

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

DISSERTATION

Regulation von Ras-Zielgenen durch DNA-Methylierung und  
Histon-modifizierende Mechanismen

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Karen Roselind Weißhaupt

aus Eberswalde

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Christine Sers  
2. Prof. Dr. med. Wolfgang Dubiel  
3. Prof. Dr. rer. nat. Jörn Walter

Datum der Promotion: 16.05.2010

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Ras-Onkogene	2
1.2	Signalweiterleitung durch Ras	3
1.3	DNA-Methylierung	5
1.4	DNA-Methylierung und Neoplasien	6
1.5	Ras und Methylierung	7
1.6	Acetylierung	8
1.7	Methylierung und Acetylierung	8
2	Ziele der Arbeit	10
3	Material und Methoden	11
3.1	Allgemein	11
3.2	Zellmodell	11
3.3	Zellkultur	12
3.4	Inhibitoren	14
3.5	Zellzahlbestimmung	16
3.6	Northern Blot	17
3.7	Sequenzierung	21
3.8	Western Blot	22
3.9	RNAi	26
3.10	Densitometrische Auswertung	28
4	Ergebnisse	29
4.1	Zielgene	29
4.2	Versuchsanordnung	31
4.3	Ras-induzierte Änderung der Zellmorphologie	34
4.4	Zelldichteveränderungen	35
4.5	Analyse der Genexpression in 208F und FE-8 Zellen	35
5	Diskussion	71
5.1	Kritische Betrachtung der Methoden	72
5.2	Genexpressionsänderungen in 208F und FE-8 Zellen	76
6	Ausblick oder Krebs ist nicht irreversibel [Sager, 1997]	88
7	Zusammenfassung	90

## Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Western Blot-Analyse von p44 <sup>MAPK</sup> -pERK1 und p42 <sup>MAPK</sup> -pERK2 in FE-8 und 208F Zellen nach Behandlung mit PD98059 und U0126	33
Abbildung 2: Western Blot-Analyse von p21 <sup>RAS</sup> und pERK1/2 in den IR-4 Zellen	33
Abbildung 3: (A) 208F, unbehandelt, 48 h; (B) FE-8, unbehandelt, 24 h; (C) FE-8, U0126, 24 h; (D) FE-8, U0126, 48 h; (E) FE-8, 5-Aza-CdR, 36 h	34
Abbildung 4: Zelldichteveränderungen in FE-8 und 208F Zellen	35
Abbildung 5: Clusterin; (A-F) Northern Blots, (G-N) Auswertungsdiagramme	37-39
Abbildung 6: Lysyl oxidase; (A-D) Northern Blots, (G-L) Auswertungsdiagramme	41-43
Abbildung 7: Lysyl oxidase-like 2 (A-D) Northern Blots, (G-L) Auswertungsdiagramme	45-48
Abbildung 8: Matrix Metalloproteinase 2 (A-F) Northern Blots, (G-N) Auswertungsdiagramme	50-52
Abbildung 9: Thrombospondin 1 (A-E) Northern Blots, (G-N) Auswertungsdiagramme	55-57
Abbildung 10: Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (A-E) Northern Blots, (G-M) Auswertungsdiagramme	59-62
Abbildung 11: Follistatin-like 1 (A-D) Northern Blots, (G-L) Auswertungsdiagramme	64-66
Abbildung 12: Lectin, galactoside-binding, soluble 3 binding protein; (A-E) Northern Blots, (G-N) Auswertungsdiagramme	68-70
Tabelle 1: Übersicht über die Zielgene	30
Tabelle 2: Behandlungsschema zum Übersichtsversuch	31
Tabelle 3: Behandlungsschema der Zellen für die Zeitkinetiken	32

meinen Eltern gewidmet

## **1 Einleitung**

Tumorgenese ist ein mehrstufiger Prozess. Störungen in natürlichen Regelkreisen führen zu Unabhängigkeit von Wachstumssignalen, Zellzyklusaktivierung und Hemmung von Apoptose; Transformation von der normalen zur Tumorzelle ist die Folge. Bei Fortschreiten der Tumorentwicklung werden Angiogenese, Gewebeinvasion und Metastasierung initiiert [Hanahan and Weinberg, 2000].

Im Rahmen dieser Prozesse werden Onkogene und Tumorsuppressorgene (genetisch) verändert. Die Aktivierung von Proto-Onkogenen zu Onkogenen führt zu einem Gewinn an Funktion. Die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen hingegen resultiert in Funktionsverlusten. Basierend auf den Mechanismen von Aktivierung und Inaktivierung können die Tumorgene in zwei Klassen eingeteilt werden [Sager, 1997]. Klasse I-Gene zeigen irreversible Veränderungen auf DNA-Niveau im Sinne von Mutationen oder Amplifikation; Klasse II-Gene sind durch Störungen auf regulativer Ebene gekennzeichnet, die aktivierende oder reprimierende Expressionsänderungen zur Folge haben. Bekannte Mechanismen zur Geninaktivierung sind epigenetische Veränderungen der DNA und der Histone wie z. B. DNA- und Histonmethylierung oder Histondeacetylierung. Diese Modifikationen sind prinzipiell reversibel.

Die Identifizierung von Tumorgenen, welche nicht klassisch durch Mutationen verändert sind, ist mit Hilfe von Genexpressionsprofilen möglich. Die Charakterisierung dieser Gene und die Identifizierung ihrer Funktionen sollen das Verstehen der Krebsentstehung durch Genveränderung ermöglichen, um im Weiteren neue therapeutische Möglichkeiten zu eröffnen.

## 1.1 Ras-Onkogene

In Säugetierorganismen werden *Ras*-Gene in allen Zelltypen und Organen exprimiert [Leon et al., 1987]. Die humanen Formen *Hras* (*Harvey-Ras*), *Kras* (*Kirsten-Ras*) und *Nras* (*Neuroblastoma-Ras*) sind als Proto-Onkogene von Bedeutung, welche in 30 % der humanen Tumoren als Onkogene aktiviert vorliegen und vor allem für Malignome von Kolon, Pankreas, Schilddrüse, Lunge und des myelopoetischen Systems bedeutend sind. Während sich die Gene stark in der Größe und Sequenz ihrer Introns unterscheiden, sind die 21 kDa großen Proteine p21<sup>RAS</sup> im aminoterminalen Bereich über 85 Aminosäuren identisch und weisen nur am C-terminalen Ende Unterschiede auf [Brandt-Rauf et al., 1988]. Die intrazellulär membranassoziiert gelegenen p21<sup>RAS</sup>-Proteine besitzen Bindungsstellen für Guaninnukleotide. Durch den Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF, guanine nucleotide exchange factor) wird die Bindung des aktivierenden GTP zum p21<sup>RAS</sup>-GTP gefördert. Die Inaktivierung vermittelt eine langsame, Ras-intrinsische GTPase-Aktivität, verstärkt durch GTPase-aktivierende Proteine (GAP, GTPase activating protein), durch hydrolytische Abspaltung eines Phosphats zum p21<sup>RAS</sup>-GDP [Bollag and McCormick, 1991; Boguski and McCormick, 1993]. In ruhenden Zellen liegen 99 % der Ras-Proteine in der inaktiven, GDP-gebundenen Form vor [Malumbres and Pellicer, 1998].

Die Aktivierung des *Ras*-Proto-Onkogens zum Onkogen erfolgt durch eine einzelne Punktmutation, zumeist an den Codons 12, 13, 61, 59. Die betreffenden Genabschnitte kodieren Teile der GAP-bindenden Domäne des p21<sup>RAS</sup>-Proteins. Die Mutationen gehen mit einer reduzierten Bindungsfähigkeit von GAP an p21<sup>RAS</sup> einher, welches die Inaktivierung von GTP-p21<sup>RAS</sup> zu GDP-p21<sup>RAS</sup> beeinträchtigt und in einer permanenten Signalweiterleitung resultiert. Punktmutationen der Codons 116, 117, 119, 146 haben eine gesteigerte Austauschrate der Guaninnukleotide mit erhöhtem p21<sup>RAS</sup>-GTP zur Folge. Ein mutationsunabhängiger Mechanismus der Ras-Aktivierung ist die Insertion retroviralen Materials mit gesteigerter transkriptioneller Aktivierung [Barbacid, 1987; Malumbres and Pellicer, 1998]. *Ras*-Gene zeigen große Homologien unter den Wirbeltieren und einen hohen Grad an speziesübergreifender, evolutionärer Konservierung. So sind für *Hras* die Sequenzen von Mensch und Maus sogar identisch, und Ras-Proteine von Hefezellen können Transformation von Säugetierzellen bewirken [DeFeo-Jones et al., 1985; Kataoka et al., 1985]. Expressionsunterschiede jedes *Ras*-Gens zwischen der embryonalen Entwicklung und einem differenzierten Gewebe lassen

auf eine Funktions- und Gewebespezifität schließen, die auch in Malignomen beobachtet werden kann. Während *Kras*-Mutationen präferentiell in Pankreaskarzinomen, Cholangiokarzinomen, kolorektalen Karzinomen und Bronchialkarzinomen auftreten, sind *Hras*-Mutationen vor allem in Blasen- und Nierenzellkarzinomen sowie in Plattenepithelkarzinomen von Kopf, Hals und Haut zu finden. *Nras*-Mutationen zeigen einen Schwerpunkt bei akuten myeloischen Leukämien und beim myelodysplastischen Syndrom [Bos, 1989; Rodenhuis, 1992]. In einer Anzahl weiterer Tumoren, wie Mamma- und Prostatakarzinom, können hingegen kaum *Ras*-Mutationen nachgewiesen werden. *Ras*-Mutationen sind bereits in prämaligen Veränderungen nachweisbar, so dass sie als ein sehr frühes Ereignis in der Tumorgenese vermutet werden bzw. sogar die Tumorentstehung initiieren [Kranenburg et al., 2004].

## 1.2 Signalweiterleitung durch Ras

Ras-Proteine vermitteln an der inneren zytoplasmatischen Membran in einer sehr zentralen Position Signalübertragung und stimulieren eine Vielzahl verschiedener Signalwege [Campbell et al., 1998]. Ausgehend von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Hormonen und Neurotransmittern, die an Tyrosinkinase-Rezeptoren (z.B. PDGF, EGF), Zytokin-Rezeptoren (z.B. IL-2-Rezeptor), T-Zell-Rezeptoren und G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden, werden extrazelluläre Informationen über Ras an intrazelluläre Signalkaskaden weitergeleitet [Malumbres and Pellicer, 1998]. Dies betrifft vor allem Stimuli mit mitogener und zelldifferenzierender Wirkung, aber auch apoptotische Signale. Die Konformationsänderung von GDP-p21<sup>RAS</sup> zum aktiven GTP-p21<sup>RAS</sup> führt zur Freilegung von Effektorbindungsstellen. Zu den wichtigsten Ras-Effektoren gehören Raf-Proteine, PI3K, Mitglieder der RalGDS-Familie (Guaninnukleotid-Austauschfaktoren), GAP, MEKK1 und PKC-ζ.

### 1.2.1 Raf/MEK/ERK

Der in Säugetierzellen zuerst identifizierte und bisher am besten untersuchte Ras-Effektor ist die Serin-/Threoninkinase Raf1. Aktiviertes Ras bindet zytoplasmatisches Raf1 und transloziert es an die Plasmamembran, wo es durch einen Ras-unabhängigen Mechanismus aktiviert wird [Stokoe et al., 1994]. Aktiviertes Raf phosphoryliert zwei weitere Kinasen, MEK1 und MEK2 (MAP-kinase extracellular signal-regulated kinase, auch MAPKK), welche wiederum aktivierend auf die MAP-Kinasen ERK1 und ERK2 (extracellular signal-regulated kinase) wirken [Mansour et al., 1994]. ERK sind eine Vielzahl von Signalmolekülen nachgeschaltet. Die Phosphorylierung von ERK bewirkt deren Homodimerisation und Translokation in den Zellkern [Khokhlatchev et al., 1998] sowie eine direkte Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie Elk-1, Ets-2, SRF, CEBP und SMAD. Die Raf/MEK/ERK-Signalkaskade ist dadurch in ein breites Spektrum Ras-abhängiger Zellprozesse eingebunden, allen voran Zellzyklusprogression und Proliferation [Yang et al., 2003].

### 1.2.2 PI3K

Ein weiterer wichtiger Ras-Effektor ist die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K), welche Ras-GTP über die Bindung seiner katalytischen Untereinheiten p110 $\alpha$  und  $\beta$  aktiviert. Die Phosphatidylinositol-3-Kinase selbst katalysiert die Phosphorylierung von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>) zu Phosphatidylinositol-(3,4,5)-triphosphat (PI(3,4,5)P<sub>3</sub>) als Antwort auf Wachstumsfaktor- und Zytokinstimulation. PI(4,5)P<sub>2</sub> und PI(3,4,5)P<sub>3</sub> sind second-messenger in Prozessen wie Zellwachstum, Zellüberleben und Stoffwechselprozessen, die direkt an PH (pleckstrin homology)-Domänen von Signalmolekülen und Enzymen binden. Beispielsweise steuert PI(3,4,5)P<sub>3</sub> direkt die Proteinkinase B/AKT und die p70-S6-Kinase [Downward, 1998].

### 1.3 DNA-Methylierung

Das Chromatin von Säugetierzellen weist als eine natürliche Modifikation die Methylierung von Cytosin in CpG-Di-Nukleotiden auf. Regionen mit niedriger CpG-Dichte sind häufig methyliert, wohingegen CpG-Inseln, die sich durch eine hohe CpG-Dichte auszeichnen, typischerweise nicht methyliert sind. Sind Cytosine innerhalb von CpG-Inseln im Bereich von Promotoren dicht methyliert, ist eine starke und vererbare transkriptionellen Stilllegung dieser Gene die Folge. Diese Stilllegung ist im Zuge des genomischen Imprinting [Rainier and Feinberg, 1994] und der X-chromosomalen Inaktivierung [Mohandas et al., 1981] bereits länger bekannt.

Mechanistisch umfasst die Methylierung verschiedene funktionelle Einheiten: DNA-Methyltransferasen, Methylierungs-Schutz-Zentren, Methylcytosin bindende Proteine, demethylierende Mechanismen. DNA-Methyltransferasen (DNMT1, DNMT2, DNMT3a, DNMT3b) sind Enzyme, die CH<sub>3</sub>-Gruppen von S-Adenosyl-Methionin an die 5'-Position von Cytosin übertragen [Robertson and Wolffe, 2000]. Die DNA-Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b sind die Methyltransferasen der *De-novo*-Methylierung und legen die Methylierungsmuster des Genoms in der Embryonalperiode fest [Okano et al., 1999]. DNMT1 hat eine hohe Affinität zu hemimethylierter DNA und ist daher primär für die Aufrechterhaltung von Methylierungsmustern während der Replikation verantwortlich. Eine homozygote Deletion der DNA-Methyltransferase in Mäusen ist für den Embryo letal [Li et al., 1992], obwohl noch die pluripotenten embryonalen Stammzellen ohne dieses Enzym lebensfähig sind [Lei et al., 1996]. Das bedeutet, dass entweder die Anwesenheit des Enzyms selbst oder aber der Vorgang der Methylierung für die Entwicklung essentiell ist. Die O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT) ist ein Reparaturprotein, das die O<sup>6</sup>-Position des Guanins von mutagenen und zytotoxischen Anhängen bereinigt. Bei ausbleibender Korrektur komplementiert die DNA-Polymerase O<sup>6</sup>-Methylguanin mit Thymin, so dass daraus eine Konversion des Basenpaares G-C zu A-T resultiert [Pegg et al., 1995]. Die Methylierung von CpG-Inseln wird in der Regel durch Methylierungs-Schutz-Zentren verhindert. Als molekulare Mechanismen für die Methylierung von CpG-Inseln werden eine dauerhaft erhöhte DNMT-Aktivität, ein Verlust regionaler Demethylierungsaktivität und der Verlust von lokalen Bindungsproteinen, so genannten Insulatoren, postuliert [Baylin et al., 1998]. Proteine wie MeCP2 (Methyl-CpG-binding protein 2), MBD1, MBD2 und MBD3 (Methyl-CpG-binding domain protein 1,2,3) können an methylierte CpG-Inseln in

Promotorregionen binden, was bei gleichzeitiger Änderung der Chromatinstruktur die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren verhindert und eine transkriptionelle Inaktivierung vermittelt. Für den Vorgang der Demethylierung sind verschiedene Mechanismen verantwortlich. Als ein Enzym der direkten Demethylierung wird MBD2 postuliert, wobei für den vorausgesagten Mechanismus ein Kofaktor notwendig ist, der bisher nicht identifiziert werden konnte. Die Exzision eines Cytosins (der Base oder des Nukleotids) führt indirekt zur Demethylierung, die Inhibition der DNA-Methyltransferasen hat eine artifizielle Demethylierung zur Folge [Patra et al., 2008].

#### **1.4 DNA-Methylierung und Neoplasien**

Neben einer absoluten Abnahme von DNA-Methylierung zeigen Tumorzellen im Bereich von spezifischen CpG-Inseln gleichzeitig einen Gewinn an Methylierung und eine erhöhte Aktivität der DNA-Methyltransferase [Baylin et al., 1998].

Die globale Hypomethylierung kann bereits mit dem Beginn der Tumorgenese einsetzen bzw. ist sogar Voraussetzung für die Tumorentstehung; beispielsweise ist in Adenomen des Kolons ein ähnlich verminderter Methylierungsgrad wie in Kolonkarzinomen zu beobachten [Goelz et al., 1985]. Regionale Hypermethylierung findet sich vor allem in regulär unmethylierten CpG-Inseln in Promotorregionen von Genen, tritt gleichzeitig mit Chromatinkondensation auf und korreliert mit zunehmender Repression dieser Gene. Durch Demethylierung ist eine (teilweise) Reaktivierung der Gene möglich. Änderung der Methylierungsmuster von Genen in einer anderen als der Promotorregion hat kaum Expressionsänderungen zur Folge [Baylin et al., 1998]. Die Hypermethylierung in Tumorzellen ist als ein fortschreitender Prozess zu verstehen und unterscheidet sich damit vom eher akuten Ereignis der Mutation kodierender Regionen mit gleichfalls folgender Inaktivierung dieser Gene. Promotorhypermethylierung betrifft Gene unterschiedlichster funktioneller Gruppen: Zellzyklusregulatoren (Rb, p16<sup>INK4A</sup>), DNA-Reparatur-Gene (BRCA1, hMLH1), Apoptose-induzierende Gene (DAPK, TMS1), Hormonrezeptoren (ER, PR). Der Selektionsvorteil der Zellen durch den Verlust der Genexpression entspricht dem durch klassische Mutation. Art und Funktion der jeweiligen Zelle determinieren den spezifischen Selektionsvorteil und damit möglicherweise das geeignete, durch Hypermethylierung zu inaktivierende Tumorsuppressorgen [Esteller, 2002]. So findet sich Promotorhypermethylierung von BRCA1 nur in Tumoren von Mamma und Ovar, von hMLH1 in malignen Neoplasien von

Kolon, Magen und Endometrium. Normalerweise werden unmethylierte CpG-Inseln durch Methylierungs-Schutz-Zentren geschützt; in neoplastischen Zellen sind diese Mechanismen offenbar gestört [Baylin et al., 1998]. Die Bedeutung der Methylierungsveränderungen in der Tumorgenese betrifft aber nicht nur Expressionsänderungen von Genen, sondern auch Störungen der strukturellen Integrität des Genoms mit Auswirkungen beispielsweise auf die Ploidität. Eine Änderung der Methylierungsmuster und chromosomale Instabilität tragen damit zur Tumorgenese bei [Gaudet et al., 2003].

### 1.5 Ras und Methylierung

Bereits 1995 konnten MacLeod et al. eine Verknüpfung zwischen dem Ras-Signalweg und DNA-Methylierung herausarbeiten. Die Maus-Nebennierenrinden-Tumorzelllinie Y1 zeichnet sich durch amplifiziertes *Kras* und stabile Methylierungsmuster aus. Die Expression eines GTPase aktivierenden Proteins (GAP), das bekanntermaßen die Ras-Aktivität hemmt, führte zu einer Reversion des malignen Transformationsstatus der Zellen und zu einer Reduktion der DNA-Methylierung. Des Weiteren konnte in diesen und in Zellen mit durch Mutation inaktiviertem Jun eine Reduktion der DNMT1-Aktivität und des *DNMT1*-mRNA-Niveaus nachgewiesen werden. Transfektion der GAP-transformierten Zellen mit onkogenem *Hras* resultierte wiederum in einem transformierten Phänotyp, einem Wiederanstieg der DNMT-Aktivität und in DNA-Methylierung [MacLeod et al., 1995].

Die DNA-Methyltransferase trägt in ihrer 5'-Region eine Anzahl Bindungsstellen für den Transkriptionsfaktorkomplex AP-1, ein Transkriptionsfaktor aus Jun/Jun-Homodimeren oder Jun/Fos-Heterodimeren und ein bekanntes Zielgen des Ras-Signalwegs. In stabil mit *Ras* transfizierten Zellen ist AP-1 für die Induktion der Promotoraktivierung von *DNMT1* verantwortlich [Rouleau et al., 1995].

Eine weitere Verknüpfung zwischen Methylierung und Ras ergibt sich über das DNA-Reparaturenzym O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). Die Hypermethylierung von CpG-Inseln im *MGMT*-Promotor geht mit Inaktivierung der *MGMT* in vielen Tumoren einher. Es resultieren Punktmutationen, die auch tumorassoziierte Gene wie das Tumorsuppressorgen *p53* und das *Ras*-Onkogen betreffen. 71 % aller kolorektalen Tumoren mit einer Guanin-Adenin-Mutation im *Kras*-Onkogen weisen einen Mangel an MGMT auf, welcher auf Promotorhypermethylierung

von *MGMT* zurückgeführt werden kann. Ein Verlust des DNA-Reparaturenzyms O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase ist bereits in kolorektalen Adenomen zu beobachten, welche noch keine *Ras*-Mutationen aufweisen. Möglicherweise kann also ein zunehmender Funktionsverlust von *MGMT* zu einer Akkumulation von *Kras*-Mutationen führen [Esteller, 2002].

## **1.6 Acetylierung**

Für Prozesse an der DNA wie Transkription, Replikation, Reparatur und Rekombination sind strukturelle Modifikationen des Chromatins erforderlich. Antirepression der DNA geht mit Histonacetylierung einher, einer enzymvermittelten reversiblen Bindung von Acetylgruppen an Lysinreste der amino-terminalen Domäne von Histonproteinen H4. Infolge von Ladungsänderungen werden die Wechselwirkungen zwischen Histonen und DNA geschwächt, was zur Auflockerung des Chromatins und damit zu einer Verbesserung der Transkription führt. Die Deacetylierung von Histonen wird durch Histondeacetylasen (HDAC) vermittelt und bewirkt durch Komprimierung der DNA wiederum Transkriptionsrepression.

## **1.7 Methylierung und Acetylierung**

Die Bedeutung des Methylierungsstatus von CpG-Di-Nukleotiden für die Transkription in Genen mit und ohne CpG-Inseln in den Promotorregionen muss differenziert betrachtet werden. Während über Methylierung/Demethylierung einfacher CpGs in den Promotorregionen von Genen direkt die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindert bzw. ermöglicht werden kann, findet sich für CpG-Inseln eine synergistische Verknüpfung von DNA-Methylierung und Histonacetylierung. CpG-Inseln in den Promotorregionen von Genen sind zumeist hypomethyliert und mit einer geöffneten Chromatinstruktur, regional verminderten Histonen H1 sowie Histonacetylierung assoziiert. Diese Konstellation erlaubt eine gesteigerte Transkription. Chromatinkondensation hingegen korreliert mit methylierten CpG-Inseln und verhindert einen Zugang von Transkriptionsfaktoren an die Promotorregionen [Baylin et al., 1998]. Eine bedeutende Rolle wird dabei Proteinen zugeschrieben, die an methylierte CpGs binden können. Das Methyl-CpG-bindende Protein MeCP2 besteht aus zwei funktionellen Domänen [Lewis et al., 1992]. Über seine Methyl-CpG-bindende Domäne kann es symmetrisch methylierte CpGs erkennen [Wakefield et al., 1999]; über die

Transkriptions-Repressions-Domäne (TRD) ist eine Interaktion mit weiteren Proteinen möglich [Nan et al., 1997]. Beispielsweise kann über Bindung des Transkriptionsfaktors TFIIB mehrere hundert Basenpaare überspannend Transkriptionsinaktivierung vermittelt werden [Kaludov and Wolffe, 2000]. In einem Multiproteinkomplex werden über die Transkriptions-Repressions-Domäne das Adaptorprotein mSin3A sowie die Histondeacetylasen 1 und 2 rekrutiert, welches über Chromatinkondensation zu einer transkriptionellen Repression führt [Jones et al., 1998; Nan et al., 1998]. Für weitere bekannte Methyl-CpG-bindende Proteine wie MBD2 und MBD3 konnte eine direkte Aktivierung der HDAC1 und HDAC2 in methylierten Promotorregionen nachgewiesen werden [Kaludov and Wolffe, 2000]. Andere Verknüpfungen zwischen DNA-Methylierung und Chromatinstruktur beziehen sich auf die direkte Interaktion zwischen DNA-Methyltransferasen und Histondeacetylasen. So wurde an der DNMT1 eine TRD identifiziert, die direkt HDAC1 rekrutieren kann [Fuks et al., 2000]. Die Komplexbildung von DNMT1 mit dem Rb-Protein, dem Zellzyklus regulierten Transkriptionsfaktor E2F-1 und der HDAC1 hat eine Transkriptionsrepression an Promotoren mit E2F-1-Bindungsstellen zur Folge [Robertson et al., 2000].

In diesen komplexen Prozessen wird nicht nur eine einfache Verknüpfung von Methylierung und Deacetylierung widerspiegelt, sondern auch die Einbeziehung einer Sequenzspezifität und von wachstumsregulatorischen Signalwegen, die in nahezu allen Krebszellen gestört ist.

## 2 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit untersucht die Expressionsänderungen von Genen als Folge von Demethylierung und Histon-Hyperacetylierung bei einer gleichzeitigen Ras-abhängigen Regulation. Gene mit einer derartigen mechanistischen Verknüpfung würden Hinweise darauf liefern, dass epigenetische Veränderungen einer Ras-abhängigen Steuerung unterliegen können. Basierend auf Expressionsprofilen der Rattenfibroblasten-Zelllinien 208F und FE-8 wurden durch Zuber et al. Zielgene der Raf/MEK/ERK-Kaskade identifiziert [Zuber et al., 2000]. Mittels Microarray-Analysen konnten des Weiteren methylierungsabhängige Gene dieses Zellsystems bestimmt werden. Aus der Liste der Gene, die sowohl MEK/ERK- als auch methylierungsabhängig reguliert werden, wurden acht Kandidatengene für die weiteren Untersuchungen ausgewählt. Die Inhibition des Raf/MEK/ERK- und des PI3K-Signalwegs sollen mittels Northern Blot-Analysen Aussagen über kurz- und mittelfristige Expressionsänderungen dieser Gene liefern. Zudem werden Expressionsänderungen unter Inhibition von DNA-Methylierung und Histonacetylierung untersucht. Damit sollen bereits vorliegende Ergebnisse von Zuber et al. bestätigt oder falsifiziert und weiterreichende Daten über mögliche Einflüsse von *Ras* auf die Steuerung von Genen gewonnen werden. Die Untersuchung der Zielgene in Zellen mit induzierbarem *Ras* soll Aussagen über die zeitlichen Abläufe der Genexpressionsänderungen liefern. Ein möglicherweise verantwortliches Schlüsselenzym ist die DNA-Methyltransferase 1. Ausschaltung dieses Enzyms mittels RNA-Interferenz in der Ras-transformierten Zelllinie sollte zu einer Reexpression der Zielgene führen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Allgemein

Standardchemikalien und Lösungen wurden, sofern nicht anders vermerkt, von Bio-Rad (München), Boehringer Mannheim (Mannheim), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße stammten von Eppendorf (Hamburg), gestopfte Pipettenspitzen von Greiner Bio-One (Frickenhausen), 15 ml- und 50 ml-Polypropylenröhrchen, Zellkulturflaschen, Zellkulturschalen und 6-Loch-Platten von Becton-Dickinson (Heidelberg). Die Lösungen wurden mit Analysenwasser aus einer Reinstwasseraufbereitungsanlage (Milli-Qplus; Millipore, Schwalbach) angesetzt. Lösungen und Kunststoffmaterialien wurden vor der Verwendung in einem Dampfsterilisator (Varioklav® Typ 400) für 30 min bei 120-122 °C und 2-2,5 bar, Glas- und Metallgeräte in einem Trockenschrank (Heraeus, Hanau) bis zu 3 h bei 180 °C behandelt.

#### 3.2 Zellmodell

Das in den Untersuchungen verwendete Zellkulturmodell wurde aus embryonalen Rattenfibroblasten entwickelt. 208F-Zellen sind Derivate der Zelllinie Rat-1 [Griegel et al., 1986]; sie sind immortal, nicht-tumorigen und phänotypisch Fibroblasten. Transformation mit konstitutiv aktiviertem *Hras1* (G12V) führte zur Zelllinie FE-8 [Griegel et al., 1986]. Diese ist tumorigen, hochmaligne und phänotypisch stark verändert. Im Gegensatz zu 208F Zellen zeigten sie ankerunabhängiges Wachstum. Das Genprodukt des Onkogens *Hras* (G12V), p21<sup>RAS</sup>, kann in FE-8 Zellen in großen Mengen nachgewiesen werden. Subkutane Injektion von FE-8 Zellen in Nacktmäuse führte zur Entstehung schnell wachsender, stark vaskularisierter lokaler Tumoren mit Infiltration von Peritoneum und inneren Organen [Griegel et al., 1986]. Das Zellpaar 208F/FE-8 unterscheidet sich damit primär durch nur ein Gen, ist genetisch eng verwandt und chromosomal äußerst stabil. Damit ist es für Untersuchungen von Signalwegen unterhalb des Ras-Onkogens geradezu prädestiniert.

Eine Verknüpfung zwischen 208F und FE-8 Zellen stellen IR (Inducible Ras)-Zellen, ausgehend von 208F-Rattenfibroblasten entwickelt, dar. Über einen induzierbaren Promotor kann onkogenes *Hras* an- und abgeschaltet werden [Liu et al., 1992]. Zugabe von 20 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalaktosid), ein Laktose-Analogen, induziert *Ras*. Die Morphologie der IR-Zellen entspricht im nicht-induzierten Zustand der der 208F

Zellen. Sie sind kontaktinhibiert. Innerhalb von 3 bis 5 Tagen nach IPTG-Zugabe kommt es zu einer deutlichen Morphologieänderung mit verminderter dichteabhängiger Wachstumsinhibition und einer Wachstumskapazität in Weichagar, welches sie als transformierte Zellen charakterisiert. Die Arbeit erfolgte mit den Klonen IR-1 und IR-4 [Schäfer et al., 2003].

### **3.3 Zellkultur**

Zellkulturmedium:

Dulbecco's modified Eagle Medium (Cambrex Bio Science, Verviers, Belgium)

10 % Foetal Calf Serum Gold (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria)

2 mM Ultraglutamin (Cambrex Company, Verviers, Belgium)

2 % 100 IU/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin (Biochrom AG Berlin)

Die Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an einer Sicherheitswerkbank (LaminAir® HBB2472, Heraeus Instruments, Hanau). Die Zellen wurden in Zellkulturflaschen (75 cm<sup>2</sup>) mit 10 ml Medium in Brutschränken mit 5 % CO<sub>2</sub>-Atmosphäre und 97 % Luftfeuchtigkeit bei 37 °C kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen alle 4 Tage mit 2 ml Trypsin (Trypsin/EDTA Solution, Biochrom AG, Berlin) abgelöst und nach Zugabe von Kulturmedium abzentrifugiert (1000 rpm, 5 min, RT, Beckmann GS-6KR Centrifuge). Das Sediment konnte in frischem Medium aufgenommen und die Zellen in der gewünschten Verdünnung wieder ausgesät werden.

Zum Ausschluss von Mycoplasmen-Kontaminationen wurden in Abständen Mycoplasmentests durchgeführt. Grundlage bildet ein DNA-interkalierender Farbstoff (Hoechst), der durch UV-Licht zu Fluoreszenz angeregt wird. Dazu wurden Zellen auf sterilen Deckgläschen (Menzel, Braunschweig) kultiviert. Zur Fixierung wurden 20 Tropfen einer Lösung aus 1 Teil Essigsäure und 3 Teilen Methanol für 2 min dazupipettiert, abgesaugt und erneut 3 ml Fixierlösung für 5-10 min dazugegeben. Anschließend konnte das Deckgläschen zum Trocknen aufgestellt werden. Zur Färbung wurden 3-4 Tropfen Hoechst-Färbelösung auf einen sauberen Objektträger (Menzel, Braunschweig) gegeben, dann das Deckgläschen mit der zellenbewachsenen Seite aufgelegt und 10 min inkubiert. Nach mehrmaligem Spülen des Deckgläschens konnte es mit Zitronensäure-Eindecklösung auf einem neuen Objektträger fixiert und die Zellen

unter dem Fluoreszenzmikroskop (Olympus BH-2, Olympus, Japan) betrachtet werden. Kontaminierte Kulturen weisen neben dem fluoreszierenden Zellkern auch eine Fluoreszenz im Zytoplasma auf.

Das Einfrieren der Zellen erfolgte nach Trypsinieren und Zentrifugieren, wie beschrieben, und anschließender Aufnahme in Zellkulturmedium mit Zusatz von 10 % DMSO und 10 % FCS in Einfrierröhrchen (Cryo.s Cellstar®, Greiner Bio-One, Frickenhausen). Die Röhrchen wurden erst in ethanolhaltige Einfrierbehälter (Cryo 1 °C Freezing Container, Nagene™), die ein Abkühlen der Zellen um 1 °C pro Minute ermöglichen, bei -80 °C (VIPSeries -86 °C, Sanyo) gelagert, um dann dauerhaft in Flüssigstickstofftanks (Chronos, Messer, Griesheim) aufbewahrt zu werden.

Zum Auftauen wurden die Einfrierröhrchen zügig auf Raumtemperatur erwärmt und die Zellen unter tröpfchenweiser Zugabe in 5 ml Kulturmedium aufgenommen. Zur Entfernung des toxisch wirkenden DMSO wurden die Zellen abzentrifugiert, in 10 ml Medium aufgenommen und in die Zellkulturflaschen überführt.

Für die Zellkulturexperimente wurden die Zellen auf Petrischalen mit 10 cm Durchmesser ausplattiert. Die gewählte Zellzahl lag, wenn nicht anders angegeben, bei  $3 \times 10^5$  Zellen pro 10 cm Petrischale. Die Behandlung mit den Inhibitoren erfolgte oder begann 24 h nach dem Ausplattieren, in allen weiteren Zeitangaben als Zeitpunkt 0 h als Bezugsgröße angegeben. Zeitgleich wurden Kontrollversuche durchgeführt, in denen die Zellen nur mit dem Lösungsmittel des Inhibitors behandelt wurden.

### **3.4 Inhibitoren**

#### **3.4.1 5-Aza-2'-Desoxycytidine (5-Aza-CdR)**

Bei 5-Aza-2'-Desoxycytidine handelt es sich um ein Cytosin-Analogon, welches während der Replikation anstelle von Cytosin eingebaut wird, aber anschließend nicht methyliert werden kann. Folgend kommt es zur Auflockerung der Chromatinstruktur mit Freilegung von Promotorregionen und der Bindungsmöglichkeit für Transkriptionsfaktoren. Des Weiteren erfolgt eine kovalente und irreversible Bindung von DNA-Methyltransferase an 5-Aza-CdR-inkorporierte DNA [Juttermann et al., 1994]. 5-Aza-CdR (Sigma, St. Louis, MO, USA) wurde in 1 x PBS (pH 6,5) zu einer Konzentration von 10 mM in Lösung gebracht und, entsprechend den Ergebnissen aus Vorversuchen (von Xiaohua Chen und Per Lund), nach Vorverdünnung mit Nährmedium in einer Endkonzentration von 0,1 µM eingesetzt. Aufgrund der starken Vorverdünnung und dem Gebrauch von PBS als Lösungsmittel wurde auf eine Behandlung der Kontrollen verzichtet. Unter Berücksichtigung der Instabilität des Inhibitors und der verzögert einsetzenden Wirkung erfolgte die Behandlung zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h (mit Mediumwechsel) und 72 h. Die RNA konnte zum Zeitpunkt 96 h extrahiert werden. Aufgrund der Versuchsanordnung über fünf Tage lag die gewählte Zellzahl bei  $1,5 \times 10^5$  Zellen pro 10 cm Petrischale. Für die Zeitkinetik wurde im Ansatz bis einschließlich 24 h eine Zellzahl von  $3 \times 10^5$ , ab 36 h eine Zellzahl von  $1,5 \times 10^5$  pro 10 cm Petrischale gewählt.

#### **3.4.2 Trichostatin A (TSA)**

Trichostatin A wurde primär aus *Streptomyces* isoliert und als fungizide Substanz identifiziert. In nanomolaren Konzentrationen ist es ein reversibler und spezifischer Inhibitor der Histondeacetylase mit daraus folgender Histon-Hyperacetylierung [Yoshida et al., 1990].

Entsprechend den Ergebnissen aus Vorversuchen (von Xiaohua Chen und Per Lund) wurde TSA (Sigma) in den zwei Konzentrationen 5 ng/ml und 25 ng/ml eingesetzt. Als Lösungsmittel für die Grundlösung (1 mg/ml) diente Ethanol, Vorverdünnungen 1:100 wurden mit Nährmedium vorgenommen. Die Kontrollbehandlung erfolgte mit entsprechend verdünntem Ethanol. Im Übersichtsversuch fand die RNA-Extraktion 24 h nach der Behandlung statt. Die Zeitkinetik wurde unter Einsatz von 25 ng/ml TSA durchgeführt; aufgrund der stark toxischen Wirkung, um eine ausreichende RNA-Menge

extrahieren zu können, einheitlich mit einer Zellzahl von  $3 \times 10^5$ . Des Weiteren erfolgte eine Kombinationsbehandlung von TSA mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-2'-Desoxycytidine [Cameron et al., 1999]. Dafür wurde im Anschluss an die beschriebene viertägige  $0,1 \mu\text{M}$  5-Aza-CdR-Behandlung zum Zeitpunkt 96 h mit  $5 \text{ ng/ml}$  TSA behandelt und die RNA zum Zeitpunkt 120 h extrahiert. Gleichermaßen wurde in der Aza-CdR-Zeitkinetik verfahren.

### **3.4.3 U0126**

U0126 inhibiert direkt und spezifisch MEK 1 und 2 und verhindert dadurch im Folgenden die Aktivierung von ERK1 und ERK2 [Favata et al., 1998]. Im Gegensatz zu PD98059 hemmt U0126 direkt die katalytische Aktivität des Enzyms.

U0126 (Promega, Madison, WI, USA) wurde in DMSO in Lösung gebracht und mit einer Endkonzentration von  $10 \mu\text{M}$  eingesetzt. Die Kontrollen wurden mit  $10 \mu\text{l}$  des Lösungsmittels DMSO behandelt. Die RNA-Extraktion im Übersichtsversuch erfolgte zum Zeitpunkt 48 h. Bei der Versuchsplanung der U0126-Zeitkinetik wurde bezüglich der Zellzahl zwischen frühen und späten Zeitpunkten differenziert. Bis einschließlich 24 h wurden  $5 \times 10^5$ , ab 36 h  $3 \times 10^5$  Zellen pro  $10 \text{ cm}$  Petrischale eingesetzt.

### **3.4.4 PD98059**

PD98059 (Alexis, Grünberg) ist ein potenter, selektiver und zellpermeabler Inhibitor von MEK1 und MEK2 [Alessi et al., 1995]. Die Hemmung erfolgt über Bindung an die inaktive, nicht phosphorylierte Form der MAPK-Kinase und blockiert damit deren Raf-vermittelte Aktivierung durch Phosphorylierung. Im Weiteren wird die Aktivierung von ERK1, 2 verhindert. Bereits aktivierte MEK kann durch PD98059 nicht inhibiert werden. PD98059 wurde in DMSO in Lösung gebracht; behandelt wurde zu einer Endkonzentration von  $50 \mu\text{M}$ . Bei der Zellkulturarbeit mit dem Inhibitor war auf eine zügige Verteilung zu achten, um ein Auskristallisieren zu verhindern. Die Behandlung der Kontrollen erfolgte mit  $10 \mu\text{l}$  DMSO. Die RNA-Extraktion fand nach 48 h und 72 h statt.

### **3.4.5 LY294002**

LY294002 (Alexis, Grünberg) ist ein spezifischer Inhibitor der PI3-Kinase. Die Interaktion erfolgt über die ATP-Bindungsstelle des Enzyms [Vlahos et al., 1994].

LY294002 wurde in DMSO in Lösung gebracht und in einer Endkonzentration von 10 µM eingesetzt. Die 1:5 Verdünnung der Grundlösung (50 mM) erfolgte mit Zellkulturmedium. Die Kontrollen wurden mit 10 µl DMSO behandelt. Die RNA-Extraktion wurde 48 h nach der Behandlung vorgenommen.

### **3.4.6 Dimethylsulfoxid (DMSO)**

Fragliche Lösungsmittelleffekte bei der Inhibitorbehandlung mit PD98059, U0126 und LY294002 im Übersichtsversuch wurden in einer Behandlung der Kontrollen mit DMSO (Sigma-Aldrich, Steinheim) berücksichtigt. Zum Ausschluss von DMSO-Effekten wurde eine Vergleichszeitkinetik mit unbehandelten und DMSO-behandelten Zellen durchgeführt.

## **3.5 Zellzahlbestimmung**

Eine vergleichende Zellzahlbestimmung unbehandelter, DMSO- und U0126-behandelter 208F und FE-8 Zellen wurde ebenfalls durchgeführt. Die Zählzeiten wurden entsprechend der Untersuchungszeitpunkte der Kinetiken gewählt: 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, 96 h. Für jeden Untersuchungszeitpunkt wurden drei 10 cm Petrischalen angesetzt; bis einschließlich 24 h mit  $5 \times 10^5$  Zellen, ab 36 h mit  $3 \times 10^5$  Zellen. Jeweils eine Petrischale blieb unbehandelt, wurde mit 10 µM U0126 oder mit 10 µl DMSO versetzt. Zum entsprechenden Untersuchungszeitpunkt wurde das Kulturmedium abgesaugt, wurden die Zellen trypsiniert, zentrifugiert, erneut in Kulturmedium aufgenommen und in einer Fuchs-Rosenthal-Zellkammer ausgezählt. Die Auszählung erfolgte für jeden Ansatz zweifach, anschließend wurde das arithmetische Mittel bestimmt. Die grafische Auswertung wurde im Programm Microsoft Excel vorgenommen.

## 3.6 Northern Blot

### 3.6.1 RNA-Präparation

Die RNA-Präparation erfolgte mit Trizol<sup>®</sup> Reagent (Life Technologies<sup>™</sup>) auf Grundlage des Firmenprotokolls. Zunächst wurden die Zellen einmal mit 1 x PBS<sub>DEPC</sub> gewaschen. Anschließend wurden 2 ml Trizol in jede Petrischale gegeben, diese geschwenkt, die lysierten Zellen mit Zellschabern heruntergekratzt und in ein 13 ml-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) überführt. Nach mehrmaligem kräftigem Resuspendieren erfolgte das Einfrieren bei -80 °C.

Zur Weiterbearbeitung wurden die Proben bei Raumtemperatur aufgetaut, mit 1 ml Chloroform pro 5 ml Trizolsuspension versetzt, geschwenkt, 10 Sekunden auf dem Vortex durchmischt und anschließend zur Phasentrennung zentrifugiert (10000 rpm, 15 min, 4 °C, Beckmann Avanti J-25, Rotor 25.50). Die farblose, wässrige, RNA-enhaltende Oberphase wurde abgenommen und in ein weiteres Röhrchen überführt, mit dem gleichen Volumen Isopropanol zur Präzipitation aufgefüllt, geschwenkt und zur Verbesserung der RNA-Ausbeute über Nacht bei 4 °C kaltgestellt. Am darauf folgenden Tag erfolgte eine erneute Zentrifugation (10000 rpm, 10 min, 4 °C, Beckmann Avanti J-25, Rotor 25.50), während derer sich ein Niederschlag ausbildete. Nach einem Waschschrift mit kaltem 70%igem Ethanol wurde zentrifugiert (7500 rpm, 10 min, 4 °C; Beckmann Avanti J-25, Rotor 25.50), das Ethanol abgegossen und der Niederschlag bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend konnte dieser in RNase freiem H<sub>2</sub>O (RNase free water, Qiagen, Hilden) gelöst und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß aufgenommen werden. Die RNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm/280 nm (Gene Quant II-RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech) auf der Grundlage 1 OD<sub>260nm</sub>=40 µg/ml. Die Konzentration der Proben wurde zwischen 1 µg/µl und 3 µg/µl eingestellt. Die Reinheit konnte anhand des Quotienten OD<sub>260nm</sub>/OD<sub>280nm</sub> bestimmt werden. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C.

### 3.6.2 RNA-Transfer

RNA-Gel (0,8 %)	0,8 g Agarose in 72,5 ml H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> schmelzen 10 ml 10 x MOPS 17,5 ml 12,3 M Formaldehyd
1,33 x RNA-Ladepuffer 2 ml	0,35 ml H <sub>2</sub> O <sub>DEPC</sub> 0,21 ml 10 x MOPS 0,35 ml 12,3 M Formaldehyd 0,96 ml deionisiertes Formamid 0,23 ml 8,7 M Glycerol 1 Messerspitze Bromphenolblau 2 µl Ethidiumbromid
10 x MOPS	0,2 M 4-Morpholinopropansulfonsäure pH 7,0 80 mM Natriumacetat 10 mM EDTA pH 8,0
20 x SSC	3 M NaCl 0,3 M Tri-Natriumcitrat pH 7,0

Eine Probenmenge von 10 µg RNA wurde mit RNase freiem H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt, mit RNA-Ladepuffer im Verhältnis 1:2 versetzt, 5 min bei 90 °C denaturiert und anschließend sofort auf Eis gelagert. Der Auftrag der Proben erfolgte im 0,8%igen RNA-Gel, die Auftrennung in der Elektrophoresekammer mit 1 x MOPS über 4-5 h bei einer Spannung von 50 V.

Für den Aufbau des Blots wurde eine Fotoschale mit 20 x SSC gefüllt. Auf eine darauf aufliegende, gereinigte Glasplatte wurde ein breiter Streifen Whatmanpapier (Whatman®, VWR International) derart platziert, dass die überhängenden Enden in die Flüssigkeit reichten und diese ansaugen konnten. Zwei Lagen Whatmanpapier in der Größe des Gels bildeten, nachdem sie in 10 x SSC getränkt waren, die nächste Schicht, während umliegende Flächen mit Haushaltsfolie luftdicht abgeschlossen werden mussten. Anschließend wurden das 3 x 10 min in 5 x SSC geschwenkte Gel und darüber die 5 min in 2 x SSC getränkte Nitrozellulosemembran (Nytran®N, Schleicher&Schuell, Dassel) luftblasenfrei aufgelegt. Um den Sog in dem absteigenden SSC-Konzentrationsgefälle zu verstärken, folgten vier trockene Lagen Whatmanpapier in der Größe des Gels und abschließend eine dicke Lage Zellstoff (Pehazell,

Hartmann). Dieser Aufbau wurde durch eine Glasplatte abgedeckt und mit Gewichten bis zu 2 kg beschwert. Der RNA-Transfer aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgte in ca. 16 h über Nacht. Nach dem Abbau des Blots konnten die Membranen über UV-Licht (Vilber Lourmat) auf den Erfolg der Übertragung hin betrachtet und die ribosomalen Banden 18 S und 28 S darauf markiert werden. Zur Minderung der hohen Salzkonzentration wurden die Membranen 3 min in 2 x SSC getaucht, anschließend 1 min auf Whatmanpapier getrocknet und dann die RNA durch UV-Bestrahlung (UV-Crosslinker, Hoefer) kovalent an die Membran gebunden. Um die Membranen vor Austrocknung zu schützen, wurden sie eingeschweißt und bei -20 °C aufbewahrt.

### 3.6.3 Herstellung der Sonden

PCR-Ansatz		je 5 ng (1 µl) cDNA-Probe 37,4 µl H <sub>2</sub> O 5 µl 10 x PCR-Puffer 3 µl 25 mM MgCl <sub>2</sub> 0,8 µl 12,5 mM dNTP 4 U Amplitac Gold 2 µl 10 µM Primer N1/N2
Universal-Primer	N1	5' -TCGAGCGGCCCGCCCGGGCAGGT- 3'
	N2	5' -AGCGTGGTCGCGGCCGAGGT- 3'
DNA-Gel (1-2,5 %)		1-2,5 g Agarose 100 ml 1 x TAE
50 x TAE		242 g/l TRIS 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
6 x DNA-Gelladepuffer 2 ml		660 µl Glycerol 240 µl 50 x TAE 0,25 % Xylencyanol 2 µl Ethidiumbromid 1,1 ml H <sub>2</sub> O

Die Fertigung der DNA-Sonden erfolgte auf Grundlage einer bereits vorhandenen cDNA-Bibliothek [Zuber et al., 2000]. Die Klonierungsarbeiten mit dem Vektor pCR2.1 (Invitrogen) in E.coli Top 10 competent cells (Invitrogen) übernahm freundlicherweise Frau Cornelia Gieseler. Die anschließende PCR-Amplifikation (Peltier Thermal Cycler PTC-225, Biozym) der Plasmid-DNA konnte aufgrund des identischen Adaptors einheitlich mit den Primern N1/N2 (Clontech) in dem beschriebenen Ansatz erfolgen. In einem 1%igen DNA-Gel wurden die Fragmente auf ihre Größe hin überprüft, anschließend mit dem QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden) aufgereinigt und die Konzentration photometrisch bestimmt. Für die Sonde Lox2, die nach der PCR eine Verunreinigung in Form einer zweiten spezifischen Bande zeigte, wurde das Prozedere erweitert: beide Banden wurden aus einem DNA-Gel aus Low-melting Agarose ausgeschnitten, anschließend die DNA über den QIAEX II Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden) herausgelöst und erneut einer PCR unterzogen. Dabei konnte nur ein Fragment amplifiziert werden, welches, wie bereits beschrieben, aufgereinigt wurde. Zur weiteren Überprüfung der Sonden wurden die DNA-Fragmente sequenziert. Ein Abgleich in der NCBI-Datenbank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) bestätigte die Sequenzen, so dass die PCR-Produkte für die Northern Blot-Hybridisierung eingesetzt werden konnten. Die radioaktive Markierung der Sonden erfolgte mittels der „random primed“ DNA-Markierung nach Feinberg und Vogelstein [Feinberg and Vogelstein, 1983]. Dazu wurden zu 25 bis 100 ng Sonden-DNA Hexanukleotide sämtlicher Sequenzkombinationen (Hexanukleotid-Mix, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) gegeben, die als Primer dienten. Mit Hilfe des Klenow-Enzyms (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg) konnte, ausgehend vom 3'-Ende der „random primer“, ein komplementärer Strang synthetisiert werden, in den die zugesetzten „kalten“ dNTP (dATP, dGTP, dTTP; peq GOLD dNTP-Set peQLab, Erlangen) ebenso eingebaut wurden wie das radioaktiv markierte Desoxyribonukleosidtriphosphat  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP (MP Biomedicals). Nach einstündiger Polymerisation bei 37 °C wurden die Sonden zur Entfernung nicht eingebauter dNTP über MicroSpin<sup>TM</sup> G-50 Columns (Amersham Biosciences, Braunschweig) gereinigt und anschließend deren Aktivität gemessen (Liquid Scintillation Counter Wallac 1409, Wallac, Turku, Finnland). Sie betrug zwischen  $0,5 \times 10^6$  und  $1 \times 10^7$  counts pro  $\mu\text{g}$ .

### 3.6.4 Hybridisierung und Filmentwicklung

Die Prähybridisierung der Membranen erfolgte mit dem Puffer ExpressHyb™ (Clontech, Heidelberg) unter Zusatz von 1 µl/ml denaturierter tRNA in 10 ml bzw. 15 ml Glasröhren (Hybaid HB-OV-BM) bei 66 °C für 1 h, wobei die Membranen wandständig, mit der RNA-beladenen Seite nach innen zeigend, eingelegt wurden. Nach Zugabe der gereinigten und denaturierten, radioaktiv markierten Sonden fand die Hybridisierung unter gleichmäßiger Rotation im Hybridisierungssofen (Hybaid) bei 66 °C über Nacht statt.

Die Waschschrirte am darauf folgenden Tag umfassten 2 x 20 min mit 2 x SSC/0,1 % SDS bei 42 °C und 2 x 30 min mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei 66 °C. Anschließend wurden die Membranen eingeschweißt und mit einem Röntgenfilm (Kodak Biomax MS) in einer Kassette bei -80 °C exponiert. Die Expositionszeit lag zwischen wenigen Stunden und zwei Wochen; abhängig von der Sonde, der Stärke der radioaktiven Markierung und der RNA-Menge. Abschließend konnten die Röntgenfilme entwickelt werden (Entwickler und Fixierer X-Omat, Kodak).

### 3.7 Sequenzierung

Gel für die Sequenzierung	30 ml Sequa Gel XR (Biozym)
	7,5 ml Sequagel Puffer (Biozym)
	400 µl DMSO
	300 µl 10 % APS

10 x Tube-Puffer	108 g/l TRIS
	55 g/l Borsäure
	20 ml/l 0,5 M EDTA pH 8,0

Die Sequenzen der DNA-Sonden wurden vor deren Einsatz überprüft. Für das „cycle sequencing“ fand der SequiTherm Excel II-Kit (Biozym) mit einem fluoreszenzmarkierten Primer Anwendung. Dazu wurden jeweils vier Ansätze mit 1 µl Reagenz, den Basen Adenin, Thymin, Guanin oder Cytosin entsprechend, 0,2 µl DMSO, 1 µl Primer N1L 1 pmol und 30 ng/1,8 µl DNA-PCR-Produkt in eine 96-Well-Platte pipettiert und die Wells mit Wachs (Chill-out-14™ Liquid Wax, MJ Research Inc., NFPA) verschlossen. Nach den Vorgaben des Primerherstellers erfolgte die PCR.

Für die Sequenzierung wurde ein LICOR-Sequenziergerät (MWG Biotech) eingesetzt.

Das Gel für die Sequenzierung wurde zwischen zwei große, seitlich mit Abstandshaltern versehene Glasplatten gegossen. Für die Schaffung von Geltaschen wurde an der oberen Kante ein Kamm eingesetzt. Nach der Polymerisation konnte das Einhängen des Gels in den Sequenzer, das Auffüllen mit 1 x TBE-Puffer und nach dem Anbringen der Elektroden die Erwärmung des Gels auf 50 °C erfolgen. Währenddessen wurden die Proben mit 3 µl DNA-Ladepuffer (Amersham) versetzt und 2 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend konnte das Gel mit je 1 µl Probe pro Tasche beladen werden. Die Sequenzierung erfolgte über 6-8 h. Die Ergebnisse wurden halbmanuell ausgewertet.

### 3.8 Western Blot

#### 3.8.1 Proteingewinnung

10 x PBS pH 7,2	87,5 g/l NaCl 11,5 g/l Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 2,4 g/l NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	
Lysispuffer für Gesamtprotein	10 mM Tris-HCl pH 7,2 150 mM NaCl 1 % Triton X-100 1 % Desoxycholsäure	frisch 1 mM PMSF 50 mM NaF 50 µg/ml Leupeptin 1 mM NaVO <sub>4</sub> 4 µg/ml Aprotinin
2 x SDS-Probenpuffer	50 mM TRIS-HCl pH 6,8 100 mM Dithiothreitol 2 % SDS 10 % Glycerol 0,1 % Bromphenolblau	
Destain 100 ml	90 ml Methanol 2 ml Essigsäure 8 ml H <sub>2</sub> O	
Elution 100 ml	50 ml Ethanol 10 µl 0,5 M EDTA 5 ml 0,5 M NaOH 45 ml H <sub>2</sub> O	

Für die Proteingewinnung wurde von den ausplattierten Zellen das Medium entfernt, die Zellen mit kaltem 1 x PBS gespült und die restliche Flüssigkeit aus den Petrischalen abgesaugt. Unter Zugabe von 100 µl Lysispuffer folgte eine 30-minütige Inkubation der Zellen auf Eis. Nach Ablauf dieser Zeit konnten 200 µl des 2 x SDS-Probenpuffers dazupipettiert und die mit einem Zellschaber gewonnenen Zelllysate in ein Eppendorfgefäß überführt werden. Auf einen Kochvorgang über 10 Minuten folgte ein Zentrifugationsschritt (14000 rpm, 5 min, 4 °C), woraufhin der Überstand zur Aufbewahrung bei -20 °C in neue 1,5 ml Eppendorfgefäße aliquotiert wurde. Zur Weiterverarbeitung der Proben mussten diese aufgetaut und zum besseren Lösen 5 min bei 37 °C erwärmt werden.

Die Konzentrationsbestimmung der Proteine erfolgte als Doppelbestimmung mittels der Amidoschwarz-Methode [Schaffner and Weissmann, 1973]. Grundlage hierfür bildet der Farbstoff Amidoschwarz, der Proteinpräzipitate bindet. Sowohl die zu messenden Proben als auch eine Standard-Verdünnungsreihe von Serumalbumin wurden mit einem Volumen von je 1 µl auf eine Nitrozellulosemembran (Protran®, Schleicher&Schuell, Dassel) aufgetragen. Nach einminütiger Färbung in Amidoschwarz (Merck) musste das Filterpapier bis zur Entfärbung des Hintergrundes in Methanol-Essigsäure gespült werden. Die gefärbten Auftragungspunkte konnten in gleichmäßiger Größe aus dem Filterpapier ausgeschnitten und in mit 700 µl Elution vorgelegte Eppendorfgefäße gegeben werden. Innerhalb einer Zeit von 30 min, unterstützt durch Lagerung auf dem Schüttler (Thermomixer 5436, Eppendorf), wurde der Farbstoff wieder aus dem Filter herausgelöst. Die Absorptionsmessung der Eluate erfolgte photometrisch bei 630 nm (UV-Visible Spectrophotometer, Pharmacia). Anhand der Eichgerade von Serumalbumin konnten nach graphischer Darstellung die Probenkonzentrationen ermittelt werden.

### 3.8.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Trenngel (12 %)	3,39 ml H <sub>2</sub> O 4 ml Acrylamid (29:1) 2,5 ml 1,5 M TRIS-HCl pH 8,8 50 µl 20 % SDS 50 µl 10 % APS 10 µl TEMED
Sammelgel	3 ml H <sub>2</sub> O 660 µl Acrylamid (29:1) 1,25 ml 0,5 M TRIS-HCl pH 6,8 25 µl 20 % SDS 25 µl 10 % APS 5 µl TEMED
5 x SDS Laufpuffer	15,1 g/l TRIS 72 g/l Glycin 5 g/l SDS
2,5 x Blotting Puffer	14,53 g/l TRIS-HCl 7,33 g/l Glycin 4,69 ml 20 % SDS 500 ml Methanol
TBST	10 mM TRIS pH 8,0 150 mM NaCl 0,05 % Tween 20

Für die Herstellung der, abhängig vom Probenvolumen, 0,75 oder 1,5 mm dicken Gele zur Proteinauftrennung wurden zwei gereinigte Glasplatten mit Abstandshaltern in die Vorrichtung (Bio-Rad) eingespannt. Zunächst konnte das breitere Sammelgel, nach dessen Polymerisation darüber das schmale Trenngel gegossen werden. Der Einsatz eines Teflonkammes in das Trenngel formte die Geltaschen. Das zwischen den Glasplatten liegende Gel wurde nach vollständiger Polymerisation in die Elektrophoresekammer (Sub-Cell®GT, Bio-Rad, München) gespannt. Nach dem Füllen der Kammer mit 1 x Laufpuffer konnten der Teflonkamm entnommen und die Geltaschen mit den gewünschten Proben und einem Größenstandard (New England BioLabs Inc.) beladen werden.

Die Elektrophorese erfolgte entweder bei einer Spannung von 60 V im Sammelgel und 95 V im Trenngel mit einer durchschnittlichen Laufzeit von 4-5 h oder bei einheitlich 19 V über Nacht. Nach dem Abbau der Elektrophoreseeinheit wurde eine in Gelgröße zurechtgeschnittene Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Hybond<sup>TM</sup>-P, Amersham) 1 min in Methanol geschwenkt, anschließend 5 min in H<sub>2</sub>O gespült und dann zusammen mit dem Elektrophoresegel 10 min in 1 x Blotting Puffer äquilibriert. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran fand in einer Blotting-Kammer (peQlab, Erlangen) statt. Für den Aufbau wurden 3 Lagen Whatmanpapier in Gelgröße zurechtgeschnitten, in Blotting-Puffer getränkt und aufgelegt. Es folgten PVDF-Membran und Gel, welche von 3 weiteren getränkten Lagen Whatmanpapier bedeckt wurden. Der Transfer der geladenen Proteine erfolgte von Anode zu Kathode bei 2 mA/cm<sup>2</sup> für 50 min.

Nach dem Blotten wurde die Membran zum Blockieren unspezifischer Proteinbindungen in einer 5%igen Magermilch-Lösung (Magermilchpulver, AppliChem, Darmstadt) 1 h bei Raumtemperatur geschwenkt und anschließend 3 x 10 min in TBST gewaschen. Das Gel wurde währenddessen 45 min in Coomassie-Brillant-Blau (Fluka) gefärbt und über Nacht in Methanol-Essigsäure entfärbt. Am darauf folgenden Tag konnte, anhand der Färbung der im Gel verbliebenen Proteinbanden, die Gleichmäßigkeit der Beladung des Gels abgeschätzt werden.

### **3.8.3 Antikörperreaktion**

Im Anschluss an das Blocken und Waschen der Membran konnte die Reaktion mit dem gewünschten Antikörper erfolgen. Der Antikörper Phospho-p44/42 Map Kinase (Thr202/Tyr204, Cell signaling) wurde in der Verdünnung 1:800 in TBST mit 5 % BSA eingesetzt. Die Inkubation fand über Nacht bei 4 °C statt. Nach einem 3 x 10 min währenden Waschvorgang mit TBST schloss sich die Inkubation mit dem Zweitantikörper anti-rabbit IgG-POD (Dianova) für 1 h bei Raumtemperatur an. Nach erneutem 3 x 10-minütigem Waschen mit TBST folgte die Chemilumineszenzreaktion. Unter Verwendung des ECL Western blotting detection reagents and analysis system (Amersham Biosciences, Freiburg) wurden je 500 µl der beiden Entwicklerlösungen auf einer Kunststoffolie zusammenpipettiert, die Membranen mit der proteinbeladenen Seite aufgelegt und für 1 min abgedeckt. Nach dem zügigen Auswischen der überschüssigen Flüssigkeit konnte die Membran luftblasenfrei in eine weitere Folie

überführt und in eine Filmkassette eingelegt werden. Die Expositionszeit (Entwickler und Fixierer X-Omat, Kodak) zur Detektion der p44<sup>MAPK</sup>-ERK1 und p42<sup>MAPK</sup>-ERK2 betrug ca. 5 min.

Um die Membranen für weitere Antikörperreaktionen zu verwenden, empfahl sich das Abwaschen bereits gebundener Antikörper. Mit Hilfe des Western Blot Recycling Kit (Alpha Diagnostic international, San Antonio, USA) wurde die Membran 5 min mit Stripping Solution und anschließend 5 min mit Blocking Solution behandelt. Nach erneutem 3 x 10-minütigem Waschen konnte die Inkubation mit einem weiteren Antikörper erfolgen.

Als Ladungskontrolle diente das 42 kDa Protein des Haushaltsgens  $\beta$ -Actin. Die Inkubation mit dem Antikörper 42 kDa  $\beta$ -Actin (Chemicon, Temecula, CA) 1:5000 in TBST währte 1 h bei Raumtemperatur. Als Zweitantikörper wurde anti-mouse-POD (Dianova; 1:10000 in TBST, Inkubation 1 h bei Raumtemperatur) verwendet. Um die Membranen vor Austrocknung zu schützen, wurden diese in TBST aufbewahrt.

### 3.9 RNAi

DNMT1-Duplex	sense	5`- UGUGCUCGCUCCCAAGGCUUU -3`
	antisense	3`- UUACACGAGCGAGGGUUC CGA -5`
EGFP-Duplex	sense	5`- AAGACCCGCGCCGAGGUGAAG-3`
	antisense	3`- AACUUCACCUCGGCGCGGGUC-5`

In den FE-8 Zellen wurde mittels RNAi die Genexpression der DNA-Methyltransferase 1 gehemmt, um die Auswirkungen auf die Expression der Zielgene zu untersuchen. Bei der RNA-Interferenz führt die Interaktion von kurzen, einsträngigen RNA-Molekülen mit mRNA zur Fragmentierung dieser und ist ein natürlicher Mechanismus der Genregulation, der experimentell imitiert werden kann. Zunächst wurden die DNMT1-Zielsequenz (Ausschnitt aus Exon 37) und die EGFP-Kontrollsequenz (green fluorescent protein, Kontrolle für die Transfektionseffizienz) mit Hilfe des Silencer<sup>TM</sup> siRNA Construction Kit (Ambion®, Austin, Texas, USA) zu small interference RNA (siRNA) prozessiert. Diese Arbeiten erfolgten freundlicherweise durch Ulf Krapfenbauer; die RNAi-Experimente wurden in Zusammenarbeit mit ihm durchgeführt.

Für die Zellkulturarbeit wurden die FE-8 Zellen in 6-Loch-Platten mit einer Zellzahl von  $6 \times 10^4$  pro Loch in Zellkulturmedium angesetzt, über Nacht bei 37 °C inkubiert und am darauf folgenden Tag bei einer Konfluenz von 40 % der ersten Transfektion unterzogen.

Dafür wurde für jedes einzelne Loch einer der folgenden Ansätze in 1,5 ml Eppendorfgefäße pipettiert:

leer-Kontrolle	Gefäß A:	175 µl OptiMEM + 10 µl steriles Wasser
	Gefäß B:	12 µl OptiMEM + 3 µl Oligofectamin
EGFP-Kontrolle	Gefäß A:	175 µl OptiMEM + 10 µl EGFP (10 µM)
	Gefäß B:	12 µl OptiMEM + 3 µl Oligofectamin
DNMT1	Gefäß A:	175 µl OptiMEM + 10 µl DNMT1 (10 µM)
	Gefäß B:	12 µl OptiMEM + 3 µl Oligofectamin

Anschließend konnten die Gefäßinhalte A und B zusammenpipettiert, resuspendiert und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Währenddessen wurde aus den 6-Loch-Platten das Nährmedium abgesaugt, mit 1 x PBS gespült und 800 µl OptiMEM (Gibco) in jedes Loch gegeben. Nach Ablauf der Inkubationszeit konnten die 200 µl des jeweiligen Duplexansatzes, für EGFP und DNMT1 zu einer Endkonzentration von 100 nM, hinzugefügt werden. Nach weiteren 4 h Inkubation bei 37 °C wurden die einzelnen Löcher zusätzlich mit 500 µl OptiMEM/FCS 10 % versetzt. Die Inkubation der Platten erfolgte weiterhin bei 37 °C im Brutschrank. Nach 24 h wurde die Prozedur in gleicher Weise wiederholt. Der Abschluss dieser zweiten Transfektion entspricht in den Versuchsbeschreibungen dem Zeitpunkt 0 h. Die RNA-Extraktion fand zum Zeitpunkt 72 h mit dem bereits beschriebenen Trizol<sup>®</sup> Reagent statt.

### **3.10 Densitometrische Auswertung**

Die Blots wurden densitometrisch mit dem Programm ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) ausgewertet. Dazu wurden die Röntgenfilme mit einem herkömmlichen Scanner elektronisch eingelesen und als tif-Dateien abgelegt. Aufgrund des ImageJ zugrunde liegenden Rechenalgorithmus, der auf der Anzahl weißer Punkte innerhalb einer vorgegebenen Fläche basiert, musste zunächst eine Farbinversion der geschwärzten Banden erfolgen. Entsprechend der Fläche der größten Schwärzungsbande eines Films wurde mit den vorgegebenen Werkzeugen der Flächeninhalt bestimmt, innerhalb dessen die Messung durchgeführt wurde. Das Flächenmaß konnte im Folgenden für sämtliche Messungen über alle Banden eines Films bewegt werden. Eine zusätzliche Messung wurde auf der Hintergrundfläche vorgenommen.

Die Messwerte konnten ins Microsoft Excel übernommen und dort ausgewertet werden. Zunächst erfolgte die Subtraktion des Hintergrundwertes, anschließend eine Quotientenbildung mit dem als Kontrolle dienenden Haushaltsgen GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase). Der letzte Schritt ermöglichte die Verrechnung von Ungenauigkeiten, die sich aus dem Probenauftrag im Gel oder beim Blotten ergaben.

Aufgrund unterschiedlich starker Markierung der Sonden und unterschiedlich langer Exposition der jeweiligen cDNA-Sonden bei variierender Expression des jeweiligen Gens sind die densitometrischen Auswertungen nur semiquantitativ möglich. Nichtsdestotrotz ermöglichen die graphischen Darstellungen eine sehr anschauliche Präsentation individueller Experimente, insbesondere über den Zeitverlauf der Expressionsänderung. Bei der Begutachtung der Diagramme ist die jeweilige Ordinaten-Achseneinteilung zu vernachlässigen, da das Maß willkürlich ist.

## 4 Ergebnisse

Die Auswahl der in dieser Arbeit untersuchten Gene basiert auf den durch Zuber et al. mittels Subtraktiver Suppressiver Hybridisierung (SSH) erstellten Genexpressionsprofilen der Zelllinien 208F und FE-8 [Zuber et al., 2000]. Mit Hilfe dieser Methode konnten die cDNA-Sequenzen der differentiell exprimierten Gene beider Zelllinien gewonnen, mittels PCR amplifiziert und nach Klonierung in Plasmide durch Sequenzierung identifiziert werden. Ein Abgleich der Sequenzen mittels Blast-Analyse (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) führte zu den verwendeten Genbezeichnungen und Accession-Nummern. Bereits in einer ersten Anwendung dieser Bibliothek wurden durch Behandlung von FE-8 Zellen mit dem Inhibitor PD98059 Zielgene des Ras/Raf/MEK/ERK-Signalwegs identifiziert [Zuber et al., 2000]. Eine weiterführende Arbeit von Xiaohua Chen (Diplomarbeit Fachbereich Biologie, Humboldt-Universität zu Berlin) untersuchte die Expression dieser Gene nach Behandlung mit 5-Aza-CdR mittels High-throughput Northern Blots. Es ergaben sich insgesamt acht Zielgene, welche eine Aktivierung sowohl durch Behandlung mit dem MEK-Inhibitor PD98059 als auch mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-CdR zeigten und damit einen Hinweis auf eine Kooperation zwischen Ras-Signalweg und Methylierung lieferten.

### 4.1 Zielgene

In Tabelle 1 sind die wichtigsten Informationen zu den acht Genen zusammengefasst. Die Namen der Gene wurden den Einträgen in Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=gene>) entnommen. Da mit Stand 02/2000 [Zuber et al., 2000] nicht alle Gene für die Ratte annotiert waren, wurden die Namen und Accession-Nummern nach dem besten Sequenzabgleich übernommen; die ggf. abweichende Spezies (m-Maus) ist angegeben. Nach Wiederholung der Sequenzabgleiche in der Datenbank konnten die Nummern mit dem Stand 01/2009 aktualisiert werden. Für Lysyl oxidase und Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 wurden in den Northern Blot-Untersuchungen, entgegen den aktuellen Datenbankeinträgen, jeweils zwei Banden detektiert (g. P. - größeres Produkt, k. P. - kleineres Produkt). Das jeweils kleinere Produkt stimmt mit den bekannten mRNA-Größen überein. Für das annotierte Follistatin-like 1 wird die Größe der mRNA mit 2283 bp angegeben, in den vorliegenden Untersuchungen lag die Größe der

detektierten mRNA bei ca. 4700 bp. Eine ebensolche Diskrepanz besteht für Lysyl oxidase, deren mRNA mit 1808 bp annotiert ist; das mRNA-Produkt der vorliegenden Untersuchungen liegt bei ca. 4500 bp. Die Genbezeichnung für Thrombospondin 1 hatte sich in dem Sequenzabgleich 02/2000 aus der größten Übereinstimmung mit einer in der Maus annotierten Sequenz ergeben. Die 01/2009 durchgeführte Analyse zeigte die Sequenzhomologie im Rattengenom 1028 bp vom Thrombospondin 1-Gen entfernt im 3`-Bereich. In der anderen Leserichtung liegt die Sequenz 2848 bp vom 5`-Ende von Similar to fibrous sheath interacting protein entfernt. Die Größe der Thrombospondin 1-mRNA wird mit 3734 bp angegeben, die von Similar to fibrous sheath interacting protein mit 1044 bp; die detektierte mRNA hat eine Größe von ca. 5500 bp. Da eine endgültige Zuordnung aktuell nicht möglich ist, wird die Bezeichnung Thrombospondin 1 beibehalten.

Als interner Standard für die Northern Blot-Untersuchungen diene Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH); die Größe der mRNA beträgt 1272 bp.

Tabelle 1: Übersicht über die Zielgene

(die Größe der detektierten mRNA ist gesondert angegeben, wenn abweichend zur Annotation, g. P. - größeres Produkt, k. P. - kleineres Produkt, m - Maus)

Genbezeichnung	Accessionnummer Stand 02/2000	Accessionnummer, Größe der mRNA Stand 01/2009
Clusterin ( <i>Clu</i> )	M64723	NM_053021, 1857 bp
Lysyl oxidase ( <i>Lox</i> )	U11038	NM_017061, 1808 bp abweichend: 4500 bp
Lysyl oxidase-like 2 ( <i>Loxl2</i> )	U89942	XM_214225, 2643 bp abweichend: g. P. 5000 bp, k. P. 2500 bp
Matrix metalloproteinase 2 ( <i>Mmp2</i> ), Gelatinase A	U65656	NM_031054, 3053 bp
Thrombospondin 1 ( <i>Thbs1</i> )	M62470 (m)	NM_011580, 3734 bp abweichend: 5500 bp
Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 ( <i>Timp2</i> )	S72594	NM_021989, 1656 bp abweichend: g. P. 3500 bp, k. P. 1500 bp
Follistatin-like 1 ( <i>Fstl1</i> ), TSC36	U06864 (m)	NM_024369, 2283 bp abweichend: 4700 bp
Lectin, galactoside-binding, soluble 3 binding protein ( <i>Lgals3bp</i> ), Peptidylprolyl Isomerase C-associated protein ( <i>Ppicap</i> )	AF065438	NM_139096, 2151 bp

## 4.2 Versuchsanordnung

In den Übersichtsversuchen wurden die Zelllinien 208F und FE-8 mit verschiedenen Inhibitoren behandelt und die mRNA zu einem Zeitpunkt extrahiert. Vierundzwanzig Stunden nach dem Ausplattieren, im Folgenden immer dem Zeitpunkt 0 h entsprechend, erfolgte die Behandlung der Zellen mit dem Inhibitor bzw. dem entsprechenden Lösungsmittel. Die Anwendung von 5-Aza-CdR fand, unter Berücksichtigung der Instabilität des Inhibitors und der verzögert einsetzenden Wirkung, zu den Zeitpunkten 0 h, 24 h, 48 h (mit Mediumwechsel) und 72 h statt. Für die Kombination der Inhibitoren 5-Aza-CdR und TSA erfolgte zunächst die beschriebene viertägige 5-Aza-CdR-Behandlung und zum Zeitpunkt 96 h dann die Behandlung mit Trichostatin A.

Tabelle 2: Behandlungsschema zum Übersichtsversuch

(Die Abfolge entspricht dem Probenauftrag von links nach rechts. „Kein Lösungsmittel“ heißt, dass der Inhibitor in PBS gelöst war und deshalb für die Kontrolle keine Behandlung vorgenommen wurde. MW - Mediumwechsel, 0 h - Bezugsgröße für die Behandlungszeitpunkte, entspricht vierundzwanzig Stunden nach dem Ausplattieren der Zellen)

Inhibitor	Konzentration des Inhibitors	Lösungsmittel	Zelldichte	Zeitpunkt der Behandlung	Zeitpunkt der RNA-Extraktion
5-Aza-CdR	0,1 µM	kein	$1,5 \times 10^5$	0 h, 24 h, 48 h + MW, 72 h	96 h
5-Aza-CdR + TSA	0,1 µM + 5 ng/ml	kein	$1,5 \times 10^5$	0 h, 24 h, 48 h + MW, 72 h (5-Aza-CdR); 96 h + MW (TSA)	120 h
TSA	5 ng/ml	Ethanol	$3 \times 10^5$	0 h	24 h
TSA	25 ng/ml	Ethanol	$3 \times 10^5$	0 h	24 h
U0126	10 µM	DMSO	$3 \times 10^5$	0 h	48 h
LY294002	10 µM	DMSO	$3 \times 10^5$	0 h	48 h
PD98059	50 µM	DMSO	$3 \times 10^5$	0 h	48 h
PD98059	50 µM	DMSO	$3 \times 10^5$	0 h	72 h

Um die Genexpressionsänderungen nach Inhibitorbehandlung über den Zeitverlauf zu beurteilen, wurden Zeitkinetiken durchgeführt. Von Interesse schienen Zeitpunkte zwischen 6 h und 96 h nach der Inhibitorbehandlung. Um eine ausreichende RNA-Ausbeute zu erzielen, gleichzeitig aber auf das Passagieren der Zellen verzichten zu können, wurde in den Ansätzen bzgl. der Zelldichte zwischen frühen, 6 h bis 24 h, und späten, 18 h bis 96 h, mRNA-Extraktionszeitpunkten differenziert. Ebenso musste die Toxizität des Inhibitors Berücksichtigung finden; für Behandlung mit TSA konnten die Zellen in einer größeren Dichte ausplattiert werden. Die RNA-Extraktion wurde zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h, 18 h, 24 h, 36 h, 48 h und 72 h, für U0126 und 5-Aza-CdR zusätzlich zum Zeitpunkt 96 h, für 5-Aza-CdR/TSA außerdem zum Zeitpunkt 120 h vorgenommen. Zur Objektivierung der Zelldichteveränderungen in den Zeitkinetiken wurden Zellzahlbestimmungen der unbehandelten, DMSO- und U0126-behandelten Zellen durchgeführt. Parallel zur Aufarbeitung der Zellen in den zeitabhängigen Versuchen erfolgte eine fotografische Dokumentation der Zellmorphologie.

Tabelle 3: Behandlungsschema der Zellen für die Zeitkinetiken (Einsatz der Lösungsmittel wie im Übersichtsversuch)

Zeitkinetik mit	Zelldichte 6 h - 24 h	Zelldichte ab 36 h	Zeitpunkte der Behandlung
5-Aza-CdR 0,1 µM	$3 \times 10^5$	$1,5 \times 10^5$	0 h, 24 h, 48 h + MW, 72 h
5-Aza-CdR 0,1 µM + TSA 5 ng/ml		$1,5 \times 10^5$	0 h, 24 h, 48 h + MW, 72 h (5-Aza-CdR); 96 h + MW (TSA)
U0126 10 µM	$5 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	0 h
TSA 25 ng/ml	$3 \times 10^5$	$3 \times 10^5$	0 h

Mittels Western-Blot-Analyse konnte die Wirkung von Trichostatin A auf die Acetylierung von H3 [Lund et al., 2006] und die Wirkung von PD98059 und U0126 auf die Phosphorylierung von ERK1,2 nachgewiesen werden.

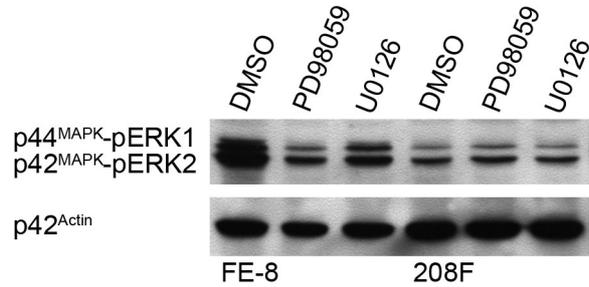


Abbildung 1: Western Blot-Analyse von p44<sup>MAPK</sup>-pERK1 und p42<sup>MAPK</sup>-pERK2 in den FE-8 und 208F Zellen nach Behandlung mit PD98059 und U0126

In den Zelllinien IR-1 und IR-4 mit induzierbarem *Hras* (G12V) kommt es bis 48 h nach IPTG-Zugabe zum Anstieg der Ras-Proteine. Innerhalb von 4 Tagen nach *Ras*-Promotor-Induktion vollzieht sich eine Änderung des Phänotyps der IR-Zellen mit Ähnlichkeit zu den FE-8 Zellen [Schäfer et al., 2003]. Da in diesen Systemen auch mögliche kurzfristige Änderungen der Genexpression hinterfragt werden können, wurde die Versuchsanordnung angepasst. Die Zellen wurden bis einschließlich 24 h in einer Dichte von  $5 \times 10^5$ , ab 48 h in einer Dichte von  $1 \times 10^5$  ausplattiert, 24 h später erfolgte die Zugabe von IPTG. Die mRNA-Extraktion wurde zu den Zeitpunkten 10 min, 30 min, 1 h, 2 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h nach IPTG-Gabe vorgenommen.

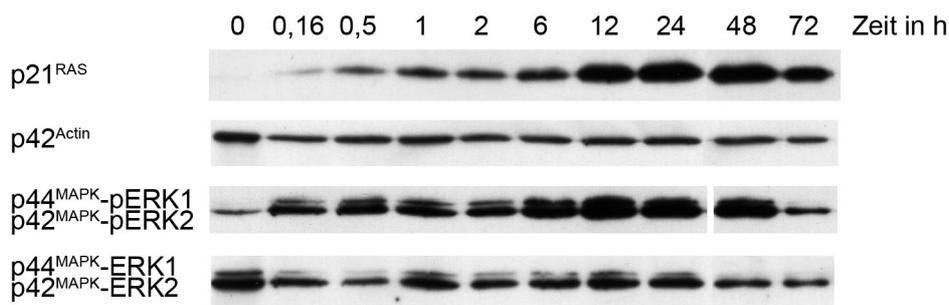


Abbildung 2: Western Blot-Analyse von p21<sup>RAS</sup> und pERK1/2 in den IR-4 Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Christine Sers, Jana Keil).

Lösungsmittelleffekte konnten durch Vergleichskinetiken unbehandelter und DMSO-behandelter 208F und FE-8 Zellen ausgeschlossen werden (Daten nicht gezeigt).

### 4.3 Ras-induzierte Änderung der Zellmorphologie

Die Morphologie der 208F Zellen ist abgeflacht (Abb. 3 A). Zunehmende Dichte führt zum Abrunden und in der Folge zum Abschwimmen der Zellen. Die Inhibitorenbehandlungen waren ohne Einfluss auf die Morphologie der 208F Zellen. FE-8 Zellen stellen sich spindelförmig mit Zellausläufern dar (Abb. 3 B). Bei zunehmender Dichte können FE-8 Zellen auch dreidimensional wachsen. Behandlung mit dem MEK1/2-Inhibitor U0126 zeigt bereits zum Zeitpunkt 6 h eine beginnende Rückbildung der Zellausläufer, die zum Zeitpunkt 12 h vollständig vollzogen ist (Abb. 3 C). Gleichzeitig kommt es zur Abflachung der Zellen mit Verlust der spindelförmigen Morphologie und zur Gruppierung der sonst eher isoliert liegenden Zellen (Abb. 3 D). Die Reversion der morphologischen Transformation bleibt über den gesamten Versuchszeitraum erhalten, auch bei steigender Zelldichte bleibt das Wachstum zweidimensional. Ebenso findet sich eine Reversion der FE-8 Zellen nach Anwendung von PD98059. Einsatz von LY294002 hat keine Auswirkung auf die Morphologie der FE-8 Zellen. 5-Aza-CdR bewirkt ab dem Zeitpunkt 6 h einen Rückgang der Zellausläufer bei gleichzeitig leichter Abflachung der FE-8 Zellen (Abb. 3 E). Die Effekte sind deutlich weniger eindrucksvoll als nach Behandlung mit U0126. Auch unter Einsatz von 25 ng/ml TSA kommt es in den FE-8 Zellen zu einem Rückgang der Zellausläufer. Des Weiteren zeigen sich in dieser Konzentration Effekte in Form einer Proliferationshemmung auf das Zellsystem 208F/FE-8. Ab dem Zeitpunkt 12 h finden sich abgerundete FE-8 Zellen, erst ab 48 h erholen sich die Zellen wieder.

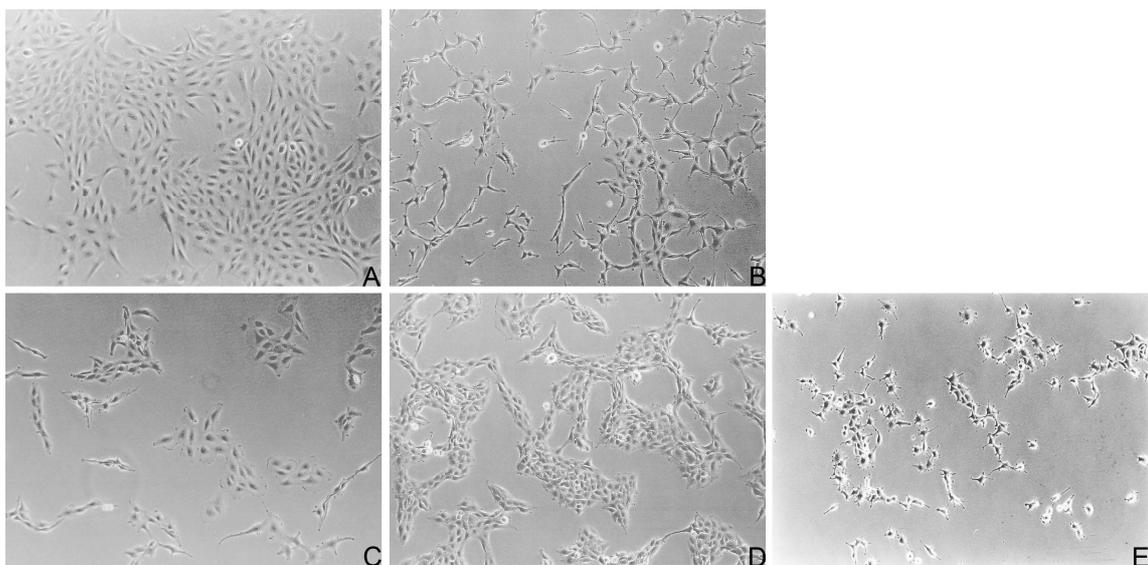


Abbildung 3: (A) 208F, unbehandelt, 48 h; (B) FE-8, unbehandelt, 24 h; (C) FE-8, U0126, 24 h; (D) FE-8, U0126, 48 h; (E) FE-8, 5-Aza-CdR, 36 h

## 4.4 Zelldichteänderungen

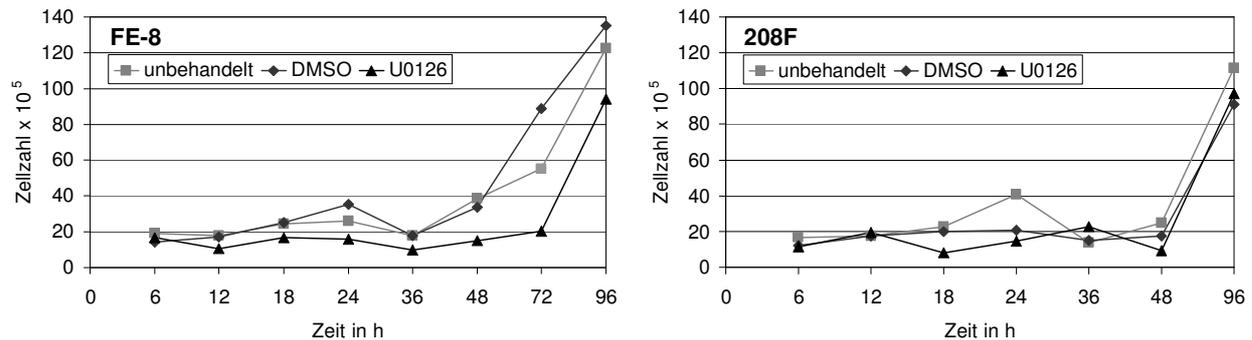


Abbildung 4: Zelldichteänderungen in FE-8 und 208F Zellen (aus technischen Gründen fehlt der 72h-Wert für die 208F Zellen)

## 4.5 Analyse der Genexpression in 208F und FE-8 Zellen

Für fast alle Zielgene ist eine Assoziation mit Neoplasien bekannt. Während Clusterin in Prozesse wie Zellzyklus-Regulation und Zell-Zell-Interaktion eingebunden ist, ist Lectin, galactoside-binding, soluble 3 binding protein (Lgals3bp) ein Bindungspartner adhäsionsmodellierender Proteine. Matrix Metalloproteinase 2 (Mmp2), Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (Timp2) und Thrombospondin 1 (Thbs1) sind Proteine der extrazellulären Matrix, wobei Mmp2 als Protease, Timp2 als Kollagenaseinhibitor und Thbs1 als ein multifunktionales Protein wirkt. Lysyl oxidase (Lox) katalysiert als Protein der extrazellulären Matrix die Verknüpfung von Kollagenen und Elastin; Lysyl oxidase-like 2 (Loxl2) ist Mitglied der Lysyl oxidase-Familie. Follistatin-like 1 (Fstl1) ist bisher wenig untersucht.

Die Ergebnisbeschreibung erfolgt für jedes Gen gesondert. Abgebildet sind sowohl die Rohdaten als auch die Auswertungsdiagramme. Zugrunde liegt die semiquantitative Auswertung der Northern Blot-Schwärzungsbanden.

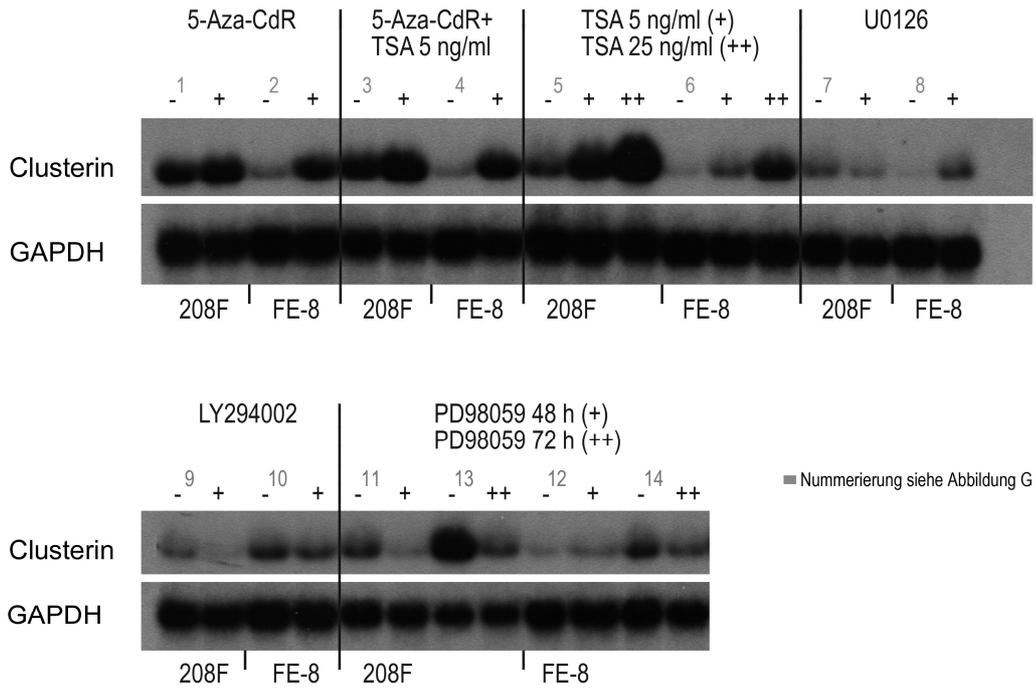
### 4.5.1 Clusterin

Das Ausgangsniveau der *Clusterin*-Expression beträgt in den FE-8 Zellen ca. ein Drittel des der 208F Zellen (Abb. 5 A, G). Die Inhibition von MEK, deutlicher unter U0126 als unter PD98059, führt zu einer Aufregulierung von *Clusterin* in den FE-8 Zellen (Abb. 5 A). In der Zeitkinetik mit U0126 ist *Clusterin* in den FE-8 Zellen zum Zeitpunkt 6 h bereits um den Faktor drei aufreguliert, bis zum Zeitpunkt 24 h wird eine Aktivierung um den Faktor sechs erreicht (Abb. 5 B, I). Zu den späteren Zeitpunkten ist eine leichte

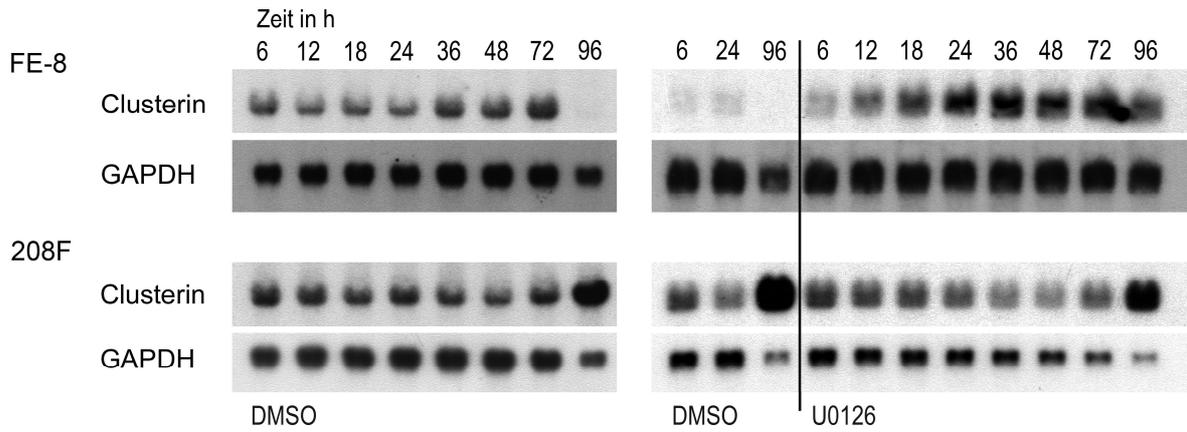
Abschwächung dieser Expressionsstärke zu beobachten. Die Zeitkinetiken der Zelllinien IR-1 und IR-4 zeigen eine beginnende Repression von *Clusterin* ab 6 h nach IPTG-Zugabe (Abb. 5 C, H), also zeitgleich mit der Induktion von p21<sup>RAS</sup> (Abb. 2). Zum Zeitpunkt 72 h beträgt die Expression nur noch ein Drittel im Vergleich zum Ausgangswert. Inhibition der PI3-Kinase in den FE-8 Zellen bleibt ohne Wirkung (Abb. 5 A). Sowohl Behandlung mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-CdR als auch dem Histondeacetylaseinhibitor TSA und Kombination beider Substanzen führen zu einem deutlichen Anstieg der *Clusterin*-Expression in den FE-8 Zellen (Abb. 5 A). Der stärkste Effekt, eine Verdreifachung, wird unter 25 ng/ml TSA erreicht. In der Kinetik hat die Behandlung mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-CdR in den FE-8 Zellen eine Aufregulierung von *Clusterin* nach dem Zeitpunkt 12 h zur Folge (Abb. 5 D, K). Bis zum Zeitpunkt 18 h wird eine Steigerung um den Faktor zwei, bis 36 h um den Faktor vier erreicht. Zum Zeitpunkt 120 h bewirkt 5-Aza-CdR eine Aufregulierung um den Faktor acht, in Kombination mit dem Histondeacetylaseinhibitors TSA sogar um den Faktor neun (Abb. 5 D, K). Dieser Effekt ist übereinstimmend mit den Daten aus dem Übersichtsversuch. Wie aus der TSA-Zeitkinetik ersichtlich, hat bereits zum Zeitpunkt 6 h eine deutliche Expressionssteigerung von *Clusterin* in den FE-8 Zellen stattgefunden, das Maximum wird zum Zeitpunkt 36 h erreicht (Abb. 5 E, M). Durch Ausschaltung der *DNA-Methyltransferase 1* mittels RNAi wird *Clusterin* in den FE-8 Zellen reexprimiert (Abb. 5 F).

Im Übersichtsversuch zeigt die Inhibition der Ras-abhängigen Signalwege in den 208F Zellen eine Abnahme der *Clusterin*-Expression (Abb. 5 A; für LY unbehandelt am ehesten Hybridisierung insuffizient). In der U0126-Kinetik ist diese allerdings nicht reproduziert (Abb. 5 B, J). Für die unbehandelten 208F Zellen ist in den Kinetiken ab 72 h eine starke Erhöhung der *Clusterin*-Expression zu beobachten (Abb. 5 B, D, E, J, L, N), wobei zu diesem Zeitpunkt die Zelldichte stark zunimmt und sich bei 96 h einer Konfluenz von 100 % nähert (Abb. 4) Behandlung mit U0126 führt zu einer ähnlichen Expressionssteigerung (Abb. 5 B, J), so dass es sich um keinen Inhibitoreffekt handelt. Unter 5-Aza-CdR finden sich keine Änderungen der *Clusterin*-Expression, unter TSA, übereinstimmend mit dem Übersichtsversuch, eine Aufregulierung zwischen 6 h und 48 h (Abb. 5 A, E).

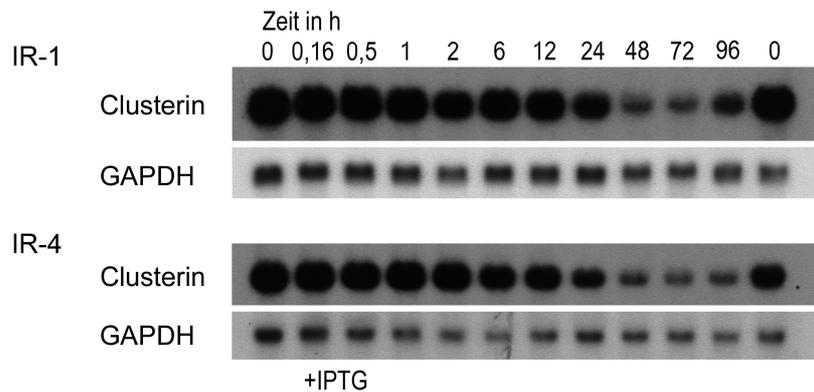
**A**



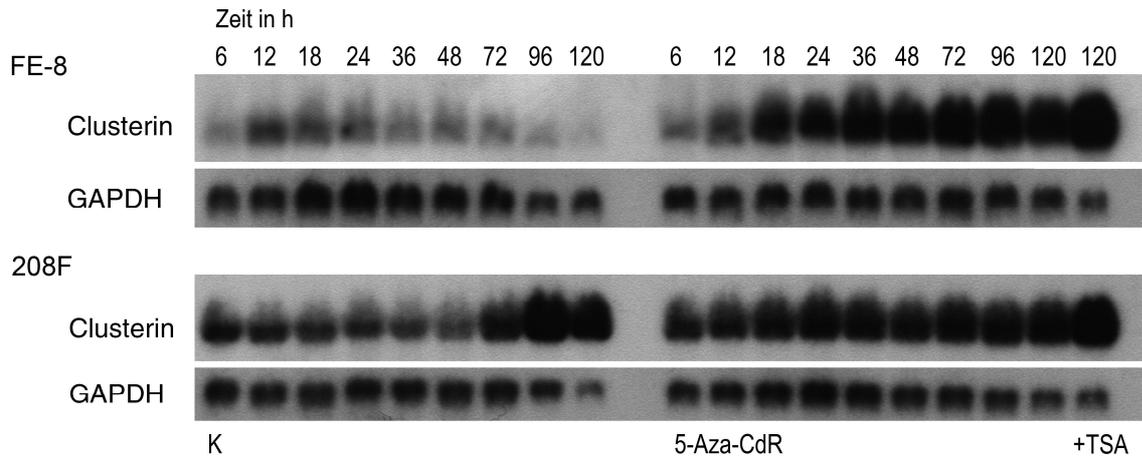
**B**



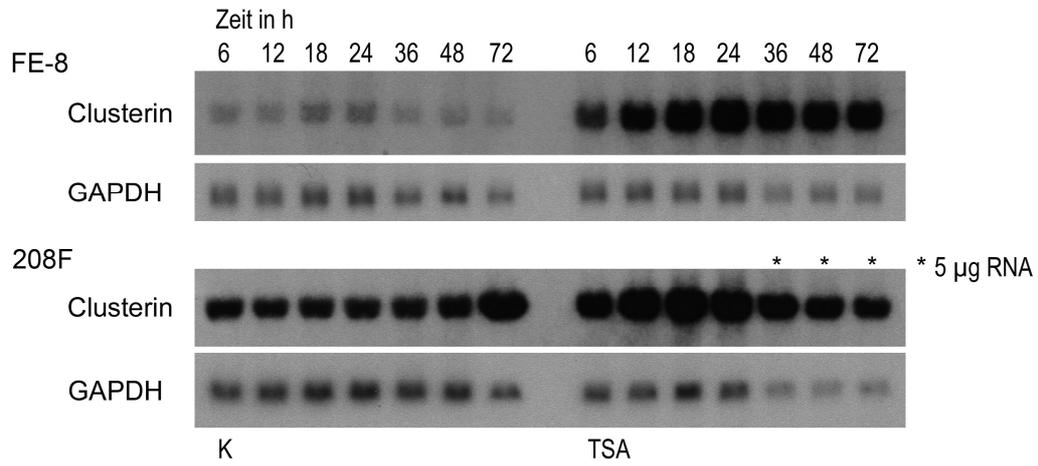
**C**



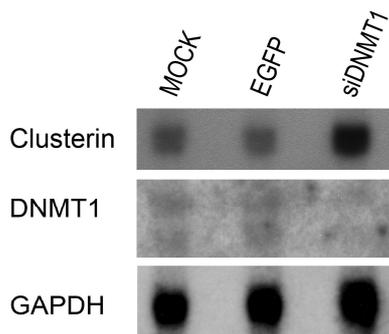
D



E



F



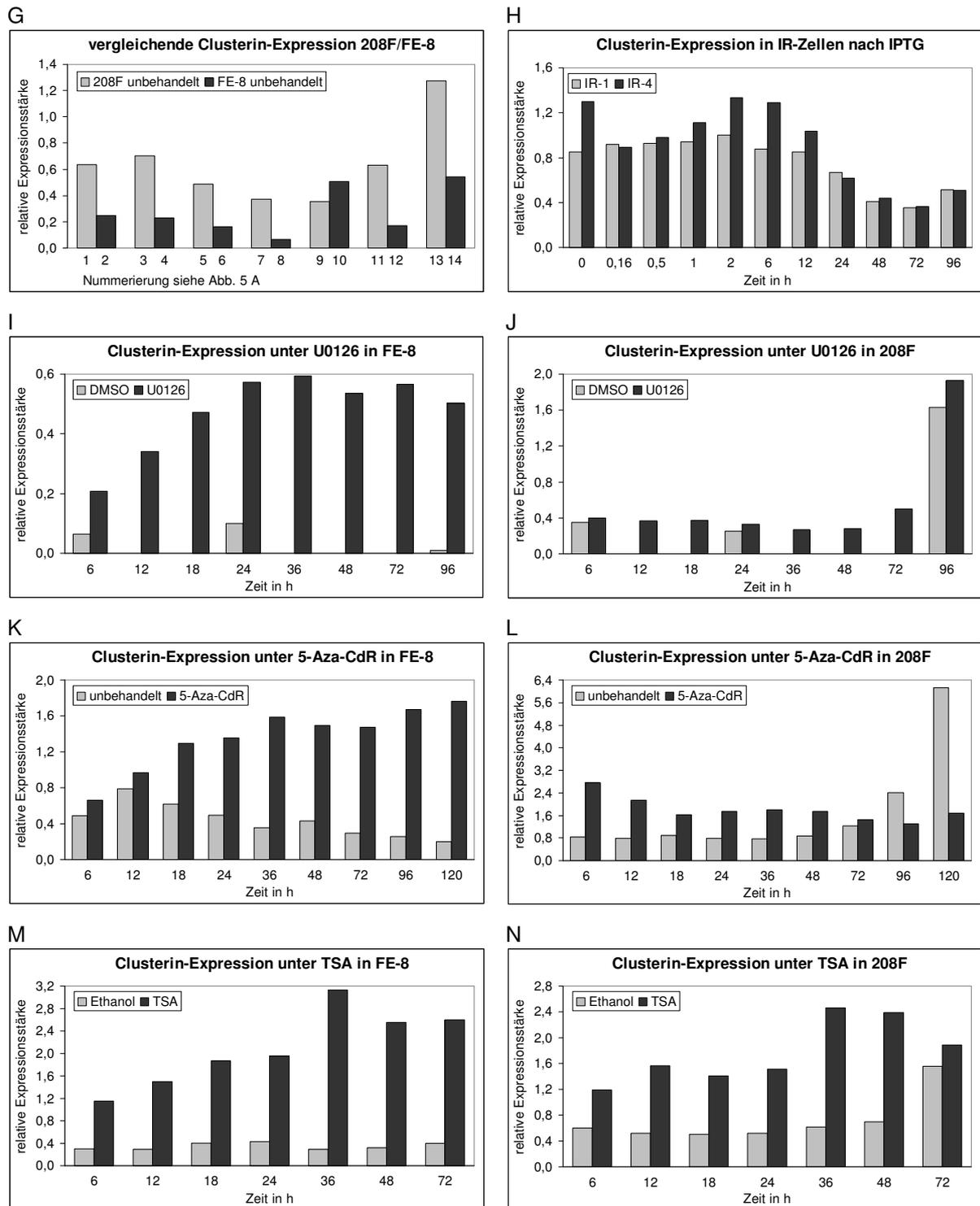


Abbildung 5: Clusterin (A-F) Northern Blots, (G-N) Auswertungsdiagramme

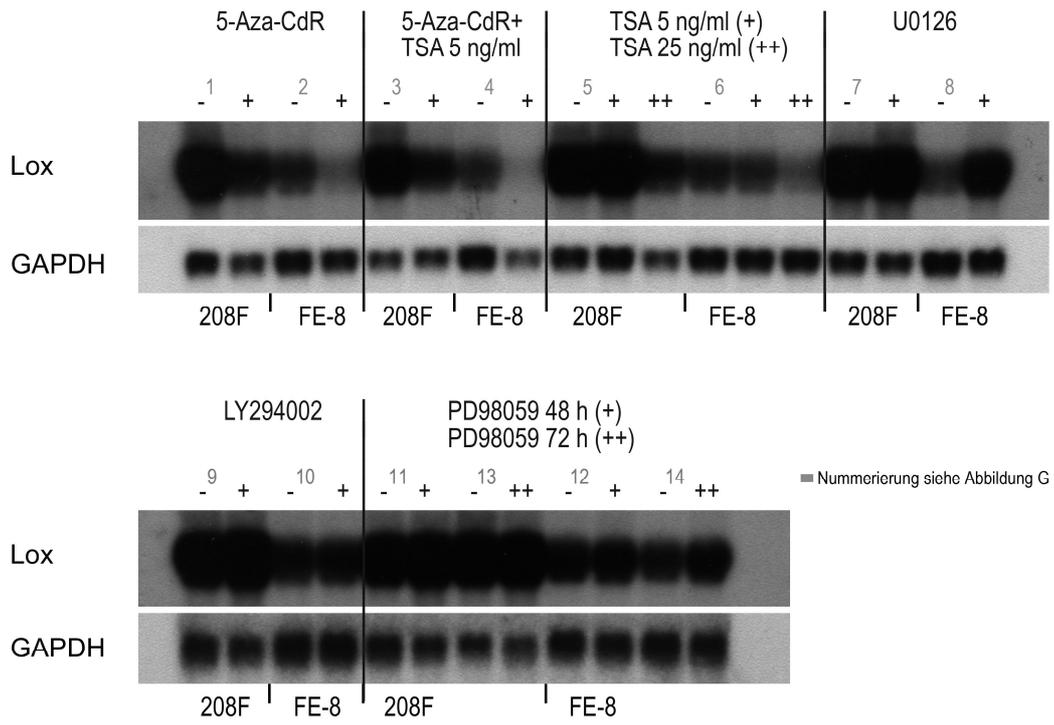
#### 4.5.2 Lysyl oxidase

In den Northern Blot-Untersuchungen wurde *Lysyl oxidase* als ein ca. 4500 bp großes Transkriptionsprodukt detektiert, in der Annotation wird die mRNA mit einer Größe von 1808 bp angegeben. Eine Heterogenität der Sequenzlängen von *Lysyl oxidase* ist bekannt und ist auf posttranskriptionale Polyadenylierung zurückzuführen [Boyd et al., 1995].

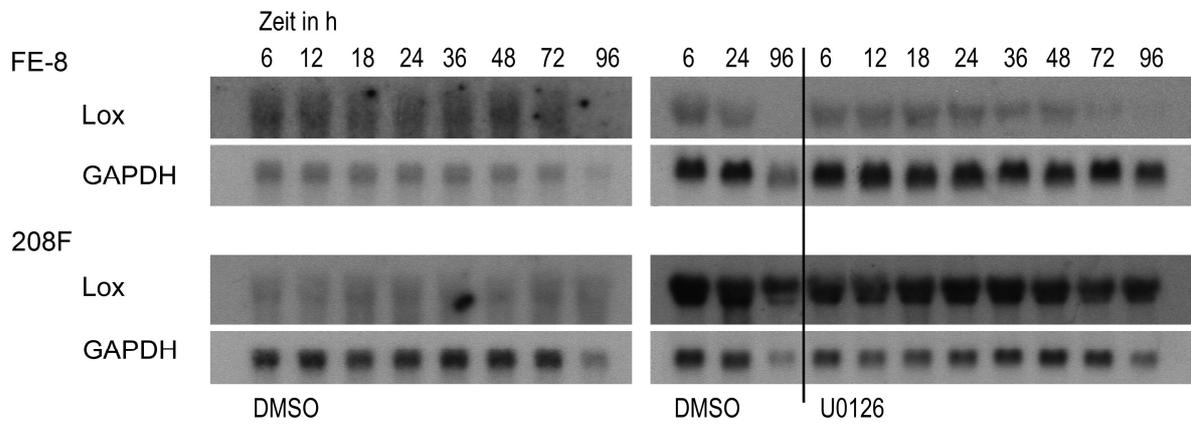
Der Expressionslevel von *Lysyl oxidase* in den FE-8 Zellen ist zwei Drittel bis halb so groß wie in den 208F Zellen (Abb. 6 A, G). Inhibition von MEK in den FE-8 Zellen durch PD98059 zeigt eine schwache, durch U0126 eine stärkere Expressionssteigerung für den Untersuchungszeitpunkt 48 h im Übersichtsversuch (Abb. 6 A). In der Zeitkinetik mit U0126 ist diese Aktivierung allerdings nicht reproduziert (Abb. 6 B, I). In den IR-Zellen (aus technischen Gründen fehlen die Daten der IR-1 Zellen) bewirkt die Induktion von *Ras* zunächst eine Aufregulierung der *Lysyl oxidase*-Expression, ab dem Zeitpunkt 6 h kommt es zu einer Suppression. Das Minimum liegt nach densitometrischer Auswertung mit einem Fünftel des ursprünglichen Expressionsniveaus bei 48 h (Abb. 6 C, H). Inhibition des PI3K-Signalwegs hat keine Auswirkungen auf die *Lysyl oxidase*-Expression in den FE-8 Zellen (Abb. 6 A). Behandlung mit 5-Aza-CdR, TSA und in Kombination führt zu einer Repression von *Lysyl oxidase* (Abb. 6 A) Die Kombination beider Substanzen bewirkt dabei eine stärkere Suppression der *Lysyl oxidase*-Expression als die Behandlung mit 5-Aza-CdR alleine (Abb. 6 A, D). In der 5-Aza-CdR-Zeitkinetik zeigt sich bis 72 h eine erniedrigte Expression der *Lysyl oxidase* unter 5-Aza-CdR im Vergleich zu den unbehandelten FE-8 Zellen. Zu den Zeitpunkten 96 h und 120 h ist die *Lysyl oxidase*-Expression in den Kontrollen ebenfalls vermindert, weshalb sich nach Normalisierung für diese späteren Zeitpunkte keine Effekte mehr ergeben (Abb. 6 D, K).

In den 208F Zellen zeigen sich unter Inhibition der Ras-Signalwege keine Expressionsänderungen der *Lysyl oxidase* (Abb. 6 A, B, J). Die Repression unter 5-Aza-CdR im Übersichtsversuch ist in der Kinetik nicht reproduziert (Abb. 6 A, D, L). Unter der Kombinationsbehandlung 5-Aza-CdR/TSA findet sich sowohl im Übersichtsversuch als auch in der Kinetik eine Suppression von *Lox* (Abb. 6 A, D).

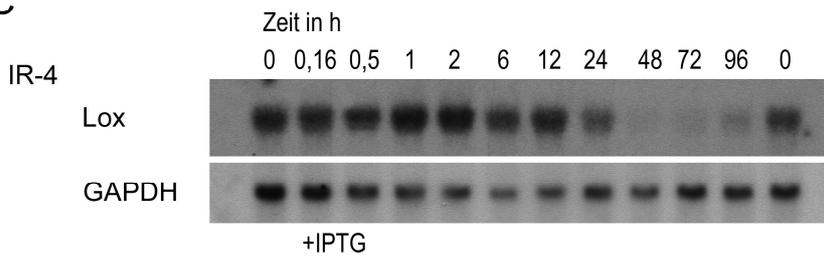
**A**



**B**

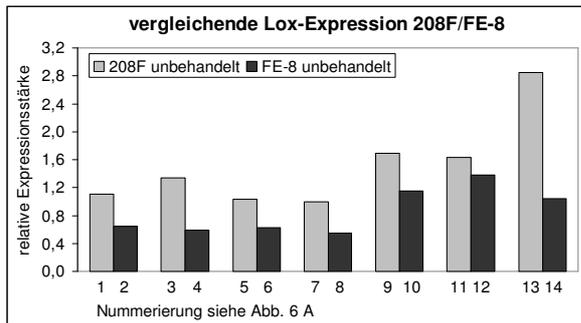


**C**

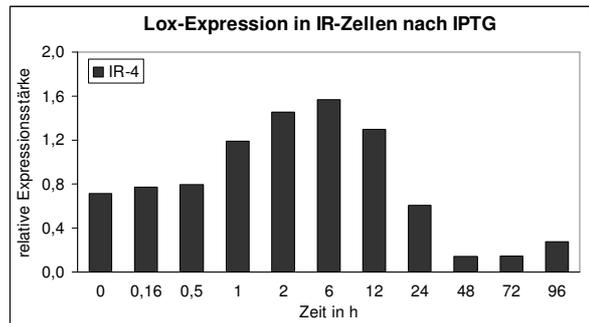




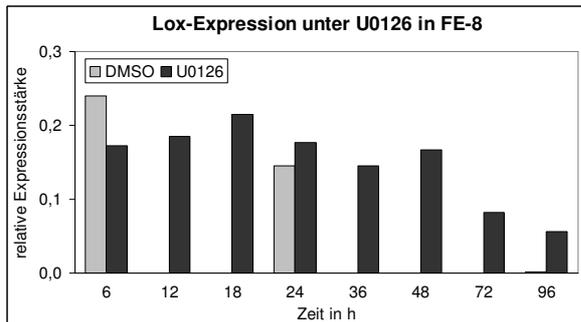
G



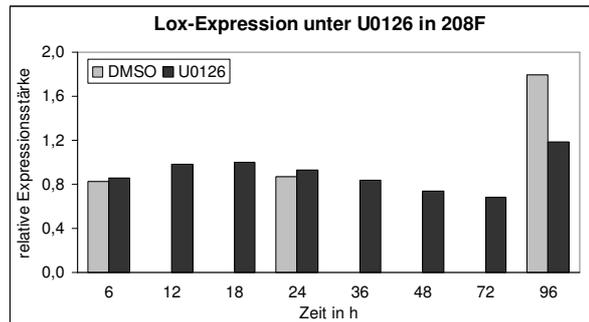
H



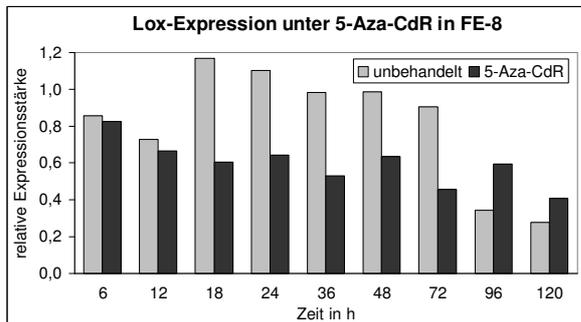
I



J



K



L

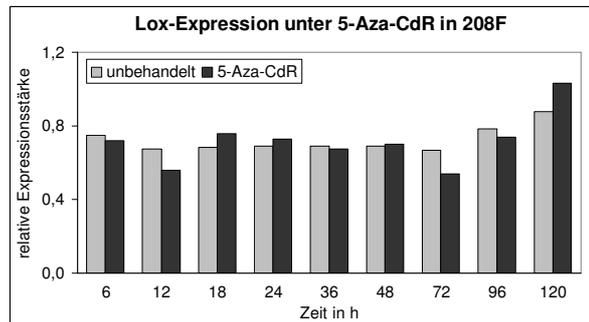


Abbildung 6: Lysyl oxidase  
(A-D) Northern Blots, (G-L) Auswertungsdiagramme

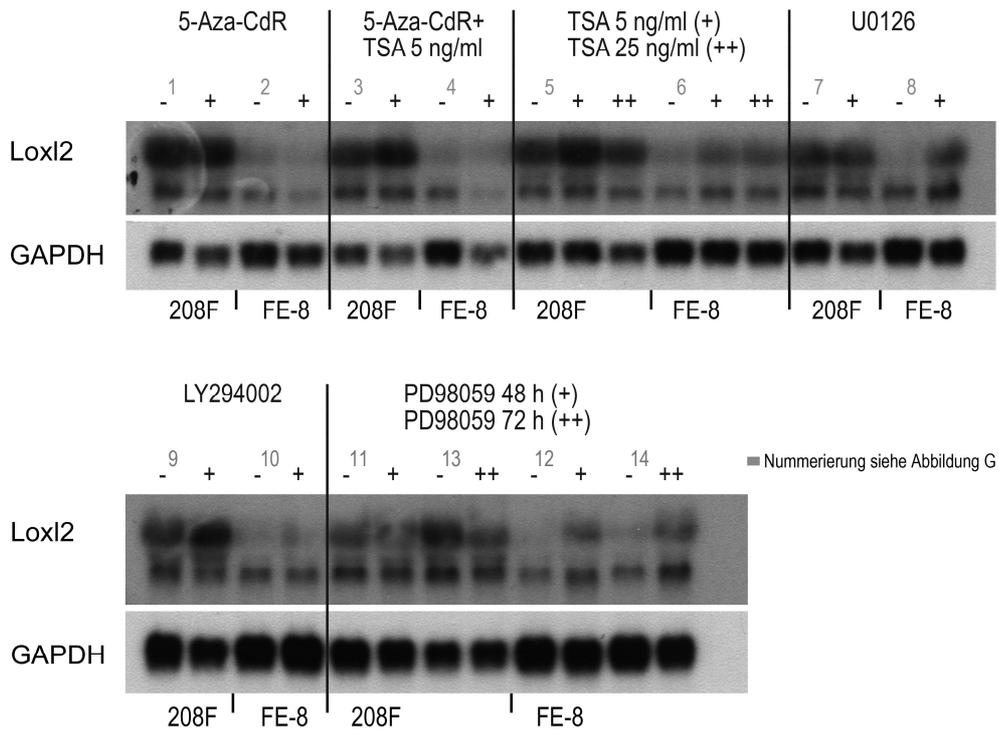
### 4.5.3 Lysyl oxidase-like 2

*Lysyl oxidase-like 2* stellt sich im Northern Blot als Doppelbande dar. Die Größe der unteren Bande stimmt mit den in der Datenbank annotierten 3179 bp überein, während eine weitere Bande für ein ca. 5000 bp großes Transkriptionsprodukt nachweisbar ist. Ein entsprechendes Genprodukt ist bisher nicht beschrieben. Beide Transkriptionsprodukte sind ähnlich reguliert, wobei die beobachteten Effekte für das 5000 bp Produkt zum Teil stärker sind.

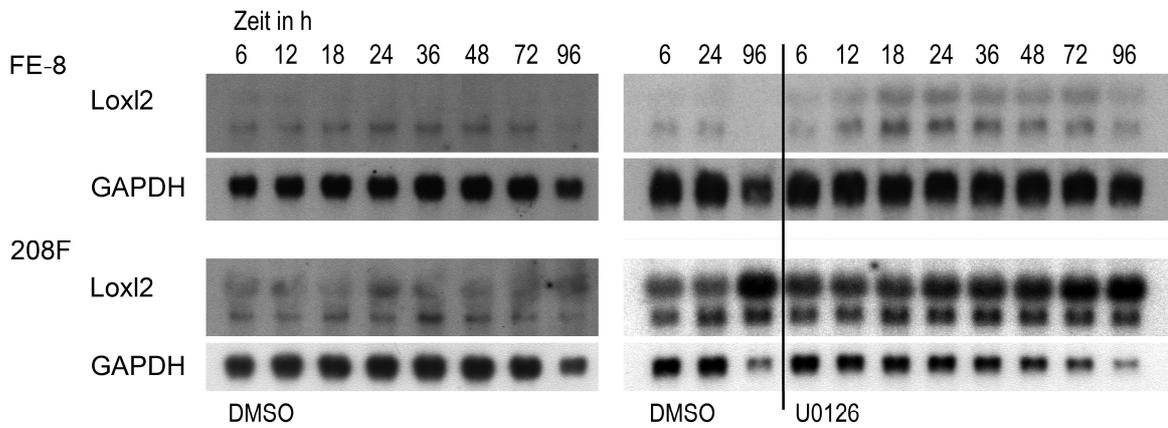
Das Expressionsniveau von *Loxl2* ist in den 208F im Vergleich zu den FE-8 Zellen durchschnittlich zwei- bis dreifach höher (Abb. 7 A, G). Inhibition des MEK/ERK-Signalwegs mit U0126 und PD98059 bewirkt in den FE-8 Zellen eine Aufregulierung um den Faktor drei und erreicht damit das Niveau der unbehandelten 208F Zellen (Abb. 7 A). In der Kinetik mit dem MEK-Inhibitor U0126 zeigt sich in den FE-8 Zellen ab 6 h eine Steigerung der *Loxl2*-Expression, die bis 18 h ihr Maximum erreicht. Zu den weiteren Zeitpunkten bleibt diese Aktivierung bestehen (Abb. 7 B, I). In den IR-Zellen führt die *Ras*-Induktion zu einer Repression der *Loxl2*-Expression. Das Minimum der Expression wird bei 48-72 h erreicht und beträgt ein Viertel im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (Abb. 7 C, H). Hemmung des PI3K-Signalwegs zeigt keine Effekte (Abb. 7 A). Eine Regulierung der *Lysyl oxidase-like 2*-Expression nach Behandlung mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-CdR ist im Übersichtsversuch nicht erkennbar (Abb. 7 A). Auch in der Kinetik zeigt demethylierende Behandlung der FE-8 zunächst keine Änderungen der Expression. Erst ab 72 h ist ein Anstieg zu verzeichnen (Abb. 7 D, K). Kombination von 5-Aza-CdR mit TSA führt sowohl im Übersichtsversuch als auch in der Kinetik zu einer Aufregulierung; ebenso die alleinige Behandlung mit dem Histondeacetylaseinhibitor TSA im Übersichtsversuch (Abb. 7 A, D).

Die Expression von *Loxl2* in den 208F Zellen bleibt von der Inhibition der Ras-abhängigen Signalwege unberührt (Abb. 7 A). Ähnlich wie in den Untersuchungen zu *Clusterin* steigt die *Loxl2*-Expression in der Kontrollkinetik der 208F Zellen für die Zeitpunkte ab 72 h deutlich an (Abb. 7 B, D, J, L). Unter der Behandlung mit 5-Aza-CdR und TSA finden sich keine spezifischen Effekte (Abb. 7 A, D, L).

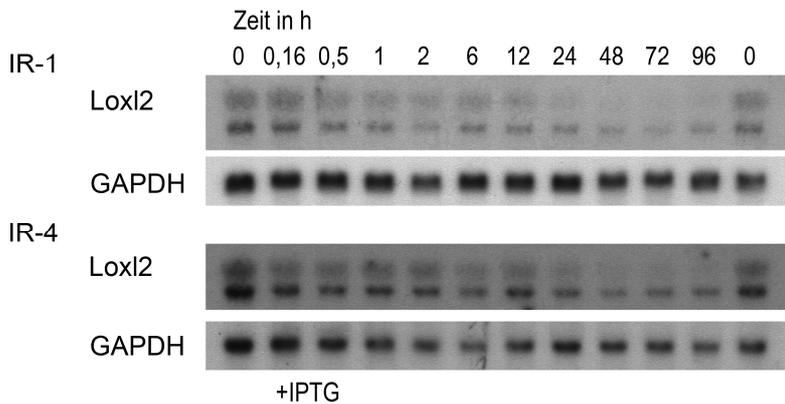
**A**



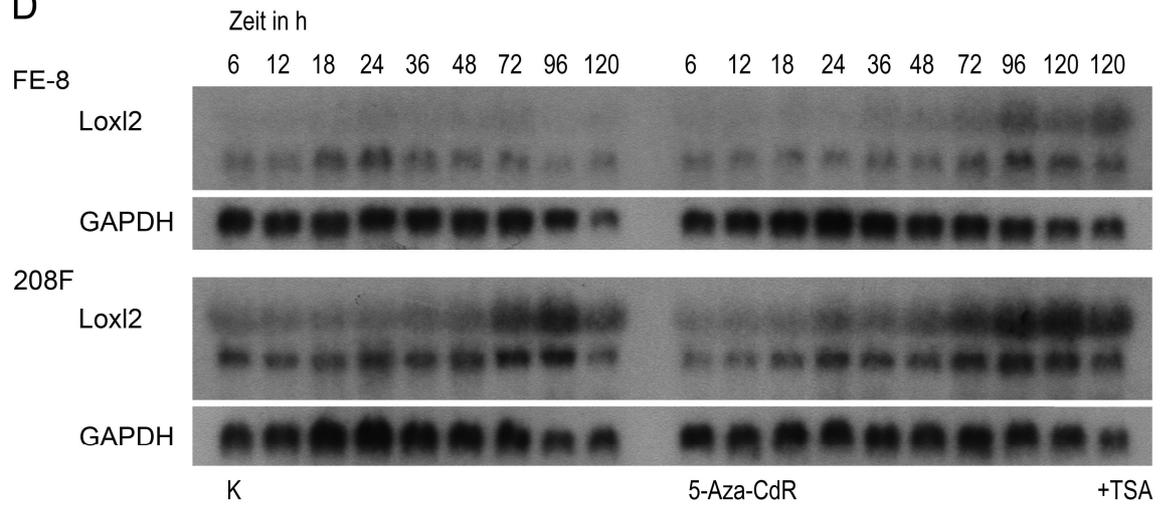
**B**



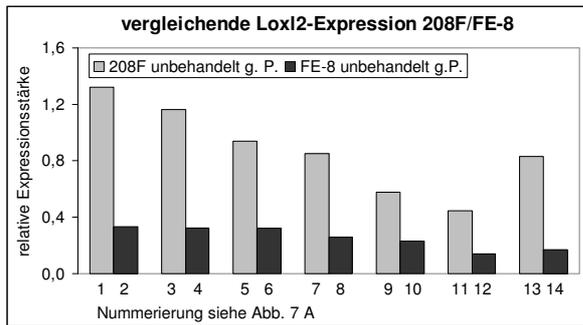
**C**



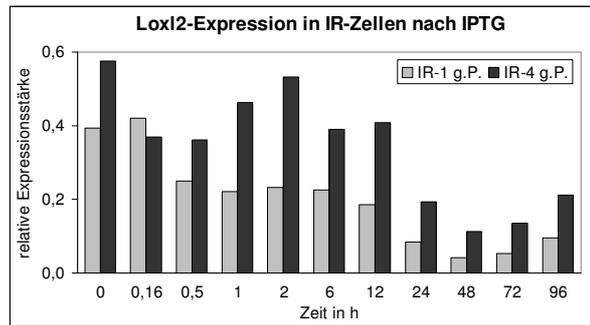
D



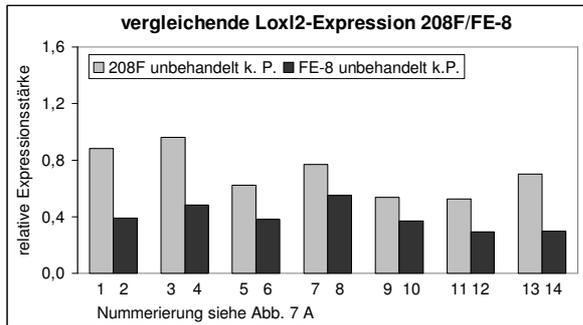
G1



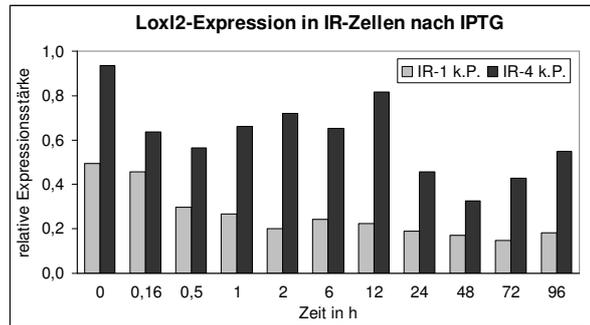
H1



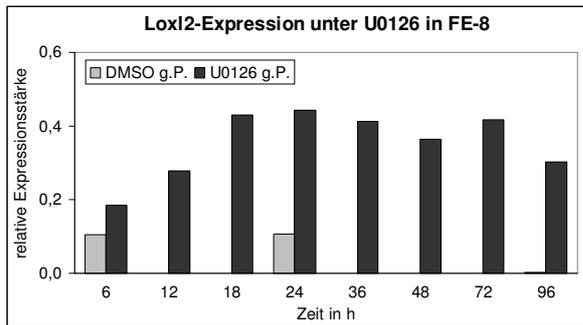
G2



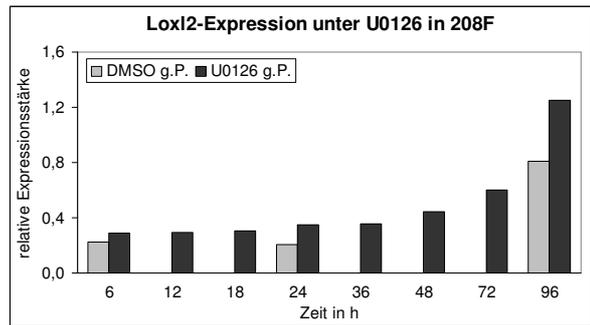
H2



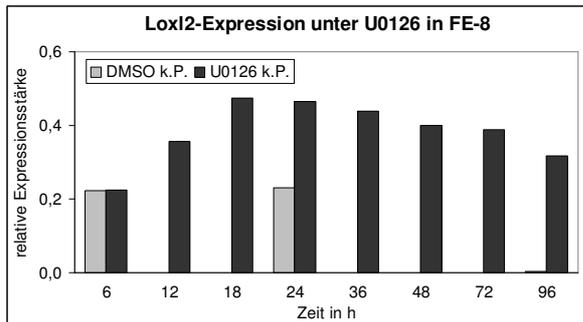
I1



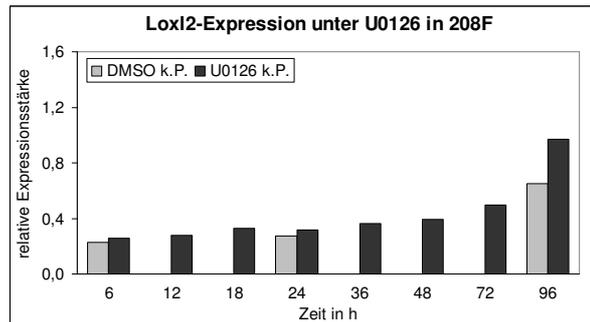
J1



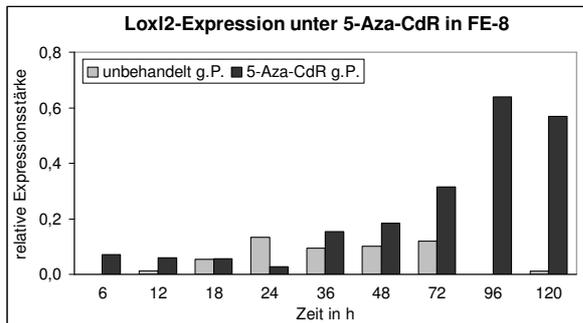
I2



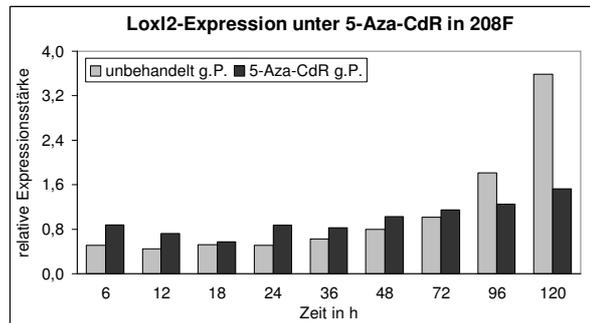
J2



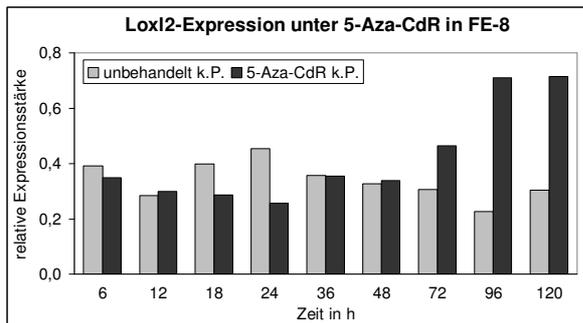
K1



L1



K2



L2

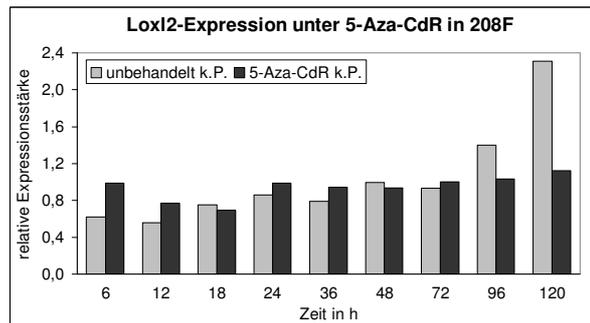


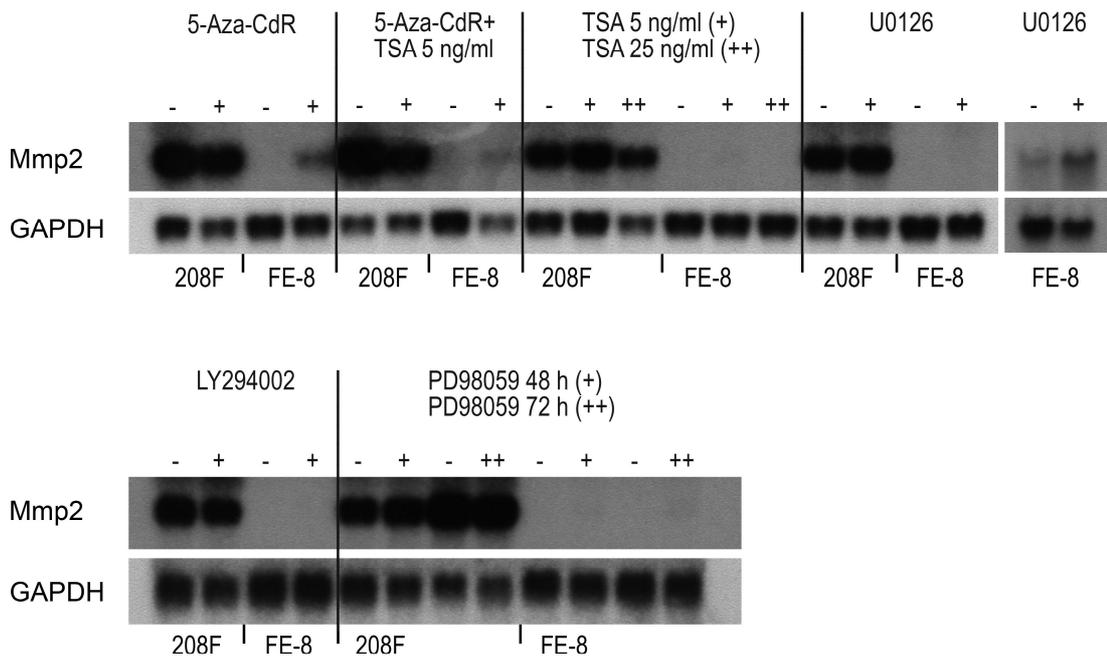
Abbildung 7: Lysyl oxidase-like 2  
(A-D) Northern Blots, (G-L) Auswertungsdiagramme

#### 4.5.4 Matrix Metalloproteinase 2

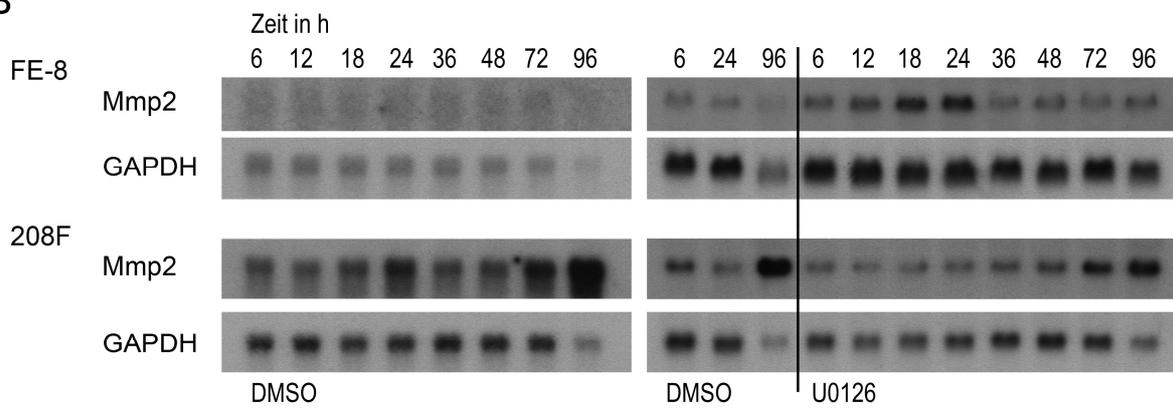
Während die *Matrix Metalloproteinase 2* in den 208F Zellen gut exprimiert wird, ist sie in den FE-8 Zellen kaum nachweisbar (Abb. 8 A). Für die Auswertung der Daten der FE-8 Zellen mussten deshalb länger exponierte Filme herangezogen werden. Inhibition des MEK/ERK-Signalwegs führt zu einer Verdopplung des *Mmp2*-Expressionsniveaus in den FE-8 Zellen, welches jedoch aufgrund des niedrigen Ausgangswertes sehr gering ist (Abb. 8 A oben rechts). In der Zeitkinetik mit dem MEK-Inhibitor U0126 wird bis zum Zeitpunkt 24 h eine Aufregulierung um den Faktor drei erreicht (Abb. 8 B, I). Für die späteren Untersuchungszeitpunkte geht die Aktivierung zurück, zum Zeitpunkt 48 h, übereinstimmend mit den Daten aus dem Übersichtsversuch, auf den Faktor zwei (Abb. 8 B, A, I). In den IR-Zellen beginnt die transkriptionelle Repression von *Mmp2* ab dem Zeitpunkt 6 h, nachdem in den IR-4 Zellen zwischen 2 h und 6 h eine intermittierende *Mmp2*-Aufregulierung zu verzeichnen war. Zum Zeitpunkt 72 h ist das Expressionsniveau in den IR-4 Zellen auf die Hälfte, in den IR-1 Zellen auf ein Fünftel vermindert (Abb. 8 C, H). Eine Beurteilung der PI3K-Inhibition in den FE-8 Zellen ist nicht möglich, da die Northern Blot-Membran nicht ausreichend lange exponiert wurde. Behandlung mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-CdR führt zu einer Aufregulierung von *Mmp2* (Abb. 8 A). In der Kinetik beginnt diese ab dem Zeitpunkt 18 h und erreicht bis 96 h den Faktor sechs (Abb. 8 D, K). Die Kombination der Inhibitoren 5-Aza-CdR und TSA, übereinstimmend in Übersichtsversuch und Kinetik, erreicht zum Zeitpunkt 120 h dieses Niveau nicht (Abb. 8 A, D). Expressionssteigerungen von *Mmp2* in den FE-8 Zellen nach Behandlung mit TSA finden sich für die Zeitpunkte 6 h und 12 h sowie ab 48 h (Abb. 8 E, M). Ausschaltung von *DNMT1* mittels RNAi führt zu einer Reexpression von *Mmp2* in den FE-8 Zellen (Abb. 8 F).

Die 208F Zellen zeigen keine Änderungen der *Mmp2*-Expression bei Inhibition der untersuchten Ras-Signalwege (Abb. 8 A, B, J). Wie für die bereits beschriebenen Gene *Clusterin* und *Lysyl oxidase-like 2* findet sich in den Kinetiken der unbehandelten und behandelten 208F Zellen zu den späten Untersuchungszeitpunkten, einhergehend mit starker Zelldichtezunahme, eine Expressionssteigerung (Abb. 8 B, D, E, J, L, N). Inhibitorspezifische Effekte unter 5-Aza-CdR, TSA oder in Kombination sind nicht auffällig (Abb. 8 D, E, L, N).

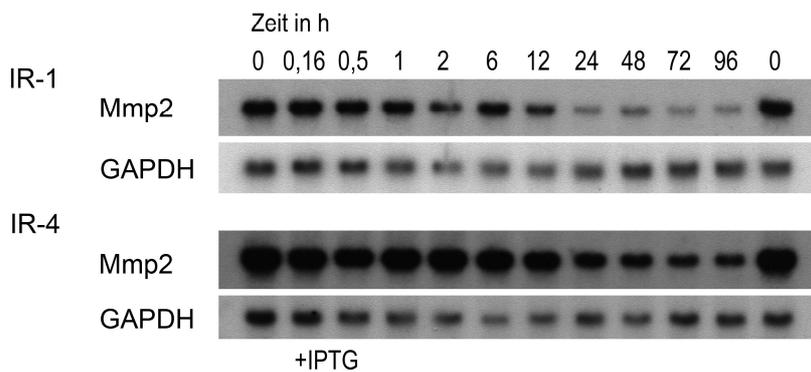
**A**



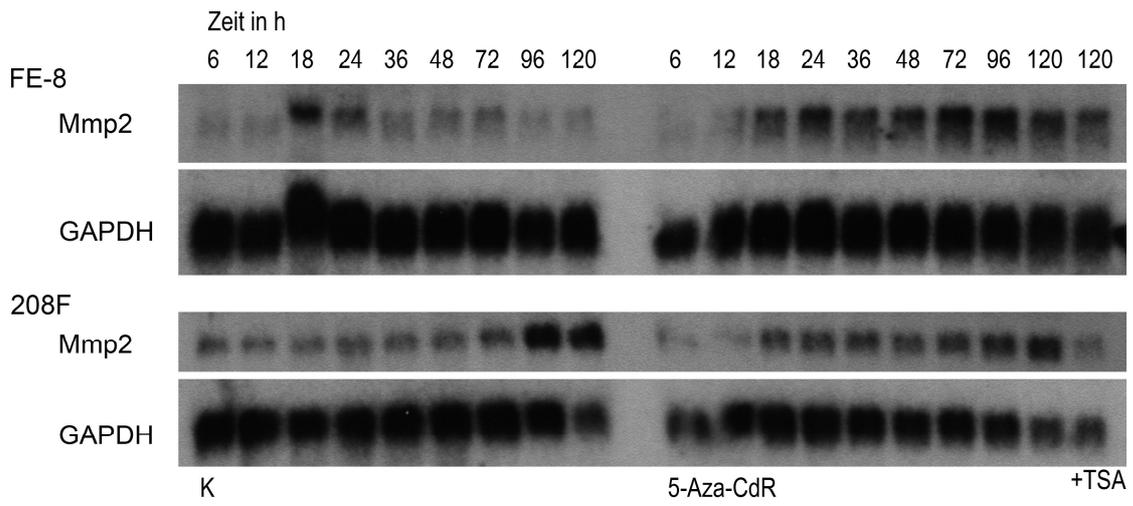
**B**



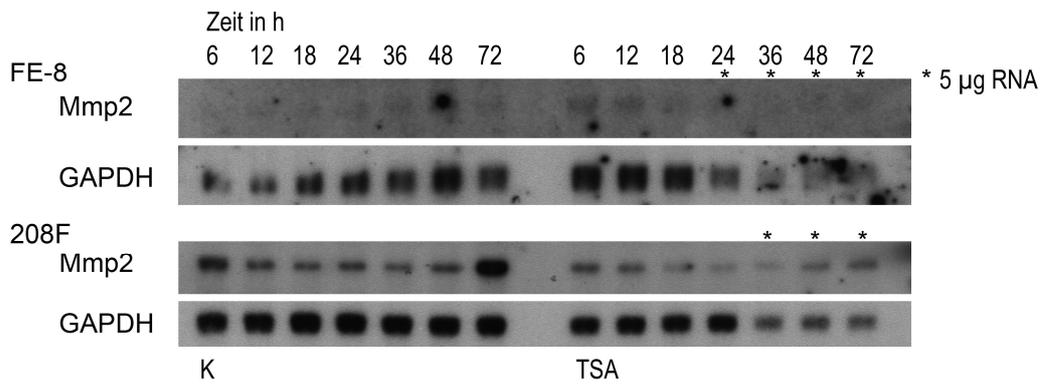
**C**



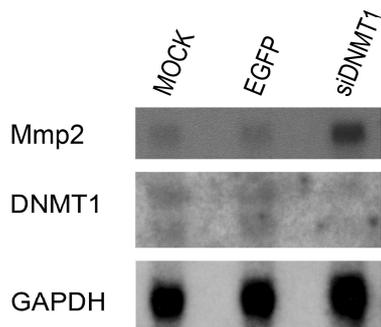
D



E



F



G  
eine vergleichende Mmp2-Expression 208F/FE-8  
ist nicht möglich, da der sehr hohe  
Expressionsunterschied beider Zelllinien  
nicht auf einem Film abgebildet werden kann

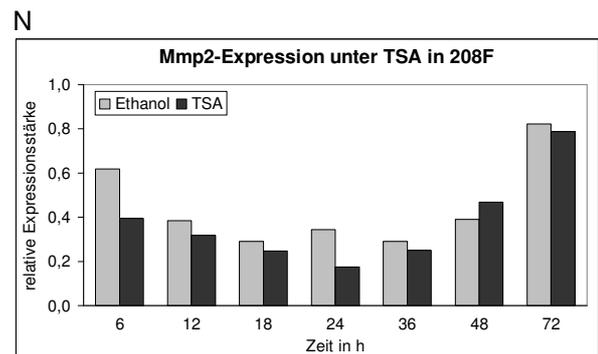
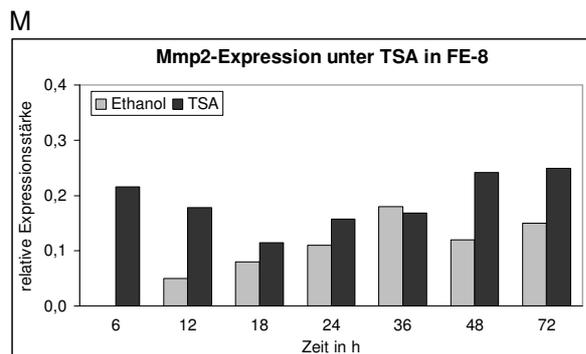
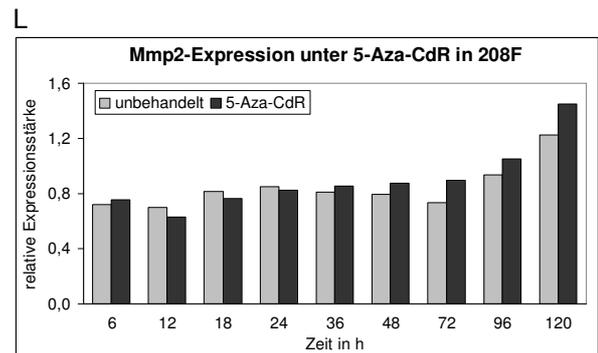
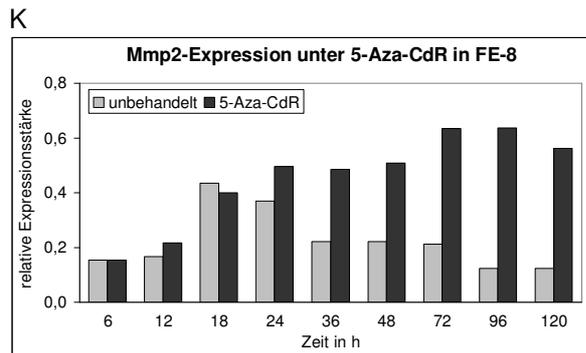
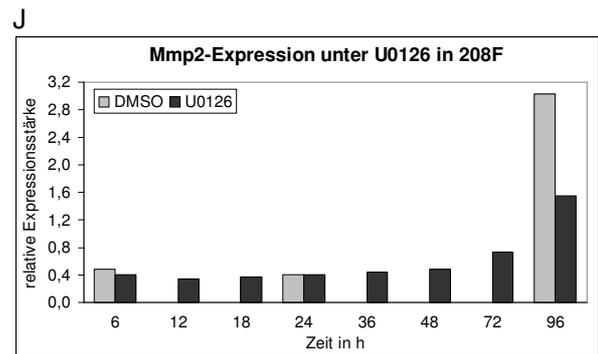
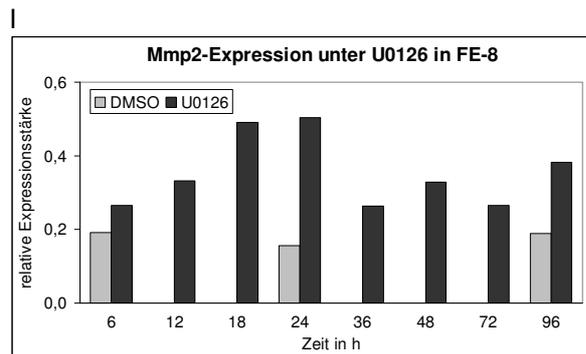
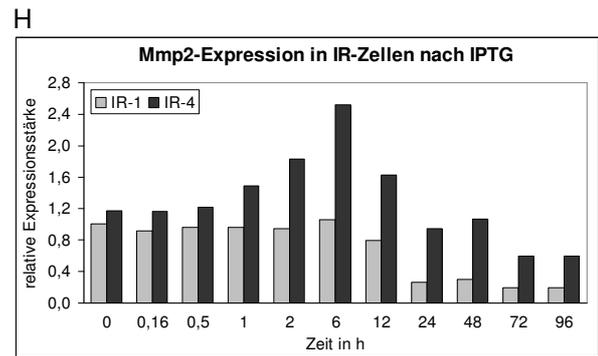


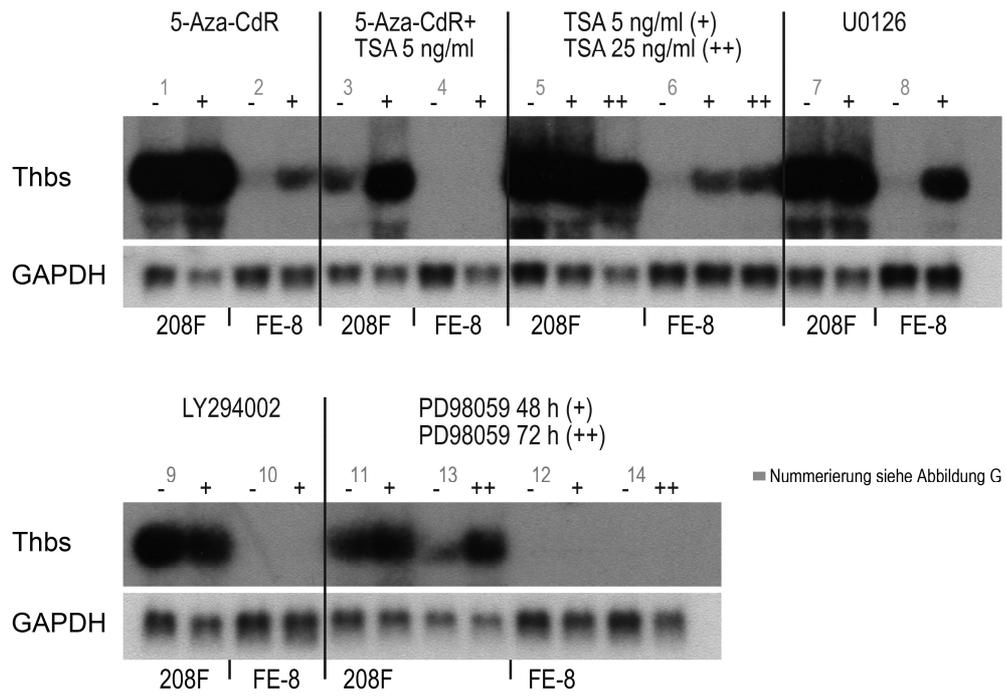
Abbildung 8: Matrix Metalloproteinase 2  
(A-F) Northern Blots, (G-N) Auswertungsdiagramme

#### 4.5.5 Thrombospondin 1

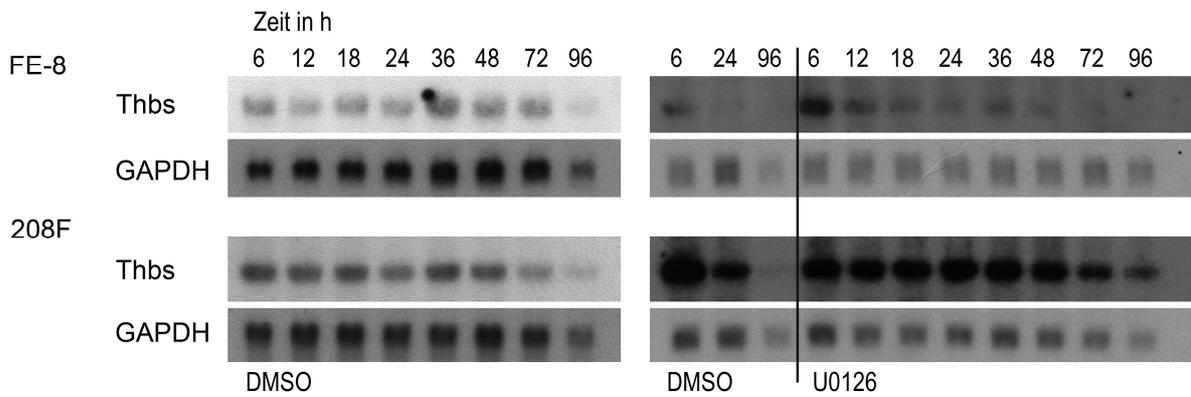
Das *Thbs1*-Ausgangsniveau liegt in den 208F Zellen ein Vielfaches über dem der FE-8 Zellen (Abb. 9 A, G). Aufgrund dieser starken Unterschiede im Expressionsniveau mussten für die Auswertung unterschiedlich lang exponierte Filme herangezogen werden. Behandlung mit U0126 bewirkt in den FE-8 Zellen eine Steigerung der *Thbs1*-Expression, im Übersichtsversuch zum Zeitpunkt 48 h um den Faktor zwei (Abb. 9 A). In der Kinetik der FE-8 Zellen zeigt sich das Niveau der *Thbs1*-Expression unter U0126 bereits zum Zeitpunkt 6 h doppelt so hoch wie in der Kontrolle (Abb. 9 B, I). Sowohl Kontrollkinetik als auch Behandlungskinetik führen dann, unter Konstanz des Expressionsunterschieds, über 96 h zu einer Abnahme der *Thbs1*-Expression. Für den Zeitpunkt 48 h sind die Daten aus dem Übersichtsversuch mit denen aus der Kinetik übereinstimmend; zum Zeitpunkt 96 h ist die *Thbs1*-mRNA in U0126 und DMSO-behandelten FE-8 Zellen auf derselben Membran bis unter die Nachweisgrenze vermindert (Abb. 9 B, A, I). Unter PD98059 zeigt sich zum Untersuchungszeitpunkt 48 h eine leichte Aufregulierung, bei derselben Expositionszeit des Filmmaterials wird zum Zeitpunkt 72 h keine mRNA mehr detektiert (Abb. nicht gezeigt). In den IR-Zellen ist zum Zeitpunkt 10 min nach Ras-Induktion die *Thbs1*-Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen bereits verdoppelt, bleibt bis zum Zeitpunkt 12 h auf diesem Niveau und wird zwischen 12 h und 24 h um den Faktor drei bis vier supprimiert, wodurch der Level in den Kontrollzellen unterschritten wird. Nach 48 h steigt die Expression erneut an und erreicht zum Zeitpunkt 96 h wieder das Niveau der unbehandelten Zellen (Abb. 9 C, H). Inhibition des PI3K-Signalwegs zeigt keine Expressionsänderung von *Thrombospondin 1* in den FE-8 Zellen (Daten nicht gezeigt). Das demethylierende Agens 5-Aza-CdR bewirkt ebenso eine Steigerung der *Thbs1*-Expression wie der Histondeacetylaseinhibitor TSA (Abb. 9 A). Die Kombination beider Inhibitoren führt zu keinem weiteren Anstieg (Abb. 9 D). Die Aufregulierung unter Behandlung mit 5-Aza-CdR beginnt nach 12 h, ab 36 h bleibt das Niveau bestehen (Abb. 9 D). Allerdings führt der Abfall der *Thbs1*-Expression in den unbehandelten FE-8 Zellen artifiziell zu einem größeren Expressionsunterschied, zum Zeitpunkt 96 h um den Faktor neun (Abb. 9 D, K). Die Zeitkinetik mit dem Histondeacetylaseinhibitor TSA zeigt den Anstieg der *Thbs1*-Expression in den FE-8 Zellen nach 24 h; auch hier durch den Abfall der Expression in den unbehandelten Zellen zusätzlich verzerrt. Für den Zeitpunkt 96 h ist die Steigerung zehnfach (Abb. 9 E, M).

In den 208F Zellen zeigt die Inhibition des MEK/ERK-Signalwegs durch PD98059 und U0126 eine Aufregulierung von *Thrombospondin 1* im Übersichtsversuch (Abb. 9 A). Anhand der Kinetik wird die Besonderheit dieser (vermeintlichen) Expressionssteigerung erkennbar: *Thbs1*-mRNA wird in den DMSO-behandelten 208F Zellen, ähnlich wie in den FE-8 Zellen, über den Untersuchungszeitraum reprimiert. Unter U0126 vollzieht sich diese Repression verzögert (Abb. 9 B, J). Bei Hemmung des PI3K-Signalwegs findet sich zum Zeitpunkt 48 h keine Regulation der *Thbs1*-Expression in den 208F Zellen (Abb. 9 A). Unter der demethylierenden Behandlung mit 5-Aza-CdR ist ein ähnlicher Effekt wie unter U0126 zu beobachten: Über den Untersuchungszeitraum wird *Thbs1* reprimiert, welches sich unter der Inhibitorbehandlung verzögert vollzieht (Abb. 9 D, L) und deshalb im Übersichtsversuch mit einer doppelt so hohen *Thbs1*-Expression unter 5-Aza-CdR-Behandlung im Vergleich zu den DMSO-behandelten 208F Zellen für den Zeitpunkt 96 h imponiert (Abb. 9 A). Unter TSA kommt es zu einer Repression der Thrombospondin-Expression nach 12 h (Abb. 9 E, N).

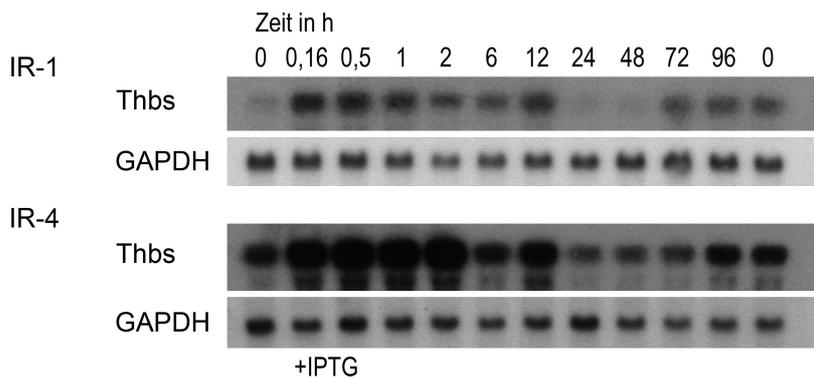
A



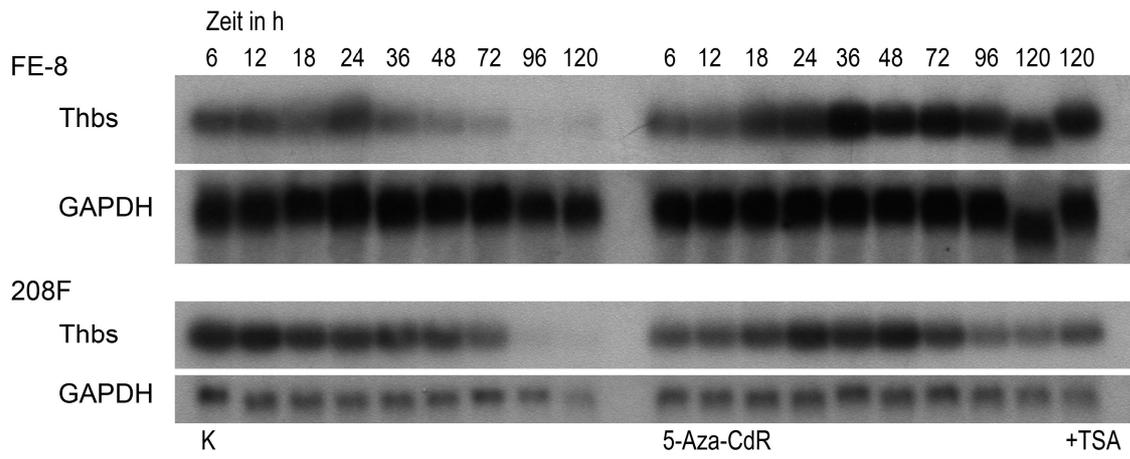
B



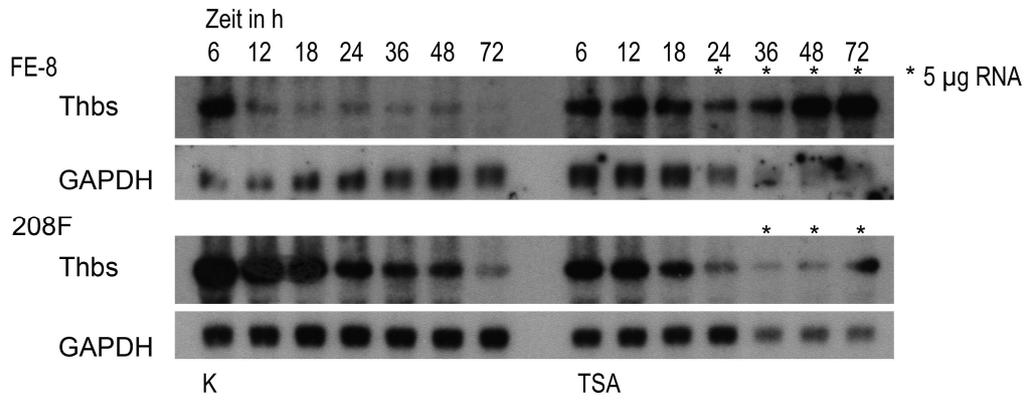
C



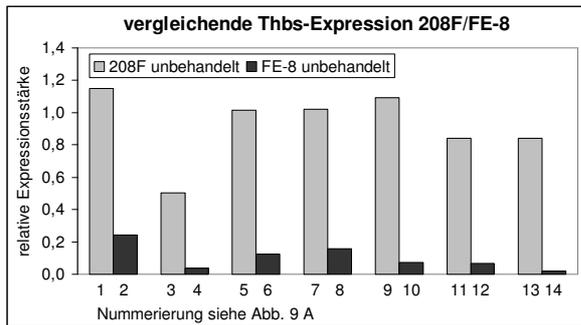
D



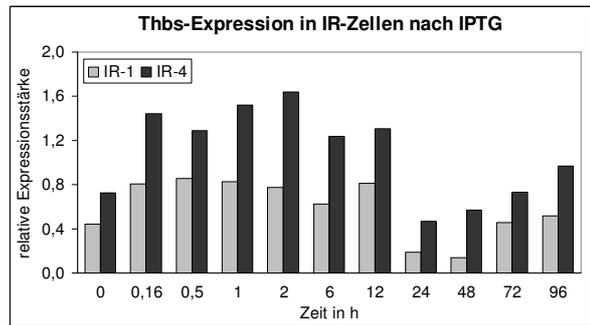
E



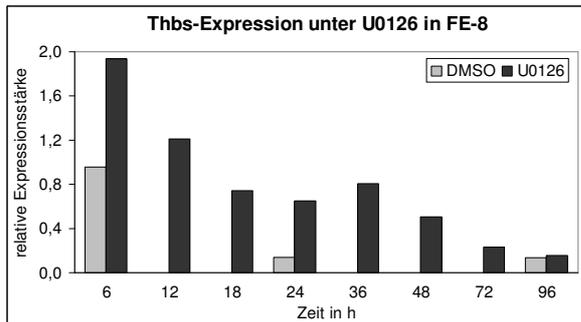
G



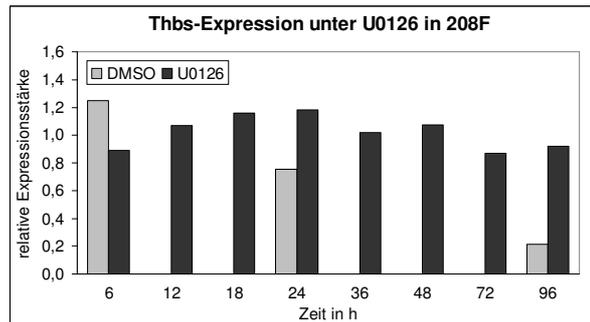
H



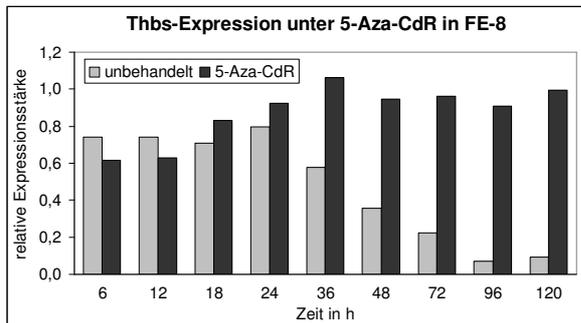
I



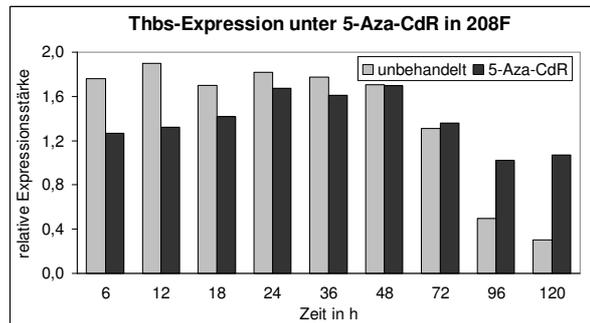
J



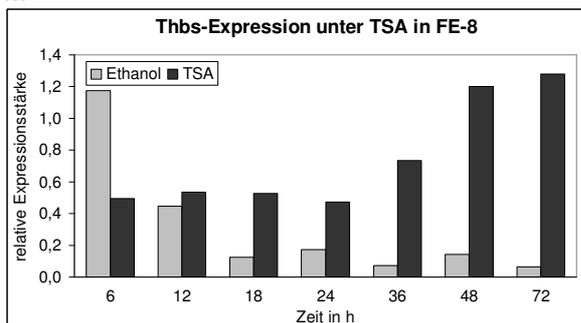
K



L



M



N

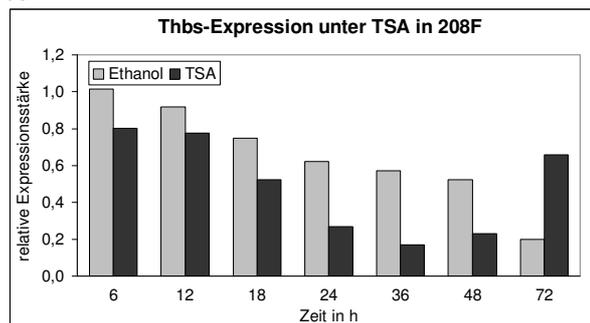


Abbildung 9: Thrombospondin 1  
(A-E) Northern Blots, (G-N) Auswertungsdiagramme

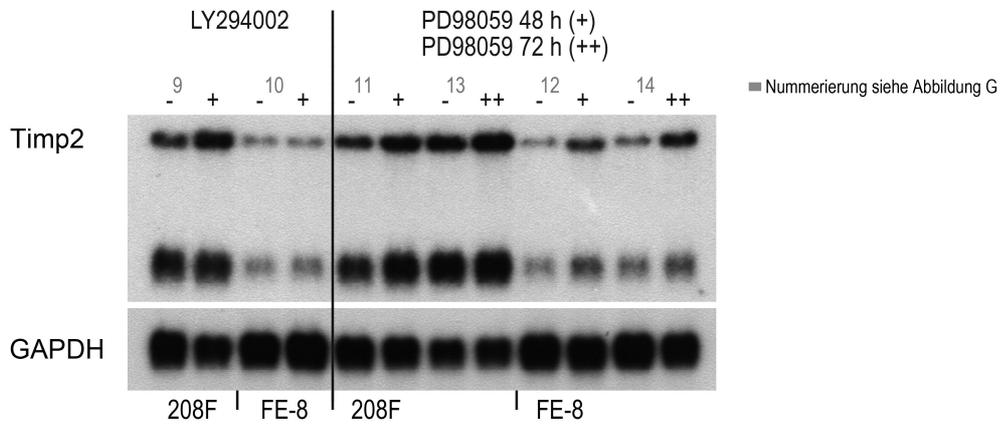
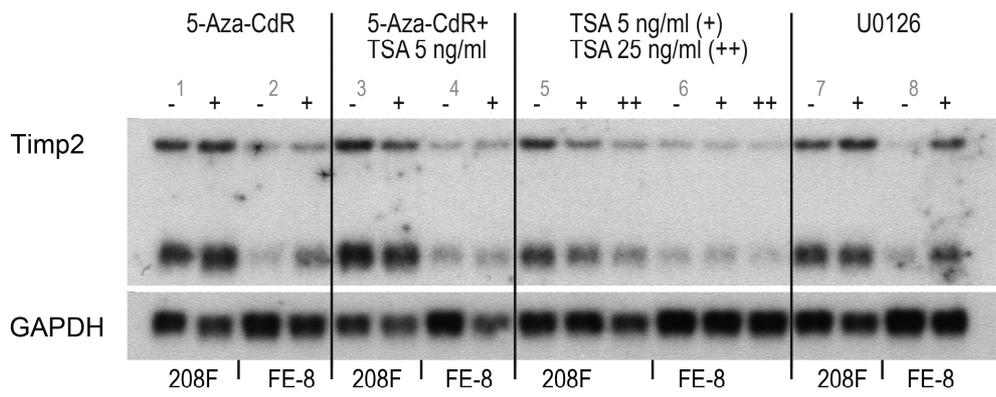
#### 4.5.6 Tissue inhibitor of metalloproteinase 2

Für *Timp2* wurden im Northern Blot zwei Transkripte detektiert. Die untere Bande stimmt mit dem in der Datenbank annotierten Transkriptionsprodukt mit einer Größe von 1656 bp (k. P.) überein, die obere Bande kann auf eine Größe von 3500 bp (g. P.) geschätzt werden. Aus Maus-Zellen wurden bereits zwei verschiedene RNA-Transkripte isoliert, die möglicherweise Spleiß-Varianten darstellen [Stetler-Stevenson, 2008].

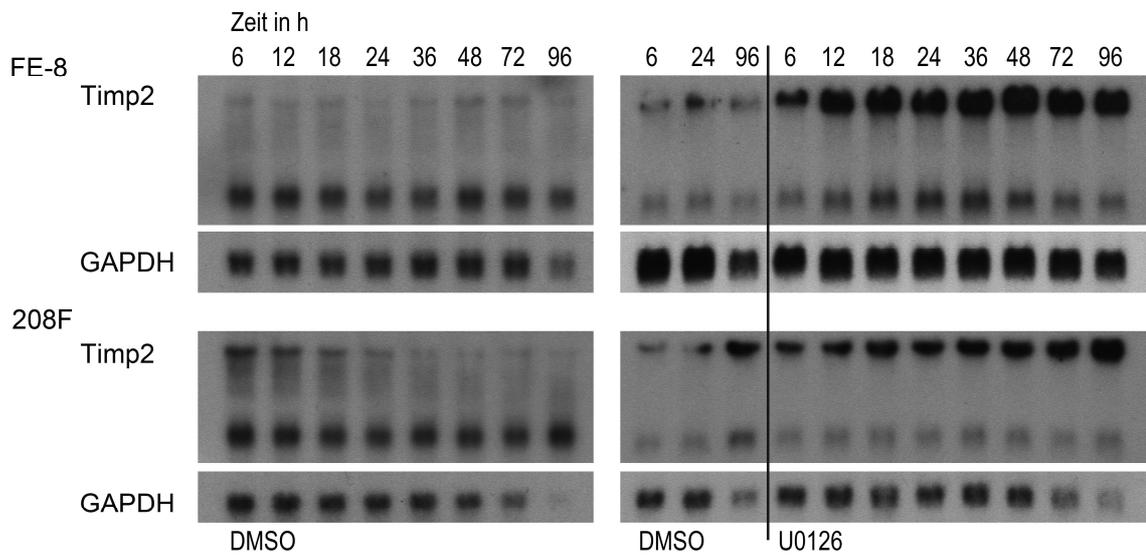
Änderungen der Genexpression sind in beiden Transkriptionsprodukten ähnlich.

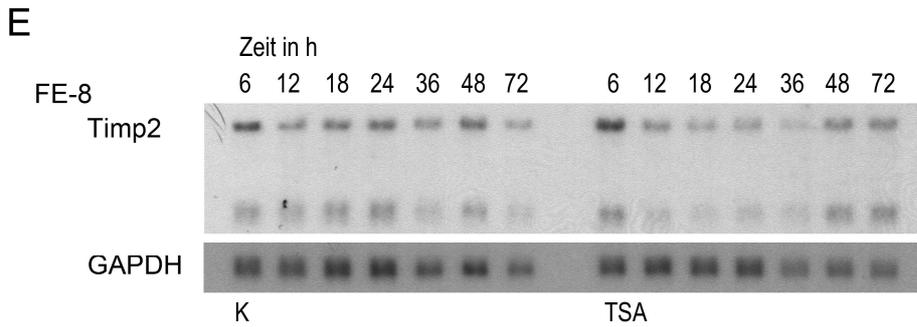
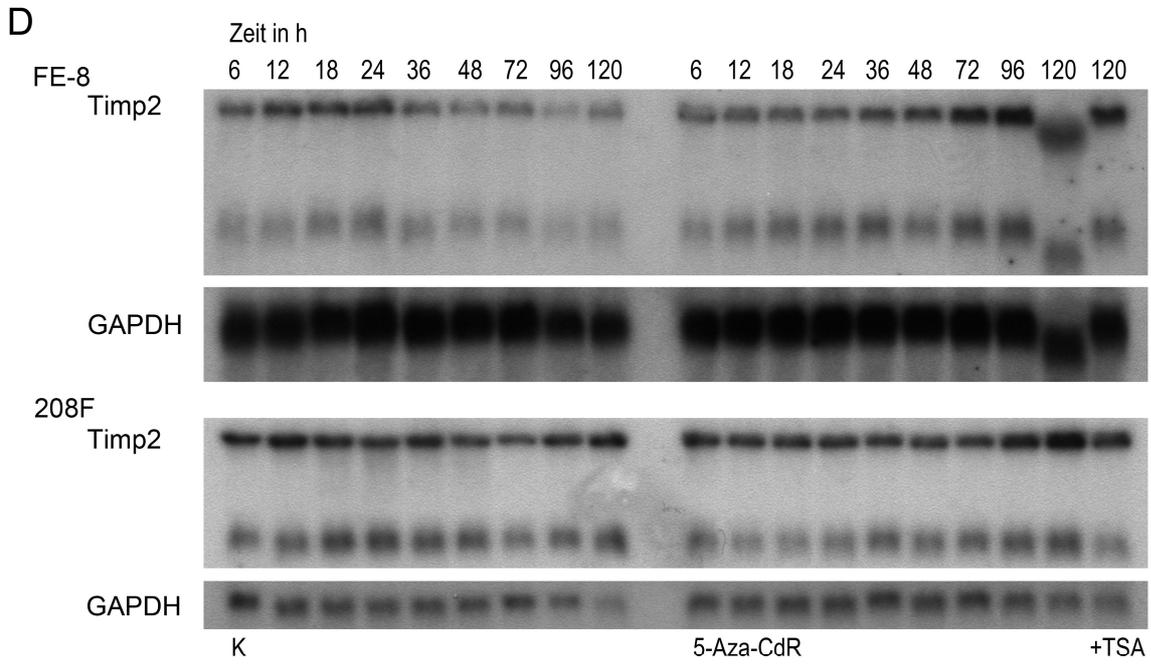
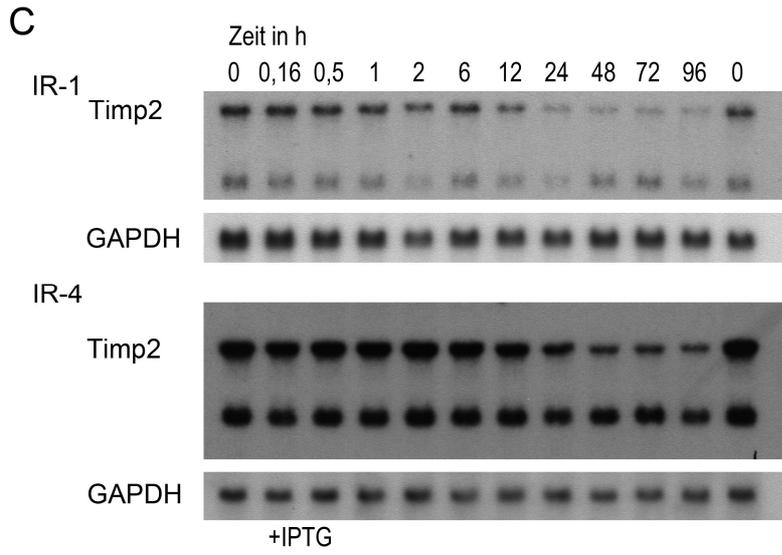
Das Ausgangsniveau von *Timp2* beträgt in den FE-8 Zellen durchschnittlich ein Viertel des der 208F Zellen (Abb. 10 A, G). Behandlung mit den MEK-Inhibitoren U0126 und PD98059 führt nach 48 h zu einer Steigerung der *Timp2*-Expression um den Faktor zwei (Abb. 10 A). In der Kinetik der FE-8 Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126 zeigt sich bereits zum Zeitpunkt 6 h eine Aktivierung um den Faktor zwei für das größere Transkriptionsprodukt, bis 24 h wird der Faktor drei erreicht (k. P. zum Zeitpunkt 24 h Faktor zwei). Zu den späteren Untersuchungszeitpunkten bleibt dieses Expressionsniveau bestehen (Abb. 10 A, I). In den IR-Zelllinien zeigt sich eine Suppression der *Timp2*-Expression, beginnend 12 h nach Ras-Induktion (Abb. 10 C, H). Das Minimum liegt zwischen einem Sechstel in den IR-1 Zellen g. P. zum Zeitpunkt 48 h und zwei Dritteln in den IR-4 Zellen k. P. zum Zeitpunkt 96 h. PI3K-Inhibition zieht keine Expressionsänderungen von *Timp2* in den FE-8 Zellen nach sich (Abb. 10 A). Behandlung mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-CdR zeigt in der Kinetik der FE-8 Zellen zwischen 24 h und 120 h eine Aufregulierung um den Faktor zwei (Abb. 10 D, K). Die Daten aus dem Übersichtsversuch sind übereinstimmend (Abb. 10 A). Die Expressionssteigerung infolge der Kombinationsbehandlung 5-Aza-CdR/TSA ist weniger stark als infolge Einzelbehandlung mit 5-Aza-CdR (Abb. 10 D). Unter Einzelbehandlung mit TSA deutet sich ab 48 h eine Aufregulierung an (Abb. 10 E, M). In den 208F Zellen zeigt sich nach Inhibition des MEK/ERK- und PI3K-Signalwegs eine leichte Aufregulierung von *Timp-2* (Abb. 10 A). In der U0126-Kinetik der 208F Zellen findet sich diese in den unbehandelten und behandelten Zellen ab 72 h (Abb. 10 B, J). Aufgrund des größeren Effektes unter U0126 ergibt sich nach Normalisierung, übereinstimmend mit den Daten aus dem Übersichtsversuch, die Aktivierung. Behandlung mit 5-Aza-CdR und TSA ist ohne Effekt (Abb. 10 A, D, L).

A

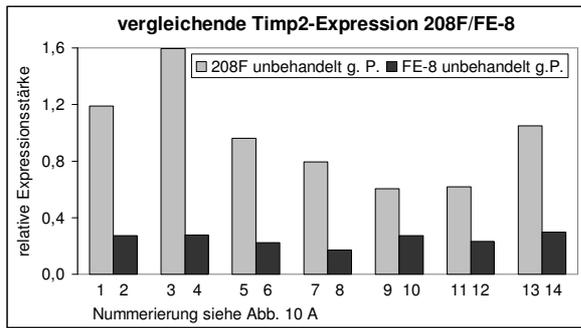


B

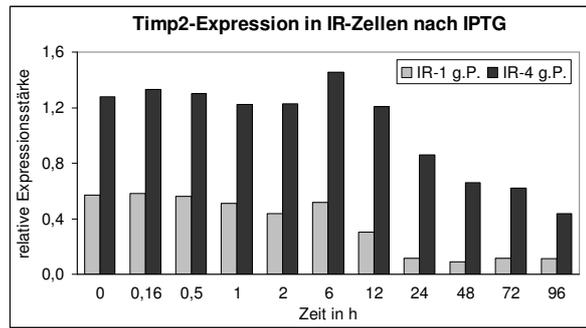




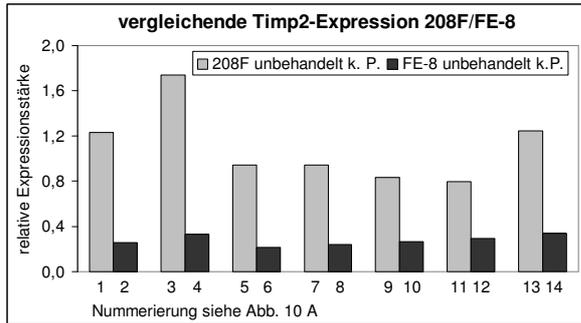
G1



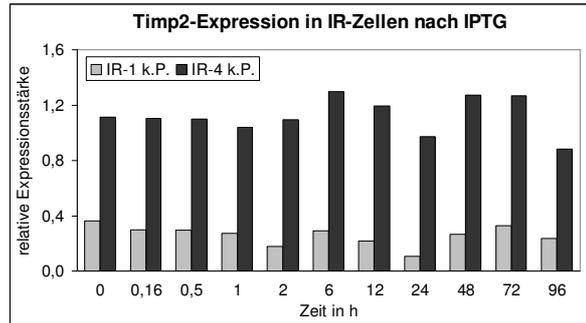
H1



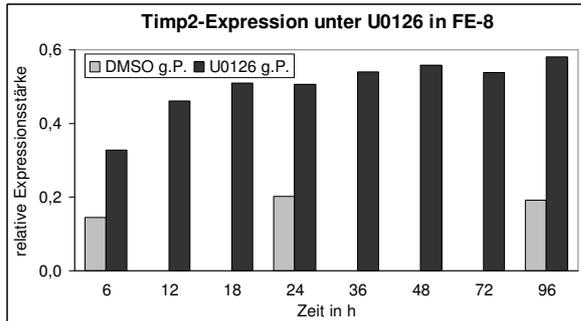
G2



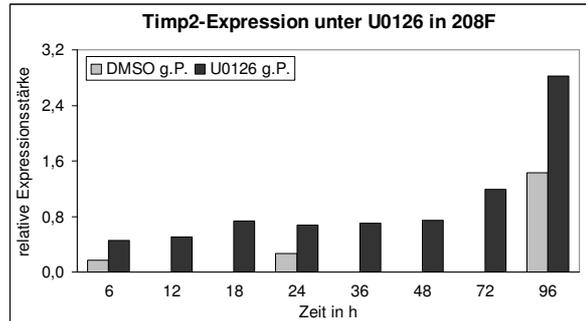
H2



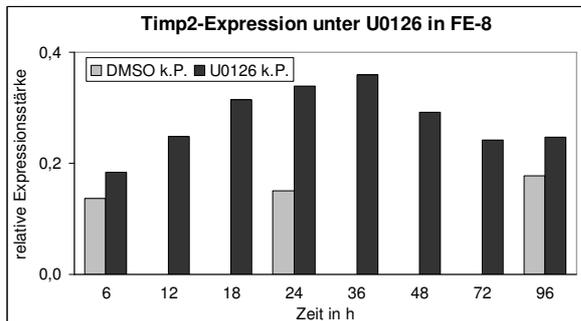
I1



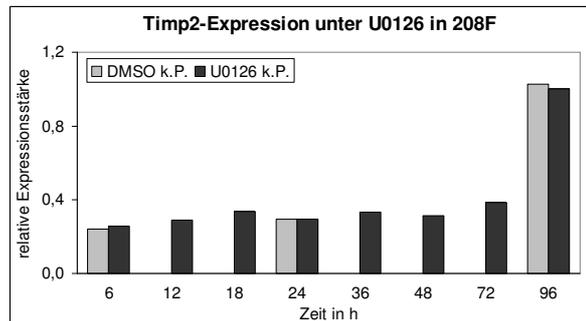
J1



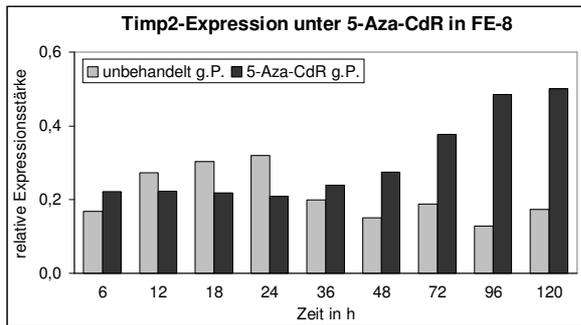
I2



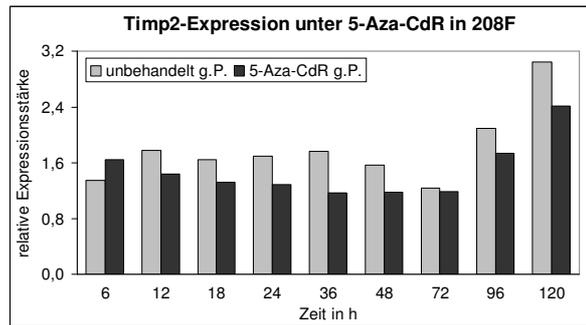
J2



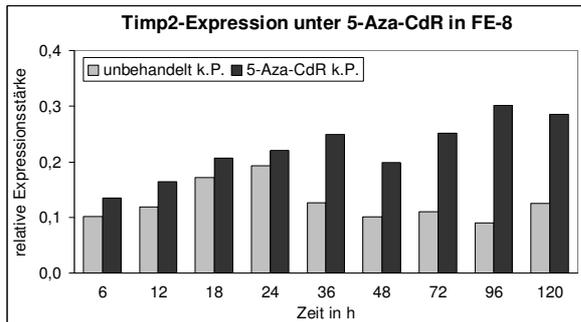
K1



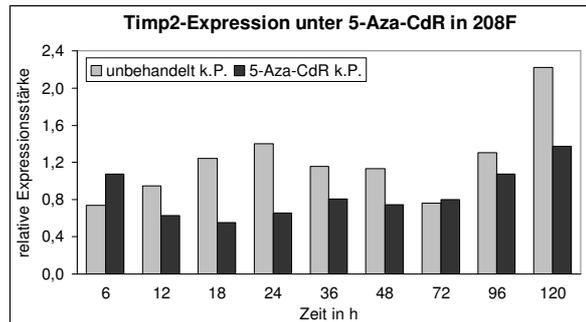
L1



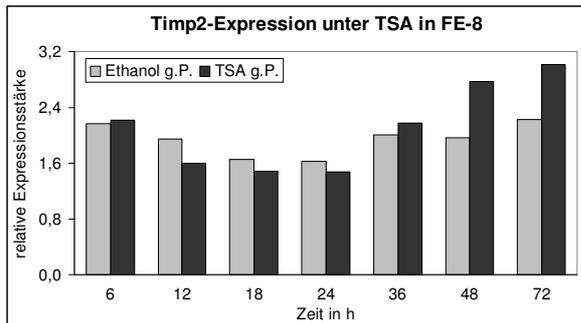
K2



L2



M1



M2

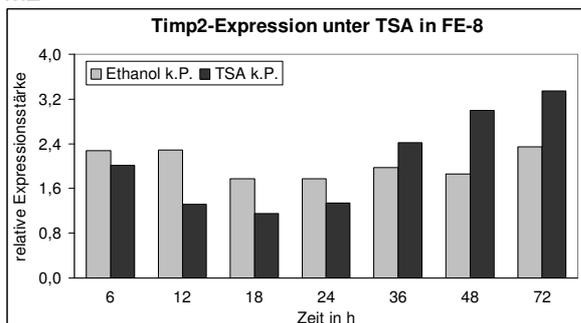


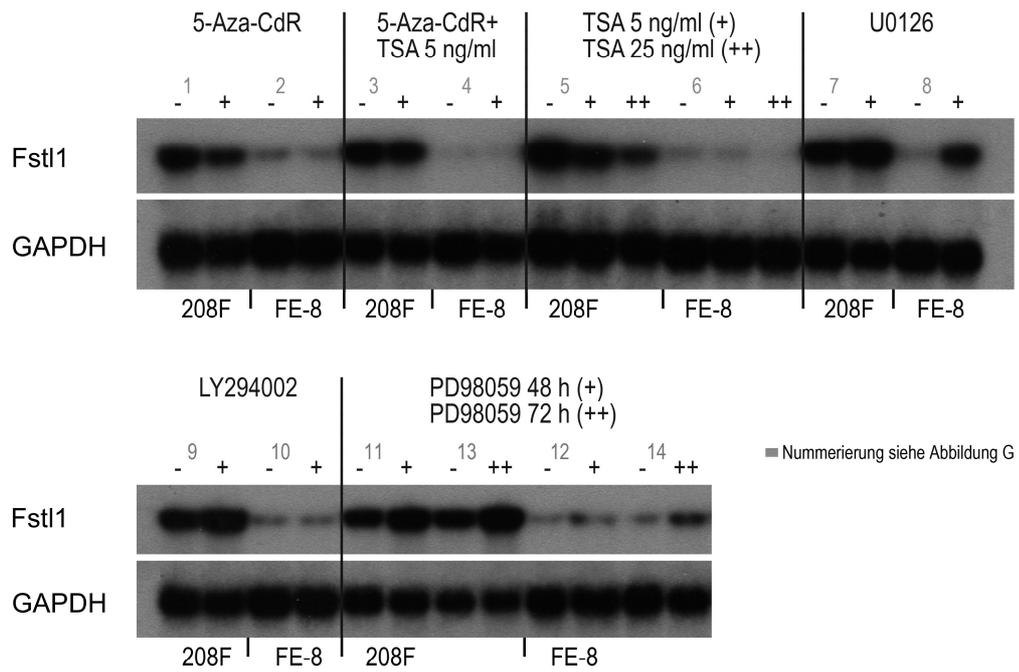
Abbildung 10: Tissue inhibitor of metalloproteinase 2 (A-E) Northern Blots, (G-M) Auswertungsdiagramme

#### 4.5.7 Follistatin-like 1

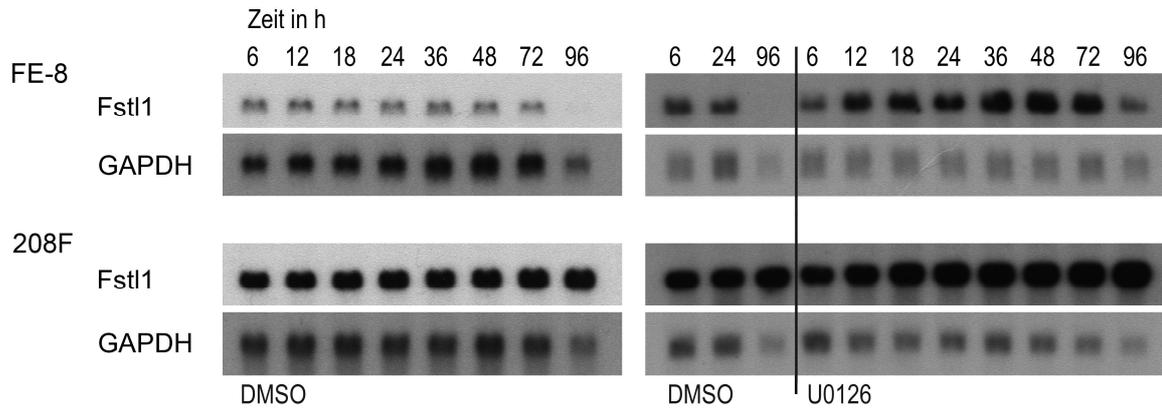
Die Blast-Analyse der cDNA-Sequenz des Genproduktes *Fstl1* ergab erst im Sequenzabgleich 01/2009 die Bezeichnung eines Rattengens. Das annotierte Transkript wird mit einer Größe von 2283 bp angegeben, das in den Northern Blot-Untersuchungen detektierte Transkriptionsprodukt weist eine Größe von ca. 4700 bp auf.

Der Grundlevel der *Fstl1*-Expression liegt in den FE-8 Zellen etwa ein Drittel bis ein Viertel unter dem der 208F Zellen (Abb. 11 A, G). Behandlung der FE-8 Zellen mit U0126 und PD98059 führt zum RNA-Extraktionszeitpunkt 48 h im Übersichtsversuch zu einer Verdopplung des Expressionsniveaus (Abb. 11 A). In der U0126-Kinetik sieht man, dass sich diese Aktivierung zwischen 6 h und 48 h vollzieht (Abb. 11 B, I). Zu den späten Zeitpunkten 72 h und 96 h bleibt dieses Niveau bestehen bzw. ist leicht rückläufig. In den Kontrollkinetiken wird die *Fstl1*-Expression zu den späten Untersuchungszeitpunkten reprimiert (Abb. 11 B, D, I, K), so dass die Expressionsunterschiede zwischen U0126- und DMSO-behandelten Zellen artifiziell größer erscheinen (Abb. 11 B, I). Aus der Kinetik der IR-Zellen ergibt sich eine Hemmung der *Fstl1*-Expression ab 6 h nach IPTG-Gabe. Zum Zeitpunkt 48 h wird das Minimum erreicht und entspricht einem Drittel der unbehandelten Zellen (Abb. 11 C, H). Inhibition des PI3K-Signalwegs bewirkt keine Expressionsänderung von *Fstl1* in den FE-8 Zellen zum Zeitpunkt 48 h (Abb. 11 A). Einzelbehandlung mit 5-Aza-CdR, TSA und die Kombination von 5-Aza-CdR und TSA zeigen keine regulierenden Effekte auf die Expression von *Fstl1* im Übersichtsversuch. Der Expressionsunterschied für die Zeitpunkte 96 h und 120 h unter 5-Aza-CdR in der Kinetik ist lediglich auf die Expressionsrepression in den unbehandelten Zellen zurückzuführen (Abb. 11 A, D, K). In den 208F Zellen weist die *Fstl1*-Expression bei Inhibition beider untersuchter Ras-Signalwege eine leichte Aufregulierung auf, in der U0126-Kinetik vollzieht sich diese über den gesamten Untersuchungszeitsaum (Abb. 11 A, B, J). Die Behandlungen mit 5-Aza-CdR und in der Kombination mit TSA zeigen im Übersichtsversuch einen niedrigeren *Fstl1*-Level als die 208F Kontrollzellen, aus der Kinetik ergeben sich aber keine spezifischen Effekte (Abb. 11 A, D). Unter Anwendung von TSA ist das Expressionsniveau von *Fstl1* im Vergleich zu den Kontrollzellen vermindert (Abb. 11 A).

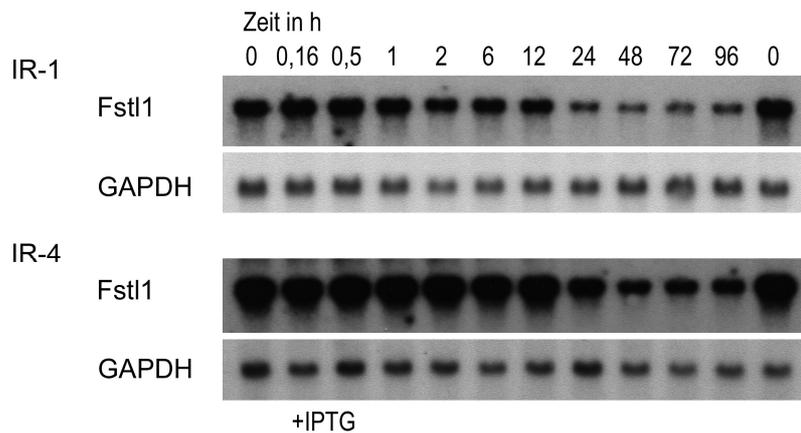
**A**



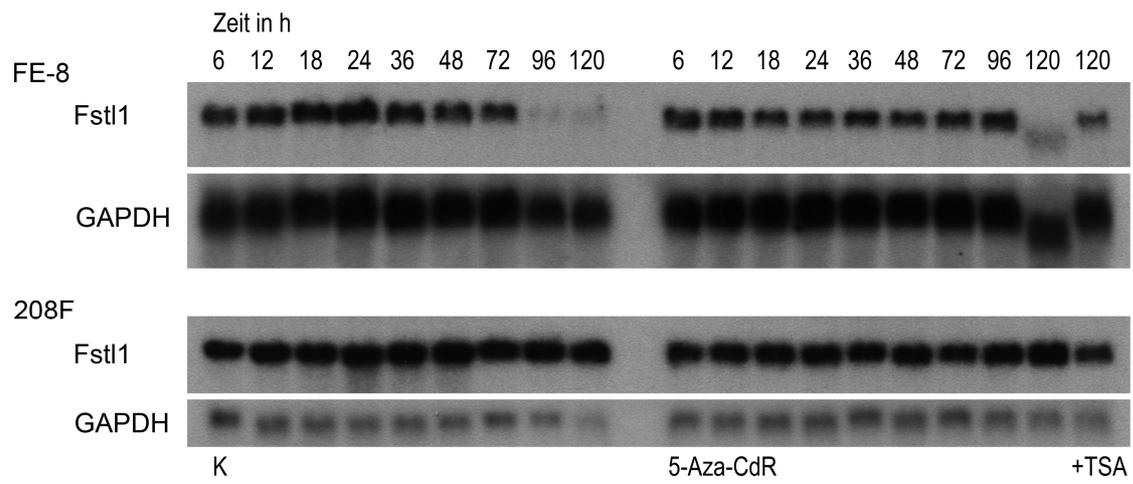
**B**



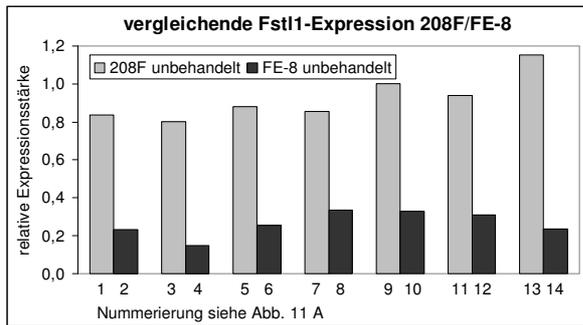
**C**



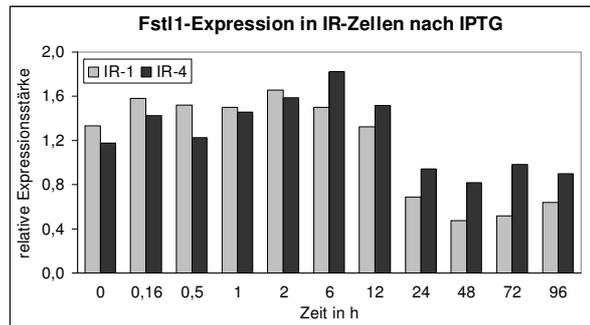
D



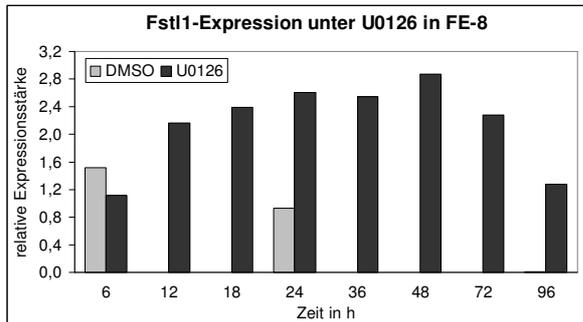
G



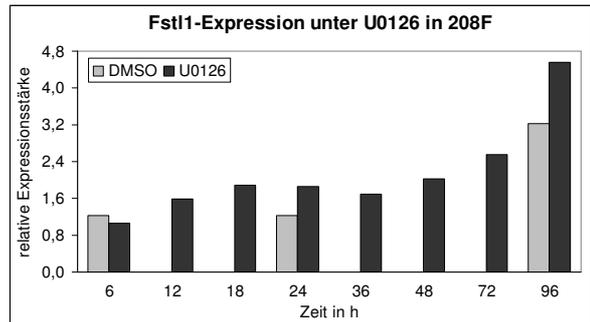
H



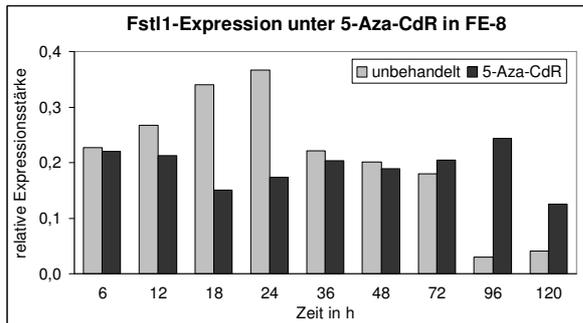
I



J



K



L

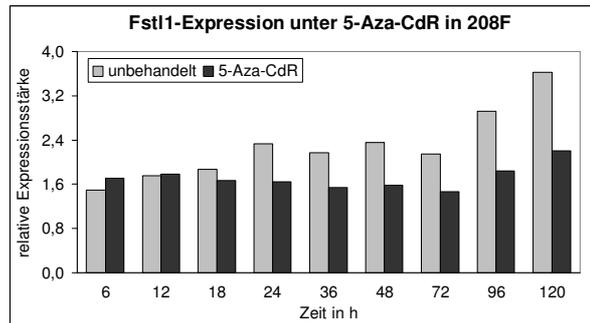


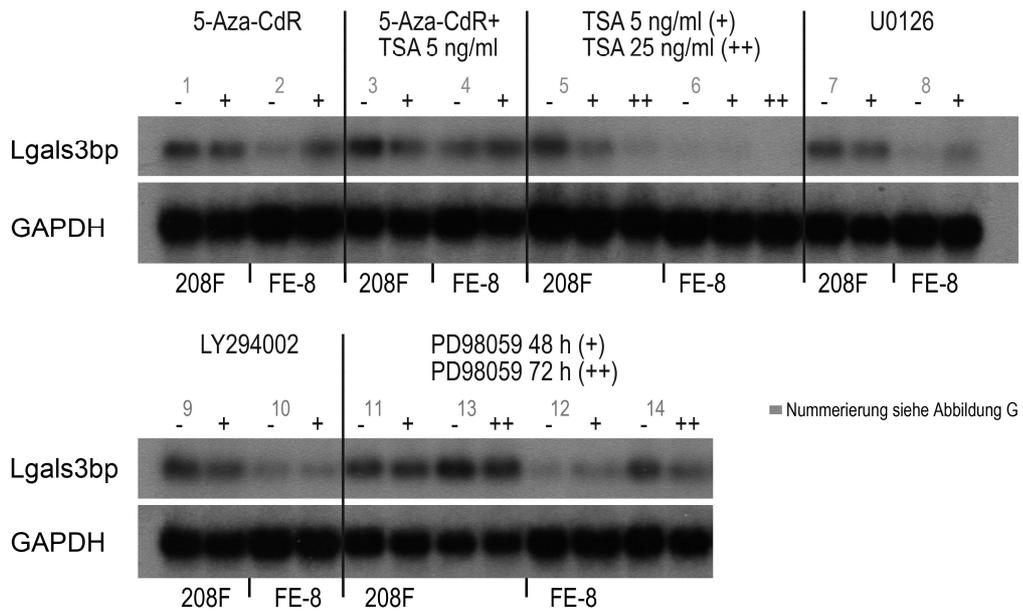
Abbildung 11: Follistatin-like 1  
(A-D) Northern Blots, (G-L) Auswertungsdiagramme

#### 4.5.8 Lectin, galactoside-binding, soluble 3 binding protein

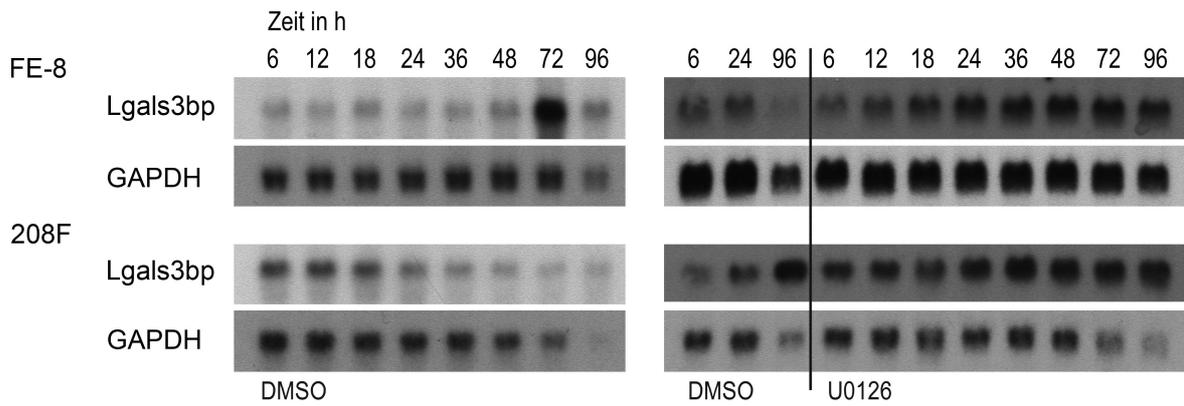
Das Expressionsniveau von *Lgals3bp* beträgt in den FE-8 Zellen etwa die Hälfte bis ein Drittel des Niveaus der 208F Zellen (Abb. 12 A, G). Während die Behandlung mit dem MEK-Inhibitor PD98059 keine Expressionsänderungen bewirkt, führt die Anwendung von U0126 in den FE-8 Zellen zum Zeitpunkt 48 h zu einer Zunahme der Genexpression um den Faktor zwei (Abb. 12 A). In der Zeitkinetik ist die Expressionsstärke ab 6 h kontinuierlich ansteigend, erreicht, übereinstimmend mit dem Übersichtsversuch, zum Zeitpunkt 48 h eine Verdopplung und bei 120 h eine Verdreifachung (Abb. 12 B, I). Inhibition der PI3K zeigt keinen Effekt (Abb. 12 A). In den IR-Zellen ist die Expression von *Lgals3bp* bis zum Zeitpunkt 24 h gleich bleibend. Für die Zeitpunkte 48 h und 72 h wird eine Vervielfachung erreicht, bei 72 h um den Faktor 4. Zum Zeitpunkt 96 h besteht wiederum das Ausgangsniveau (Abb. 12 C, H). Die Anwendung des demethylierenden Agens 5-Aza-CdR zeigt im Übersichtsversuch für die FE-8 Zellen eine Aufregulierung von *Lgals3bp* um den Faktor zwei (Abb. 12 A). In der Kinetik beginnt diese ab 24 h, bis zum Zeitpunkt 120 h wird sogar eine Aktivierung um den Faktor fünf erreicht (Abb. 12 D, K). Kombination von 5-Aza-CdR mit TSA erreicht dieses Niveau nicht (Abb. 12 A, D). Alleinige Behandlung der FE-8 Zellen mit TSA führt, wie auch für *Lox*, zu einer Suppression der *Lgals3bp*-Expression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (Abb. 12 A). Die Kinetik zeigt das Hauptintervall der Suppression zwischen 6 h und 24 h nach Inhibitorbehandlung (Abb. 12 E, M).

In den 208F-Zellen führt die Inhibition des Raf/MEK/ERK- und des PI3K-Signalwegs zu keiner Expressionsänderung von *Lgals3bp* (Abb. 12 A). In den Kinetiken zeigt sich ein Expressionsanstieg in den unbehandelten Zellen ab 72 h. Die expressionssteigernden Effekte für diese späten Zeitpunkte in der U0126-Zeitkinetik sind in behandelten Zellen und Kontrollzellen gleich stark und damit unspezifisch (Abb. 12 B, J). Unter 5-Aza-CdR finden sich ebenfalls keine spezifischen Effekte (Abb. 12 D, L). Unter TSA hingegen zeigt sich eine *Lgals3bp*-Suppression zwischen 6 h und 18 h mit anschließender Konstanz dieses verminderten Levels im Vergleich zu den 208F Kontrollzellen (Abb. 12 E, N).

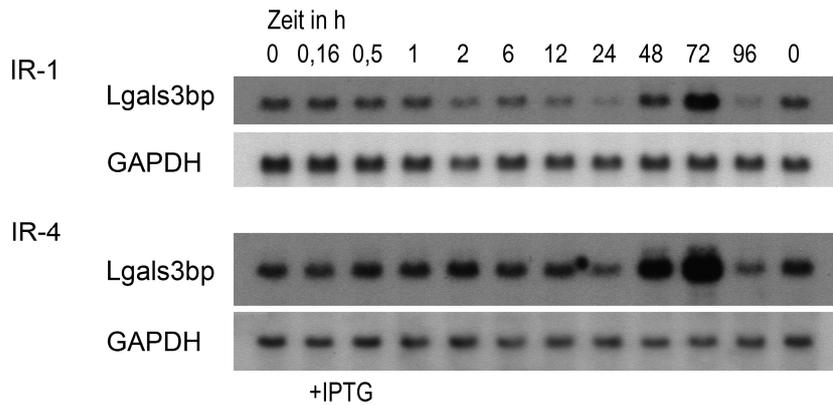
**A**



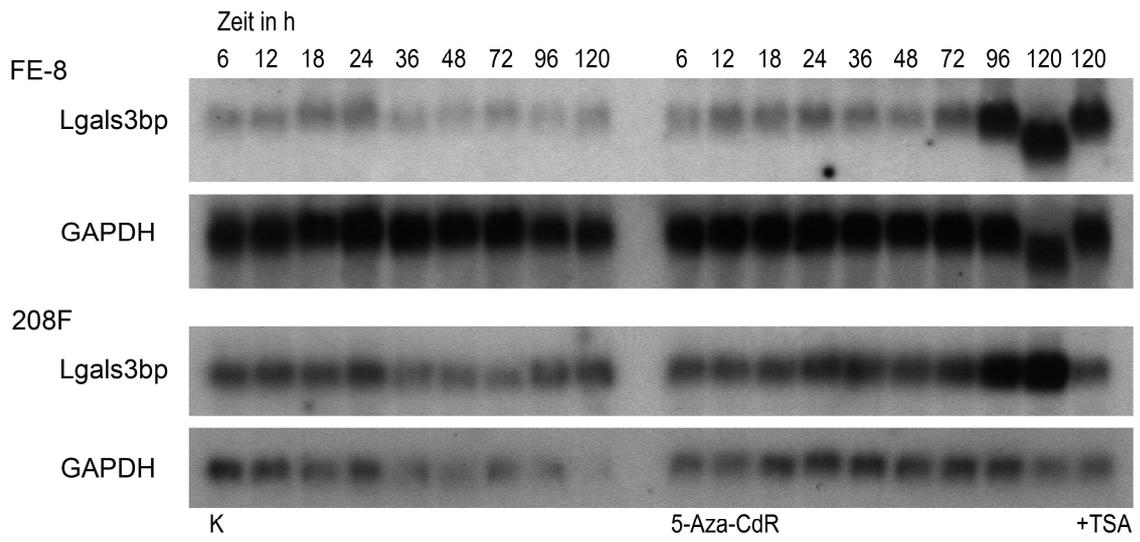
**B**



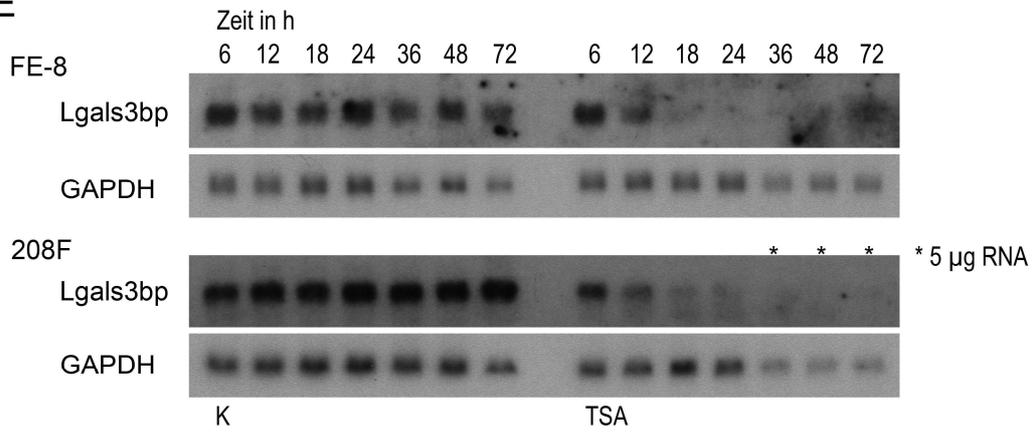
**C**



D



E



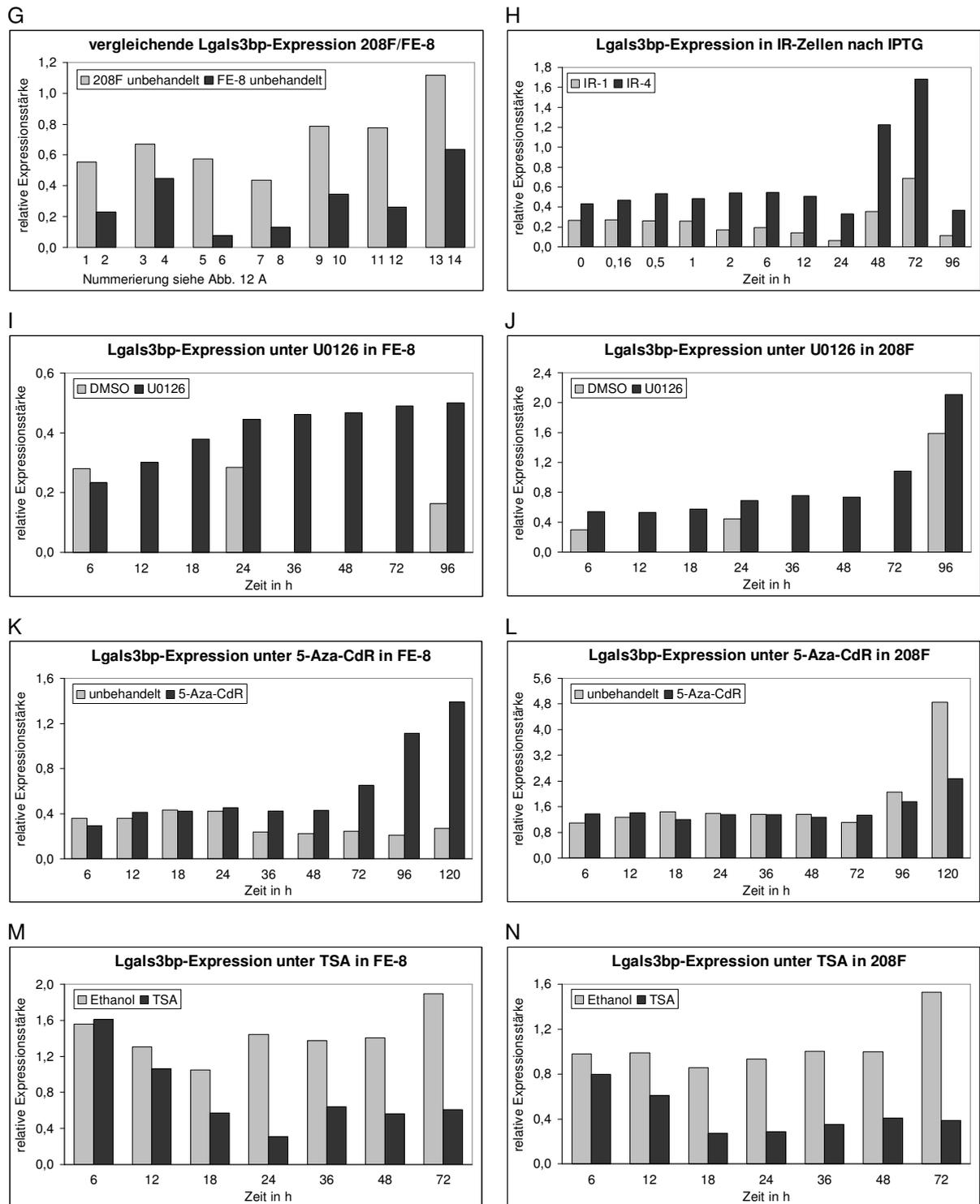


Abbildung 12: Lectin, galactoside-binding, soluble 3 binding protein (A-E) Northern Blots, (G-N) Auswertungsdiagramme

## 5 Diskussion

Tumorgenese ist auf zahlenmäßig begrenzte Defekte in Genen und Signalwegen zurückzuführen, die wiederum eine Expressionsänderung mehrerer hundert Gene zur Folge haben [Hahn and Weinberg, 2002]. Unumstritten ist die Bedeutung epigenetischer Veränderungen in malignen Neoplasien, die sowohl globale DNA-Hypomethylierung und Modifikationen des Chromatins als auch genspezifische Hypomethylierung und Hypermethylierung umfassen. Globale DNA-Hypomethylierung führt zu chromosomaler Instabilität und korreliert mit erhöhten Krebsraten; sie ist ein sehr frühes Ereignis in der Tumorentstehung [Esteller and Herman, 2002]. Aus genspezifischer Hypomethylierung kann die Aktivierung von Proto-Onkogenen, aus genspezifischer Hypermethylierung die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen resultieren [Feinberg et al., 2006]. Über onkogene Signalwege wiederum können sowohl nicht-epigenetisch und als auch epigenetisch bedingte Transkriptionsrepressionen von Genen erwirkt werden; die Folge ist eine Störung regulärer Signalnetzwerke. Mechanismen der Ras-abhängigen Gensuppression sind bisher wenig bekannt. Ein Beispiel ist eine Ras/PI3K/Rho- und ROCK-abhängige, durch ein phosphoryliertes c-Myc-Protein vermittelte Suppression des Thrombospondin-Gens [Watnick et al., 2003]. Inwiefern aber können Ras-abhängige Signalwege eine Gensuppression durch Methylierung und/oder Hyperacetylierung vermitteln?

In neoplastischen Zellen ist vielfach eine Erhöhung der DNA-Methyltransferase-Aktivität im Vergleich zum Ursprungsgewebe zu verzeichnen [Baylin et al., 1998]. Bakin und Curran zeigten einen zwei- bis dreifachen Anstieg der mRNA-Level und einen zehnfachen Anstieg der Protein-Level von DNMT1 in *Fos*-transformierten Rattenfibroblasten im Vergleich zur Ursprungszelle 208F. Die Morphologie von *Fos*-transformierten und *DNMT1*-überexprimierenden Rattenfibroblasten ist auffallend ähnlich im Sinne einer malignen Transformation. Gleichzeitig ist in den *Fos*-transformierten Zellen ein um 20 % höherer, in den *DNMT1*-transformierten Zellen sogar ein um 60 % höherer Methylcytosingehalt als in den 208F Zellen auffällig [Bakin and Curran, 1999]. Diese Daten stehen der bekannten Hypomethylierung von Tumorzellen mit nur lokaler Hypermethylierung gegenüber. Kautiainen und Jones fanden keine Korrelation zwischen der Aktivität von DNMT und dem Gesamtgehalt an Methylcytosin innerhalb einer Zelle [Kautiainen and Jones, 1986]. Möglicherweise ist für eine Genaktivierung/-inaktivierung der Methylierungsstatus spezifischer Domänen

innerhalb der DNA entscheidend und damit bei der Tumorentstehung nicht die Quantität, sondern die Qualität der DNA-Methylierung von Bedeutung. Entsprechend ergibt sich eine Notwendigkeit, den Methylierungsstatus einzelner Gene zu untersuchen, um die spezifischen Domänen zu identifizieren und die zugrunde liegenden Mechanismen aufzudecken.

## **5.1 Kritische Betrachtung der Methoden**

### **5.1.1 Bedeutung von Zellkulturexperimenten**

Grundlagenforschung beginnt in der Zellkultur, deren Vorteile gegenüber *in vivo*-Tumoren klar auf der Hand liegen: Zellmaterial steht unbegrenzt zur Verfügung, die Umgebungsfaktoren sind eingeschränkt. Die Zellen sind relativ einheitlich, da Tumorzentrum, Invasionsfront oder metastasierende Zelle nicht unterschieden werden. Umgebende oder einflussnehmende Strukturen wie Stroma, Blutgefäße oder Immunsystem müssen nicht berücksichtigt werden.

Das Rattenfibroblasten-Zellsystem 208F/FE-8 unterscheidet sich durch das Ras-Onkogen, welches in FE-8 Zellen überexprimiert wird, und ist damit ein geeignetes Modell für die Untersuchung Ras-abhängiger Signalwege. Im Vergleich der Zelllinien 208F und FE-8 werden die acht Zielgene differentiell exprimiert. Auf die Bedeutung der Gene für die Transformation kann jedoch nicht unmittelbar rückgeschlossen werden. Beispielsweise sind allein aufgrund von Zelldichtezunahmen Genexpressionsunterschiede in transformierten und nicht-transformierten Zellen zu erwarten. Alle untersuchten Gene zeigen in den unbehandelten 208F Zellen eine gleich starke Expression bis zum Zeitpunkt 72 h; zu den späteren Zeitpunkten kommt es zu einer Aktivierung. Anders verhält es sich nur bei Thrombospondin: hier findet sich eine kontinuierliche Abnahme der Expression über den Untersuchungszeitraum. Zum Zeitpunkt 72 h weisen die unbehandelten 208F Zellen eine 60-70%ige Konfluenz auf, zu den späteren Zeitpunkten nähern sie sich einer Konfluenz von 100 %. Durch die Behandlung mit den Inhibitoren werden nicht gleich hohe Zelldichten erreicht wie in den unbehandelten Zellen, so dass hier die Expressionsänderungen erst verzögert zu erwarten sind. Die Regulationen der untersuchten Gene zu den Zeitpunkten >72 h in den unbehandelten 208F Zellen sind daher am ehesten auf Zelldichteeffekte zurückzuführen. Dass sich die 208F Zellen im Gegensatz zu den FE-8 Zellen durch eine dichteabhängige Wachstumsinhibition auszeichnen, unterstützt diese

Argumentation. Die Genexpressionsänderungen in den unbehandelten 208F Zellen müssen demnach kritisch betrachtet werden und bedürfen weiterer Untersuchungen.

### **5.1.2 Bedeutung von Zeitkinetiken**

Aus den Ergebnissen der Arbeit kristallisiert sich eine Bedeutung von Zeitkinetikexperimenten für Genexpressionsuntersuchungen heraus. Betrachtung von Einzelzeitpunkten wie im Übersichtsversuch erlaubt nicht die direkte Schlussfolgerung von mRNA-Aufregulierung oder Repression unter Anwendung eines Inhibitors, da, wie im Beispiel von *Thrombospondin 1*, das Gen auch in den Kontrollzellen reguliert sein kann oder zelldichteabhängige Effekte erfasst werden müssen. Ebenso kann bei Betrachtung von Einzelzeitpunkten der relevante Zeitraum einer Genexpressionsänderung nicht erfasst sein. So ist es auch nicht möglich, eine Relevanz des PI3K-Signalwegs aufgrund einer ausschließlichen Untersuchung zum Zeitpunkt 48 h für die Regulation der Zielgene auszuschließen.

### **5.1.3 Anwendung von Inhibitoren**

Für die Untersuchung von Signalwegen werden gerne Proteinkinaseinhibitoren eingesetzt, deren Vorteil u. a. die leichte Anwendung ist. Diese Inhibitoren zeichnen sich durch eine hohe Spezifität aus, selten allerdings bezieht sich diese auf nur ein Substrat. Soll aus dem Vergleich eines Proteinkinaseinhibitoreffektes einer normalen mit einer transformierten Zelle direkt auf die Bedeutung der Proteinkinase für die Transformation geschlossen werden, ist die Spezifität für ein einziges Substrat notwendig.

Laut einer Publikation von Davies et al. zur Spezifität von Proteinkinaseinhibitoren inhibiert U0126 neben MEK 1 auch die Proteinkinasen SAPK2a/p38, PRAK und PKB $\alpha$ , diese allerdings weniger potent. LY294002 hingegen inhibiert bei derselben Inhibitorkonzentration sowohl PI3K als auch CK-2 [Davies et al., 2000]. U0126 und PD98059 sind bekannte Inhibitoren von MEK 1 und 2. In PC12 Zellen konnte außerdem eine Inhibition von MEK5/ERK5 durch U0126 und PD98059 nachgewiesen werden [Kamakura, et al., 1999]. Eine Untersuchung weiterer Proteinkinasen einschließlich des MEK5-Signalwegs im Zellsystem 208F/FE-8 unter den verwendeten Inhibitoren U0126, PD98059 und LY294002 in zellbasierten Kinase Assays wäre daher von Interesse. Eine vollständige Aufarbeitung setzt jedoch mehr Wissen über die Inhibitorsubstrate voraus.

Auch weitere Inhibitorwirkungen können beobachtet werden: unter der Behandlung mit 5-Aza-CdR eine Wachstumshemmung, unter TSA sogar vermehrter Zelltod. *In vitro*-Behandlung von Zellen mit 5-Aza-CdR zeigte eine gesteigerte Zahl chromosomaler Translokationen [Ji et al., 1997] und Anwendung von TSA hatte einen Zellzyklusarrest in der G1- und G2-Phase zur Folge [Hoshikawa et al., 1994]. Eine Unterscheidung direkter Inhibitoreffekte oder sekundärer Wirkungen auf die Genexpressionsänderungen ist allein aufgrund der durchgeführten Untersuchungen nicht möglich.

#### **5.1.4 Analyse von DNA-Methylierung und Histonacetylierung**

Die Anwendung von 5-Aza-CdR ist ein etabliertes Verfahren, um Gene zu detektieren, die in Tumoren infolge DNA-Methylierung supprimiert sind und nach Anwendung von 5-Aza-CdR reaktiviert werden. Allerdings wird durch die Anwendung von 5-Aza-CdR kein Beweis erstellt, dass die Gene selbst durch Methylierung inaktiviert waren. Die Reexpression kann ebenso auf einer indirekten Wirkung von 5-Aza-CdR beruhen, beispielsweise als Antwort auf eine DNA-Schädigung oder durch Demethylierung eines methylierten Transkriptionsaktivators. Direkte Methylierungsanalysen sind mittels Bisulfit-Sequenzierung oder Methyl-DNA Immunopräzipitation (MeDIP) möglich und können im Weiteren Anwendung finden.

Durch Hemmung der Histondeacetylase mit konsekutiver Hyperacetylierung wird eine Strukturlockerung des Chromatins erreicht, die Transkription ermöglicht. Diese spezifische Wirksamkeit von TSA ist sowohl *in vivo* als auch *in vitro* bekannt. Anwendung von TSA kann Morphologieänderungen der Zellen bewirken [Hoshikawa et al., 1994]; in der Maus-Fibroblastenzelllinie NIH3T3 konnte eine Reversion Ras-transformierter Zellen zu normaler Zellmorphologie erreicht werden [Futamura et al., 1995]. Selektive, bereits als durch Methylierung reprimiert bekannte Gene, wurden nach TSA-Behandlung reexprimiert. Weitere Untersuchungen zeigten eine partielle Reversibilität bereits beschriebener synergistischer Effekte der DNMT1 und der HDAC durch Behandlung mit TSA [Robertson and Wolffe, 2000; Rountree et al., 2000; Fuks et al., 2000]. Eine andere Methode, Histonacetylierung zu untersuchen, wäre histonacetylierungsspezifische Chromatinimmunopräzipitation.

### **5.1.5 GAPDH**

Als interner Standard für die Northern Blot-Untersuchungen diente das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Als solches zeichnet es sich durch eine relativ konstante Expression in verschiedenen Zelltypen, während verschiedener Entwicklungsphasen und unter wechselnden Umweltbedingungen aus. Es ist bekannt, dass kein Haushaltsgen immer stabil exprimiert wird [Janssens et al., 2004]. Bereits in den ersten Northern Blot-Untersuchungen zeigte sich GAPDH im Zellsystem 208F/FE-8 (durch die Inhibitorenbehandlung) reguliert, weshalb zusätzlich das ribosomale 18S getestet wurde. Da dieses ebenfalls Expressionsänderungen aufwies, wurde der Einsatz von GAPDH beibehalten. GAPDH wird in den FE-8 Zellen um ca. ein Siebentel stärker exprimiert als in den 208F Zellen. Eine Aufregulierung von GAPDH in verschiedenen Tumorzellen im Vergleich zu ihrem Ursprungsgewebe wurde wiederholt beobachtet [Valenti et al., 2006]. Mit starker Zunahme der Zelldichte ab 72 h geht eine Repression von GAPDH in den 208F und FE-8 Zellen einher (Abb. 5-12 B, D, E). In den IR-Zellen wird die GAPDH-Expression nach IPTG-Zugabe ebenfalls supprimiert (Abb. 5-12 C). In der semiquantitativen Auswertung hat die Regulation von GAPDH eine Verzerrung der Genexpressionsänderungen zur Folge und muss als systematischer Fehler berücksichtigt werden.

Haushaltsgene wie ribosomale 28S-RNA,  $\alpha$ -Tubulin,  $\beta$ -Actin und Porphobilinogen-Deaminase könnten bei weiteren Untersuchungen getestet werden, um die mRNA-Auswertung zu optimieren.

### **5.1.6 Proteinuntersuchungen**

Weiterführende Untersuchungen der Gene müssen berücksichtigen, dass die mRNA-Expression zumeist nicht mit dem Proteinlevel oder der Aktivität des Proteins gleichzusetzen ist. Entsprechend notwendig sind Expressionsuntersuchungen der Proteine. Für Western Blot-Analysen der Zielgene im Rattenzellmodell standen aber bisher zumeist keine geeigneten Antikörper zur Verfügung.

## 5.2 Genexpressionsänderungen in 208F und FE-8 Zellen

### 5.2.1 Clusterin

Clusterin ist ein Glykoprotein mit einer ubiquitären Gewebeverteilung. Es ist in physiologische Prozesse wie Zellzyklus-Regulation, Zell-Zell-Interaktion, DNA-Reparatur, Apoptose und Lipidtransport eingebunden; als Chaperon stabilisiert es Proteine. Gleichzeitig ist es mit Tumorgenese und Metastasierung assoziiert. In Tumoren ist meistens eine Aktivierung von Clusterin, beispielsweise in Karzinomen von Prostata, Niere, Blase, Kolon, Mamma und Bronchien, seltener eine Suppression, beispielsweise in Ösophagus- und Pankreaskarzinomen, beschrieben [Shannan et al., 2006].

Für die Transformation von Rat1-Fibroblasten mit *Hras* wird eine sieben- bis zehnfache Repression der *Clusterin*-mRNA angegeben [Klock et al., 1998]. Mit diesen Ergebnissen übereinstimmend, beträgt das *Clusterin*-Expressionslevel in den Ras-transformierten FE-8 Zellen etwa ein Drittel des der 208F Zellen. Während die Inhibition des PI3K-Signalwegs keine Änderung der *Clusterin*-Expression bewirkt, führt die Anwendung des MEK-Inhibitors U0126 in den FE-8 Zellen zu einer Aktivierung. Die Transkriptionsaktivierung ist bereits 6 h nach Inhibitorgabe deutlich und erreicht ihr Maximum zum Zeitpunkt 24 h. Aus den Daten der IR-Zellen ergibt sich ein Zeitfenster von 2 h bis 6 h für die regulierenden Mechanismen, zeitgleich mit der Induktion von p21<sup>RAS</sup>. Ebenso findet sich zum Zeitpunkt 6 h eine dreifache Aufregulierung der *Clusterin*-Expression unter Anwendung des Histondeacetylaseinhibitors. Die Aufregulierung infolge Demethylierung ist erst 18 h nach Inhibitorbehandlung deutlich. Vergleichende Methylierungsuntersuchungen in Geweben hoher und niedriger *Clusterin*-Expression im Genitaltrakt männlicher Ratten konnten bereits hypomethylierte Regionen des *Clusterin*-Gens in Geweben erhöhter *Clusterin*-Expression identifizieren, was auf eine methylierungsabhängige Regulation des *Clusterin*-Gens hinwies [Rosemlit and Chen, 1994]. Aus den eigenen und weiteren Untersuchungsergebnissen ergibt sich, dass eine Repression der *Clusterin*-Expression in den FE-8 Zellen primär durch Histondeacetylierung und sekundär durch Methylierung, vermittelt über den Raf/MEK/ERK-Signalweg, wahrscheinlich ist [Lund et al., 2006]. Dass die Inhibition von *DNMT1* eine Reexpression von *Clusterin* in den FE-8 Zellen bewirkt, rückt die DNA-Methyltransferase als mögliches Schlüsselenzym in den Fokus. Denkbar wäre hier eine direkte Interaktion der DNMT1 mit einer HDAC [Fuks et al., 2000].

Methylierungsanalysen in den 208F und FE-8 Zellen konnten zeigen, dass die Methylierung von CpGs im *Clusterin*-Promotor und einer CpG-Insel 14,5 kb upstream des Promotors für die *Clusterin*-Repression in den FE-8 Zellen verantwortlich ist [Lund et al., 2006]. Die Hypothese stützend, dass die Methylierung erst sekundär nach der Hypoacetylierung zum Tragen kommt, zeigte sich in den IR-4 Zellen erst 240 h nach Ras-Induktion eine Methylierung des Promotors [Lund et al., 2006]. Die Regulation der *Clusterin*-Expression kann zelltypabhängig und stimulusabhängig, beispielsweise durch Steroidhormone und Wachstumsfaktoren oder auch durch ionisierende Strahlung, sehr variabel erfolgen. Entsprechend wurden eine Vielzahl von DNA-Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren und andere DNA-regulatorische Elemente identifiziert. So finden sich in der hoch konservierten Promotorregion des *Clusterin*-Gens Bindungsstellen für AP-1 (activator protein 1), AP-2 (activator protein 2), Sp1 und NF1 (nuclear factor 1) [Trogakos and Gonos, 2002]. Das AP1-Protein ist ein dimerer Transkriptionsfaktor aus Jun/Jun-Homodimeren oder Jun/Fos-Heterodimeren, abhängig von den Komponenten differiert die transkriptionelle Aktivität. Beteiligung von c-Fos am AP-1-Komplex wirkt reprimierend am *Clusterin*-Promotor. TGF $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ ) kann die c-Fos-Bindung lösen und darüber eine *Clusterin*-Reexpression vermitteln [Jin and Howe, 1999]. Phosphorylierung der C-terminalen c-Fos-Region durch die MAPK und die RSK (90 kDa-ribosomal S6 kinase) fördert die Stabilität von c-Fos und erhöht seine transkriptionelle Aktivität [Chen et al., 1996].

Der Anstieg der *Clusterin*-Expression ab dem Zeitpunkt 72 h in den unbehandelten 208F Zellen ist als Zelldichteeffekt zu verstehen. Für die Expressionssteigerung unter TSA zwischen 6 h und 48 h müssen jedoch weitere, direkte oder eher indirekt durch TSA induzierte Mechanismen ursächlich sein.

In humanen Zellen existieren zwei *Clusterin*-Isoformen mit antagonistischen Funktionen. Sekretorisches sClu wirkt zellprotektiv mit verlängertem Zellüberleben und gesteigertem Metastasierungspotential, nukleäres nClu wirkt proapoptotisch. Das Verhältnis sClu/nClu scheint kritisch für das Zellüberleben zu sein, wobei Tumorzellüberleben mit einer Überexpression von sClu und einem Verlust von nClu assoziiert ist [Trogakos et al., 2009]. Trotz verminderter *Clusterin*-mRNA in den FE-8 Zellen kann die Überexpression eines 40 kDa-Proteins bei gleichzeitiger Verminderung einer 60 kDa-Form im Vergleich zu den 208F Zellen nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Behandlung mit dem MEK-Inhibitor U0126 führt zu einer Repression des

40 kDa Peptids. Im humanen System wird die Synthese der nukleären Clusterinform auf ein alternatives Spleiß-Produkt zurückgeführt. Dieses Modell ist auf Rattenzellen mangels eines zweiten AUG-Startcodons im Bereich von Exon I/II nicht übertragbar und bedarf weiterer Untersuchungen [Shannan et al., 2006]. Lund et al. haben eine mögliche Regulation des Spleiß-Produktes über die 14,5 kb upstream liegende CpG-Insel postuliert [Lund et al., 2006].

### **5.2.2 Mmp2, Timp2 und Thbs1**

Die Genprodukte von Mmp2, Timp2 und Thbs1 bilden ein funktionelles Modul. Für die im Rahmen der Tumorgenese erworbenen Fähigkeiten der Angiogenese, der Invasion und Metastasierung sind proteolytische Prozesse im Bereich von Basalmembranen und extrazellulärer Matrix unabdingbar [Hanahan and Folkman, 1996]. Eine Degradation der extrazellulären Matrix bedeutet Verlust von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten, welches sowohl die Migration endothelialer Zellen und in der Folge die Bildung neuer Blutgefäße als auch die Migration von Tumorzellen unterstützt. Durch Umbauprozesse im umgebenden Gewebe induzieren Tumoren die Bildung eines tumorspezifischen Stromas, das die Tumorzellen vor Immunreaktionen und Apoptose schützt.

### **5.2.3 Matrix Metalloproteinase 2**

Die Endopeptidase Mmp2 gehört zu einer Familie von mehr als 20 bekannten humanen Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und ist für den Abbau von Zelloberflächenproteinen und extrazellulärer Matrix verantwortlich. Sie wird, parakrin durch Wachstumsfaktoren und Zytokine stimuliert, als ein sekretorisches Proenzym synthetisiert. Die Substratspezifität von Mmp2 bezieht sich vor allem auf die Degradation von Komponenten der Basalmembran, Gelatin und Kollagen Typ IV, des Weiteren auf Kollagen Typ I, Typ XI und Laminin [Hamacher et al., 2004]. Mit der Degradation von extrazellulärer Matrix geht die Freisetzung und Aktivierung verschiedener Wachstumsfaktoren und Wachstumsfaktor-Rezeptoren, darunter TGF $\alpha$ , TGF $\beta$  (Transforming growth factor  $\alpha$  und  $\beta$ ), IGF (Insulin like growth factor) und FGFR (Fibroblast growth factor receptor) sowie von Zelladhäsionsmolekülen einher. Gleichzeitig werden anti-angiogene Faktoren wie Angiostatin und Endostatin aktiviert. Natürliche Inhibitoren der Matrix Metalloproteinasen sind  $\alpha_2$ -Makroglobulin und TIMPs. Thbs 1 bindet pro-Mmp2 und verhindert so deren Aktivierung. Im Allgemeinen

beobachtet man in invasiven Tumoren eine Steigerung der MMP-Expression, die mit fortgeschrittenen Tumorstadien, gesteigerter Invasion und Metastasierung sowie schlechteren Überlebensraten einhergeht [Egeblad and Werb, 2002]. Die Stärke der *Mmp2*-Expression erwies sich als negativer prognostischer Faktor in Karzinomen von Ovar, Mamma, Magen und Bronchien [Turpeenniemi-Hujanen, 2005;Kuvaja et al., 2006]. In den *Ras*-transformierten FE-8 Zellen ist die *Mmp2*-mRNA reprimiert und wird erst durch Inhibition des Raf/MEK/ERK-Signalwegs aktiviert. Diese Kontroverse könnte auf den Umstand zurückgeführt werden, dass sich die vorliegenden Untersuchungen auf Zellkulturen beziehen, denn nur in einem Gewebe besteht für maligne Zellen die „Notwendigkeit“ von Prozessen wie Matrixdegeneration und Invasion. Gestützt wird diese Annahme durch eine Arbeit von Kuvaja et al., wonach der prognostische Wert von im Blut zirkulierendem *Mmp2* mit dem der soliden Tumoren nicht übereinstimmt [Kuvaja et al., 2006]. Andererseits zeigen die Endopeptidasen *Mmp3* und *Mmp10* in den FE-8 Zellen eine Aktivierung, Behandlung mit dem MEK-Inhibitor PD98059 führte zu einer Repression [Zuber et al., 2000]. Diese Konstellation spricht für eine zellspezifisch komplexe, Ras-abhängige Regulation der Matrix Metalloproteinasen und unterstützt die Hypothese einer dualen Funktion der MMPs [Egeblad and Werb, 2002].

MMPs sind Klasse II-Gene. Aus der Literatur sind drei MAPKKK-Signalwege, darunter auch der Raf/MEK/ERK-Signalweg, bekannt, die in humanen Zellen die Promotoren der *Mmp2* regulieren. Regulatorische Elemente beinhalten Bindungsstellen für AP-1, AP-2, Sp1, Ets-1, YB1 (Y-Box transcription factor) [Mook et al., 2004]. Inhibition des Raf/MEK/ERK-Signalwegs in den FE-8 Zellen führt zu einer Aufregulierung von *Mmp2* zwischen 6 h und 24 h, in den IR-Zellen im gleichen Zeitfenster zur Repression. Eine ebenfalls beschriebene Regulation über den PI3K-Signalweg ist im Zellsystem 208F/FE-8 aus technischen Gründen nicht untersucht.

Behandlung der FE-8 Zellen mit 5-Aza-CdR führte zu einer deutlichen Steigerung der *Mmp2*-Expression zwischen 18 h und 96 h, die auf eine methylierungsabhängige Regulation hinweisen könnte. Diese Arbeitshypothese untermauernd, hatte RNAi gegen *DNMT1* eine Reexpression von *Mmp2* zu Folge. Eine Methylierungsanalyse von Lund et al. ergab eine gleichmäßig verteilte, inkomplette Demethylierung des *Mmp2*-Promotors nach Anwendung von 5-Aza-CdR [Lund et al., 2006]. Unter Anwendung von TSA zeigte sich eine Expressionssteigerung für die Zeitpunkte 6 h und 12 h sowie ab dem Zeitpunkt 48 h. Wie für *Clusterin* ist demnach auch für *Mmp2* eine negative

Regulation in den FE-8 Zellen primär durch Histondeacetylierung und sekundär durch Methylierung, vermittelt über den Raf/MEK/ERK-Signalweg, möglich.

#### **5.2.4 Tissue inhibitor of metalloproteinase 2**

Timp2 gehört zu einer vier Mitglieder zählende Familie von Kollagenaseinhibitoren mit einer stark variierenden Gewebeverteilung und einem spezifischen Hemmungsmuster für die Matrix Metalloproteinasen. Die Bindung der Proteaseinhibitoren an ihre Substrate erfolgt mit hoher Affinität, wobei Timp2 vorzugsweise Mmp2 bindet. Hohe Timp2-Level führen zu einer effizienten und reversiblen enzymatischen Inaktivierung von Mmp2, wohingegen niedrige Timp2-Level mit einer MT1 (membrane-type)-MMP-vermittelten Mmp2-Aktivierung assoziiert sind. Die duale Funktion der MMPs ist demnach auch in den TIMPs wieder zu finden [Stetler-Stevenson, 2008]. Im Sinne multifunktionaler Proteine sind auch MMP-unabhängige biologische Aktivitäten möglich, darunter eine MAPK-vermittelte Wachstumspromotion, die über Ras gesteuert werden kann, eine Wachstumsinhibition, die über FGF-2 (Fibroblast growth factor 2) vermittelt wird und antiangiogene Effekte [Stetler-Stevenson, 2008]. Das Bild der Timp2-Expression zeigt sich letztlich sehr variabel, so dass die Funktion der Proteaseinhibitoren gewebespezifisch und abhängig von der Mikroumgebung vermutet werden muss.

Eine Aufregulierung der *Timp2*-Expression unter Behandlung mit U0126 und PD98059 in den FE-8 Zellen bzw. eine Suppression 12 h nach Ras-Induktion in den IR-Zellen kennzeichnet den Proteaseinhibitor im untersuchten Zellsystem als Zielgen des MAPK-Signalwegs. In humanen Tumoren kann das Niveau der *Timp2*-Expression sowohl durch genetische Polymorphismen, als auch durch epigenetische Veränderungen wie Promotormethylierung supprimiert sein [Galm et al., 2005; Pulukuri et al., 2007]. Eine Transkriptionsaktivierung kann durch Zytokine und Wachstumsfaktoren wie TGF $\beta$  vermittelt werden. Promotoranalysen haben Sp-1-Bindungsstellen identifiziert.

Die Behandlung von humanen Prostatakarzinomzellen mit 5-Aza-CdR und TSA führte zu einer Reexpression von *Timp2*. Des Weiteren konnte eine präferentielle Bindung von MeCP2 an methylierte CpG-Inseln im *Timp2*-Promotor gezeigt werden [Pulukuri et al., 2007]. Durch die Anwendung des demethylierenden Agens 5-Aza-CdR wurde auch in den FE-8 Zellen eine Steigerung der *Timp2*-Expression erreicht. Diese begann nach dem Zeitpunkt 24 h. Eine beginnende Transkriptionssteigerung infolge

Histonacetylierung zeigte sich ab 48 h. Bisulfit-Sequenzierung im Rahmen weiterführender Untersuchungen [Lund et al., 2006] konnte allerdings nur eine geringe Methylierung der CpG-Insel des *Timp2*-Promotors aufdecken. Möglicherweise kommt hier ein Mechanismus zum Tragen, über den 5-Aza-CdR eine vermehrte Bindung des NF-Y (nuclear factor Y) am *Timp2*-Promotor mit einer *Timp2*-Reexpression bewirkt [Cappabianca et al., 2003].

### 5.2.5 Thrombospondin 1

Die Daten für das Transkriptionsprodukt *Thrombospondin 1* warfen eine Vielzahl Fragen auf, da diese sich in den Kinetiken erheblich von den anderen untersuchten Genen unterscheiden. Wie bereits anfangs beschrieben, muss grundsätzlich in Frage gestellt werden, ob es sich bei dem untersuchten Transkriptionsprodukt tatsächlich um *Thbs1* handelt. Die Sequenzhomologie des Sequenzabgleichs 01/2009 lag im 3'-Bereich außerhalb von *Thrombospondin 1*, in der entgegengesetzten Leserichtung außerhalb des 5'-Bereichs von Similar to fibrous sheath interacting protein. Eine endgültige Zuordnung ist aktuell nicht möglich.

Thrombospondin 1 ist ein multifunktionales Protein der extrazellulären Matrix mit einer zentralen Rolle in der Angiogenese. Umfangreiche Untersuchungen ergeben ein komplexes Bild in der Funktion des Proteins und seiner Angiogeneseregulation. Angiogenese ist für die Selbstversorgung eines wachsenden Tumors ebenso essentiell wie für die hämatogene Metastasierung, und es zeichnet sich die Bedeutung einer Balance zwischen pro-angiogenen und anti-angiogenen Faktoren ab. In verschiedenen Tumoren konnte eine verminderte *Thbs1*-Expression beobachtet werden, Reexpression in Tumorzelllinien ging mit Verminderung von Tumorwachstum, von Angiogenese und Metastasierung einher [Kazerounian et al., 2008]. In frühen Tumorstadien exprimieren Stromazellen *Thbs1*, welches die Neoangiogenese hemmt und das Tumorwachstum kontrolliert. Nach einem „angiogenen Switch“ kann *Thbs1* die Interaktion normaler und neoplastischer Zellen mit der extrazellulären Matrix modulieren: Nicht-angiogene Tumorzellen exprimieren mehr *Thbs1* als angiogene Tumorzellen, die Balance angiogener Faktoren verschiebt sich in Richtung pro-angiogen. In einer hohen Konzentration aktiviert *Thbs1* dann das proteolytische Plasmin, welches Zellinvasion fördert. In einer niedrigeren Konzentration fördert es Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakte, die für das Tumorzellwachstum erforderlich sind [Kazerounian et al., 2008].

Die antiangiogenen Effekte werden funktionell durch die Bindung von

Thrombospondin 1 an den Membranrezeptor CD36 auf endothelialen Zellen vermittelt. Downstream von CD36 liegen die Kinasen p38 und JNK-1 (c-Jun N-terminal Kinase-1), die Apoptose induzieren [Armstrong and Bornstein, 2003]. Indirekte Effekte resultieren aus der Aktivierung von TGF $\beta$  durch Thrombospondin 1: Bei TGF $\beta$ -Sensitivität der Zellen wird das Wachstum der Tumorzellen gehemmt. Eine Bindung von Thrombospondin an Matrix Metalloproteinasen verhindert deren Aktivierung und damit eine Freisetzung pro-angiogener Faktoren.

Mechanistisch konnte gezeigt werden, dass Onkogene wie *Ras*, *c-Jun*, *c-Myc* und der Transkriptionsfaktor Id1 [Volpert et al., 2002] die *Thbs1*-Expression reprimierend, während Tumorsuppressorgene wie p53 [Dameron et al., 1994] und Rb [Salnikow et al., 1994] die Expression positiv regulieren. Im Gegensatz zu den Expressionsänderungen der anderen Gene, ist *Thbs1* in den FE-8 Zellen zum Zeitpunkt 6 h nach Behandlung mit U0126 bereits stark aufreguliert, wird im Weiteren reprimiert und ist zum Zeitpunkt 96 h nicht mehr nachweisbar. Die Ergebnisse unter PD98059 aus dem Übersichtsversuch sind damit kongruent. Entscheidend für die (Ras-abhängige) Regulation müssen diesbezüglich Ereignisse sein, die bereits vor dem Zeitpunkt 6 h liegen; die Inhibition von MEK hat dann nur kurz- und mittelfristige Expressionsänderungen von *Thbs1* zur Folge. Die Gründe dafür sind unklar. Auch die Kontrollkinetiken sowohl der FE-8 als auch der 208F Zellen zeigen eine Abnahme der *Thbs1*-Expression über 96 h. Ursächlich müssten diesbezüglich Zelldichteveränderungen untersucht werden, die nicht mit einer kritischen Schwelle relevant würden, sondern mit kontinuierlicher Zelldichtezunahme eine kontinuierliche Abnahme der *Thbs1*-Expression bewirken. In den IR-Zellen zeigt sich eine *Thbs1*-Suppression nur zwischen 24 h und 72 h. Ein Erklärungsmodell für die frühe Aufregulation fehlt.

Watnick et al. haben, ausgehend von zwei humanen Zelllinien, ein komplexes Modell entwickelt, in welchem die Repression von *Thbs1* den kritischen Schritt hin zur Neovaskularisierung darstellt. Abhängig vom *Ras*- und *Myc*-Status könnte *Thbs1* als Mediatorprotein selbst den „angiogenen switch“ in Tumorzellen vermitteln. Dabei aktiviert Ras über PI3K, Rho und ROCK durch Phosphorylierung *Myc*, woraus eine Repression der *Thrombospondin*-Expression folgt [Watnick et al., 2003]. Li et al. stellten Methylierung als potentiellen Mechanismus zur Inaktivierung des *Thbs*-Gens dar [Li et al., 1999]. Übereinstimmend mit diesen Daten führt Behandlung der FE-8 Zellen sowohl

mit 5-Aza-CdR als auch mit TSA zu einer Aufregulierung von *Thbs1*. Die Effekte unter 5-Aza-CdR beginnen zwischen 12 h und 18 h nach Inhibitorzugabe, die unter TSA nach dem Zeitpunkt 24 h. Damit können epigenetische Mechanismen für die Inaktivierung von *Thbs* in den FE-8 Zellen vermutet werden. Eine gleichzeitige zeitliche Zuordnung der Expressionsänderungen unter MEK-Inhibition ist aber nicht möglich.

### **5.2.6 Lectin, galactoside-binding, soluble 3 binding protein**

Galectine sind eine umfassende Gruppe Glykan-bindender Proteine, die als adhäsionsmodellierende Proteine in verschiedenste Zellprozesse eingebunden sind. Zu ihren Liganden gehören u. a. Laminin, Fibronectin und Lectin, galactoside-binding, soluble 3 binding protein (Lgals3bp), wobei namentlich die Galectine 1, 3 und 7 spezifische Bindungspartner von Lgals3bp sind. Lgals3bp, ein 90 kDa großes Protein, wird von verschiedenen Zelltypen synthetisiert und sezerniert. Erhöhte Serumspiegel sind bei Hepatitis B und C, bei HIV-Infektion, aber auch Krebserkrankungen messbar. Erhöhte Serumspiegel korrelieren mit einer schlechteren Prognose und dem Auftreten von Fernmetastasen beim Mammakarzinom und Bronchialkarzinom, mit einem verminderten Therapieansprechen bei Non-Hodgkin-Lymphomen [Grassadonia et al., 2004]. Die bisher vorliegenden Daten haben zur Entwicklung eines Modells geführt, in welchem Lgals3bp Tumorzellen verknüpft, die auf ihrer Oberfläche Galectin 1 oder Galectin 3 exprimieren. Die Formierung solcher Tumorzellaggregate ist ein kritischer Schritt für die hämatogene Metastasierung. Ebenso kann die Adhäsion der Aggregate an der extrazellulären Matrix Apoptose verhindern und die Formierung neuer Tumorkolonien ermöglichen [Grassadonia et al., 2004]. Im Gegensatz dazu findet sich in manchen Tumoren aber auch eine erniedrigte Lgals3bp-Expression. In der Diskussion dieser Diskrepanzen muss aber zwischen Lgals3bp-mRNA und aktivem Protein unterschieden werden [Fukaya et al., 2008].

Galectin 3 ist als selektiver Bindungspartner für Kras-GTP beschrieben, der eine Modulation der nachgeschalteten Signalwege mit Aktivierung von PI3K und Inhibition von ERK bewirkt [Elad-Sfadia et al., 2004]. Eine Rolle von Lgals3bp ist dabei aber bisher nicht untersucht. In den 208F und FE-8 Zellen wird *Lgals3bp* in den *Ras*-transformierten Zellen vermindert exprimiert, eine Aufregulierung unter MEK-Inhibition ab dem Zeitpunkt 6 h kennzeichnet es als Zielgen des Raf/MEK/ERK-Signalwegs. Die kurzzeitige Aufregulierung in den IR-Zellen kann aktuell nicht erklärt werden. Unter

Anwendung von 5-Aza-CdR ist ab dem Zeitpunkt 24 h eine Expressionssteigerung von *Lgals3bp* zu beobachten, die bis 120 h progredient ist. Dieser Expressionslevel wird unter der Kombinationsbehandlung 5-Aza-CdR/TSA nicht erreicht und unter Einzelbehandlung mit TSA zeigt sich eine Transkriptionsrepression. Diese ist zeitlich zwischen 6 h und 24 h nach Behandlung mit dem Histondeacetylaseinhibitor einzuordnen. Schlussfolgernd müssen direkte oder indirekte demethylierende Mechanismen, die die *Lgals3bp*-Expression regulieren, vermutet werden. Die Hyperacetylierung führt mutmaßlich zur Aktivierung eines Suppressors, der eine Reexpression von *Lgals3bp* verhindert und eine weitere Repression vermittelt. Diese *Lgals3bp*-Suppression unter TSA findet sich interessanterweise auch in den 208F Zellen, so dass es sich am ehesten nicht um einen Ras-Effekt handelt. Die Expressionssteigerungen zu den späten Untersuchungszeitpunkten in den unbehandelten 208F Zellen sind auf Zelldichteeffekte zurückzuführen.

Bemerkenswert ist die Kolokalisation von *Lgals3bp* und *Timp2* auf dem Chromosom 10q32.3 mit einem Abstand von 38 kb zwischen den Transkriptionsstartpunkten beider Gene ohne dazwischenliegende kodierende Regionen. Die Effekte der Inhibitoren auf beide Gene sind ähnlich. Denkbar wäre daher eine mögliche koordinierte, übergeordnete Regulation beider Gene. Eine domänenspezifische Regulation von Genclustern ist bereits für das genomische Imprinting bekannt [Wan and Bartolomei, 2008].

### **5.2.7 Lysyl oxidase**

Lysyl oxidase ist ein Kupfer-abhängiges Enzym der extrazellulären Matrix, das die kovalente Verknüpfung von Kollagenen und Elastin katalysiert. Die Bedeutsamkeit des Enzyms für die strukturelle Integrität der extrazellulären Matrix zeigt sich in den mit Strukturstörungen assoziierten Erkrankungen. So findet sich eine verminderte *Lox*-Expression bei Cutis laxa und spontaner Koronargefäßdissektion. Bei Atherosklerose, Leberzirrhose und der Alzheimer Erkrankung ist die Expression erhöht. In verschiedenen humanen Neoplasien ist sowohl eine Suppression als auch eine Erhöhung der *Lysyl oxidase*-Expression beschrieben, wobei weitere Untersuchungen auf eine divergente Funktion, zum einen als Tumorsuppressorgen, zum anderen als Promotor im Metastasierungsprozess hindeuten [Payne et al., 2007]. Lysyl oxidase kann *Ras*-abhängige Transformation in NIH3T3-Zellen inhibieren und zu

phänotypischer Reversion führen [Palamakumbura et al., 2004], stabile Suppression von *Lox* in Keratinozyten hatte deren Invasion in die Dermis zur Folge [Bouez et al., 2006]. In Karzinomen der Mamma, Prostata und Niere korrelierte eine hohe *Lox*-Expression mit einer schlechteren Prognose, assoziiert mit schlechter Differenzierung, höheren Rezidivraten und vermindertem Gesamtüberleben [Payne et al., 2007]. *Lox* scheint insbesondere in fortgeschrittenen Tumorstadien und im Metastasierungsprozess bedeutsam zu sein.

Bereits frühere Arbeiten zur *Lysyl oxidase* in *Hras*-transformierten Rattenfibroblasten zeigten niedrige mRNA-Level und ein ankerunabhängiges Wachstum in FE-8 Zellen im Vergleich zu hohen Expressionsleveln der *Lysyl oxidase* und einem schwachen Wachstum in Weichagar in spontanen phänotypischen Revertanten [Hajnal et al., 1993]. Damit übereinstimmend ist in den aktuellen Untersuchungen das Expressionsniveau von *Lysyl oxidase* in den *Ras*-transformierten FE-8 Zellen nur halb so hoch wie in den immortalen 208F Zellen und *Ras*-Induktion in den IR-Zellen führt zu einer *Lox*-Suppression um den Faktor fünf. Die intermittierende *Lox*-Aktivierung in den IR-Zellen zu den frühen Zeitpunkten ist ein wiederholt beobachtetes Phänomen, siehe auch *Thbs1* und *Mmp2*; die Gründe sind bisher allerdings unklar. Zuber et al. hatten eine Reexpression von *Lox* unter PD98059 verzeichnet [Zuber et al., 2000]. Im Übersichtsversuch zeigt sich bei Inhibition von MEK eine schwache *Lox*-Aufregulierung, unter U0126 um den Faktor 1,5. Aus der Kinetik ergeben sich allerdings keine spezifischen Effekte. Auch unter Inhibition der PI3K zeigen sich keine Expressionsänderungen. Smith-Mungo et al. beschreiben hingegen den PKC/MEK/ERK-Signalweg als kritisch für die *Lysyl oxidase*-Expression [Smith-Mungo and Kagan, 2002], welcher für das Zellsystem untersucht werden müsste.

In humanen Magenkarzinomen ist eine Suppression der *Lysyl oxidase* durch Promotormethylierung nachgewiesen worden [Kaneda et al., 2004]. In den FE-8 Zellen findet sich unter Anwendung von 5-Aza-CdR und TSA hingegen eine Suppression der *Lox*-Expression. Am ehesten müssen hier indirekte Inhibitorwirkungen vermutet werden, die über die Regulation zwischengeschalteter Proteine diese Repression bewirken. Andererseits ist bekannt, dass *Lox* selbst über Interaktion mit den Histonen H1 und H2 in Prozesse der Transkriptionsregulation eingebunden ist [Giampuzzi et al., 2003]. Über Inaktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B ist sogar eine partielle Antagonisierung der Ras-abhängigen Raf/MEK/ERK- und PI3K-Signalwege möglich [Jeay et al., 2003].

Die Bedeutung von *Lox* für das Zellsystem 208F/FE-8 ist aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen nicht eindeutig zu belegen. Weiterführende Proteinuntersuchungen müssen berücksichtigen, dass Lysyl oxidase als ein Precursor-Protein synthetisiert und im Folgenden zu einem aktiven Enzym und einem Propeptid, beide mit einer katalytischen Aktivität, prozessiert wird [Payne et al., 2007].

### 5.2.8 Lysyl oxidase related protein 2

Lysyl oxidase related protein 2 wurde erst 1999 als eines der fünf Proteine der Lysyl oxidase-Familie identifiziert und ist bisher wenig untersucht. Die Aktivität der verschiedenen Lysyloxidasen ist abhängig von Zellart und Entwicklungsstadium, Homologien finden sich in der Kupfer-Bindungsdomäne und der katalytischen Domäne. Die Detektion von *Lox12* als Doppelbande bei 2,6 und 5 kb im Northern Blot lässt Spleiß-Varianten der Ratten-mRNA vermuten; aus humanen Expressionsuntersuchungen sind eine 3,6 kb und eine 4,9 kb mRNA bekannt [Jourdan-Le Saux et al., 1999]. Die Organverteilung von *Lox12* ist ubiquitär, aber in reproduktiven Geweben wie Uterus, Plazenta und Prostata erhöht. In humanen Neoplasien ist zumeist eine Aufregulierung der *Lox12*-mRNA und des Proteins zu finden [Payne et al., 2007].

*Lysyl oxidase related protein 2* ist in den *Ras*-transformierten FE-8 Zellen im Vergleich zu den 208F Zellen reprimiert. Es ist ein Zielgen der MEK/ERK-Signalkaskade, wobei die aktivierenden Mechanismen in einem Zeitfenster zwischen 6 h und 18 h nach MEK-Inhibition einzuordnen sind. Die Repression von *Lox12* in den IR-Zellen vollzieht sich bis zum Zeitpunkt 48 h. Deutlich ist weiterhin eine Transkriptionsaktivierung infolge Hyperacetylierung, die sich im Übersichtsversuch zum Zeitpunkt 24 h zeigt. Die TSA-Kinetik wäre von Interesse, ist für *Lox12* aber nicht durchgeführt worden. Behandlung mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-CdR lässt im Übersichtsversuch keine Regulation erkennen, in der Kinetik deutet sich bei 96 h und 120 h eine Transkriptionsaktivierung an, so dass die Auswirkungen der Demethylierung in dem untersuchten Zeitfenster möglicherweise nicht vollständig erfasst wurden. Zu hinterfragen wäre hier, ähnlich wie für *Clusterin*, eine mögliche primäre Bedeutung der Histondeacetylierung und erst sekundär der Methylierung bei der Suppression der *Lysyl oxidase like 2* in den FE-8 Zellen.

### 5.2.9 Follistatin-like 1

Fstl1 oder TSC-36 (TGF $\beta$ -stimulated clone 36), ein extrazelluläres Glykoprotein, ist bisher wenig untersucht. Eine verminderte Expression konnte in Bronchial-, Ovarial- und Endometriumkarzinomen nachgewiesen werden [Sumitomo et al., 2000; Chan et al., 2009]. Reexpression in Karzinomzelllinien hatte verminderte Wachstumsraten und eine höhere Apoptoseraten zur Folge.

Während *Fstl1* in 208F Zellen gut exprimiert wird, zeigte sich in *v-Fos*- und *Ras*-transformierten Rattenfibroblasten eine Suppression. Reexpression von *Fstl1* in den *v-Fos*-transformierten Rattenfibroblasten hatte eine Hemmung der *in vitro*-Invasion zur Folge und ließ auf eine AP1-Abhängigkeit des Invasionsprogramms der Fibroblasten schließen [Johnston et al., 2000]. Mit diesen Daten übereinstimmend, beträgt das Expressionsniveau von *Fstl1* in den FE-8 Zellen ein Drittel des der 208F Zellen. Aufregulierung unter der Anwendung der MEK-Inhibitoren kennzeichnet *Fstl1* als Zielgen des Raf/MEK/ERK-Signalwegs und datiert die Regulation in ein Zeitfenster zwischen 6 h und 48 h nach Inhibitorbehandlung. Zeitgleich findet auch die Repression von *Fstl1* in den IR-Zellen statt. Expressionsänderungen durch Demethylierung oder Inhibition der Histondeacetylase fanden sich nicht. Allerdings wurde keine TSA-Zeitkinetik durchgeführt, so dass Regulationen auch zu einem anderen als dem untersuchten Zeitpunkt 24 h möglich sind.

In der U0126-Zeitkinetik der 208F steigt die Fstl1-Expression kontinuierlich über den gesamten Untersuchungszeitraum. Diese Veränderungen sind eher nicht auf Zelldichtezunahmen zurückzuführen; möglicherweise wird Fstl1 zellzyklusabhängig reguliert.

## 6 Ausblick oder Krebs ist nicht irreversibel [Sager, 1997]

Eine Bedeutung epigenetischer Veränderungen für die Tumorgenese ist unstrittig; dieses Wissen muss nun praktisch umgesetzt werden. Der Nachweis von hypermethylierten Tumorzellen ist bereits aus Lymphknoten, Sputum, Urin und Samenflüssigkeit gelungen, so dass die Detektion von epigenetischen Veränderungen für die Diagnostik von Krebs eingesetzt werden könnte. Werden bestimmte hypermethylierte Gene nachgewiesen, wären möglicherweise prognostische Aussagen über das Ursprungsgewebe des Tumors, die Aggressivität des Tumors im Hinblick auf Angiogenese und Metastasierung sowie Sensitivität für bestimmte Therapien ableitbar. Und letztlich eröffnet sich die Chance auf neue therapeutische Strategien, denn epigenetische Veränderungen sind reversibel, die genetische Struktur der Gene ist intakt. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Gene sind teilweise bereits Gegenstand gezielter therapeutischer Eingriffe; wobei für den richtigen Einsatz dieser Therapien ein Verständnis der Genregulation essentiell ist. Überexpression der sekretorischen Form des Clusterins geht mit Resistenz gegen Chemotherapeutika und Apoptose-induzierende Agenzien einher, weshalb Antisense Oligonukleotide gegen *Clusterin* entwickelt wurden. Phase I-Studien beim fortgeschrittenen Mammakarzinom kombinieren diese mit dem HER-2-Antikörper Trastuzumab und erreichen eine Wachstumshemmung und Induktion von Apoptose. RNAi gegen Clusterin und damit Ausschaltung antiapoptotischer Funktionen in humanen, androgenunabhängigen Prostatakarzinomzellen führte zu einer Zunahme der Chemosensitivität *in vivo* und *in vitro* [Miyake et al., 2000]. Phase I-Studien zum Prostatakarzinom, die die konventionellen Therapien um die Anwendung von Antisense Oligonukleotiden gegen *Clusterin* ergänzen, verbessern die Wirksamkeit von Chemotherapeutika, Radiatio und Androgenentzug. Das Wissen um die Matrix Metalloproteinasen hat zur Herstellung synthetischer Inhibitoren geführt, wobei sich die medikamentöse Angriffspunkte auf eine Inhibition der MMP-Synthese, eine Interaktion mit MMP-mRNA oder Rezeptor-Tyrosinkinasen und eine Inhibition der MMP-Aktivität beziehen. Diese Substanzen wirken zum einen nicht selektiv gegen bestimmte MMPs, andere hemmen spezifisch die Expression einzelner MMPs. In einem Prostatakarzinommodell konnte beispielsweise die Hemmung von Tumorwachstum, Invasion und Metastasierung unter Metastat, einem nicht antimikrobiellen Tetracyclin-Derivat, das die Expression von Mmp2 und Mmp9 hemmt, nachgewiesen werden [Lokeshwar et al., 2002]. Während die klinischen

Daten auf eine wichtige Rolle der MMPs in der Tumorprogression hinweisen, wurden MMP-spezifische Krebstherapien aber bisher nur in fortgeschrittenen Tumorstadien eingesetzt. Insgesamt waren die Ergebnisse nicht zufrieden stellend; die diskutierten Gründe sind vielfältig [Egeblad and Werb, 2002]. Therapeutische Ansätze zur Behandlung von Mäusen mit Angiogeneseinhibitoren [Parangi et al., 1996] bzw. von Maus-Melanommetastasen mit Thrombospondin-Mimetika [Reiher et al., 2002] beeinträchtigte das Tumorwachstum, führte aber zu keinem Wachstumsstillstand der Tumoren. Der Proliferationsindex behandelter Tumorzellen und der Kontrollzellen war gleich, wohingegen die Dichte von Mikrogefäßen deutlich reduziert und der apoptotische Index in den Tumorzellen verdoppelt war [Parangi et al., 1996]. Aufgrund der eigenen Untersuchungsergebnisse zeichnet sich ein diffiziles Bild in der Regulation der Matrix Metalloproteinasen ab, die wiederum in ein komplexes Modul mit weiteren Genen wie TIMPs und Thrombospondin eingebettet sind. Möglicherweise liegen therapeutische Ansätze hier eher in einer Kontrolle der übergeordneten (epigenetischen) Regulation, beispielsweise über die DNA-Methyltransferase 1.

Epigenetische Veränderungen von Genen können über Ras-Signalwege vermittelt werden [Lund et al., 2006; Patra, 2008]. Der Raf/MEK/ERK-Signalweg ist in einer Vielzahl Tumoren aktiviert, reguliert Zellwachstum, Zellüberleben und Metastasierung und kann entsprechend pharmakologisch therapeutisch genutzt werden. Er ist eingebunden in ein komplexes Signalnetzwerk, das über zahlreiche weitere Proteine reguliert und über Feedbackschleifen kontrolliert wird [Kolch, 2005]. Pharmakologische Substanzen umfassen den Zelloberflächenrezeptor EGFR, Ras-Inhibitoren (z. B. gegen Enzyme der posttranslationalen Modifikation) und Inhibitoren der Raf/MEK/ERK-Kaskade [Roberts and Der, 2007]. Modulatoren der Ras-abhängigen Signalwege könnten mit genspezifischen Therapien kombiniert werden, um die Effektivität der Behandlung zu erhöhen; beispielsweise Inhibitoren der Raf/MEK/ERK-Kaskade zur Wachstumshemmung mit Antisense Oligonucleotiden gegen Clusterin zur Steigerung der Apoptoserate, wobei die Raf/MEK/ERK-Inhibition eine zusätzliche Modulation der Clusterin-Expression bewirkt.

Nicht zuletzt wird die Effektivität zielgerichteter Therapie ebenso durch Resistenzen limitiert wie es von konventionellen Chemotherapien bekannt ist. Für eine erfolgreiche Behandlung von Krebserkrankungen wird deshalb die Kombination verschiedener Therapien notwendig werden.

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Methylierung und Acetylierung auf die Expression von insgesamt acht Ras-abhängigen Genen im Rattenfibroblasten-Zellsystem 208F/FE-8 untersucht. Alle Gene wurden unter Inhibition des Raf/MEK/ERK-Signalwegs in den FE-8 Zellen aufreguliert (nur für *Lox* in der U0126-Kinetik nicht reproduziert). *Clusterin*, *Loxl2*, *Mmp2*, *Thbs1*, *Timp2* und *Lgals3bp* wurden auch durch das demethylierende Agens 5-Aza-CdR in den *Ras*-transformierten FE-8 Zellen aufreguliert. Anders als in den Vorversuchen wiesen *Fstl1* und *Lox* keine Regulierung bzw. eine Suppression unter 5-Aza-CdR auf. Inhibition der HDAC führte zu einer Aufregulierung von *Clusterin*, *Loxl2*, *Mmp2*, *Thbs1* und *Timp2*. *Lox* und *Lgals3bp* zeigten eine Suppression unter TSA, *Fstl1* keine Expressionsänderung. siRNA gegen *DNMT1* hatte eine Reexpression von *Clusterin* und *Mmp2* in den FE-8 Zellen zur Folge. Damit sind möglicherweise epigenetische Regulationen für die Inaktivierung von Genen infolge Promotormethylierung wichtige Teilmechanismen bei der malignen Transformation der Rattenfibroblasten. Die Gene *Loxl2*, *Mmp2*, *Timp2*, *Thbs1* und *Lgals3bp* werden derartig zumindest indirekt reguliert, für *Clusterin* konnte eine methylierungsabhängige Regulation nachgewiesen werden [Lund et al., 2006]. Für *Timp2* und *Lgals3bp* kann ein räumlicher Effekt auf der DNA mit übergeordneten regulatorischen Elementen für eine epigenetische Regulation postuliert werden: Beide Gene liegen auf dem Chromosom 10q32.3, zwischen ihren Transkriptionsstartpunkten befinden sich keine weiteren kodierenden Regionen. Ein mögliches Schlüsselenzym für eine Ras-abhängige epigenetische Regulation ist DNMT1. Behandlung der FE-8 Zellen mit den MEK-Inhibitoren PD98059 und U0126 führte zu einer morphologischen Reversion und induzierte einen Phänotyp, der dem der 208F Zellen sehr ähnlich ist. Damit ist der Raf/MEK/ERK-Signalweg offenbar für die Morphologie von FE-8 Zellen verantwortlich und die genannten Gene haben eine potentielle Funktion in der morphologischen Transformation des Zellsystems 208F/FE-8. Anwendung von 5-Aza-CdR hatte eine partielle Reversion der FE-8 Zellen zur Folge.

Für den Großteil der Gene ist bereits eine Beteiligung an der Transformation oder der Tumorgenese bekannt. Weitere Grundlagenforschung ist notwendig, um die komplexen Mechanismen der Genregulation (in Tumorzellen) aufzudecken. Erst dann können die Target Therapien für eine effiziente Behandlung von Krebs (individuell) ausgewählt werden.

## Literaturverzeichnis

- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, Saltiel AR (1995) PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 270: 27489-27494
- Armstrong LC, Bornstein P (2003) Thrombospondins 1 and 2 function as inhibitors of angiogenesis. *Matrix Biol* 22: 63-71
- Bakin AV, Curran T (1999) Role of DNA 5-methylcytosine transferase in cell transformation by fos. *Science* 283: 387-390
- Barbacid M (1987) ras genes. *Annu Rev Biochem* 56: 779-827
- Baylin SB, Herman JG, Graff JR, Vertino PM, Issa JP (1998) Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia. *Adv Cancer Res* 72: 141-196
- Boguski MS, McCormick F (1993) Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* 366: 643-654
- Bollag G, McCormick F (1991) Regulators and effectors of ras proteins. *Annu Rev Cell Biol* 7: 601-632
- Bos JL (1989) ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49: 4682-4689
- Bouez C, Reynaud C, Noblesse E, Thepot A, Gleyzal C, Kanitakis J, Perrier E, Damour O, Sommer P (2006) The lysyl oxidase LOX is absent in basal and squamous cell carcinomas and its knockdown induces an invading phenotype in a skin equivalent model. *Clin Cancer Res* 12: 1463-1469
- Boyd CD, Mariani TJ, Kim Y, Csiszar K (1995) The size heterogeneity of human lysyl oxidase mRNA is due to alternate polyadenylation site and not alternate exon usage. *Mol Biol Rep* 21: 95-103
- Brandt-Rauf PW, Carty RP, Chen J, Avitable M, Lubowsky J, Pincus MR (1988) Structure of the carboxyl terminus of the RAS gene-encoded P21 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 5869-5873
- Cameron EE, Bachman KE, Myohanen S, Herman JG, Baylin SB (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet* 21: 103-107
- Campbell SL, Khosravi-Far R, Rossman KL, Clark GJ, Der CJ (1998) Increasing complexity of Ras signaling. *Oncogene* 17: 1395-1413
- Cappabianca L, Farina AR, Tacconelli A, Mantovani R, Gulino A, Mackay AR (2003) Reconstitution of TIMP-2 expression in SH-SY5Y neuroblastoma cells by 5-azacytidine is mediated transcriptionally by NF-Y through an inverted CCAAT site. *Exp Cell Res* 286: 209-218
- Chan QK, Ngan HY, Ip PP, Liu VW, Xue WC, Cheung AN (2009) Tumor suppressor effect of follistatin-like 1 in ovarian and endometrial carcinogenesis: a differential expression and functional analysis. *Carcinogenesis* 30: 114-121
- Chen RH, Juo PC, Curran T, Blenis J (1996) Phosphorylation of c-Fos at the C-terminus enhances its transforming activity. *Oncogene* 12: 1493-1502
- Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N (1994) Control of angiogenesis in fibroblasts by p53 regulation of thrombospondin-1. *Science* 265: 1582-1584
- Davies SP, Reddy H, Caivano M, Cohen P (2000) Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors. *BiochemJ* 351: 95-105

- DeFeo-Jones D, Tatchell K, Robinson LC, Sigal IS, Vass WC, Lowy DR, Scolnick EM (1985) Mammalian and yeast ras gene products: biological function in their heterologous systems. *Science* 228: 179-184
- Downward J (1998) Mechanisms and consequences of activation of protein kinase B/Akt. *Curr Opin Cell Biol* 10: 262-267
- Egeblad M, Werb Z (2002) New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer* 2: 161-174
- Elad-Sfadia G, Haklai R, Balan E, Kloog Y (2004) Galectin-3 augments K-Ras activation and triggers a Ras signal that attenuates ERK but not phosphoinositide 3-kinase activity. *J Biol Chem* 279: 34922-34930
- Esteller M (2002) CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21: 5427-5440
- Esteller M, Herman JG (2002) Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 196: 1-7
- Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, Van Dyk DE, Pitts WJ, Earl RA, Hobbs F, Copeland RA, Magolda RL, Scherle PA, Trzaskos JM (1998) Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem* 273: 18623-18632
- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S (2006) The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 7: 21-33
- Feinberg AP, Vogelstein B (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132: 6-13
- Fukaya Y, Shimada H, Wang LC, Zandi E, DeClerck YA (2008) Identification of galectin-3-binding protein as a factor secreted by tumor cells that stimulates interleukin-6 expression in the bone marrow stroma. *J Biol Chem* 283: 18573-18581
- Fuks F, Burgers WA, Brehm A, Hughes-Davies L, Kouzarides T (2000) DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat Genet* 24: 88-91
- Futamura M, Monden Y, Okabe T, Fujita-Yoshigaki J, Yokoyama S, Nishimura S (1995) Trichostatin A inhibits both ras-induced neurite outgrowth of PC12 cells and morphological transformation of NIH3T3 cells. *Oncogene* 10: 1119-1123
- Galm O, Suzuki H, Akiyama Y, Esteller M, Brock MV, Osieka R, Baylin SB, Herman JG (2005) Inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene by promoter hypermethylation in lymphoid malignancies. *Oncogene* 24: 4799-4805
- Gaudet F, Hodgson JG, Eden A, Jackson-Grusby L, Dausman J, Gray JW, Leonhardt H, Jaenisch R (2003) Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation. *Science* 300: 489-492
- Giampuzzi M, Oleggini R, Di Donato A (2003) Demonstration of in vitro interaction between tumor suppressor lysyl oxidase and histones H1 and H2: definition of the regions involved. *Biochim Biophys Acta* 1647: 245-251
- Goelz SE, Vogelstein B, Hamilton SR, Feinberg AP (1985) Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms. *Science* 228: 187-190
- Grassadonia A, Tinari N, Iurisci I, Piccolo E, Cumashi A, Innominato P, D'Egidio M, Natoli C, Piantelli M, Iacobelli S (2004) 90K (Mac-2 BP) and galectins in tumor progression and metastasis. *Glycoconj J* 19: 551-556

- Griegel S, Traub O, Willecke K, Schafer R (1986) Suppression and re-expression of transformed phenotype in hybrids of HA-ras-1-transformed rat-1 cells and early-passage rat embryonic fibroblasts. *Int J Cancer* 38: 697-705
- Hahn WC, Weinberg RA (2002) Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat Rev Cancer* 2: 331-341
- Hajnal A, Klemenz R, Schafer R (1993) Up-regulation of lysyl oxidase in spontaneous revertants of H-ras-transformed rat fibroblasts. *Cancer Res* 53: 4670-4675
- Hamacher S, Matern S, Roeb E (2004) [Extracellular matrix -- from basic research to clinical significance. An overview with special consideration of matrix metalloproteinases]. *Dtsch Med Wochenschr* 129: 1976-1980
- Hanahan D, Folkman J (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86: 353-364
- Hanahan D, Weinberg RA (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70
- Hoshikawa Y, Kwon HJ, Yoshida M, Horinouchi S, Beppu T (1994) Trichostatin A induces morphological changes and gelsolin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines. *Exp Cell Res* 214: 189-197
- Janssens N, Janicot M, Perera T, Bakker A (2004) Housekeeping genes as internal standards in cancer research. *Mol Diagn* 8: 107-113
- Jeay S, Pianetti S, Kagan HM, Sonenshein GE (2003) Lysyl oxidase inhibits ras-mediated transformation by preventing activation of NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 23: 2251-2263
- Ji W, Hernandez R, Zhang XY, Qu GZ, Frady A, Varela M, Ehrlich M (1997) DNA demethylation and pericentromeric rearrangements of chromosome 1. *Mutat Res* 379: 33-41
- Jin G, Howe PH (1999) Transforming growth factor beta regulates clusterin gene expression via modulation of transcription factor c-Fos. *Eur J Biochem* 263: 534-542
- Johnston IM, Spence HJ, Winnie JN, McGarry L, Vass JK, Meagher L, Stapleton G, Ozanne BW (2000) Regulation of a multigenic invasion programme by the transcription factor, AP-1: re-expression of a down-regulated gene, TSC-36, inhibits invasion. *Oncogene* 19: 5348-5358
- Jones PL, Veenstra GJ, Wade PA, Vermaak D, Kass SU, Landsberger N, Strouboulis J, Wolffe AP (1998) Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat Genet* 19: 187-191
- Jourdan-Le Saux C, Tronecker H, Bogic L, Bryant-Greenwood GD, Boyd CD, Csiszar K (1999) The LOXL2 gene encodes a new lysyl oxidase-like protein and is expressed at high levels in reproductive tissues. *J Biol Chem* 274: 12939-12944
- Juttermann R, Li E, Jaenisch R (1994) Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 11797-11801
- Kaludov NK, Wolffe AP (2000) MeCP2 driven transcriptional repression in vitro: selectivity for methylated DNA, action at a distance and contacts with the basal transcription machinery. *Nucleic Acids Res* 28: 1921-1928
- Kamakura S, Moriguchi T, Nishida E (1999) Activation of the protein kinase ERK5/BMK1 by receptor tyrosin kinases. Identification and characterization of a signaling pathway to the nucleus. *J Biol Chem* 274: 26563-26571

- Kaneda A, Wakazono K, Tsukamoto T, Watanabe N, Yagi Y, Tatematsu M, Kaminishi M, Sugimura T, Ushijima T (2004) Lysyl oxidase is a tumor suppressor gene inactivated by methylation and loss of heterozygosity in human gastric cancers. *Cancer Res* 64: 6410-6415
- Kataoka T, Powers S, Cameron S, Fasano O, Goldfarb M, Broach J, Wigler M (1985) Functional homology of mammalian and yeast RAS genes. *Cell* 40: 19-26
- Kautiainen TL, Jones PA (1986) DNA methyltransferase levels in tumorigenic and nontumorigenic cells in culture. *J Biol Chem* 261: 1594-1598
- Kazerounian S, Yee KO, Lawler J (2008) Thrombospondins in cancer. *Cell Mol Life Sci* 65: 700-712
- Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93: 605-615
- Klock G, Storch S, Rickert J, Gutacker C, Koch-Brandt C (1998) Differential regulation of the clusterin gene by Ha-ras and c-myc oncogenes and during apoptosis. *J Cell Physiol* 177: 593-605
- Kolch W (2005) Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 827-837
- Kranenburg O, Gebbink MF, Voest EE (2004) Stimulation of angiogenesis by Ras proteins. *Biochim Biophys Acta* 1654: 23-37
- Kuvaja P, Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Turpeenniemi-Hujanen T (2006) Low serum level of pro-matrix metalloproteinase 2 correlates with aggressive behavior in breast carcinoma. *Hum Pathol* 37: 1316-1323
- Lei H, Oh SP, Okano M, Juttermann R, Goss KA, Jaenisch R, Li E (1996) De novo DNA cytosine methyltransferase activities in mouse embryonic stem cells. *Development* 122: 3195-3205
- Leon J, Guerrero I, Pellicer A (1987) Differential expression of the ras gene family in mice. *Mol Cell Biol* 7: 1535-1540
- Lewis JD, Meehan RR, Henzel WJ, Maurer-Fogy I, Jeppesen P, Klein F, Bird A (1992) Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell* 69: 905-914
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69: 915-926
- Li Q, Ahuja N, Burger PC, Issa JP (1999) Methylation and silencing of the Thrombospondin-1 promoter in human cancer. *Oncogene* 18: 3284-3289
- Liu HS, Scrabble H, Villaret DB, Lieberman MA, Stambrook PJ (1992) Control of Ha-ras-mediated mammalian cell transformation by Escherichia coli regulatory elements. *Cancer Res* 52: 983-989
- Lokeshwar BL, Selzer MG, Zhu BQ, Block NL, Golub LM (2002) Inhibition of cell proliferation, invasion, tumor growth and metastasis by an oral non-antimicrobial tetracycline analog (COL-3) in a metastatic prostate cancer model. *Int J Cancer* 98: 297-309
- Lund P, Weisshaupt K, Mikeska T, Jammias D, Chen X, Kuban RJ, Ungethum U, Krapfenbauer U, Herzel HP, Schafer R, Walter J, Sers C (2006) Oncogenic HRAS suppresses clusterin expression through promoter hypermethylation. *Oncogene* 25: 4890-4903
- MacLeod AR, Rouleau J, Szyf M (1995) Regulation of DNA methylation by the Ras signaling pathway. *J Biol Chem* 270: 11327-11337

- Malumbres M, Pellicer A (1998) RAS pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front Biosci* 3: d887-d912
- Mansour SJ, Matten WT, Hermann AS, Candia JM, Rong S, Fukasawa K, Vande Woude GF, Ahn NG (1994) Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. *Science* 265: 966-970
- Miyake H, Chi KN, Gleave ME (2000) Antisense TRPM-2 oligodeoxynucleotides chemosensitize human androgen-independent PC-3 prostate cancer cells both in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 6: 1655-1663
- Mohandas T, Sparkes RS, Shapiro LJ (1981) Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. *Science* 211: 393-396
- Mook OR, Frederiks WM, Van Noorden CJ (2004) The role of gelatinases in colorectal cancer progression and metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1705: 69-89
- Nan X, Campoy FJ, Bird A (1997) MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell* 88: 471-481
- Nan X, Ng HH, Johnson CA, Laherty CD, Turner BM, Eisenman RN, Bird A (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex. *Nature* 393: 386-389
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247-257
- Palamakumbura AH, Jeay S, Guo Y, Pischon N, Sommer P, Sonenshein GE, Trackman PC (2004) The propeptide domain of lysyl oxidase induces phenotypic reversion of ras-transformed cells. *J Biol Chem* 279: 40593-40600
- Parangi S, O'Reilly M, Christofori G, Holmgren L, Grosfeld J, Folkman J, Hanahan D (1996) Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 2002-2007
- Patra SK (2008) Ras regulation of DNA-methylation and cancer. *Exp Cell Res* 314: 1193-1201
- Patra SK, Patra A, Rizzi F, Ghosh TC, Bettuzzi S (2008) Demethylation of (Cytosine-5-C-methyl) DNA and regulation of transcription in the epigenetic pathways of cancer development. *Cancer Metastasis Rev* 27: 315-334
- Payne SL, Hendrix MJ, Kirschmann DA (2007) Paradoxical roles for lysyl oxidases in cancer--a prospect. *J Cell Biochem* 101: 1338-1354
- Pegg AE, Dolan ME, Moschel RC (1995) Structure, function, and inhibition of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 51: 167-223
- Pulukuri SM, Patibandla S, Patel J, Estes N, Rao JS (2007) Epigenetic inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) gene in human prostate tumors. *Oncogene* 26: 5229-5237
- Rainier S, Feinberg AP (1994) Genomic imprinting, DNA methylation, and cancer. *J Natl Cancer Inst* 86: 753-759
- Reiher FK, Volpert OV, Jimenez B, Crawford SE, Dinney CP, Henkin J, Haviv F, Bouck NP, Campbell SC (2002) Inhibition of tumor growth by systemic treatment with thrombospondin-1 peptide mimetics. *Int J Cancer* 98: 682-689
- Roberts PJ, Der CJ (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26: 3291-3310

- Robertson KD, Ait-Si-Ali S, Yokochi T, Wade PA, Jones PL, Wolffe AP (2000) DNMT1 forms a complex with Rb, E2F1 and HDAC1 and represses transcription from E2F-responsive promoters. *Nat Genet* 25: 338-342
- Robertson KD, Wolffe AP (2000) DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 1: 11-19
- Rodenhuis S (1992) ras and human tumors. *Semin Cancer Biol* 3: 241-247
- Rosembit N, Chen CL (1994) Regulators for the rat clusterin gene: DNA methylation and cis-acting regulatory elements. *J Mol Endocrinol* 13: 69-76
- Rouleau J, MacLeod AR, Szyf M (1995) Regulation of the DNA methyltransferase by the Ras-AP-1 signaling pathway. *J Biol Chem* 270: 1595-1601
- Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB (2000) DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 25: 269-277
- Sager R (1997) Expression genetics in cancer: shifting the focus from DNA to RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 952-955
- Salnikow K, Cosentino S, Klein C, Costa M (1994) Loss of thrombospondin transcriptional activity in nickel-transformed cells. *Mol Cell Biol* 14: 851-858
- Schäfer R, Tchernitsa OI, Zuber J, Sers C (2003) Dissection of signal-regulated transcriptional modules by signaling pathway interference in oncogene-transformed cells. *Adv Enzyme Regul* 43: 379-391
- Schaffner W, Weissmann C (1973) A rapid, sensitive, and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal Biochem* 56: 502-514
- Shannan B, Seifert M, Leskov K, Willis J, Boothman D, Tilgen W, Reichrath J (2006) Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer. *Cell Death Differ* 13: 12-19
- Smith-Mungo L, Kagan HM (2002) PKC-MEK-MAPK-dependent signal transduction pathway mediates the stimulation of lysyl oxidase expression by serum and PDGF in rat aortic smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 85: 775-784
- Stetler-Stevenson WG (2008) Tissue inhibitors of metalloproteinases in cell signaling: metalloproteinase-independent biological activities. *Sci Signal* 1: re6
- Stokoe D, Macdonald SG, Cadwallader K, Symons M, Hancock JF (1994) Activation of Raf as a result of recruitment to the plasma membrane. *Science* 264: 1463-1467
- Sumitomo K, Kurisaki A, Yamakawa N, Tsuchida K, Shimizu E, Sone S, Sugino H (2000) Expression of a TGF-beta1 inducible gene, TSC-36, causes growth inhibition in human lung cancer cell lines. *Cancer Lett* 155: 37-46
- Trougakos IP, Djeu JY, Gonos ES, Boothman DA (2009) Advances and challenges in basic and translational research on clusterin. *Cancer Res* 69: 403-406
- Trougakos IP, Gonos ES (2002) Clusterin/apolipoprotein J in human aging and cancer. *Int J Biochem Cell Biol* 34: 1430-1448
- Turpeenniemi-Hujanen T (2005) Gelatinases (MMP-2 and -9) and their natural inhibitors as prognostic indicators in solid cancers. *Biochimie* 87: 287-297

- Valenti MT, Bertoldo F, Dalle CL, Azzarello G, Zenari S, Zanatta M, Balducci E, Vinante O, Lo C, V (2006) The effect of bisphosphonates on gene expression: GAPDH as a housekeeping or a new target gene? *BMC Cancer* 6: 49
- Vlahos CJ, Matter WF, Hui KY, Brown RF (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J Biol Chem* 269: 5241-5248
- Volpert OV, Pili R, Sikder HA, Nelius T, Zaichuk T, Morris C, Shiflett CB, Devlin MK, Conant K, Alani RM (2002) Id1 regulates angiogenesis through transcriptional repression of thrombospondin-1. *Cancer Cell* 2: 473-483
- Wakefield RI, Smith BO, Nan X, Free A, Soteriou A, Uhrin D, Bird AP, Barlow PN (1999) The solution structure of the domain from MeCP2 that binds to methylated DNA. *J Mol Biol* 291: 1055-1065
- Wan LB, Bartolomei MS (2008) Regulation of imprinting in clusters: noncoding RNAs versus insulators. *Adv Genet* 61: 207-223
- Watnick RS, Cheng YN, Rangarajan A, Ince TA, Weinberg RA (2003) Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. *Cancer Cell* 3: 219-231
- Yang SH, Sharrocks AD, Whitmarsh AJ (2003) Transcriptional regulation by the MAP kinase signaling cascades. *Gene* 320: 3-21
- Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* 265: 17174-17179
- Zuber J, Tchernitsa OI, Hinzmann B, Schmitz AC, Grips M, Hellriegel M, Sers C, Rosenthal A, Schafer R (2000) A genome-wide survey of RAS transformation targets. *Nat Genet* 24: 144-152

## **Danke**

...Frau Prof. Cerni,  
für die Begeisterung an unseren „kleinen Patienten“, den Zellen in Kultur.

...Per,  
für die gemeinsame Arbeit und die geteilte Begeisterung bei unserer Labortätigkeit.

...Christine,  
für die Motivation, den Glauben an „das Große“ unserer Arbeit und die sachliche Nüchternheit in der Bewertung der Ergebnisse.

...Conny, Jana und Berit,  
für den guten Arbeitsplatz in eurem Labor, die methodische Anleitung, Hilfe und Zuarbeit.

...Anne,  
für dein geduldiges Ertragen der Vernachlässigung, der Stimmungsschwankungen und das Teilen der großen Freude.

...Ulf,  
dass ich dich mit meiner Begeisterung für die Wissenschaft anstecken konnte und wir unsere Forschergeister zusammentaten.

...Mike,  
für die Erleichterung meines Kampfes mit dem Photoshop.

## **Lebenslauf**

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

## Publikation

Oncogenic Hras suppresses clusterin expression through promoter hypermethylation

Lund P, Weisshaupt K, Mikeska T, Jammal D, Chen X, Kuban RJ, Ungethüm U, Krapfenbauer U, Herzog HP, Schäfer R, Walter J, Sers C

*Oncogene 25: 4890-4903 (2006)*

Berlin, 09.09.2009

## **Erklärung**

Ich, Karen Weißhaupt, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „Regulation von Ras-Zielgenen durch DNA-Methylierung und Histon-modifizierende Mechanismen“ 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.

Berlin, 09.09.2009