

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

DISSERTATION

Regulation des EGFR-Liganden Amphiregulin über DNA-
Methylierung und MAPK-Kaskade

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Sabine Fonfara

aus Berlin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Chr. Sers
 2. Prof. Dr. med. W. Weichert
 3. Prof. Dr. J. Walter

Datum der Promotion: 07.09.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung.....	7
1.1 Molekularpathologie des Kolonkarzinoms.....	7
1.2 Pharmakologische Therapiestrategien in der Behandlung des Kolonkarzinoms.....	8
1.3 Das ErbB-Netzwerk.....	9
1.3.1 Liganden, Rezeptoren und Funktion des ErbB-Netzwerks.....	9
1.3.2 Klinische Relevanz des ErbB-Netzwerks.....	11
1.4 Amphiregulin (AREG).....	12
1.4.1 Molekularbiologische Eigenschaften von AREG.....	12
1.4.2 Funktion und Tumorrelevanz von AREG.....	13
1.4.3 Regulation von AREG.....	15
1.5 Epigenetische Genregulation und Tumorgenese.....	15
1.5.1 Grundlagen der Epigenetik.....	15
1.5.2 DNA-Methylierung und Tumorgenese.....	16
1.5.3 Klinische Relevanz der Epigenetik.....	17
1.6 Fragestellung	17
2 Material und Methoden.....	19
2.1 Material.....	19
2.1.2 Puffer und Lösungen	20
2.1.3 Chemikalien.....	21
2.1.4 Inhibitoren	22
2.1.5 Antikörper.....	22
2.1.6 Kits	22
2.1.7 Medien.....	23
2.1.8 Verbrauchsmaterial.....	23
2.1.9 Geräte	24
2.2 Zellbiologische Methoden.....	25
2.2.1 Zellkultur - Routinekultivierung.....	25
2.2.2 Inhibitoren- und Zytostatikabehandlung.....	26
2.2.3 Proliferationstest MTT-Assay	27
2.3 Molekularbiologische Methoden.....	27
2.3.1 Proteinbestimmung.....	27
2.3.2 Western Blot.....	28
2.3.2.1 Proteingewinnung.....	28
2.3.2.2 SDS-Page.....	29
2.3.2.3 Blotverfahren	30
2.3.2.4 Proteindetektion	31
2.3.3 ELISA (Enzym-linked Immuno Absorbend Assay).....	31
2.3.3.1 Gewinnung und Aufbereitung von Zellkulturüberständen zum Nachweis von AREG Protein durch ELISA.....	32
2.3.3.2 Gewinnung und Aufbereitung von Zellysaten zum Nachweis von AREG Protein durch ELISA.....	32
2.3.3.3 Prinzip und Durchführung von ELISA.....	32
2.3.4 Immunhistochemie	34
3 Ergebnisse.....	35
3.1 Etablierung und Optimierung.....	35
3.1.1 Etablierung eines Proteinnachweis für den EGFR-Liganden AREG	35
3.1.1.1 Western Blot für AREG.....	35
3.1.1.2 ELISA für AREG.....	37

Inhaltsverzeichnis

3.1.2 Optimierung der Applikation des DNMT1-Inhibitors Zebularine.....	42
3.1.3 Etablierung des AREG Antikörpers für immunhistochemische Analysen	50
3.2 AREG in humanen Kolonkarzinomzelllinien.....	51
3.3 Analyse der AREG Regulation durch DNA-Methylierung und die MAPK-Signalkaskade.....	53
3.3.1 Einfluss der DNA-Methylierung auf die Regulation von AREG in HCT 116	53
3.3.2 Wirkung des DNMT1-Inhibitors Zebularine auf AREG in kolorektalen Tumorzelllinien.....	56
3.3.3 Wirkung des DNMT Inhibitors 5-Aza-2'-Desoxyzytidin auf AREG in kolorektalen Tumorzelllinien	59
3.3.4 Einfluss der MAPK-Signalkaskade auf die Regulation von AREG in kolorektalen Tumorzelllinien	60
3.4 Analyse der AREG Expression in humanen Kolonkarzinomgeweben.....	64
3.5 Wirkung von Gefitinib (ZD1839, Iressa®) auf das Proliferationsverhalten von HCT 116 parental und HCT DNMT ^{d-/-}	67
4 Diskussion	72
4.1 Methodische Anmerkungen	72
4.1.1 Proteinnachweis für AREG	72
4.1.2 Einflüsse des Lösungsmittels DMSO	72
4.1.3 EGFR TKI Gefitinib	74
4.2 AREG als potentiell Proto-Onkogen im Kolon	75
4.2.1 AREG im Kolonkarzinom	75
4.2.2 Regulation von AREG durch DNA-Methylierung	76
4.2.3 Regulation von AREG durch MAPK	83
4.3 Potentieller Nutzen von AREG für die Klinik.....	83
4.3.1 AREG im Kontext der prädiktiven Biomarker für das Ansprechen auf eine EGFR Therapie	83
4.3.2 AREG als mögliche Zielstruktur für antiproliferative Therapien	87
5 Zusammenfassung.....	91
6 Literaturverzeichnis.....	92
Abbildungsverzeichnis.....	101
Tabellenverzeichnis.....	104
Lebenslauf.....	105
Publikationsliste	106
Danksagung	107
Selbständigkeitserklärung.....	108

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
A.dest	Aqua destillatum
APC	adebomatous polyposis coli
AREG	Amphiregulin
AG	Arbeitsgruppe
ATCC	American Types Culture Collection
bp	Basenpaare
BTC	Betacellulin
CH	Schweiz
CIMP	CpG Island methylator phenotype
CLS	Cell Lines Services
D	Deutschland
Da	Dalton
DCC	deleted in colorectal cancer
DNA	Desoxyribonuklein Acid
DNMT	DNA-Methyltransferase
EFGN	Epigen
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
EPR	Epiregulin
EU	Europäische Union
FCS	Fetales Kälberserum
FOLFIRI	Chemotherapieprotokoll for kolorektale Karzinome: Folinsäure, Flourouracil, Irinotecan
FOLFOX	Chemotherapieprotokoll for kolorektale Karzinome: Folinsäure, Flourouracil, Oxaliplatin
GB	Großbritannien
ggf	gegebenenfalls
h	Stunden
HB-EGF	Heparin Binding – Epidermal Growth Factor
HDAC	Histondeacetylase
HDI	Histondeacetylase Inhibitor
HER	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
HRP	horseradish peroxidase
IFOX	Chemotherapieprotokoll in Studien for kolorektale Karzinome: Folinsäure, Flourouracil, Irinotecan, Gefitinib
k	kilo
MBD	Methylbindungsprotein

Abkürzungsverzeichnis

min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MSI	microsatellite instability
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
NRGN	Neuregulin
PBS	phosphate buffered saline
PD	Privatdozent
rpm	Rotationen pro Minute
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid
sec	Sekunden
SG	Sammelgel
TBST	tris-buffered saline tween 20
TG	Trenngel
TGF- α	transforming growth factor- α
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TKI	Tyrosinkinase Inhibitor
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor

1 Einleitung

1.1 Molekularpathologie des Kolonkarzinoms

Die Entwicklung von einer Kolonepithelzelle zu einer Kolonadenokarzinomzelle kann 10 bis 15 Jahre beanspruchen. Während dieses Zeitraums kommt es zu multiplen Genalterationen (Neibergs, Hein et al. 2002; Grady 2005), welche durch entsprechende histologische Formen von einer normalen Epithelzelle über ein tubuläres zu einem tubulär-villösem bzw. villösem Adenom bis zum Karzinom begleitet werden; dies wird als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet. Die molekularen Modifikationen in der mehrstufigen Tumorgenese des Kolonkarzinoms werden durch genetische und epigenetische Mechanismen bewirkt. Prominente Gene, in denen Veränderungen im Kolonkarzinom identifiziert wurden, sind die Gene für APC (adenomatous polyposis coli), DCC (deleted in colorectal cancer), β -Catenin, Ras, p53, RASSF1A, E-Cadherin, p16INK4A, TIMP3, MSH1 und MLH2 (Grady 2005; Miranda, Destro et al. 2006).

Eine zentrale Rolle bei der Entstehung des Kolonkarzinoms nimmt die Wingless/Wnt-Signalkaskade ein, in der das APC-Gen eine zentrale Rolle spielt. Am Ende dieser Signaltransduktion steht die Komplexbildung von β -Catenin mit dem Transkriptionsfaktor TCF/LEF, die zur Transkription von Protoonkogenen, wie zum Beispiel Myc, führt. Genetische Veränderungen in der Wingless/Wnt-Signalkaskade werden in 85% der sporadischen Kolonkarzinome beobachtet (Neibergs, Hein et al. 2002). Eine weitere bedeutende Funktion in der Tumorgenese des Kolonkarzinoms nehmen KRAS-Mutationen ein, welche mit einer Häufigkeit von bis zu 40% in dieser Tumorentität vorzufinden sind (Markowitz and Bertagnolli 2009; Siena, Sartore-Bianchi et al. 2009). Auch p53-Mutationen sind in bis zu 30% der kolorektalen Karzinome zu finden (Neibergs, Hein et al. 2002; Miranda, Destro et al. 2006). Sind DNA-Reparaturgene wie MSH1 oder MLH2 defekt, so treten vermehrt Mikrosatelliten Instabilitäten (MSI) auf. In 10-15% der sporadischen Kolonkarzinome lassen sich solche MSI detektieren und als diagnostischer Marker verwenden.

Epigenetische Alterationen von Genen treten früh in der Tumorgenese des Kolonkarzinoms auf. Gene, für die neben genetischen Veränderungen auch epigenetische Einflüsse diskutiert werden, sind zum Beispiel MLH1 und TIMP3. Im Zusammenhang mit veränderter DNA-Methylierung und der Pathogenese von kolorektalen Tumoren wird das Konzept des CpG Island methylator phenotype (CIMP), erstmals in Toyota (Toyota, Ahuja et al. 1999) beschrieben, diskutiert. Das Konzept geht davon aus, dass bei einer Subpopulation von

Kolontumoren vermehrt hypermethylierte DNA-Abschnitte gefunden wurden. Neuere Studien stellen eine Assoziation zwischen CIMP positiven Kolontumoren und klinisch-pathologischen als auch molekularen Charakteristiken her (Issa, Shen et al. 2005; Samowitz, Albertsen et al. 2005).

1.2 Pharmakologische Therapiestrategien in der Behandlung des Kolonkarzinoms

Bei der chemotherapeutischen Behandlung des Kolonkarzinoms kommen laut FOLFOX bzw. FOLFIRI-Schema Folinsäure (Leucovorin), Fluorouracil und Oxaliplatin bzw. Irinotecan zur Anwendung. Die konventionelle Chemotherapie wirkt ubiquitär auf alle Zellen eines Organismus und ist dadurch oft durch Nebenwirkungen wie Alopezie, Polyneuropathie, Panzytopenie und Diarrhoe gekennzeichnet. Das neuere Feld der gezielten pharmakologischen Tumorthherapie („targeted therapy“) hemmt gezielt einzelne molekulare Strukturen von Tumorzellen oder die Tumorangiogenese durch so genannte „biologicals“, Antikörper oder Inhibitoren (small molecules). Die Vorteile einer Kombination von konventionellen Chemotherapeutika mit biologicals könnten darin bestehen, dass Einzeldosen der Medikamente reduziert und folglich Nebenwirkungen vermindert werden. Ebenfalls kann eine Verlängerung der Progressionsfreiheit in palliativen Situationen erreicht werden (Cunningham, Humblet et al. 2004).

Zwei interessante Ziele der gezielten pharmakologischen Therapie des Kolonkarzinoms sind der Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und der Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR). Der VEGF besitzt bei der Neoangiogenese eine wichtige Rolle. In Deutschland ist der VEGF-Antikörper Bevacizumab seit 2005 als First-Line-Therapie beim metastasierten Kolonkarzinom anerkannt (Hurwitz, Fehrenbacher et al. 2005).

Der EGFR besitzt eine wichtige Funktion für das Wachstum von epithelialen Zellen. Die Expression des EGFR im Kolonkarzinom variiert je nach Literaturangabe zwischen 50-80% (Porebska, Harlozinska et al. 2000; McKay, Murray et al. 2002). Gegen den EGFR-gerichtete Therapien stellen neue, Erfolg-versprechende Behandlungskonzepte dar. Der EGFR-Antikörper Cetuximab ist seit 2004 in Kombination mit Irinotecan bei EGFR-Expression und Irinotecan-Resistenz (Cunningham, Humblet et al. 2004) in Deutschland zur Behandlung zugelassen. Ein zweiter Weg den EGFR zu hemmen ist durch die Substanzen der Tyrosinkinaseinhibitoren gegeben, wobei Gefitinib in vorklinischen wie auch klinischen Studien Erfolge verzeichnet. In Zellkulturmodellen hemmt Gefitinib die Proliferation von Tumorzellen und sensibilisiert sie auch gegenüber Chemotherapien (Ciardiello, Caputo et al.

2000; Sirotnak, Zakowski et al. 2000). In klinischen Studien zeigte sich aber, dass der EGFR-TKI als Monotherapie beim Kolonkarzinom keine Wirkung besitzt (Mackenzie, Hirte et al. 2005; Rothenberg, LaFleur et al. 2005). Eine Phase II Studie, in der vorbehandelte Patienten mit metastasiertem Kolontumor eine Kombination aus FOLFOX-4 und Gefitinib (IFOX) erhielten, sprachen jedoch 33% der Erkrankten auf die Therapie an (partial response) (Kuo, Cho et al. 2005; Mackenzie, Hirte et al. 2005; Rothenberg, LaFleur et al. 2005); bei etwa 50% der Behandelten waren Nebenwirkungen wie Neutropenie und Diarrhoe zu verzeichnen. Diese Studie demonstriert, dass der EGFR-TKI Gefitinib möglicherweise einige Kolontumoren für Chemotherapieregime, wie FOLFOX-4, empfänglich macht und verdeutlicht die Chancen, die in den EGFR-Therapien stecken.

1.3 Das ErbB-Netzwerk

1.3.1 Liganden, Rezeptoren und Funktion des ErbB-Netzwerks

Bedeutend für das Wachstum von Epithelzellen ist das Netzwerk der Familie der ErbB-Wachstumsfaktor-Rezeptoren und seinen Liganden. Es werden vier Rezeptoren und verschiedene Liganden beschrieben (Abbildung 1). Zu den ErbB-Rezeptoren gehören der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor EGFR (HER1, ErbB1), ErbB2 (HER2/neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4). Diese Rezeptoren besitzen einen extrazellulären, einen transmembranären und einen intrazellulären Anteil, wobei beim EGFR, HER2 und HER4 im intrazellulären Bereich eine Tyrosinkinaseaktivität lokalisiert ist.

Als Liganden wurden folgende Wachstumsfaktoren identifiziert: Epidermal Growth Factor (EGF), Transforming Growth Factor α (TGF- α), Amphiregulin (AREG), Heparin Binding EGF (HB-EGF), Betacellulin (BTC), Cripto-1, Epiregulin (EPR), Epigen (EFGN) und Neuregulin 1-4 (NRGN).

Den EGFR binden bevorzugt EGF, TGF- α , AREG, BTC und HB-EGF. Nach der Bindung des Liganden an den Rezeptor kommt es zur Dimerisierung mit einem zweiten Molekül EGFR (Homodimerisierung) oder mit einem Molekül von HER-2, HER-3 oder HER-4 (Heterodimerisierung). Die Gruppe der Neureguline bindet bevorzugt an HER-3 und/oder HER-4 und induziert die Bildung von HER-3 oder HER-4 Homodimeren oder aber die Bildung von ErbB2/ErbB3 oder ErbB2/ErbB4-Heterodimeren (Harris, Chung et al. 2003). Für ErbB2 ist noch kein Ligand gefunden, so dass man annimmt, dass dieser Rezeptor hauptsächlich als Korezeptor bzw. Heterodimerisierungspartner für ErbB1, ErbB3 und ErbB4 fungiert (Mendelsohn 2004). Die Dimerisierung des Rezeptors führt zur Aktivierung der

Tyrosinkinaseaktivität und zur Autophosphorylierung. Als Folge können über die Phosphotyrosinreste der Rezeptoren weitere intrazelluläre Proteine mit SH2-Domänen binden, was schließlich zur Aktivierung einer Vielzahl von intrazellulären Signalkaskaden führt (Abbildung 1).

Ein Hauptsignaltransduktionsweg ist der mitogene Ras/Raf/MEK/Erk-Signalweg, der durch die Inhibition von BAX und die Expression von Transkriptionsfaktoren die Apoptose verhindert und DNA-Synthese, Zellproliferation und Differenzierung bewirkt. Ein anderer wichtiger Weg ist die PI3-K/AKT-Kaskade, die über die Inhibition von BAD ebenso die Apoptose inhibiert und damit Zellüberleben ermöglicht (Mendelsohn and Baselga 2000; Boulougouris and Elder 2001).

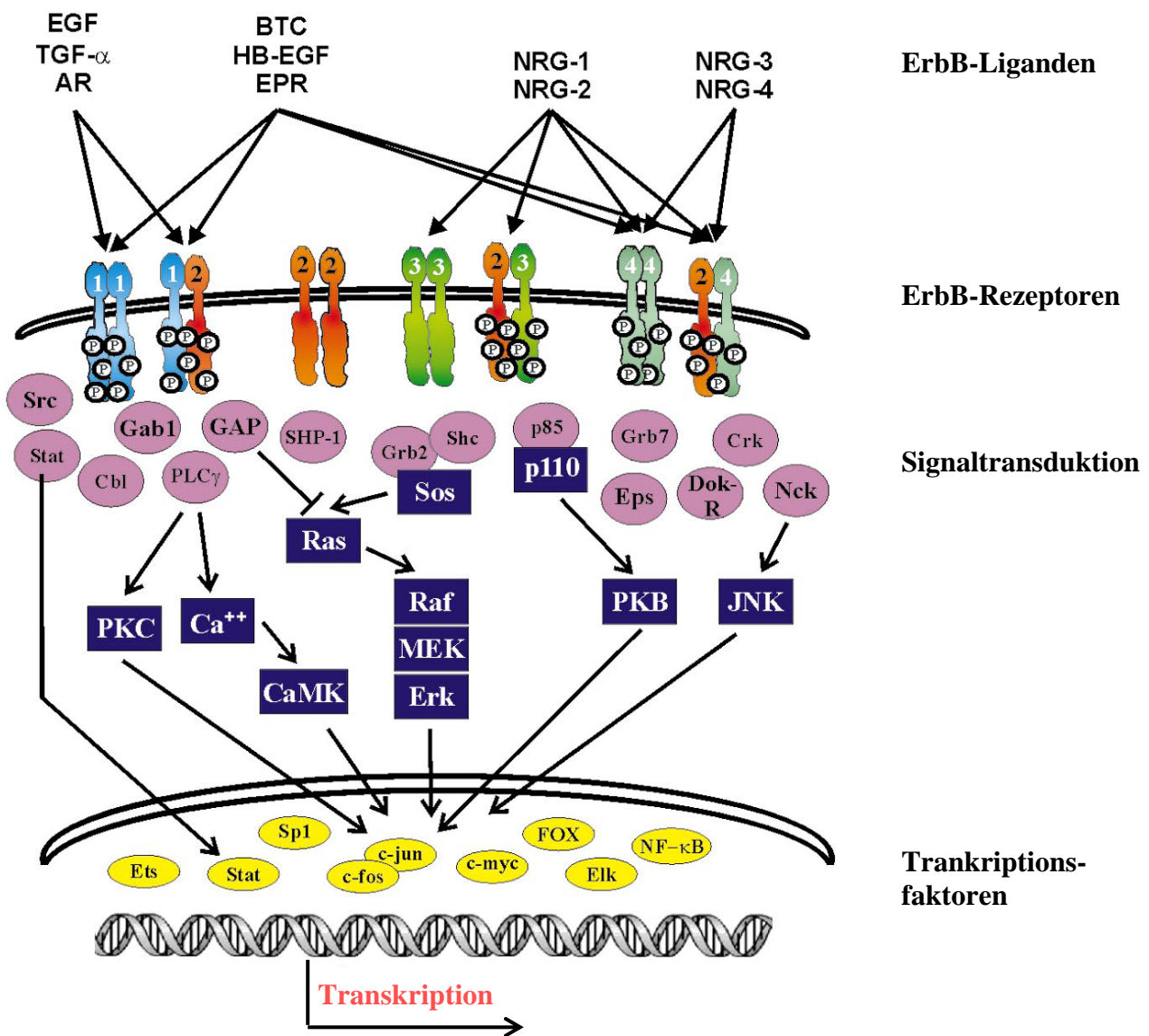


Abbildung 1: Übersicht über das ErbB-Netzwerk. Die Liganden binden an die Rezeptoren und bewirken eine Dimerisierung der Rezeptoren. Für ErbB2 wurde noch kein Ligand detektiert; dieser Rezeptor ist bevorzugt Dimerisierungspartner für ErbB1, ErbB3 und ErbB4. ErbB3 Homodimere besitzen keine Tyrosinkinaseaktivität. (in Anlehnung an Holbro and Hynes 2004)

Zahlreiche humane Tumoren haben hohe Expressionsniveaus der ErbB Wachstumsfaktoren und ihrer Rezeptoren (Salomon, Brandt et al. 1995). Eine autokrine Wirkung von überexprimierten Liganden, Rezeptorüberexprimierung und Rezeptormutation führen zu einer dauerhaften Aktivierung der Rezeptoren und der nachgeschalteten Signalkaskaden. Besonders hervorzuheben sind hier EGFR und HER2, welchen vor allem in der Kanzerogenese von Tumoren von Kopf, Hals, Lunge, Kolon, Mamma und Ovar eine Rolle zugeschrieben wird (Holbro and Hynes 2004). Durch die gesteigerte Aktivität von EGFR und/oder HER-2 kann über eine gesteigerte Aktivität der Signalkaskaden RAS/MEK/ERK und PI-3K/Akt eine vermehrte Zellproliferation zustande kommen. Weiterhin spielt der EGFR in Tumoren auch eine wichtige Rolle für Metastasierung, Angiogenese und Tumorresistenz gegenüber Chemo- und Strahlentherapie (Holbro, Civenni et al. 2003; Schmidt-Ullrich, Contessa et al. 2003).

1.3.2 Klinische Relevanz des ErbB-Netzwerks

Ein fehl-reguliertes ErbB-Netzwerk hat nicht nur funktionelle Bedeutung für das Tumorstadium, sondern bietet neben Strukturen für neue diagnostische und prognostische Marker auch Angriffspunkte für zielgerichtete Therapien von malignen Erkrankungen. Gegenstand vieler Forschungsprojekte und klinischer Studien sind Therapien die gegen den EGFR und HER2 gerichtet sind. Der Transmembran-Rezeptor HER2 ist beim Mamma-Karzinom in 30% der Erkrankungen verstärkt exprimiert, induziert ein aggressives Tumorstadium und ist für eine schlechte Prognose verantwortlich. Gleichzeitig dient HER2 auch als molekulares Ziel des Antikörpers Trastuzumab (Piccart-Gebhart 2006). Seit 2000 ist der Antikörper in der Europäischen Union (EU) zur Therapie bei HER2-positiven Mammatumoren im metastasierten, seit 2006 auch im nicht-metastasierten Erkrankungsstadium zugelassen.

Auch der EGFR ist Ziel von Therapien durch zahlreiche Inhibitoren und Antikörpern. In der klinischen Erprobung am weitesten fortgeschritten sind hierbei die Tyrosinkinase-Inhibitoren Erlotinib und Gefitinib zur Behandlung von NSCLC und Pankreastumoren. Der am besten untersuchte EGFR-Antikörper ist Cetuximab, welcher Relevanz für die Therapie vom Kolonkarzinom und von Plattenepitheltumoren von Hals und Kopf hat. Cetuximab ist seit 2004 in der EU zugelassen zur Mono- oder Kombinationstherapie mit Irinotecan in der Behandlung von Irinotecan-refraktären metastasierten Kolontumoren und als Einzel- oder Kombinationstherapie mit Radiotherapie bei metastasierten oder nicht-resezierbaren Plattenepitheltumoren von Kopf und Hals seit 2006. Für die Therapie von Patienten mit EGFR-exprimierenden, metastasiertem kolorektalen KRAS-Wildtyp-Karzinom ist Cetuximab seit 2008 in Kombination mit Chemotherapie als Erstlinientherapie erlaubt.

Problematisch bei klinischen Studien von anti-EGFR-Therapien ist die Rekrutierung von anti-EGFR-sensitiven Patienten. Aktuelle Studien zur Erforschung von Tyrosinkinaseinhibitoren fokussieren darauf entsprechende Patientenpopulationen zu bestimmen und prognostische Parameter für erfolgreiche Therapien zu entwickeln. So zeigte sich für den EGFR-Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib in der Behandlung von NSCLC, dass Patienten mit einem mutierten EGFR-Status auf die Behandlung besser ansprachen (Lynch, Bell et al. 2004; Paez, Janne et al. 2004). Komplizierend kommen bei der Erprobung von anti-EGFR-Therapien toxische Nebenwirkungen der Substanzen hinzu. In einer Studie zur Therapie des Kolonkarzinoms mit Gefitinib traten beispielsweise Nebenwirkungen, wie Diarrhoe und Neutropenie, auf (Kuo, Cho et al. 2005).

1.4 Amphiregulin (AREG)

AREG ist ein Ligand des EGFR und wurde erstmals 1988 im Medium von PMA (Phorbol 12-Myristate-13-Acetate)-behandelten MCF-7 (humane Mamma-Adenokarzinom-Zelllinie) entdeckt (Shoyab, McDonald et al. 1988). Der Bestandteil „amphi“ des Namens gründet auf die Tatsache, dass das Protein wachstumsstimulierende Effekte auf u.a. verschiedene Fibroblastenzelllinien, jedoch wachstumshemmende Wirkungen auf einige Neuroblastom- und Adenokarzinomzelllinien hatte (Shoyab, McDonald et al. 1988). Die inhibierenden Effekte von AREG sind noch nicht abschließend validiert; deutlich ist jedoch der stimulierende Einfluss auf Differenzierung, Apoptose, Wachstum und Tumorgenese.

1.4.1 Molekularbiologische Eigenschaften von AREG

Das AREG-Gen ist auf Chromosom 4 (4q13-4q21) lokalisiert und enthält sechs Exons. Die DNA umfasst 10,2 kb und die mRNA 1,2 kb.

AREG ist als transmembranäres Propeptid von 252 Aminosäuren in der Zellmembran lokalisiert. Das extrazellulär auf der Zelloberfläche sitzende Enzym ADAM 17 (a disintegrin and metalloproteinase) katalysiert die Proteolyse von Pro-AREG zu AREG Protein (Abbildung 2: Modellhafte Darstellung der Proteolyse von Pro-AREG zu AREG Protein durch das Enzym ADAM 17 (in Anlehnung an Sternlicht, Sunnarborg et al. 2005)). Letzteres besteht aus 84 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 23 kDA (Sternlicht, Sunnarborg et al. 2005).

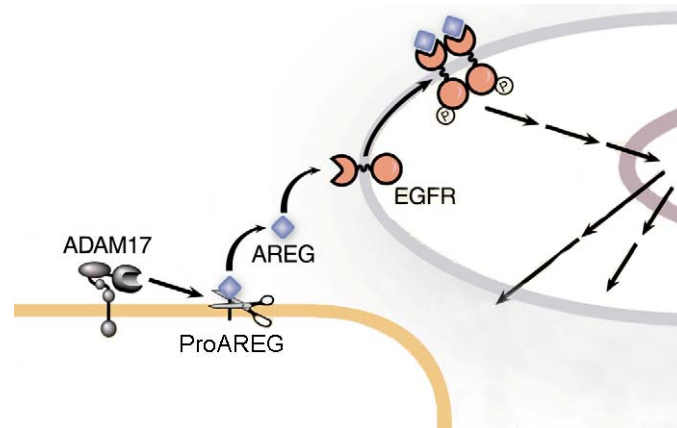


Abbildung 2: Modellhafte Darstellung der Proteolyse von Pro-AREG zu AREG Protein durch das Enzym ADAM 17 (in Anlehnung an Sternlicht, Sunnarborg et al. 2005).

Biologisch aktiv ist AREG in der transmembranären als auch in der löslichen Form und bindet auto-, para- oder juxtakrin an den EGFR und aktiviert ihn. Durch posttranslationale Modifikation (Glykosylierung) existieren verschiedene lösliche Isoformen in der Größe von 9-60 kDA von AREG, wobei jedoch nicht abschließend bekannt ist, ob alle Formen biologische Aktivität besitzen.

Das AREG Protein enthält eine EGF-ähnliche Domäne um an den EGFR zu binden und einen hydrophilen NH₂-terminalen 40 Aminosäuren-Rest, der glykosyliert werden kann und der 2 mögliche Kernlokalierungssignale enthält (Shoyab, Plowman et al. 1989; Johnson, Prigent et al. 1993). Weiterhin weist AREG eine Heparin-Bindungsdomäne auf.

Außer der transmembranären Lokalisierung des AREG-Propeptids wurde AREG auch im Zytoplasma und im Kern nachgewiesen (Johnson, Saeki et al. 1991; Johnson, Saeki et al. 1992). In Ovarial-Karzinomzellen wurde eine AREG-Konzentrierung im Nukleolus und in ovariellen Epithelzellen (OSE) ein diffuses AREG-Vorkommen im Kern beschrieben.

1.4.2 Funktion und Tumorrelevanz von AREG

AREG spielt eine Rolle bei vielen physiologischen Prozessen, so zum Beispiel der Regeneration von Nerven (Nilsson and Kanje 2005), der Implantation von Blastozysten (Lee, Yanagimoto Ueta et al. 2006) und der Ausbildung von Knochengewebe (Qin, Tamasi et al. 2005). Außerdem wird dem Protein eine wichtige Funktion bei der Bildung der Milchgänge in der Mamma (Sternlicht, Sunnarborg et al. 2005) sowie der Entwicklung von Lunge, Niere und Prostata zugeschrieben.

Bei allen bisher genannten Prozessen geht es um biologische Vorgänge, bei denen Gewebeinvasion bzw. -verzweigung eine zentrale Rolle spielen. Für AREG ist nachgewiesen, dass es eine kritische Rolle in der Zellinvasion und Motilität inne hat. MCF10A-Zellen

(humane epitheliale Mamma-Zelllinie), die AREG gesteigert exprimieren oder denen AREG exogen zugesetzt wird, zeigen erhöhte Motilität und Invasion im Vergleich zu MCF10A Zellen, denen EGF exogen zugesetzt wird. Dies kann damit begründet werden, dass AREG in MCF10A Gene, welche in Prozesse wie Proteolyse, Adhäsion und Chemotaxis involviert sind, hochreguliert (Willmarth and Ethier 2006). Sind Prozesse wie Invasion und Motilität fehl-reguliert, so können sie eine Schlüsselrolle bei der Tumorgenese einnehmen.

Nicht überraschend hat AREG offenbar auch einen Anteil an pathologischen Prozessen, insbesondere bei solchen mit einer Hyperplasie von Epithelien. Bei der Entstehung von Psoriasis wird AREG für die Herunterregulation von adhärenen Zellkontakten verantwortlich gemacht (Chung, Cook et al. 2005). Ein funktioneller Beitrag von AREG zur Tumorgenese und eine pathologische Expression des Proteins in verschiedenen Tumorgeweben werden mehrfach beschrieben. So ist die AREG mRNA Expression im Kolonkarzinom erhöht, eine Entfernung von AREG aus dem Medium zur Kultivierung von GEO Zellen resultiert in einer 40%igen Wachstumsinhibition (Ciardiello, Kim et al. 1991; Johnson, Saeki et al. 1992). In nicht-kleinzelligen Lungentumoren hemmt AREG über die Ras/Mek/Erk-Kaskade und die PI3-K-Kaskade die Apoptose (Hurbín, 2005). Bei der Progression des Mammakarzinoms spielt AREG möglicherweise eine Schlüsselrolle; in entartetem Gewebe wurde im Vergleich zu umgebenden normalen Stroma vermehrt AREG detektiert (Qi, Liscia et al. 1994). Castillo et al. zeigten, dass AREG in gesunden Lebergewebe nicht, dahingegen aber in zirrhotischen und malignen Gewebeproben exprimiert wird (Castillo, Erroba et al. 2006). Billings et al. untersuchten die Entstehung verschiedener dermaler Tumoren in einem Xenograft-Maus-Model und entdeckten, dass eine vermehrte AREG Expression zu der Bildung von schnell wachsenden Kerathoakanthomen führt (Billings, Southall et al. 2003).

Generell wird angenommen, dass AREG über die Bildung von autokrinen Schleifen eine gesteigerte Aktivierung von proliferationsfördernden Signalen bewirkt. Eine Komponente dieser Schleifen ist die Stimulation des EGFR durch AREG, was über eine MAPK zur Bildung von AREG führt. In EGFR und HER-2 exprimierenden Prostata-Stroma-Zellen zeigten Sorensen et al. beispielsweise, dass die EGFR-Liganden HB-EGF und EGF die Expression von AREG mRNA um ein 15-faches erhöhte (Sorensen, Topping et al. 2000).

Die AREG-EGFR-AREG Schleifen können zur Verstärkung der Signaltransduktion führen und bei Dysregulation von Liganden oder Rezeptoren des ErbB-Netzwerkes zur Tumorgenese beitragen.

1.4.3 Regulation von AREG

Die Regulation von AREG ist auf mehreren Ebenen möglich. Der Promotorbereich von AREG weist multiple Bindungsstellen auf, die für die Regulation des Gens bedeutsam sein könnten. Drei TCF/LEF-Bindungsstelle weisen darauf hin, dass AREG ein potentielles Ziel der Wnt/Wingless-Signalkaskade ist (Katoh and Katoh 2006). Weiterhin sind Bindungsstellen wie zum Beispiel cAMP-responsive element (CRE), serum responsive element (SRE), specificity protein 1 element (SP1), WT-1 responsive element (WRE) identifiziert. Mehrere Publikationen haben gezeigt, dass cAMP die AREG Expression in verschiedenen Zelltypen erhöht (Johansson, Yndestad et al. 2004). In humanen Brustkarzinomzellen stimulieren Östrogene die AREG Expression (Vendrell, Magnino et al. 2004). Eine Regulation von AREG über Ras wird angenommen. In Ras-onkogen-transformierten RIE-1 Zellen (intestinale Rattenzellen) wurde gezeigt, dass AREG, TGF α und HB-EGF hoch exprimiert sind und dass die Applikation eines Farnesyltransferase-Inhibitors eine Herunterregulation von AREG und TGF α bewirkt (Sizemore, Cox et al. 1999).

AREG ist hauptsächlich nach der Proteolyse durch ADAM17 in löslicher Form im extrazellulären Raum biologisch aktiv. Hier besteht eine weitere Möglichkeit der Regulation, diesmal eine posttranslationale Regulation. Durch verminderte Expression des ADAM17-Inhibitors TIMP3 kann eine dauerhafte Aktivierung von ADAM17 resultieren und damit eine vermehrte Freisetzung von aktivem AREG erfolgen.

Auch eine potentielle Regulation von AREG durch den epigenetischen Mechanismus der DNA-Methylierung ist beschrieben worden. In der kolorektalen Zelllinie HCT 116 wurde auf der Ebene der mRNA gezeigt, dass Zellen mit Knockouts in DNA-Methyltransferasen eine verminderte AREG Menge enthielten (Gius, Cui et al. 2004).

1.5 Epigenetische Genregulation und Tumorgenese

1.5.1 Grundlagen der Epigenetik

Die Epigenetik beschäftigt sich mit Vorgängen der Chromatin-Struktur ohne Modifikation der Nukleotidsequenz. Diese Veränderungen haben Einfluss auf die Regulation und Expression von Genen. Epigenetische Alterationen führen durch reversible chemische Modifikationen zu einer Veränderung des Phänotyps ohne Beeinflussung des Genotyps. Man unterscheidet zwei molekulare Mechanismen von epigenetischen Regelmechanismen: die DNA-Methylierung und die Histonmodifikationen.

Der Prozess der DNA-Methylierung bezeichnet das enzymatische Anfügen einer Methylgruppe an die C5-Position eines Cytosinmoleküls. Katalysiert wird dieser Prozess durch eine Familie von DNA-Methyltransferasen (DNMT); in Säugetierzellen stellen die DNMT 1, DNMT 3a und DNMT 3b die wichtigsten Vertreter dar. Die DNMT 1 hat eine hohe Affinität zu hemi-methylierter DNA, ist in somatischen Zellen stark exprimiert und wird hauptsächlich für die Konservierung von Methylierungsmustern nach der Mitose verantwortlich gemacht. Den beiden Vertretern der DNMT 3 wird eher eine Rolle bei der de novo Methylierung, zum Beispiel nach der Embryoimplantation oder nach der Integration von neuen retroviralen Sequenzen, zugeschrieben (Okano, Bell et al. 1999). Es ist aber wahrscheinlich, dass in vivo alle drei DNMTs die Konservierung von Methylierung als auch de novo Methylierung gewährleisten (Robertson 2001).

Die Effekte der DNA-Methylierung auf das Genom sind vielfältig; der Methylierungsstatus spielt eine wichtige Rolle für die Chromatinorganisation und die Genexpression. Ist die Promotorregion eines Gens methyliert, wird meist die Anlagerung von Transkriptionsfaktoren und somit die Transkription des Gens verhindert. Methylierte CpG-Promotorregionen führen durch Unterdrückung der mRNA-Transkription zu einer Inaktivierung des betroffenen Gens. Ebenso bewirkt DNA-Methylierung eine Kondensierung der Chromatinstruktur, an der Gentranskription nicht möglich ist. Die Verdichtung der Chromatinstruktur kommt dadurch zustande, dass methylierte DNA-Abschnitte Methylbindungsproteine (MBD) und Histondeacetylasen (HDAC) rekrutieren (Baylin, Belinsky et al. 2000).

1.5.2 DNA-Methylierung und Tumorgenese

Im Vergleich mit normalen Zellen zeigen humane Tumorzellen einen veränderten DNA-Methylierungsstatus. Abweichende DNA-Methylierungsmuster in Tumorzellen wurden vor mehr als 20 Jahren entdeckt (Goelz, Vogelstein et al. 1985; Feinberg, Gehrke et al. 1988). In Tumoren beobachtet man zum einen eine Hypomethylierung des gesamten Genoms. Der Gesamtgehalt von Methylcytosin einer entarteten Zelle beträgt 20-60% weniger als in einer normalen Zelle. Dies kann zu chromosomaler Dekondensation und Instabilität führen. Zum anderen besteht eine lokale Hypermethylierung in Promotorbereichen von Tumorsuppressorgenen, die infolge der Methylierung inaktiviert sind. Es wird angenommen, dass die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen und DNA-Reparaturgenen zu ca. 50% durch DNA-Methylierung verursacht ist (Jones and Baylin 2002).

1.5.3 Klinische Relevanz der Epigenetik

Epigenetische Veränderungen stellen ein erhebliches Potenzial für die Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen dar. Da Promotormethylierungen oft frühe Ereignisse in der Karzinomentstehung sind, könnten Methylierungsuntersuchungen an Gewebeproben als „Screeningmethode“ für maligne Erkrankungen fungieren. Gene, deren Inaktivierung mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko assoziiert sind, könnten gezielt untersucht werden und zur prognostischen Abschätzung dienen. Epigenetische Alterationen sind primär als reversible Vorgänge zu betrachten, worin therapeutische Ansätze ihre Grundlage finden. Durch demethylierende Agenzien soll eine Reexpression von methylierungsbedingten Inaktivierungen von Tumorsuppressorgenen erfolgen. Werden hierbei Gene, die die Proliferation hemmen und die Apoptose induzieren wieder aktiviert, kann das Tumorstadium negativ beeinflusst werden.

Demethylierende Agenzien wie 5-Azacytidin, 5-Aza-2'-Desoxyzytidin und Trichostatin, einem Histondeacetylaseinhibitor, sind Gegenstand klinischer Studien zur Behandlung von hämatologischen Erkrankungen, wie den myelodysplastischen Syndromen und Formen der akuten myeloischen Leukämie. Als problematisch erweist sich jedoch die Toxizität und unspezifische Wirkungsweise der verwendeten Substanzen. So inhibieren 5-Azacytidin und 5-Aza-2'-Desoxyzytidin physiologische und pathologische DNA-Methylierung, zudem erschwert die schwere Wasserlöslichkeit die Applikation in Forschung und Klinik.

Um epigenetische Veränderungen in der Diagnostik und Therapie von Tumorerkrankungen optimal nutzen zu können, ist ein Verständnis um die exakten molekularen Vorgänge und ihr Einfluss auf die Genexpression von grosser Bedeutung.

1.6 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll in humanen Kolonkarzinomzelllinien die Regulation von AREG über DNA-Methylierung und über die Ras/Mek/Erk-Kaskade auf Proteineebene untersucht werden.

Basis hierfür sind Vorarbeiten in der humanen Kolonadenokarzinomzelllinie HCT 116 und Derivaten davon mit Deletionen in DNMT1, DNMT3a und DNMT3b. Hier zeigt sich, dass die Expression von AREG mRNA sich in den verschiedenen Derivaten unterscheidet. Dies gibt Anlass zur Annahme, dass AREG über DNA-Methylierung reguliert wird. Interessant erscheint der Aspekt auf einen potentiellen neuen Regulationsmechanismus eines EGFR-Liganden gestoßen zu sein.

Zunächst wird ein Proteinnachweis für AREG etabliert und optimiert. Daran anschließend sollen verschiedene humane Kolonkarzinomzelllinien auf AREG Protein hin untersucht werden, um geeignete Zelllinien für die Behandlung mit Inhibitoren zu bestimmen. Um Aussagen über die Regulation durch DNA-Methylierung machen zu können, wird mit dem DNMT1-Inhibitor Zebularine gearbeitet. Für die Untersuchung eines Einflusses der RAF/MEK/ERK-Kaskade wird der MEK-Inhibitor U0126 verwendet.

Weiterhin besteht die Aufgabe den Einfluss des EGFR-Inhibitors Gefitinib auf die Proliferation von HCT 116 parental und HCT 116 DNMT1^{-/-} zu untersuchen. Im Zellkulturmodell soll der Frage nachgegangen werden, ob die Kombination einer Methylierungstherapie mit einer EGFR-Therapie von Vorteil wäre.

Um außerdem die pathophysiologische Rolle des untersuchten EGFR-Liganden im Kolonkarzinom zu beurteilen, wird die AREG Expression mittels Immunhistochemie in humanen Kolongewebebeurteilungen analysiert.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende humane kolorektale Tumorzelllinien verwendet. Die Zelllinien SW-707 und SW-948 wurden freundlicher Weise von der AG Prof. PD Dr.med. Denkert zur Verfügung gestellt.

Zelllinie	Bemerkungen / genetische Alterationen	Bezugsquelle	Medium	Referenz
HCT 116	p53: wildtyp KRAS: mutiert (G13D) β-Catenin: mutiert	B.Vogelstein, Johns Hopkins University	McCoys5a	(Brattain, Fine et al. 1981)
HCT 116 ^{DNMT1-/-}	Derivat von HCT 116 mit homozygoter Deletion im DNMT1-Gen		McCoys5a	(Rhee, Bachman et al. 2002)
HCT 116 ^{DNMT3b-/-}	Derivat von HCT 116 mit homozygoter Deletion im DNMT 3b-Gen		McCoys5a	(Rhee, Bachman et al. 2002)
HCT 116 ^{DNMT1-/-} + DNMT 3b-/-	Derivat von HCT 116 mit homozygoter Deletion im DNMT1 und DNMT 3b Gen		McCoys5a	(Rhee, Bachman et al. 2002)
HT-29	p53: mutiert (R273H) KRAS: wildtyp β-Catenin: wildtyp	ATCC, Katalognummer HTB-38	L-15	(Fogh and Trempe 1975)
SW-480	p53: mutiert (R273H) KRAS: mutiert (G12V) β-Catenin: wildtyp	ATCC, Katalognummer CCL-228	L-15	(Leibovitz, Stinson et al. 1976)
SW-707		CLS	L-15	(Leibovitz, Stinson et al. 1976)
SW-948		CLS	L-15	(Leibovitz, Stinson et al. 1976)
CX-2		CLS	L-15	(Ovejera, Houchens et al. 1978)
HRT-18 (HCT-8)		CLS	L-15	(Köbel, Budianto et al. 2005)
CaCo-2		CLS	RPMI	(Fogh, Wright et al. 1977)

WiDr	Derivat der Zelllinie HT-29	ATCC, Katalognummer CCL-218	D10	(Noguchi, Wallace et al. 1979) (Chen, Drabkowski et al. 1987)
------	-----------------------------	-----------------------------	-----	--

Tabelle 1: Auflistung und Charakterisierung der verwendeten humanen kolorektalen Tumorzelllinien. ATCC= American Type Culture Collection, CLS=Cell Lines Service. Die Angaben über die genetischen Alterationen von HCT 116, HT-29 und SW-480 beziehen sich auf (Gayet, Zhou et al. 2001)

2.1.2 Puffer und Lösungen

Für die Herstellung von Puffern und Lösungen wurde MilliQ 18Ω Wasser (PURELAB Classic-Anlage, ELGA Lab water, Bucks, Großbritannien), in der vorliegenden Arbeit als Aqua bidest bezeichnet, benutzt.

Im Folgenden sind jegliche verwendete Puffer aufgelistet:

- PBS 10x (80g NaCl, 2g KCl, 14.4g Na₂HPO₄, 2.4g KH₂PO₄, pH 7.4)
- TE 1x (10mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH 7.5)
- TAE 50x (242g Tris-base, 57.1ml Eisessig, 100ml 0.5M EDTA(pH8), pH 7,5)
- Lauf-Puffer für Western Blot 5x (15,1g Tris Base, 72g Glycine, 5g SDS oder 25ml 20% SDS)
- Blotting-Puffer für Western Blot 2,5x (14,53g Tris Base, 7,33g Glycine, 4,69ml 20% SDS, 500ml Methanol, ad 1l)
- TBST 1xTBST(10mM Tris pH8,0, 150mM NaCl, 0,05% Tween 20)
- RIPA (150mM NaCl, 5ml 10%NP-40, 0,25g 0,5% DOC, 0,25ml 20% SDS , 2,47ml 1M TrisHCl (50mM), ad 50ml)
- Homogenisierungspuffer (10mM Pipes, 2mM Magnesiumchlorid, 1mM EGTA, 400mM NaCl, pH7,4)
- Waschpuffer ELISA (1xPBS, 0,05% Tween 20)
- Elution-Puffer Amidoschwarz Proteinbestimmung (50ml EtOH, 10µl 0,5M EDTA 5ml 0,5M NaOH 45ml H₂O)
- 2x SDS-Sample Buffer (20ml 0,5M Tris-Base pH6,8, 308,4 mg DTT, 2ml SDS 2%, 2ml Glycerol 10%, 5mg Bromphenolblau, ad 10ml)

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie	Bezugsquelle
Amidoschwarz	Merck KgaA, Darmstadt, D
Amphiregulin, rekombinantes humanes Protein	R&D Systems, MN, USA
Ammoniumperoxiddisulfat (APS)	Sigma, MS, USA
Bromphenolblau	Sigma, MS, USA
Coomassie	Fluka AG, Bucks, CH
Dimethyl Sulfoxid DMSO	Sigma, MS, USA
Dithiotreitol (DTT)	Sigma, MS, USA
EDTA	Merck, KgaA, Darmstadt, D
Essigsäure	Merck, KgaA, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Merck, KgaA, Darmstadt, Deutschland
Ethylen Glycol TetraAcetat (EGTA)	Sigma, MS, USA
Glycerol	Merck, KgaA, Darmstadt, D
Glycine	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Hygromycin	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, D
Isopropanol	Merck, KgaA, Darmstadt, D
Kaliumchlorid	Merck, KgaA, Darmstadt, D
Lithiumchlorid (LiCl)	Merck, KgaA, Darmstadt, D
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt, D
Magnesiumchlorid	Merck, KgaA, Darmstadt, D
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	Merck, KgaA, Darmstadt, D
Methanol	Merck, KgaA, Darmstadt, D
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, KgaA, Darmstadt, D
Natriumdihydrogenphosphat (NaH ₂ PO ₄)	Merck, KgaA, Darmstadt, D
Natrium-Deoxycholate (DOC)	Sigma, MS, USA
Natrium-Dodecylsulfat	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck, KgaA, Darmstadt, D
Page Ruler (WB Marker)	Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, D
Penicillin/Streptomycin	BiochromAG, Berlin, D
Piperazin-1,4-bis (2-ethansulfonsäure)	Merck, KgaA, Darmstadt, D
Rotiphorese	Roth, Karlsruhe, D
Rinderserumalbumin (Bovines Serum Albumin, BSA)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Schwefelsäure	Merck, KgaA, Darmstadt, Deutschland)
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma, MS, USA
Tris-Base (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan)	Merck, KgaA, Darmstadt, D
Tris-HCl (Tris-(hydroxymethyl)aminomethan-HCl)	Merck, KgaA, Darmstadt, D
Triton X-100	Sigma, MS, USA
Tween 20	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D

Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien.

2.1.4 Inhibitoren

Inhibitor	Bezugsquelle
5-Aza-2'-Desoxyzytidin	Sigma, MS, USA
Aprotinin	Sigma, MS, USA
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, D
Gefitinib	Biaffin GmbH & CoKG, Kassel, D
Pefabloc SC Plus	Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, D
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Sigma, MS, USA
U0126	Promega, WI, USA
Zebularine	Calbiochem, CA, USA

Tabelle 3: Liste der verwendeten Inhibitoren

2.1.5 Antikörper

Zielprotein	Bezugsquelle	Herkunft	Arbeitsverdünnung	Inkubationszeit- und temperatur
primäre Antikörper				
AREG	R&D Systems, MN, USA	Ziege	1:100 bis 1:1000 in 5% Magermilch/ TBST	über Nacht , 4°C
DNMT1	New England Biolabs(NEB), Frankfurt am Main, Dtl.	Hase	1:1000 in 5% Magermilch/ TBST	über Nacht, 4°C
Aktin	Chemicon	Maus	1:10000 in TBST	1h, Raumtemperatur
sekundäre Antikörper				
anti-Maus	Dianova, Hamburg, Dtl.	Hase	1:5000	1 h, Raumtemperatur
anti-Hase	Cell Signaling, MA, USA	Ziege	1:1000	45 min, Raumtemperatur
anti-Ziege	Santa Cruz, CA, USA	Affe	1:15000	45min, Raumtemperatur

Tabelle 4: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.

2.1.6 Kits

Kit	Bezugsquelle
Human Amphiregulin ELISA Kit	R&D Systems, MN, USA
ECL Western blotting detection reagents and analysis system	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, GB
Substrat Reagent Pack	R&D Systems, MN, USA
Big Dye Terminatorv1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, CA, USA

Tabelle 5: Liste der verwendeten kommerziellen Kits.

2.1.7 Medien

Medium	Bezugsquelle
McCoy's 5a Medium	Gibco, Invitrogen, MD, USA
Leibovitz – 15	Cambrex, NJ, USA
VLE RPMI 1640 Medium	Biochrom AG, Berlin, D
DMEM	Cambrex, NJ, USA
OptiMEM	Gibco, Invitrogen, MD, USA

Tabelle 6: Liste der verwendeten Medien.

2.1.8 Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Bezugsquelle
15ml Plastikröhrchen	Nalge Nunc International, NY, USA
50ml Plastikröhrchen	Becton Dickinson, NY, USA
6-Lochplatten	Becton Dickinson, NY, USA
96-Lochplatten	Becton Dickinson, NY, USA
Einwegspritzen 5ml, 10ml, 20ml	B. Braun, Melsungen AG, D
Eppendorfgefäße 1,5ml und 2ml	Eppendorf, Hamburg, D
Filter FP 30/0,2 CA-S	Whatman Schleicher&Schuell, NJ, USA
Glaspipetten 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Becton Dickinson, NY, USA
Gummiwischer	Roth, Karlsruhe, D
Hybond-P PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran system	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, GB
Hyperfilm ECL	Amersham Biosciences, Buckinghamshire, GB
Kryoröhrchen	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Nitrocellulosemembran	Whatman Schleicher & Schuell, NJ, USA
Parafilm	American National Can, IL, USA
Petrischalen 3,5cm, 10cm	Becton Dickinson, NY, USA
Pipettenspitzen gestopft 10µl, 100µl, 1000µl	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Pipettenspitzen gestopft 200µl	Sorenson Bio Science Inc., UT, USA
Pipettenspitzen nicht gestopft 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
TC-Tube	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen, D
Whatman Papier	Whatman Schleicher&Schuell, NJ, USA
YM-3 Microcon	Millipore, MA, USA
Zellkulturflaschen 75cm ²	Becton Dickinson, NY, USA
Zellschaber 24cm	Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH

Tabelle 7: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.

2.1.9 Geräte

Gerät	Bezugsquelle
ABI Prism 310 Genetic Analyzer	GMI Inc., MN, USA
Allegra X-15R Centrifuge	Beckman Coulter Inc., CA, USA
Avanti J-25 Centrifuge	Beckman Coulter Inc., CA, USA
Benchmark Plus microplate spectrophotometer	Bio-RAD, CA, USA
Blotgerät: Transblot-SD	Bio-RAD, CA, USA
Cryo 1°C Freezing Container	Nalgene, NY, USA
Elektrophoresis Power Supply 200	Pharmacia Biotech, NJ, USA
Eppendorf-Pipetten 2,5µl, 10µl, 100µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
Finnpipette 200µl,	Labsystems, Quickborn, D
Glasplatten 75mm und 150mm	Bio-RAD, CA, USA
HERA cell240 Zellkulturinkubator	Kendro, MS, USA
Hybaid Touchdown PCR Thermal Cycler	Thermo Electron Corp., MA, USA
Laminar Flow Sicherheitswerkbank	NuAire Inc., MN, USA
Mini-Protean Gelkammer	Bio-RAD, CA, USA
Neubauer Zellzählkammer	LO Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, D
Pipetboy	Integra Bioscience GmbH, Fernwald, D
Power Pac 200 bzw. 300	Bio-RAD, CA, USA
Sonicator W-250	Branson Ultrasonics Cooperation, CT, USA
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg, D
Vortexer REAX 2000	Heidolph, Schwabach, D
Wasserbadinkubator 37°C GFL 1092	GFL, Burgwedel, D
Zentrifuge 5415C, Raumtemperatur	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge 5417 R, 4°C	Eppendorf, Hamburg, D

Tabelle 8: Liste der verwendeten Geräte

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur - Routinekultivierung

Die Zelllinie HCT 116 parental und ihre Derivate HCT 116 DNMT 1-/-, HCT 116 DNMT 3b-/- sowie HCT 116 DNMT DKO wuchsen in McCoy's Medium 5a mit 10% fötalem Kälberserum (FCS). Die Zelllinien HCT116 DNMT 1-/- und HCT116 DNMT DKO wurden in dem entsprechenden Medium und 100µg/ml Hygromycin kultiviert.

Die Zelllinien HT-29, SW-480, SW-707, SW-948, HRT-18 und CX-2 wuchsen in Leibovitz-15 Medium. CaCo-2 wurde in RPMI-Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und WiDr in DMEM-Medium mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) (D10) kultiviert.

Zur Routinekultivierung der Zelllinien wurde das entsprechende Medium mit Penicillin/Streptomycin versetzt, so dass eine Endkonzentration von 100µg/ml erreicht wurde.

Allen Zelllinien wuchsen adhärent bei 37°C und 5%CO₂. Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt.

Das Auftauen der Zellen erfolgte bei 37°C im Wasserbad. Die Zelllösungen wurden mit dem jeweiligen Medium tropfenweise auf 10 ml aufgefüllt und bei Raumtemperatur und 800 rpm fünf Minuten abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 4ml Medium resuspendiert, dann auf 10 ml aufgefüllt und in 75 cm²-Zellkulturflaschen ausplattiert.

Erreichten die Zellen in den Zellkulturflaschen eine Konfluenz von 80% wurden sie 1:5 bis 1:10 in entsprechendem Medium verdünnt. Dazu wurden sie zunächst mit 5ml 1xPBS pro 75cm²-Flasche gewaschen und mit 2 ml Trypsin für 5-15 min im Inkubator behandelt. Die vollständige Ablösung der Zellen wurde im Mikroskop kontrolliert. Es wurden 8 ml des jeweiligen Mediums zugegeben und bei Raumtemperatur und 800 rpm fünf Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Medium aufgenommen und entsprechend der gewünschten Verdünnung in Medium in eine neue 75 cm²-Zellkulturflasche gegeben. Mit dem jeweiligen Medium wurde auf 10 ml aufgefüllt.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Neubauer-Kammer (0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm²). Es wurden 10 µl der Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert. Nach dem Auszählen aller vier Quadranten ergab sich die Zellzahl aus der Gleichung: Zellzahl/ml = (gezählte Zellen/4) x 10⁴. Die Gleichung wurde nur angewendet, wenn die ermittelte Zellzahl größer als 100 war.

Zum Wegfrieren überschüssiger Zellen wurde wie folgt verfahren: Die Zellen wurden wie beim Passagieren beschrieben gewaschen, trypsiniert und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,5ml Medium mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) gut resuspendiert, wovon 1ml in einem Kryoröhrchen in einem Cryo 1°C Freezing Container (*Nalgene, NY, USA*) auf -80°C gekühlt und in flüssigem Stickstoff weggefroren wurde.

2.2.2 Inhibitoren- und Zytostatikabehandlung

U0126

U0126 ist ein MEK-Inhibitor. Die Zelllinien HCT 116 parental, HCT 116 DNMT1^{-/-}, HCT 116 DNMT3b^{-/-}, HCT 116 DNMT DKO, HT-29, SW-707, SW-948, CX-2, CaCo-2 und WiDr wurden mit 10 µM U0126 24 h nach dem Aussähen der Zellen behandelt. Hierzu erfolgte ein Mediumwechsel. Da U0126 in DMSO gelöst ist, wurden als Lösungsmittelkontrolle DMSO behandelte Zellen mitgeführt. Je nach Experimentdurchführung wurden die Zellen 48 h, 96 h oder 120 h mit U0126 inkubiert. Nach 48h erfolgte ein Medium-/ Reagenzienwechsel.

Für den Nachweis von Amphiregulin mittels ELISA in Zellkulturüberständen von U0126-behandelten Zellen wurde das Medium nach 48 h nicht gewechselt.

Zebularine

Zebularine ist ein Inhibitor der DNA-Methyltransferase 1. Zur Analyse der Regulation von AREG durch DNA-Methylierung wurde die Zelllinien HCT 116 parental, HT-29, SW-707, SW-948, CX-2, CaCo-2 und WiDr mit Zebularine behandelt. Dieser Inhibitor wurde in DMSO bzw. Methanol gelöst, weshalb eine DMSO bzw. Methanol Lösungsmittelkontrolle mitgeführt wurde.

5-Aza-2'-Desoxyzytidin

5-Aza-2'-Desoxyzytidin hemmt unspezifisch DNA-Methylierung. Die Zelllinie HCT 116 parental wurde mit 5-Aza-2'-Desoxyzytidin in einer Konzentration von 1 µM und 10 µM über einen Zeitraum von 96 h behandelt. Alle 24 h wurde das entsprechend Medium und 5-Aza-2'-Desoxyzytidin erneuert. 5-Aza-2'-Desoxyzytidin ist in 1xPBS (pH=6,4) gelöst, weshalb keine spezifische Lösungsmittelkontrolle notwendig war.

Gefitinib

Gefitinib ist ein EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren. Es wurde überprüft, ob die Wirkung von Gefitinib von DNA-Methylierung abhängig ist. Hierzu wurde HCT 116 parental und

HCT 116 DNMT^{1-/-} mit Gefitinib behandelt und die Proliferation über 96 Stunden durch einen MTT-Assay kontrolliert. Gefitinib wurde in einer Konzentration von 1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM, 50 µM und 100 µM getestet. Der Inhibitor ist in DMSO gelöst, weshalb entsprechende DMSO-Kontrollen mitgeführt wurden.

2.2.3 Proliferationstest MTT-Assay

Der MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromid)-Assay ist ein kolorimetrischer Test zur Messung von Zellproliferation. Die mitochondriale Reduktase in metabolisch aktiven Zellen reduziert MTT zu Formazan. Das violett-farbene Kristall Formazan wird gelöst und die Färbung photometrisch erfasst.

Um den Einfluss von Gefitinib auf das Zellwachstum zu beurteilen wurde ein MTT-Wachstumsassay unter Verwendung des Cell Proliferation Kit I (MTT) (Roche Deutschland Holding GmbH, Mannheim, Dtl.) laut Herstellerprotokoll durchgeführt. Hierzu wurden unbehandelte Zellen in 96-Lochplatten mit folgender Zellzahl ausgesät:

HCT 116 parental	1500 Zellen pro Vertiefung
HCT 116 DNMT ^{1-/-}	3000 Zellen pro Vertiefung

24 Stunden nach der Aussaat erfolgte die Inhibitoren- oder Zytostatikabehandlung.

Es wurden jeweils 10 µl MTT-Reagenz und 100 µl Lösungsreagenz (10% SDS in 0.01 M HCl) im Abstand von 4 Stunden pipettiert. Die resultierende Färbung wurde photometrisch mit Benchmark Plus microplate spectrophotometer bei 580 nm bestimmt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Proteinbestimmung

Um die Gesamtproteinmenge in Zelllysaten und Zellkulturüberständen zu bestimmen, wurde in den Experimenten die Amidoschwarz-Methode angewendet. Auf eine Nitrocellulosemembran wurden jeweils 2 µl der Probe bzw. der BSA-Standardwerte pipettiert. Es folgte eine 1minütige Inkubation mit Amidoschwarz (0,1%), welches kovalent an basische Aminosäuren der Proteine bindet. Nachdem überschüssiges Amidoschwarz dekantiert war, erfolgte eine Entfärbung der Membran mit Destain für 3x10 min. Amidoschwarz verblieb nur an den Punkten, wo es an Proteine gebunden hatte. Diese Punkte wurden ausgeschnitten und in je 600 µl Elutions-Puffer für 45 min bei Raumtemperatur

inkubiert. Der Farbstoff Amidoschwarz eluierte dabei. Der Grad der Verfärbung wurde im Benchmark Plus Microplatten Photometer bei 620 nm gemessen.

2.3.2 Western Blot

Die SDS-Page (sodium dodecyl sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) mit anschließendem Western Blot ermöglicht eine Identifizierung spezifischer Proteine innerhalb eines Proteingemisches. Nach Herstellung von Gesamtzelllysaten und der Bestimmung der Proteinmenge, erfolgt eine Auftrennung aufbereiteter Proben mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE), Transfer der Proteine auf eine Membran (Blot) und die Proteindetektion mittels Antikörper, die spezifisch an antigene Epitope des auf der Membran fixierten Zielproteins binden.

2.3.2.1 Proteingewinnung

Für die Gewinnung von Proteingemischen aus dem Zelllysate wurden die Zellen in der Zellkulturflasche mit 1xPBS gewaschen, trypsinisiert, abzentrifugiert und die Zellzahl bestimmt. In Abhängigkeit der Versuchsdauer und der Inhibitorinkubation variierte die Zellzahl von $0,4 \times 10^6$ - 1×10^6 , die in 10 ml Medium in einer 10 cm-Schale ausgesät wurde.

24 h nach dem Aussäen erfolgte ggf. die Inhibitorenbehandlung mit einem Mediumwechsel. Alle 48 h erfolgte dann erneut ein Reagenzien-/Mediumwechsel.

Zur Herstellung von Gesamtzelllysaten wurde das Medium der 10 cm-Schalen dekantiert und die Zellen zweimal mit kaltem 1xPBS gewaschen. Nach dem Absaugen überschüssiger Flüssigkeit wurde in jede Schale 300 µl RIPA-Puffer, der mit Complete Protease Inhibitor versetzt war, gegeben. Die Zellen wurden mit einem Gummischaber abgelöst und das Lysat in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Nach einer ein-stündigen Inkubation der Proben auf Eis, wobei alle 10 min gevortext wurde, erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 14.000 rpm für 5 min. Die Überstände wurden in neue 1,5ml-Eppendorfgefäße überführt. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde anhand der Amidoschwarzmethode, wie unter 2.3.1 Proteinbestimmung beschrieben, bestimmt. Zur langfristigen Lagerung wurden die Proben bei -20°C weg gefroren.

2.3.2.2 SDS-Page

Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte elektrophoretisch mittels einer diskontinuierlichen SDS-PAGE. In der Probenaufbereitung und als Zusatz im Gel wurde das anionische Detergens Sodium Dodecyl Sulfat verwendet. Dies bewirkte durch unspezifische Anlagerung eine Denaturierung der Proteine und ein Überlagern der Eigenladung der Proteine. Die Laufgeschwindigkeit der negativ geladenen linearisierten Proteine im Gel hängt dann nur von dem Molekulargewicht und dem Acrylamidgehalt des Gels ab.

Das Gel besteht aus einem dreidimensionalen Polyacrylamidnetz, welches durch die Verknüpfung von Acrylamidmonomeren mit N,N'-Methylenbisacrylamid entsteht. Die Vernetzung wird durch TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin) und Amoniumpersulfat katalysiert. Die Porengröße des Gels hängt von der Acrylamidmenge ab. Je höherprozentig das Gel, desto kleiner die Poren.

Bei der diskontinuierlichen SDS-Page wird über das eigentliche Trenngel ein Sammelgel geschichtet. Durch die Verwendung von einem anderen Puffer und durch eine relativ große Polyacrylamidporenweite wird eine Aufkonzentrierung der Proteine im Sammelgel erreicht. Dies führt im Trenngel zu einer guten Auftrennung und hohen Schärfe der Proteinbanden.

Zur Herstellung des Gels wurden zwei mit SDS und Ethanol gereinigte Glasplatten in die Vorrichtung gespannt. Das gewünschte Trenngel (TG) wurde laut Tabelle 9 hergestellt und nach Zugabe von TEMED zügig bis 1,5 cm unterhalb der Glasoberkante zwischen die eingespannten Glasplatten pipettiert. Bis zur Oberkante der Platten wurde mit Isopropanol aufgefüllt. Nach 30 min wurde das Isopropanol abgegossen und Reste mit Filterpapier entfernt. Das 4% Sammelgel (SG) wurde gemäß Tabelle 9 hergestellt und auf das Trenngel bis zur Oberkante der Glasplatten pipettiert. Ein Kamm wurde luftblasenfrei eingeschoben und das Gel 30 min gehärtet.

	8% TG	10% TG	12% TG	15% TG		4% SG
A.dest	4,69 ml	4,02 ml	3,35 ml	2,35 ml	A.dest.	6,1 ml
1,5M TrisHCl	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	0,5M TrisHCl	2,5 ml
10% SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	10% SDS	100 µl
Acrylamid	2,66 ml	3,33 ml	4 ml	5 ml	Acrylamid	1,33 ml
10% APS	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	10% APS	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	TEMED	10 µl
total	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml		10 ml

Tabelle 9: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid-Gels, TG=Trenngel, SG= Sammelgel.

Während der Wartezeit erfolgte die Vorbereitung der Proteinproben. In Abhängigkeit vom nachzuweisenden Protein wurden variierende Proteinmengen aufgetragen: AREG 30 µg bis 100 µg, DNMT1 50 µg. Die Proben wurden 5 min bei 37°C aufgetaut. Um die Proteine zu beschweren, die Auftragung in die Geltaschen zu erleichtern und um die Proben anzufärben, wurden sie 1:1 mit Gelladungspuffer 1 oder 1:8 mit Gelladungspuffer 2 versetzt. Nach kurzem Vortexen und Zentrifugieren erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 95°C, gefolgt von erneutem Abzentrifugieren. Bis zur Auftragung auf das Gel wurden die Proben auf Eis gelagert.

Das gehärtete Gel wurde mit den Glasplatten vertikal in die Elektrophoresekammer eingesetzt und die Kammer mit 1x Lauf-Puffer gefüllt. Der Kamm wurde herausgezogen, die Taschen gespült und die Proben sowie 3 µl Marker (Page Ruler, 11-170 kDa) auf die Taschen verteilt. Die Elektrophorese wurde mit 70 V begonnen und auf 120 V erhöht, sobald die Lauffront im Trenngel war. Die Elektrophorese wurde beendet, als die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte. Die Elektrophoresekammer wurde zurückgebaut, Sammel- und Trenngel voneinander entfernt. Das Trenngel wurde in 1 x Blotting-Puffer äquilibriert.

2.3.2.3 Blotverfahren

Der elektrophoretische Transfer der aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine proteinbindende Membran wurde als Halbtrockenes-Blotverfahren/Semi-Dry-Blot-Verfahren in 1 x Blotting-Puffer durchgeführt. Als Membran wurde PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran oder Nitrocellulose-Membran verwendet. Die PVDF-Membran wurde zuerst 10 sec in Methanol aktiviert und dann 10 min in A.dest eingelegt. Vor dem Blot wurden Filterpapier, Membran und Gel für 10 min in dem Transferpuffer äquilibriert. Auf der Anode des Blotgeräts wurde der Blot entsprechend Abbildung 3 aufgebaut und luftblasenleer gestrichen.

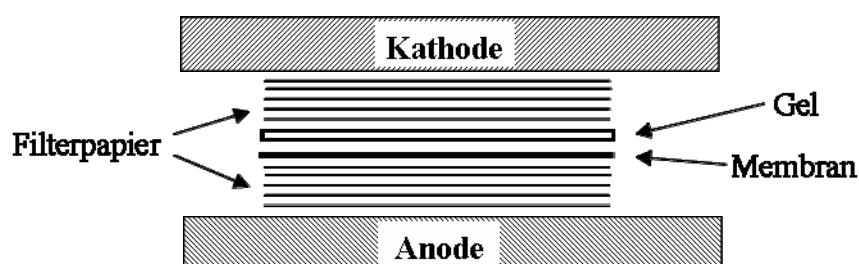


Abbildung 3: Aufbau des Western-Blot.

Die Kathode wurde aufgesetzt und der Transfer begonnen. Die Transferzeit wurde in Abhängigkeit von der Molekularmasse des nachzuweisenden Proteins gewählt. Je größer das Protein, desto länger die Transferzeit: AREG – 45 min, DNMT1 – 90 min. Für eine Gelgröße von 6 cm x 8 cm erfolgte der Transfer elektrophoretisch bei einer Stromstärke von 100 mA.

2.3.2.4 Proteindetektion

Um die Proteindetektion mittels Antikörperreaktion zu ermöglichen, wurden zuerst alle noch freien unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Membran durch eine einstündige Inkubation mit 5% Magermilch in TBST bei Raumtemperatur abgesättigt. Schließlich erfolgte die Inkubation mit dem antigenspezifischen unmarkierten Primärantikörper (siehe unter 2.1.5 Antikörper). Der Antikörper wurde dekantiert. Nach einem dreifachen Waschschrift mit 1xTBST für je 10 min erfolgte die Inkubation mit dem passenden Sekundärantikörper. Die Inkubationsbedingungen der Sekundärantikörper sind ebenfalls aus 2.1.5 Antikörper zu entnehmen.

Die sekundären Antikörper sind spezifisch gegen das F_c-Fragment der Primärantikörper gerichtet und waren alle mit Merretichperoxidase markiert.

Auch der Sekundärantikörper wurde dekantiert und ungebundene Reste durch einen dreifachen Waschschrift mit 1 x TBST für je 10 min entfernt. Die Visualisierung der Antikörperbindung an das Protein erfolgte unter Verwendung des ECL Western blotting detection reagents and analysis system Kits (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien) und Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, Großbritannien). In Abhängigkeit des nachzuweisenden Proteins wurde der Film unterschiedlich lange auf dem Blot exponiert.

2.3.3 ELISA (Enzym-linked Immuno Absorbend Assay)

Amphiregulin-Protein sollte im Medium und in Zelllysaten von Kolonkarzinomzelllinien nachgewiesen werden. Dies wurde unter Verwendung des ELISA Kit Amphiregulin (R&D Systems, MN, USA) durchgeführt.

2.3.3.1 Gewinnung und Aufbereitung von Zellkulturüberständen zum Nachweis von AREG Protein durch ELISA

Um AREG Protein im Zellkulturüberstand nachzuweisen wurden $0,1 \times 10^6$ Zellen in 2 ml Medium pro Vertiefung einer 6-Lochplatte ausplattiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium entfernt und durch 1 ml frisches Medium ersetzt, gegebenenfalls unter Zusatz der Inhibitoren U0126 oder Zebularine. Nach weiteren 96 Stunden wurde das Medium abgenommen und $0,2 \mu\text{m}$ filtriert.

Um das Volumen der Zellkulturüberstände zu verkleinern wurde mit Microcon YM-3 (Millipore) gearbeitet. $500 \mu\text{l}$ des Zellkulturüberstandes wurde auf die Säule aufgetragen. Es erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 60 min bei 4°C und 14000 rpm. Der Überstand auf der Membran der YM-3-Säule wurde durch einen weiteren Zentrifugationsschritt von 3 min bei 4°C und 14000 rpm in ein neues Eppendorfgefäß eluiert. Die Proteinkonzentration wurde mit der Amidoschwarzmethode bestimmt. Die Proben wurden bei -20°C weggefroren.

2.3.3.2 Gewinnung und Aufbereitung von Zelllysaten zum Nachweis von AREG Protein durch ELISA

Um AREG Protein in Zelllysaten nachzuweisen wurden $0,1 \times 10^6$ Zellen in 6-Lochplatten oder $0,4 \times 10^6$ Zellen in 10 cm-Schalen ausplattiert. Erfolgte eine Inkubation der Zellen mit U0126, Zebularine oder 5-Aza-2'-Desoxyzytidin wurde 24 Stunden nach dem Aussähen das Medium entfernt und durch neues Medium, welches mit dem Inhibitor versetzt war, ausgetauscht. In Abhängigkeit der Versuche wurde nach weiteren 48 oder 96 Stunden das Medium dekantiert und die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Pro Unterteilung einer 6-Lochplatte wurden $100 \mu\text{l}$ bzw. pro 10 cm-Schale wurden $300 \mu\text{l}$ Homogenisierungspuffer gegeben. Das Zelllysate wurde in ein $1,5 \text{ ml}$ -Eppendorfgefäß überführt. Jede Probe wurde dreimal mit dem Branson Sonifier sonifiziert und anschließend bei 4°C , 14000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinkonzentration mit der Amidoschwarzmethode bestimmt. Die Proben wurden bei -20°C weggefroren.

2.3.3.3 Prinzip und Durchführung von ELISA

Der ELISA ist ein quantitativer Immunoassay zur Konzentrationsbestimmung von Biomolekülen, der auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion basiert. Ein erster Antikörper

(Fängerantikörper) wird kovalent an eine feste Phase gekoppelt. Nicht gebundene Fängerantikörper werden durch einen Waschschrift entfernt. Freie Bindungsstellen der festen Phase werden abgeblockt. Der Fängerantikörper bindet spezifisch das Antigen in der Probe. Ein zweiter Antikörper (Detektionsantikörper), bindet ebenfalls an das Antigen. Ein Enzym (*horseradish peroxidase, HRP*) wird an den Detektionsantikörper gebunden – in diesem Fall durch eine Biotin-Streptavidin-Bindung. Durch Substratumsatz des Enzyms entsteht eine Verfärbung der Probe, dessen Grad photometrisch gemessen werden kann (Abbildung 4).

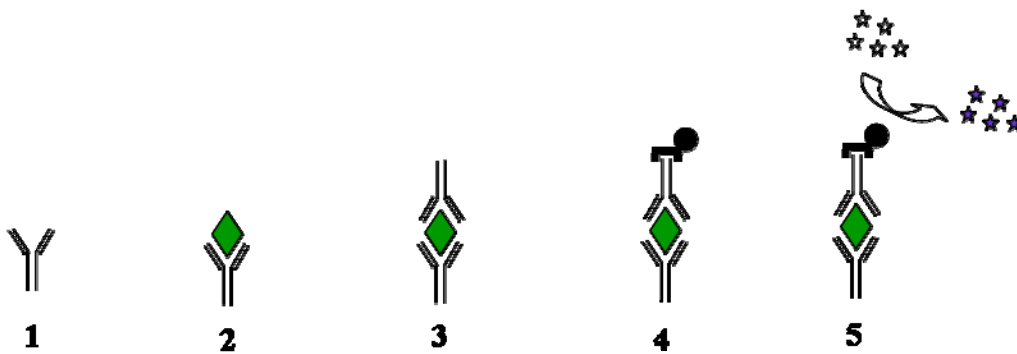


Abbildung 4: ELISA Sandwich Methode. 1 Mit Fängerantikörper beschichtete feste Phase, z.B. Mikrotiterplatte. 2 Inkubation mit Probe und Bindung des Antigens. 3 Zugabe und Bindung des Detektionsantikörpers. 4 Zugabe und Bindung eines Enzyms. 5 Zugabe eines zum Enzym passenden Substrats, das zu einem dektektierbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird.

Zum Nachweis von AREG Protein wurde mit dem ELISA Kit Amphiregulin (R&D Systems, MN, USA) gearbeitet. Die im Herstellerprotokoll angegebene Zeit zum Blocken der unspezifischen Proteinbindestellen wurde von 1 h auf 2 h erhöht. Alle Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Es wurde eine Amphiregulin Standardkurve mitgeführt. Alle Werte wurden in Dreifachbestimmung erhoben, die Waschschrte jeweils mit 400 µl 1xPBS/0,05% Tween 20 pro Vertiefung durchgeführt. Eine 96-Lochplatte wurde über Nacht mit 100µl Fängerantikörper (2 µg/ml) pro Loch beschichtet. Es erfolgte ein dreifacher Waschschrift. Die Platte wurde mit 300 µl 1xPBS/ 1%BSA pro Loch für 2 Stunden geblockt, gefolgt von einem dreifachen Waschschrift. Zur Analyse von Zelllysaten wurden 30-40 µg Protein, zur Untersuchung von Zellkulturüberständen 150-200 µg Protein aufgetragen. Das Volumen wurde auf 100 µl pro Vertiefung mit 1xPBS/ 1%BSA aufgefüllt. Die Standardwerte wurden mit 100 µl pro Loch pipettiert. Nach einer Inkubation von 2 Stunden erfolgten das Dekantieren der Proben bzw. Standardwerte und ein dreifacher Waschschrift. Weiterhin wurden 100 µl Detektionsantikörper (100 ng/ml) pro Loch pipettiert und für zwei Stunden inkubiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch einen dreifachen Waschschrift entfernt. Anschließend erfolgte eine 20minütige Inkubation im Dunkeln mit 100 µl Streptavidin-HRP pro well, die durch Dekantieren und einen dreifachen Waschschrift beendet wurde. Es folgte

eine Substratreaktion unter Verwendung von 100 µl Substratreagenz pro well des Substrat Reagent Pack (R&D Systems, MN, USA) für 20 Minuten im Dunkeln. Die Zugabe von 50 µl 2N H₂SO₄ beendete die Substratreaktion. Der Grad der Verfärbung wurde im Benchmark Plus microplate spectrophotometer (Bio-RAD, CA, USA) bei 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 540 nm gemessen.

2.3.4 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode zur Darstellung von Proteinen in oder auf Zellen und Geweben nach Anwendung immunreaktiver Verfahren. Antigen-Antikörper-Komplexe können durch unterschiedliche Detektionssysteme sichtbar gemacht und im Lichtmikroskop ausgewertet werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden von der AG PD Dr.med. Wilko Weichert 143 humane Kolonkarzinomgewebe bezüglich der Amphiregulin Expression immunhistochemisch untersucht. Die Auswertung der Färbungen erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr.med. Wilko Weichert.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung und Optimierung

Um die Regulation von AREG durch DNA-Methylierung und durch die MAPK-Signalkaskade auf Proteinebene nachzuweisen, wurde zunächst nach einer Nachweismethode für das AREG Protein gesucht. Weiterhin mussten für die Versuche mit dem DNMT1-Inhibitor Zebularine die Inkubationsbedingungen optimiert werden.

3.1.1 Etablierung eines Proteinnachweis für den EGFR-Liganden AREG

Zu Beginn der Arbeit sollte ein geeignetes Nachweisverfahren für das AREG Protein etabliert und optimiert werden. Das AREG Protein kommt in den Zellen in mehreren Formen vor. Als Propeptid liegt es intrazellulär und in der Zellmembran vor, wird dann durch spezifische Proteasen gespalten und als funktionelles Protein sezerniert. Daher bestand grundsätzlich die Frage, ob die intrazelluläre bzw. membranständige Form im Zellysate oder die sezernierte Form im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden soll.

3.1.1.1 Western Blot für AREG

Als Methode der Wahl des Proteinnachweises wurde mit Western Blots begonnen. Zunächst sollte der Nachweis der intrazellulären bzw. membranständigen Proteinform an Gesamtzelllysaten von HCT 116 parental Zellen etabliert werden.

Da die Ergebnisse häufig von der Zusammensetzung des Lysepuffers, der aufgetragenen Proteinmenge, dem Membrantyp und der Antikörperverdünnung abhängig sind, wurden diese Parameter zur Etablierung des Proteinnachweises variiert. Insgesamt kamen sechs verschiedene Lysepuffer zur Anwendung. Die SDS-PAGE wurde mit Proteinmengen im Bereich von 30-100 µg Gesamtzelllysate durchgeführt. Beim Blotting der Proteine wurden sowohl PVDF- als auch Nitrocellulosemembranen verwendet. Die Antikörperinkubation erfolgte in Verdünnungen von 1:100, 1:250, 1:500, 1:750 und 1:1000 in 5% Magermilch. Als Positivkontrolle der Western Blots wurde 50 ng und 100 ng rekombinantes AREG Protein (R&D) mitgeführt.



Abbildung 5: AREG Western Blot in HCT 116 parental Zelllysaten; Spur: 1- Marker, 2- 50 ng AREG Protein, 3- 100 ng Protein, Spur 4-9: Zelllysate in verschiedenen Lysepuffer: 4- Ripa-Puffer 1, 5- Ripa-Puffer 2, 6- Lysispuffer 1, 7- Lysispuffer 2, 8- MAPK-Lysispuffer, 9- SDS-Lysispuffer; Bedingungen: SDS-PAGE: 30 µg Protein; Blotten: PVDF-Membran, 45 min, 100 mA; Antikörperinkubation: AREG-AK (R&D) 1:250 in 5% MM 1 h.

In Abbildung 5 ist ersichtlich, dass die Positivkontrolle in Spur 2 und 3 detektiert wird, das heißt, dass das Nachweisverfahren des durchgeführten Western Blots funktioniert. Dahingegen konnte in den Zelllysaten von HCT 116 parental in den Spuren 4-9 keine äquivalente Bande zur Positivkontrolle detektiert werden. Die untersuchten Extrakte unterschieden sich durch die unterschiedlichen Lysepuffer bei der Proteinernte. Trotz des mehrfachen Variierens der oben genannten Parameter konnte weder die intrazelluläre noch die membranständige Form von AREG in Zelllysaten von HCT 116 parental durch Western Blots nachgewiesen werden. Möglicherweise ist die Menge an intrazellulärem bzw. membranständigem AREG so gering, dass die Sensitivität von Western Blots nicht ausreicht. Der verwendete Antikörper detektiert AREG-Proteinmengen ab 2 ng pro Tasche. Wahrscheinlich ist jedoch, dass das AREG hauptsächlich in den Extrazellularraum sezerniert wird.

Zur weiteren Optimierung und Etablierung der AREG-Protein-Detektion sollte daher ein sensitiveres Proteinnachweisverfahren gewählt und ein Protokoll zum Nachweis der sezernierten AREG-Form erstellen werden.

3.1.1.2 ELISA für AREG

Als alternative und sensitivere Methode des Proteinnachweises wurden ELISAs verwendet. Es sollte zunächst der Nachweis von intrazellulärem bzw. membranständigem AREG im Gesamtzelllysate etabliert werden. Anschließend wurde auch der Nachweis des in den Zellkulturüberstand sezernierten AREGs etabliert.

Detektion von AREG im Zelllysate

Um AREG Protein im Zelllysate nachzuweisen, musste zunächst wieder ein geeignetes Protokoll zur Herstellung von Extrakten erarbeitet werden. Zur Zellyse wurde der in Torring, Jorgensen et al. 2000 verwendete Homogenisierungspuffer (10 mM Pipes, 2 mM Magnesiumchlorid, 1 mM EGTA, 400 mM NaCl, pH 7,4) eingesetzt. Das dort angegebene Protokoll zur Zellkultivierung und Extrakterstellung wurde, wie im Folgenden beschrieben, optimiert:

Protokoll Zellysatherstellung

- Aussähen von 1×10^6 Zellen / 10 cm Schale in 10 ml Medium
- Inkubation der Zellen bis zu 70% Konfluenz
- Dekantieren des Mediums
- 2x Waschen der Zellen mit kaltem PBS
- 300 μ l Homogenisierungspuffer (Torrington 2000) / 10 cm Schale
- Lösen der Zellen mit Zellschaber und überführen des Lysates in Eppendorfgeläß
- 3faches Sonifizieren jeder Probe, im Abstand von 10 min
- Zentrifugieren bei 4°C und 14 000 rpm für 10 min
- Überstand in neues Eppendorfgeläß überführen
- Aliquots bei -20°C wegfrieren

Anhand dieses Protokolls wurden zuerst Extrakte von den Zelllinien HCT 116 parental und HCT 116 DNMT^{1-/-} gewonnen und im ELISA auf AREG analysiert. Der ELISA wurde nach Herstellerprotokoll und den Angaben von Torring (Torrington, Jorgensen et al. 2000) durchgeführt.

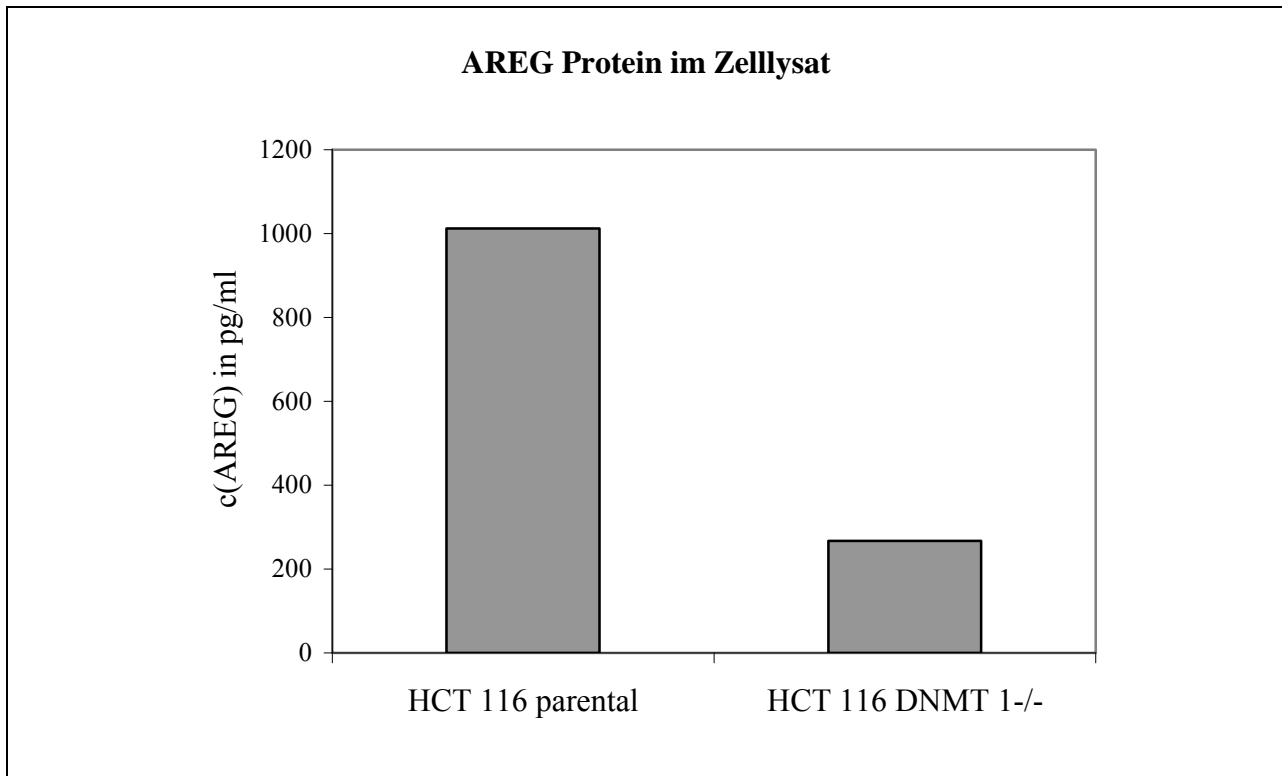


Abbildung 6: AREG Protein Konzentration (pg/ml) im Zelllysate von HCT 116 parental und HCT 116 DNMT^{1-/-}.

Abbildung 6 zeigt, dass in der Zelllinie HCT 116 parental ca. 4x so viel AREG enthalten ist, wie in den Zellen mit einer Deletion der DNMT1. Hiermit war der Nachweis von AREG im Zelllysate von HCT 116 parental erstmals gelungen. Bei dieser ersten Detektion von AREG ist eine deutlich reduzierte Expression des Proteins in HCT 116 DNMT^{1-/-} im Vergleich zu HCT 116 parental Zellen nachweisbar. Dieser Befund entspricht den Erwartungen, dass AREG in HCT 116 DNMT^{1-/-} reduziert exprimiert wird.

Detektion von AREG im Zellkulturüberstand

Nachdem eine Nachweismethode für AREG im Zelllysate zur Verfügung stand, sollte auch die sezernierte Form detektiert werden. Zunächst bestand die Notwendigkeit ein praktikables und effektives Protokoll zur Aufbereitung und Konzentrierung der Zellkulturüberstände zu erstellen. Dieses erfolgte in Anlehnung an die Vorgehensweise von Torring, Jorgensen et al. 2000.

Ein erster Schwerpunkt lag in der Konzentrierung des Zellkulturüberstands, welche notwendig war, da das sezernierte AREG Protein vermutlich in sehr geringern Mengen vorhanden war. Statt der von Torring verwendeten Lyophilisation wurde für die Konzentrierung des Zellkulturüberstands mit Microcon-YM3-Säulen (cut off 3 kDa) gearbeitet. 500 µl Zellkulturüberstand wurden auf die YM3-Säulen aufgetragen. Während der anschließenden Zentrifugation traten Moleküle nur < 3 kDa durch die Membran, größere wurden zurück

gehalten. Dann wurde die optimale Dauer der Zentrifugation bestimmt, bei der möglichst viel Volumen durch die Membran durchtritt und noch ein gewisses Restvolumen über dem Filter bleibt. Die Zentrifugation erfolgte bei 4°C um den Proteinabbau durch Proteasen zu hemmen. Wie in Tabelle 1 ersichtlich wurden Zentrifugationszeiten von 5, 30, 60 und 75 Minuten getestet.

Volumen zu Beginn der Zentrifugation	Dauer der Zentrifugation in Minuten	ungefähres Volumen nach der Zentrifugation <i>über</i> der Membran
500 µl	5	485 µl
500 µl	30	400 µl
500 µl	60	200 µl
500 µl	75	100 µl

Tabelle 1: Optimierung der Zentrifugationsdauer: Restvolumen von 500 µl Anfangsvolumen *über* der Membran nach verschiedenen Zentrifugationsdauern.

Nach 60 Minuten zentrifugieren bestand ein Restvolumen von ca. 200 µl über der Membran. Mit dieser Zentrifugationsdauer wurde zunächst weiter gearbeitet, da das Volumen des Zellkulturüberstands so um mehr als 50% eingeengt werden konnte und der Zeitraum von 1 h praktikabel war.

Ein zweiter Schwerpunkt in der Optimierung des Protokolls zur ELISA-Durchführung war der Probenauftrag. Beim ersten Versuch des AREG-Nachweises in Zelllysaten wurden die Proben in einer 1:5 Verdünnung eingesetzt. Grundsätzlich gibt es zwei Verfahrensweisen dies vorzunehmen. Erstens besteht die Möglichkeit den Extrakt in einem festen Verhältnis, zum Beispiel 1:3, in PBS/1%BSA so zu verdünnen, dass das Endvolumen 100 µl beträgt und dieses schließlich auf die 96-Lochplatte aufzutragen. Die Proteinkonzentration der einzelnen Probe wird dabei vernachlässigt. Hier besteht aber die Gefahr, dass beim Vergleich der AREG-Menge in Zellkulturüberständen von unterschiedlich schnell proliferierenden Zelllinien, wie HCT 116 parental und HCT 116 DNMT^{1-/-}, eine unterschiedliche AREG-Expression detektiert wird, die allein durch das Auftragen von weniger Gesamtprotein der langsamer wachsenden Zelllinie HCT 116 DNMT^{1-/-} zustande kommt. Die Zelllinie HCT 116 DNMT^{1-/-} hat durch die Deletion der DNMT1 ein deutlich langsames Wachstumsverhalten als die Zelllinie HCT 116 parental, welches wahrscheinlich auch eine verminderte Proteinsekretion bewirkt.

Als zweites Verfahren zum Auftragen der Proben kann man die Proteinkonzentration der Überstände und Extrakte vorher bestimmen, gleiche Proteinmengen in die 96-Lochplatte pipettieren und bis auf 100 µl Volumen mit PBS/1%BSA auffüllen. Die Proteinkonzentration

des Extraktes wird hierbei beachtet, jedoch werden die Proben in verschiedenen Puffervolumina gelöst, was möglicherweise die Antigendetektion durch die Antikörper beeinflussen könnte. Das Auftragen gleicher Extraktverdünnungen stand dem Auftragen von gleichen Proteinmengen gegenüber. Im Rahmen der Optimierung wurden daher Zellkulturüberstände von HCT 116 parental und HCT 116 DNMT^{1-/-} laut erarbeitetem Protokoll gewonnen. Die Proteinkonzentration wurden bestimmt und dann entweder äquivalente Verdünnungen (von 1:2 bis 1:100 (Abbildung 7)) oder verschiedene Proteinmengen (im Bereich von 4 µg – 200 µg (Abbildung 8)) im ELISA analysiert.

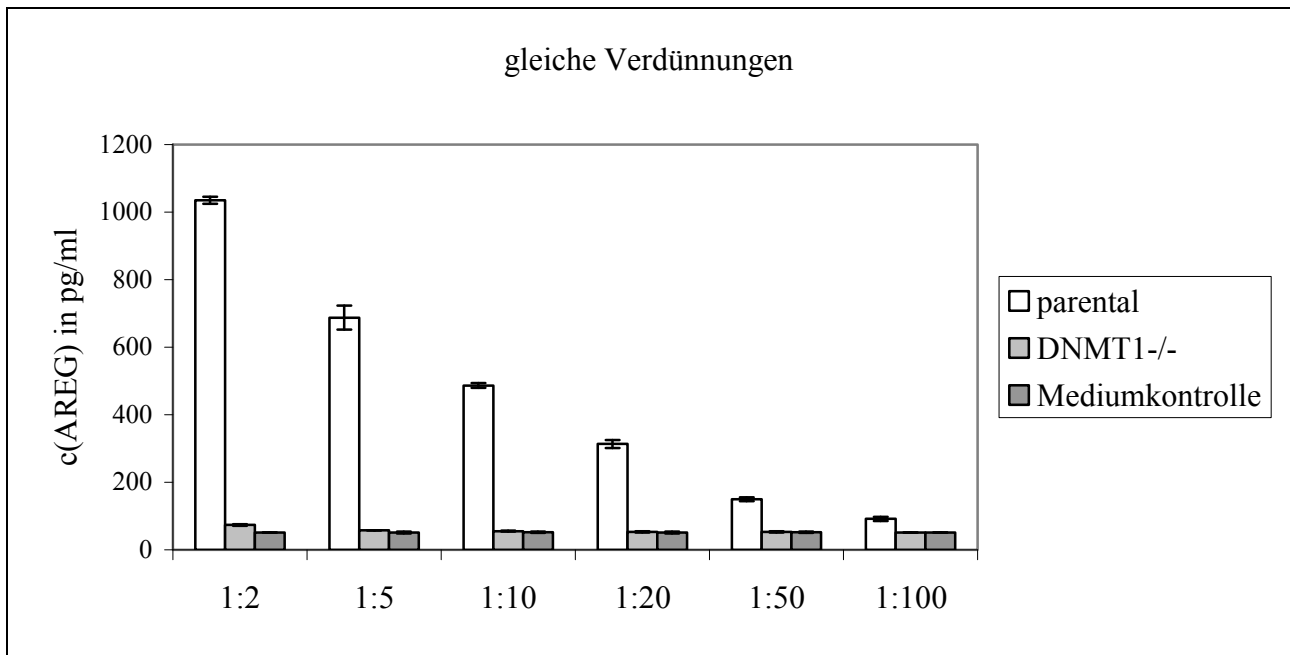


Abbildung 7: AREG nach 96h im Zellkulturüberstand von HCT 116 parental und HCT 116 DNMT^{1-/-}. Beim Auftragen von HCT 116 parental und HCT 116 DNMT^{1-/-} - Extrakten im ELISA wurden *gleiche Verdünnungen* verwendet.

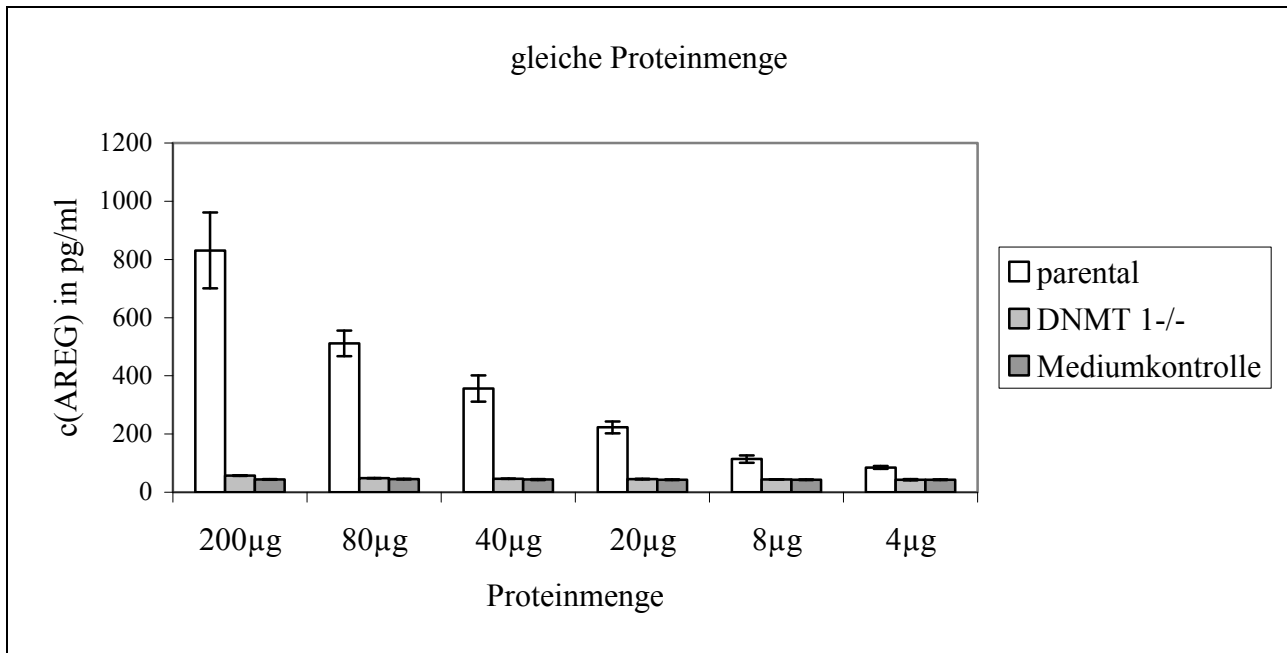


Abbildung 8: AREG nach 96h im Zellkulturüberstand von HCT 116 parental Zellen und HCT 116 DNMT1^{-/-}. Beim Auftragen von HCT 116 parental Zellen und HCT 116 DNMT1^{-/-} - Extrakten im ELISA wurden *gleiche Proteinmengen* verwendet.

Den Abbildungen 7 und 8 ist zu entnehmen, dass das erarbeitete Protokoll zur Detektion von AREG Protein im Zellkulturüberstand von HCT 116 parental geeignet ist. In den Extrakten von HCT 116 DNMT1^{-/-} ist kein AREG enthalten, da kein Unterschied zu den mitgeführten Mediumkontrollen besteht.

In allen analysierten Verdünnungen bzw. Proteinmengen ist im Zellkulturüberstand von HCT 116 parental Zellen mindestens doppelt soviel AREG Protein enthalten wie im Zellkulturüberstand von HCT 116 DNMT1^{-/-} oder in der mitgeführten Mediumkontrolle. In den Extrakten von HCT 116 DNMT1^{-/-} ist keine Abnahme der AREG-Menge in den verschiedenen Verdünnungen oder Proteinmengen zu verzeichnen, d.h. hier ist die Nachweisgrenze erreicht. Der unterschiedliche AREG-Gehalt im Überstand der beiden Zellen stimmen mit dem Unterschied der AREG-Mengen im Zelllysat wie in Abbildung 6 überein. Beide Ergebnisse ergänzen bzw. bestätigen die Beobachtungen zu den AREG-mRNA-Mengen der genomweiten Expressionsprofile.

Betrachtet man die AREG-Konzentration in HCT 116 parental in den aufeinander folgenden Verdünnungen (Abbildung 7) und in den absteigenden Proteinmengen (Abbildung 8), so wird deutlich, dass mit höherer Verdünnung bzw. mit geringerer Proteinmenge weniger AREG detektiert wird. Dies ist durch die Tatsache zu erklären, dass in höheren Verdünnungen bzw. verringerter Proteinmenge zunehmend weniger Gesamtprotein eingesetzt wird und daher auch weniger AREG enthalten ist. Dies bedingt auch, dass der Unterschied der AREG-Expression

zwischen HCT 116 parental und HCT 116 DNMT1^{-/-} mit höherer Verdünnung und verringerter Proteinmenge geringer wird. Bei der 1:2 Verdünnung ist die AREG-Expression in HCT 116 parental 9fach gegenüber der HCT 116 DNMT1^{-/-} erhöht, wohingegen in der 1:100 Verdünnung sie nur etwa doppelt so hoch ist. Ähnliche Verhältnisse sind festzustellen, wenn man die Reihe der Proteinmenge (Abbildung 8) betrachtet. Die AREG-Menge in 200 µg Protein von HCT 116 parental ist um das 8fache gegenüber der äquivalenten Proteinmenge von HCT 116 DNMT1^{-/-} erhöht. Untersucht man dahingegen 4 µg Protein ist der AREG-Gehalt in HCT 116 parental nur etwa doppelt groß wie in HCT 116 DNMT1^{-/-}.

Die mitgeführte Mediumkontrolle zeigt in allen analysierten Verdünnungen und Proteinmengen, dass das verwendete Medium kein AREG enthält. Jegliches im Zellkulturüberstand detektiertes AREG Protein muss deshalb von den kultivierten Zellen sezerniert worden sein.

Ziel dieses Experiments war es auch, herauszufinden, ob beim Auftragen der Proben das Verwenden gleicher Verdünnungen oder gleicher Proteinmengen vorteilhafter ist. Bei der 1:2 Verdünnung und auch beim Auftragen von 200 µg Protein ist ein um mindestens das 8fache erhöhter AREG-Gehalt in HCT 116 parental gegenüber HCT 116 DNMT1^{-/-} festzustellen. Da die Verwendung äquivalenter Proteinmengen ein besseres und reproduzierbares Vergleichen von Experimenten ermöglicht, wurde in allen weiteren ELISA Analysen damit gearbeitet.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass AREG Protein im Zellkulturüberstand von HCT 116 parental Zellen mittels ELISA detektiert werden konnte. Somit steht auch ein Nachweisverfahren für das sezernierte AREG Protein zur Verfügung. Das erarbeitete Protokoll zur Konzentrierung des Zellkulturüberstandes ist praktikabel und die Art des Probenauftrags konnte optimiert werden. Damit bei allen weiteren Analysen der Zellkulturüberstand von gleichen Zellen stammt, musste das Protokoll zur Kultivierung nochmals geringfügig abgewandelt werden. Bisher stammten die Zelllysate aus Kulturen in 10 cm-Schalen und die Zellkulturüberstände von Kulturen in 24-Lochplatten. Das bei allen weiteren Experimenten verwendete Protokoll sieht eine Kultivierung in 6-Lochplatten mit 1×10^5 Zellen pro Loch vor.

3.1.2 Optimierung der Applikation des DNMT1-Inhibitors Zebularine

Um die Regulation von AREG durch DNA-Methylierung näher analysieren zu können, sollte mit dem DNMT1-Inhibitor Zebularine gearbeitet werden. Hierfür wurden initial die Inkubationsbedingungen Konzentration, Lösungsmittel und Inkubationszeit an der Zelllinie HCT 116 parental optimiert.

Aus der Literatur war bekannt, dass Zebularine spezifisch die DNMT1 in der Harnblasenkarzinomzelllinie T24 inhibiert und bei Experimenten über mehrere Tage nach 48 h erneuert werden musste (Cheng, Weisenberger et al. 2004). Nach 72 h Zebularine-Inkubation (500 μ M) ist ein deutlicher Anstieg der mRNA Expression des Tumorsuppressor p16 zu verzeichnen (Cheng, Weisenberger et al. 2004). Weiterhin war bekannt, dass Zebularine in einer Konzentrationen von bis zu 500 μ M eingesetzt werden musste, um eine Demethylierung von p15INK4B in humanen AML-Zelllinien nachweisen zu können (Scott, Lakshimikuttysamma et al. 2007).

Unklar war, ob Zebularine auch in HCT 116 parental die DNMT1 inhibiert, in welcher Konzentration der Inhibitor eingesetzt werden muss und über welchen Zeitraum die Zellen behandelt werden müssen, damit man einen möglichen Effekt auf AREG nachweisen kann.

Im ersten Schritt wurde nachgewiesen, dass Zebularine auch in HCT 116 parental die DNMT1 inhibiert, hierzu wurde ein Western Blot durchgeführt. Über einen Zeitraum von 48 h wurden die Zellen mit 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M, 50 μ M, 100 μ M bzw. 300 μ M Zebularine behandelt.

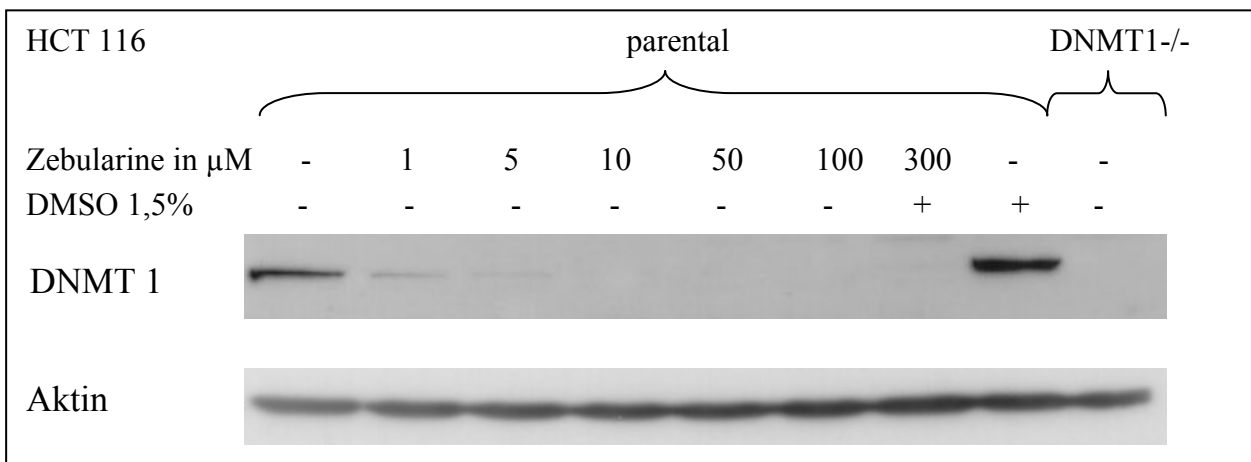


Abbildung 9: DNMT1 Western Blot in HCT 116 parental und HCT 116 DNMT^{1-/-} als Kontrolle nach 48 h Zebularine Inkubation. Als Ladekontrolle wurde Aktin nachgewiesen.

In Abbildung 9 ist die Expression der DNMT1 in unbehandelten HCT 116 parental Zellen und wie erwartet kein Protein HCT 116 DNMT^{1-/-} zu erkennen. Weiterhin ist ersichtlich, dass bereits mit einer Konzentration von 1 μ M Zebularine eine starke Reduktion der DNMT1-Expression in HCT 116 parental erreicht wurde. Ab einer Konzentration von 5 μ M Zebularine ist keine DNMT1 spezifische Bande in den HCT 116 parental Extrakten mehr nachweisbar. Die mitgeführte DMSO-Kontrolle zeigt, dass das Lösungsmittel keinen supprimierenden Einfluss auf die DNMT1-Expression hat. Dieses Experiment wies nach, dass Zebularine auch in

HCT 116 parental die DNMT1 inhibiert. Daher wurde im nächsten Schritt das AREG Protein in Zebularine behandelten HCT 116 parental-Zelllysaten mittels ELISA analysiert.

Optimierung 1

Um eine bessere Durchführbarkeit der Versuche zu ermöglichen, wurde in diesen Experimenten nur Zelllysate analysiert. Untersucht wurde die AREG Expression nach 48 und 96 Stunden Inkubation mit Zebularine. Nach 48 h wurde ein starke Reduktion der DNMT1 erreicht, aus der Literatur war jedoch bekannt, dass ein deutlicher Effekt auf die mRNA Expression von p16 erst nach 72 h zu sehen war.

Die Abbildung 10 und die Abbildung 11 zeigen, dass eine Konzentration von 1 μM und 10 μM Zebularine nach 48 Stunden nur eine geringe Suppression von AREG bewirkt. Die mitgeführten DMSO Kontrollen zeigen eine ähnliche Reduktion von AREG, so dass nicht von einem Zebularine-spezifischen Effekt gesprochen werden kann. Nach einer Zebularine Inkubation mit 1 μM über 96 h zeigt sich kein Effekt auf die AREG Proteinexpression, wohingegen die Applikation von 10 μM Zebularine nach 96 h eine Reduktion von ca. 20% der AREG Expression bedingt. Die DMSO Lösungsmittelkontrolle zeigt nach 96 h keinen signifikanten Einfluss auf die AREG Expression, was die Zebularine bedingte AREG-Supprimierung unterstreicht.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass mit einer Konzentration von 1 μM Zebularine weder nach 48 h noch nach 96 h ein lösungsmittelunabhängiger Einfluss auf die AREG Suppression im HCT 116 parental-Zelllysate festgestellt werden konnte. Bei Behandlung mit 10 μM Zebularine resultierte jedoch nach 96 h Inkubation eine geringe, DMSO-unabhängige Suppression von AREG. Da bei diesem ersten Versuch nur Doppelbestimmungen erhoben wurden, musste unbedingt eine Wiederholung des Experiments erfolgen.

Ergebnisse

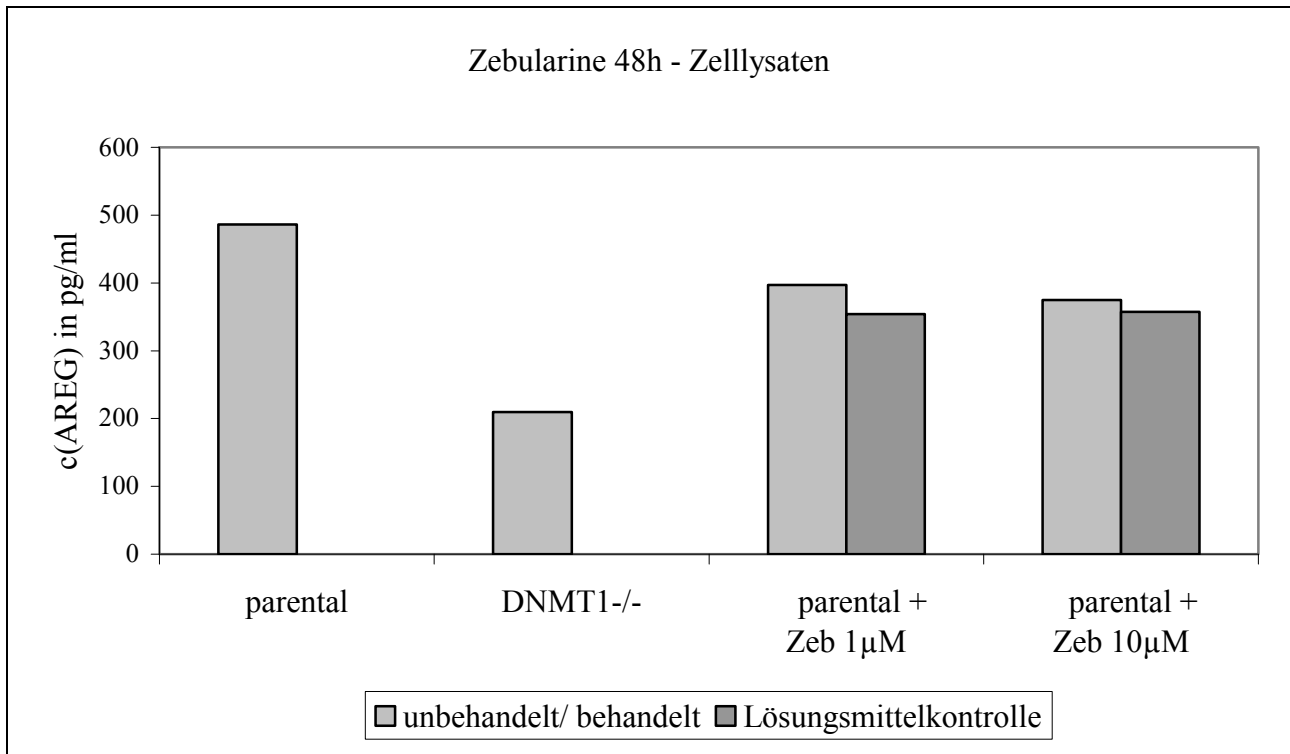


Abbildung 10: AREG Proteinexpression in HCT 116 parental Zellen Zelllysaten nach 48 h Zebularine-Inkubation, Lösungsmittel: DMSO.

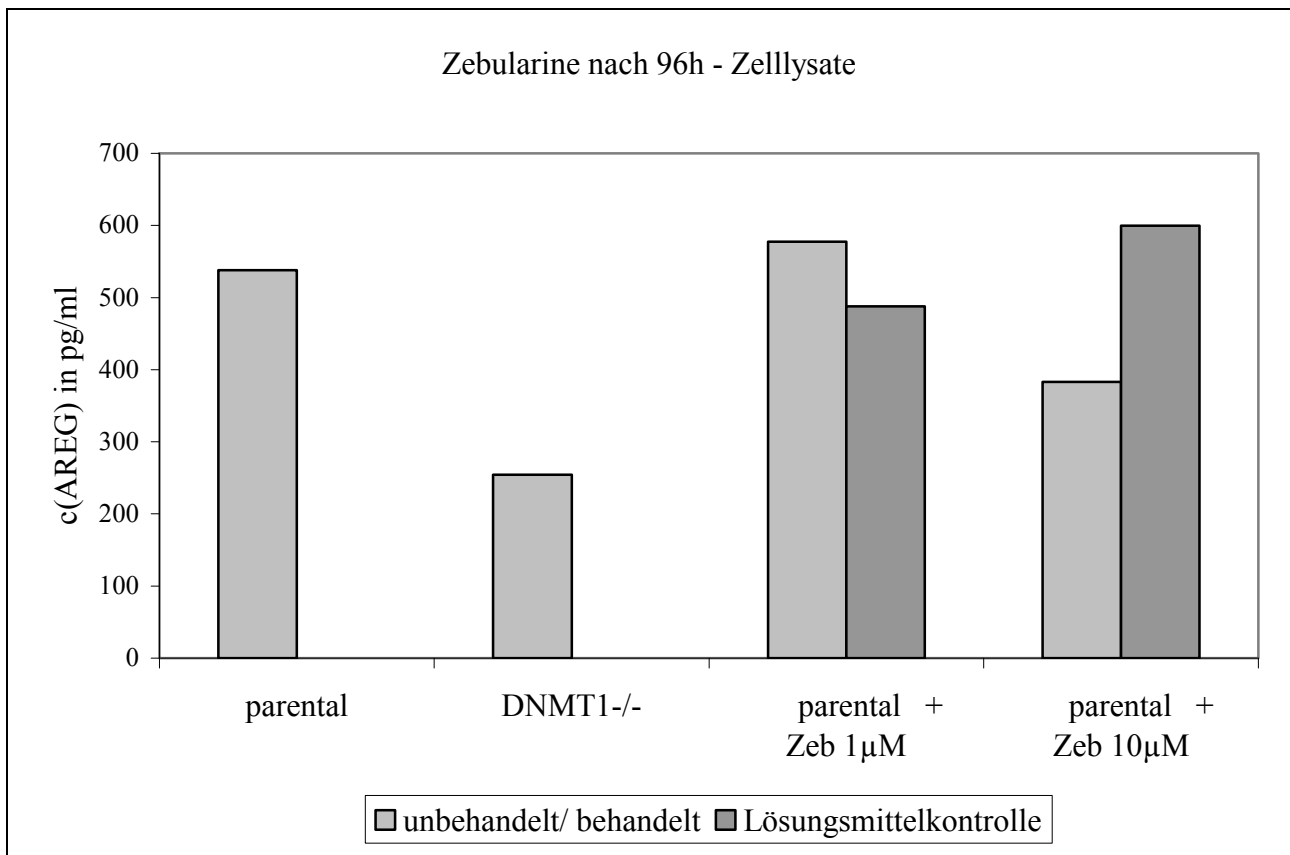


Abbildung 11: AREG Proteinexpression in HCT 116 parental Zelllysate nach 96 h Zebularine-Inkubation, Lösungsmittel: DMSO.

Optimierung 2

Da in HCT 116 parental eine Zebularine-Konzentration von 10 μM zwar eine deutliche Suppression der DNMT1 bewirkt, aber nur eine geringe Reduktion von AREG nach 96 h, sollte im nächsten Schritt versucht werden AREG durch höhere Zebularine-Konzentrationen in HCT 116 parental Zellen zu supprimieren. Über einen Inkubationszeitraum von 96 h wurde mit 1, 10, 50 und 100 μM Zebularine behandelt, wobei wiederholt nach 48 h das Medium und der Inhibitor erneuert wurden. Analysiert wurde wieder die intrazelluläre bzw. membranständige Form von AREG im Zelllysate. In Abbildung 12 sieht man, dass eine Behandlung mit 1 μM Zebularine eine geringfügige, jedoch nicht lösungsmittelunabhängige Steigerung der AREG Expression in HCT 116 parental Zellen bewirkt. Eine Inkubation mit 10 μM , 50 μM bzw. 100 μM hingegen reduziert die AREG Expression im Vergleich zu unbehandelten parental Zellen um ca. 10%, 12% bzw. 16%. Die mitgeführte Lösungsmittel-Kontrolle von 10 μM zeigt keinen Effekt auf die AREG Expression. Die DMSO-Kontrollen der beiden höheren Zebularine-Konzentrationen supprimiert die Expression des Wachstumsfaktors jedoch um ca. 1/5 bzw. 1/10. Hier lässt sich keine Aussage darüber machen, ob der DNMT1-Inhibitor Zebularine eine spezifische Reduktion von AREG im Zelllysate bewirkt, da das Lösungsmittel offenbar auch Effekte auf die Proteinmenge hat. Der DMSO-Effekt sollte daher durch eine Wiederholung des Experiments abgeklärt werden.

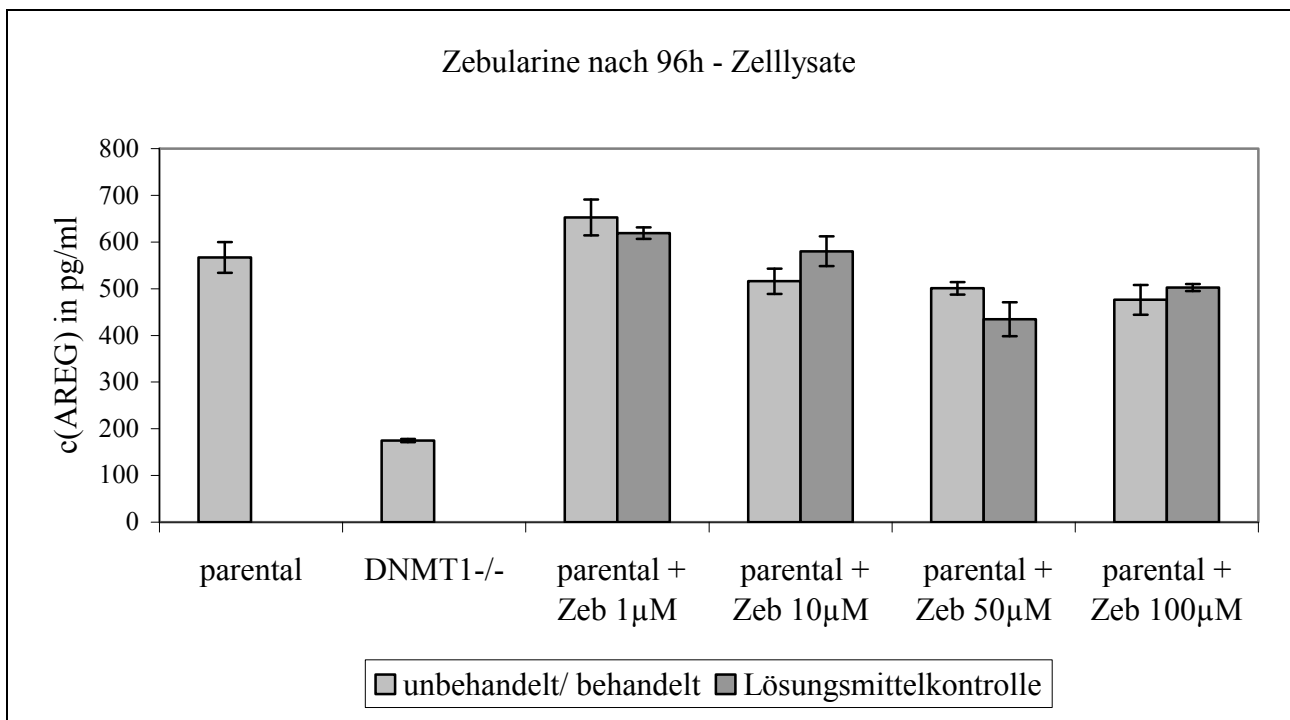


Abbildung 12: AREG Proteinexpression in HCT 116 parental Zelllysaten nach 96 h Zebularine-Inkubation, Lösungsmittel: DMSO.

Optimierung 3

Im weiteren Verlauf sollte versucht werden zu zeigen, dass Zebularine nicht nur das intrazelluläre AREG, sondern auch die sezernierte Form beeinflusst. Um den Effekt auf das sezernierte AREG zu analysieren wurde nur einmal mit dem Inhibitor behandelt und der Zellkulturüberstand nach 96 h gewonnen. Hierbei bestand jedoch die Möglichkeit, dass der Effekt von Zebularine nach 48 h wieder verloren geht. Um dies auszuschließen wurde eine Zeitreihe analysiert, das heißt, die AREG Menge wurde nach 48, 72 und 96 Stunden gemessen. Weiterhin sollten die DMSO-Effekte auf die AREG Menge durch eine Wiederholung der Experimente überprüft werden. In Abbildung 13 ist ersichtlich, dass HCT 116 parental mit zunehmender Zeit mehr AREG in den Zellkulturüberstand sezerniert. Im Vergleich dazu gibt HCT 116 DNMT^{1-/-} über den untersuchten Zeitraum nur wenig bzw. kein AREG in den Zellkulturüberstand ab. Die AREG-Menge im Zellkulturüberstand nach 96 h HCT 116 parental und HCT 116 DNMT^{1-/-} entsprechen den bereits unter 3.1.1.2 ELISA für AREGgezeigten Ergebnissen.

Wird HCT 116 parental mit 10 µM bzw. 100 µM Zebularine über 48 h inkubiert, ergibt sich kein Unterschied zwischen der AREG Expression in den Zebularine behandelten und den unbehandelten Zellen. Nach 72 h Inkubation ist das gleiche Ergebnis zu verzeichnen. Nach 96 h dahingegen kann mit 10 µM Zebularine in HCT 116 parental Zellen eine um ca.32% reduzierte AREG Menge im Vergleich zu unbehandelten parentalen Zellen erzielt werden. Die entsprechende DMSO Kontrolle bewirkt jedoch eine Reduktion um ca. 20%. Wird mit 100 µM Zebularine über 96 h behandelt, so kann die AREG Menge um 60% im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle gesenkt werden. Die entsprechende DMSO Kontrolle supprimiert AREG um 35%.

Diese Experimente zeigten, dass AREG im Zellkulturüberstand von HCT 116 parental detektierbar ist. Eine signifikante Wirkung von Zebularine auf die AREG Protein Expression lässt sich jedoch erst nach 96 h nachweisen. 100 µM Zebularine über 96 h reduzieren die AREG Expression um mehr als die Hälfte, jedoch ist immer noch ein starker Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Proteinexpression zu beobachten, so dass die Frage besteht, ob ein anderes Lösungsmittel verwendet werden kann.

Die Gefahr, dass ein supprimierender Effekt von Zebularine auf die AREG Expression nach 48 h sichtbar ist und nach 96 h wieder abklingt, besteht offenbar nicht. Eine einmalige Behandlung mit Zebularine über 96 h scheint zulässig zu sein. Damit besteht die Möglichkeit den Effekt von Zebularine auch auf die sezernierte AREG Form nach zuweisen.

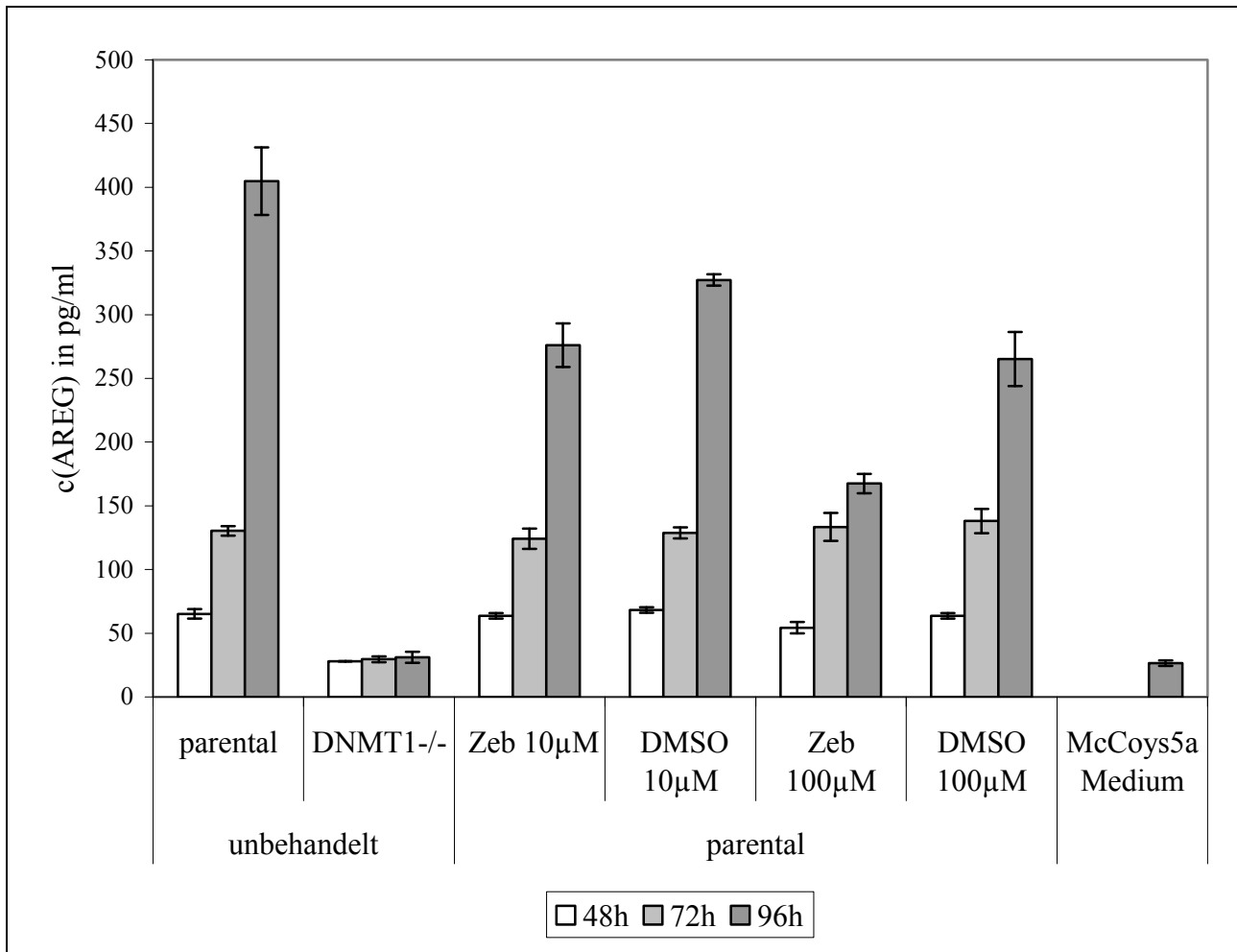


Abbildung 13: AREG Proteinexpression in HCT 116 parental Zelllysate nach 48 h, 72 h, und 96 h Zebularine Inkubation in HCT 116 parental Zellen, Lösungsmittel: DMSO.

Optimierung 4

Bei den durchgeführten Inkubationen mit Zebularine fielen wiederholt starke Effekte des Lösungsmittels DMSO auf. In den folgenden Versuchen wurde DMSO daher durch Methanol ersetzt. Die Ergebnisse aus dem vorhergehenden Optimierungsschritt hatten ergeben, dass bei einmaliger Inkubation mit Zebularine über 96 h eine Reduktion der AREG Expression nachweisbar war. Daher bestand jetzt die Möglichkeit sowohl die zellständige als auch die sezernierte Form von AREG zu analysieren. Parentale HCT 116 Zellen wurden einmal mit Zebularine in einer Konzentration von 10 µM und 100 µM behandelt und der Zellkulturüberstand sowie die Zelllysate nach einer Inkubation von 96 h gewonnen. Die Abbildung 14 und die Abbildung 15 zeigen, dass eine Applikation von 10 µM Zebularine zu einer Reduktion der AREG Expression von 40% im Zelllysate und 20% im Zellkulturüberstand führt. Die entsprechende Lösungsmittelkontrolle zu 10 µM Zebularine im Zelllysate reduziert AREG Protein immer noch um ca.14%. Betrachtet man jedoch die Proteinmenge in den mit

100 μM Zebularine inkubierten Extrakten fällt auf, dass AREG in Zelllysaten um 83% und im Zellkulturüberstand um 50% reduziert ist. Die entsprechende Methanol-Kontrolle zeigt im Zelllysate nur eine Reduktion der AREG Menge um 11% in den Zelllysaten und 16 % in den Zellkulturüberständen. Mit einer Konzentration von 100 μM Zebularine kann in HCT 116 parental also nach 96 h Inkubation die AREG Menge in Zelllysaten effektiv gesenkt werden, unabhängig vom Lösungsmittel. Auffällig ist, dass mit 100 μM Zebularine in HCT 116 parental AREG auf das Niveau wie in HCT 116 DNMT^{1-/-} reduziert werden kann.

Die Inkubationsbedingungen konnten erfolgreich optimiert werden, so dass abschließend geeignete Bedingungen zur Verfügung standen, um die AREG-Mengen in HCT 116 parental weitgehend lösungsmittelunabhängig zu modulieren. Im Rahmen dieser Optimierung wurde gezeigt, dass die Inhibition der DNMT1 zu einer reduzierten AREG Protein Menge führt. Dies unterstreicht die Rolle der DNA-Methylierung für die Expressionsregulation von AREG. Es bestätigt die Ergebnisse des Expressionsarrays und bekräftigt die eingangs formulierte These, dass sich DNA-Methylierung positiv auf die Expression dieses EGFR-Liganden auswirkt.

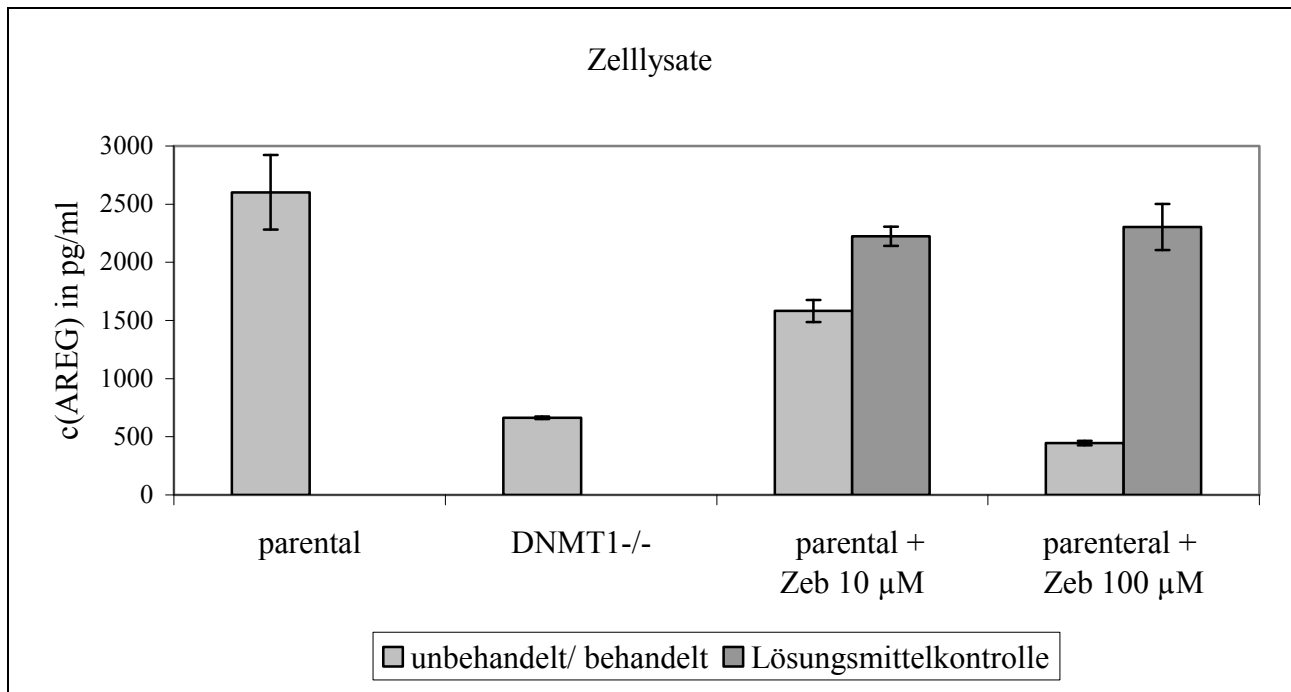


Abbildung 14: AREG Proteinexpression in Zelllysaten von HCT 116 parental nach 96 h Zebularine Inkubation, Lösungsmittel: Methanol.

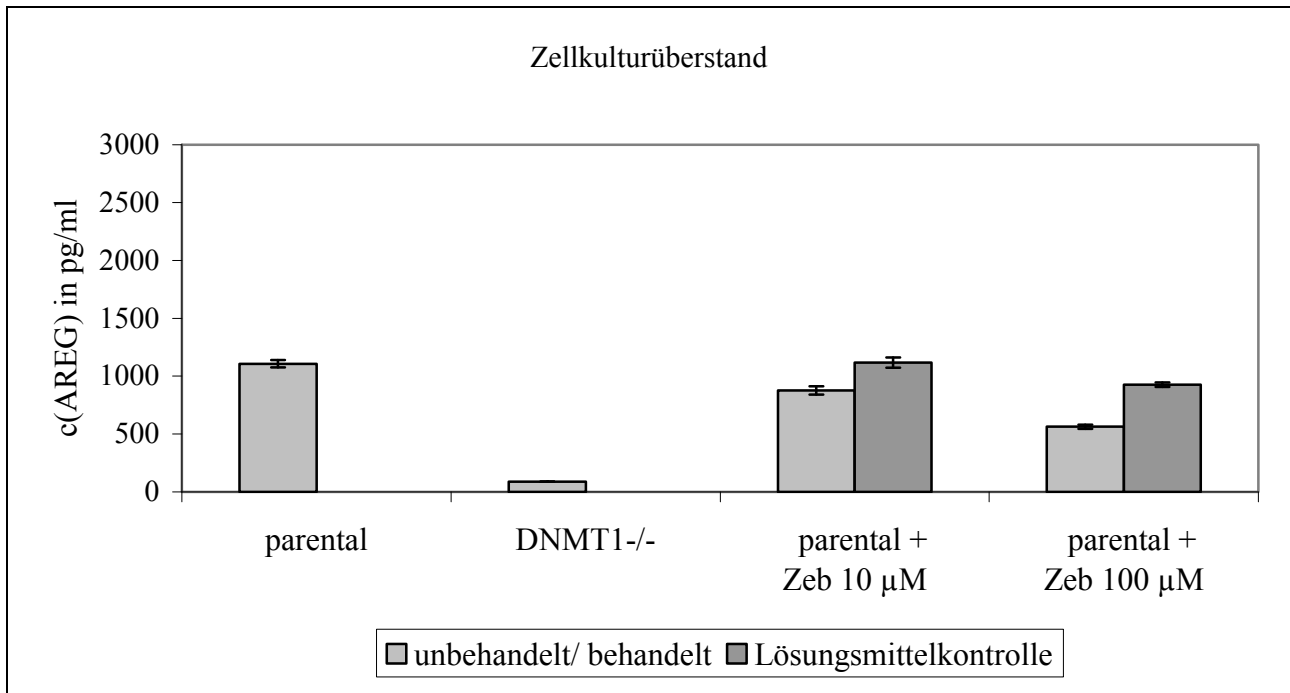


Abbildung 15: AREG Proteinexpression in Zellkulturüberständen von HCT 116 parental nach 96 h Zebularine Inkubation, Lösungsmittel: Methanol.

3.1.3 Etablierung des AREG Antikörpers für immunhistochemische Analysen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten in Kooperation mit PD Dr. Wilko Weichert, Institut für Pathologie, Charité immunhistochemische Analysen von humanen Kolontumorgeweben hinsichtlich der AREG Expression erfolgen. Hierzu musste im Vorfeld geprüft werden, ob der verwendete Antikörper für AREG für die Analyse der Gewebe geeignet war. Aus diesem Grund wurde die AREG Expression in HCT 116 parental, HCT 116 DNMT1-/-, HCT 116 DNMT3b-/- und HCT 116 DKO analysiert.

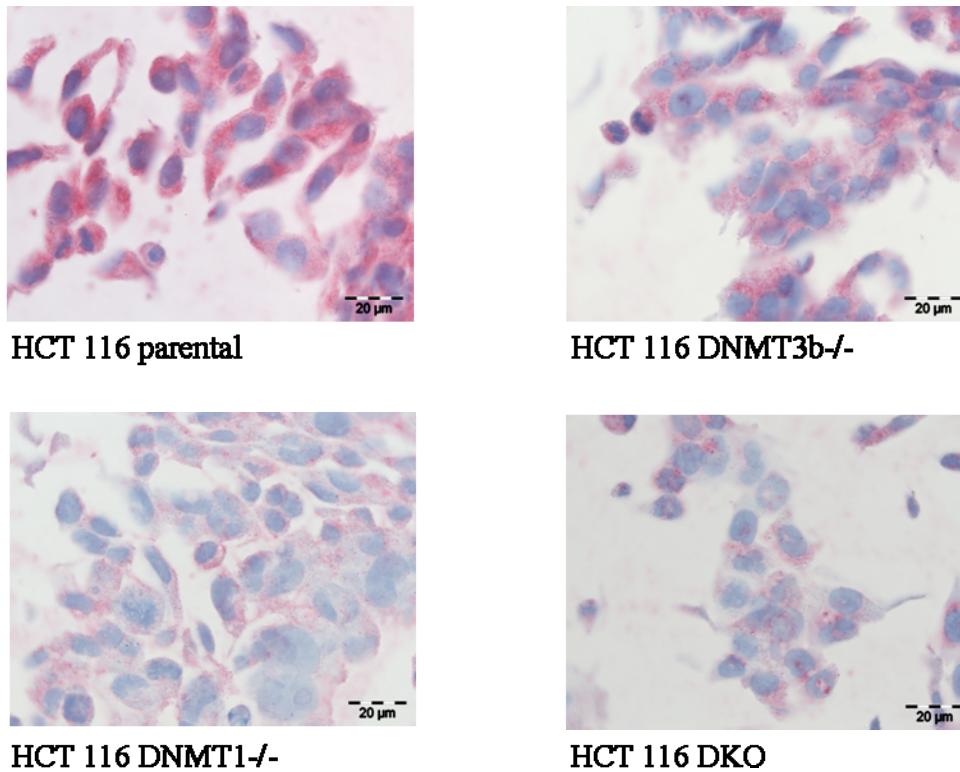


Abbildung 16: Immunhistochemische Analyse der AREG Protein Expression in HCT 116 Derivaten

Der Abbildung 16 ist zu entnehmen, dass HCT 116 parental und HCT 116 DNMT^{3b-/-} entsprechend der stärkeren Färbung mehr AREG enthalten als HCT 116 DNMT^{1-/-} und HCT 116 DKO. Der verwendete Antikörper detektiert AREG und sowie Unterschiede in der Expression des EGFR-Liganden.

3.2 AREG in humanen Kolonkarzinomzelllinien

Im Anschluss an die erfolgreiche Optimierung des AREG-Proteinnachweises in HCT 116 parental Zellen, sollten weitere Kolonkarzinomzelllinien hinsichtlich ihrer AREG-Expression analysiert werden. Zelllysate und Zellkulturüberstände von HT-29, SW-480, SW-707, SW-948, HRT-18, CX-2 und CaCo-2 wurden mittels ELISA analysiert. Daran anschließend sollten geeignete Zelllinien zur Analyse der Regulation von AREG durch DNA-Methylierung und MAPK-Signalkaskade bestimmt werden.

Die Ergebnisse der ELISA-Analyse der Zelllysate (Abbildung 17) zeigten, dass in allen untersuchten Zelllinien AREG detektiert werden konnte. Vergleicht man alle untersuchten Zelllinien fällt auf, dass HCT 116 parental und HT-29 AREG am stärksten exprimieren, und dass HRT-18 am wenigsten AREG im Zelllysate enthält.

Ergebnisse

Abbildung 18 gibt die Resultate der Untersuchung der Zellkulturüberstände wieder. Alle analysierten Zelllinien, bis auf SW-480, sezernieren AREG in das zur Kultivierung verwendete Medium. Im Vergleich aller Zelllinien zeigt der Zellkulturüberstand von SW-948 den stärksten AREG-Gehalt und der von HT-29 und HRT-18 den niedrigsten AREG-Gehalt. Die Zelllinie SW-480 sezerniert kein AREG in das Medium.

Auffallend und überraschend ist, dass der Vergleich von Zelllysate und Überstand von den Zelllinien nicht das gleiche Muster ergeben. So ist in HCT 116 parental, HT-29 und HRT-18 die AREG Menge im Lysat größer als im Überstand, wohingegen SW-707, SW-948, CX-2 und CaCo-2 mehr AREG im Überstand als im Lysat enthalten ist.

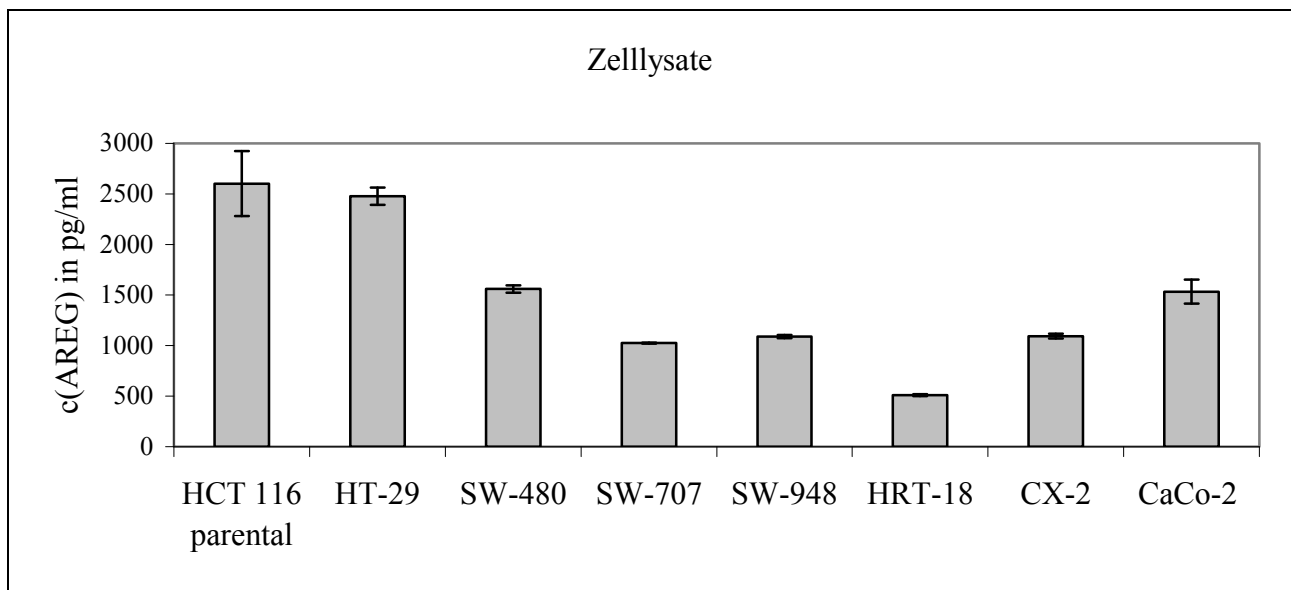


Abbildung 17: AREG Menge in Zelllysaten diverser Kolonkarzinomzelllinien.

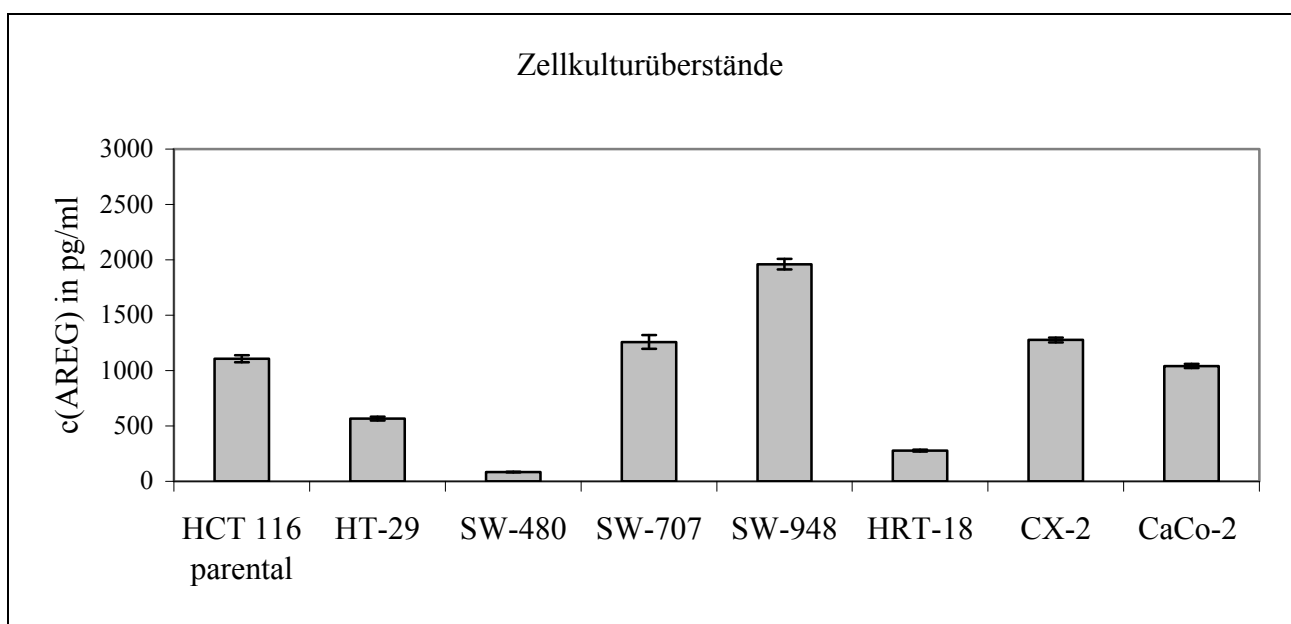


Abbildung 18: AREG Menge in Zellkulturüberständen diverser Kolonkarzinomzelllinien.

Anhand dieser Ergebnisse sollten weitere Zelllinien zur Analyse der Regulation von AREG durch DNA-Methylierung und durch die MAPK-Signalkaskade ausgewählt werden. Als Kriterium hierfür galt, dass das AREG Protein sowohl im Zelllysat und als auch im Zellkulturüberstand detektierbar sein sollte. Da im Zellkulturüberstand von SW-480 kein AREG nachgewiesen werden konnte, entfällt diese Zelllinie für weitere Analysen. Aus weiteren Experimenten ebenfalls ausgeschlossen wird HRT-18, da diese Zelllinie im Vergleich zu allen anderen sowohl im Zellkulturüberstand als auch im Zelllysat sehr geringe Mengen an AREG Protein enthielt. HT-29 hat eine ähnlich geringe AREG-Proteinmenge im Zellkulturüberstand, wie HRT-18, jedoch gehört HT-29 zu den Zelllinien, die AREG stark im Zelllysat exprimieren. Aus diesen Gründen werden für weitere Experimente zur Analyse der AREG-Regulation durch DNA-Methylierung und MAPK-Signalkaskade die Kolonkarzinomzelllinien HCT 116 parental, HT-29, SW-707, SW-948, CX-2 und CaCo-2 verwendet.

3.3 Analyse der AREG Regulation durch DNA-Methylierung und die MAPK-Signalkaskade

Die Regulation von AREG durch DNA-Methylierung und durch die MAPK-Signalkaskade sollte aufgrund der Ergebnisse genomweiter Expressionsprofile der Kolonkarzinomzelllinie HCT 116 parental untersucht werden. Es bestand die Vermutung, dass sowohl DNA-Methylierung als auch die aktivierte Signaltransduktion via MAPK eine Expressionssteigerung der AREG mRNA bewirken.

Die Regulation des EGFR-Liganden AREG sollte zunächst an der Zelllinie HCT 116 analysiert werden, im Anschluss daran auch an weiteren kolorektalen Tumorzelllinien.

Um den Einfluss der DNA-Methylierung auf AREG näher zu charakterisieren, wurde AREG in HCT 116 Zellen mit DNMT-Deletionen untersucht sowie die Wirkung der DNMT-Inhibitoren Zebularine und 5-Aza-2'-Desoxyzytidin auf den EGFR-Liganden geprüft.

Die Rolle der MAPK-Signalkaskade auf die Regulation von AREG wurde anhand der Verwendung des MEK-Inhibitors U0126 analysiert.

3.3.1 Einfluss der DNA-Methylierung auf die Regulation von AREG in HCT 116

Die genomweiten Expressionsprofile von HCT 116 parental, HCT 116 DNMT^{1-/-}, HCT 116 DNMT^{3b-/-} und HCT 116 DKO hatten gezeigt, dass AREG mRNA in Zellen mit DNMT-Deletionen um mindestens 60% reduziert exprimiert wird, verglichen mit DNMT

exprimierenden Zellen. Eines der Hauptziele dieser Arbeit war es diesen transkriptionssteigernden Effekt der DNA-Methylierung auf die Expression von AREG auch auf Proteinebene nachzuweisen. Nach der erfolgreichen Optimierung und Etablierung eines Proteinnachweises für AREG, bestand die Möglichkeit die intrazelluläre bzw. membranständige Form im Zelllysate, sowie die sezernierte Form im Zellkulturüberstand zu detektieren. Von allen vier HCT 116-Derivaten wurden Zelllysate und Zellkulturüberstände gewonnen und die AREG-Proteinkonzentration mittels ELISA analysiert.

In der Abbildung 19 und der Abbildung 20 ist zu sehen, dass im Zelllysate und im entsprechenden Zellkulturüberstand von HCT 116 parental AREG detektiert werden konnte. Dies wurde bereits im Rahmen der Optimierung des Proteinnachweises unter 3.1.1.2 ELISA für AREG gezeigt.

Im Zelllysate von HCT 116 DNMT^{1-/-} ist die AREG Proteinexpression dahingegen um 75% gegenüber der Expression in den parental HCT 116 Zellen reduziert. Im entsprechenden Zellkulturüberstand von HCT 116 DNMT^{1-/-} konnte kein AREG Protein detektiert werden. Dieser Unterschied zwischen der AREG Menge in HCT 116 parental und HCT 116 DNMT^{1-/-} stimmt mit den Ergebnissen der Expressionsprofile überein.

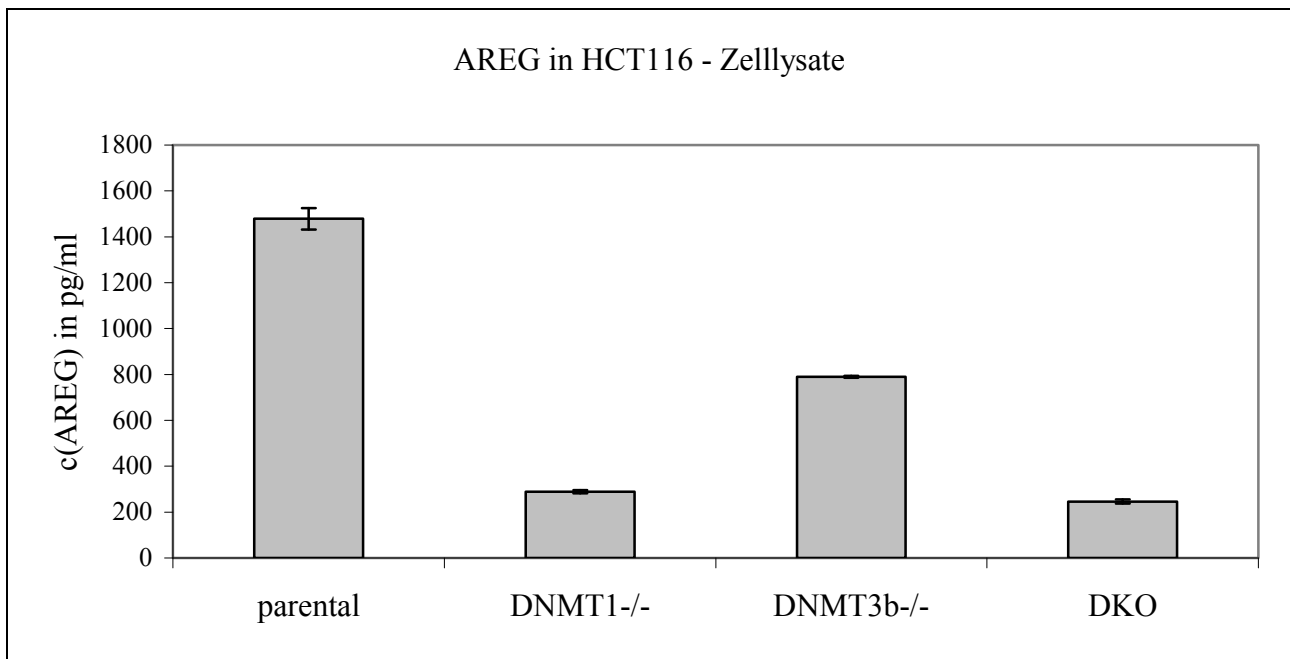


Abbildung 19: AREG Proteinexpression in Zellkulturüberständen von HCT 116 parental und Derivaten mit DNMT Deletionen.

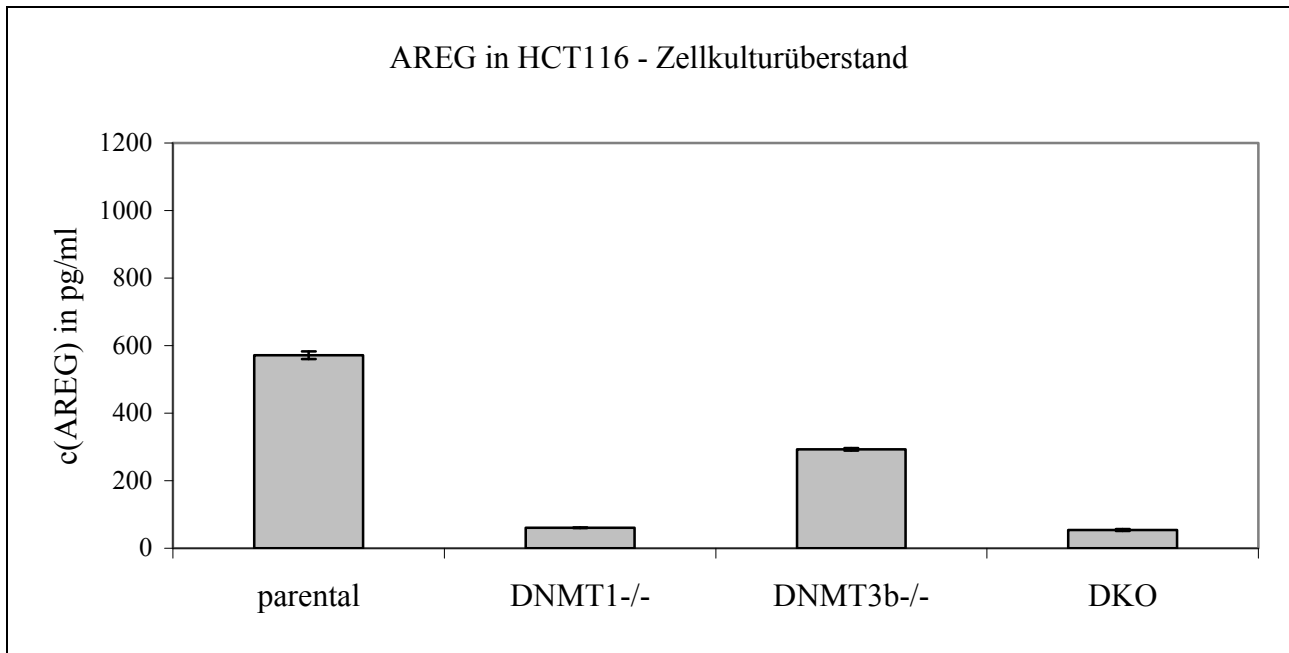


Abbildung 20: AREG Proteinexpression in Zellkulturüberständen von HCT 116 parental und Derivaten mit DNMT Deletionen.

Die HCT 116 Zelllinie mit deletierter DNMT3b exprimiert im Vergleich zu den parentalen Zellen etwa 40% weniger AREG Protein im Zelllysat und sezerniert ca. 50% weniger AREG Protein in den Zellkulturüberstand. Im Vergleich zu HCT 116 DNMT^{1-/-} und HCT 116 DKO enthält HCT 116 DNMT^{3b-/-} dahingegen ca. 2,5-fach mehr AREG Protein im Zelllysat.

Die Zelllinie HCT 116 DKO exprimiert die gleiche Menge AREG Protein wie HCT 116 DNMT^{1-/-} im Zelllysat und sezerniert kein AREG in das zur Kultivierung verwendete Medium. Im Vergleich zu den parentalen HCT 116 Zellen kann im Zelllysat von HCT 116 DKO eine um etwa 75% reduzierte AREG-Proteinexpression detektiert werden. Im entsprechenden Zellkulturüberstand kann dahingegen das gesuchte Protein nicht nachgewiesen werden, ähnlich wie bei HCT 116 DNMT^{1-/-}.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das AREG Protein in unterschiedlicher Menge in Zelllysaten der HCT 116-Derivate exprimiert wird. Die Derivate mit homozygoter Deletion einer oder mehrerer DNA-Methyltransferasen weisen im Zelllysat eine mindestens 50% geringere Menge an AREG auf als die parentalen Zellen. Diese reduzierte Proteinproduktion in Zellen mit DNMT-Deletionen zeigt sich auch, wenn man die sezernierte Form von AREG Protein im Medium betrachtet. So wird im Zellkulturüberstand von HCT 116 DNMT^{3b-/-} 50% weniger AREG detektiert als im Zellkulturüberstand von HCT 116 parental. Von der schon sehr geringen intrazellulären bzw. membranständigen AREG-Menge in HCT 116 DNMT^{1-/-} und HCT 116 DKO wird offenbar kein Anteil sezerniert.

3.3.2 Wirkung des DNMT1-Inhibitors Zebularine auf AREG in kolorektalen Tumorzelllinien

Die Deletion der DNA-Methyltransferase 1 hat einen größeren supprimierenden Effekt auf die Expression von AREG mRNA und Protein gezeigt als die Deletion der DNMT3b. Daher sollte jetzt die Rolle der DNMT1 auf die AREG Protein Expression näher betrachtet werden. Hierzu wurde mit dem spezifischen DNMT1-Inhibitor Zebularine gearbeitet. Die Inkubationsbedingungen für die Arbeit mit Zebularine wurden an der Zelllinie HCT 116 parental wie unter 3.1.2 beschrieben, erarbeitet. Im Rahmen dieser Optimierung wurde gezeigt, dass die Hemmung der DNMT 1 eine Suppression der AREG Protein Expression in HCT 116 parental bewirkt. Jetzt sollten weitere Kolonkarzinomzelllinien untersucht werden. Die unter 3.2 beschriebenen Zelllinien HT-29, SW-707, SW-948, CX-2 und CaCo-2 wurden mit Zebularine behandelt. Mit einer Konzentration von 100 μM Zebularine konnte die AREG Protein Expression in HCT 116 parental um mehr als die Hälfte gesenkt werden. Da aber bekannt war, dass in anderen Zelllinien wesentlich mehr Zebularine eingesetzt werden muss, um Effekte zu sehen (Scott, Lakshimikuttysamma et al. 2007), wurde neben der Konzentration von 100 μM jetzt auch mit 250 μM und 500 μM behandelt. Von jeder Zelllinie wurden jeweils Zelllysat und Zellkulturüberstand geerntet, um die zelluläre und sezernierte Form von AREG zu analysieren.

In Abbildung 21 ist zu sehen, dass in HCT 116 parental mit der Applikation von 100 μM Zebularine die zelluläre Form von AREG um 80% und die sezernierte Form von AREG um 40% gesenkt werden kann.

Betrachtet man dahingegen den AREG-Gehalt in unbehandelten und mit 100-200 μM Zebularine inkubierten HT-29 Zellen bzw. die entsprechenden Zellkulturüberstände (Abbildung 21), so fällt eine erhöhte AREG Expression in den Extrakten mit inhibierter DNMT1 auf. Diese Erhöhung der AREG Expression scheint in den Zellkulturüberständen offenbar positiv von den verwendeten Zebularinekonzentrationen abhängig zu sein. In den mit 200 μM Zebularine inkubierten Extrakten lässt sich sogar eine 1,9 fache Steigerung des sezernierten AREGs im Zellkulturüberstand feststellen.

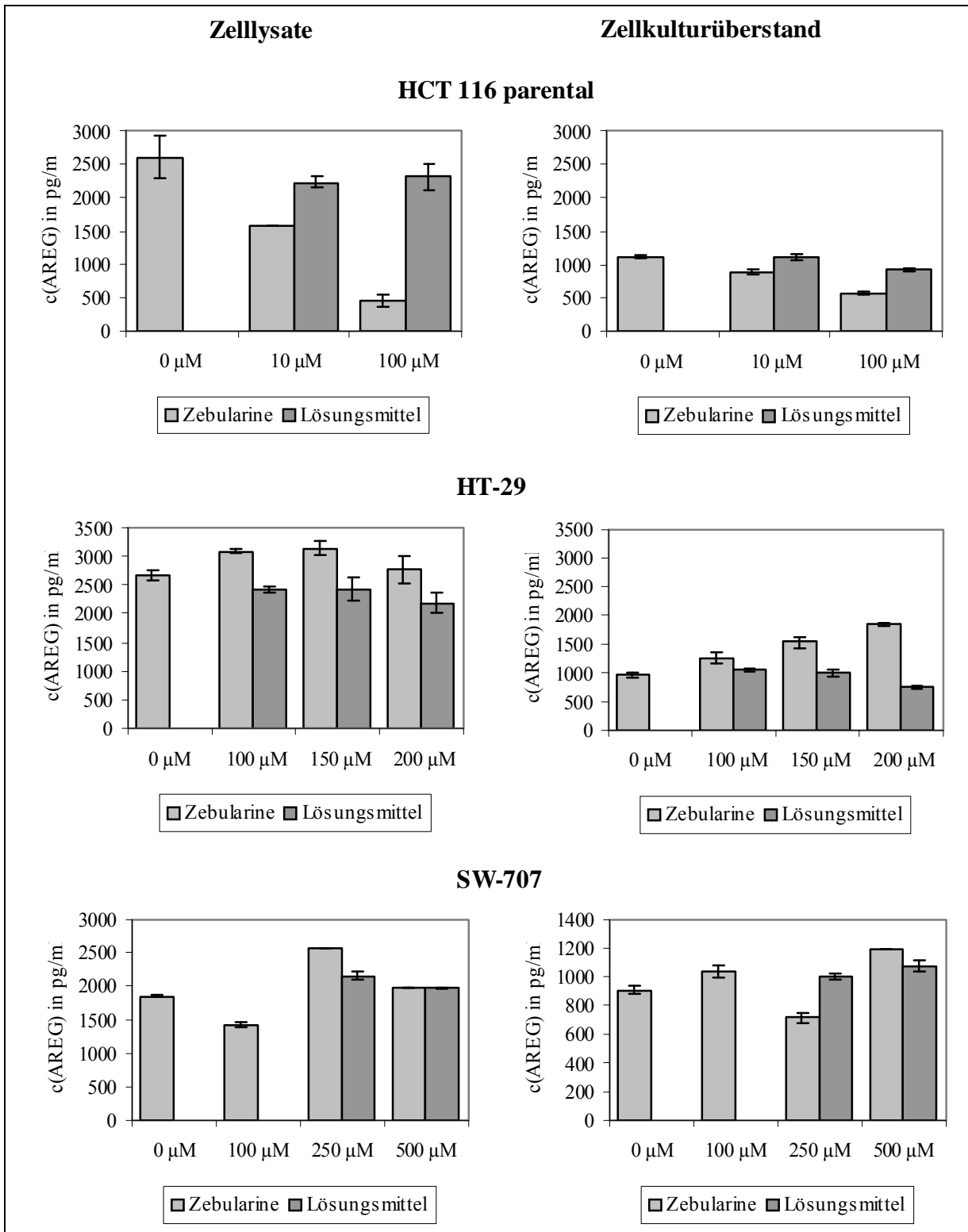


Abbildung 21: AREG Proteinexpression in HCT 116 parental, HT-29 und SW-707 unter Zebularine-Behandlung

Die Zelllinie SW-707 zeigt nach der Behandlung mit Zebularine (Abbildung 21) weder im Zellysate noch im Zellkulturüberstand eindeutige Veränderungen des zellulären bzw. sezernierten AREG-Gehalts. Lediglich die Inkubation mit 250 μM Zebularine führt zu einer ca.

15%igen Reduktion des sezernierten AREGs nicht jedoch des zellulären AREGs. Die Applikation mit 500 μM Zebularine führt zu keiner lösungsmittelunabhängigen Änderung der AREG-Expression in SW-707.

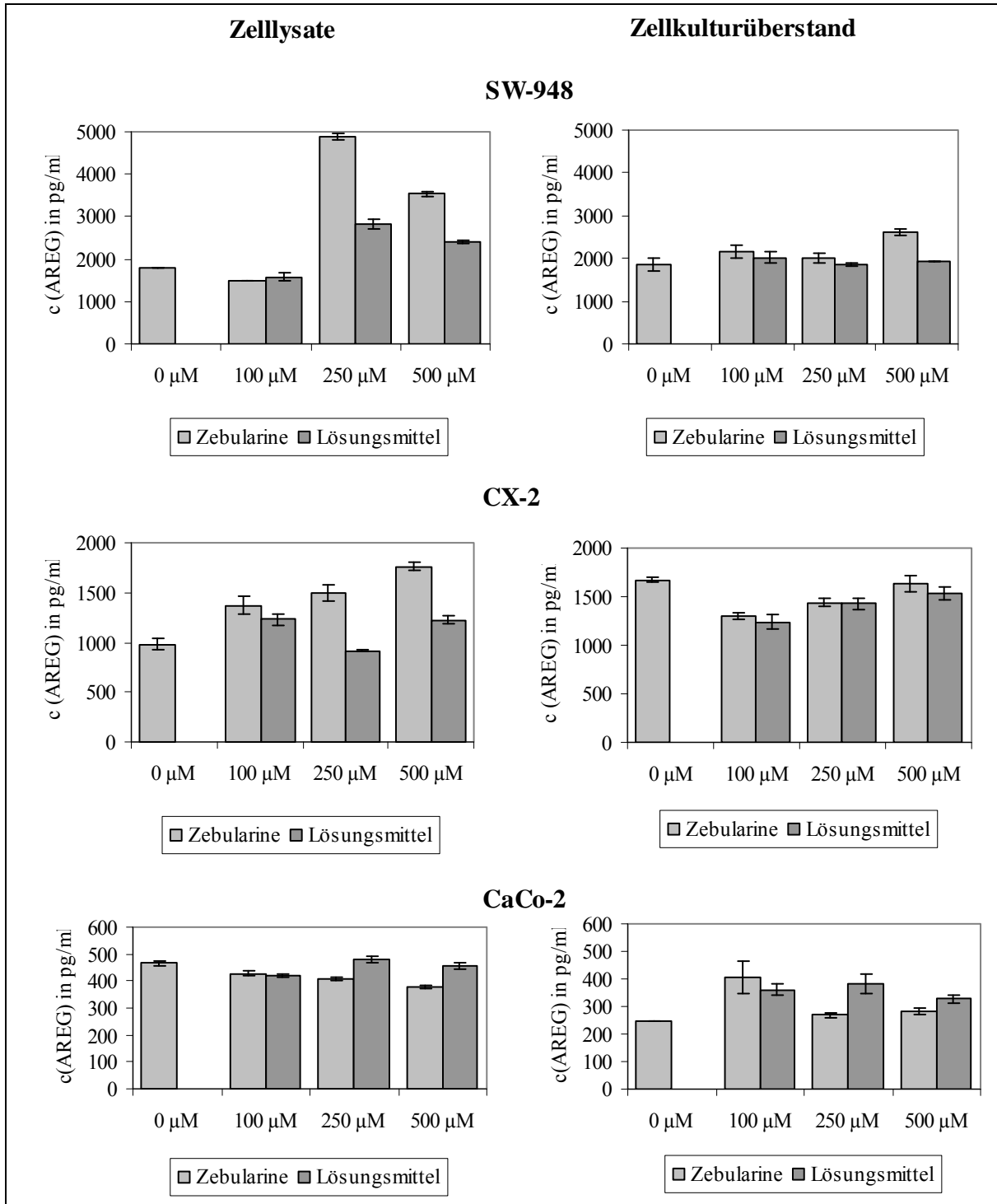


Abbildung 22: AREG Proteinexpression in SW-948, CX-2, CaCo-2 unter Zebularine-Behandlung.

In SW-948 in Abbildung 22 führt 100 μM Zebularine zu keiner Veränderung der zellulären oder sezernierten AREG Menge. 250 μM Zebularine bewirken eine um das 2,7 fache erhöhte Expression des zellulären AREGs, jedoch zu keiner Änderung des sezernierten AREGs. 500 μM Zebularine führen dahingegen zu einer ca. 90%igen Steigerung der zellulären und zu einer 40%igen Steigerung der sezernierten AREG Menge. Tendenziell führt die Zebularine Inkubation der Zelllinie SW-948 also zu einer erhöhten AREG Expression, wobei aber kein von der Zebularine Konzentration abhängiger Effekt, wie in HT-29, zu beobachten ist.

In der Zelllinie CX-2 ist nach Zebularine Inkubation (Abbildung 22) eine geringfügige Zunahme des zellulären AREGs festzustellen. 500 μM Zebularine führen zu einer ca. 40%igen Erhöhung des zellulären AREGs. Im Zellkulturüberstand dahingegen ist keine Erhöhung, sondern eine Reduktion von AREG zu beobachten, die jedoch nicht lösungsmittelunabhängig ist.

In CaCo-2 (Abbildung 22) hat keine der eingesetzten Zebularine Konzentrationen einen Einfluss auf das zelluläre oder sezernierte AREG. Im Zellkulturüberstand ist nur bei der Applikation von 100 μM Zebularine eine um 40% erhöhte Konzentration von AREG zu beobachten; der annähernd gleiche Effekt tritt jedoch auch in der mitgeführten Lösungsmittelkontrolle auf.

Anhand dieser Experimente lässt sich keine allgemeine Schlussfolgerung über die Regulation von AREG durch Zebularine erreichen. Lediglich in SW-707 konnte mit der Applikation von 250 μM eine Reduktion der AREG Protein Expression um 15% erreicht werden. Anstatt der erwarteten Reduktion der AREG Expression nach Zebularine Behandlung zeigte sich stellenweise die Tendenz zur gesteigerten AREG Produktion in mehreren Zelllinien. Besonders deutlich, lösungsmittelunabhängig und offenbar linear von der Zebularine Konzentration abhängig, war dies im Zelllysat und Zellkulturüberstand von HT-29 festzustellen.

3.3.3 Wirkung des DNMT Inhibitors 5-Aza-2'-Desoxyzytidin auf AREG in kolorektalen Tumorzelllinien

Frühere Experimente in der AG Dr Jürchott hatten gezeigt, dass die Inkubation von HCT 116 Zellen mit 5-Aza-2'-Desoxyzytidin zu einer 2,5fach erhöhten Expression von AREG-mRNA im Vergleich zur Kontrolle führten. Dies stand im Widerspruch zu den Analysen der AREG-Expression auf mRNA- und Proteinebene in HCT 116.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher HCT 116 parental Zellen mit 5-Aza-2'-Desoxyzytidin inkubiert und anschließend die AREG Menge analysiert. Abbildung 23 zeigt, dass eine Inkubation mit 1 μM bzw. 10 μM 5-Aza-2'-Desoxyzytidin zu einer um 22% bzw. 30% reduzierten AREG Menge in HCT 116 parental Zellen gegenüber unbehandelten Zellen führt. In

der durchgeführten, hier nicht dargestellten Experimentwiederholung konnte mit 1 μM 5-Aza-2'-Desoxyzytidin eine um 28% reduzierte AREG Expression in HCT 116 parental Zellen erzielt werden.

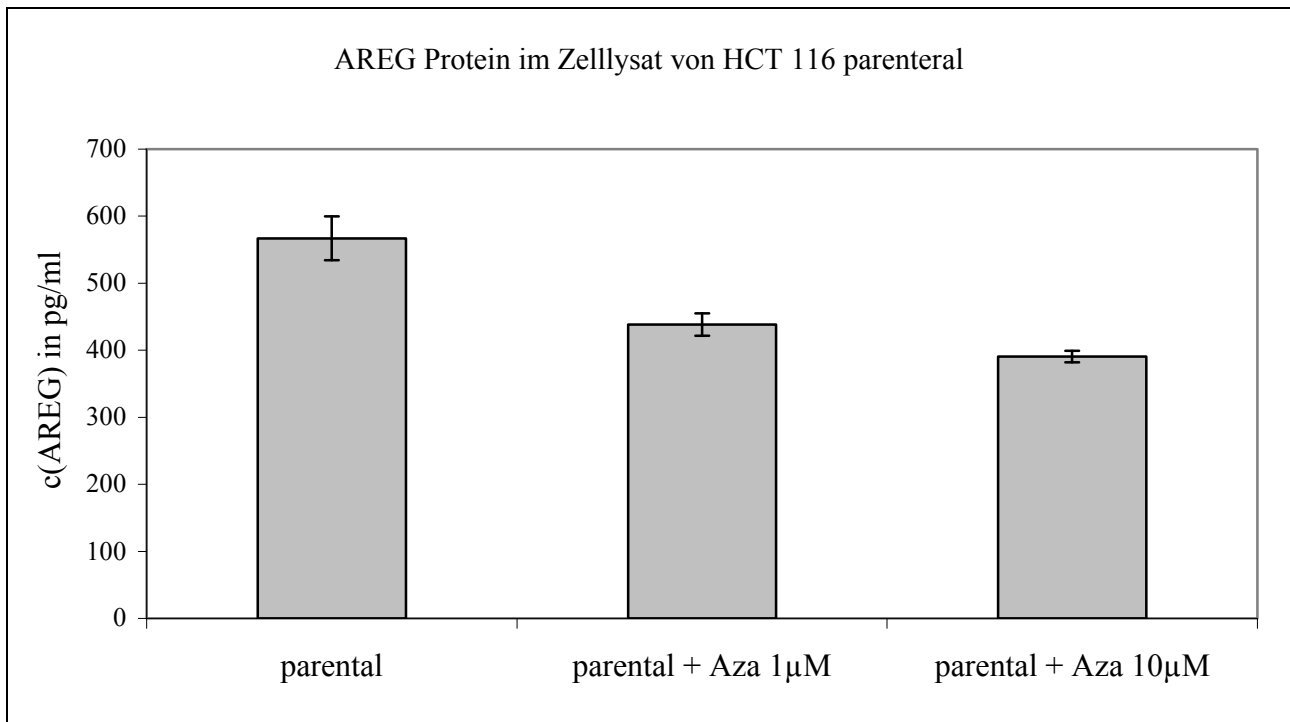


Abbildung 23: AREG Protein Expression in HCT 116 parental Zelllysaten nach Inkubation mit 5-Aza-2'-Desoxyzytidin über 96h

Abschließend lässt sich festhalten, dass in HCT 116 parental Zellen mit 1 μM 5-Aza-2'-Desoxyzytidin eine, im Gegensatz zu den vorangegangenen Experimenten, reproduzierbare Reduktion der AREG-Proteinexpression erzielt werden konnte. Dies unterstützt die Ergebnisse der AREG-Proteinexpressionsanalyse in HCT 116 parental-Derivaten mit DNMT-Deletionen und nach Zebularine-Inkubation, welche bereits im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden.

3.3.4 Einfluss der MAPK-Signalkaskade auf die Regulation von AREG in kolorektalen Tumorzelllinien

Neben dem Einfluss der DNA-Methylierung soll in dieser Arbeit auch die Rolle der MAPK-Signalkaskade auf die AREG Expression untersucht werden. In der Literatur wird beschrieben, dass Ras EGF-Liganden, wie TGF- α und AREG, positiv reguliert. So führt die Applikation eines Farnesyltransferaseinhibitors zur Suppression von AREG und TGF- α . Die genomweiten Expressionprofile der Kolonkarzinomzelllinie HCT 116 parental haben jedoch gezeigt, dass die Applikation des MEK-Inhibitors U0126 (Abbildung 24) eine um 50% erhöhte AREG mRNA Expression in HCT 116 parental Zellen und eine um 300% erhöhte AREG mRNA Expression in

HCT 116 DNMT^{3b-/-} bewirkt. Aufgrund dieser Diskrepanz sollte der Einfluss des MEK-Inhibitors U0126 auf die AREG Protein Expression untersucht werden.

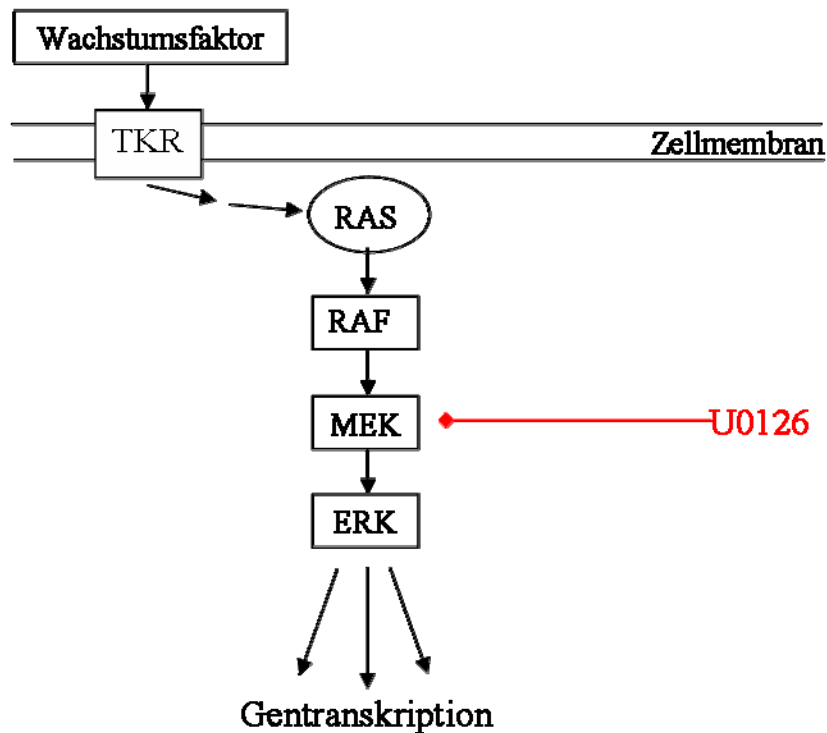


Abbildung 24: RAS/RAF/MEK Kaskade. Die RAS/RAF/MEK wird aktiviert durch Wachstumsfaktoren, die an Tyrosinkinase Rezeptoren (TKR) binden, was zur Aktivierung des Ras-Proteins führt. In der Folge davon werden RAF, MEK und ERK in einer Kaskade von Phosphorylierungen aktiviert. ERK kann viele Zielproteine phosphorylieren und die Gentranskription beeinflussen. Die RAS/RAF/MEK-Kaskade kann durch den MEK-Hemmstoff U0126 inhibiert werden.

Zunächst wurden HCT 116 parental, HCT 116 DNMT^{1-/-}, HCT 116 DNMT^{3b-/-} und HCT 116 DKO Zellen mit dem MEK-Inhibitor U0126 über 96 h inkubiert, jeweils Zellysate und Zellkulturüberstand gewonnen und der AREG Proteingehalt in den Extrakten mittels ELISA analysiert. Anschließend wurde auch die AREG Menge in den Kolonkarzinomzelllinien HT-29, SW-707, SW-948, CX-2 und CaCo-2 nach U0126-Behandlung bestimmt.

Die Inkubation mit U0126 führt in der Zelllinie HCT 116 parental (Abbildung 25 und Abbildung 26) zu einer Reduktion der AREG Expression um 25% im Zellysate und um 80% im Zellkulturüberstand. In der Zelllinie HCT 116 DNMT^{3b-/-} fällt AREG im Zellysate nicht deutlich ab, jedoch ist eine um etwa 60% reduzierte Expression des sezernierten Proteins festzustellen. In den Zellysaten von HCT 116 DNMT^{1-/-} und HCT 116 DKO ist dahingegen ein leichter Anstieg der AREG Menge nach U0126-Inkubation festzustellen. Keinen Einfluss hat U0126 auf

Ergebnisse

sezerniertes AREG in HCT 116 DNMT^{1-/-} und HCT 116 DKO, was darauf zurückzuführen ist, dass diese Zellen kaum oder kein AREG enthalten.

Der MEK-Inhibitor U0126 beeinflusst in HCT 116 parental und HCT 116 DNMT^{3b-/-} die sezernierte und die zelluläre AREG Menge negativ. So wird nach U0126-Inkubation in beiden Zelllinien das in den Zellkulturüberstand abgegebene AREG um mindestens 50% reduziert. Dabei ist der Effekt auf die sezernierte Form stärker als auf die zelluläre was möglicherweise auf einen Effekt des MAPK Signalweges auf die Regulation der AREG Spaltung schließen lässt.

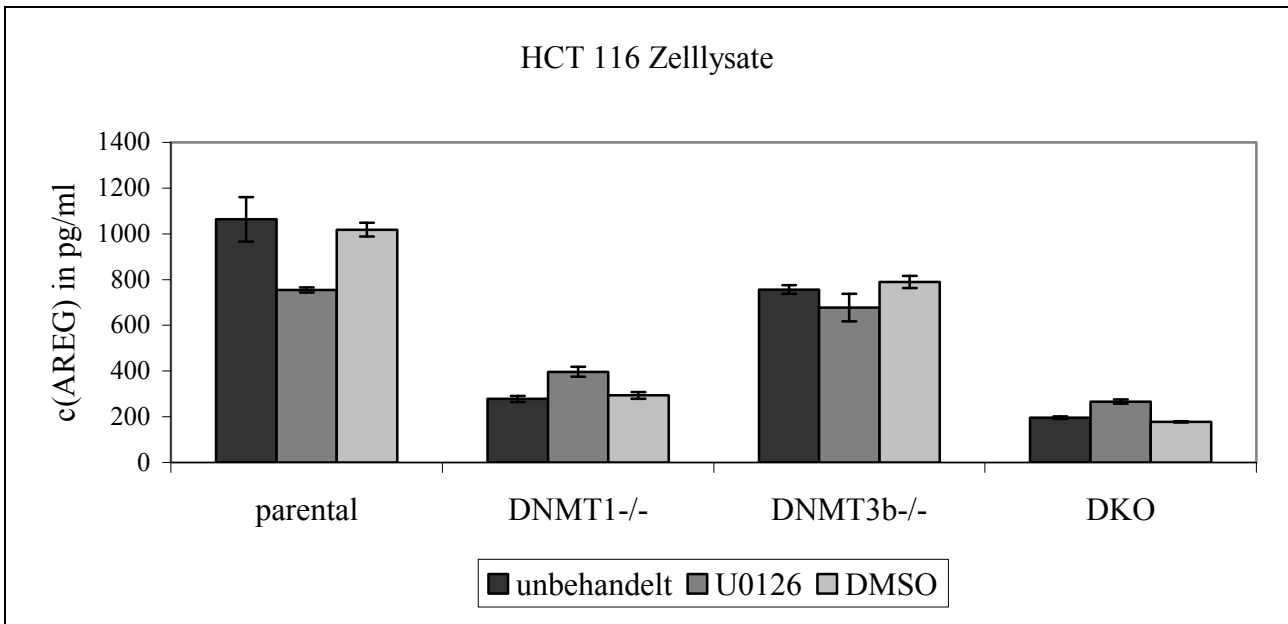


Abbildung 25: AREG Proteinexpression in Zelllysaten von HCT 116 Derivaten mit DNMT-Deletionen nach U0126-Inkubation.

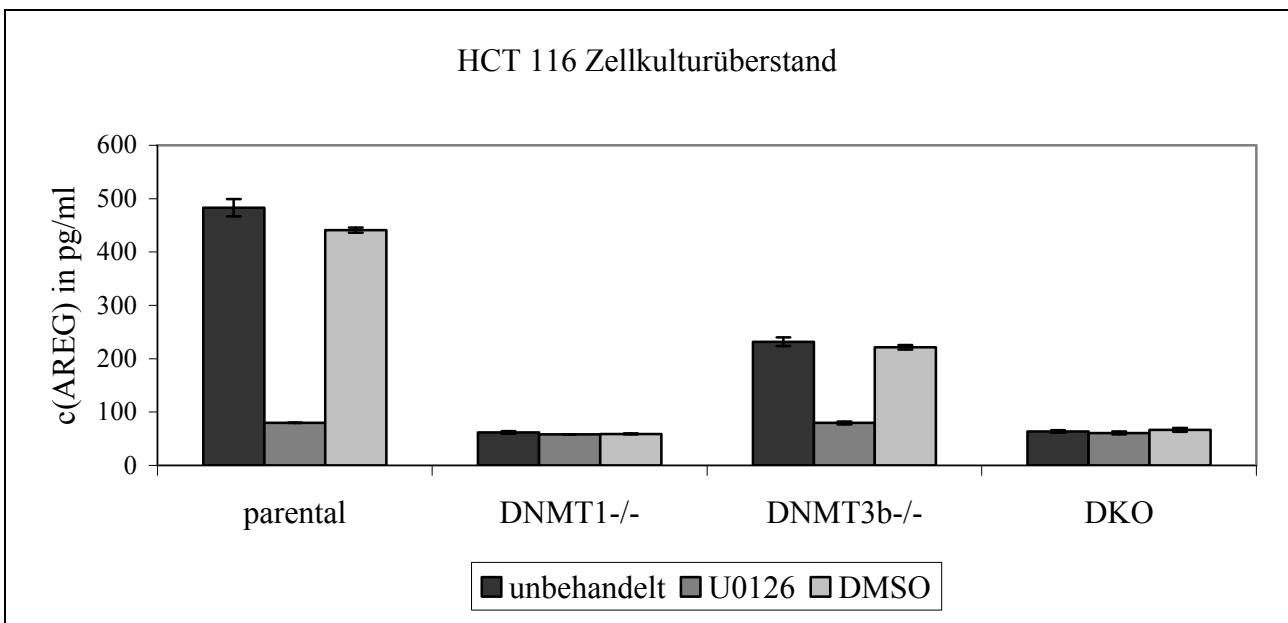


Abbildung 26: AREG Proteinexpression in Zellkulturüberständen von HCT 116 Derivaten mit DNMT-Deletionen nach U0126-Inkubation.

Die beschriebenen Veränderungen der AREG Menge in HCT 116 parental Zellen nach U0126 Applikation sieht man auch in der Abbildung 27 und der Abbildung 28. Die U0126-Inkubation in HT-29 bewirkt keine lösungsmittelunabhängige Veränderung der Expression von AREG, weder der zellulären noch der sezernierten Form. Betrachtet man dahingegen SW-707 fällt nach Applikation des MEK-Inhibitors eine ca. 40%ige Reduktion des zellulären AREGs und eine ca. 60%ige Reduktion des sezernierten AREGs auf. Eine ähnliche Veränderung der AREG Expression ist in SW-948 zu beobachten. So fällt der AREG-Gehalt in SW-948 nach U0126-Behandlung im Zelllysate um ca. 30% ab, die Lösungsmittelkontrolle zeigt hier eine 40%ige Zunahme der AREG Expression. Dennoch ist im Zellkulturüberstand von SW-948 eine deutliche, lösungsmittelunabhängige, um mindestens 80% reduzierte Expression von AREG zu verzeichnen. Die Zelllinie CX-2 zeigt keinen veränderten zellulären AREG-Gehalt nach U0126, jedoch eine um mindestens 60% geminderte AREG Expression im Zellkulturüberstand. Wird die Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 mit dem MEK-Inhibitor behandelt, so ist sowohl im Zelllysate als auch im Zellkulturüberstand ein um ca. 10% erhöhter AREG-Gehalt festzustellen.

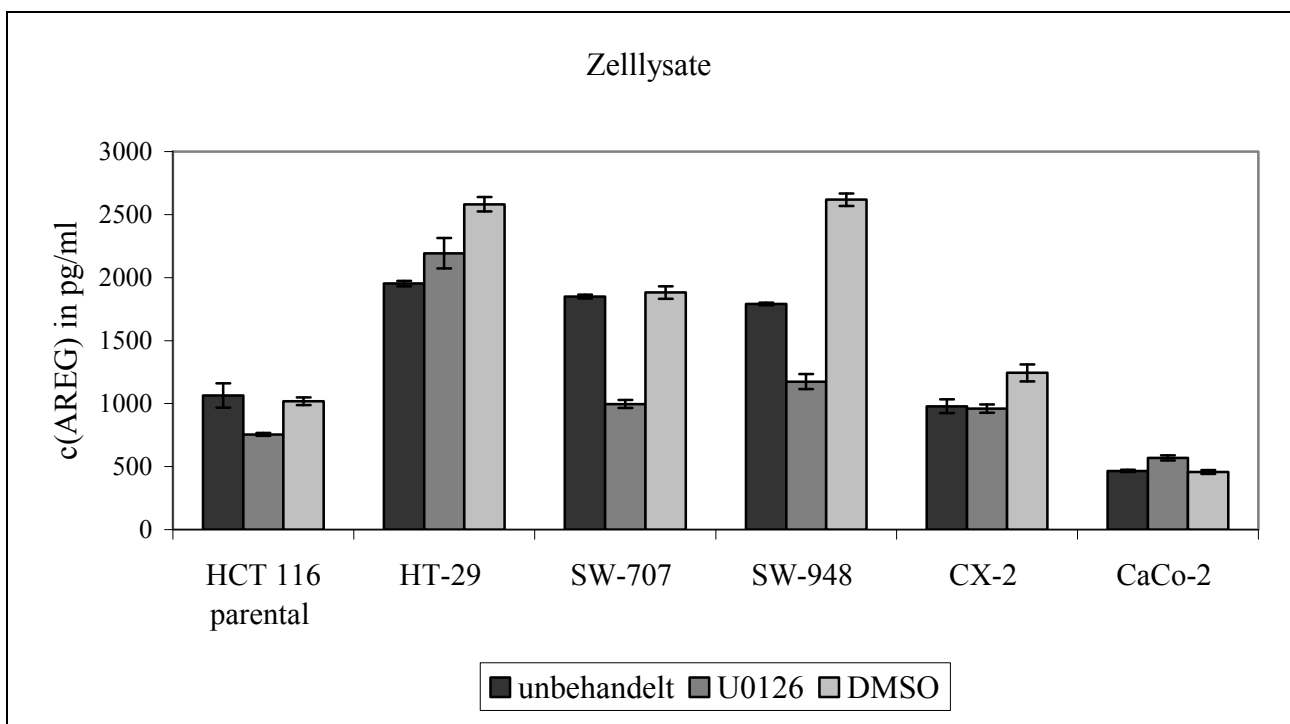


Abbildung 27: AREG Proteinexpression in Zelllysaten diverser Kolonkarzinomzelllinien nach U0126-Inkubation.

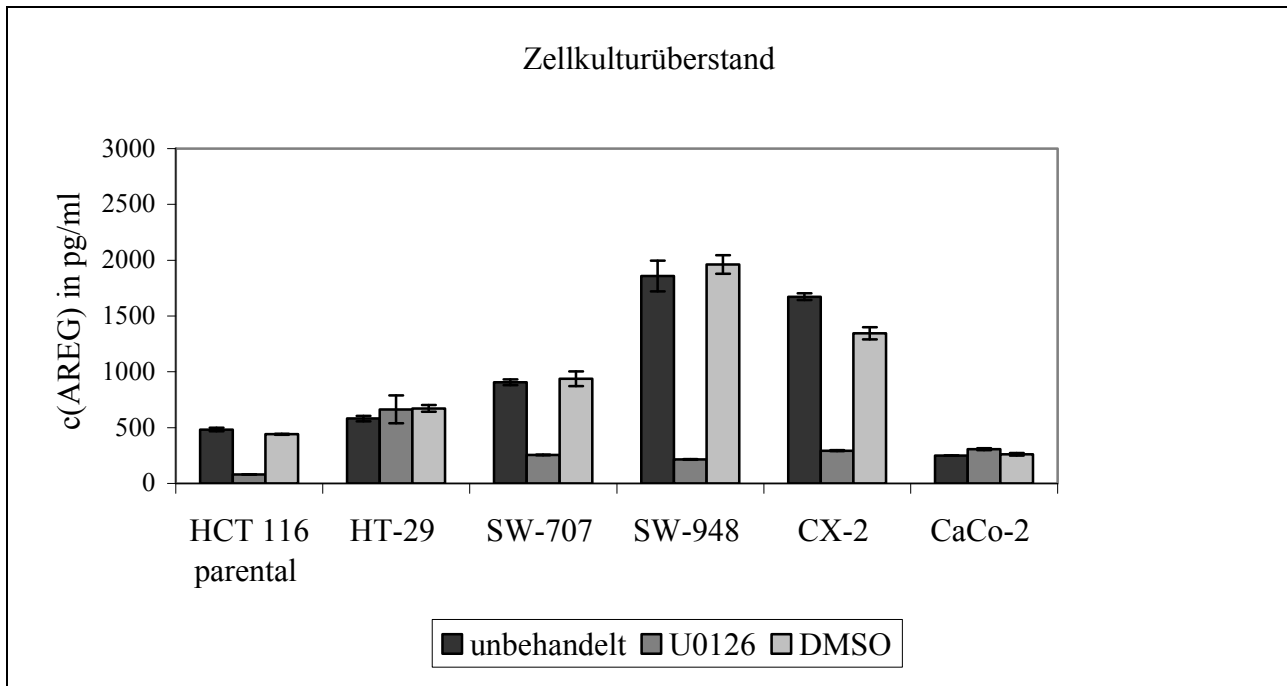


Abbildung 28: AREG Proteinexpression in Zellkulturüberständen diverser Kolonkarzinomzelllinien nach U0126-Inkubation.

Die Analyse der AREG Menge nach Applikation des MEK-Inhibitors U0126 zeigte, dass in drei (HCT 116 parental, SW-707, SW-948) der sechs untersuchten Zelllinien ein um mindestens 25% reduzierter AREG-Gehalt im Zellysate zu verzeichnen ist. Weiterhin ist in vier (HCT 116 parental, SW-707, SW-948, CX-2) der sechs untersuchten Zelllinien eine Minderung von mindestens 70% der sezernierten AREG Expression zu beobachten.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nicht nur in HCT 116 parental sondern auch in anderen Kolonkarzinomzelllinien AREG positiv durch die MAPK-Signalkaskade reguliert wird. Dies widerlegt die eingangs beschriebenen Ergebnisse der genomweiten Expressionprofile für die Zelllinie HCT 116 parental, bestätigt jedoch die Ergebnisse, die in der Literatur beschrieben wurden.

3.4 Analyse der AREG Expression in humanen Kolonkarzinomgeweben

Das Netzwerk der ErbB-Rezeptoren und seiner Liganden hat eine große Rolle für die Karzinogenese. Im Kolonkarzinom sind EGFR und HER2 überexprimiert und eine mögliche Rolle von AREG bei der Entstehung von kolorektalen Karzinomen wurde mehrfach beschrieben. Vergleicht man die AREG mRNA Expression im Kolonkarzinomgewebe mit der im Normalgewebe, wird eine gesteigerte Expression im Tumorgewebe beschrieben (Ciardiello, Kim et al. 1991).

Um die Bedeutung von AREG auf Proteinebene im Kolonkarzinom näher zu analysieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit in Zusammenarbeit mit PD Dr.med. Wilko Weichert, Institut für Pathologie, Charité, die AREG Protein Expression in 143 humanen Kolonkarzinomgeweben mittels Immunhistochemie analysiert.

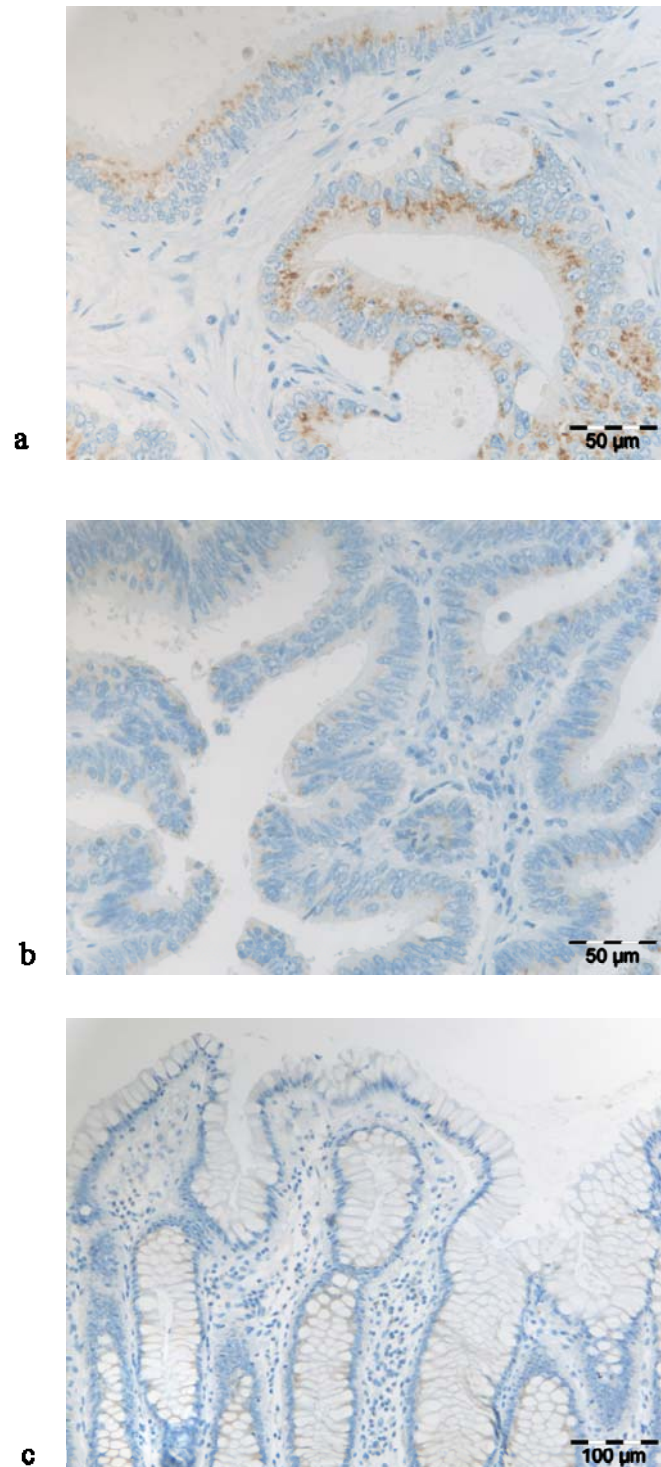


Abbildung 29: Immunhistochemische Analyse der AREG Proteinexpression im Kolongewebe. a) AREG positiver Tumor b) AREG negativer Tumor c) normale Kolonmukosa.

Ergebnisse

23% (33/143) der untersuchten Gewebe wurden als AREG positiv und 77% (110/143) als AREG negativ eingestuft. Die Abbildung 29 zeigt beispielhaft jeweils ein Bild eines AREG positiven Tumors (a) und eines AREG negativen Tumors (b). Im Vergleich dazu ist normale Kolonmukosa abgebildet (c).

Statistische Analysen (Tabelle 10) ergaben, dass die AREG Protein Expression in den untersuchten Tumorgeweben mit dem Tumor-Stadium korreliert ($p < 0,05$). Mit fortschreitender Größe enthalten die Tumoren mehr AREG Protein (Abbildung 30).

c	alle Fälle	AREG negativ	AREG positiv	p-Wert
Alle Fälle	143	110	33	
Dukes-Stadium				
A	35	33 (94,3%)	2 (5,7%)	0,342
B	55	35 (36,6%)	20 (36,4%)	
C	42	33 (78,6%)	9 (21,4%)	
D	11	9 (81,8%)	2 (18,2)	
Tumor Stadium				
T1	10	10 (100%)	0	0,018
T2	32	27 (84,4%)	5 (15,6%)	
T3	90	66 (73,3%)	24 (26,7%)	
T4	11	7 (63,6%)	4 (36,4%)	
Lymphknoten Stadium				
N0	92	70 (76,1%)	22 (23,9%)	1
N1	24	20 (83,3%)	4 (16,7%)	
N2	27	20 (74,1%)	7 (25,9%)	
Metastasen Stadium				
M0	132	101 (76,5%)	31 (23,5%)	1
M1	11	9 (81,8%)	2 (18,2%)	
Grade				
G1	5	4 (80%)	1 (20%)	0,315
G2	115	86 (74,8%)	29 (25,2%)	
G3	23	20 (87%)	3 (13%)	
Ki67				
mean		35,55	1,331	0,37
SD		11,757	2,718	

Tabelle 10: Statistische Auswertung der histologischen Charakterisierung des Tumorkollektivs

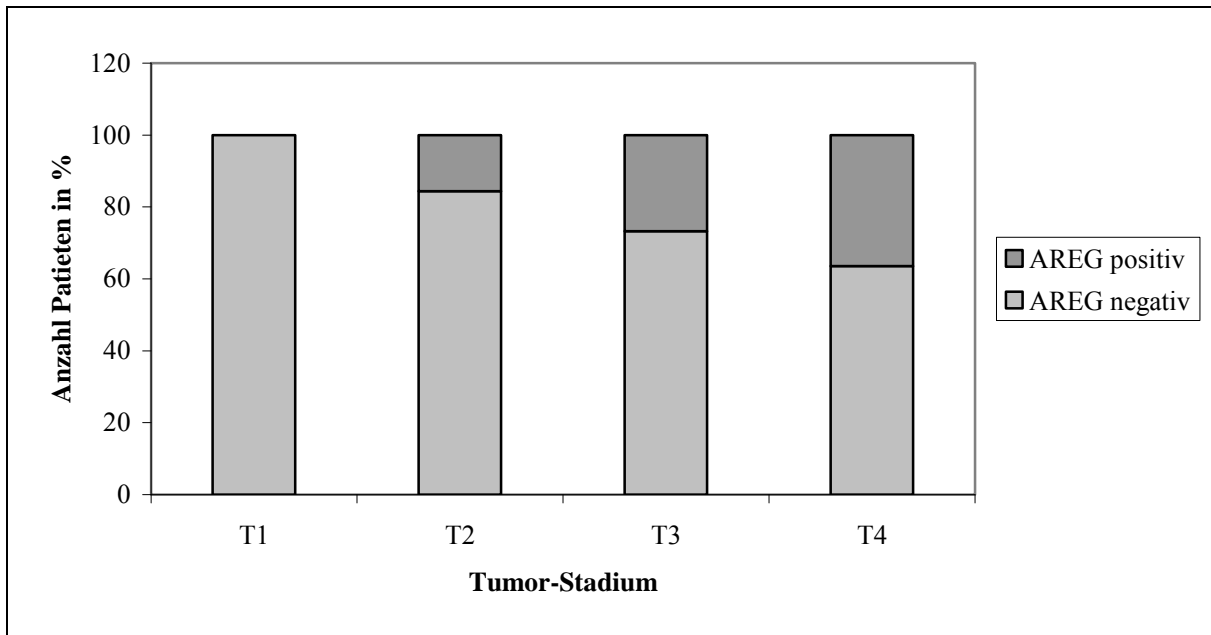


Abbildung 30: Verteilung AREG positiver und AREG negativer Tumoren entsprechend der T-Stadien.

Es wurde allerdings keine signifikante Korrelation zwischen der AREG Expression und dem DUKE-, dem Lymphknoten- bzw. Metastasen-Stadium, dem Grading und dem Proliferationsmarker Ki67 nachgewiesen. Der EGFR- Ligand AREG besitzt in kolorektalen Tumoren auf der Proteinebene keine diagnostische oder prädiktive Funktion bezüglich der genannten Parameter.

3.5 Wirkung von Gefitinib (ZD1839, Iressa®) auf das Proliferationsverhalten von HCT 116 parental und HCT DNMT^{1-/-}

Wachstumsfaktoren, wie z.B. AREG, stimulieren durch Bindung an den EGFR u.a. die Ras / MAPK-Signalkaskade und die PI3-Kinase-Signalkaskade und damit Prozesse wie Zellwachstum, Angiogenese, Metastasierung und Hemmung der Apoptose. Literaturhinweise und die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit gaben Grund zur Annahme, dass eine aktivierte MAPK-Signalkaskade u.a. die Transkription von EGFR-Liganden, so auch AREG, aktiviert. Die dadurch mögliche Entstehung von autokrinen bzw. parakrinen positiven Rückkopplungen, die das Zellwachstum unterhalten, wird so möglich und ist auch für mehrere EGFR-Liganden beschrieben (Johnson, Saeki et al. 1992; Roberts and Der 2007). In Tumoren mit aktivierenden Ras-Mutationen ist die MAPK – Signalkaskade daher oft dauerhaft aktiviert und die autokrinen Rückkopplungen von EGFR-Liganden können zum unkontrollierten Zellwachstum beitragen. Inhibitoren der EGFR-Tyrosinkinase, wie Gefitinib oder Cetuximab, werden appliziert, um den EGF - Rezeptor und nach geschaltete Kaskaden zu hemmen. In einer klinischen Studie mit Gefitinib zur Therapie des

NSCLC fiel auf, dass Patienten, die nicht auf Gefitinib ansprachen eine erhöhte Serumkonzentration von AREG hatten (Ishikawa, Daigo et al. 2005). Es bestand daher die Frage, ob eine erhöhte Konzentration von AREG am EGFR die Wirkung von Gefitinib beeinflusst und möglicherweise herabsetzt und ob ähnliche Korrelationen wie im NSCLC auch im Kolonkarzinom gelten.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die HCT 116 parental Zellen gezeigt, dass die AREG Expression durch DNA-Demethylierung reduziert werden kann. Der DNMT1-Inhibitor Zebularine supprimiert AREG in HCT 116 parental und in HCT 116 DNMT^{1-/-} ist AREG deutlich geringer exprimiert. Daher wird für die Zelllinie HCT 116 DNMT^{1-/-} eine geringere autokrine Stimulation der AREG/EGFR/MAPK-Kaskade vermutet.

Im weiteren Verlauf sollte daher untersucht werden, welche der beiden Zelllinien sensitiver auf die Applikation des Tyrosinkinaseinhibitors Gefitinib reagiert.

Dazu wurde das Proliferationsverhalten beider Zellen nach einmaliger Gefitinib-Behandlung mittels MTT-Assays gemessen. Es ist diejenige Zelllinie auf Gefitinib sensitiver, die über den Zeitraum von 96h eher bzw. bei geringeren Gefitinib-Konzentrationen vermindertes Wachstum im Vergleich zu der anderen zeigt.

Wie in Abbildung 31 zu sehen ist, bewirkt die Applikation von 1 μ M Gefitinib keine Wachstumshemmung in HCT 116 parental. Dahingegen führen 5 μ M Gefitinib nach 96 h zu einer Wachstumshemmung von 23%. Die Behandlung mit 10 μ M bzw. 20 μ M Gefitinib resultieren bereits nach 48 h in einer Proliferationshemmung und führen zum Absterben der Zellen. Die mitgeführte Lösungsmittelkontrolle zeigt keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen (Abbildung 32).

Ergebnisse

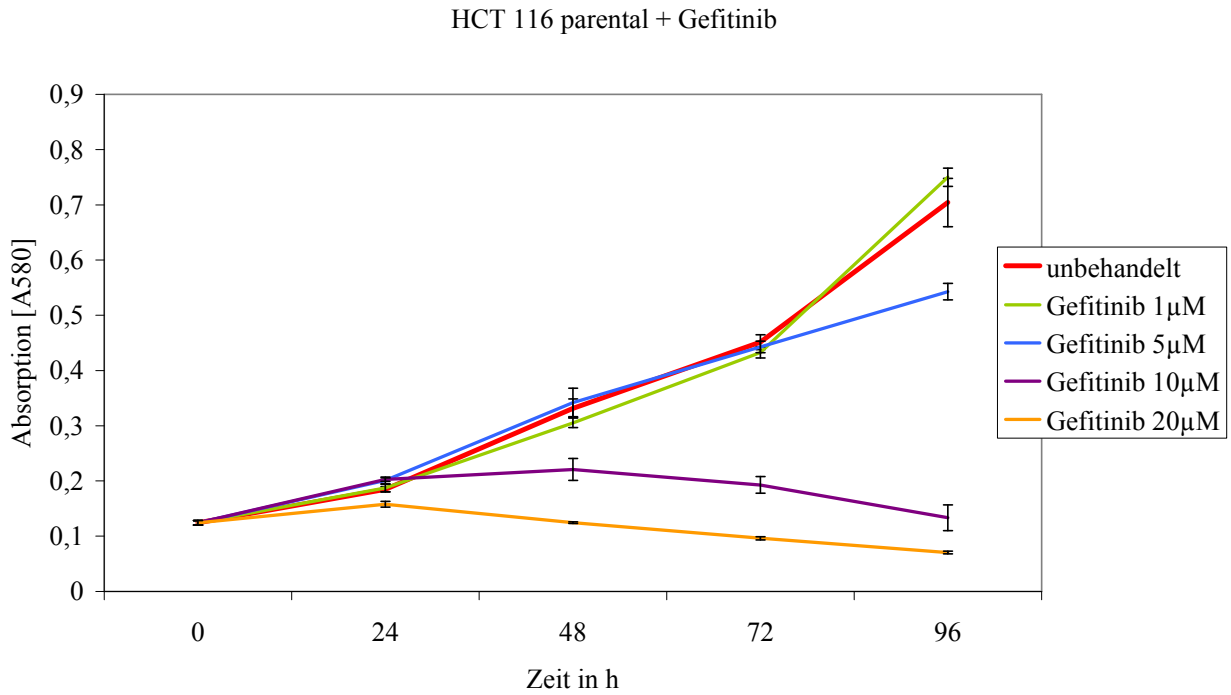


Abbildung 31: Proliferation von HCT 116 parental nach Applikation des Tyrosinkinaseinhibitors Gefitinib.

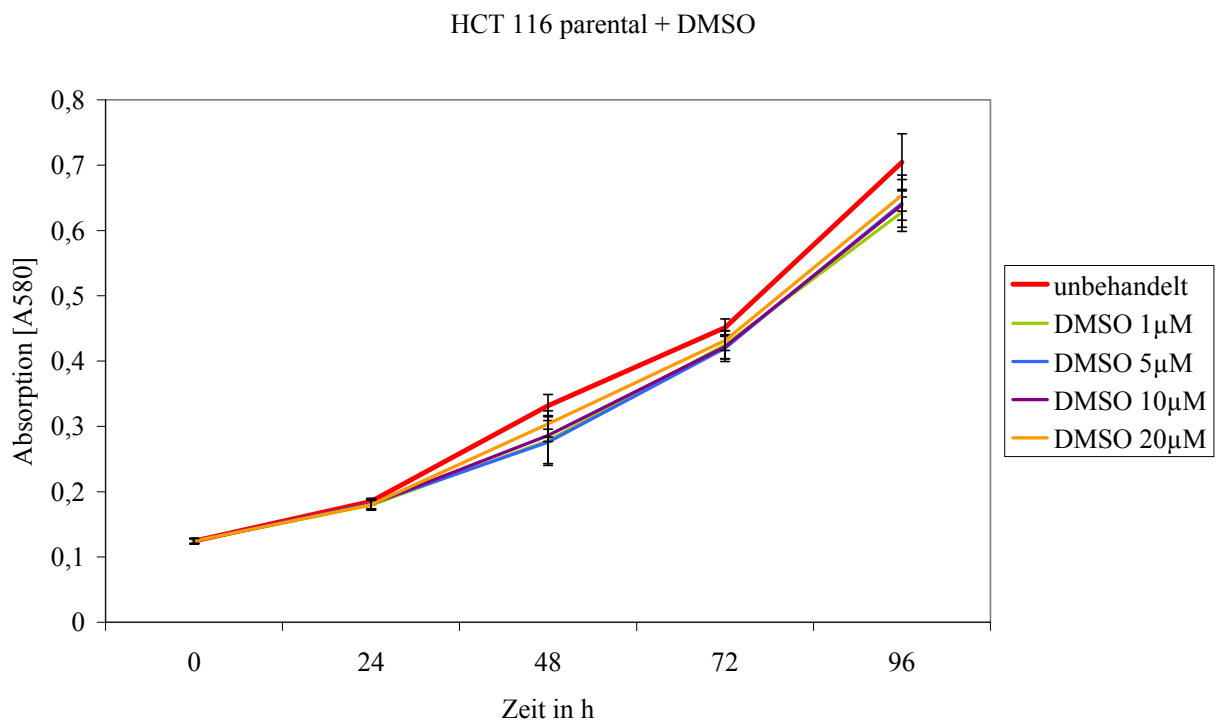


Abbildung 32: Proliferation von HCT 116 parental nach Applikation des Lösungsmittels DMSO.

Ergebnisse

Betrachtet man die Zelllinie HCT 116 DNMT^{1-/-} (Abbildung 33) wird klar, dass weder 1 μ M noch 5 μ M Gefitinib über den beobachteten Zeitraum von 96 h zu einer Wachstumshemmung führen. Werden 10 μ M Gefitinib appliziert, so ist nach 48 h eine Wachstumsreduktion um 31% und nach 96 h um 50% festzustellen. Hervorzuheben ist, dass HCT 116 DNMT^{1-/-} selbst mit 10 μ M des Inhibitors reduziert, aber kontinuierlich über den untersuchten Zeitraum proliferieren. Erst die Behandlung mit 20 μ M Gefitinib führt bei HCT 116 DNMT^{1-/-} nach 24 h zur sofortigen Proliferationshemmung bzw. zum Absterben der Zellen. Die Lösungsmittelkontrolle weist auch hier keinen Einfluss auf das Proliferationsverhalten von HCT 116 DNMT^{1-/-} auf.

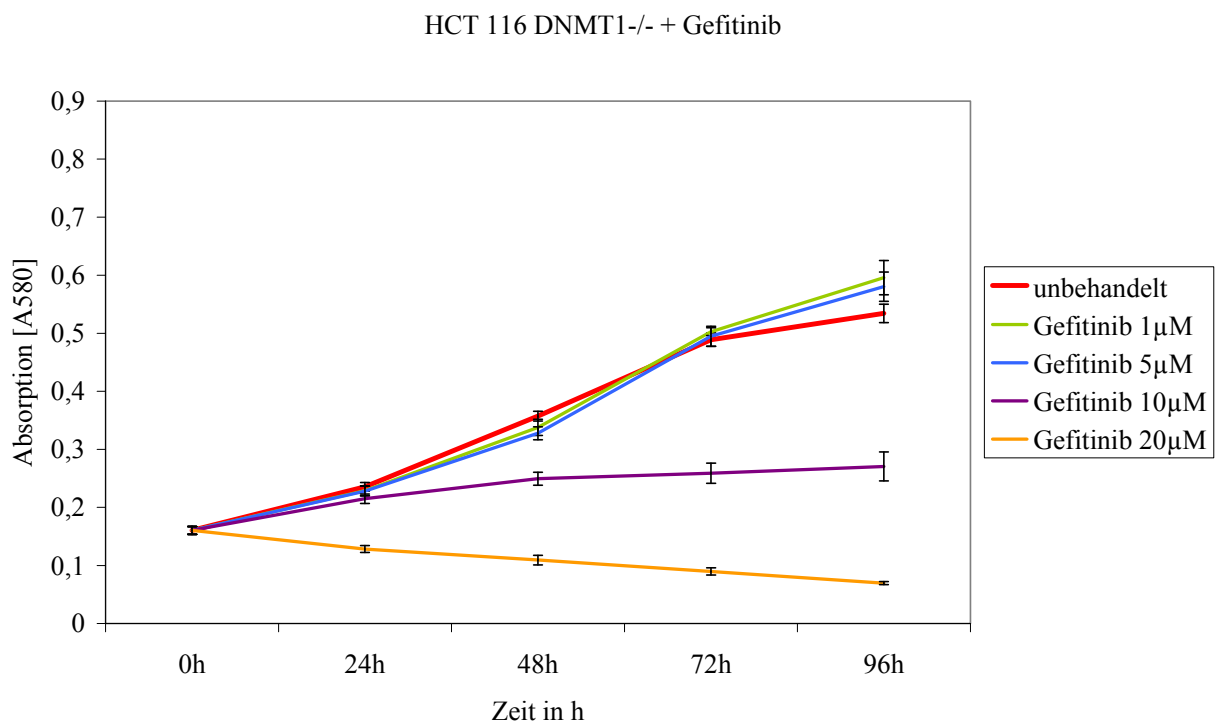


Abbildung 33: Proliferation von HCT 116 DNMT^{1-/-} nach Applikation des Tyrosinkinaseinhibitors Gefitinib.

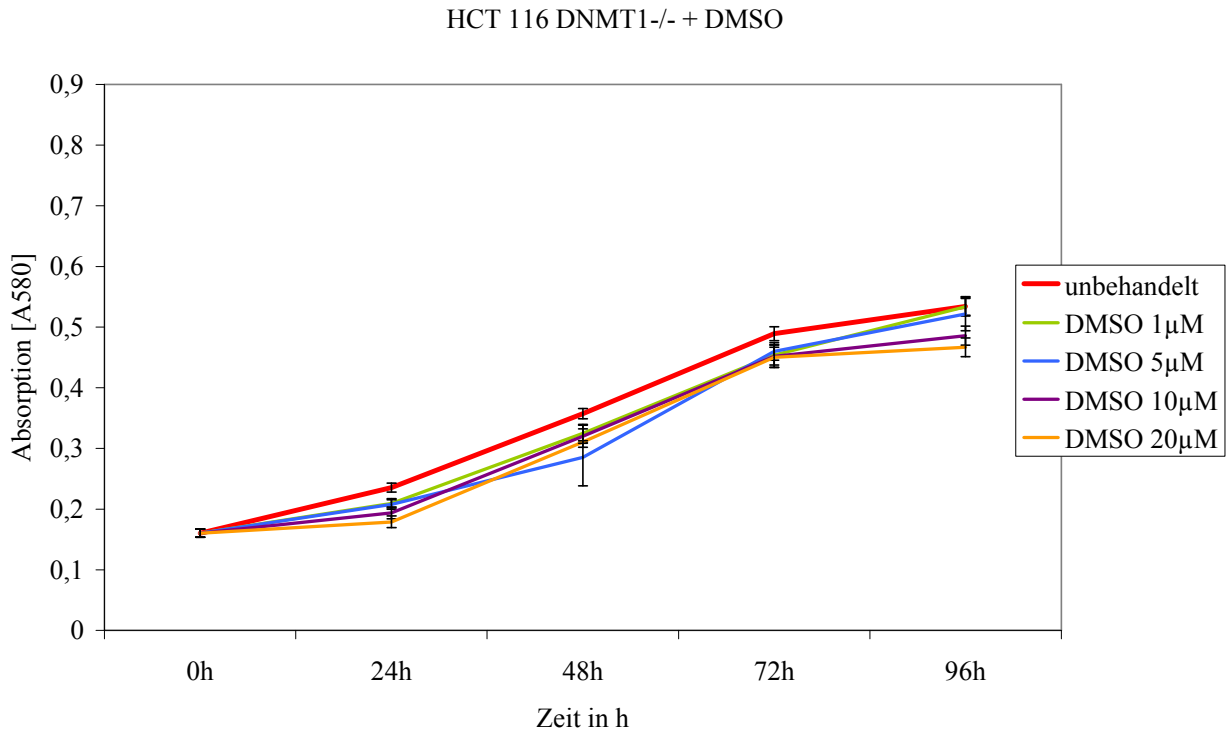


Abbildung 34: Proliferation von HCT 116 DNMT^{1-/-} nach Applikation des Lösungsmittels DMSO.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Zelllinie HCT 116 parental sensitiver auf Gefitinib reagiert als HCT 116 DNMT^{1-/-}. Die AREG Konzentration korreliert somit in kolorektalen Tumorzellen mit der Sensitivität der Zellen auf den EGFR Inhibitor Gefitinib, und damit anders als in NSCLC beschrieben.

4 Diskussion

4.1 Methodische Anmerkungen

4.1.1 Proteinnachweis für AREG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Regulation von AREG durch DNA-Methylierung und durch die MAPK-Signalkaskade zu untersuchen. Hierzu wurde ein Proteinnachweis für den EGFR-Liganden etabliert und optimiert.

Mittels Western Blot konnte AREG Protein in Zelllysaten nicht nachgewiesen werden. Möglicherweise war die Menge an intrazellulären bzw. membranständigen AREG so gering, dass die Sensitivität der Western Blots nicht ausreichte. Laut Herstellerangaben detektiert der verwendete Antikörper AREG Proteinmengen ab 2 ng pro Tasche. Die aus Literaturrecherchen ermittelten AREG Konzentrationen in Zellen lagen jedoch zumeist im pg-Bereich. Lediglich in Zellkulturmodellen, die AREG konstitutiv verstärkt exprimierten, konnte der EGFR Ligand durch Western Blot nachgewiesen werden (Billings, Southall et al. 2003). Aus diesen Gründen war der Western Blot als Nachweismethode für das AREG Protein in HCT 116 ungeeignet.

In später durchgeführten ELISAs wurde eine wesentlich höhere AREG Menge detektiert. Zu Beginn lagen die AREG Mengen für HCT 116 in Bereichen zwischen 500 und 1500 pg/ml. Im späteren Verlauf der Experimente waren allerdings AREG Konzentrationen von 2500 pg/ml zu verzeichnen. Diese Diskrepanz der gemessenen AREG Konzentrationen kann darin begründet sein, dass die Zellen zu lange in Kultur waren und mehr AREG produziert haben. Weiterhin könnte ein Wechsel der Serumcharge hierfür verantwortlich gewesen sein. Ursächlich käme auch ein methodischer Fehler in der Auswertung in Betracht. Durch Anne Sophie Kelm wurde eine Linearität des Assays für die Standardkurve bis 1000 pg festgestellt. Eine Testung der Standardkurve auf Linearität über 1000 pg hinaus liegt nicht vor. Sollte eine Linearität der Standardkurve über 1000 pg nicht bestehen, wären die Daten nur eingeschränkt zu verwerten. Bei Wiederholung der Experimente sollte eine Testung der Standardkurve auch über 1000 pg erfolgen.

4.1.2 Einflüsse des Lösungsmittels DMSO

Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurden der DNMT1-Inhibitor Zebularine und der EGFR Tyrosinkinase-Inhibitor Gefitinib verwendet. Die Arbeit mit beiden Hemmstoffen

erforderte die Optimierung und Etablierung der verwendeten Lösungsmittel, Konzentrationen und Inkubationszeiten. Als Lösungsmittel wurde Dimethyl Sulfoxid (DMSO) in der Optimierung und während der Durchführung der Versuche eingesetzt.

Bei der Arbeit mit Zebularine fiel wiederholt ein Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die AREG Expression auf. So konnte in den ersten drei von insgesamt vier Optimierungsexperimenten kein Zebularine-spezifischer und DMSO-unabhängiger Effekt auf die AREG Expression registriert werden. Es resultierte sogar eine signifikante Reduktion der Expression des EGFR Liganden durch DMSO. Offensichtlich bestand ein Einfluss des verwendeten Agens auf die Expression von AREG.

Bereits 1971 wurden erstmals Effekte von DMSO auf die Zellphysiologie beschrieben. Das Agens induzierte Wachstumshemmung und Zelldifferenzierung in einer Leukämie-Zelllinie (murine erythroleukemia cells) (Friend, Scher et al. 1971). Für die beobachteten Effekte wurde die Polarität des Moleküls verantwortlich gemacht und war damit Grundlage für die Entwicklung weiterer Substanzen. Zahlreiche Versuche und mehrfache chemische Modifikation der verwendeten Agenzien führten zur Entwicklung von SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid; Vorinostat) im Jahr 1996. Die biologischen Effekte, wie Hemmung von Zellwachstum und eine Induktion der Apoptose, wurden schließlich auf eine Inhibition der Histon Deazetylasen (HDAC) zurückgeführt (Marks and Breslow 2007).

Die Tatsache, dass ausgehend von DMSO der Histon Deazetylase Inhibitors (HDI) Vorinostat entwickelt wurde, implizierte, dass auch DMSO eine HDI ähnliche Funktion ausüben kann.

Dies wirft für die durchgeführten Experimente zwei neue Fragestellungen auf.

Erstens lässt es vermuten, dass die Expression von AREG durch Modifikation von Histonen beeinflusst werden kann. Histone bilden mit DNA-Abschnitten von 146 Basenpaaren das Nukleosom, wobei die Modifizierung der Histone durch Azetylierung und Deazytylierung die Konfiguration des Nukleosoms ändern kann. Nicht-azetylierte Histone sind positiv geladen und bilden mit der negativ geladenen DNA eine kompakte Chromatinstruktur, die eine Transkription von Genen verhindert. Azetylierte Histone hingegen ermöglichen eine offene Chromatinstruktur an der Gentranskription möglich ist. Die Deazetylierung von Histonen erfolgt durch Histon-Deacetylasen und diese Enzyme können durch HDIs gehemmt werden. Die Histon-Deacetylasen üben ihre Funktion u.a. aus, indem sie sich an Proteine mit einer methyl-binding Domäne (MBD) anlagern. Die MBD-Proteine erkennen methylierte DNA und es ist die Funktion dieser MBD-Proteine spezifische Repressorkomplexe wie beispielsweise die Histon-Deacetylasen zu rekrutieren. Mittels der MBD-Proteine besteht also eine Verbindung zwischen der Histonmodifizierung und der DNA-Methylierung. Eine weitere

Verbindung dieser beiden epigenetischen Mechanismen besteht auch darin, dass nicht die DNA-Methylierung Voraussetzung für Histon-Azetylierung ist sondern auch umgekehrt: erst an azetylierten Histonen erfolgt die Methylierung von DNA. Beide Prozesse sind für die Genregulation von enormer Bedeutung, wobei die Abfolge beider Mechanismen noch etwas unklar ist; sie sich wahrscheinlich aber gegenseitig bedingen (Fuks 2005).

Interessant wäre es zu prüfen, ob die AREG Expression auch über den Mechanismus der Histonmodifikation reguliert wird. Hierzu könnte man den Einfluss von HDIs, beispielsweise TSA, auf die Expression von AREG in weiteren Experimenten untersuchen.

Zweitens stellte der wachstumshemmende Effekt von DMSO die durchgeführten Proliferationsanalysen der Kolonkarzinomzelllinie HCT 116 mit dem TKI Gefitinib in Frage. Der wachstumshemmende Effekt von DMSO auf die MELC Zellen wurde jedoch bei einer Konzentration von 280 mM beschrieben (Friend, Scher et al. 1971). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen wesentlich geringere DMSO Konzentration von 1-20 μM = 0,001-0,02 mM zum Einsatz. Das Wachstum der nur mit DMSO behandelten Zellen war minimal langsamer als das der unbehandelten Zellen; jedoch kam es zu keiner signifikanten Abweichung. Die beobachtete Wachstumsinhibition ist somit alleine auf den TKI Gefitinib zurückzuführen.

4.1.3 EGFR TKI Gefitinib

Ein weiteres Ziel der Arbeit war es, das Wachstumsverhalten der Zelllinie HCT 116 nach Applikation des Tyrosinkinase Inhibitors (TKI) Gefitinib unter der Verwendung eines MTT Wachstumsassay zu untersuchen.

Der EGFR TKI Gefitinib bindet kompetitiv an die ATP-Bindungsstelle des EGFR und hemmt somit die Phosphorylierung des Rezeptors und die nachfolgende Signaltransduktion.

Hierbei bestand grundsätzlich die Frage, ob die Zelllinie HCT 116 sensibel für den TKI Gefitinib war. Die verwendete Zelllinie HCT 116 trägt eine KRAS-Mutation. Eine solche Mutation wurde mit einem Misserfolg von Therapiestrategien gegen den EGFR (TKI und mAb) in Lungen- und Kolontumoren assoziiert (Pao, Wang et al. 2005; Lievre, Bachet et al. 2006).

Dennoch zeigten andere Arbeitsgruppen, dass das Proliferationsverhalten von HCT 116 durch die Applikation mit Gefitinib durchaus gehemmt werden kann (Mantha, Hanson et al. 2005; Yang, Qu et al. 2005).

Die im Rahmen dieser Arbeit eingesetzten Gefitinib Konzentrationen von 1-20 μM , die zu einer Wachstumshemmung führten, lagen im gleichen Bereich wie die von Mantha, Hanson et al. 2005 verwendeten Konzentrationen von 10 $\mu\text{mol/l}$.

Bei weiteren Analysen in der AG Molekulare Tumorpathologie wurde der DNA-Gehalt in HCT 116 parental Zellen nach der Applikation von Gefitinib in Konzentrationen von 50, 200 und 1000nM untersucht. Hierbei wurde beobachtet, dass die Zellen vermehrt der G0/G1-Phase und vermindert der G2/M-Phase zugeordnet werden konnten (persönliche Mitteilung PD Dr. rer. nat. Christine Sers). Dies deutete darauf hin, dass eine Hemmung der Zellteilung erfolgte und ließ schlussfolgern, dass Gefitinib auch in geringeren Konzentrationen das Wachstum der Zelllinie HCT 116 hemmen kann.

Im Gegensatz dazu stand allerdings die Beobachtung einer anderen Gruppe, die bei der Durchführung eines kolorimetrischen Wachstumssassays keine Wachstumsinhibition durch die Applikation von 200 nM und 500 nM Gefitinib der Zelllinie HCT 116 zeigen konnten (Cunningham, Thomas et al. 2006).

Die beobachteten Unterschiede könnten in der Zelllinie HCT 116 liegen. Es gibt zwei Typen von HCT Zellen und diese zeigen ein unterschiedliches Wachstumsverhalten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die von B.Vogelstein modifizierten HCT Zellen verwendet. Weiterhin gibt es die von der ATCC bereitgestellten HCT Zellen. Beide Zellen unterscheiden sich in verschiedenen Aspekten.

Möglicherweise war dieser Unterschied durch die verwendeten Nachweismethoden zu erklären. Der Nachweis von Änderungen auf der Ebene der mRNA Expression war eventuell sensitiver als ein kolorimetrischer Wachstumsassay.

Festzuhalten ist abschließend, dass das Proliferationsverhalten der Zelllinie HCT 116 durch den TKI Gefitinib durchaus gehemmt werden kann. Es bleibt dennoch hinzuzufügen, dass andere kolorektalen Zelllinien sensitiver auf den Inhibitor reagieren (Yang, Qu et al. 2005).

4.2 AREG als potentielles Proto-Onkogen im Kolon

4.2.1 AREG im Kolonkarzinom

AREG ist ein EGFR Ligand und hat als Wachstumsfaktor eine zentrale Rolle bei physiologischen und pathologischen Wachstumsprozessen.

Eine vermehrte Expression des Proteins in verschiedenen Tumorgeweben und ein funktioneller Beitrag von AREG zur Tumorgenese wurden mehrfach beschrieben.

Im Zusammenhang mit dem Kolonkarzinom wurde AREG erstmals 1991 von Ciardello et al erwähnt. Eine erhöhte Expression der AREG mRNA in kolorektalen Tumoren gegenüber normaler Mukosa des Kolons wurde wiederholt geschildert (Ciardiello, Kim et al. 1991; Saeki, Salomon et al. 1995; Nishimura, Andoh et al. 2008).

Auch scheint der EGFR Ligand einen funktionellen Anteil in der Pathogenese des Kolonkarzinoms zu haben, da eine Entfernung von AREG aus dem Medium zur Kultivierung von GEO Zellen in einer 40%igen Wachstumsinhibition resultierte (Johnson, Saeki et al. 1992). Weiterhin führte eine Inhibition von AREG durch kurze Oligodeoxynukleotide zu einer Hemmung des ankerunabhängigen Wachstums in GEO Zellen von bis zu 80% (Normanno, Selvam et al. 1995). Mehrfach wird für den funktionellen Beitrag von EGFR Liganden, so auch für AREG, für die Pathogenese von Tumoren die Wirkung über auto- und parakrine Schleifen beschrieben. Hierunter versteht man eine Wirkung des in einer Zelle produzierten EGFR Liganden auf die Zelle selbst.

Die pathogene Bedeutung von AREG in kolorektalen Tumoren wird durch Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit unterstützt, da die Expression von AREG in Gewebeproben von kolorektalen Tumoren signifikant mit dem Tumorstadium des TNM Systems korrelierte ($p=0,018$). Eine Korrelation der AREG Expression und dem Tumorstadium konnte in einer Analyse von Yamada et al 2008 nicht gezeigt werden. Auffallend ist jedoch, dass bei der Auswertung von Yamada et al die Tumorstadien T1-T3 gegen T4 verglichen wurden. In der gleichen Studie wird die pathogene Rolle von AREG in kolorektalen Tumoren durch eine Korrelation zwischen der AREG Expression und der Existenz von Lebermetastasen unterstrichen. Im Rahmen der eigenen Arbeit konnte jedoch keine Korrelation zwischen der AREG Expression und dem Metastasenstatus des TNM-Systems hergestellt werden. Bedingt sein könnte dies dadurch, dass in der eigenen Arbeit der Metastasenstatus nicht weiter bezüglich ihrem Ursprung spezifiziert wurde.

4.2.2 Regulation von AREG durch DNA-Methylierung

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte sich, dass in der Kolonadenokarzinomzelllinie HCT 116 der EGFR Ligand AREG durch DNA-Methylierung reguliert wird. Hierbei wurde jedoch nicht die übliche Inaktivierung durch DNA-Methylierung nachgewiesen, sondern eine Suppression des Gens durch Demethylierung.

Eine hypomethylierungs-assoziierte Inaktivierung und hypermethylierungs-assoziierte Aktivierung von Genen ist ungewöhnlich; jedoch für einzelne Gene bereits beschrieben.

In Genexpressionsprofilanalysen der Ratten Fibroblastenzelllinie 208F zeigte sich, dass eine verstärkte Expression der DNMT1 neben einer Hemmung der Genaktivität auch zu einer Steigerung der Genaktivität führte – in DNMT1-transfomierten Zellen wurden ca. 250 Genen vermindert und ca. 350 Gene vermehrt exprimiert (Ordway, Williams et al. 2004).

Zunehmend wird für mehrere Gene von einer Aktivierung durch DNA-Methylierung berichtet (Tabelle 11). So beispielsweise für IL8 (interleukin 8), EGR2 (early growth response 2), HLA-DRA, FGF18 (fibroblast growth factor 18) und MMP11 (matrix metalloproteinase 11).

Gen		Funktion des Proteins	Tumorentität	Referenz
IL8	Interleukin 8	Chemokin	Brustkarzinomzelllinien	(De Larco, Wuertz et al. 2003)
EGR2	Early growth response 2	Transkriptionsfaktor	Multiple Tumoren	(Unoki and Nakamura 2003)
HLA-DRA	Human leukocyte antigene DR alpha	Immunabwehr		(Niesen, Osborne et al. 2005)
FGF18	Fibroblast growth factor 18	Wachstumsfaktor	Blasenkarzinomzelllinien	(Veerla, Panagopoulos et al. 2008)
MMP 11	Matrix metalloproteinase 11	Proteolyse des alpha1-Proteinase Inhibitors	Blasenkarzinomzelllinien	(Veerla, Panagopoulos et al. 2008)

Tabelle 11: Übersicht über diverse Gene für die eine Aktivierung durch DNA-Methylierung beschrieben wurde.

Für den EGFR Liganden AREG konnten die eigenen Ergebnisse durch weitere Arbeiten von Anne Sophie Kelm in der AG Molekulare Tumorpathologie bestätigt werden. Zudem zeigte sie, dass zusätzlich zu AREG auch die EGFR Liganden Betacellulin (BTC) und Epiregulin (EREG) dem gleichen Regulationsmechanismus durch DNA-Methylierung in HCT 116 unterliegen.

Auch in der Literatur lassen sich Angaben finden, die die hypomethylierungs-assoziierte Inaktivierung von AREG ebenfalls beschreiben. In HCT 116 Zellen wurde für AREG eine verminderte mRNA Expression nach genetischer Hemmung der DNMTs beschrieben (Gius, Cui et al. 2004).

Bei den durchgeführten Experimenten konnte durch genetische (homozygote Deletion der DNMT1) und chemische Inhibition (Zebularine, 5-Aza-2'-Desoxyzytidin) der DNA-Methylierung eine verminderte AREG Expression in HCT 116 erzielt werden.

Widersprüchlich hierzu ist die Beobachtung in Gewebeproben und Zelllinien von Magenkarzinomen, da eine Behandlung mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-2'-Desoxyzytidin zu einer gesteigerten Expression von AREG führte (Satoshi, Yoshimi et al.

2006). Der Unterschied zu den eigenen Ergebnissen kann in der differenten Tumorentität, Magenkarzinom versus Kolonkarzinom, liegen.

Auch in der AG Karsten Jürchott wurde für die Zelllinie HCT 116 eine vermehrte Expression von AREG nach einer Inkubation mit 5-Aza-2'-Desoxyzytidin nachgewiesen. Ursächlich für diese beobachtete Diskrepanz zu den eigenen Resultaten könnten die bereits o.g. unterschiedlichen HCT 116 Zelllinien sein. Es ist bekannt, dass in der AG Karsten Jürchott die Zellen der ATCC verwendet wurden, wohingegen in den eigenen Experimenten die Zellen von Vogelstein zum Einsatz kamen.

Um den Einfluss der DNA-Methylierung auf das AREG Gen weiter zu untersuchen sollte neben einer Gen-Inaktivierung durch DNA-Demethylierung auch eine Gen-Aktivierung durch DNA-Methylierung nachgewiesen werden. Um dies zu zeigen könnte die DNMT1 in der Zelllinie verstärkt exprimiert und anschließend die AREG Expression analysiert werden.

Mechanismus der Genaktivierung durch DNA Methylierung

Ergebnis der vorliegenden Arbeit war es, dass das AREG-Gen durch DNA-Methylierung in HCT 116 aktiviert wird. Fraglich und interessant sind die Mechanismen, die für eine Genaktivierung durch DNA-Methylierung verantwortlich sind. Für eine direkte Regulation von Genen durch DNA-Methylierung ist es zunächst Voraussetzung, dass CpG-Inseln existieren. Das AREG Gen enthält im Promotor-Bereich unmethylierte CpG-Inseln und im intragenetischen Bereich methylierte CPG-Inseln (persönliche Mitteilung PD Dr. rer. nat. C. Sers), womit das Gen über DNA-Methylierung reguliert werden kann.

Um den exakten Mechanismus der Genaktivierung durch DNA-Methylierung zu erklären, sind verschiedene Ansätze auf der Ebene der Transkription denkbar. Hierbei kann eine DNA-Methylierung im Promotorbereich oder aber im codierenden Bereich (gene-body methylation) der Gene die Transkription beeinflussen.

Im Promotorbereich binden Chromatin Isolator Proteine bevorzugt an unmethylierte GC-reiche Sequenzen im 5'-Bereich von Genen und können so die Transkription von Genen stimulieren oder hemmen. CTCF (CCCTC-binding factor zinc finger protein) ist ein solches Chromatin Isolator Protein mit multiplen Funktionen; u.a. wird es als hemmender Transkriptionsfaktor beschrieben (Bell and Felsenfeld 2000). Nach der Bindung an die

spezifische DNA-Sequenz bewirkt CTCF eine Isolierung von Enhancer und Promotor und unterbindet damit den Beginn der Transkription von Genen.

Interessanterweise wurde im Promotorbereich des AREG Gens in einer CpG Insel im AREG Promotor eine CTCF Bindungsstelle identifiziert (Gius, Cui et al. 2004). Das Isolator Protein CTCF könnte die hypomethylierungs-assoziierte Inaktivierung von AREG folglich erklären. Um dies näher zu untersuchen, müsste man die Bindung von CTCF an den unmethylierten AREG Promotor nachweisen. Zusätzlich könnte man versuchen in HCT 116 Zellen eine Hemmung von CTCF, beispielsweise durch siRNA, zu erzielen und anschließend die AREG Expression analysieren.

Ursächlich für eine Gen-Aktivierung durch DNA-Methylierung könnten auch Transkriptionsfaktoren sein, die bevorzugt an methylierte DNA binden. Dies wurde für die Aktivierung des methylierten Promotors des HLA-DRA Gens durch den Transkriptionsfaktor RFX nachgewiesen (Niesen, Osborne et al. 2005).

Zur Überprüfung, ob auch das AREG Gen einer solchen Regulation unterliegen könnte, müsste nach einer entsprechenden RFX Bindungsstelle im AREG Promoter gesucht werden.

Neben einer Methylierung im Promotorbereich kann auch eine Methylierung im codierenden Genbereich (gene-body methylation) zu einer veränderten Genexpression beitragen. So wurde in verschiedenen Genen eine veränderte Methylierung von CpG Inseln oder Sequenzen außerhalb des Promoters und dafür im eigentlichen codierenden Genabschnitt für eine Gen-Aktivierung verantwortlich gemacht. Die verstärkte Expression von IL-8 in metastatischen Brustkarzinomzelllinien beispielsweise wurde mit der Existenz von 2 methylierten CpG Sequenzen im IL-8-Gen assoziiert (De Larco, Wuertz et al. 2003). Weiterhin wurde die Expression von EGR2 in multiplen Tumorzelllinien mit einer methylierten CpG Insel im Intron 1 in Zusammenhang gebracht (Unoki and Nakamura 2003).

Zusätzlich zu einem direkten Einfluss der DNA-Methylierung auf die Gentranskription besteht auch die Möglichkeit, dass die Methylierung eine indirekte Wirkung auf die Genexpression ausübt indem Transkriptionsfaktoren selber durch Methylierung reguliert werden. Die Existenz eines transkriptionellen Repressors, der durch Methylierung gehemmt wird und im unmethylierten Zustand aktiv ist, könnte die hypomethylierungs-assoziierte Inaktivierung von AREG erklären. Der Promotorbereich von AREG weist Bindungsstellen für cAMP, die Transkriptionsfaktoren TCF/LEF, SP1 (specific protein 1) und WT-1 (Wilms

Tumor Suppressor) auf. Ebenso wurden im Promotor ein SRE (serum responsive element) gefunden.

cAMP und WT-1 wurden als transkriptionelle Aktivatoren für AREG identifiziert (Lee, Huang et al. 1999; Johansson, Yndestad et al. 2004) und können die hypomethylierungs-assoziierte Inaktivierung von AREG nicht erklären.

Der Transkriptionsfaktor SP1 kann als transkriptioneller Aktivator oder Repressor fungieren (Wierstra 2008). Welchen Einfluss SP1 auf die AREG Expression hat, ist jedoch nicht geklärt.

Der Transkriptionsfaktor TCF/LEF bindet beta-Catenin und kann dann bekanntlich die Expression von Genen stimulieren (Nelson and Nusse 2004). Interessanterweise gibt es für beta-Catenin Hinweise auf methylierungs-bedingte Stilllegung des Gens. So wurde für metastasierte gastrointestinale Tumoren eine reduzierte beta-Catenin Expression festgestellt, welche mit einer Inaktivierung des Gens für beta-Catenin durch DNA-Methylierung assoziiert (Ebert, Yu et al. 2003; Zhang, Rumilla et al. 2006) wird. Allerdings ist beta-Catenin in kolorektalen Karzinomen in mehr als 80% hyperaktiv (Saifo, Rempinski et al. 2010) und kann eine hypomethylierungs-assoziierte Inaktivierung nicht erklären.

Abschließend sei gesagt, dass Erklärungsansätze zur Genregulation durch DNA-Methylierung sehr interessant sind, aber auch sehr differenziert betrachtet werden müssen. Die Komplexität dieses Mechanismus der Genregulation wird deutlich, wenn zur Genexpression eine Hypomethylierung im Promotorbereich und einer Hypermethylierung im codierenden Genbereich gefordert wird. Eine offenbar duale Rolle der DNA-Methylierung ist für die Gentranskription von hTERT gezeigt worden. Hier ist eine Hypomethylierung im Promotorbereich zur Anlagerung des Transkriptionskomplexes und eine Methylierung zur Hemmung einer CTCF-Bindung notwendig (Renaud, Loukinov et al. 2007).

Vergleich der AREG Regulation durch DNA-Methylierung in Kolonkarzinomzelllinien

In den durchgeführten Experimenten fiel auf, dass die AREG Expression in den untersuchten kolorektalen Tumorzelllinien unterschiedlich war. Sechs der acht analysierten Zelllinien exprimierten AREG stark. Eine unterschiedliche AREG Expression fiel auch in Analysen von Lungentumorzelllinien auf, wobei sieben von 14 Zelllinien eine AREG Expression aufwiesen (Yonesaka, Zejnullahu et al. 2008).

Weiterhin war bei den erhobenen Daten auffällig, dass im Rahmen der eigenen Experimente eine reduzierte AREG Expression durch DNA-Hypomethylierung nur in einer von sechs humanen Kolonkarzinomzelllinien gezeigt werden konnte. Lediglich in HCT 116 führte eine homozygote Deletion der DNMT1 und eine Hemmung der DNMT1 mit Zebularine zu einer eindeutigen verminderten Expression von AREG Protein.

Ursächlich für die Beobachtung, dass die Expression von AREG nur in einer Zelllinie deutlich durch den DNMT1 Inhibitor Zebularine deutlich gehemmt werden kann, können mehrere Faktoren sein.

Denkbar ist, dass der Inhibitor Zebularine in den Zelllinien HT-29, SW-707, SW-948, CX-2 und CaCo-2 keine suffiziente Hemmung der DNMT1 bewirkte. Eine Kontrolle, ob die DNMT1 durch Zebularine gehemmt wurde, erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nur für HCT 116. Auch für die anderen untersuchten Zelllinien wäre ein Nachweis der Hemmung der DNMT1 durch Zebularine notwendig; dies sollte in Folgeexperimenten erfolgen.

Möglich ist zudem, dass eine Demethylierung durch den DNMT1 spezifischen Inhibitor Zebularine zwar erfolgte, dass andere DNMTs jedoch die Funktion der DNMT1 übernehmen, die DNA also weiterhin methyliert war und deshalb keine verminderte Expression von AREG nachgewiesen werden konnte. Initial wurde den DNMTs zwar getrennte Methylierungsfunktionen zugeschrieben; DNMT1 – Erhalt von Methylierungsmustern, DNMT3 – *de novo* Methylierung in der embryogenen Phase; jedoch wird auch davon berichtet, dass die verschiedenen DNMTs sich in ihrer Funktion ergänzen und kooperieren (Robertson 2001). Möglicherweise erwies sich eine gezielte Inhibition der DNMT1 im Rahmen dieser Arbeit als nachteilig. Um dies zu überprüfen, sollten die Zelllinien mit dem DNMT-unspezifischen demethylierenden Agens 5-Aza-2'-Desoxyzytidin inkubiert werden und anschließend eine Analyse der AREG Expression erfolgen; dies ist Gegenstand aktueller Analysen in der AG Molekulare Tumorpathologie.

Die Hypothese, dass das AREG Gen nur in einer, HCT 116, von mehreren Kolonkarzinomzelllinien durch DNA-Methylierung reguliert ist, kann jedoch auch Ausdruck für die Individualität jedes Tumors sein. Auch innerhalb einer Tumorentität ist jede maligne Erkrankung genetisch spezifisch.

Rolle anderer Liganden bei DNA-Methylierung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es die Regulation des EGFR Liganden AREG durch DNA-Methylierung zu untersuchen. Die Genexpressionsanalysen in der AG Molekulare Tumorpathologie zeigten, dass die Liganden Betacellulin (BTC) und Epiregulin (EREg) ähnliche Expressionsmuster hatten. So war die mRNA von BTC und EREG in HCT 116 vermehrt und in HCT 116 DNMT1-/- vermindert exprimiert. Möglich ist ein gemeinsamer Regulationsmechanismus, da AREG, BTC und EREG sowie auch Epigen (EPGN) nebeneinander auf dem Genlokus 4q13-q21 liegen (Abbildung 35). Für BTC und EREG wurde in der AG Molekulare Tumorpathologie ebenfalls eine Hemmung in DNMT-defizienten Zellen gezeigt.

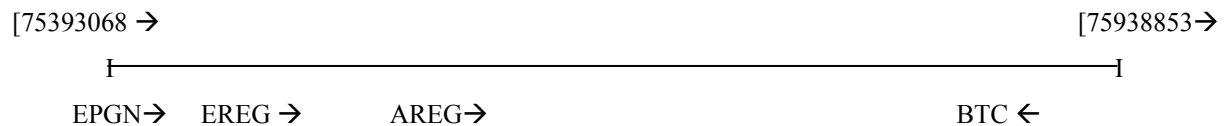


Abbildung 35: Darstellung des Genlokus 4q13-q21. Die Gene EPGN, EREG, AREG und BTC haben einen ähnlichen Genlokus auf dem Chromosom 4. Die Ziffern geben die Basenpaare an. Die Gene für EPGN, EREG und AREG sind auf dem (+)-DNA-Strang und das Gen für BTC auf dem (-)-DNA-Strang lokalisiert. Quelle: Entrez Gene, NCBI

Die Gene für die anderen EGFR-Liganden hingegen sind auf Chromosom 2 (2p13) (TGF-alpha) und auf Chromosom 4 (4q25) (EGF) lokalisiert. Interessant wäre es, eine Beeinflussung der Expression von TGF-alpha und EGF durch DNA-Methylierung zu untersuchen.

Bedeutung der Gen-Aktivierung durch DNA-Methylierung

Im Vergleich zu normalen Zellen zeigen humane Tumorzellen einen veränderten DNA-Methylierungsstatus; so wird eine globale Hypomethylierung und eine lokale Hypermethylierung im Genom von malignen Zellen beobachtet. Eine lokale DNA Hypermethylierung wird im Promotorbereich von Genen festgestellt. Ergebnis vieler Forschungsbemühungen ist die Erkenntnis, dass Gene, vor allem Tumorsuppressorgene, durch eine Methylierung im Promotorbereich inaktiviert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde jedoch eine Aktivierung durch DNA-Methylierung für den EGFR Liganden AREG untersucht. Eine Aktivierung durch DNA-Methylierung und vice versa eine Inaktivierung durch DNA-Demethylierung von Genen ist ungewöhnlich. Mit dem Wissen um diesen Regulationsmechanismus von Genen scheinen zwei entgegengesetzte Effekte der DNA-Methylierung neben einander zu existieren. Dieses Modell erscheint sinnvoll, wenn man von einer Inaktivierung von Tumorsuppressoren und von einer Aktivierung von Onkogenen

spricht. Die weiterführende Erforschung von Proto-Onkogenen, die durch DNA-Methylierung aktiviert werden, wird einen wichtigen Beitrag dazu leisten die Entstehung maligner Erkrankungen weiter zu verstehen.

4.2.3 Regulation von AREG durch MAPK

Neben der Regulation durch DNA-Methylierung war es Bestandteil dieser Arbeit auch die Regulation durch die RAS/RAF/MAPK von AREG zu untersuchen.

Im Vorfeld dieser Arbeit zeigten genomweite Expressionsprofile von parentalen und DNMT-defizienten HCT-Zellen eine gesteigerte Expression von AREG nach der Hemmung der RAS/RAF/MAPK-Kaskade durch den MEK-Inhibitor U0126. Dies würde einer negativen Regulation von AREG durch die MAPK-Kaskade entsprechen. In der Literatur wird jedoch beschrieben, dass die RAS/RAF/MAPK-Kaskade die EGFR-Liganden, TGF-alpha und AREG positiv reguliert.

Die eigenen Ergebnisse mit der Arbeit des MEK-Inhibitors U0126 zeigten eine Suppression der AREG Menge in den Zelllinien HCT 116, SW-707, SW-948 und CX-2 und gehen damit konform mit dem in der Literatur beschriebenen Regelmechanismus durch die MAPK-Kaskade. Innerhalb der durchgeführten Analysen fiel auf, dass der Effekt der MAPK-Kaskade auf die sezernierte Form von AREG stärker als auf die zelluläre Form war. Dies lässt möglicherweise auf einen Einfluss der MAPK-Signalweges auf die Regulation der AREG Spaltung schließen.

Die Freisetzung von AREG erfolgt durch das Enzym ADAM-17. Interessanterweise sind aktivierende Einflüsse der MAPK-Kaskade auf ADAM Enzyme bereits beschrieben worden (Le Pabic, Dominique et al. 2003; Yin and Yu 2009).

4.3 Potentieller Nutzen von AREG für die Klinik

4.3.1 AREG im Kontext der prädiktiven Biomarker für das Ansprechen auf eine EGFR Therapie

Der EGFR ist ein interessantes Zielobjekt für die Entwicklung neuer Therapiestrategien in der Behandlung maligner Erkrankungen, da er einen der wichtigsten Wachstumsfaktoren epithelialer Tumoren darstellt. Die Entwicklung zielgerichteter Therapeutika für bösartige Erkrankungen ist kostenintensiv, die Ansprechraten sind gering und es wurden Toxizitäten beobachtet. Die Entwicklung von prädiktiven Biomarkern für den Erfolg / Misserfolg von anti-EGFR Therapien ist daher essentiell. Mehrere Gene stehen als mögliche prädiktive

Biomarker für anti-EGFR Therapien zur Verfügung, wobei KRAS hier bereits klinische Bedeutung erlangt hat. Im Fokus der Forschung stehen weitere Strukturen wie beispielsweise der Status des EGFR-Gens, Gene und Proteine wichtiger Signalkaskaden und auch der EGFR Ligand AREG.

AREG

Zu Beginn der Arbeit bestand die Hypothese, dass AREG eine negative prädiktive Rolle für den Erfolg von anti-EGFR Therapien besitzt. Ursächlich hierfür waren Beobachtungen bei Patienten mit nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen; Erkrankte mit erhöhten AREG Serum Konzentrationen sprachen schlechter auf eine Therapie mit dem EGFR TKI Gefitinib an (Ishikawa, Daigo et al. 2005).

Im Gegensatz zu der potentiellen negativen prädiktiven Rolle von AREG in nicht-kleinzelligen Lungentumoren stehen Ergebnisse, die im Rahmen dieser Arbeit erhoben wurden. Bei den eigenen Analysen war auffällig, dass HCT 116 Zellen mit erhöhtem AREG Gehalt empfindlicher auf die Applikation von Gefitinib reagierten. AREG erscheint demzufolge als möglicher positiver Prädiktor bei der Verwendung von Gefitinib im Kolonkarzinom.

Dies wird unterstützt durch weitere Daten, die zeigen, dass eine erhöhte AREG Konzentration mit einem besseren Erfolg von anti-EGFR Therapien assoziiert ist. Bei der Behandlung von Patienten mit kolorektalen Karzinomen mit dem EGFR Antikörper Cetuximab wurde eine erhöhte AREG mRNA Menge im Tumorgewebe als positiver prädiktiver Biomarker beschrieben (Khambata-Ford, Garrett et al. 2007). In nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinien wurde AREG später im Zusammenhang mit Gefitinib oder Cetuximab mittlerweile ebenfalls eine positive prädiktive Funktion zugeschrieben (Yonesaka, Zejnullahu et al. 2008). Dies unterstützt die eigenen Ergebnisse. Ob die AREG Expression bei Kolontumoren auch für die Behandlung mit Gefitinib eine positive prädiktive Funktion besitzt, bleibt abzuwarten.

Bislang ist die Bedeutung von AREG als prädiktiver Biomarker nicht eindeutig. Die Beobachtungen von Ishikawa in nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen, der zu Folge eine erhöhte AREG Menge im Serum mit einem schlechteren Ansprechen auf die Behandlung mit Gefitinib assoziiert wurde, stehen im Widerspruch zu eigenen Ergebnissen und Daten anderer Arbeitsgruppen. Ursächlich für die unterschiedlichen Beobachtungen könnten die verschiedenen Medien sein, in denen die AREG Konzentration bestimmt wurde.

Möglicherweise stimmt die von Ishikawa et al gemessene AREG Menge im Serum nicht mit der AREG Expression im Tumorgewebe überein. In kolorektalen Tumoren wird für AREG von einer eingeschränkten Korrelation zwischen der systemischen Proteinkonzentration im Serum und der mRNA Expression im Tumor berichtet (Khambata-Ford, Garrett et al. 2007). Folglich sollte in weiteren Studien analysiert werden, wo (Serum/Tumor) die Konzentration des Liganden bestimmt wird und welche Daten aussagekräftiger sind.

Fraglich ist auch wie der Zusammenhang zwischen einer erhöhten AREG Konzentration und dem besseren Ansprechen auf anti-EGFR Therapien entsteht. Eine erhöhte Expression von EGFR Liganden kann zum Tumorwachstum durch autokrine Aktivierung der Zellen beitragen und ist Ausdruck eines EGFR-abhängigen Tumors. Eine erhöhte AREG Expression kann daher solche Tumoren charakterisieren, die für eine anti-EGFR Therapie besonders empfänglich sind.

Eine ebenfalls denkbare Ursache für die erhöhte AREG Expression bei Gefitinib Applikation ist die Option, dass EGFR Liganden durch die Gabe von anti-EGFR Agenzien hochreguliert werden. So wurde in Gefitinib resistenten Burstkarzinomzellen eine vermehrte AREG Expression nach der Applikation von Gefitinib verzeichnet (Ferrer-Soler, Vazquez-Martin et al. 2007). Auch für kolorektale Zelllinien wurde eine verstärkte TGF- α Menge nach der Gabe von Cetuximab detektiert (Mutsaers, Francia et al. 2009). Eine Diskussion der Mechanismen, die zur Erhöhung der EGFR-Liganden nach der Gabe von anti-EGFR Agenzien führen, wäre interessant doch würde hier den Rahmen sprengen. Eine Hochregulation der EGFR Liganden nach der Gabe von anti-EGFR Hemmstoffen impliziert jedoch für weitere Studien, dass die Konzentrationen der Liganden vor und nach der Gabe des Hemmstoffes gemessen werden sollten.

EGFR

Neben dem EGFR-Ligand AREG ist der Status des EGFR ein weiterer möglicher prädiktiver Faktor. Eine verstärkte Expression oder Mutationen im EGFR-Gen werden mit einem höheren Therapieerfolg für die Behandlung mit TKI in Verbindung gebracht. So wurden in Lungentumoren Mutationen des Rezeptors für ein besseres Ansprechen von Gefitinib verantwortlich gemacht (Lynch, Bell et al. 2004; Paez, Janne et al. 2004). Die Mutationen sind häufig in den Exons 18 bis 21 des Gens für den EGFR lokalisiert und die kodieren für eine Region nahe der ATP-Bindungsstelle im Kinase-Bereich des Rezeptors. Durch eine

veränderte Umgebung der ATP-Bindungsstelle, könnte die Bindungsaffinität von Gefitinib erhöht oder verlängert werden und die Signaltransduktion des Rezeptors gemindert werden. Für den Erfolg von EGFR TKI wird zunehmend von einer sekundären Resistenz gegenüber TKI berichtet, wobei dies durch eine zweite, erworbene Mutation im EGFR erklärt wird (Nguyen, Kobayashi et al. 2009).

In Kolontumoren wird der EGFR immerhin von bis zu 80% der Tumoren exprimiert, eine verstärkte Expression oder Mutationen des Rezeptors sind jedoch sehr selten. Ob und in welchem Ausmaß der Erfolg von anti-EGFR Therapien in kolorektalen Malignomen vom EGFR-Status abhängig ist, wird kontrovers diskutiert. Für die Verwendung von Gefitinib im kolorektalen Karzinom scheint der Erfolg unabhängig vom Status des EGFR zu sein. So zeigten EGFR positive Patienten mit kolorektalem Tumor eine Remissionsrate von 70% und solche die EGFR negativ waren eine Remissionsrate von 75%; demnach gab es keine Korrelation zwischen dem EGFR-Status und einem Therapieerfolg (Fisher, Kuo et al. 2008). Für die Verwendung von Cetuximab in kolorektalen Tumoren, zeigten sich hingegen ein Einfluss des EGFR-Status auf eine Patientensubpopulation. So bestand bei Patienten mit KRAS-Wildtyp Tumoren eine Korrelation zwischen Therapieerfolg und dem EGFR-Status (hohe Polysomie/ Amplifikation) dieser Fälle in 17.7% (Laurent-Puig, Cayre et al. 2009). Dies lässt den Schluss zu, dass der Status des EGFR als prädiktiver Biomarker in der Behandlung von Kolontumoren mit anti-EGFR Agenzien nach bisherigem Wissen keine Bedeutung hat.

Signalkaskaden

Zusätzlich zu Liganden und EGFR zeigen Arbeiten der letzten Jahre zunehmend, dass Alterationen in Genen, die für Proteine wichtiger Signalkaskaden kodieren, eine große Bedeutung als prädiktive Marker haben.

Eine KRAS-Mutation führt zur dauerhaften Aktivierung der RAS/RAF/MAPK-Kaskade und hat eine sehr große klinische Relevanz. Eine KRAS-Mutation in Kolontumoren gilt als negativer Prädiktor für Behandlungen mit dem Antikörper Cetuximab (Lievre, Bachet et al. 2006). Wird Cetuximab als Monotherapie verabreicht, zeigen Patienten mit einem KRAS-Wildtyp Tumor einen größeren Benefit als Patienten mit KRAS-Mutationen (Karapetis, Khambata-Ford et al. 2008). In der Behandlung von Patienten mit der Kombination aus FOLFOX-4 und Cetuximab stellte der KRAS-Status ein wirksames Auswahlkriterium dar. So sprachen 61% der Patienten mit einem KRAS-Wildtyp Status auf die Behandlung an,

wohingegen Patienten mit KRAS-Mutationen nur zu 33% reagierten (Bokemeyer, Bondarenko et al. 2009).

Fraglich ist warum die restlichen 39% der KRAS-Wildtyp Patienten nicht auf eine EGFR Antikörper Therapie ansprechen. Hier hat sich heraus gestellt, dass ein Teil dieser Patienten weitere Mutationen in Genen wie BRAF oder PI3K zeigten bzw. dass die Patienten aufgrund intratumoraler Heterogenität falsch-negativ waren (Baldus, Schaefer et al. 2010).

Die Funktion von KRAS als prädiktiver Marker für den Antikörper Cetuximab ist, wie oben beschrieben, recht gut erforscht und von klinischer Relevanz. Eine ähnliche prädiktive Funktion von KRAS für den Einsatz des EGFR-Inhibitors Gefitinib in kolorektalen Tumoren konnte bisher nicht gezeigt werden (Ogino, Meyerhardt et al. 2005). Dies sollte Gegenstand weiterer Studien sein.

Neben der RAS/RAF/MAPK-Kaskade kann in Tumoren auch die PTEN/PI3K/AKT-Kaskade beständig aktiviert sein. PTEN dephosphoryliert den second messenger PIP3, welcher das Produkt der PI3K ist, und reguliert damit AKT negativ. Alterationen in dieser Kaskade sind mit Resistenzen gegenüber anti-EGFR Therapien assoziiert worden. Eine Inaktivierung des Tumorsuppressors PTEN wird mit einer Resistenz von Gefitinib in Lungentumoren assoziiert (Kokubo, Gemma et al. 2005). Eine Expression von PTEN im Kolontumor wird im Zusammenhang mit einem Ansprechen auf eine Behandlung auf Cetuximab beschrieben (Razis, Briasoulis et al. 2008). Liegt eine PIK3CA Mutation in Kolontumoren vor, so ist dies mit einem Therapieversagen von Cetuximab und Panitumab assoziiert (Sartore-Bianchi, Martini et al. 2009). Interessanterweise können eine Reexpression von PTEN mit einer erhöhten Sensitivität gegenüber Gefitinib in Verbindung gebracht werden (Noro, Gemma et al. 2007).

Beiden beschriebenen Signalkaskaden der MAPK und der PI3K gemeinsam ist, dass sie unterhalb des EGFR Signalübertragung lokalisiert sind und dass ihre konstitutive Aktivierung offensichtlich eine Ineffektivität von anti-EGFR Therapien bewirkt.

4.3.2 AREG als mögliche Zielstruktur für antiproliferative Therapien

Das ErbB Netzwerk spielt eine Schlüsselrolle in zellulären Prozessen wie Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Eine Hyperaktivierung der Rezeptoren des ErbB Netzwerkes kann zu einem dysregulierten Zellzyklus und der Entstehung von Tumoren führen. Eine gesteigerte Aktivierung des EGFR kann unter anderem durch eine abnormale Stimulation durch die entsprechenden Liganden EGF, AREG, EPGN, TGF-alpha, BTC und EREG erfolgen.

Im Zuge möglicher therapeutischer Eingriffe, stellen neben dem EGFR selbst auch die Liganden mögliche Zielstrukturen dar. Im Gegensatz zu den Rezeptoren stehen die Liganden noch nicht so sehr im Fokus der gezielten Tumorthherapie. Dies ist dadurch bedingt, dass eine Hemmung von Rezeptoren effektiver ist als eine Hemmung von einzelnen Liganden. Dennoch sollten Möglichkeiten die EGFR Liganden zu inhibieren in Betracht gezogen werden. Neben einer pathogenen Rolle für die Entstehung und Progression von Tumoren, können die EGFR Liganden auch eine von mehreren Ursachen (Rezeptormutation, konstitutive Aktivierung von Signalkaskade down stream des EGFR) für die erworbene Resistenz gegenüber anti-EGFR Therapien sein (Morgillo and Lee 2005).

Die Hemmung der EGFR Liganden kann über direkte und indirekte Wege erreicht werden. Eine direkte Inhibition ist durch die Verwendung von siRNAs (small interfering RNAs) möglich. Die Transfektion von diversen Tumorzelllinien mit siRNAs gegen AREG führte zur verstärkten Apoptose. Es war auffällig, dass ein Knockout von AREG die Zahl an apoptotischen Zellen in der kolorektalen (LoVo), pankreatischen (ASPC1) und renalen (Caki-1) Zelllinie signifikant stärker erhöhte als ein Knockout der EGFR Liganden EREG oder HB-EGF. Zudem führte die Transfektion von LoVo mit siRNA für AREG auch zu einer Beeinträchtigung der Phosphorylierung von EGFR und ERK (Yotsumoto, Yagi et al. 2008). Auch in hepatozellulären Tumorzelllinien (PLC, Hep3B) konnte ein Effekt von siRNA für AREG auf die Zellphysiologie gezeigt werden; ankerabhängiges und ankerunabhängiges Wachstum sowie die Phosphorylierung von EGFR und ERK wurden inhibiert (Castillo, Erroba et al. 2006).

Eine weitere Möglichkeit AREG zu hemmen besteht in der Option die Transkription durch den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Einfluss der DNA-Methylierung auf die Expression des Proteins zu beeinflussen. Die Applikation von demethylierenden Agenzien führte in der kolorektalen Zelllinie HCT 116 zu einer verminderten Expression von AREG. Könnte diese Regulation auch für weitere kolorektale Zelllinien und eventuell auch für andere Tumorentitäten gezeigt werden, wäre dies eine Grundlage für in vivo Experimente.

Interessant ist der Aspekt, dass vermutlich nicht nur AREG sondern auch die EGFR Liganden BTC, EREG und EPGN über DNA-Methylierung reguliert werden. Die Applikation eines demethylierenden Agens würde demzufolge zu einer Hemmung mehrerer EGFR Liganden führen.

Zusätzlich kann AREG indirekt durch eine verminderte Freisetzung aus der zellmembranständigen Form gehemmt werden. Die für die Proteolyse von AREG verantwortliche Protease ADAM 17 kann durch spezifische Inhibitoren beeinflusst werden und Anwendungen der Hemmstoffe in Zellkulturmodellen sind viel versprechend. WAY-022 ist ein selektiver ADAM 17 Inhibitor und hemmt das Zellwachstum in kolorektalen Zelllinien (Merchant, Voskresensky et al. 2008). INCB3619 ist ein Hemmstoff von ADAM 10 und ADAM 17 und erhöht die Apoptoserate in NSCLC Zelllinien (Zhou, Peyton et al. 2006).

Wie aufgezeigt wurde, bestehen mehrere Optionen den EGFR Liganden AREG zu hemmen. Fraglich ist, ob eine alleinige Inhibition von AREG, beispielsweise durch siRNA, zur Tumorthherapie geeignet ist. Sinnvoll erscheint die Hemmung von AREG im Kontext einer Demethylierungstherapie, da hier neben Genen mit onkogenen Funktionen, wie AREG, auch Tumorsuppressorgene aktiviert werden.

Ebenfalls attraktiv erscheint die Kombination von verschiedenen Therapieansätzen, beispielsweise die kombinierte Anwendung einer anti EGFR Therapie und einer Hemmung der DNA-Methylierung, ADAMs, der MAPK-Signalkaskade oder der PI3K-Signalkaskade. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde modellhaft die Kombination einer anti-EGFR Therapie mit der einer Demethylierungstherapie untersucht. Hierzu wurde das Wachstumsverhalten der Zelllinie HCT 116 und HCT 116 DNMT1^{-/-} mit und ohne Applikation des Tyrosinkinaseinhibitors Gefitinib analysiert. Die DNMT1 defizienten Zellen mit vermindertem AREG Gehalt reagierten weniger empfindlich auf die Applikation von Gefitinib. Dies lässt schlussfolgern, dass eine Kombination einer Methylierungstherapie mit einer anti-EGFR Therapie ungünstig ist.

Zu beachten ist jedoch, dass die "Methylierungstherapie" hier durch einen genetischen Knockout der DNMT1 besteht. Dieser genetische Knockout der DNMT1 führt in HCT 116 DNMT1^{-/-} zu einem um 20% verminderten Methylierungsstatus des Genoms- im Vergleich zu der parentalen HCT 116. Der nur um 20% geminderte Methylierungsstatus des Genoms in HCT 116 DNMT1^{-/-} wird damit begründet, dass der genetische Knockout der DNMT1 unvollständig ist und eine verkürzte aber schwächer enzymatisch aktive Proteinform der DNMT1 in den Zellen vorhanden ist (Egger, Jeong et al. 2006). Das im Rahmen der Arbeit untersuchte Modell ist also nicht geeignet um Aussagen über die Effektivität einer Kombination von Methylierungs- und anti-EGFR Therapien zu machen. Untersucht werden sollte das Proliferationsverhalten daher nach der Applikation eines demethylierenden Agens

und eines EGFR Inhibitors. In eigenen Experimenten wurde versucht die kolorektale Tumorzelllinie HCT 116 mit Zebularine und Gefitinib nacheinander zu behandeln. Die Analysen mussten jedoch nach der Applikation von Zebularine und dem Umsetzen der Zellen in 96-Lochplatten aus Gründen einer hohen unspezifischen Apotoserate abgebrochen werden.

Trotz dessen, dass im Rahmen der durchgeführten Versuche kein günstiger Effekt einer Verknüpfung von anti-EGFR und Methylierungs-Therapie gezeigt werden konnte, erscheint diese Kombination unter bestimmten Bedingungen viel versprechend.

In Lungentumorzelllinien wurde gezeigt, dass bei einer kombinierten Applikation von Gefitinib und einem HDI (TSA bzw. Vorinostat) das Zellwachstum vermehrt gehemmt bzw. die Apoptose stärker induziert wurde (Noro, Gemma et al. 2007; Witta, Dziadziuszko et al. 2009) als bei Einzelapplikation. Auffällig ist, dass für die Methylierungstherapie ein HDI statt einem Methylierungsinhibitor verwendet wurde. Auch für kolorektale Tumorzelllinien sollte bei der Kombination von EGFR- und Methylierungstherapie ein HDI untersucht werden.

Interessanterweise wird die von Noro et al. beschriebene Wachstumshemmung von Lungentumorzellen durch Gefitinib mit der Reexpression des Tumorsuppressors PTEN und damit der Hemmung der PI3K-Kaskade assoziiert; die Reexpression von PTEN wurde durch die Anwendung von epigenetisch wirksamen Agenzien (TSA oder 5-Aza-2'-Desoxyzytidin) erreicht. Die Assoziation der Wachstumshemmung durch Gefitinib mit der Reexpression von PTEN impliziert, dass durch eine Inhibition von intrazellulären Signalkaskaden, wie der PI3K-Kaskade, die Wirkung von anti-EGFR-Therapien verbessert werden können. Eine gleichzeitige Hemmung von intrazellulären Signalkaskaden und dem EGFR erscheint besonders sinnvoll mit Hinblick darauf, dass anti-EGFR-Therapien bei Mutationen der intrazellulären Signalkaskaden (beispielsweise KRAS-Mutation) oft nicht ansprechen und betont die Chancen die in kombinierten Therapieansätzen stecken.

5 Zusammenfassung

AREG ist ein EGFR Ligand und Bestandteil des ErbB Netzwerkes, welches aus vier Rezeptoren und 12 verschiedenen Liganden besteht. Das ErbB-Netzwerk besitzt eine wichtige Rolle bei Wachstum, Differenzierung und Regulation von Epithelzellen. Ein hyperaktiviertes ErbB-Netzwerk trägt nicht nur funktionell zur Tumorentstehung und -progression bei, sondern bietet auch gleichzeitig Strukturen für diagnostische Marker und Angriffspunkte für antiproliferative Therapien.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation des EGFR Liganden AREG im kolorektalen Karzinom anhand von Zellkulturen untersucht. Initial bestand durch Ergebnisse von mRNA Analysen der Verdacht, dass der EGFR Ligand AREG im kolorektalen Karzinom durch DNA-Methylierung reguliert wird. Zu Beginn der eigenen Experimente erfolgte die Etablierung und Optimierung eines Proteinnachweises für AREG durch die Verwendung von ELISA. Mittels Verwendung des DNMT-1-Inhibitors Zebularine konnte eine Reduktion der AREG Expression erreicht werden. Die Applikation von Gefitinib führte bei HCT 116 parental zu einer stärkeren Wachstumsverlangsamung als bei HCT 116 DNMT1-/- . Mit den durchgeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine Hemmung der DNA-Methylierung zu einer verminderten Menge an AREG führte und bestätigte so die initiale Vermutung. Jedoch ließ sich der Einfluss der DNA-Methylierung eindeutig nur in einer (HCT 116) von sechs untersuchten kolorektalen Zelllinien nachweisen. Eine Gen-Inaktivierung durch DNA-Demethylierung und vice versa eine Gen-Aktivierung durch DNA-Methylierung ist ungewöhnlich und bisher für nur sehr wenige Gene beschrieben. Prominentester ist das Wissen um eine Gen-Inaktivierung durch DNA-Methylierung von Tumorsuppressorgenen. Dennoch schließt das Wissen um eine Gen-Aktivierung von Genen durch DNA-Methylierung eine Lücke im Verständnis der Epigenetik; insbesondere dann, wenn die betroffenen Gene zu den Proto-Onkogenen zählen.

AREG scheint als positiver prädiktiver Marker für den Erfolg von anti EGFR Therapien im Kolonkarzinom zu fungieren. Der EGFR Ligand muss jedoch im Kontext mit Mutationen in intrazellulären Signalkaskaden (beispielsweise KRAS-Mutation) und dem Status des EGFR betrachtet werden.

Im Rahmen einer DNA-Methylierungstherapie stellt AREG eine potentielle Angriffsstruktur für antiproliferative Therapien dar. Besonders effektiv scheinen kombinierte Therapieansätze, beispielsweise die Verbindung einer Methylierungs- mit einer anti EGFR Therapie.

6 Literaturverzeichnis

- Baldus, S. E., K.-L. Schaefer, et al. (2010). "Prevalence and Heterogeneity of KRAS, BRAF, and PIK3CA Mutations in Primary Colorectal Adenocarcinomas and Their Corresponding Metastases." Clinical Cancer Research **16**(3): 790-799.
- Baylin, S. B., S. A. Belinsky, et al. (2000). "Aberrant methylation of gene promoters in cancer---concepts, misconcepts, and promise." J Natl Cancer Inst **92**(18): 1460-1461.
- Bell, A. C. and G. Felsenfeld (2000). "Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene." Nature **405**(6785): 482-485.
- Billings, S. D., M. D. Southall, et al. (2003). "Amphiregulin overexpression results in rapidly growing keratinocytic tumors: an in vivo xenograft model of keratoacanthoma." Am J Pathol **163**(6): 2451-2458.
- Bokemeyer, C., I. Bondarenko, et al. (2009). Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin With and Without Cetuximab in the First-Line Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. **27**: 663-671.
- Boulougouris, P. and J. Elder (2001). "Epidermal growth factor receptor structure, regulation, mitogenic signalling and effects of activation." Anticancer Res **21**(4A): 2769-2775.
- Brattain, M. G., W. D. Fine, et al. (1981). Heterogeneity of Malignant Cells from a Human Colonic Carcinoma. **41**: 1751-1756.
- Castillo, J., E. Erroba, et al. (2006). "Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells." Cancer Res **66**(12): 6129-6138.
- Chen, T. R., D. Drabkowski, et al. (1987). "WiDr is a derivative of another colon adenocarcinoma cell line, HT-29." Cancer Genetics and Cytogenetics **27**(1): 125-134.
- Cheng, J. C., D. J. Weisenberger, et al. (2004). "Continuous Zebularine Treatment Effectively Sustains Demethylation in Human Bladder Cancer Cells." Mol. Cell. Biol. **24**(3): 1270-1278.
- Chung, E., P. W. Cook, et al. (2005). "Amphiregulin causes functional downregulation of adherens junctions in psoriasis." J Invest Dermatol **124**(6): 1134-1140.
- Ciardello, F., R. Caputo, et al. (2000). "Antitumor effect and potentiation of cytotoxic drugs activity in human cancer cells by ZD-1839 (Iressa), an epidermal growth factor receptor-selective tyrosine kinase inhibitor." Clin Cancer Res **6**(5): 2053-2063.
- Ciardello, F., N. Kim, et al. (1991). "Differential expression of epidermal growth factor-related proteins in human colorectal tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(17): 7792-7796.
- Cunningham, D., Y. Humblet, et al. (2004). "Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer." N Engl J Med **351**(4): 337-345.

- Cunningham, M. P., H. Thomas, et al. (2006). "Responses of human colorectal tumor cells to treatment with the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody ICR62 used alone and in combination with the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib." Cancer Res **66**(15): 7708-7715.
- De Larco, J. E., B. R. K. Wuertz, et al. (2003). Atypical methylation of the interleukin-8 gene correlates strongly with the metastatic potential of breast carcinoma cells. **100**: 13988-13993.
- Ebert, M. P. A., J. Yu, et al. (2003). Loss of Beta-Catenin Expression in Metastatic Gastric Cancer. **21**: 1708-1714.
- Egger, G., S. Jeong, et al. (2006). "Identification of DNMT1 (DNA methyltransferase 1) hypomorphs in somatic knockouts suggests an essential role for DNMT1 in cell survival." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(38): 14080-14085.
- Feinberg, A. P., C. W. Gehrke, et al. (1988). "Reduced Genomic 5-Methylcytosine Content in Human Colonic Neoplasia." Cancer Res **48**(5): 1159-1161.
- Ferrer-Soler, L., A. Vazquez-Martin, et al. (2007). "An update of the mechanisms of resistance to EGFR-tyrosine kinase inhibitors in breast cancer: Gefitinib (Iressa) - induced changes in the expression and nucleo-cytoplasmic trafficking of HER-ligands (Review)." Int J Mol Med **20**(1): 3-10.
- Fisher, G. A., T. Kuo, et al. (2008). "A Phase II Study of Gefitinib, 5-Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin in Previously Untreated Patients with Metastatic Colorectal Cancer." Clinical Cancer Research **14**(21): 7074-7079.
- Fogh, J. and G. Trempe (1975). New human tumor cell lines. Human tumor cells in vitro. J. Fogh. New York, Plenum Press: 115-159.
- Fogh, J., W. C. Wright, et al. (1977). "Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors." J Natl Cancer Inst **58**(2): 209-214.
- Friend, C., W. Scher, et al. (1971). "Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(2): 378-382.
- Fuks, F. (2005). "DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes." Curr Opin Genet Dev **15**(5): 490-495.
- Gayet, J., X. P. Zhou, et al. (2001). "Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines." Oncogene **20**(36): 5025-5032.
- Gius, D., H. Cui, et al. (2004). "Distinct effects on gene expression of chemical and genetic manipulation of the cancer epigenome revealed by a multimodality approach." Cancer Cell **6**(4): 361-371.
- Goelz, S. E., B. Vogelstein, et al. (1985). "Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms." Science **228**(4696): 187-190.
- Grady, W. M. (2005). "Epigenetic events in the colorectum and in colon cancer." Biochem Soc Trans **33**(Pt 4): 684-688.

- Harris, R. C., E. Chung, et al. (2003). "EGF receptor ligands." Exp Cell Res **284**(1): 2-13.
- Holbro, T., G. Civenni, et al. (2003). "The ErbB receptors and their role in cancer progression." Exp Cell Res **284**(1): 99-110.
- Holbro, T. and N. E. Hynes (2004). "ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life." Annu Rev Pharmacol Toxicol **44**: 195-217.
- Hurwitz, H. I., L. Fehrenbacher, et al. (2005). "Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin: an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer." J Clin Oncol **23**(15): 3502-3508.
- Ishikawa, N., Y. Daigo, et al. (2005). Increases of Amphiregulin and Transforming Growth Factor- α in Serum as Predictors of Poor Response to Gefitinib among Patients with Advanced Non-Small Cell Lung Cancers. **65**: 9176-9184.
- Issa, J.-P. J., L. Shen, et al. (2005). "CIMP, at Last." Gastroenterology **129**(3): 1121-1124.
- Johansson, C. C., A. Yndestad, et al. (2004). "The epidermal growth factor-like growth factor amphiregulin is strongly induced by the adenosine 3',5'-monophosphate pathway in various cell types." Endocrinology **145**(11): 5177-5184.
- Johnson, G. R., S. A. Prigent, et al. (1993). "Characterization of high and low molecular weight forms of amphiregulin that differ in glycosylation and peptide core length. Evidence that the NH₂-terminal region is not critical for bioactivity." J Biol Chem **268**(25): 18835-18843.
- Johnson, G. R., T. Saeki, et al. (1991). "Response to and expression of amphiregulin by ovarian carcinoma and normal ovarian surface epithelial cells: nuclear localization of endogenous amphiregulin." Biochem Biophys Res Commun **180**(2): 481-488.
- Johnson, G. R., T. Saeki, et al. (1992). "Autocrine action of amphiregulin in a colon carcinoma cell line and immunocytochemical localization of amphiregulin in human colon." J Cell Biol **118**(3): 741-751.
- Jones, P. A. and S. B. Baylin (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." Nat Rev Genet **3**(6): 415-428.
- Karapetis, C. S., S. Khambata-Ford, et al. (2008). K-ras Mutations and Benefit from Cetuximab in Advanced Colorectal Cancer. **359**: 1757-1765.
- Katoh, Y. and M. Katoh (2006). "Canonical WNT signaling pathway and human AREG." Int J Mol Med **17**(6): 1163-1166.
- Khambata-Ford, S., C. R. Garrett, et al. (2007). Expression of Epiregulin and Amphiregulin and K-ras Mutation Status Predict Disease Control in Metastatic Colorectal Cancer Patients Treated With Cetuximab. **25**: 3230-3237.
- Köbel, M., D. Budianto, et al. (2005). "Influence of Various Cytokines on Adhesion and Migration of the Colorectal Adenocarcinoma Cell Line HRT-18." Oncology **68**(1): 33-39.

- Kokubo, Y., A. Gemma, et al. (2005). "Reduction of PTEN protein and loss of epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancer with natural resistance to gefitinib (IRESSA)." Br J Cancer **92**(9): 1711-1719.
- Kuo, T., C. D. Cho, et al. (2005). Phase II Study of Gefitinib, Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin Therapy in Previously Treated Patients With Metastatic Colorectal Cancer. **23**: 5613-5619.
- Laurent-Puig, P., A. Cayre, et al. (2009). "Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR Status in Determining Benefit From Cetuximab Therapy in Wild-Type KRAS Metastatic Colon Cancer." J Clin Oncol **27**(35): 5924-5930.
- Le Pabic, H., B. Dominique, et al. (2003). ADAM12 in human liver cancers: TGF-beta-regulated expression in stellate cells is associated with matrix remodeling. **37**: 1056-1066.
- Lee, D. S., Y. Yanagimoto Ueta, et al. (2006). "Expression of amphiregulin during the pre- and post-implantation period in the mouse reproductive tract." J Reprod Dev **52**(6): 781-787.
- Lee, S. B., K. Huang, et al. (1999). "The Wilms Tumor Suppressor WT1 Encodes a Transcriptional Activator of amphiregulin." Cell **98**(5): 663-673.
- Leibovitz, A., J. C. Stinson, et al. (1976). Classification of Human Colorectal Adenocarcinoma Cell Lines. **36**: 4562-4569.
- Lievre, A., J. B. Bachet, et al. (2006). "KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer." Cancer Res **66**(8): 3992-3995.
- Lynch, T. J., D. W. Bell, et al. (2004). Activating Mutations in the Epidermal Growth Factor Receptor Underlying Responsiveness of Non-Small-Cell Lung Cancer to Gefitinib. **350**: 2129-2139.
- Mackenzie, M. J., H. W. Hirte, et al. (2005). "A phase II trial of ZD1839 (Iressa) 750 mg per day, an oral epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic colorectal cancer." Invest New Drugs **23**(2): 165-170.
- Mantha, A. J., J. E. L. Hanson, et al. (2005). Targeting the Mevalonate Pathway Inhibits the Function of the Epidermal Growth Factor Receptor. **11**: 2398-2407.
- Markowitz, S. D. and M. M. Bertagnolli (2009). "Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer." N Engl J Med **361**(25): 2449-2460.
- Marks, P. A. and R. Breslow (2007). "Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug." Nat Biotechnol **25**(1): 84-90.
- McKay, J. A., L. J. Murray, et al. (2002). "Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases." Eur J Cancer **38**(17): 2258-2264.
- Mendelsohn, J. (2004). "EGF receptors as a target for cancer therapy." Trans Am Clin Climatol Assoc **115**: 249-253; discussion 253-244.

- Mendelsohn, J. and J. Baselga (2000). "The EGF receptor family as targets for cancer therapy." Oncogene **19**(56): 6550-6565.
- Merchant, N. B., I. Voskresensky, et al. (2008). TACE/ADAM-17: A Component of the Epidermal Growth Factor Receptor Axis and a Promising Therapeutic Target in Colorectal Cancer. **14**: 1182-1191.
- Miranda, E., A. Destro, et al. (2006). "Genetic and epigenetic changes in primary metastatic and nonmetastatic colorectal cancer." Br J Cancer **95**(8): 1101-1107.
- Morgillo, F. and H.-Y. Lee (2005). "Resistance to epidermal growth factor receptor-targeted therapy." Drug Resistance Updates **8**(5): 298-310.
- Mutsaers, A. J., G. Francia, et al. (2009). Dose-Dependent Increases in Circulating TGF- α and Other EGFR Ligands Act As Pharmacodynamic Markers for Optimal Biological Dosing of Cetuximab and Are Tumor Independent. **15**: 2397-2405.
- Neiberghs, H. L., D. W. Hein, et al. (2002). "Genetic profiling of colon cancer." J Surg Oncol **80**(4): 204-213.
- Nelson, W. J. and R. Nusse (2004). Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. **303**: 1483-1487.
- Nguyen, K. S., S. Kobayashi, et al. (2009). "Acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancers dependent on the epidermal growth factor receptor pathway." Clin Lung Cancer **10**(4): 281-289.
- Niesen, M. I., A. R. Osborne, et al. (2005). Activation of a Methylated Promoter Mediated by a Sequence-specific DNA-binding Protein, RFX. **280**: 38914-38922.
- Nilsson, A. and M. Kanje (2005). "Amphiregulin acts as an autocrine survival factor for adult sensory neurons." Neuroreport **16**(3): 213-218.
- Nishimura, T., A. Andoh, et al. (2008). "Amphiregulin and epiregulin expression in neoplastic and inflammatory lesions in the colon." Oncol Rep **19**(1): 105-110.
- Noguchi, P., R. Wallace, et al. (1979). "Characterization of the WIDR: a human colon carcinoma cell line." In Vitro **15**(6): 401-408.
- Normanno, N., M. P. Selvam, et al. (1995). "Amphiregulin anti-sense oligodeoxynucleotides inhibit growth and transformation of a human colon carcinoma cell line." Int J Cancer **62**(6): 762-766.
- Noro, R., A. Gemma, et al. (2007). "PTEN inactivation in lung cancer cells and the effect of its recovery on treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors." Int J Oncol **31**(5): 1157-1163.
- Ogino, S., J. A. Meyerhardt, et al. (2005). Molecular Alterations in Tumors and Response to Combination Chemotherapy with Gefitinib for Advanced Colorectal Cancer. **11**: 6650-6656.
- Okano, M., D. W. Bell, et al. (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." Cell **99**(3): 247-257.

- Ordway, J. M., K. Williams, et al. (2004). "Transcription repression in oncogenic transformation: common targets of epigenetic repression in cells transformed by Fos, Ras or Dnmt1." *Oncogene* **23**(21): 3737-3748.
- Ovejera, A. A., D. P. Houchens, et al. (1978). "Chemotherapy of human tumor xenografts in genetically athymic mice." *Ann Clin Lab Sci* **8**(1): 50-56.
- Paez, J. G., P. A. Janne, et al. (2004). EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *304*: 1497-1500.
- Pao, W., T. Y. Wang, et al. (2005). "KRAS mutations and primary resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib." *PLoS Med* **2**(1): e17.
- Piccart-Gebhart, M. J. (2006). "Adjuvant trastuzumab therapy for HER2-overexpressing breast cancer: what we know and what we still need to learn." *Eur J Cancer* **42**(12): 1715-1719.
- Porebska, I., A. Harlozinska, et al. (2000). "Expression of the tyrosine kinase activity growth factor receptors (EGFR, ERB B2, ERB B3) in colorectal adenocarcinomas and adenomas." *Tumour Biol* **21**(2): 105-115.
- Qi, C. F., D. S. Liscia, et al. (1994). "Expression of transforming growth factor alpha, amphiregulin and cripto-1 in human breast carcinomas." *Br J Cancer* **69**(5): 903-910.
- Qin, L., J. Tamasi, et al. (2005). "Amphiregulin is a novel growth factor involved in normal bone development and in the cellular response to parathyroid hormone stimulation." *J Biol Chem* **280**(5): 3974-3981.
- Razis, E., E. Briasoulis, et al. (2008). Potential value of PTEN in predicting cetuximab response in colorectal cancer: An exploratory study. **8**: 234.
- Renaud, S., D. Loukinov, et al. (2007). "Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene." *Nucl. Acids Res.* **35**(4): 1245-1256.
- Rhee, I., K. E. Bachman, et al. (2002). "DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells." *Nature* **416**(6880): 552-556.
- Roberts, P. J. and C. J. Der (2007). "Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer." *Oncogene* **26**(22): 3291-3310.
- Robertson, K. D. (2001). "DNA methylation, methyltransferases, and cancer." *Oncogene* **20**(24): 3139-3155.
- Rothenberg, M. L., B. LaFleur, et al. (2005). "Randomized phase II trial of the clinical and biological effects of two dose levels of gefitinib in patients with recurrent colorectal adenocarcinoma." *J Clin Oncol* **23**(36): 9265-9274.
- Saeki, T., D. S. Salomon, et al. (1995). "Association of epidermal growth factor-related peptides and type I receptor tyrosine kinase receptors with prognosis of human colorectal carcinomas." *Jpn J Clin Oncol* **25**(6): 240-249.

- Saifo, M., D. Rempinski, et al. (2010). "Targeting the oncogenic protein beta-catenin to enhance chemotherapy outcome against solid human cancers." Molecular Cancer **9**(1): 310.
- Salomon, D. S., R. Brandt, et al. (1995). "Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies." Critical Reviews in Oncology/Hematology **19**(3): 183-232.
- Samowitz, W. S., H. Albertsen, et al. (2005). "Evaluation of a large, population-based sample supports a CpG island methylator phenotype in colon cancer." Gastroenterology **129**(3): 837-845.
- Sartore-Bianchi, A., M. Martini, et al. (2009). PIK3CA Mutations in Colorectal Cancer Are Associated with Clinical Resistance to EGFR-Targeted Monoclonal Antibodies. **69**: 1851-1857.
- Satoshi, Y., T. Yoshimi, et al. (2006). Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. **97**: 64-71.
- Schmidt-Ullrich, R. K., J. N. Contessa, et al. (2003). "ERBB receptor tyrosine kinases and cellular radiation responses." Oncogene **22**(37): 5855-5865.
- Scott, S. A., A. Lakshimikuttysamma, et al. (2007). "Zebularine inhibits human acute myeloid leukemia cell growth in vitro in association with p15INK4B demethylation and reexpression." Experimental hematology **35**(2): 263-273.
- Shoyab, M., V. L. McDonald, et al. (1988). "Amphiregulin: a bifunctional growth-modulating glycoprotein produced by the phorbol 12-myristate 13-acetate-treated human breast adenocarcinoma cell line MCF-7." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(17): 6528-6532.
- Shoyab, M., G. D. Plowman, et al. (1989). "Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family." Science **243**(4894 Pt 1): 1074-1076.
- Siena, S., A. Sartore-Bianchi, et al. (2009). "Biomarkers Predicting Clinical Outcome of Epidermal Growth Factor Receptor-Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer." J. Natl. Cancer Inst. **101**(19): 1308-1324.
- Sirotnak, F. M., M. F. Zakowski, et al. (2000). "Efficacy of cytotoxic agents against human tumor xenografts is markedly enhanced by coadministration of ZD1839 (Iressa), an inhibitor of EGFR tyrosine kinase." Clin Cancer Res **6**(12): 4885-4892.
- Sizemore, N., A. D. Cox, et al. (1999). "Pharmacological inhibition of Ras-transformed epithelial cell growth is linked to down-regulation of epidermal growth factor-related peptides." Gastroenterology **117**(3): 567-576.
- Sorensen, B. S., N. Topping, et al. (2000). "Quantitation of the mRNA expression of the epidermal growth factor system: selective induction of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and amphiregulin expression by growth factor stimulation of prostate stromal cells." J Lab Clin Med **136**(3): 209-217.

- Sternlicht, M. D., S. W. Sunnarborg, et al. (2005). "Mammary ductal morphogenesis requires paracrine activation of stromal EGFR via ADAM17-dependent shedding of epithelial amphiregulin." Development **132**(17): 3923-3933.
- Torrington, N., P. E. Jorgensen, et al. (2000). "Increased expression of heparin binding EGF (HB-EGF), amphiregulin, TGF alpha and epiregulin in androgen-independent prostate cancer cell lines." Anticancer Res **20**(1A): 91-95.
- Toyota, M., N. Ahuja, et al. (1999). "CpG island methylator phenotype in colorectal cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8681-8686.
- Unoki, M. and Y. Nakamura (2003). "Methylation at CpG islands in intron 1 of EGR2 confers enhancer-like activity." FEBS Letters **554**(1-2): 67-72.
- Unoki, M. and Y. Nakamura (2003). "Methylation at CpG islands in intron 1 of EGR2 confers enhancer-like activity." FEBS Lett **554**(1-2): 67-72.
- Veerla, S., I. Panagopoulos, et al. (2008). "Promoter analysis of epigenetically controlled genes in bladder cancer." Genes Chromosomes Cancer **47**(5): 368-378.
- Vendrell, J. A., F. Magnino, et al. (2004). "Estrogen regulation in human breast cancer cells of new downstream gene targets involved in estrogen metabolism, cell proliferation and cell transformation." J Mol Endocrinol **32**(2): 397-414.
- Wierstra, I. (2008). "Sp1: Emerging roles--Beyond constitutive activation of TATA-less housekeeping genes." Biochemical and Biophysical Research Communications **372**(1): 1-13.
- Willmarth, N. E. and S. P. Ethier (2006). "Autocrine and juxtacrine effects of amphiregulin on the proliferative, invasive, and migratory properties of normal and neoplastic human mammary epithelial cells." J Biol Chem **281**(49): 37728-37737.
- Witta, S. E., R. Dziadziuszko, et al. (2009). ErbB-3 expression is associated with E-cadherin and their coexpression restores response to gefitinib in non-small-cell lung cancer (NSCLC). **20**: 689-695.
- Yang, J. L., X. J. Qu, et al. (2005). "Interferon- α Promotes the Anti-Proliferative Effect of Gefitinib (ZD1839) on Human Colon Cancer Cell Lines." Oncology **69**(3): 224-238.
- Yin, J. and F.-S. X. Yu (2009). ERK1/2 Mediate Wounding- and G-protein-Coupled Receptor Ligands-Induced EGFR Activation via Regulating ADAM17 and HB-EGF Shedding. **50**: 132-139.
- Yonesaka, K., K. Zejnullahu, et al. (2008). Autocrine Production of Amphiregulin Predicts Sensitivity to Both Gefitinib and Cetuximab in EGFR Wild-type Cancers. **14**: 6963-6973.
- Yotsumoto, F., H. Yagi, et al. (2008). "Validation of HB-EGF and amphiregulin as targets for human cancer therapy." Biochemical and Biophysical Research Communications **365**(3): 555-561.

- Zhang, H. Y., K. M. Rumilla, et al. (2006). "Association of DNA methylation and epigenetic inactivation of RASSF1A and beta-catenin with metastasis in small bowel carcinoid tumors." Endocrine **30**(3): 299-306.
- Zhou, B.-B. S., M. Peyton, et al. (2006). "Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer." Cancer Cell **10**(1): 39-50.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über das ErbB-Netzwerk. Die Liganden binden an die Rezeptoren und bewirken eine Dimerisierung der Rezeptoren. Für ErbB2 wurde noch kein Ligand detektiert; dieser Rezeptor ist bevorzugt Dimerisierungspartner für ErbB1, ErbB3 und ErbB4. ErbB3 Homodimere besitzen keine Tyrosinkinaseaktivität. (in Anlehnung an (Holbro and Hynes 2004))	10
Abbildung 2: Modellhafte Darstellung der Proteolyse von Pro-AREG zu AREG Protein durch das Enzym ADAM 17. (in Anlehnung an (Sternlicht, Sunnarborg et al. 2005)).....	13
Abbildung 3: Aufbau des Western-Blot.....	30
Abbildung 4: ELISA Sandwich Methode. 1 Mit Fängerantikörper beschichtete feste Phase, z.B. Mikrotiterplatte. 2 Inkubation mit Probe und Bindung des Antigens. 3 Zugabe und Bindung des Detektionsantikörpers. 4 Zugabe und Bindung eines Enzyms. 5 Zugabe eines zum Enzym passenden Substrats, das zu einem dektektierbaren Reaktionsprodukt umgesetzt wird.....	33
Abbildung 5: AREG Western Blot in HCT 116 parental Zelllysaten; Spur: 1- Marker, 2- 50 ng AREG Protein, 3- 100 ng Protein, Spur 4-9: Zelllysate in verschiedenen Lysepuffer: 4- Ripa-Puffer 1, 5- Ripa-Puffer 2, 6- Lysispuffer 1, 7- Lysispuffer 2, 8- MAPK-Lysispuffer, 9- SDS-Lysispuffer; Bedingungen: SDDS-PAGE: 30 µg Protein; Blotten: PVDF-Membran, 45 min, 100 mA; Antikörperinkubation: AREG-AK (R&D) 1:250 in 5%MM 1 h.....	36
Abbildung 6: AREG Protein Konzentration (pg/ml) im Zelllysate von HCT 116 parental und HCT 116 DNMT ^{1-/-} . (ELISA 3, 1:5 Verdünnung)	38
Abbildung 7: AREG nach 96h im Zellkulturüberstand von HCT 116 parental und HCT 116 DNMT ^{1-/-} . Beim Auftragen von HCT 116 parental und HCT 116 DNMT ^{1-/-} - Extrakten im ELISA wurden <i>gleiche Verdünnungen</i> verwendet. (E 9).....	40
Abbildung 8: AREG nach 96h im Zellkulturüberstand von HCT 116 parental Zellen und HCT 116 DNMT ^{1-/-} . Beim Auftragen von HCT 116 parental Zellen und HCT 116 DNMT ^{1-/-} - Extrakten im ELISA wurden <i>gleiche Proteinmengen</i> verwendet. (E 7).....	41
Abbildung 9: DNMT1 Western Blot in HCT 116 parental und HCT 116 DNMT ^{1-/-} als Kontrolle nach 48 h Zebularine Inkubation. Als Ladekontrolle wurde Aktin nachgewiesen..	43
Abbildung 10: AREG Proteinexpression in HCT 116 parental Zellen Zelllysaten nach 48 h Zebularine-Inkubation, Lösungsmittel: DMSO. (E 14)	45
Abbildung 11: AREG Proteinexpression in HCT 116 parental Zelllysate nach 96 h Zebularine-Inkubation, Lösungsmittel: DMSO. (E 14).....	45
Abbildung 12: AREG Proteinexpression in HCT 116 parental Zelllysaten nach 96 h Zebularine-Inkubation, Lösungsmittel: DMSO. (E 15)	46
Abbildung 13: AREG Proteinexpression in HCT 116 parental Zelllysate nach 48 h, 72 h, und 96 h Zebularine Inkubation in HCT 116 parental Zellen, Lösungsmittel: DMSO. (E 16)	48
Abbildung 14: AREG Proteinexpression in Zelllysaten von HCT 116 parental nach 96 h Zebularine Inkubation, Lösungsmittel: Methanol. (E 17).....	49
Abbildung 15: AREG Proteinexpression in Zellkulturüberständen von HCT 116 parental nach 96 h Zebularine Inkubation, Lösungsmittel: Methanol. (E 17).....	50

Abbildung 16: Immunhistochemische Analyse der AREG Protein Expression in HCT 116 Derivaten	51
Abbildung 17: AREG Menge in Zelllysaten diverser Kolonkarzinomzelllinien. (E17,23,24) 52	
Abbildung 18: AREG Menge in Zellkulturüberständen diverser Kolonkarzinomzelllinien. (E 17,23,24).....	52
Abbildung 19: AREG Proteinexpression in Zellkulturüberständen von HCT 116 parental und Derivaten mit DNMT Deletionen. (E12)	54
Abbildung 20: AREG Proteinexpression in Zellkulturüberständen von HCT 116 parental und Derivaten mit DNMT Deletionen. (E10)	55
Abbildung 21: AREG Proteinexpression in HCT 116 parental, HT-29 und SW-707 unter Zebularine-Behandlung.....	57
Abbildung 22: AREG Proteinexpression in SW-948, CX-2, CaCo-2 unter Zebularine-Behandlung.....	58
Abbildung 23: AREG Protein Expression in HCT 116 parental Zelllysaten nach Inkubation mit 5-Aza-2'-Desoxyzytidin über 96h	60
Abbildung 24: RAS/RAF/MEK Kaskade. Die RAS/RAF/MEK wird aktiviert durch Wachstumsfaktoren, die an Tyrosinkinaserzeptoren (TKR) binden, was zur Aktivierung des Ras-Proteins führt. In der Folge davon werden RAF, MEK und ERK in einer Kaskade von Phosphorylierungen aktiviert. ERK kann viele Zielproteine phosphorylieren und die Gentranskription beeinflussen. Die RAS/RAF/MEK-Kaskade kann durch den MEK-Hemmstoff U0126 inhibiert werden.	61
Abbildung 25: AREG Proteinexpression in Zelllysaten von HCT 116 Derivaten mit DNMT-Deletionen nach U0126-Inkubation. (E 13)	62
Abbildung 26: AREG Proteinexpression in Zellkulturüberständen von HCT 116 Derivaten mit DNMT-Deletionen nach U0126-Inkubation. (E 11).....	62
Abbildung 27: AREG Proteinexpression in Zelllysaten diverser Kolonkarzinomzelllinien nach U0126-Inkubation.	63
Abbildung 28: AREG Proteinexpression in Zellkulturüberständen diverser Kolonkarzinomzelllinien nach U0126-Inkubation.....	64
Abbildung 29: Immunhistochemische Analyse der AREG Proteinexpression im Kolongewebe. a) AREG positiver Tumor b) AREG negativer Tumor c) normale Kolonmukosa.	65
Abbildung 30: Verteilung AREG positiver und AREG negativer Tumoren auf die jeweiligen T-Stadien.	67
Abbildung 31: Proliferation von HCT 116 parental nach Applikation des Tyrosinkinaseinhibitors Gefitinib. (MTT 5)	69
Abbildung 32: Proliferation von HCT 116 parental nach Applikation des Lösungsmittels DMSO. (MTT 5)	69
Abbildung 33: Proliferation von HCT 116 DNMT ^{1-/-} nach Applikation des Tyrosinkinaseinhibitors Gefitinib. (MTT 6)	70
Abbildung 34: Proliferation von HCT 116 DNMT ^{1-/-} nach Applikation des Lösungsmittels DMSO. (MTT 6)	71

Abbildung 35: Darstellung des Genlokus 4q13-q21. Die Gene EPGN, EREG, AREG und BTC haben einen ähnlichen Genlokus auf dem Chromosom 4. Die Ziffern geben die Basenpaare an. Die Gene für EPGN, EREG und AREG sind auf dem (+)-DNA-Strang und das Gen für BTC auf dem (-)-DNA-Strang lokalisiert. Quelle: Entrez Gene, NCBI 82

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung und Charakterisierung der verwendeten humanen kolorektalen Tumorzelllinien. ATCC= American Type Culture Collection, CLS=Cell Lines Service. Die Angaben über die genetischen Alterationen von HCT 116, HT-29 und SW-480 beziehen sich auf (Gayet, Zhou et al. 2001)	20
Tabelle 2: Liste der verwendeten Chemikalien.....	21
Tabelle 3: Liste der verwendeten Inhibitoren	22
Tabelle 4: Liste der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper.....	22
Tabelle 5: Liste der verwendeten kommerziellen Kits.....	22
Tabelle 6: Liste der verwendeten Medien.....	23
Tabelle 7: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	23
Tabelle 8: Liste der verwendeten Geräte.....	24
Tabelle 9: Zusammensetzung des SDS-Polyacrylamid-Gels, TG=Trenngel, SG= Sammelgel.	29
Tabelle 10: Statistische Auswertung der histologischen Charakterisierung des Tumorkollektivs	66
Tabelle 11: Übersicht über diverse Gene für die eine Aktivierung durch DNA-Methylierung beschrieben wurde.....	77

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

Publikationsliste

Nazarenko I, Kristiansen G, Fonfara S, Guenther R, Gieseler C, Kemmer W, Schäfer R, Petersen I and Sers C. „H-REV107-1“ stimulates growth in non-small cell lung carcinomas via the activation of mitogenic signaling“ American Journal of Pathology 2006 Oct;169(4):1427-39

Danksagung

An erster Stelle geht mein ganz herzlicher Dank an Frau PD Dr. rer. nat. Christine Sers für die Überlassung des Themas, das Vertrauen in meine Person, der Fähigkeit für wissenschaftliche Kontexte begeistern und motivieren zu können und der geduldigen Betreuung dieser Arbeit.

Auch möchte ich ganz herzlich den Mitarbeitern der AG Molekulare Tumorpathologie, vorangehend dem Leiter Herrn Prof. Dr. rer. nat. Reinhold Schäfer danken. Desgleichen gilt mein großer und besonderer Dank Cornelia Gieseler, Jana Keil, Berit Lenz und Dr. Andrea Solf. Stets verwandelten sie mit Humor und einem Lächeln große Probleme in kleine und zauberten kleine schließlich weg.

Ebenso gilt der Berliner Krebsgesellschaft ein großes Dankeschön, die mit einem Stipendium den praktischen Teil dieser Arbeit finanziell ermöglichten.

Für die finanzielle Unterstützung und immer währende Geduld während dieser Arbeit und des ganzen Studiums möchte ich mich ganz besonders bei Ute Fonfara und Kurt Fonfara bedanken.

Ein abschließender Dank gilt meinem Freundes- und Familienkreis. Hier insbesondere Judith Christoph, die mir während der Laborphase mit Motivationshilfe und Neugier bei Seite stand und Konrad Fonfara dem zu Dank ich nun endlich sagen kann "Who killed Bambi?-I did!"

Selbständigkeitserklärung

Ich, Sabine Fonfara, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Regulation des EGFR-Liganden Amphiregulin über DNA-Methylierung und MAPK-Kaskade" 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.

Datum

Unterschrift