammenhang zwischen Mek/Erk und Proteinexpression zu untersuchen, analysierten wir die HLA-A und ULBP1-, 2-, -3-Oberflächenexpression in den HCT116 Zellen nach U0126-Behandlung.

Zu sehen ist ein deutlicher Oberflächenexpressionsanstieg. Sowohl für HLA-A1, als auch für HLA-A2. Der monoklonale Antikörper W6/32 dient als Referenz für die gesamte MHC-Klasse-I Oberflächenexpression und zeigt ebenfalls eine deutliche Mek/Erk Abhängigkeit (Abbildung 24).

Ein Einfluss der DNA-Methyltransferasen auf die Oberflächenexpression konnte bereits in früheren FACS-Analysen nachgewiesen werden (64). Dort zeigte sich, dass auch der alleinige Doppelknockout zur Steigerung der HLA-A-Expression genügt.

ULBP1 und ULBP2 zeigten einen Anstieg der Oberflächenexpression nach U0126-Behandlung. Für ULBP3 war kein signifikanter Effekt festzustellen. Zusammengenommen ist die Oberflächenexpression von ULBP im Vergleich zu HLA-A nur gering (Abbildung 25).

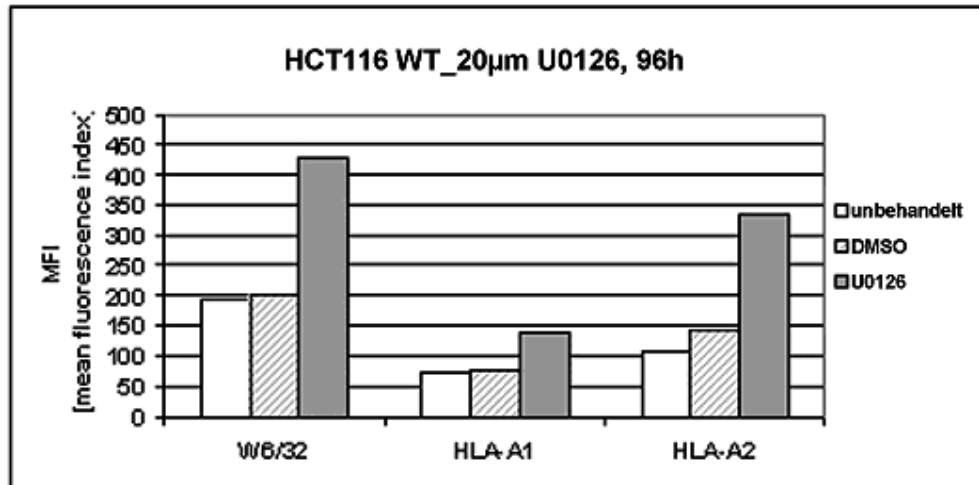


Abbildung 24: Oberflächenexpression HLA-A1/2 auf parental HCT116

parentale HCT116 behandelt mit 20µm U0126 (96h); Darstellung der Zelloberflächenexpression von HLA-A1 vor und nach U0126-Behandlung.

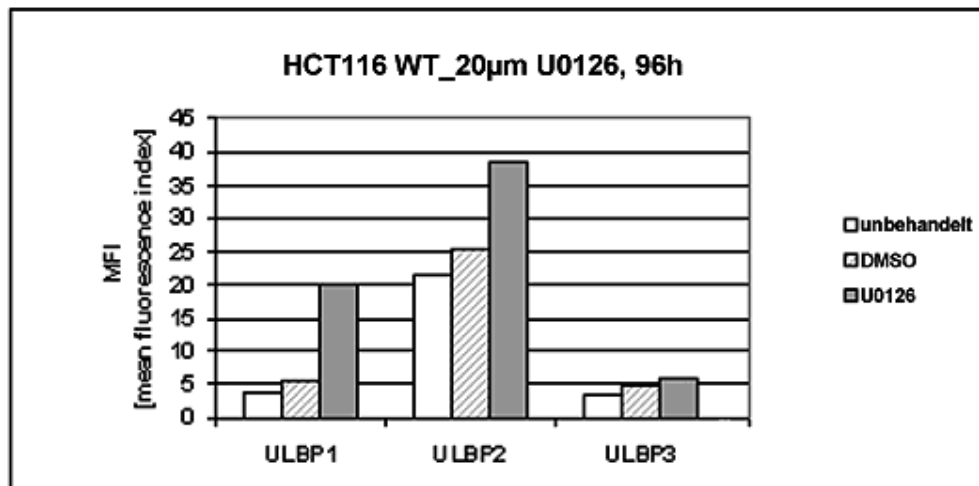


Abbildung 25: Oberflächenexpression ULBP1, 2 und 3 auf parental HCT116

parentale HCT116 behandelt mit 20µm U0126 (96h); Darstellung der Zelloberflächenexpression von ULBP1, 2 und 3 vor und nach U0126-Behandlung.

3.4 Statistische Auswertung für ULBP2

3.4.1 Einfluss der unterschiedlichen DNMT-Knockouts auf die Methylierung von ULBP2

Im Kruskal-Wallis-Test zeigt sich ein grundlegender Effekt des DNMT-Knockouts auf die Methylierung von ULBP2 II ($\chi^2=38,227$; $df=3$; $p<0,001$) und ULBP2 III ($\chi^2=55,395$; $df=3$; $p<0,001$).

Zur Analyse möglicher signifikanter Unterschiede der DNMT-Knockouts auf den Grad der Methylierung wurden mithilfe von U-Tests für beide Abschnitte (ULBP2 II und III) jeweils 6 Einzelkontraste gerechnet. Nach Adjustierung des α -Levels auf $0,025/6=0,004$ werden für ULBP2 II folgende Kontraste signifikant:

- parental vs. DKO ($Z=-4,696$; $p<0,001$)
- DNMT1 vs. DKO ($Z=-5,06$; $p<0,001$)
- DNMT3b vs. DKO ($Z=-4,923$; $p<0,001$)

Die anderen Einzelvergleiche ergeben folgendes Bild:

- parental vs. DNMT1 ($Z=-2,103$; $p=0,035$)
- parental vs. DNMT3b ($Z=-2,587$; $p=0,01$)
- DNMT1 vs. DNMT3b ($Z=-0,74$; $p=0,459$)

Die Methylierung in HCT116 DNMT1^{-/-} und DNMT3b^{-/-} geht im Vergleich zur parental Zelllinie tendenziell zurück, während sich zwischen HCT116 DNMT1^{-/-} und DNMT3b^{-/-} kein Unterschied finden lässt. Die einzig signifikante Demethylierung zeigen HCT116 DKO.

Für ULBP2 III werden folgende Kontraste signifikant:

- parental vs. DKO (Z=-5,883; p<0,001)
- DNMT1 vs. DKO (Z=-5,349; p<0,001)
- DNMT3b vs. DKO (Z=-5,689; p<,001)

Die anderen Einzelvergleiche ergeben folgendes Bild:

- parental vs. DNMT1 (Z=-1,732; p=0,089)
- parental vs. DNMT3b (Z=-1,577; p=0,117)
- DNMT1 vs. DNMT3b (Z=-0,198; p=0,846)

Die einzig signifikante Demethylierung zeigen damit auch hier HCT116 DKO.

Zelllinie	Stichprobengröße (n)		Mittelwert in %		Standardabweichung	
	II	III	II	III	II	III
ULBP2						
HCT116 PT	22	18	81,3	71,2	24,5	26,8
HCT116 DNMT1-/-	23	13	77,9	53,8	15,5	13,2
HCT116 DNMT3b-/-	18	16	76,3	57,8	10,4	25,1
DKO	15	29	21,2	2,3	17,4	3

Tabelle 8: Statistiken für ULBP2 II und III in parentalen HCT116, DNMT1-/-, DNMT3b-/-, DKO; Die Stichprobengröße n umfasst die Anzahl der untersuchten Klone.

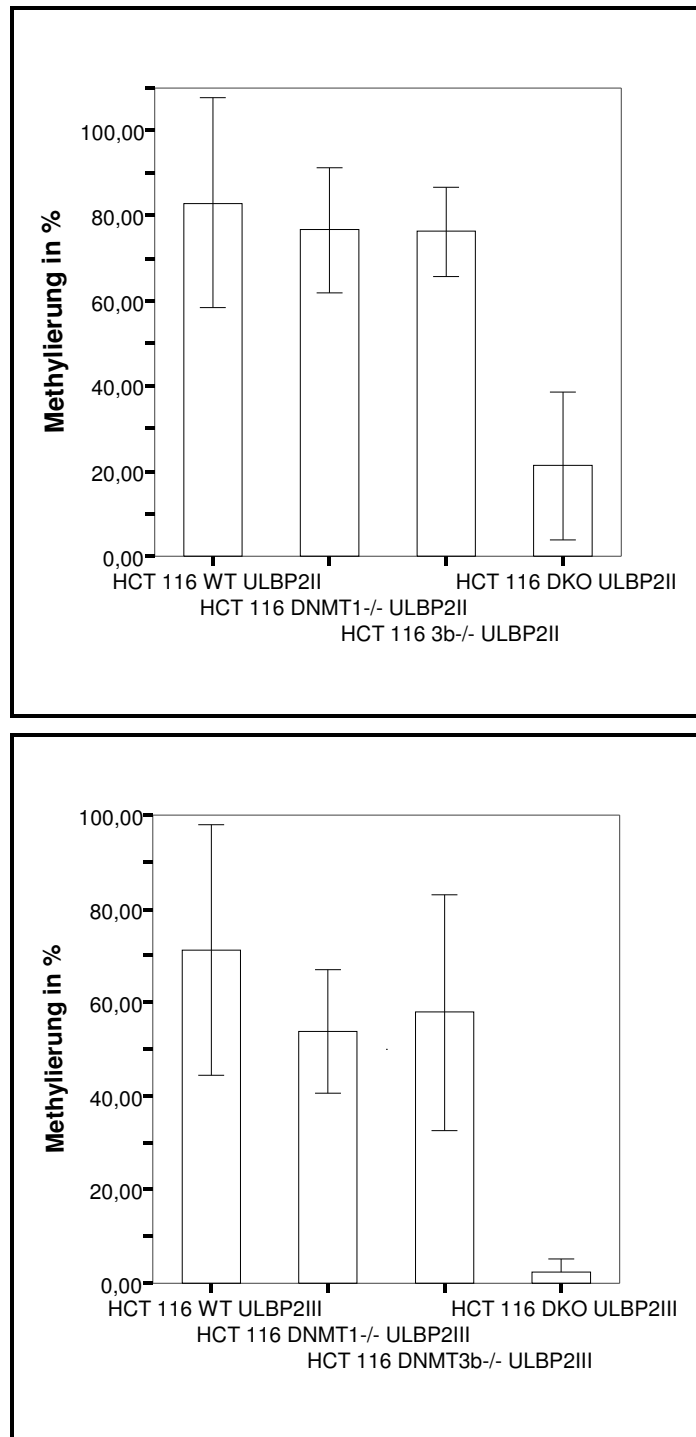


Abbildung 26: ULBP2 Promotor-Methylierung in %, Abschnitte II und III; alle Zelllinien im Vergleich

3.4.2 Einfluss der Mek/Erk-Inhibition auf die Methylierung von ULBP2

Zur Erueierung eines möglichen Einflusses von Mek/Erk auf die Methylierung von ULBP2 wurde mithilfe von U-Tests für beide Abschnitte jeweils ein Einzelkontrast gerechnet (Tabelle 9, Abbildung 27).

Für ULBP2 II und III ergeben beide Tests signifikante Ergebnisse.

- ULBP2 II: parental vs. parental + U0126 ($Z=-3,378$; $p<0,001$).
- ULBP2 III: parental vs. parental + U0126 ($Z=-4,963$; $p<0,001$).

Mek/Erk hat damit einen signifikanten Einfluss auf die Methylierung von ULBP2.

Zelllinie	Stichprobengröße (n)		Mittelwert in %		Standardabweichung	
	II	III	II	III	II	III
ULBP2						
HCT116 PT	22	18	81,3	71,2	24,6	26,8
HCT116 PT + U0126	13	15	38,5	1,6	33,2	2,3

Tabelle 9: Statistiken für ULBP2 II und III in parentalen HCT116 vor und nach U0126-Behandlung; Die Stichprobengröße n umfasst die Anzahl der untersuchten Klone.

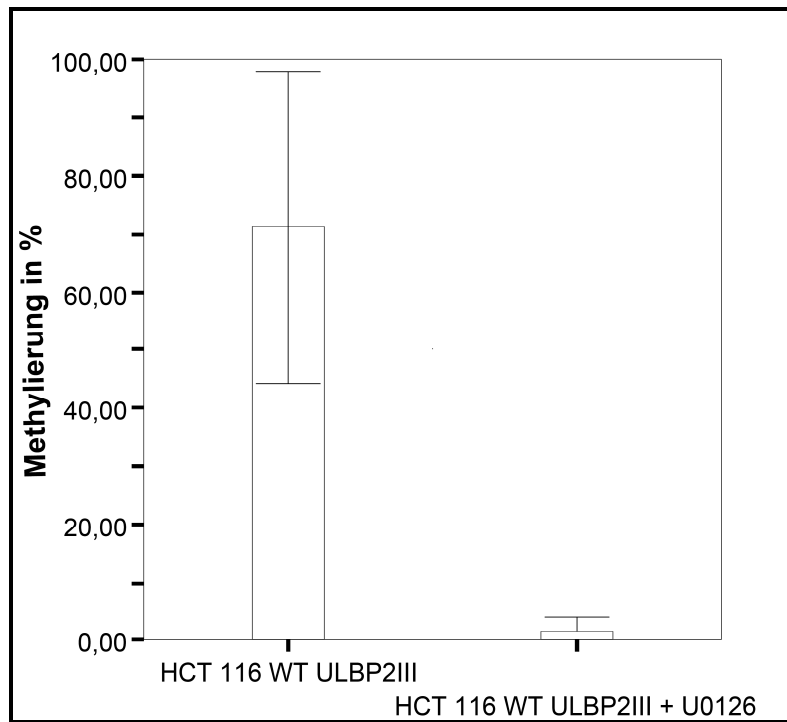
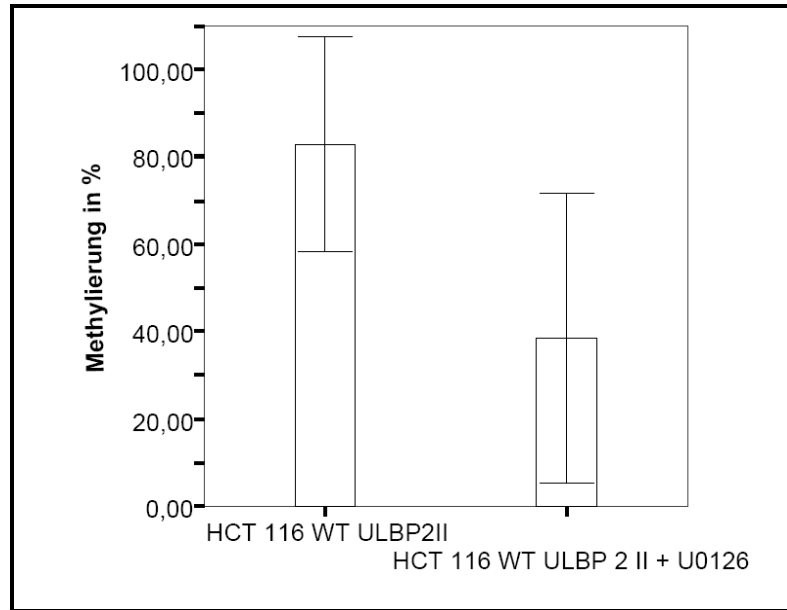


Abbildung 27: ULBP2 Promotor-Methylierung in % vor und nach Mek/Erk-Inhibition, Abschnitte II und III; parentale HCT116

3.4.3 Einfluss von DMSO auf die Methylierung von ULBP2

Zur Erueierung eines möglichen Einflusses von DMSO auf die Methylierung von ULBP2 wurde mithilfe von U-Tests für beide Abschnitte jeweils ein Einzelkontrast gerechnet (Tabelle 10).

Für ULBP2 II und III ergeben sich folgende Ergebnisse:

- ULBP2 II: parental vs. parental + DMSO ($Z = -2,730$; $p < 0,013$).
- ULBP2 III: parental vs. parental + DMSO ($Z = -0,713$; $p < 0,484$).

Für den Abschnitt ULBP2 II wird der Unterschied in der Methylierung signifikant. Jedoch wäre für die vorliegenden Ergebnisse lediglich eine Signifikanz im Sinne einer Demethylierung von Bedeutung. Demzufolge kann umgekehrt geschlossen werden, dass DMSO keinen signifikanten Einfluss auf die Demethylierung von ULBP2 hat.

Zelllinie	Stichprobengröße (n)		Mittelwert in %		Standardabweichung	
	II	III	II	III	II	III
ULBP2						
HCT116 PT	22	18	81,3	71,2	24,6	26,8
HCT116 PT + DMSO	17	16	97,9	76,5	3,97	24,5

Tabelle 10: Statistiken für ULBP2 II und III in parentalen HCT116 vor und nach DMSO-Behandlung; Die Stichprobengröße n umfasst die Anzahl der untersuchten Klone.

4 Diskussion

4.1 Ras und DNA-Methylierung

Aktivierende K-Ras Mutationen gehören zu den häufigsten Veränderungen in humanen Karzinomen. Innerhalb der kolorektalen Tumorigenese treten sie frühzeitig auf (65). Die verschiedenen Tumortypen unterscheiden sich hinsichtlich der Häufigkeit der Ras Mutationen (Tabelle 11). Für das Pankreas-Karzinom beträgt die Inzidenz 95% für K-Ras Mutationen, wohingegen das Melanom lediglich eine Inzidenz von 30% für N-Ras zeigt. Das Kolon-Karzinom rangiert mit einer Inzidenz von 40% für K-Ras in der Mitte (66).

Tumortyp	Inzidenz (%)	Onkogen
Pankreas-Ca	95	K- <i>ras</i>
Schilddrüsen-Ca	60	N- <i>ras</i>
Kolon-Ca	50	K- <i>ras</i>
Seminom	40	K- <i>ras</i> , N- <i>ras</i>
Bronchial-Ca	40	K- <i>ras</i>
Myelodysplastisches Syndrom	30	N- <i>ras</i>
Melanom	30	N- <i>ras</i>

Tabelle 11: aktivierte Ras Onkogene in humanen Tumoren (modifiziert nach (66)).

K-Ras gewinnt als klinischer Marker für Prognose und Therapie kolorektaler Karzinome immer mehr an Bedeutung. Ein wichtiger therapeutischer Ansatz ist die Blockade des Rezeptors für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGFR) mit monoklonalen Antikörpern. EGFR-Expression wird in bis zu 80% humaner

kolorektaler Karzinome gefunden. Im letzten Jahr konnte gezeigt werden, dass Patienten, die eine Mutation für K-Ras tragen, nicht von der Therapie mit monoklonalen Antikörpern wie Cetuximab profitieren (67). Ist K-Ras mutiert und dadurch immer aktiviert, macht es keinen Unterschied ob EGFR blockiert wird oder nicht. Der Signalweg ist in jedem Fall auf „an“ geschaltet. Daher ist es wichtig, weitere therapeutische Angriffspunkte zu erforschen.

Eine wichtige Möglichkeit der Expressionsregulierung bestimmter Gene in humanen Tumoren ist die schon besprochene DNA-Methylierung. Promotor-Hypermethylierung eines Gens führt in vielen Fällen dazu, dass das Gen nicht mehr exprimiert wird. Im Hinblick auf methylierungsspezifische Effekte ist in maligne veränderten Zellen die Stilllegung von Genen von besonderem Interesse. Man beobachtet innerhalb entarteter Zellen häufig eine globale **Hypomethylierung**, wohingegen CpG-reiche Promotorregionen (GpC-Inseln) der Tumorsuppressorgene oft **hypermethyliert** sind (68).

Aktuelle Publikationen zeigen interessante Zusammenhänge zwischen Ras und Methylierung auf. Die Aktivierung von Ras in humanen Tumoren spielt eine wichtige Rolle in der epigenetischen (methylierungsabhängigen) Inaktivierung einiger Gene. Mek/Erk Zielgene wie Clusterin, Mmp2, Peptidyl-Propyl Isomerase C-assoziiertes Protein, SDC4, Timp2 und Thbs1 sind in H-Ras-transformierten Rattenfibroblasten (FE-8 Zellen) methylierungsabhängig inaktiviert (69). Unter Behandlung der FE-8 Zellen mit 5-AzadC und dem Mek1/2 Inhibitor U0126 ließen sich die genannten Gene wieder aufregulieren. Eine Bisulfitsequenzierung der H-Ras transformierten Zellen ergab eine hypermethylierte GpC-Insel 14,5kb stromaufwärts des Clusterinpromotors, sowie eine weitere CpG-Anhäufung innerhalb des Clusterin- und Mmp2-Promotors (70).

Ras-abhängige DNA-Methylierung konnte auch für adrenokortikale Tumorzellen (Y1) gezeigt werden. Die Aktivierung des DNMT1 Promotors wird in Y1 Zellen über Ras und AP-1 reguliert (71;72).

Im Zusammenhang mit H-Ras wurde eine Abregulierung des Zelltod induzierenden Gens fas beschrieben. Zellen fibroblastischen und epithelialen Ursprungs zeigen eine Resistenz gegen Fas-Ligand induzierte Apoptose. Fas mRNA ist in Ras-transformierten Zellen nicht detektierbar. Eine Inhibierung der DNA-Methylierung allerdings stellt die Fas Expression wieder her (73).

In Ras-transformierten NIH3T3 Fibroblasten ist das Apoptose fördernde Protein Par-4 durch Raf/Mek/Erk MAPK induzierte Hyperaktivität von DNMT1 und DNMT3b und daraus resultierender Promotor-Hypermethylierung abreguliert (74).

In kolorektalen Karzinomen ist die Stilllegung von Genen (Gene-Silencing) mit Methylierung und Histon-Deacetylierung von RasSF2 assoziiert. RasSF2 vermittelt unter anderem Induktion morphologischer Veränderungen und Apoptose. RasSF2 wurde in kolorektalen Karzinomen als Tumorsuppressor identifiziert (75). In primären kolorektalen Karzinomzellen sind K-Ras/B-Raf Mutationen häufig mit RasSF2-Methylierung und einer daraus resultierenden Inaktivierung von RasSF2 assoziiert. Mögliches Resultat ist eine K-Ras induzierte onkogene Zelltransformation. RasSF2-Methylierung zeigt sich auch in kolorektalen Adenomen. RasSF2 reguliert den Ras-Signalweg und wird selbst über DNA-Methylierung reguliert.

Maligne Astrozytome mit aktiviertem Ras-Signalweg zeigen häufig DNA-Methylierung, die zu einer Inaktivierung von p53 führt (76).

4.2 Regulation der HLA-A-Expression

Aktuelle Publikationen zeigen für bestimmte humane Tumore wie z.B. das Magen- oder Ösophaguskarzinom einen Zusammenhang zwischen Promotormethylierung und einer daraus resultierenden verminderten HLA-A-Expression (77;78). Ein solcher Zusammenhang konnte von uns für die verwendete humane Kolonkarzinomzelllinie HCT116 nicht nachgewiesen werden.

Wie die Bisulfitsequenzierung zeigte, ist HLA-A im Promotorbereich nicht methyliert. Allerdings hat eine zuvor (nicht Teil dieser Arbeit) durchgeführte real Time PCR ergeben, dass die mRNA-Expression von HLA-A in den HCT116 DKO Zellen deutlich gesteigert ist (79). Demzufolge ist es sehr wahrscheinlich, dass die Steuerung der Expression durch DNA-Methyltransferasen über indirekte Methylierung erfolgt. Weiterhin kann von einem Einfluss des MAPK-Signalwegs auf die HLA-A Expression ausgegangen werden, da sich mittels fluoreszenzbasierter Durchflusszytometrie für HCT116 + U0126 im Vergleich zur unbehandelten HCT116 Zelllinie eine Steigerung der Oberflächenexpression nachweisen lies. Offenbar regulieren DNA-Methyltransferasen und Komponenten des Mek-Erk-Signalweges in einem gemeinsamen Zusammenspiel die HLA-A-Expression in Kolonkarzinomzellen.

Höchstwahrscheinlich geschieht dies im Falle von HLA-A nicht auf DNA-, sondern auf Proteinebene. Die genauen molekularen Mechanismen sind dabei jedoch immer noch unklar.

Sehr wahrscheinlich ist allerdings, dass Komponenten, die an der Prozessierung von MHC-Klasse-I Molekülen beteiligt sind, eine Rolle spielen. Hier liegt der Fokus auf den Peptidtransportern TAP1, TAP2 und Tapasin, sowie den proteosomalen Proteinen LMP2 und LMP7. Für TAP1, Tapasin und LMP2 wurde

eine verminderte Expression in Kolonkarzinomzellen mit K-Ras-Mutation gezeigt (80).

4.3 Regulation der ULBP-Expression

Die Analyse des ULBP2 Methylierungsmusters ergab im Gegensatz zu HLA-A und ULBP3 eine deutliche Mek/Erk- und DNMT-Abhängigkeit.

Nachdem sowohl der Abschnitt ULBP2 II, als auch ULBP2 III in parentalen HCT116 stark methyliert waren, zeigten beide Regionen einen deutlichen Rückgang der Methylierung im Doppelknockout. Bereits in DNMT1-/- ging die Methylierung für ULBP2 II im Vergleich zu parentalen HCT116 zurück. Dieser Effekt konnte durch zusätzliche Behandlung mit U0126 verstärkt werden. Im Doppelknockout ergab sich für ULBP2 II und III ebenfalls ein Rückgang der Methylierung. Eine starke Demethylierung innerhalb der Promotorregion konnte für ULBP2 II und III nach U0126 Behandlung der parentalen HCT116 Zelllinie beobachtet werden. DNMT3b hat auf den Grad der Methylierung insgesamt einen geringeren Einfluss als DNMT1.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse aus der Methylierungsanalyse damit eine klare Mek/Erk- und DNMT-Abhängigkeit der Methylierung des ULBP2-Promotors.

Auch die Untersuchung der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie zeigte für ULBP2 diese Mek/Erk-Abhängigkeit. Die Oberflächenexpression von ULBP2, die in parentalen HCT116 stark vermindert war, wurde nach U0126-Behandlung aufreguliert. Für die HCT116 DKO Zelllinie plus U0126 war der Effekt noch deutlicher als in der behandelten parentalen Zelllinie. Damit ergibt sich an dieser Stelle auch für ULBP2 der Verdacht auf ein gemeinsames Zusammenspiel aus Ras/MAPK und DNA-Methyltransferasen im Zuge der Regulation der Gen- und Oberflächenexpression.

Mit dieser Annahme sind allerdings die Ergebnisse aus der Northernblot-Analyse nicht zu erklären. Eine Steigerung der mRNA-Expression zeigte sich lediglich für HCT116 DKO, nicht jedoch für die Behandlung von parentalen HCT116 mit U0126. Die Ergebnisse korrelieren mit der Aussage einer vorhergehenden SAM-Analyse, welche zeigte, dass die ULBP2-Expression nicht signifikant über Mek/Erk reguliert wird, jedoch deutlich DNMT-abhängig ist (81). Den Ergebnissen aus der Bisulfitsequenzierung zufolge lässt sich ein Einfluss von Mek/Erk auf die ULBP2-Promotormethylierung jedoch nicht verneinen, da es unter U0126-Behandlung zumindest auf DNA-Ebene zu einer signifikanten Demethylierung innerhalb der Promotorregion kam (s.o.). Welche detaillierten Faktoren letzten Endes für den Wiederanstieg der ULBP2-Expression eine Rolle spielen bleibt unklar. Möglich wäre, dass die Expression unter anderem über Methylierung bestimmter Transkriptionsfaktoren gesteuert wird.

Frühere Studien zeigen, dass es innerhalb der ULBP-Promotoren Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren ATF6 (activation transcription factor 6), MZF1 (myeloid zinc finger 1), BNC (basonuclein) und HSF1 (heat shock transcription factor 1) gibt (Abbildung 28). Zusätzlich konnte innerhalb des 1. Introns eine Bindungsstelle für NF-Kappa-B identifiziert werden, die gleich der schon zuvor gefundenen (82) Bindungsstelle innerhalb des MIC-A Promotors war (83). NF-Kappa-B ist aktiv in die T-Zellaktivierung involviert und in vielen Tumoren konstitutiv aktiv.

			ATF6				MZF1
RAET1L	-547	CAGCCCGGAC	TGTAACCACG	CCCACCGGGG	ActggggaAG	TAGTG	GAGGG GACG-----
ULBP2	-510	TAGCCCGGAC	TGTAATCAG	TCCACTGGG	a actgggcAG	TAGTG	GAGGG GACG-----
ULBP1	-536	CCTCATGCTT	T-----	-----	-----	TAGTGGAGAG	GCAAAAAGG
RAET1G	-593	TAGCCAGGC	TATAACCAG	TCCACTCGG	G Atttgggatg	agccc	GCGGG GATG-----
ULBP3	-598	CCTCATGCTT	T-----	-----	-----	TAGTGGAGAG	GCAAGAAGG
							MZF1
RAET1L	-493	-----CG	AAC-AGGCC	ATGGCTGTGC	CCAGGGCGGG	GTGAGCCAGG	GACCCCGCGG
ULBP2	-456	-----CG	ATC-AGGCC	GTGGCTGCGC	CCAGAGCATG	ATAAGCCAGG	GACCTCGCGG
ULBP1	-405	TTCGCTCCGg	aatgGGGAA-	GCGGCTGCGC	CCTGGACGGA	GAGGG	GCGGG GACTTCGCGA
RAET1G	-539	-----GG	ACT-GGGCTT	GGATCTGCGC	ACAGGACGGT	GGGTTGGGAG	CACTCTGCAA
ULBP3	-567	TCTGCTCCGG	ACT-GGGAA-	GCAGCTGCGC	CCTGGACGGA	GAGGG	GCGGG GACTCCTTGG
							BNC
RAET1L	-442	C-GCAAGCGG	AAGGAGGGAG	AGTGCCGCGG	ACCCAGGCGG	GGACAAGGAG	ACGCCGAGGC
ULBP2	-405	C-GCAGGCGG	AGGGAGGGAG	AGCGTCGCGG	ACCCAGGCGG	GGACAAGGAG	ACGCCGCCCG
ULBP1	-446	CtGCAGGCGG	AGGGAGGGCG	GGTGTGCGTG	GCGCAGGCGG	TGACAGGGAG	ACACCGCCCG
RAET1G	-488	C-GCAGGAG	AGGGAAGGCG	GGTGTGCGAG	GTACAGGCGa	GGACAAGGAG	ACCTGTGCGC
ULBP3	-509	C-GCAGGCTG	AAGGAGGGCA	GGTGTGCGTG	GCGGAGGCGG	TGACGGGGG	ACACAGCCCG
			HSF1				
RAET1L	-383	CGCTGAATAT	TCCTCTGCAC	GTTTCTTCAC	CATTAAT---	-----	-----
ULBP2	-346	CGCTGAATAT	TCCTCTGCAA	GTTTCTTCAC	CTTCAAT---	-----	-----
ULBP1	-386	CACTGAGTAT	TCCTATGCAA	GTTTCTTCAT	CTTCTGTGC	ATCAGTGTTT	ACACTGGGGT
RAET1G	-429	GGCTGAACAC	TTCTGTGCAT	-TTTCTTCAC	CTTCTGTGC	ATCGGTATCC	ACATGGATT
ULBP3	-450	CACTGGATAT	CCCTGTGCAA	GTTTCTTCGC	TTTCTGTGC	ATCAGTGCTT	ACATTGGGGT

Abbildung 28: Synopsis der potentiellen Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen innerhalb von NKG2DL-Promotoren (modifiziert nach (84)).

Vor dem aufgezeigten Hintergrund sollten zukünftig weitere Methylierungsanalysen für die Gene der genannten Transkriptionsfaktoren innerhalb von Tumorzelllinien (z.B. HCT116) durchgeführt werden.

Der Mechanismus der ULBP1-Expressionregulation wurde vor kurzem beschrieben. Danach binden Sp1 und Sp3 (ornithine decarboxylase) an CRE(1) (cAMP response element-binding protein) und steuern die ULBP1-Transkription. Nach Deletionen innerhalb der CRE(1)-Bindungsstelle war kein ULBP2-Transkriptionsprodukt mehr nachweisbar (85). Neben den Bindungsstellen für die genannten Transkriptionsfaktoren wurden Polymorphismen innerhalb der Promotoren von NKG2D-Liganden gefunden, welche die Vermutung nahe legen,

dass deren Genexpression auch potentiell über eine Veränderung der Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren reguliert werden kann (86).

Das schließt die zusätzliche Regulation über DNA-Methylierung nicht aus. Basierend darauf, geben unsere Ergebnisse am Beispiel von ULBP2 weiteren Aufschluss über die Expressionsregulation von NKG2D-Liganden, indem sie zeigen, dass der ULBP2-Promotor innerhalb der parentalen Zelllinie von HCT116 hypermethyliert ist. Die Regulation der ULBP-Genexpression scheint eine eng kontrollierte Antwort der Zelle auf Stress zu sein. Die Expression aller ULBP-Gene unterscheidet sich in den verschiedenen Tumoren erheblich. Einige Tumore exprimieren stark ULBPs, andere fast gar keine. Unsere Beobachtung der alleinigen Präsenz eines ULBP-Transkriptionsproduktes ohne eine daraus zwingend resultierende Oberflächenexpression wurde kürzlich publiziert (87;88). Vermutlich spielen dabei zusätzliche Ebenen der post-transkriptionellen Kontrolle eine Rolle, die in Zukunft weiter Gegenstand der Forschung sein werden.

4.4 Methodik

4.4.1 Arbeit mit der HCT116 Zelllinie

Die Arbeit mit den verschiedenen HCT116 Zelllinien hat uns Einblicke in zahlreiche Prozesse innerhalb humaner Krebszellen verschafft, die in Zusammenhang mit der DNA-Methylierung stehen. Zwei aktuelle Publikationen zeigen, dass DNMT1^{-/-} weiterhin ein verkürztes DNMT1 exprimieren (89;90). Nach Mek/Erk-Inhibition fanden wir eine leichte Reduktion des DNMT1-Levels in parentalen HCT116 Zellen, was gut mit früheren Publikationen im Hinblick auf Ras-abhängige Regulation des DNMT1-Promotors übereinstimmt (91). Das impliziert die Regulation der Methylierung bestimmter Gene über eine Ras/MAPK-abhängige Steuerung des DNMT1-Proteinlevels. Dieser Effekt ist allerdings für jedes Gen sehr unterschiedlich. So zeigte die Region II des ULBP2 Gens unter Mek/Erk-Inhibition schon nach 48 Stunden eine vollständige Demethylierung, wohingegen für das HCG4 Pseudogen, welches auf Chromosom 6p lokalisiert ist, auch nach 96stündiger Inkubation mit U0126 keine signifikante Demethylierung nachgewiesen werden konnte.

Wir nehmen an, dass DNMT1 vor allem CpG-arme Regionen methyliert, jedoch keine GpC-Inseln oder Imprint-Gene. Wir haben drei Regionen mit annäherungsweise gleichen CpG-Anteilen verwendet (6,7% für HCG4, 7,8% für ULBP2 II, 4,8% für ULBP2 III), wobei die Mek/Erk-Inhibition vorzugsweise für ULBP2 III Wirkung zeigte. Erst kürzlich zeigten Lu et al., dass die MAPK-Signalweg-Suppression in kolorektalen Krebszellen zur Demethylierung von p16 und p21 führt (92). Zusätzlich vermuten wir, dass Mek eine Rolle bei PCNA spielt. Es ist möglich, dass Ras/MAPK den replikationsassoziierten Transfer der epigenetischen Information stört. So oder so ist zurzeit noch nicht bekannt welche konkreten Auswirkungen unterschiedliche DNMT1-Level auf die

Genmethylierung haben und ob noch andere Signalwege im Bezug auf die Ras/MAPK-abhängige DNMT-Aktivierung eine Rolle spielen.

4.4.2 Bisulfitsequenzierung

Als Voraussetzung für eine korrekte statistische Auswertung der Daten, musste die Konvertierungsrate nach Bisulfitsequenzierung mindestens 95% betragen. Andernfalls wurden die entsprechenden Klone nicht mit in die Auswertung einbezogen.

Einige Sequenzen innerhalb einer vollständig unmethylierten Region sind häufig resistent gegenüber einer Konvertierung (93). Diese Beobachtung macht man oft innerhalb von CpG-Regionen. Die Formation einer stabilen Sekundär-Struktur im Bereich CpG reicher Regionen ist möglicherweise ein Grund für die unvollständige Konvertierung. Indem eine punktuelle Region doppelsträngiger DNA entsteht, wird dem Bisulfitreagenz der „Zugang verwehrt“.

Interessanterweise weist dieselbe Sequenz im hypomethylierten Zustand eine gute Konvertierungsrate auf. Das könnte mit dem Effekt der Schmelzpunktverschiebung methylierter Cytosine zusammenhängen, da diese resistenter gegenüber Denaturierung und anschließender Konvertierung sind. In der vorliegenden Arbeit hatten wir Probleme mit einer ungenügenden Bisulfitkonvertierung im Falle von ULBP2 II in der HCT 116 DNMT1^{-/-} und DNMT3b^{-/-} + U0126. Hier ließen sich keine Konvertierungsraten über 95% erzielen und der Abschnitt konnte für die betreffenden Zelllinien nicht mit in die Auswertung einbezogen werden. Dasselbe Problem trat für ULBP2 III in DNMT3b^{-/-} unter U0126 Behandlung auf. Auch hier konnten keine Daten gewonnen werden. Möglicherweise sollten die Experimente zukünftig außerdem mit einem alternativen Mek/Erk-Inhibitor wie PD098059 oder PD184161 durchgeführt werden. PD184161 erwies sich als stärkerer Mek/Erk-Inhibitor als U0126 und PD098059 (94).

Die DMSO-Lösungskontrollen glichen im Methylierungsmuster weitgehend den unbehandelten Zelllinien. Lediglich der Abschnitt ULBP2 III zeigte in HCT116 DNMT1^{-/-} eine leichte Demethylierung im Vergleich zu DNMT1^{-/-} ohne DMSO. DMSO kann das Zellwachstum negativ beeinflussen. Weiterhin interessant ist, dass beispielsweise bei der methyl-sensitiven Dimethyl-Sulfoxid-PCR (Ms-DMSO-PCR) unter Verwendung des gleichen Primerpaars lediglich die Menge an DMSO für die Amplifizierung methylierter oder unmethylierter DNA entscheidend ist. Um methylierte DNA zu amplifizieren muss eine größere Menge an DMSO eingesetzt werden als für unmethylierte DNA (95).

Offensichtlich sind die Einflüsse, die DMSO auf Zellwachstum und Methylierung haben kann zahlreich. Da das Methylierungsmusters jedoch lediglich in einer Kontrolle eine geringe Änderung zeigte, die in der statistischen Auswertung nicht signifikant wurde, sind diese bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse zu vernachlässigen.

4.5 Tumor- und Therapierelevanz

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die ULBP-Expression mit einer besseren Überlebensprognose bei Krebspatienten korreliert, obwohl seine exakte Rolle innerhalb der Immunreaktion auf Tumorzellen weiter unklar bleibt (96). IL-15 wurde als Verstärker der Immunantwort auf ULBP-exprimierenden Tumoren beschrieben, was einen neuen Ansatz in der tumorimmunologischen Therapie bedeuten könnte (97). Innerhalb der Kommunikation zwischen ULBPs und NK-Zellen konnte gezeigt werden, dass ULBP2 die größte Bindungsaffinität gegenüber NKG2D besitzt. Kommt es durch ULBP zu einer Aktivierung von NKG2D, zieht das eine Vielzahl von Effekten wie z.B. eine vermehrte Oberflächenexpression aktivierender Markermoleküle, eine erhöhte zytotoxische

Aktivität und eine verbesserte Immunantwort gegenüber virusinfizierten Zellen und Tumorzellen nach sich (98) (Abbildung 29).

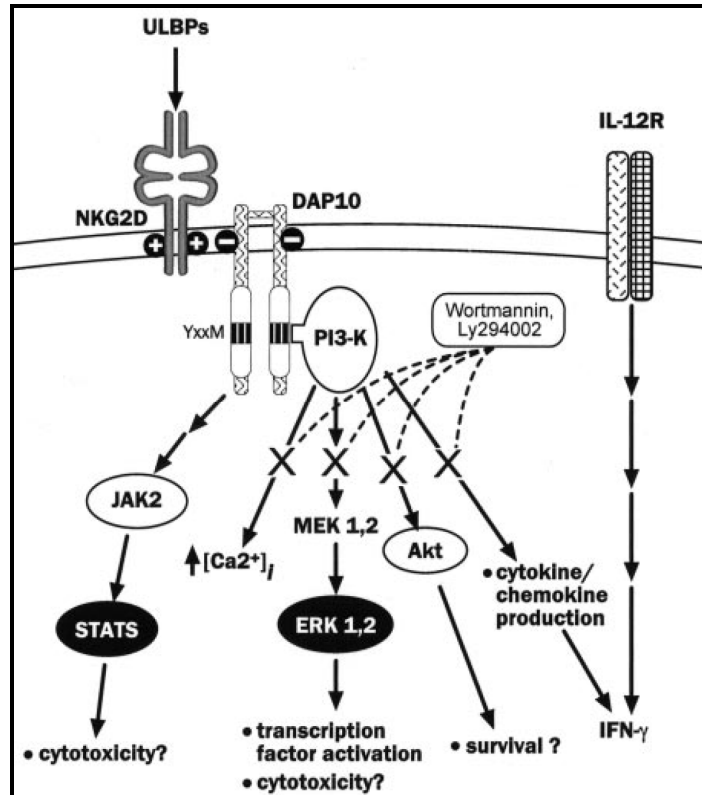


Abbildung 29: ULBP Signalweg

ULBPs binden an NKG2D/DAP10 und triggern unterschiedlichste Signaltransduktions-Kaskaden in Natürlichen Killerzellen. ULBP-NKG2D/DAP10-Interaktion führt zur Calcium-Freisetzung und damit zur Aktivierung der PI3-K/Akt, Mek/Erk und JAK2/STAT5 Signalwege. Kostimulation von NK-Zellen mit ULBPs und IL-12 führt zu verstärkter Zytokinproduktion. Alle nachgeschalteten PI3-K-Signalwege werden durch Wortmannin und Ly294002 abgeschwächt (modifiziert nach (99)).

Obwohl ULBPs in Tumoren im Vergleich zu gesunden Zellen normalerweise stark auf der Zelloberfläche exprimiert werden, findet sich in einigen Tumoren dennoch keine oder nur eine geringe ULBP-Oberflächenexpression.

Auch für verschiedene Kolonkarzinomzelllinien werden ULBPs heterogen auf der Oberfläche exprimiert (100). Fehlt einer Zelle ULBP auf der Oberfläche, wird

die Antwort des Immunsystems durch Natürliche Killerzellen abgeschwächt (101). Ebenso entfällt die Markierung der Tumorzelle für zytotoxische Lymphozyten (102;103). Es wird deutlich, dass die Oberflächenexpression der NKG2D-Liganden für eine komplexe Immunantwort auf den Tumor eine wichtige Voraussetzung ist. Im Falle der humanen Kolonkarzinomzelllinie HCT116 findet sich für die parentale Zelllinie keine ULBP2-Oberflächenexpression. Eine wichtige Ursache dafür ist höchstwahrscheinlich die in dieser Zelllinie konstitutiv aktive Ras-Raf-Mek-Erk Kaskade, die über DNA-Methyltransferasen zu einer Hypermethylierung des ULBP2-Promotors und damit zu einer gestörten Transkription führt.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die onkogene Signalübertragung in Kolonkarzinomzellen einen großen Einfluss auf immunmodulatorische Gene hat und nicht unerheblich zum Überleben des Tumors beiträgt. Zytotoxische T-Lymphozyten greifen vermehrt DNMT-defiziente Zellen an (104). Dieser Effekt lässt sich unter U0126-Behandlung verstärken.

Während die molekularen Schritte in dem gemeinsamen Zusammenspiel von MAPK-abhängiger Gensuppression und DNMT-abhängiger Genregulierung zukünftig weiterhin detailliert untersucht werden müssen, implizieren unsere Ergebnisse schon jetzt therapeutische Interventionsmöglichkeiten. Innerhalb klinischer Studien wurden bereits demethylierende Agenzien und Signalinhibitoren mit dem Ziel, die ungehemmte Proliferationstendenz von Tumorzellen zu stoppen, eingesetzt (105-108) Die kombinierte Behandlung mit solchen Wirkstoffen stört nicht nur den Aufbau einer genetischen Tumorsignatur, also eines genetischen Remodellings, ausgelöst durch Mutationen, sondern ermöglicht es ebenso, die Immunantwort auf den Tumor zu verstärken und die Tumorzellen aus eigener Kraft zu zerstören.

5 Zusammenfassung

Zentrale Fragestellung der Arbeit war es, eine mögliche funktionelle Verknüpfung zwischen dem Onkoprotein Ras und dem Prozess der DNA-Methylierung in der Suppression bestimmter für die Tumorabwehr wichtiger Gene experimentell zu unterstützen.

Eine Verminderung der MHC-I-Expression wurde bereits im Zusammenhang mit Ras beschrieben. Weitere wichtige Erkennungs-Moleküle für NK-Zellen und T-Zellen sind ULBPs, MHC-Klasse-I verwandte Liganden der Natürlichen Killerzellrezeptoren (NKG2D).

Die ULBP-Expression ist bis jetzt nur wenig verstanden. Gesundes Gewebe exprimiert kaum ULBPs, wohingegen krankes Gewebe als Stressantwort normalerweise eine deutliche Oberflächenanreicherung verschiedenster NKG2D-Liganden (MIC-A, MIC-B, ULBP1/2/3) zeigt. Im Hinblick auf Tumoren findet sich ein heterogenes Bild. Einige Tumore exprimieren wie vermeintlich gesundes Gewebe gar keine Liganden, andere sehr viele. Aufgrund der vielseitigen therapeutischen Ansatzmöglichkeiten, die sich aus der Aufklärung der Regulationsmechanismen der NKG2D-Liganden ergeben könnten, sind diese ubiquitärer Gegenstand der aktuellen tumorimmunologischen Forschung.

Um einen potentiellen Zusammenhang zwischen Ras, DNA-Methylierung und Gensuppression zu untersuchen, wurden Genexpressionsprofile für die humane Kolonkarzinom Zelllinie HCT116 erstellt. Unter den supprimierten Genen, die nach Inhibition der Ras-Raf-Mek-Erk-Kaskade wieder aufreguliert wurden, befanden sich HLA-A1/2 und ULBP2 und -3. In der vorliegenden Arbeit analysierten wir die Methylierungsmuster der Promotoren dieser Gene mittels Bisulfitesequenzierung in der parentalen HCT116 Zelllinie und in drei weiteren

von Rhee et al. generierten Knockout-Zelllinien: HCT116 DNMT1^{-/-}, DNMT3b^{-/-} und DKO. Der ULBP2-Promotor zeigte eine signifikante Hypermethylierung, die nach einer Behandlung mit dem Mek/Erk-Inhibitor U0126 nahezu vollständig aufgehoben werden konnte. Weiterhin konnten wir eine deutliche Hypomethylierung in den drei Knockout-Zelllinien DNMT1^{-/-}, DNMT3b^{-/-} und DKO zeigen. HLA-A1/2 waren nicht methyliert, jedoch ergaben Vorexperimente nach Mek/Erk-Inhibierung und Doppelknockout eine vermehrte Oberflächenexpression für beide Allele. Sowohl ULBP2, als auch HLA-A1/2 scheinen durch ein abgestimmtes Zusammenspiel zwischen onkogenem Ras und DNMTs direkt bzw. indirekt reguliert zu werden. Unsere Ergebnisse verknüpfen daher die DNMT-Aktivität mit dem K-Ras induzierten Mek/Erk-Signalweg auf der Ebene der Zielgene. Die Ras-vermittelte und DNMT-abhängige Suppression der Immunerkennung könnte zukünftig in der Behandlung von Tumoren mit Inhibitoren der Mek/Erk-Signalkaskade einen wichtigen Fortschritt in der Immuntherapie bedeuten.

Literaturverzeichnis

- (1) Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Kraywinkel K. Krebs in Deutschland 2005/2006 Häufigkeiten und Trends. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes 7, 19. 2010. Robert Koch Institut.
Ref Type: Magazine Article
- (2) Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol carcinogenesis* 1993;7(3):139-46.
- (3) Van SL. From epigenesis to epigenetics: the case of C. H. Waddington. *Ann N Y Acad Sci* 2002 December;981:61-81.
- (4) Neiberghs HL, Hein DW, Spratt JS. Genetic profiling of colon cancer. *Journal of Surgical Oncology* 2002;80:204-13.
- (5) Marshall MS. Ras target proteins in eukaryotic cells. *FASEB J* 1995 October;9(13):1311-8.
- (6) Malumbres M, Pellicer A. Ras pathways to cell cycle control and cell transformation. *Frontiers in Bioscience* 1998;3:887-912.
- (7) Alberts B. *Molecular Biology of the Cell*. 4 ed. 2002.
- (8) Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* 1999;68:913-63.
- (9) Polunovsky VA, Gingras AC, Sonenberg N, Peterson M, Tan A, Rubins JB et al. Translational control of the antiapoptotic function of Ras. *J Biol Chem* 2000 August 11;275(32):24776-80.
- (10) Nobes CD, Hall A. Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 1995 April 7;81(1):53-62.

- (11) Bos JL. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Canc Res* 1989;49:4682-9.
- (12) Sers C. Zielgene der RAS-Onkoprotein-abhängigen Signaltransduktion: Identifizierung und Charakterisierung von Klasse II Tumor-Suppressorgenen 2003.
- (13) Di Cristofano A, Pandolfi PP. The multiple roles of PTEN in tumor suppression. *Cell* 2000;100(4):387-90.
- (14) Karp JE, Broder S. Molecular foundations of cancer: New targets for intervention. *Nature Medicine* 1995;1:309-20.
- (15) Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Experimental Cell Research* 2001;264:29-41.
- (16) Stanbridge EJ. Human tumor suppressor genes. *Annual Review of Genetics* 1991;24:615-57.
- (17) Lee SW, Tomasetto C, Sager R. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 1991;88:2825-9.
- (18) Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-28.
- (19) Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nat Rev Cancer* 2004 February;4(2):143-53.
- (20) Mertens F, Johansson B, Hoglund M, Mitelman F. Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. *Cancer Res* 1997 July 1;57(13):2765-80.
- (21) Nguyen CT, Gonzales FA, Jones PA. Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Res* 2001 November 15;29(22):4598-606.
- (22) Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002 January;196(1):1-7.

- (23) Yokochi T, Robertson KD. Preferential methylation of unmethylated DNA by Mammalian de novo DNA methyltransferase Dnmt3a. *J Biol Chem* 2002 April 5;277(14):11735-45.
- (24) Egger G, Jeong S, Escobar SG, Cortez CC, Li TW, Saito Y et al. Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 September 19;103(38):14080-5.
- (25) Hermann A, Schmitt S, Jeltsch A. The human Dnmt2 has residual DNA-(cytosine-C5) methyltransferase activity. *J Biol Chem* 2003 August 22;278(34):31717-21.
- (26) Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999 October 29;99(3):247-57.
- (27) Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002 April 4;416(6880):552-6.
- (28) Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002 April 4;416(6880):552-6.
- (29) Di Croce L, Raker VA, Corsaro M, Fazi F, Fanelli M, Faretta M et al. Methyltransferase recruitment and DNA hypermethylation of target promoters by an oncogenic transcription factor. *Science* 2002;295:1079-82.
- (30) Brenner C, Deplus R, Didelot C, Loriot A, Vire E, De Smet C et al. Myc represses transcription through recruitment of DNA methyltransferase corepressor. *EMBO J* 24, 336-346. *EMBO J* 2005;24:336-46.
- (31) Nie Y, Yang G, Song Y, Zhao X, So C, Liao J et al. DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 2001 October;22(10):1615-23.
- (32) Lund P, Weisshaupt K, Mikeska T, Jammal D, Chen X, Kuban RJ et al. Oncogenic HRAS suppresses clusterin expression through promoter hypermethylation. *Oncogene* 2006 August 10;25(35):4890-903.

- (33) Atkins D, Breuckmann A, Schmahl GE, Binner P, Ferrone S, Krummenauer F et al. MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2004 March 20;109(2):265-73.
- (34) Sutherland CL, Rabinovich B, Chalupny NJ, Brawand P, Miller R, Cosman D. ULBPs, human ligands of the NKG2D receptor, stimulate tumor immunity; enhancement by IL-15. *Blood* 2006 April 18.
- (35) Fernandez-Messina L, Ashiru O, Boutet P, guera-Gonzalez S, Skepper JN, Reyburn HT et al. Differential mechanisms of shedding of the glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored NKG2D ligands. *J Biol Chem* 2010 March 19;285(12):8543-51.
- (36) Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunologie*. 5 ed. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag; 2002.
- (37) Wake CT. Molecular biology of the HLA class I and class II genes. *Mol Biol Med* 1986 February;3(1):1-11.
- (38) van den Elsen PJ, Holling TM, Kuipers HF, Van der SN. Transcriptional regulation of antigen presentation. *Curr Opin Immunol* 2004 February;16(1):67-75.
- (39) Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, Cosman D. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* 2002 January 15;168(2):671-9.
- (40) Vivier E, Tomasello E, Paul P. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr Opin Immunol* 2002 June;14(3):306-11.
- (41) Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003 October;3(10):781-90.
- (42) Zuber J, Tchernitsa OI, Hinzmann B, Schmitz AC, Grips M, Hellriegel M et al. A genome-wide survey of RAS transformation targets. *Nat Genet* 2000 February;24(2):144-52.
- (43) Lund P, Weisshaupt K, Mikeska T, Jammal D, Chen X, Kuban RJ et al. Oncogenic HRAS suppresses clusterin expression through promoter hypermethylation. *Oncogene* 2006 August 10;25(35):4890-903.

- (44) Beissbarth T, Speed TP. Gostat: find statistically overrepresented Gene Ontologies within a group of genes. *Bioinformatics* 2004 June 12;20(9):1464-5.
- (45) Sers C, Kuner R, Falk CS, Lund P, Sueltmann H, Braun M et al. Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2009 October 1;125(7):1626-39.
- (46) Tepass U. Adherens junctions: new insight into assembly, modulation and function. *Bioessays* 2002 August;24(8):690-5.
- (47) Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE et al. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002 April 4;416(6880):552-6.
- (48) Egger G, Jeong S, Escobar SG, Cortez CC, Li TW, Saito Y et al. Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 September 19;103(38):14080-5.
- (49) Duncia JV, Santella JB, III, Higley CA, Pitts WJ, Wityak J, Frieze WE et al. MEK inhibitors: the chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorg Med Chem Lett* 1998 October 20;8(20):2839-44.
- (50) Carvalho L, Foulkes K, Mickey DD. Effect of DMSO and DFMO on rat prostate tumor growth. *Prostate* 1989;15(2):123-33.
- (51) Frommer M, McDonald LE, Millar DS, Collis CM, Watt F, Grigg GW et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992 March 1;89(5):1827-31.
- (52) Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. *Nucleic Acids Res* 1994 August 11;22(15):2990-7.
- (53) Warnecke PM, Stirzaker C, Song J, Grunau C, Melki JR, Clark SJ. Identification and resolution of artifacts in bisulfite sequencing. *Methods* 2002 June;27(2):101-7.

- (54) Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res* 1996 December 15;24(24):5064-6.
- (55) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 December;74(12):5463-7.
- (56) Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977 December;74(12):5350-4.
- (57) Feinberg AP, Vogelstein B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 1983 July 1;132(1):6-13.
- (58) Glick BR, Pasternak JJ. *Molekulare Biotechnologie*. 1 ed. Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum, Akad. Verl.; 1995.
- (59) Bortz J. *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2005.
- (60) Sers C, Kuner R, Falk CS, Lund P, Sueltmann H, Braun M et al. Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2009 October 1;125(7):1626-39.
- (61) Sers C, Kuner R, Falk CS, Lund P, Sueltmann H, Braun M et al. Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2009 October 1;125(7):1626-39.
- (62) Sers C, Kuner R, Falk CS, Lund P, Sueltmann H, Braun M et al. Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2009 October 1;125(7):1626-39.
- (63) Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 April 24;98(9):5116-21.

- (64) Sers C, Kuner R, Falk CS, Lund P, Sueltmann H, Braun M et al. Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2009 October 1;125(7):1626-39.
- (65) Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990 June 1;61(5):759-67.
- (66) Downward J. G proteins, Ras and cancer. In: Yarnold JR, Stratton M, McMillan TJ, editors. *Molecular biology for oncologists*. 2 ed. Cambridge: Chapman & Hall; 1996. p. 63-74.
- (67) Jiang Y, Kimchi ET, Staveley-O'Carroll KF, Cheng H, Ajani JA. Assessment of K-ras mutation: a step toward personalized medicine for patients with colorectal cancer. *Cancer* 2009 August 15;115(16):3609-17.
- (68) Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001 April 15;61(8):3225-9.
- (69) Lund P, Weisshaupt K, Mikeska T, Jammias D, Chen X, Kuban RJ et al. Oncogenic HRAS suppresses clusterin expression through promoter hypermethylation. *Oncogene* 2006 August 10;25(35):4890-903.
- (70) Lund P, Weisshaupt K, Mikeska T, Jammias D, Chen X, Kuban RJ et al. Oncogenic HRAS suppresses clusterin expression through promoter hypermethylation. *Oncogene* 2006 August 10;25(35):4890-903.
- (71) Rouleau J, MacLeod AR, Szyf M. Regulation of the DNA methyltransferase by the Ras-AP-1 signaling pathway. *J Biol Chem* 1995 January 27;270(4):1595-601.
- (72) MacLeod AR, Rouleau J, Szyf M. Regulation of DNA methylation by the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 1995 May 12;270(19):11327-37.
- (73) Peli J, Schroter M, Rudaz C, Hahne M, Meyer C, Reichmann E et al. Oncogenic Ras inhibits Fas ligand-mediated apoptosis by downregulating the expression of Fas. *EMBO J* 1999 April 1;18(7):1824-31.
- (74) Pruitt K, Ulku AS, Frantz K, Rojas RJ, Muniz-Medina VM, Rangnekar VM et al. Ras-mediated loss of the pro-apoptotic response protein Par-4 is mediated by DNA hypermethylation through Raf-independent and

- Raf-dependent signaling cascades in epithelial cells. *J Biol Chem* 2005 June 17;280(24):23363-70.
- (75) Akino K, Toyota M, Suzuki H, Mita H, Sasaki Y, Ohe-Toyota M et al. The Ras effector RASSF2 is a novel tumor-suppressor gene in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005 July;129(1):156-69.
- (76) Akino K, Toyota M, Suzuki H, Mita H, Sasaki Y, Ohe-Toyota M et al. The Ras effector RASSF2 is a novel tumor-suppressor gene in human colorectal cancer. *Gastroenterology* 2005 July;129(1):156-69.
- (77) Ye Q, Shen Y, Wang X, Yang J, Miao F, Shen C et al. Hypermethylation of HLA class I gene is associated with HLA class I down-regulation in human gastric cancer. *Tissue Antigens* 2009 October 30.
- (78) Nie Y, Yang G, Song Y, Zhao X, So C, Liao J et al. DNA hypermethylation is a mechanism for loss of expression of the HLA class I genes in human esophageal squamous cell carcinomas. *Carcinogenesis* 2001 October;22(10):1615-23.
- (79) Sers C, Kuner R, Falk CS, Lund P, Sueltmann H, Braun M et al. Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2009 October 1;125(7):1626-39.
- (80) Atkins D, Breuckmann A, Schmahl GE, Binner P, Ferrone S, Krummenauer F et al. MHC class I antigen processing pathway defects, ras mutations and disease stage in colorectal carcinoma. *Int J Cancer* 2004 March 20;109(2):265-73.
- (81) Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 April 24;98(9):5116-21.
- (82) Molinero LL, Fuertes MB, Girart MV, Fainboim L, Rabinovich GA, Costas MA et al. NF-kappa B regulates expression of the MHC class I-related chain A gene in activated T lymphocytes. *J Immunol* 2004 November 1;173(9):5583-90.
- (83) Eagle RA, Traherne JA, Ashiru O, Wills MR, Trowsdale J. Regulation of NKG2D ligand gene expression. *Hum Immunol* 2006 March;67(3):159-69.

- (84) Eagle RA, Traherne JA, Ashiru O, Wills MR, Trowsdale J. Regulation of NKG2D ligand gene expression. *Hum Immunol* 2006 March;67(3):159-69.
- (85) Lopez-Soto A, Quinones-Lombrana A, Lopez-Arbesu R, Lopez-Larrea C, Gonzalez S. Transcriptional regulation of ULBP1, a human ligand of the NKG2D receptor. *J Biol Chem* 2006 October 13;281(41):30419-30.
- (86) Eagle RA, Traherne JA, Ashiru O, Wills MR, Trowsdale J. Regulation of NKG2D ligand gene expression. *Hum Immunol* 2006 March;67(3):159-69.
- (87) Cosman D, Mullberg J, Sutherland CL, Chin W, Armitage R, Fanslow W et al. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity* 2001 February;14(2):123-33.
- (88) Pende D, Rivera P, Marcenaro S, Chang CC, Biassoni R, Conte R et al. Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* 2002 November 1;62(21):6178-86.
- (89) Egger G, Jeong S, Escobar SG, Cortez CC, Li TW, Saito Y et al. Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 September 19;103(38):14080-5.
- (90) Spada F, Haemmer A, Kuch D, Rothbauer U, Schermelleh L, Kremmer E et al. DNMT1 but not its interaction with the replication machinery is required for maintenance of DNA methylation in human cells. *J Cell Biol* 2007 February 26;176(5):565-71.
- (91) MacLeod AR, Rouleau J, Szyf M. Regulation of DNA methylation by the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 1995 May 12;270(19):11327-37.
- (92) Lu R, Wang X, Chen ZF, Sun DF, Tian XQ, Fang JY. Inhibition of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway decreases DNA methylation in colon cancer cells. *J Biol Chem* 2007 April 20;282(16):12249-59.
- (93) Harrison J, Stirzaker C, Clark SJ. Cytosines adjacent to methylated CpG sites can be partially resistant to conversion in genomic bisulfite

- sequencing leading to methylation artifacts. *Anal Biochem* 1998 November 1;264(1):129-32.
- (94) Klein PJ, Schmidt CM, Wiesenauer CA, Choi JN, Gage EA, Yip-Schneider MT et al. The effects of a novel MEK inhibitor PD184161 on MEK-ERK signaling and growth in human liver cancer. *Neoplasia* 2006 January;8(1):1-8.
- (95) Kholod N, Boniver J, Delvenne P. A new dimethyl sulfoxide-based method for gene promoter methylation detection. *J Mol Diagn* 2007 November;9(5):574-81.
- (96) Sutherland CL, Rabinovich B, Chalupny NJ, Brawand P, Miller R, Cosman D. ULBPs, human ligands of the NKG2D receptor, stimulate tumor immunity; enhancement by IL-15. *Blood* 2006 April 18.
- (97) Sutherland CL, Rabinovich B, Chalupny NJ, Brawand P, Miller R, Cosman D. ULBPs, human ligands of the NKG2D receptor, stimulate tumor immunity; enhancement by IL-15. *Blood* 2006 April 18.
- (98) Kubin M, Cassiano L, Chalupny J, Chin W, Cosman D, Fanslow W et al. ULBP1, 2, 3: novel MHC class I-related molecules that bind to human cytomegalovirus glycoprotein UL16, activate NK cells. *Eur J Immunol* 2001 May;31(5):1428-37.
- (99) Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, Cosman D. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* 2002 January 15;168(2):671-9.
- (100) Maccalli C, Pende D, Castelli C, Mingari MC, Robbins PF, Parmiani G. NKG2D engagement of colorectal cancer-specific T cells strengthens TCR-mediated antigen stimulation and elicits TCR independent anti-tumor activity. *Eur J Immunol* 2003 July;33(7):2033-43.
- (101) Sutherland CL, Chalupny NJ, Schooley K, VandenBos T, Kubin M, Cosman D. UL16-binding proteins, novel MHC class I-related proteins, bind to NKG2D and activate multiple signaling pathways in primary NK cells. *J Immunol* 2002 January 15;168(2):671-9.
- (102) Vivier E, Tomasello E, Paul P. Lymphocyte activation via NKG2D: towards a new paradigm in immune recognition? *Curr Opin Immunol* 2002 June;14(3):306-11.

- (103) Raulet DH. Roles of the NKG2D immunoreceptor and its ligands. *Nat Rev Immunol* 2003 October;3(10):781-90.
- (104) Sers C, Kuner R, Falk CS, Lund P, Sueltmann H, Braun M et al. Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells. *Int J Cancer* 2009 October 1;125(7):1626-39.
- (105) Cohen G, Mustafi R, Chumsangsri A, Little N, Nathanson J, Cerda S et al. Epidermal growth factor receptor signaling is up-regulated in human colonic aberrant crypt foci. *Cancer Res* 2006 June 1;66(11):5656-64.
- (106) Esteller M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. *Curr Opin Oncol* 2005 January;17(1):55-60.
- (107) Villar-Garea A, Esteller M. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer* 2004 November 1;112(2):171-8.
- (108) Brueckner B, Lyko F. DNA methyltransferase inhibitors: old and new drugs for an epigenetic cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 2004 November;25(11):551-4.

Curriculum Vitae

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Publikationen

Sers C, Kuner R, Falk CS, Lund P, Sueltmann H, Braun M, Bunes A, Ruschhaupt M, **Conrad J**, Mang-Fatehi S, Stelnic I, Krapfenbauer, U., Poustka A, Schäfer R.: Down-regulation of HLA Class I and NKG2D ligands through a concerted action of MAPK and DNA methyltransferases in colorectal cancer cells, *International Journal of Cancer*, 2009 Oct 1; 125(7):1626-39

Selbständigkeitserklärung

Ich, Janine Conrad, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Methylierungsanalyse der Gene HLA-A, ULBP2 und ULBP3 in humanen Kolonkarzinomzellen“

selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Ort, Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich danke meiner Mutter, die mir das Interesse für die Naturwissenschaften vererbt und mich im Geiste immer motivierend vorangetrieben hat.

Ich danke meiner Doktor-Mutter, Christine Sers, für all die konstruktiven Gespräche und die endlos geduldige Betreuung. Ich danke Cornelia Gieseler, die mir alles beigebracht hat, was für die Entstehung dieser Arbeit nötig war und ohne die ich definitiv sang- und klanglos im Laboralltag untergegangen wäre. Weiterhin danke ich Nadine Schmidt für ihre äußerst hilfreiche Unterstützung bei der praktischen Arbeit.

Ich danke meinem Vater, der selbstverständlich immer für mich da war und es dabei kontinuierlich verstand, meine Doktorarbeit voranzutreiben, indem er mir unermüdlich vom produktiven großen Bruder berichtete. Eben diesem danke ich auch: meinem Bruder, Nico, ohne den ich mich niemals erfolgreich durch den Statistik-Dschungel gekämpft hätte und der mir mit „eingereicht“ SMS in den unverhofftesten Momenten einen Stich ins „Doktorherz“ versetzt hat. Ich danke meinen Großeltern für ihre liebevolle und tatkräftige Unterstützung.

Ich danke meinem Mitbewohner und besten Freund, Markus, der es in jedem Winkel unserer Wohnung und unseres Lebens auf seine ganz eigene Art und Weise verstanden hat, mich zu motivieren. Ich danke meinen Freunden Katha und Gesa für ihre Nachsichtigkeit mit einem medizinischen Doktoranden und der großen Hilfe bei der fachlich korrekten Erläuterung der Methoden. Ich danke Claudia, einfach dafür, dass sie ein mich immer wieder inspirierender Teil meines Lebens ist.

Ich danke Timo, der einen Großteil an meiner Seite mit mir und auch für mich durchgestanden hat.

Dank an meinen Waschbären, der definitiv nicht unerwähnt bleiben darf.