

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

DISSERTATION

Die Regulation der EGF-Rezeptor-Liganden Amphiregulin
und Betacellulin in Kolonkarzinomzellen
durch DNA-Methylierung

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anne Sophie Kelm
aus Berlin

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Chr. Sers

2. Prof. Dr. med. I. Petersen

3. Priv. Doz. Dr. I. Tinhofer-Keilholz

Datum der Promotion: 30.11.2012

I Inhaltsverzeichnis

I Inhaltsverzeichnis	i
II Abbildungsverzeichnis	iv
III Tabellenverzeichnis	v
IV Abkürzungsverzeichnis	vi
IV.1 Gene	vi
IV.2 Andere Biomoleküle	vii
IV.3 Material und Methoden	vii
IV.4 Klinik	viii
1 Einleitung	1
1.1. Kolorektale Karzinome	1
1.2 Mechanismen der Tumorentstehung	2
1.2.1 Genetische Veränderungen	2
1.2.1.1 Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)	3
1.2.1.2 Liganden des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors	4
1.2.1.3 Das Ras/Raf-Signalnetzwerk	6
1.2.2 Epigenetische Veränderungen	7
1.2.2.1 DNA-Methylierung	7
1.3 Therapeutische Ansätze	9
1.3.1 Tyrosinkinaseinhibitoren	10
1.3.2 Antikörper gegen den Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor	12
2 Fragestellung	14
3 Material und Methoden	15
3.1 Material	15
3.1.1 Geräte und Chemikalien	16
3.1.2 Software	19
3.1.3 Stammlösungen und Puffer	19
3.2 Methoden	23

3.2.1 Zellen und Zellkultur	23
3.2.1.1 Verwendete Zelllinien	23
3.2.1.2 Zellkultur	24
3.2.2 Behandlung mit Inhibitoren und siRNA-Experimente	25
3.2.2.1 Behandlung mit Zebularin	25
3.2.2.2 Behandlung mit Gefitinib	25
3.2.2.3 Behandlung mit Cetuximab	26
3.2.2.4 siRNA-vermittelte Hemmung der Genexpression	26
3.2.3 Aufreinigungen	28
3.2.3.1 Proteinisolierung	28
3.2.3.2 Isolierung von RNA	29
3.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Amido-Schwarz	30
3.2.4 Analytische Methoden	30
3.2.4.1 SDS-PAGE und Western Blot	30
3.2.4.2 Messung von AREG und BTC mittels Sandwich-ELISA	32
3.2.4.3 Northern Blot	33
3.2.4.4 Immunpräzipitation	34
3.2.4.5 Wachstums-Assays mit AlamarBlue	35
4 Ergebnisse	36
4.1 Expression von EGFR, AREG und BTC in humanen Kolonkarzinomzellen	36
4.1.1 Bestimmung der EGFR-Expression	36
4.1.2 Bestimmung der Expression der EGFR-Liganden AREG und BTC	37
4.1.2.1 Vergleich der AREG-Konzentration in parentalen HCT116 und DNMT-Knockout-Zellen	37
4.1.2.2 Bestimmung der direkten Abhängigkeit der AREG- Proteinexpression vom Methylierungsstatus	38
4.1.2.3 Bestimmung der mRNA-Expression von AREG in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus	41
4.1.2.2 Bestimmung der Konzentration von Betacellulin	42
4.2 Die Rolle von Amphiregulin für die EGFR-Funktion und das Zellwachstum	45
4.2.1 Einfluß von Amphiregulin auf den Phosphorylierungsstatus des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors	45

4.2.2 Wirkung des EGFR-Inhibitors Gefitinib auf die Proliferation von HCT116 und HCT116 DNMT1-/-	46
4.2.3 siRNA-vermittelte Hemmung von Amphiregulin und Auswirkungen der Hemmung auf das Ansprechen der Zelle auf Gefitinib	48
4.2.4 Wirkung des Antikörpers Cetuximab auf die Proliferation von HCT116 und HT29	53
5 Diskussion	55
5.1 Kritische Bewertung der Ergebnisse	55
5.1.1 Korrelation zwischen der Expression von EGFR und seinen Liganden	55
5.1.2 Zusammenhang zwischen Protein-Expression und Zellproliferation	57
5.1.3 Zusammenhang DNA-Methylierung und Protein-Expression	58
5.1.4 Sensitivität gegenüber Gefitinib	59
5.1.5 Sensitivität gegenüber Cetuximab	61
5.2 Methodische Limitationen	63
5.2.1 Zelllinien	63
5.2.2 siRNA	63
5.2.3 Northern Blot	64
5.2.4 Gefitinib	65
5.3 Klinische Einordnung	65
5.4 Schlußfolgerung	66
6 Zusammenfassung	68
7 Anhang	
7.1 Literaturverzeichnis	70
7.2 Danksagung	79
7.3 Lebenslauf	80
7.4 Publikationsliste	82
7.5 Eigenständigkeitserklärung	83

II Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.1: EGFR in HCT116 parental, DNMT1 ^{-/-} , DNMT3b ^{-/-} und DKO	36
Abb. 4.2: Relativer EGFR-Gehalt der HCT116-Zelllinien im Vergleich	37
Abb. 4.3: Konzentration von AREG im Zellysat von HCT116, HCT116 DNMT1 ^{-/-} , HCT116 DNMT3b ^{-/-} und HCT116 DKO	38
Abb. 4.4: Expression der DNMT1 in HCT116 nach Behandlung mit Zebularin	39
Abb. 4.5: Konzentration von AREG im Zellysat von HCT116 nach Behandlung mit Zebularin	40
Abb. 4.6: Konzentration von AREG im Zellüberstand von HCT116 nach Behandlung mit Zebularin	40
Abb. 4.7: AREG mRNA in HCT116 nach Behandlung mit Zebularin	41
Abb. 4.8: Relativer AREG-mRNA-Gehalt in HCT116 nach Behandlung mit Zebularin und in HCT116 DNMT1 ^{-/-}	42
Abb. 4.9: Konzentration von BTC im Zellüberstand von HCT116 nach Behandlung der Zellen mit Zebularin sowie von HCT116 DNMT1 ^{-/-}	43
Abb. 4.10: Konzentration von BTC im Zellysat von HCT116, HCT116 DNMT1 ^{-/-} , DNMT3b ^{-/-} und DKO	44
Abb. 4.11: Konzentration von BTC im Zellysat von HCT116 nach Behandlung mit Zebularin	44
Abb. 4.12: Wachstum von HCT116 nach Behandlung mit Gefitinib	47
Abb. 4.13: Wachstum von HCT116 DNMT1 ^{-/-} nach Behandlung mit Gefitinib	48
Abb. 4.14: Effizienz des siRNA-vermittelten Knockdowns von AREG in HCT116	49
Abb. 4.15: Wachstum von HCT116 nach siRNA-vermittelter Hemmung von AREG und Behandlung mit Gefitinib	50
Abb. 4.16: Effizienz des siRNA-vermittelten Knockdowns von AREG in HT29-Zellen	51
Abb. 4.17: Wachstum von HT29 nach siRNA-vermittelter Hemmung von AREG und Behandlung mit Gefitinib	52
Abb. 4.18: Wachstum von HCT116 nach Behandlung mit Cetuximab	53
Abb. 4.19: Wachstum von HT29 nach Behandlung mit Cetuximab	54

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: Zelllinien	15
Tabelle 3.2: siRNAs	15
Tabelle 3.3: Verwendete Primärantikörper	15
Tabelle 3.4.: Verwendete Sekundärantikörper	16
Tabelle 3.5: Geräte und Materialien	16
Tabelle 3.6: Fortsetzung Tabelle 3.5: Geräte und Materialien	17
Tabelle 3.7: Chemikalien	17
Tabelle 3.8: Fortsetzung Tabelle 3.7: Chemikalien	18
Tabelle 3.9: Antibiotika	18
Tabelle 3.10: Kits	18
Tabelle 3.11: Inhibitoren	19
Tabelle 3.12: Transfektionsreagenzien	19
Tabelle 3.13: Software	19
Tabelle 3.14: Stammlösungen und Puffer	19
Tabelle 3.15: Fortsetzung Tabelle 3.14: Stammlösungen und Puffer	20
Tabelle 3.16: Fortsetzung Stammlösungen und Puffer	21
Tabelle 3.17: Fortsetzung Stammlösungen und Puffer	22
Tabelle 3.18: Zusammensetzung der Gele für Westernblot	22
Tabelle 3.19: Zusammensetzung der RNA-Gele	22
Tabelle 3.20: Übersicht über eingesetzten Substanzen und Konzentrationen	33

IV Abkürzungsverzeichnis

IV.1 Gene

APC	adenomatous-polyposis-coli
AREG	Amphiregulin
BCL6	B-cell lymphoma 6
BTC	Betacellulin
CRBP1	cellular retinol binding protein-1
CTCF	11 zinc finger transcriptional repressor
EGF	epidermal growth factor
EGFR	epidermal growth factor receptor
ErbB	erythroblastic leukemia viral oncogene
EREG	Epiregulin
ERK	extracellular signal-related kinase
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
H-Ras	Harvey-Ras
HER 2/Neu	human epidermal growth factor receptor 2
hMLH1	hereditary non polyposis colorectal cancer
K-Ras	Kirsten-Ras
MEK	mitogen-activated protein kinase
MGMT	methylated-DNA-protein-cysteine methyltransferase
N-Ras	Neuroblastoma-Ras
p14ARF	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p16INK4a	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
p27^{Kip1}	cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
PIK3CA	phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha
Raf	rapidly accelerated fibrosarcoma
RARB2	retinoic acid receptor B2
Ras	rat sarcoma
SV40	simian vacuolating virus 40
TGF-α	transforming growth factor alpha
Wnt	wingless Int-1
WRN	Werner syndrome ATP-dependent helicase

IV.2 Andere Biomoleküle

cDNA	complementary DNA
DNA	desoxyribonucleic acid
DNMT	DNA-Methyltransferase
GAP	GTPase activating protein
GDP	Guanindiphosphat
GEF	guanine nucleotide-Exchange-Factor
GTP	Guanintriphosphat
HDAC	Histondeacetylase
MBP	Methylcytosin-bindendes Protein
mRNA	messenger RNA
RNA	ribonucleic acid
RISC	RNA interference silencing
siRNA	small interfering RNA
t-RNA	transfer RNA

IV.3 Material und Methoden

Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
BSA	bovine serum albumine
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGTA	ethylene glycol tetraacetic acid
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
FCS	Fötales Kälberserum
HRP-α	horse radish peroxydase
LB	Loading buffer
MM	Magermilch
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline plus Tween

RD	reagent diluent
RIPA	radioimmunoprecipitation assay buffer
RT	Raumtemperatur
rt-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamid Gel Elektrophorese
TBST	Tris buffered saline plus Tween

IV.4 Klinik

FOLFIRI	Irinotecan plus 5-Fluorouracil/Folinsäure
MAb	monoclonal antibody
NSCLC	non small cell lung cancer
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor

1 Einleitung

1.1. Kolorektale Karzinome

Kolorektale Karzinome gehören zu den häufigsten Krebserkrankungen des Menschen. In Deutschland waren sie im Jahr 2008 mit einer Inzidenz von ca. 73/100 000 Einwohner die am zweithäufigsten diagnostizierte Krebsart bei beiden Geschlechtern und stellten die zweithäufigste Krebstodesursache nach dem Bronchialkarzinom beim Mann und dem Mammakarzinom der Frau dar (Ferlay et al., 2010; Robert-Koch-Institut, 2008).

Für die Entwicklung eines epithelialen Tumors bedarf es bestimmter genetischer und epigenetischer Veränderungen, die sich im Verlauf von vielen Jahren anhäufen und von den betroffenen Zellen an ihre Tochterzellen weitergegeben werden (Jones und Baylin, 2002). In ihrer Summe versetzen diese Veränderungen die Zelle in die Lage, unabhängig von äußeren Stimuli zu proliferieren. Im Falle des kolorektalen Karzinoms erfolgt die Transformation von Epithelzellen des Dickdarms zu malignen Tumorzellen in einer Reihe von vorhersagbaren genetischen und epigenetischen Schritten, die zunächst die Entwicklung eines Adenoms und im weiteren Verlauf eines Karzinoms begünstigen. Man spricht von einer Adenom-Karzinom-Sequenz (Nowell, 1976). Hierbei typischerweise auftretende Veränderungen betreffen neben dem APC-Gen und Regulatoren des Zellzyklus wie p53 auch solche Gene, deren Produkte auf verschiedenen Ebenen von Signalkaskaden Wachstum, Überleben und Proliferation der Zelle begünstigen. Unter diesen Signalwegen spielt der Ras/Raf/MEK/ERK-Weg eine herausragende Rolle (Markowitz und Bertagnoli, 2009). So finden sich in Kolonkarzinomen häufig Mutationen an K-Ras (Karnoub und Weinberg, 2008). Auch die Überexpression des der Ras-abhängigen Signalkaskade vorgeschalteten EGF-Rezeptors ist in kolorektalen Karzinomen ein häufig beobachtetes Phänomen (Holbro und Hynes, 2004).

1.2 Mechanismen der Tumorentstehung

1.2.1 Genetische Veränderungen

Die Besonderheit von Tumorerkrankungen gegenüber anderen genetisch bedingten Erkrankungen besteht darin, daß der Tumorgenese meist somatische, und weniger häufig Mutationen der Keimbahn, zugrunde liegen. Ferner entsteht ein Tumor nicht durch eine einzige, isolierte Mutation, sondern durch mehrere verschiedene Mutationen, die im Laufe der Jahre akkumulieren (Multi-Hit-Konzept). Dieses Modell erklärt, warum die Inzidenz von Tumorerkrankungen mit steigendem Lebensalter zunimmt (Vogelstein und Kinzler, 1993).

Die möglichen genetischen Veränderungen in kanzerös veränderten Zellen sind dabei von zweierlei Art: In sogenannten Proto-Onkogenen, regulatorischen Genen, die verschiedene Aspekte des Zellwachstums und der Differenzierung pro-proliferativ beeinflussen, sind sie typischerweise dominant. Das bedeutet, daß bereits eine Mutation auf einem der beiden Allele in einer Funktionszunahme des Proteins resultiert. In sogenannten Tumorsuppressor- oder Anti-Onkogenen, die für die Kontrolle des Zellzyklus oder die Regulation der Apoptose verantwortlich sind, bewirken die onkogenen Mutationen einen Funktionsverlust. Dafür sind Mutationsereignisse in beiden Allelen nötig, diese Mutationen sind also rezessiv (Bishop, 1991). Beide Mutationsarten begünstigen eine ungehemmte Proliferation der betroffenen Zelle. Kommt es zusätzlich zu Defekten in Genen, die DNA-Reparaturmechanismen regeln, prädisponiert der Funktionsverlust dieser Gene die Zelle zu weiteren Mutationen, die das Tumorwachstum weiter fördern können. Hinzu kommt, daß Zellen, die diesen Veränderungen in ihrem Gen-Expressionsmuster unterliegen, in der Regel einen relativen Wachstumsvorteil gegenüber nicht-transformierten Zellen besitzen (Salomon et al., 1995).

1.2.1.1 Der Epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR)

Der Großteil der Zellen des adulten Organismus befindet sich in einem ruhenden, inaktiven Zustand. Um von diesem Ruhezustand in einen aktiven, proliferierenden Zustand zu gelangen, etwa zum Zweck der Erneuerung eines Gewebes, benötigen Zellen mitogene Wachstumssignale aus der Umgebung. Diese Signale gelangen über transmembranäre Rezeptoren in die Zelle. Die Aktivierung dieser Rezeptoren setzt im Zellinneren verschiedene Signalkaskaden in Gang, die ihrerseits die Expression von Genen steuern und auf diese Weise ein biologisches Ergebnis bewirken (Holbro und Hynes, 2004). Ein wichtiger Vertreter dieser membrangebundenen Rezeptoren ist der Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR).

Der EGFR gehört zur Familie der ErbB-Rezeptoren, einer Gruppe von vier verschiedenen Rezeptor-Tyrosinkinasen, die eine entscheidende Rolle im Zellwachstum, in der Entwicklung und bei der Homöostase spielen. ErbB-Rezeptoren bestehen aus einem extrazellulären Abschnitt mit zwei Bindungsstellen für Liganden, einem extrazellulären juxtamembranären Bereich, einer hydrophoben Transmembrandomäne, einer zytoplasmatischen Region mit Tyrosinkinaseaktivität und mehreren zytoplasmatisch gelegenen Tyrosinresten, die als Phosphorylierungsstellen dienen. Die Bindung eines EGF-ähnlichen Liganden induziert eine vorübergehende Homo- oder Hetero-Dimerisierung des Rezeptors, infolge derer es zur Autophosphorylierung der zytoplasmatischen Domäne des Rezeptors und zu einer Aktivierung von nachgeschalteten Signalkaskaden, wie z.B. Ras/Raf/MEK/ERK, kommt. Das Vorkommen von vier verschiedenen ErbB-Rezeptortypen sowie einer Vielzahl von Liganden ermöglicht die Bildung verschiedenster Hetero- und Homodimere. Dadurch wird eine große Diversität in der Signalverarbeitung erreicht (Holbro und Hynes, 2004).

Bei mehreren Krebsarten werden ErbB-Rezeptoren, insbesondere ErbB1 und ErbB2, konstitutiv aktiviert. Zugrunde liegen entweder eine vermehrte Bildung autokrin wirkender Liganden, eine Überexpression des Rezeptors oder Mutationen. Ist der Rezeptor onkogen verändert, bleibt die dimere Form bestehen. Der Rezeptor ist nun auch ohne Bindung eines Liganden aktiviert und liefert kontinuierlich mitogene Signale an die Zelle. Mutationen in den Genen für die Rezeptoren der ErbB-Familie spielen in zahlreichen humanen Tumoren eine zentrale Rolle (Holbro et al., 2003; Roberts und Der, 2007). Auch ihre Überexpression ist ein Phänomen, das in etwa

einem Drittel aller epithelialen Tumoren beobachtet wird (Mendelsohn, 2004). So wird ErbB1 verschiedenen Studien zufolge in bis zu 80 % aller Plattenepithelkarzinome der Lunge, in 50 % der Glioblastome, in 80 - 100 % der Kopf- und Halstumoren, in 30 - 50 % der Pankreaskarzinome, in 27 - 77 % der kolorektalen Karzinome und außerdem in Karzinomen der Harnblase überexprimiert (Roberts und Der, 2007). Die Expression von ErbB2 (HER 2/Neu) ist in etwa 25 % der Mammakarzinome sowie in Adenokarzinomen von Ovarien, Lunge, Magen und Speicheldrüsen erhöht (Bianco et al., 2005). Die Überexpression von EGFR korreliert bei einer Reihe von Tumoren mit einer schlechteren Prognose und einem ungünstigen klinischen Verlauf der Erkrankung (Bianco et al., 2005). Die Deregulation von EGFR-gesteuerten Signalkaskaden und die so induzierte Änderung der EGF-abhängigen Genexpression tragen zusätzlich zur Entstehung von Tumoren, auch zu deren Progression und Metastasierung bei (Riese et al., 2007).

1.2.1.2 Liganden des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors

Bei der Klasse der EGF-Rezeptorliganden handelt es sich um eine Gruppe von Peptidhormonen, die agonistisch am EGF-Rezeptor wirken. Dazu zählen neben EGF auch TGF- α , Betacellulin, Amphiregulin, Epiregulin, Epigen, Heparin-binding EGF growth factor und Vertreter aus der Klasse der Neureguline (Yarden und Sliwkowski, 2001).

Die Bildung einiger dieser Liganden erfolgt als Reaktion der Zelle auf Wachstumssignale aus der Umgebung in Abhängigkeit des EGF-Rezeptors. Der neugebildete Ligand wird von der Zelle sezerniert und kann nun seinerseits wieder an den Rezeptor binden, auf dessen Signal hin seine Bildung initiiert wurde. Auf diese Weise kann er parakrin, juxtakrin oder autokrin wirken (Willmarth und Ethier, 2006).

Ist der EGF-Rezeptor selbst oder ein Bestandteil der nachgeschalteten Signalkaskade, zum Beispiel das Ras-Protein, konstitutiv aktiv, so werden unabhängig von exogenen Wachstumsreizen kontinuierlich EGFR- bzw. Ras-abhängige Proteine gebildet und sezerniert. Da ich mich in der vorliegende Arbeit auf die Liganden Amphiregulin und Betacellulin konzentriert habe, sollen diese beiden Liganden hier näher beschrieben werden.

Amphiregulin (AREG) ist ein Polypeptid, das agonistisch am EGF-Rezeptor wirkt. Seine Bindung induziert die Autophosphorylierung und Aktivierung der EGFR-intrinsischen Tyrosinkinase. Charakterisiert wurde es 1993 von Johnson et al., die es im konditionierten Medium humaner MCF-7 Mammakarzinomzellen nachweisen konnten (Johnson et al., 1993). Es wurden Varianten der Größen 16,5 kDa und 9,5 kDa isoliert. Das aktive Amphiregulin ist ein 84 Aminosäuren langes Residualprotein, das eine Sequenzhomologie zu den anderen Mitgliedern der EGF-Familie aufweist (Shoyab et al., 1989). Es wird ursprünglich als transmembranäre Vorstufe synthetisiert, wobei sich der aktive Teil an der Außenseite der Zellmembran befindet und durch Metalloproteasen proteolytisch abgespalten wird (Hinkle et al., 2004). Sowohl die sezernierte Form als auch die membrangebundene Variante sind in der Lage, den EGFR auf benachbarten Zellen oder auf der Zellmembran der Ursprungszelle zu aktivieren (Singh und Harris, 2005; Willmarth und Ethier, 2006). Im letzteren Fall entsteht eine autokrine Schleife. Autokrine Schleifen mit Amphiregulin spielen bei der Entstehung zahlreicher Tumorentitäten, unter anderem bei der von Pankreaskarzinomen, kolorektalen Karzinomen und hepatozellulären Karzinomen, eine Rolle (Willmarth und Ethier, 2006). AREG wird physiologisch in einer Vielzahl von adulten Geweben exprimiert, insbesondere in Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts (Salomon et al., 1995). Weitere Orte der Synthese sind die Submandibulardrüse, die Brunner-Drüsen des Duodenums und die Nieren. In der Zellkultur ist AREG in der Lage, das Wachstum von Karzinomzellen, Fibroblasten und Keratinozyten zu stimulieren, das Wachstum einiger Karzinomzelllinien wird allerdings auch gehemmt (Johnson et al., 1993). Etwa 50 % der humanen Kolonkarzinome exprimieren AREG (Saeki et al., 1992).

Betacellulin (BTC) wurde ursprünglich im konditionierten Medium von pankreatischen β -Zell-Insulinomen der Maus isoliert, bei denen das SV40-Large-T-Onkogen unter die Kontrolle des Insulinpromotors gebracht worden war (Shing et al., 1993). Später konnte die Betacellulin-cDNA aus humanen MCF-7 Mammakarzinomzellen isoliert werden (Sasada et al., 1993). Das reife Peptid besteht bei einem Molekulargewicht von 32 kDa aus 80 Aminosäuren, die membrangebundene Vorläuferstufe bei der Maus aus 177, beim Menschen aus 178 Aminosäuren. Das Protein ist zwischen Mensch und Maus zu 79 % homolog (Salomon et al., 1995). BTC bindet EGFR mit etwa einem Zehntel der Affinität von

EGF und besitzt eine mitogene Wirkung auf Mausfibroblasten und glatte Muskelzellen. In Mäusen werden hohe Level von BTC-mRNA in Leber und Niere und geringere Mengen in Lunge, Herz, Darm und Uterus exprimiert (Salomon et al., 1995). Beim Menschen wird Betacellulin hauptsächlich im Pankreas und im Dünndarm exprimiert (Seno et al., 1996).

1.2.1.3 Das Ras/Raf-Signalnetzwerk

Eine zentrale Stellung unter den am Zellwachstum beteiligten Signalkaskaden nimmt das Ras/Raf-Signalnetzwerk ein. Ras-GTPasen wirken als GDP/GTP-regulierte molekulare Schalter, die Signale von Rezeptoren auf der Zelloberfläche auf intrazelluläre Kaskaden übertragen und so an der Steuerung der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Apoptose und Seneszenz beteiligt sind (Omerovic et al., 2008). Ras-Proteine sind in drei Isoformen bekannt, H- K- und N-Ras. In kolorektalen Karzinomen spielen mutierte K-Ras-Gene eine große Rolle (Karnoub und Weinberg, 2008).

In normalen, ruhenden Zellen ist Ras an GDP gebunden und inaktiv. Extrazelluläre Stimuli (z.B. durch den Wachstumsfaktor EGF) rufen eine vorübergehende Bindung an GTP hervor, die zur Aktivierung des Ras-Proteins führt. Der Austausch von GDP und GTP wird dabei durch sogenannte Guanine-Nucleotid-Exchange-Faktoren (RasGEFs) gesteuert. Ihnen entgegen stehen die GTPase-aktivierenden Proteine (GAPs). Sie stimulieren die Hydrolyse von GTP durch Ras und bewirken so seine Inaktivierung (Mitin et al., 2005). In 30 % aller malignen Tumore ist Ras durch Mutation permanent aktiv (Cengel et al., 2007). Die mutierten Ras-Gene kodieren dabei für mutierte Ras-Proteine, die Substitutionen von einzelnen Aminosäuren aufweisen. Vornehmlich betroffen sind die Aminosäurereste G12, G13 oder Q61. Die onkogenen Ras-Proteine sind GAP-Proteinen gegenüber unempfindlich, was dazu führt, daß sie ständig an GTP gebunden sind und somit in ihrem aktiven Zustand verbleiben. Dadurch werden unabhängig von äußeren Stimuli fortwährend nachgeschaltete Effektoren aktiviert, unter anderem die der Raf-MEK-ERK-Kaskade (Mitin et al., 2005). Die höchsten Prävalenzen für mutierte Ras-Gene finden sich in Pankreaskarzinomen (90 %), Kolonkarzinomen (50 %), Schilddrüsenkarzinomen (50 %), Lungenkarzinomen (30 %) und malignen Melanomen (25 %) (Malumbres und Barbacid, 2003).

1.2.2 Epigenetische Veränderungen

Zusätzlich zu den genetischen Veränderungen in Tumorzellen spielen Veränderungen auf epigenetischer Ebene eine wichtige Rolle (Jones und Baylin, 2002). Im Unterschied zu genetischen Aberrationen sind epigenetische Veränderungen solche, die langfristig die Genexpression betreffen, ohne daß dabei die Sequenz der DNA-Nukleotide selbst verändert wäre. Im Laufe der Embryonalentwicklung und der Zelldifferenzierung werden auf diese Weise einzelne, für die weitere Differenzierung nicht mehr benötigte, Gene des Genoms stillgelegt. Beispiele sind die Stilllegung des zweiten X-Chromosoms bei der Frau und die entwicklungsbedingte Apoptosekontrolle von Geweben während der Embryogenese (Klose und Bird, 2006). Ferner stellen epigenetische Prozesse einen wichtigen Faktor bei der zellulären Seneszenz und dem Altern von Organismen dar (Fraga und Esteller, 2007). Die am besten beschriebenen epigenetischen Modifikationen sind die DNA-Methylierung und die posttranslationale Histonmodifikation. Zu letzterer zählen die Histonmethylierung, -acetylierung, -ubiquitinierung und -phosphorylierung (Jenuwein und Allis, 2001). Die transkriptionelle Unterdrückung von Tumorsuppressorgenen durch Hypermethylierung des Promoters ist ein Phänomen, das in allen menschlichen Tumoren nachweisbar ist. Dabei sind Anzahl und Art der durch Methylierung stillgelegten Tumorsuppressorgene in den unterschiedlichen Tumorentitäten verschieden, so daß jede Tumorart über ein charakteristisches Methylierungsmuster verfügt. Zu den häufig betroffenen Tumorsuppressorgenen in kolorektalen Karzinomen zählen Gene, die am Zellzyklus beteiligt sind wie p16INK4a und p14ARF, DNA-Reparaturgene wie hMLH1, MGMT und WRN, Bestandteile des Wnt-Signalweges wie APC und am Vitaminstoffwechsel beteiligte Gene wie RARB2 und CRBP1 (Esteller, 2007).

1.2.2.1 DNA-Methylierung

Bei der DNA-Methylierung werden an bestimmte Cytosinbasen des DNA-Strangs Methylgruppen angehängt. Dies verändert die Struktur und damit die Funktionsweise der DNA in den betroffenen Abschnitten des Chromosoms. Geschieht DNA-Methylierung in der Nachbarschaft eines Genpromotors, kann sie die Transkription des entsprechenden Gens unterdrücken. Dieser Effekt beruht auf verschiedenen

Mechanismen: einerseits verhindert die Methylierung im Promotorbereich die Bindung von Transkriptionsfaktoren und führt auf diesem Wege zu einer Stilllegung des entsprechenden Gens (Nguyen et al., 2001; Watt und Molloy, 1988). Umgekehrt kann durch die Entfernung von Methylgruppen aus der Region eines Genpromotors die Transkription wiederaufgenommen werden (Esteller, 2007). Andererseits können mithilfe der Methylgruppen bestimmte Proteinkomplexe an die DNA binden, die sowohl Methylcytosin-bindende Proteine (MBPs) als auch Histondeacetylasen (HDACs) enthalten. Letzere sind in der Lage, Acetatgruppen von Histonmolekülen zu entfernen. Dadurch kommt es zu einer Ladungsänderung des Histons und somit zur Konfigurationsänderung des Chromatins, das nun in einer Konformation vorliegt, in der die Transkription nicht möglich ist (Jones et al., 1998).

Gesteuert wird diese Modifikation durch eine Gruppe spezifischer Enzyme, die DNA-Methyltransferasen (DNMTs). Durch sie wird im Anschluß an die DNA-Synthese bestimmten Cytosinbasen an Position 5 ihres Pyrimidinrings eine Methylgruppe angehängt. Methylcytosine finden sich ausschließlich an solchen Cytidinbasen, die in Cytidin-Guanidin-Dinukleotiden, sogenannten CpG-Paaren, vorliegen. Diese Dinukleotide sind in großen Teilen des Säugetiergenoms unterrepräsentiert. Es gibt jedoch kurze Abschnitte von etwa 0,5-4 kb Länge, die reich an CpG-Dinukleotiden sind und als CpG-Inseln bezeichnet werden. Die meisten CpG-Inseln befinden sich in den proximalen Promoterregionen von fast der Hälfte aller Gene des Säugetiergenoms (Jones und Baylin, 2002).

Bei Säugetieren werden zwei Klassen von DNA-Methyltransferasen unterschieden. Die de-novo Methyltransferasen DNMT3a und DNMT3b sind hauptsächlich für die Methylierung solcher CpG-Inseln verantwortlich, die vorher unmethyliert waren. Die Erhaltungs- oder „maintainance“ Methyltransferase DNMT1 hingegen kopiert während der DNA-Replikation die bereits existierenden Methylierungsmuster auf den neugebildeten DNA-Strang. Auf diese Weise können epigenetische Muster an Tochterzellen vererbt werden. Neuere Studien mit stabilen Knockout-Zelllinien für DNMT1, DNMT3b und den Doppelknockout DNMT1/DNMT3b zeigen, daß beide Enzyme sowohl bei der de-novo als auch bei der maintainance Methylierung eine Rolle spielen und sich gegenseitig ergänzen, da ausschließlich in Doppelknockoutzellen eine weitreichende Hypomethylierung und entsprechende Aktivierung von Genen beobachtet werden konnte (Paz et al., 2003; Rhee et al., 2002). Eine vierte DNA-Methyltransferase, DNMT2, scheint im Aufbau des DNA-

Methylierungsmusters der Zelle nur eine untergeordnete Rolle zu spielen (Klose und Bird, 2006). Stattdessen konnte gezeigt werden, daß DNMT2 eine ausgeprägte tRNA-Methyltransferase-Aktivität aufweist (Goll et al., 2006).

Im Genom von Krebszellen kann man zwei gegensätzliche Phänomene, die den Methylierungsstatus betreffen, beobachten. Mit fortschreitender Tumorentwicklung sinkt der Gesamtmethylierungsstatus der Zelle ab, was vermutlich auf einen Funktionsverlust der Erhaltungs-Methyltransferasen zurückzuführen ist. Da die DNA-Methylierung an der Stabilisierung des Chromatins beteiligt ist, geht diese globale Hypomethylierung mit chromosomaler Instabilität einher und kann auf diesem Wege die Tumorgenese begünstigen (Lu et al., 2006). Gleichzeitig werden lokalisierte Bereiche hoher CpG-Dichte über die Maßen methyliert. Da diese CpG-Inseln hauptsächlich im Bereich von Genpromotoren anzutreffen sind, bedeutet das, daß de-novo Methyltransferasen die Transkription von Genen unterdrücken, die eigentlich aktiv sein sollten. Werden auf diese Weise Gene stillgelegt, die als Tumorsuppressorgene wirken, trägt dieser Mechanismus zum Fortschreiten des Tumors bei (Jones und Baylin, 2002).

1.3 Therapeutische Ansätze

Ziel onkologischer Therapien ist die Hemmung der unkontrollierten und unkoordinierten Zellteilungen des entarteten Gewebes. Man unterscheidet hierbei die traditionelle zytotoxische Therapie, die an allen sich schnell teilenden Geweben angreift, von der gezielten Tumorthherapie (Pfeiffer et al., 2007).

Ein mögliche gezielte Strategie ist die Unterbrechung mitogen wirkender Signalwege, die durch genetische oder epigenetische Veränderungen auf Ebene der Wachstumsfaktoren, ihrer Rezeptoren oder der nachgeschalteten intrazellulären Signalkaskaden pathologisch gesteigert sein können.

Aufgrund seiner zentralen Rolle bei der Entstehung und Progression einer Vielzahl von Tumoren setzen viele der gezielten Krebstherapien am EGFR an. Dies kann entweder durch eine Blockade der EGFR-Bindestelle für Liganden durch Antikörper oder durch Hemmung der Signalweiterleitung geschehen. Für diese Aufgabe infrage kommen Tyrosinkinaseinhibitoren (TKIs), die in die Phosphorylierung des Rezeptors eingreifen; monoklonale Antikörper (MAbs), die direkt die Bindung des Liganden an

den Rezeptor behindern; Antisense-Oligonukleotide oder Ribozyme, die die mRNA-Translation blockieren und schließlich MAbs, die als Carrier für Radionuklide, Prodrugs oder Toxine dienen (Mendelsohn, 2004). In der klinischen Entwicklung am weitesten fortgeschritten sind die niedermolekularen TKIs und die rezeptorblockierenden MAbs.

1.3.1 Tyrosinkinaseinhibitoren

Der Wirkmechanismus der Tyrosinkinaseinhibitoren beruht auf einer Hemmung der Aktivität der intrinsischen Tyrosinkinase des EGFR. Der Inhibitor konkurriert reversibel mit Adenosintriphosphat um die spezifische Bindestelle an der intrazellulären Domäne des Rezeptors und verhindert so die Autophosphorylierung des Rezeptors und die nachfolgende Signalweiterleitung ins Innere der Zelle (Wakeling et al., 2002).

Zur klinischen Anwendung zugelassen sind zur Zeit Gefitinib (Iressa) und Erlotinib (Tarceva). Beide sind niedermolekulare synthetische selektive EGFR-Tyrosinkinaseinhibitoren und werden in der Therapie des fortgeschrittenen, chemotherapieresistenten, nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms und des Pankreaskarzinoms eingesetzt (Fachinformation Iressa, 2009; Fachinformation Tarceva, 2010).

In der Zellkultur bewirkt Gefitinib einen Wachstumsarrest, in höheren Dosen ist es in der Lage, Apoptose zu induzieren (Ciardiello et al., 2000; Kakiuchi et al., 2004). In Kombination mit zytotoxischen Substanzen verstärkt sich deren zytostatischer Effekt und die Apoptoserate nimmt zu (Ciardiello et al., 2000). Auch andere Prozesse, die im Zusammenhang mit dem ErbB-vermittelten Tumorwachstum stehen, wie z.B. die Angiogenese, werden durch die Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren gehemmt (Hirata et al., 2002).

In mehreren Studien konnten bei Patienten mit fortgeschrittenen nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen, die auf platinbasierte Chemotherapien nicht angesprochen hatten, starke Antitumoreffekte durch Gefitinib beobachtet werden (Fukuoka et al., 2003; Kim et al., 2004).

Allerdings profitieren nicht alle Patienten gleichermaßen von der Behandlung mit Tyrosinkinaseinhibitoren. Obwohl ihr Einsatz für viele Patienten eine Verbesserung der Prognose und der Lebensqualität bewirkt, zeigen je nach Studie bis zu 60 % aller behandelten Patienten keinerlei Ansprechen auf die Therapie (Takano et al., 2004).

Zusätzlich können unerwünschte Nebenwirkungen wie die Entwicklung einer schwerwiegenden Gefitinib-induzierten akuten interstitiellen Pneumonie auftreten (Takano et al., 2004). Um Vorhersagen über die Wirksamkeit des Medikaments für den einzelnen Patienten treffen zu können ist es notwendig, prognostische Marker zu etablieren. Infrage kommen hierfür einerseits Befunde, die am Tumormaterial selbst erhoben werden können, wie z.B. eventuelle Mutationen am EGFR, eine mögliche Überexpression des EGFR oder der Mutationsstatus des Ras-Gens. Andererseits gibt es Parameter, die sich im Serum des Patienten nachweisen lassen wie z.B. von der Tumorzelle sezernierte Moleküle. Eine besondere Bedeutung kommt hier den EGFR-Liganden zu (Ishikawa et al., 2005).

Die Nutzung des Mutationsstatus des EGF-Rezeptors als prädiktiven Faktor für das Therapieansprechen erwies sich in zahlreichen Studien zwar bezüglich einer partiellen Wirkung (partial response), nicht aber als Indikator für das Langzeitüberleben der Patienten als hilfreich (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004; Tokumo et al., 2005).

Als weiterer möglicher Marker scheint der Mutationsstatus von K-RAS bei nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen ein wichtiger Indikator für die Resistenz gegenüber Rezeptortyrosinkinaseinhibitoren darzustellen, wobei das Vorliegen der Wildtyp-Variante mit einem guten Therapieansprechen einhergeht. Liegt K-Ras hingegen in mutierter Form vor, überdeckt dies den aus mehreren anderen Studien bekannten positiven Effekt einer erhöhten Anzahl von Kopien des EGFR bezüglich der Vorhersagen für das Therapieansprechen und der Überlebensdauer (Massarelli et al., 2007).

Als vielversprechende Kandidaten für die Vorhersage des Therapieansprechens wurden bei NSCLC-Patienten außerdem die Serumlevel der EGFR-Liganden Amphiregulin und TGF- α identifiziert, wobei niedrige Level auf ein gutes Therapieansprechen schließen ließen (Ishikawa et al., 2005). Auch in anderen Studien zeigten sich ähnliche Ergebnisse. AREG und TGF- α waren in non-responders signifikant überexprimiert, in Tumoren mit gutem Therapieansprechen hingegen kaum nachweisbar (Kakiuchi et al., 2004). Ishikawa et al. beobachteten außerdem eine signifikant längere mediane Überlebenszeit von Patienten mit niedrigen Serumspiegeln von Amphiregulin gegenüber Patienten mit hohen Spiegeln (Ishikawa et al., 2005).

1.3.2 Antikörper gegen den Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor

Cetuximab (Erbix) ist ein chimärisierter human-muriner IgG1-Antikörper gegen EGFR, der mit hoher Spezifität an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors bindet und sie so für die Bindung von Liganden blockiert. Dadurch wird die ligandeninduzierte Autophosphorylierung des Rezeptors verhindert und die Signalübertragung unterbrochen (Lievre et al., 2006). Zusätzlich zu dem Effekt, die Ligandenbindung zu verhindern, gibt es Hinweise, daß der Antikörper eine Internalisation des Rezeptors stimuliert und so die EGFR-Expression vermindert (Sunada et al., 1986).

In Studien von Wu et al. resultierte die Behandlung verschiedener Tumorzelllinien mit Cetuximab in einer Hemmung des Wachstums. Zu den zugrundeliegenden Mechanismen gehörten eine Expressionserhöhung des Zellzyklusinhibitors p27^{Kip1} (Wu et al., 1996) sowie die Induktion von Apoptose (Huang et al., 1999; Liu et al., 2000; Wu et al., 1995) und von Autophagie (Li und Fan, 2010).

In mehreren in-vivo Modellsystemen war Cetuximab in der Lage, das Tumorstadium einzudämmen (Prewett et al., 1998), die Angiogenese sowie die Metastasenbildung zu hemmen (Perrotte et al., 1999) und die Sensitivität gegenüber chemotherapeutischen Substanzen zu erhöhen (Inoue et al., 2000).

Weiterhin erhöht Cetuximab die Sensitivität maligner Zellen gegenüber Strahlung (Huang et al., 1999). Ein Grund für diesen Effekt ist eine durch Cetuximab bedingte Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen (Huang und Harari, 2000).

Cetuximab ist in Deutschland als Monotherapie oder in Kombination mit Irinotecan für die Behandlung des metastasierten Kolonkarzinoms zugelassen und in Kombination mit Bestrahlung zur Behandlung von Patienten mit lokal fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom im Kopf-Halsbereich (Fachinformation Erbitux, 2010). Bei einem Einsatz als Monotherapie beträgt die Ansprechrate etwa 9 % (Cunningham et al., 2004), in Kombination mit Irinotecan plus 5-Fluorouracil/Folinsäure (FOLFIRI) 48 % (Fakih und Wong, 2010). Das Nebenwirkungsprofil umfaßt Diarrhoen, Übelkeit und Erbrechen, Hautreaktionen und infusionsbedingte Reaktionen (Cunningham et al., 2004). Als mögliche prädiktive Faktoren für ein positives Therapieansprechen wurden u.a. der K-Ras-Mutationsstatus, Expression und Kopienanzahl des EGFR sowie die Expression von EGFR-Liganden untersucht:

Mehrere Studien zeigen eine höhere Ansprechrate auf die Therapie mit Cetuximab für Patienten mit Tumoren ohne K-Ras-Mutationen (48 - 76 %) als für solche Patienten, deren Tumoren eine K-Ras-Mutation aufwiesen (10 - 31 %) (Khambata-Ford et al., 2007; Lievre et al., 2006). Diese Ergebnisse stimmen mit der theoretischen Überlegung überein, nach der das Vorhandensein einer aktivierenden K-Ras-Mutation die inhibitorische Aktivität von Cetuximab umgehen sollte (Khambata-Ford et al., 2007).

In Studien, in denen der Einfluß von Mutationen am EGF-Rezeptor auf das Therapiesprechen untersucht werden sollte, erwies sich die Mutationsrate bei kolorektalen Karzinomen als sehr gering (Khambata-Ford et al., 2007). In anderen Studien konnte kein Zusammenhang zwischen der EGFR-Expression und dem Ansprechen auf Cetuximab gefunden werden (Chung et al., 2005; Vallbohmer et al., 2005). In der Zellkultur zeigten sich ähnliche Ergebnisse (Jhawer et al., 2008).

Auch eine erhöhte Anzahl von Kopien des EGFR wurde in weniger als zehn Prozent der in der Studie betrachteten Patienten gefunden (Khambata-Ford et al., 2007; Lenz et al., 2006; Lievre et al., 2006). Daher scheinen sich diese beiden Parameter schlecht für die Vorhersage des Therapieansprechens auf Cetuximab bei kolorektalen Karzinomen und damit für die Selektion derjenigen Patienten, die voraussichtlich von der Therapie profitieren würden, zu eignen.

Die Expression der EGFR-Liganden Amphiregulin und Epiregulin hingegen korreliert gut mit dem Therapieansprechen. Studien an Biopsiematerial von Tumoren zeigten sowohl eine bessere Ansprechrate als auch ein signifikant längeres progressionsfreies Überleben bei denjenigen mit Cetuximab behandelten Patienten, deren Tumoren vor Beginn der Cetuximab-Behandlung hohe mRNA-Level von Epiregulin und Amphiregulin exprimierten (Jacobs et al., 2009; Khambata-Ford et al., 2007). Es bestand allerdings keine Korrelation zwischen mRNA-Level und Protein-Level (Khambata-Ford et al., 2007). Eine erhöhte Expression der Liganden könnte durch die Bildung einer autokrinen Schleife am EGF-Rezeptor eine Rolle im Tumorwachstum und -überleben spielen. Dadurch könnten solche Tumoren gekennzeichnet sein, die von EGFR abhängig und daher besonders empfindlich gegenüber Cetuximab sind (Khambata-Ford et al., 2007).

2 Fragestellung

Bei Vorarbeiten mit Chip-Analysen war aufgefallen, daß die Expression der EGF-Rezeptorliganden Amphiregulin, Betacellulin und Epiregulin in kolorektalen Karzinomzellen abhängig vom DNMT-Status differentiell reguliert ist. Ein hoher DNMT-Status korrelierte dabei mit einer vermehrten Expression der Liganden-mRNA. Dieser Befund war insofern überraschend, als daß DNA-Methylierung in der Literatur im allgemeinen mit einer verminderten, nicht wie im hier beobachteten Fall mit einer erhöhten, Expression der betroffenen Proteine bzw. ihrer mRNA einhergeht. Ziel der vorliegenden Arbeit soll es sein, diese Beobachtung für ausgewählte Liganden auf Proteinebene zu bestätigen. Dafür soll zunächst die Expression dieser Liganden in solchen Zellen untersucht werden, bei denen die DNA-Methyltransferasen durch homologe genetische Rekombination ausgeschaltet wurden. Diese Spiegel sollen dann mit denen in den parentalen Varianten der selben Zelllinie verglichen werden. Um einen direkten kausalen Zusammenhang zwischen der DNA-Methylierung und der Expression der Liganden zu untersuchen, sollen weiterhin die DNA-Methyltransferasen durch einen spezifischen Inhibitor gehemmt werden und die Auswirkungen dieser Hemmung auf die Ligandenexpression auf mRNA- und auf Proteinebene untersucht werden.

Ferner soll untersucht werden, ob die Höhe der Expression der EGF-Rezeptor-Liganden Rückschlüsse auf die Aktivität von EGFR-abhängigen Signalwegen zuläßt. Dazu sollen zunächst die Höhe der Ligandenexpression mit der Expression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors in Beziehung gesetzt werden und anschließend dessen Aktivität in Abhängigkeit der vorhandenen Menge an Liganden bestimmt werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

Tabelle 3.1: Zelllinien

Zellart	Medium	Herkunft
HCT 116	McCoys5A, 10 % FCS, 1 % Pen/Strept	Labor Bert Vogelstein
HCT 116 DNMT1 -/-	McCoys5A, 10 % FCS, 1 % Pen/Strept, Hygromycin B 2 µl/ml	Labor Bert Vogelstein
HCT 116 DNMT3b -/-	McCoys5A, 10 % FCS, 1 % Pen/Strept, Hygromycin B 2 µl/ml	Labor Bert Vogelstein
HCT116 DNMT1 DKO	McCoys5A, 10 % FCS, 1 % Pen/Strept, Hygromycin B 2 µl/ml	Labor Bert Vogelstein
SW 480	Leibowitz Medium 15, 10 % FCS	ATCC
HT29	Leibowitz Medium 15, 10 % FCS	ATCC
A549	F-12 (Ham), Ultraglutamin	

Pen/Strept - Penicillin/Streptomycin, FCS – Fetal Calf Serum

Tabelle 3.2: siRNAs

Target	siRNA	Sequenz	Firma
AREG	Sense	r(AAA UCC AUG UAA UGC AGA A)dTdT	Qiagen
	Antisense	r(UUC UGC AUU ACA UGG AUU U)dTdT	
AREG	Sense	r(CCA CAA AUA CCU GGC UAU A)dTdT	Qiagen
	Antisense	r(UAU AGC CAG GUA UUU GUG G)dTdT	
Negativkontrolle		All Stars Negative Control	Qiagen

siRNAs gegen AREG selbstdesigned; Negativkontrolle kommerziell (Nr. 1027281)

Tabelle 3.3: Verwendete Primärantikörper

Name	Firma	Nr.	Ansatz in	Inkubation	Spezies
Actin	Millipore	MAB 1501 R	1:5000 1 x TBST	RT 1 h	Maus
DNMT1 (Cyt5)	NEB	M0231S	1:1000 5 % MM	RT über Nacht	Kaninchen
EGFR	NEB	2232	1:1000 5 % BSA, 1 x TBST	4 °C über Nacht	Kaninchen
pEGFR (Tyr1173)	NEB	4407	1:1000 5 % BSA, 1 x TBST	4 °C über Nacht	Kaninchen
pEGFR (Tyr992)	NEB	2235	1:1000 5 % BSA, 1 x TBST	4 °C über Nacht	Kaninchen
Phosphotyrosin	Upstate	05-321	1:1000 3 % MM	4 °C über Nacht	Kaninchen

TBST – Tris-buffered Saline, Tween 20; NEB – New England Biolabs; MM – Magermilch; RT – Raumtemperatur; DNMT1 – DNA-Methyltransferase 1; BSA – Bovines Serumalbumin; EGFR – epidermal growth factor receptor

Tabelle 3.4.: Verwendete Sekundärantikörper

Name	Firma	Nr.	Ansatz in
HRP- α - Kaninchen	NEB	7074	5 % MM
HRP- α -Maus	Dianova	315-035-045	5 % MM

MM – Magermilch

3.1.1 Geräte und Chemikalien

Tabelle 3.5: Geräte und Materialien

Geräte und Verbrauchsmaterial	Hersteller
0,5ml, 1,5ml und 2ml Eppendorf-Tubes	Eppendorf/Sarstedt
15ml, 50ml Falcon-Tubes	BD Falcon
6-Well-Platten	BD Falcon/Sarstedt
96-Well-Platten	BD Falcon/Sarstedt
Blotgerät	PreQLab
Brutschrank Zellkultur	Hera
Elektrophoresekammer + Zubehör	Biorad
ELISA-Reader	Biorad
Eppendorfpipetten	Eppendorf
Mehrkanalpipetten	Eppendorf
Filme (Röntgenfilme)	Amersham Hyperfilm
Hamilton-Pipette	Hamilton
Heizblock (Thermomixer)	Eppendorf
Kryobox	Nalgene
Kryoröhrchen	Cellstar
Kulturflaschen für Zellkultur	BD Falcon
Küvette (für RNA-Messung)	Hellma
Magnetrührer	IKAMAG
Mikroskop	Leica DMIL
Mikrowelle	Samsung
Nanodrop	Implen
Nitrozellulosemembranen	Protran N Schleicher & Schuell
Nylonmembranen	Nytran N Schleicher & Schuell
Schüttler	Stuart Scientific
Spannungsgerät	Biorad
Ultraschallbad	Bioruptor
Vortex	Assistant
Wärmeschrank	Heraeus
Waage	Sartorius
Wasserbad	GFL 1092
YM-3 Millipore-Säulen	Microcon

Tabelle 3.6: Fortsetzung Tabelle 3.5: Geräte und Materialien

Geräte und Verbrauchsmaterial	Hersteller
Zählkammer	Neubauer
Zellschaber	TPP
Zentrifuge	Beckman Coulter Avanti™ J25
Zentrifuge	Beckman Coulter Optima™-TL
Zentrifuge	Beckman Coulter Allegra X-15R
Zentrifuge	Eppendorf 5415C
Zentrifuge	Eppendorf 5417R

Tabelle 3.7: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
1kb-Leiter (für RNA-Agarosegele)	Eurogentec
Acrylamid	Roth (3029.1)
Agarose	Serva (11404)
AlamarBlue	Invitrogen (DAL1025)
Amidoschwarz	Merck (1167)
APS (Ammoniumpersulfat)	Merck (1.01201.0100)
Bromphenolblau	Sigma (115399)
BSA (Bovine Serum Albumine)	Serva (11926)
Chloroform	Sigma Aldrich (C2432)
Complete	Roche (1697498)
DEPC (Diethylprocarbonat)	Sigma (2165428)
Desinfektionsmittel Meliseptol	Braun (650542/2)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma (064K00671)
DTT (Dithiothreitol)	Sigma (D43815)
Dynabeads anti rabbit-IgG	Invitrogen (112.04D)
EDTA (Titriplex)	Merck (1.08418.0250)
EGTA	Sigma (E3889)
Eisessig	Merck (561000)
Entwickler	Kodak
Ethanol	J.T. Baker (605183)
Ethidiumbromid	Sigma
Fixierer	Kodack
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom (S0115)
Glycerol (Glycerin)	Merck (1.04033.1000)
Hepes	Sigma (H3375)
Isoamylalkohol	Sigma (W205702)
Isopropanol	Baker (8045)
KCl (Kaliumchlorid)	Merck (1.04936.1000)
KH ₂ PO ₄ (Kaliumdihydrogenphosphat)	Merck (1.04877.1000)
LiCl (Lithiumchlorid)	Sigma (L0505)
Marker (für SDS-PAGE)	PageRuler Fermentas (SM0671)
Methanol	J.T. Baker (8045)

Tabelle 3.8: Fortsetzung Tabelle 3.7: Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Milchpulver	Applichem (108301000)
MOPS (3-Morpholinpropansulfonsäure)	Merck
Na ₂ HPO ₄ (Dinatriumhydrogenphosphatdihydrat)	Merck (1.06580.1000)
NaCl (Natriumchlorid)	Merck (1.06404.1000)
NaOH	Merck (1.06498.1000)
Natrium-Acetat	Merck (1.06207.0500)
Natriumdesoxycholat (DOC)	Sigma (105K2618)
Natriumjodat	Merck (65250.100)
Natriumzitrat	Merck
Nonidet NP40 (10 %)	Calbiochem (492018)
Pelletpaint	Novagen
Penicillin/Streptomycin	Biochrom (A2213)
Phenol	Fluka (77613)
Phosphataseinhibitor	Pierce
PMSF (Phenylmethansulfonsäurefluorid)	Sigma (P7626)
Proteinase K	Roche (03115887001)
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva (20765)
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)	Sigma (19281-26ML)
Trireagent	Invitrogen (15596-026)
Tris Base	Merck (1.08382.2500)
Tris HCl	Merck (1.08259.1000)
Triton X 100	Sigma (9002-93-1)
Trizol	Invitrogen
Trypsin/EDTA (für Zellkultur)	Biochrom AG (L2153)
Tween 20	Serva (37470)
Ultraglutamin	Lonza (BE 17-605E/U1)

Tabelle 3.9: Antibiotika

Antibiotika	Hersteller
Penicillin/Streptomycin	Calbiochem (492018)
Hygromycin B	Roche (1084355501)

Tabelle 3.10: Kits

Name	Hersteller	Verwendung
ECL (Enhanced Chemoluminescence Analysis Kit)	Amersham	Western Blot
Western Blot Recycling Kit	Alpha Diagnostic	Western Blot
Amphiregulin ELISA Kit	R&D Systems (DY262)	ELISA
Betacellulin ELISA Kit	R&D Systems (DY261)	ELISA
Substrate Reagent Pack	R&D Systems (DY999)	ELISA

Tabelle 3.11: Inhibitoren

Inhibitor	Hersteller
Zebularin	Calbiochem (191400)
Gefitinib	Biaffin GmbH
Cetuximab	Merck

Tabelle 3.12: Transfektionsreagenzien

Reagenz	Hersteller
Primefect	Lonza (PA-3269)
Lipofectamine 2000	Invitrogen (11668-019)

3.1.2 Software

Tabelle 3.13: Software

Anwendung	Software (Hersteller)
Bildanalyse und -bearbeitung	Adobe Photoshop CS Version 9.0 (Adobe), Image J, GIMP
Geldokumentation	Argus 4.1.0 (Biostep)
ELISA-Reader	Microplate Manager 5.2.1 (Biorad)
statistische Analyse	Microsoft Office (Access, Excel), CurveExpert

3.1.3 Stammlösungen und Puffer

Tabelle 3.14: Stammlösungen und Puffer

Stammlösung/Puffer	Zusammensetzung
Amidoschwarz (400 ml):	Amidoschwarz 0,4 g Methanol 90 ml Eisessig 20 ml bi-destilliertes Wasser 290 ml
10 % APS:	1 g APS in 10 ml bi-destilliertem Wasser lösen
2,5 x Blotpuffer (1 l):	Tris-Base 14,5 g Glycerol 7,3 g 10 % SDS 9,37 ml Methanol 500 ml Auf 1 l mit bi-destilliertem Wasser auffüllen
Complete (50 x):	1 Tablette in 1 ml bi-destilliertem Wasser lösen

Tabelle 3.15: Fortsetzung Tabelle 3.14: Stammlösungen und Puffer

Stammlösung/Puffer	Zusammensetzung
Destain (1 l):	Methanol 400 ml Eisessig 100 ml bi-distilliertes Wasser 500 ml
0,1 % DEPC (100 ml):	900 µl DEPC in bi-distilliertes Wasser geben Deckel nur anschrauben und über Nacht stehen lassen, autoklavieren und Deckel fest verschrauben
0,5 M EDTA (1 l):	EDTA 186,1 g bi-distilliertes Wasser 800 ml NaOH-Plättchen 20 g pH 8 einstellen Auf 1 l mit bi-distilliertem Wasser auffüllen
5 x Elektrophoresepuffer (1 l):	Tris-Base 15,1 g Glycin 72,0 g SDS 5,0 g Auf 1 l mit bi-distilliertem Wasser auffüllen, pH 8,3
Elution (500 ml)	Ethanol 250 ml EDTA (0,5 M) 50 µl NaOH (0,5 M) 25 ml bi-distilliertes Wasser 225 ml
Entwickler (1 l):	destilliertes Wasser 700 ml Lösung A 250 ml Lösung B 25 ml Lösung C 25 ml
Fixierer (1 l):	destilliertes Wasser 700 ml Lösung A 250 ml Lösung B 50 ml
Gelladungspuffer für RNA-Gele (2 ml)	0,35 ml DEPC-Wasser 0,21 ml 10 x MOPS 0,35 ml Formaldehyd 0,96 ml deionisiertes Formamid 0,13 ml 80 % Glycerol 2 µl Ethidiumbromid 1 Krümel Bromphenolblau

Tabelle 3.16: Fortsetzung Stammlösungen und Puffer

Stammlösung/Puffer	Zusammensetzung
Homogenisierungspuffer (100 ml)	0,3 Piperazin 300 µl MgCl ₂ (1 M) 1 EGTA (100 mM) 8 ml NaCl (5 M) Auf 100 ml mit bi-destilliertem Wasser auffüllen, pH 7,4
20 x Hybridisierungspuffer (1 l)	175,3 g NaCl 88,2 g Natrium-Citrat In DEPC-Wasser lösen und auf 1 l auffüllen
10 x MOPS (2 l)	MOPS 83,6 g Natrium-Acetat 16,4 g 0,5 M EDTA 40 ml Auf 2 l mit bi-destilliertem Wasser auffüllen
3 M Natrium-Acetat (1 l)	408,1 g Natrium-Acetat in 800 ml bi-destilliertem Wasser lösen pH 5,5 mit Essigsäure einstellen Auf 1 l mit bi-destilliertem Wasser auffüllen
10 x PBS (1 l)	NaCl 80 g KCl 2 g Na ₂ HPO ₄ 14,4 g KH ₂ PO ₄ 2,4 g Auf 1 l mit bi-destilliertem Wasser auffüllen, pH 7,4
0,05 % PBST (1 l)	10 x PBS 100 ml Tween 20 500 µl Auf 1 l mit bi-destilliertem Wasser auffüllen
2 x Probenpuffer (10 ml):	0,5 M Tris Base pH 6,8 2 ml DTT 0,308 g 10 % SDS 4 ml Glycerol 2 ml Bromphenolblau 0,1 g Auf 10 ml mit bi-destilliertem Wasser auffüllen

Tabelle 3.17: Fortsetzung Stammlösungen und Puffer

Stammlösung/Puffer	Zusammensetzung
RIPA-Puffer (50 ml)	1 M Tris-HCl pH 8,0 2,5 ml 5 NaCl 1,5 ml 10 % NP40 5 ml 10 % DOC 2,5 ml 10 % SDS 500 µl 1 Tablette Roche complete Auf 50 ml mit bi-destilliertem Wasser auffüllen
SDS-Lysepuffer (50 ml)	10 % SDS 5 ml 1 M Tris HCl pH 7,5 0,5 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 0,2 ml Auf 50 ml mit bi-destilliertem Wasser auffüllen
50 x TAE (1 l)	Tris-Base 242 g EDTA 18,6 g Auf 1 l mit bi-destilliertem Wasser auffüllen, pH 8,0
Elutionspuffer (50 ml)	1 M Tris pH 8,0 500 µl 0,5 M EDTA 100 ml 10 % SDS 5 ml Auf 50 ml mit bi-destilliertem Wasser auffüllen
5 x TBS (1 l):	1 M Tris-Base pH 8,0 50 ml 5 M NaCl 150 ml bi-destilliertes Wasser 800 ml
0,05 % TBST (1 l)	TBS 1 l Tween20 500 µl

Tabelle 3.18: Zusammensetzung der Gele für Westernblot

	12 % (Trenngel)	10 % (Trenngel)	8 % (Trenngel)	4 % (Sammelgel)
H ₂ O	6,7 ml	8,1 ml	9,37 ml	6,1 ml
1,5 M TrisHCl, pH 8,6	5 ml	5 ml	5 ml	-
0,5 M TrisHCl, pH 6,8	-	-	-	2,5 ml
30 % Acrylamid	8 ml	6,6 ml	5,32 ml	1,33 ml
10 % SDS	200 µl	200 µl	200 µl	100 µl
10 mM APS	100 µl	100 µl	100 µl	50 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl

Tabelle 3.19: Zusammensetzung der RNA-Gele

	1,2 %iges Gel
Agarose	1,2 g
DEPC-Wasser	72,2 ml
10 x MOPS	10 ml
Formaldehyd 37 %	17,8 ml

3.2 Methoden

3.2.1 Zellen und Zellkultur

3.2.1.1 Verwendete Zelllinien

Es wurde mit drei verschiedenen Zelllinien gearbeitet, die jeweils unterschiedliche onkogene Mutationen besitzen. Es handelte sich hierbei um die humanen Kolonkarzinomzelllinien HCT 116, SW480 und HT29.

HCT116 ist eine humane Kolonkarzinomzelllinie, die eine K-Ras Mutation aufweist. Diese Mutation bewirkt ein konstitutiv aktiviertes Ras-Protein und damit eine permanente Aktivität der dem Ras nachgeschalteten Signalkaskaden, was zu einem veränderten Proliferationsverhalten der Zelle führt.

Da von dieser Zelllinie stabile Derivate existieren, bei denen die DNA-Methyltransferasen DNMT1 bzw. DNMT3b durch homologe genetische Rekombination ausgeschaltet wurden, gilt sie als besonders geeignet für die Untersuchung von DNA-methylierungsabhängigen Phänomenen. Gearbeitet wurde mit HCT116 DNMT1^{-/-}, HCT116 DNMT3b^{-/-} und einem HCT116-Derivat, bei dem sowohl DNMT1 als auch DNMT3b ausgeschaltet sind („Doppelknockout“, DKO). In DNMT1^{-/-} und DKO-Zellen liegt die DNMT1 hypomorph in Form eines Residualproteins mit niedrigerem Molekulargewicht als das vollständige Protein vor (Egger et al., 2006).

Außerdem liegen in HCT116 PIK3CA (Phosphatidylinositol 3-kinase, catalytic, alpha) und β -Catenin mutiert vor (Jhawer et al., 2008; Kitaeva et al., 1997), so daß auch der apoptoseregulierende PI3-Kinase-Signalweg und der an der Zelldifferenzierung beteiligte Wnt-Signalweg in ihrer Aktivität verändert sind.

SW480 ist eine weitere Kolonkarzinomzelllinie, die ebenfalls eine K-RAS-Mutation besitzt (Jhawer et al., 2008). Zusätzlich dazu weist sie eine APC (Yang et al., 2006) und eine p53-Mutation auf (Abarzua et al., 1995).

Auch bei **HT29** handelt es sich um eine Kolonkarzinomzelllinie humanen Ursprungs. Sie weist eine B-Raf-Mutation auf. K-Ras liegt bei dieser Zelllinie unmutiert (Jhawer et al., 2008), APC mutiert vor (Yang et al., 2006).

A549 ist eine alveoläre Karzinomzelllinie, bei der K-Ras mutiert vorliegt (Valenzuela und Groffen, 1986) und die in hohem Maße den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor EGFR exprimiert (Diaz et al., 2010).

3.2.1.2 Zellkultur

Die Zellen wurden in 75 ml-Kulturflaschen bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Jeweils bei einer Konfluenz von 70 - 80 % wurden sie passagiert und hierfür 1:5 bis 1:10 verdünnt. Zum Passagieren wurde den Zellen zunächst das Medium entzogen. Mediumreste wurden mit 1 x PBS abgegespült. Anschließend erfolgte eine 2-5minütige Behandlung mit 2 ml Trypsin bei 37 °C, die zum Ablösen der Zellen führte. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Zugabe von 8 ml FCS-haltigem Medium. Die Zellen wurden bei 149 x g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml frischen Mediums resuspendiert. Hiervon wurde jeweils 1 ml in 10 ml frischen Mediums aufgenommen und nach guter Durchmischung in eine frische Kulturflasche überführt.

Bei der Durchführung der Experimente wurden die Trypsinierungsbedingungen geringfügig verändert. So erfolgte das Ablösen aus 6-Well-Platten mit 500 µl Trypsin pro Well, das Stoppen der Reaktion mit 1500 µl FCS-haltigem Medium und das Resuspendieren in 2 ml Medium. Beim Aussäen in 10 cm-Schalen entsprachen die Volumina den für die T75-Flaschen verwendeten.

Sollte eine definierte Anzahl von Zellen ausgesät werden, wurden sie nach der Resuspension in Neubauer-Zählkammern gezählt.

Zur weiteren Verwendung in Experimenten wurden folgende Zellzahlen ausgesät: 10 cm-Schale: 5x10⁵ bis 1x10⁶ Zellen, 6-Well-Platten 10⁵ Zellen pro Well, 96-Well-Platte: 1500 (HCT116, HT29) – 3000 (HCT116 DNMT1-/-) Zellen pro Well.

Für die Archivierung über längere Zeiträume wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben trypsiniert und abzentrifugiert. Das Pellet wurde dann in einem Gesamtvolumen von 1 ml (Medium mit 10 % DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Diese wurden in einer Kryobox zunächst bei -80 °C

gelagert. Dabei sorgte das in der Kryobox enthaltene Isopropanol für eine schonende Abkühlung von 1 K pro Stunde. Anschließend wurden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff bei -196 °C gelagert.

Das Auftauen erfolgte unter ständiger Bewegung im 37 °C warmen Wasserbad. Zum Neutralisieren des zytotoxischen DMSO (Lin et al., 1995) wurden tropfenweise 5 ml Medium zugegeben, anschließend wurde zentrifugiert, der Überstand mit dem toxischen DMSO abgesaugt und das Pellet in frischem Medium resuspendiert.

3.2.2 Behandlung mit Inhibitoren und siRNA-Experimente

3.2.2.1 Behandlung mit Zebularin

Zebularin wirkt als Inhibitor der DNA-Methyltransferasen DNMT1, und, in geringerem Maße, DNMT3a und DNMT3b (Cheng 2004, Marquez 2005). Dadurch verhindert die Behandlung der Zellen mit Zebularin die Methylierung von CpG-Inseln in Promotorregionen von Genen und greift so in die epigenetische Regulierung der individuellen Genexpression ein.

Die Zellen wurden unter Routinebedingungen gehalten, trypsiniert, gezählt und in 6-Well-Platten bzw. 10 cm-Schalen ausplattiert. Nach 24-stündigem Anwachsen wurden sie zweimal mit 1 x PBS gewaschen und anschließend mit Medium überschichtet, dem 10 bis $100\text{ }\mu\text{M}$ des DNA-Methyltransferaseinhibitors Zebularin zugesetzt war. Das Zebularin war dabei in 1 x PBS gelöst, um die zytotoxischen Wirkungen des üblicherweise als Lösungsmittel eingesetzten DMSO zu umgehen. DMSO kann eine Umstrukturierung des Zytoskeletts bewirken und so das Zellwachstum beeinflussen (Lampugnani et al., 1987). Außerdem wirkt DMSO als schwacher Histondeacetylasehemmer (Marks und Breslow, 2007).

3.2.2.2 Behandlung mit Gefitinib

Gefitinib ist ein Tyrosinkinaseinhibitor, der die Tyrosinkinasen der EGF-Rezeptoren hemmt und somit die für die Aktivierung des Rezeptors notwendige Autophosphorylierung verhindert (Wakeling et al., 2002). Gefitinib unterbricht folglich die Übertragung exogener Wachstumssignale auf intrazelluläre Signalkaskaden, wie

z.B. auf das Ras-Netzwerk. Die Zellen wurden in Routinekultur kultiviert und in 10 cm-Schalen oder 96-Well Platten ausgesät. Nach dem Anwachsen der Zellen wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Anschließend wurden sie mit Medium überschichtet, dem 5-20 µl Gefitinib zugesetzt war. Da Gefitinib in DMSO gelöst ist, das in der Lage ist, das Zellwachstum zu beeinflussen, wurde bei jedem Experiment eine DMSO-Kontrolle mitgeführt, um eventuelle Effekte durch DMSO von denen durch Gefitinib abgrenzen zu können.

3.2.2.3 Behandlung mit Cetuximab

Die Zellen wurden in Routinekultur kultiviert, in 96-Well-Platten ausgesät und mit 450 µl Medium pro Well überschichtet. 24 h nach der Aussaat wurden jedem Well weitere 50 µl Medium zugegeben, das derart mit Cetuximab versetzt war, daß die Endkonzentration pro Well 2 – 20 µg/ml betrug.

3.2.2.4 siRNA-vermittelte Hemmung der Genexpression

Ziel der Experimente war es, die Expression von Amphiregulin mithilfe einer spezifischen siRNA zu inhibieren. Für Knockdown-Experimente mit siRNA macht man sich einen in eukaryontischen Zellen natürlich vorkommenden Mechanismus zur viralen Abwehr zunutze, bei dem es zum Abbau von messenger-RNA kommt. Diese sogenannte RNA-Interferenz erfolgt über kurze Abschnitte von RNA-Strängen (21-23 nt), die in der Lage sind, sich mithilfe des sogenannten RISC-Komplexes (RNA interference silencing complex) komplementär an messenger RNA zu binden und diese zu entwinden und in ihre Einzelstränge aufzuspalten. In der Folge kann die mRNA durch im Zellplasma vorliegende Nukleasen abgebaut werden. Folglich werden die betreffenden Gene zwar transkribiert, die Translation in Proteine bleibt jedoch aus (Rahman et al. 2008, Elbashir et al. 2001).

Für die hier beschriebenen Versuche wurden zwei künstliche siRNA-Duplexe verwendet, die jeweils spezifisch an zwei unterschiedliche Abschnitte des Amphiregulin-Gens binden. Der Transport der siRNA ins Innere der Zelle erfolgte mithilfe der lipophilen Transfektionsreagenzien Lipofectamine und Primefect. Die

Sequenzen der siRNAs wurden in Anlehnung an eine Arbeit von Eckstein (Eckstein et al., 2008) gewählt und über Qiagen bezogen. Als Negativkontrolle wurde Qiagen All Stars Negative Control verwendet.

Die Zellen wurden in 6-Well-Platten ausgesät und bei einer Konfluenz von 40 % (HT29) bzw. 70 - 80 % (HCT116) transfiziert. Zunächst wurde das Medium abgenommen und die Zellen zweimal mit 1 x PBS gewaschen. Pro Well wurde 1 ml (HT29) bzw. 1,1 ml (HCT116) Vollmedium gegeben. Der Transfektionsansatz bestehend aus 200 µl serumfreiem Medium (Optimem), 16 µl Primefect und 7,5 µl siRNA (3,5 µl siRNA-Einzelstränge s und as) für die Transfektion von HT29 bzw. 100 µl serumfreiem Medium, 1,5 µl Lipofectamine 2000 und 1 µl siRNA für die Transfektion von HCT116 wurde zusammengestellt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert, Während dieser Zeit kam es zur Bildung des siRNA-Transfektionsreagenz-Komplexes. Nach Ablauf der 20 min wurde der Transfektionsansatz zu den Zellen pipettiert und durch vorsichtiges Schwenken der Platte mit dem Medium vermischt. Die Endkonzentration der siRNA betrug 125 nM/Well für HT29 und 33 nM/Well für HCT116.

Zur Erhöhung der Transfektionseffizienz erfolgte nach 24 Stunden eine zweite Transfektion. 24 h nach der zweiten Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel, um zytotoxische Effekte des Transfektionsreagenz zu minimieren. Die Menge an im Zytoplasma vorliegenden Amphiregulin wurde im ELISA bestimmt und zu der Menge in der Negativprobe ins Verhältnis gesetzt. Dafür wurde die Amphiregulinmenge in der Negativprobe als 100 % definiert und die Differenz zur Menge in der Knockdown-Probe in Prozent angegeben. Sollten die siRNA-transfizierten Zellen im weiteren für Wachstumsassays verwendet werden, wurden sie 24 h nach der zweiten Transfektion trypsiniert und in 96-Well-Platten neu ausgesät. Parallel wurde für jeden geplanten Meßzeitpunkt eine Probe der transfizierten Zellen sowie eine Negativkontrolle in 6-Well-Platten ausgesät. Diese Ansätze wurden parallel zu jedem Meßzeitpunkt lysiert und die Effizienz des Knockdowns im ELISA gemessen.

3.2.3 Aufreinigungen

3.2.3.1 Proteinisolierung

ELISA

Der Zellüberstand wurde aus den 6-Well-Platten abgesaugt, die Zellen zweimal mit eisgekühltem 1 x PBS gewaschen und pro Well mit 100-200 µl Homogenisierungspuffer versetzt (Torrington et al., 2000). Nach 2 min wurden die Zellen mit dem Zellschaber abgeschabt und mit der Eppendorfpipette in 1,5 ml Eppendorfgefäße überführt. Anschließend erfolgte im Ultraschallbad ein Aufschluß der Zellen durch Kavitation (7 min, Impulsfrequenz 0,5 min, Power: high). Es wurde durchgehend auf Eis gearbeitet. Bei der anschließenden Zentrifugation (4 °C, 5 min, 10.600 x g) setzten sich die Zelltrümmer als Pellet am Boden des Eppendorfröhrchens ab, der Überstand wurde abpipettiert, in ein neues Röhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei –20 °C eingefroren.

Western Blot

Die Zellen wurden zweimal mit kaltem 1 x PBS gewaschen und pro 6-Well mit 150-200 µl, pro 10 cm-Kulturschale mit 300 µl eines Lysispuffers versetzt. Für die Bestimmung von DNMT1 wurde SDS-Puffer, für die Bestimmung von EGFR RIPA-Puffer verwendet. Nach etwa 2 min wurde das Zellysat mit dem Zellschaber abgeschabt und in 1,5 ml-Eppendorfgefäße überführt. Anschließend wurde das Zellysat bei 95 °C für 5 Minuten denaturiert (SDS), die als Schleimpropfen vorliegende DNA bei 18.000 x g für 10 Minuten herunterzentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Messung der Proteinkonzentration erfolgte mit der Amido-Schwarz-Methode, die Lagerung der Proben bei –20 °C.

Isolierung von sezernierten Proteinen aus dem Zellüberstand

Nach Behandlung mit Zebularin wurden im Abstand von jeweils 24 Stunden etwa 200 µl des Zellüberstandes abgenommen, 2 µm-sterilfiltriert und mithilfe von YM-3 Millipore-Säulen auf ein kleineres Volumen eingegengt, um die Konzentration des zu untersuchenden Proteins auf einen zuverlässig meßbaren Bereich anzuheben. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Filterwirkung einer Zellulosemembran,

deren Poren nur für Moleküle mit einem Molekulargewicht von unter 3 kDa durchlässig ist. Die Säulen wurden in spezielle Röhrchen eingesetzt und bei 4 °C und 20.800 x g für 60 min zentrifugiert. Das durch den Filter getretene Volumen wurde verworfen, der Filter umgedreht und in ein neues Röhrchen eingesetzt. Bei der erneuten Zentrifugation (4 °C, 20.800 x g, 3 min) gelangten die im Filter hängengebliebenen Moleküle in das neue Röhrchen. Die Proteinkonzentration wurde mit der Amidoschwarz-Methode gemessen (siehe 3.2.3.3) und die Proben zur weiteren Untersuchung bei -20 °C eingefroren.

3.2.3.2 Isolierung von RNA

Für die Isolierung von RNA wurde aus den Kulturschalen zunächst das Medium abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Jede 10 cm-Schale wurde mit 2 ml Trizol versetzt. Trizol ist ein Reagenz, das in der Lage ist, Zellen zu lysieren und RNAsen aus dem Zytoplasma zu inaktivieren.

Nach ca. einer Minute Einwirkzeit des Trizols wurde die Zellsuspension abgeschabt und in ein 1,5 ml-Eppendorfgefäß überführt. Die Proben wurden für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 0,2 ml Chloroform pro ml Trizol versetzt. Die Suspension wurde kräftig gemischt, für 2 - 3 min bei Raumtemperatur inkubiert und bei 4 °C und 10.600 x g 15 min lang zentrifugiert. Es erfolgte eine Trennung in drei Phasen, von denen die obere die RNA enthielt. Die RNA-Phase wurde abgenommen, in ein neues Tube überführt, mit 0,5 ml Isopropanol pro ml Trizol, 2 µl Pelletpaint und 100 µl 3 M Natriumacetat gefällt und für 5 - 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch erneute Zentrifugation (4 °C, 20 min, 10.600 x g) setzte sich ein RNA-Pellet in der Spitze des Tubes ab. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit 75%igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde zum Trocknen bei 37 °C inkubiert und anschließend in 80 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

Es folgten weitere 5 min Inkubation bei 65 °C. Die Probe wurde bei -80 °C gelagert. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte nach 24 Stunden bei 260 nm am Photometer.

3.2.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mit Amido-Schwarz

Die Amidoschwarz Methode zur Bestimmung der Proteinkonzentration einer Probe basiert auf der Bindung saurer Gruppen des Farbstoffes Amidoschwarz an basische Aminosäuren. Dabei korreliert innerhalb eines bestimmten Bereichs die Intensität der Anfärbung linear mit der Proteinkonzentration.

Zunächst wurde eine Standardreihe mit in 1 x PBS gelöstem BSA angesetzt, die den Bereich umfaßte, in dem die Konzentration der Probe erwartet werden konnte (z.B. 0.5, 1, 2, 5 und 10 mg/ml). Anschließend wurden sowohl von jeder Verdünnung der Standardreihe als auch von jeder Probe jeweils zweimal zwei Mikroliter in Doppelbestimmung auf eine Nitrozellulosemembran aufpipettiert. Die Membran wurde daraufhin für etwa 1 min in Amidoschwarz geschwenkt, das sich dabei an die auf der Membran befindlichen Proteine band. Dann wurde das überschüssige Amidoschwarz dekantiert und die Membran für ca. 20 min mit Destain entfärbt. Hierbei wurden unspezifische Färbungen der Membran außerhalb der aufgetropften Proben entfernt. Nachdem die die Proben umgebende Membran vollständig entfärbt war, wurden die angefärbten Proben tropfen mit einem Skalpell aus der Membran ausgeschnitten und in 2 ml-Eppendorfgefäßen in jeweils 300 µl Elutionslösung bei Raumtemperatur für 30 min auf dem Schüttler entfärbt. Von der gefärbten Elutionslösung wurden nun jeweils 200 µl in eine 96-Well-Platte überführt und die Intensität photometrisch jeweils bei 570 und 625 nm Wellenlänge gemessen und gegen die Standardreihe abgeglichen.

3.2.4 Analytische Methoden

3.2.4.1 SDS-PAGE und Western Blot

Die Kombination aus SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Poly Acrylamid Gel Elektrophorese) und Western Blot bildet eine Methode zur Auftrennung von Proteingemischen und anschließender Identifizierung und Quantifizierung einzelner darin enthaltener Bestandteile.

Die aufbereiteten Proteinproben wurden mit 4 x Gelladungspuffer (LB) derart versetzt, daß der Gelladungspuffer in einfacher Konzentration in dem Gemisch

vorlag. Anschließend wurden die Proben für 5 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert und kurz herunterzentrifugiert. Dann wurden jeweils 50 µg der Proben mit der Hamiltonpipette in die Geltaschen gegeben. Als Größenstandard dienten 5 µl des PageRuler™.

Für die Gelelektrophorese kamen SDS-Polyacrylamid-Gele zum Einsatz. Deren negativ geladener Bestandteil SDS überlagert die Eigenladung der Proteine, so daß diese ihre höheren Proteinstrukturen einbüßen und nun in ihrer linearisierten Form vorliegen. Die Gesamtladung der Proteine wird negativ. Der zweite namensgebende Bestandteil des Gels, das Acrylamid, bildet durch Polymerisierung ein gleichmäßiges Gitternetzwerk. Trägt man nun das zu untersuchende Proteingemisch auf das Gel auf und legt eine Spannung an, wandern die denaturierten Proteine im elektrischen Feld abhängig von ihrer Molekularmasse unterschiedlich schnell. Man erhält klar voneinander abgegrenzte Proteinbanden.

Nach der Auftrennung des Proteingemischs erfolgte die Übertragung der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran, das sogenannte Blotting. Hierfür wurde das Gel mit den aufgetrennten Proteinbanden auf eine Nitrozellulosemembran gelegt und unter semi-dry-Bedingungen senkrecht zu Gel und Membran ein elektrisches Feld angelegt. Die aufgetrennten Proteinproben wanderten nun aus dem Gel auf die Nitrozellulosemembran, wo sie anschließend detektiert werden konnten. Der Transfer wurde bei 100 mA pro Gel für 60 – 90 Minuten durchgeführt.

Die Detektion der spezifischen Proteine erfolgte mithilfe von Antikörpern, die spezifisch an antigene Epitope des auf der Membran fixierten Zielproteins banden. Zunächst wurden die unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran mittels 5-10%iger Magermilch in 1 x TBST für eine Stunde bei Raumtemperatur auf dem Schüttler abgesättigt. Anschließend wurde die Membran mit dem Primär- und danach mit dem Sekundärantikörper inkubiert (Bedingungen siehe **Tabelle 3.3** und **3.4**). Aufgrund ihrer höheren Affinität verdrängten die spezifischen Antikörper dabei die Magermilchbestandteile.

Nun konnte der gebundene Antikörper und folglich die Lage des zu detektierenden Proteins auf der Membran, mithilfe einer Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht werden. Dabei katalysierte das an den Sekundärantikörper gebundene Enzym Meerrettichperoxidase eine Luminolreaktion. In der Dunkelkammer wurde

diese Luminolreaktion mithilfe eines lichtempfindlichen Films sichtbar gemacht. Die Belichtungszeit betrug 30 Sekunden bis 20 Minuten.

3.2.4.2 Messung von AREG und BTC mittels Sandwich-ELISA

Der Enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA) ist ein immunologisches Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Proteinen. Als Marker dient beim ELISA ein Enzym, das ein Substrat proportional zu dessen Konzentration umsetzt und dabei einen Farbumschlag bewirkt.

Beim Sandwich-ELISA binden zwei Antikörper an verschiedenen Epitopen spezifisch an das nachzuweisende Antigen, wobei der erste Antikörper, der sogenannte Capture- oder Fang-Antikörper, an eine feste Phase, meist den Boden der Mikrotiterplatte, bindet.

Es wurde mit ELISA-Kits von R&D Systems gearbeitet. Die Konzentrationen der einzelnen Reagenzien wurden aus den entsprechenden Datenblättern übernommen. Zunächst wurde der Capture Antibody an den Boden einer 96-Well-Mikrotiterplatte gebunden (coating). Pro Well wurden dazu 100 µl (2 µg/ml) appliziert und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Coatingpuffer und ungebundener Antikörper sind durch Ausschlagen der Platte und dreimaliges Waschen mit Waschpuffer (PBST) entfernt worden. Freie Proteinbindestellen wurden für zwei Stunden mit Reagent Diluent (1%igem BSA 0,2 µm-sterilfiltriert in 1 x TBST) bei Raumtemperatur blockiert. Die Platte wurde ausgeschlagen und dreimal gewaschen. Standardreihe und Proben wurden mit Reagent Diluent auf ein jeweiliges Gesamtvolumen von 100 µl ergänzt, in Doppel- bzw. Dreifachbestimmung aufpipettiert und für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten ein weiterer Waschschrift und die Inkubation mit dem Detektionsantikörper (Volumen pro Well 100 µl, 100 ng/ml) für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach einem erneuten Waschschrift wurden pro Well 100 µl des mit Meerrettichperoxidase konjugierten Streptavidin (Streptavidin-HRP) zugefügt und unter Lichtabschluß für 20 min inkubiert. Die Aktivität dieses Enzyms kann durch die Zugabe colorimetrisch detektierbarer Substrate nachgewiesen werden. Der Waschschrift wurde wiederholt und pro Well 100 µl der Substratlösung, einer 1:1 Mischung aus H₂O₂ und Tetramethylbenzidin, zugegeben. Die Platte wurde erneut bei Raumtemperatur unter Lichtabschluß inkubiert und die Reaktion nach 20 Minuten durch Zugabe von jeweils 50 µl H₂SO₄ gestoppt. Die Farbentwicklung wurde im

ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 570 und 625 nm photometrisch bestimmt und gegen die Standardreihe abgeglichen.

Tabelle 3.20: Übersicht über eingesetzten Substanzen und Konzentrationen

Substanz	Gelöst in	Ausgangs-konzentration	Eingesetzte Konzentration	Eingesetztes Volumen
Capture-Ak AREG	1 x PBS	360 µg/ml	2 µg/ml	100 µl
Blockreagenz	RD	1 %	1 %	300 µl
Detection-Ak AREG	RD	18 µg/ml	100 ng/ml	100 µl
Standard AREG	RD	80 ng/ml	0, 15, 30, 60, 120, 240, 480, 1000 pg/ml	100 µl
Capture-Ak BTC	1 x PBS	720 µg/ml	4 µg/ml	100 µl
Detection-Ak BTC	RD	9 µg/ml	50 ng/ml	100 µl
Standard BTC	RD	70 ng/ml	0, 15, 30, 60, 120, 240, 480, 1000 pg/ml	100 µl
Probe	RD	variabel	Zellysat: 40 µg, Zellüberstand: 200 µg	100 µl
Streptavidin-HRP	RD	200 x	1 x	100 µl
Substratlösung	-	Keine Angaben des Herstellers		100 µl
Stopplösung	-	2 N	2 N	50 µl

Ak – Antikörper; RD (Reagent Diluent – 1 x PBS, 1 % BSA 0,2 µm-filtriert); AREG – Amphiregulin; BTC – Betacellulin; Waschpuffer – 0,05 % Tween 20 in 1 x PBS, pH 7,2-7,4; „Capture-Ak“ – Maus anti-human Amphiregulin bzw. Betacellulin; „Detection-Ak“ – biotinylierter Ziege anti-human Amphiregulin bzw. Betacellulin; Standard – Rekombinantes humanes Amphiregulin bzw. Betacellulin; Substratlösung: R&D Systems Substrate Solution, 1:1 Mischung aus Color Reagent A (H₂O₂) und B (Tetramethylbenzidin) ohne Angaben zu Konzentration und Lösungsmittel; Stopplösung 2 N H₂SO₄

3.2.4.3 Northern Blot

Der Northern Blot ist eine Methode zur Detektion und Quantifizierung spezifischer RNA-Abschnitte. Dazu werden die RNA-Fragmente zunächst gelelektrophoretisch entsprechend ihrer Größe aufgetrennt, auf einer Membran fixiert und anschließend mithilfe spezifischer Sonden detektiert.

Die aufbereiteten RNA-Proben wurden in der Vakuumkammer auf eine Konzentration von 1 µg/µl eingeeengt und mit einem Gelladungspuffer derart versetzt, daß das Gemisch in einer Konzentration von 1:3 vorlag und jede Probe 11 µg RNA enthielt. Jeweils 1 µl jeder Probe wurde für 2 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert und auf ein Probegel aufgetragen, um die Qualität der Aufreinigung zu überprüfen. Die Auftrennung erfolgte bei 50 V und 400 mA über ca. drei Stunden. Anschließend

wurde auch das verbleibende Volumen der Proben denaturiert, auf ein Gel aufgetragen und bei 50 V für etwa vier Stunden aufgetrennt.

Im Anschluß an die Auftrennung der RNA-Fragmente erfolgte der Transfer auf eine Nylonmembran. Dazu wurde unter Nutzung der Kapillarkräfte ein Transferpuffer durch das Gel und die daraufliegende Membran in einen Stapel trockener Papiertücher gezogen. Dabei bewegten sich die RNA-Moleküle, dem Sog des Puffers folgend, aus dem Gel heraus und verblieben an der Membran. Der Transfer dauerte etwa 12-14 Stunden. Danach wurde die getrocknete Membran mit UV-Licht bestrahlt, um die RNA kovalent an die Membran zu binden. Dieser Vorgang wird als cross-linking bezeichnet. Anschließend wurde die Membran mit einer radioaktiv markierten Sonde hybridisiert, wobei die Sonde an diejenigen auf der Membran befindlichen RNA-Fragmente band, deren Nukleinsäuresequenz zu der eingesetzten Sonde komplementär war. Die Positionen der so entstandenen Hybride wurden autoradiographisch sichtbar gemacht. Als Beladungskontrolle diente die mRNA des Enzyms Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die Aufbewahrung der Membran erfolgte in Folie eingeschweißt bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.2.4.4 Immunpräzipitation

Bei der Immunpräzipitation werden gezielt bestimmte Proteine mithilfe spezifischer immobilisierter Antikörper aus einem Proteingemisch angereichert.

Es wurde mit magnetischen Dynabeads der Firma Invitrogen gearbeitet. Zunächst wurden die Dynabeads mit anti-EGFR (NEB 2232) komplexiert. Als Immunpräzipitationspuffer (IP) wurde 1 x PBS mit 0,5 % BSA verwendet. Die Komplexierung erfolgte über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Ungebundener Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen entfernt und die nun mit Antikörper behafteten Kugeln erneut über Nacht bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ mit dem Proteinlysat inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit IP-Puffer wurden die Dynabeads-Komplexe in $40\text{ }\mu\text{l}$ 8 x Gelladungspuffer aufgenommen, bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufgekocht und auf ein Westernblotgel aufgetragen. Der Nachweis der Banden erfolgte mit einem Phosphotyrosinantikörper.

3.2.4.5 Wachstums-Assays mit AlamarBlue

AlamarBlue ist ein Farbstoff, der es erlaubt, das Wachstum von Zellen quantitativ zu bestimmen. Seine Wirkung beruht auf einem Oxidations-Reduktions-Indikator, der abhängig von der metabolischen Aktivität seine Farbe ändert (colorimetrische Veränderung). Das Ausmaß des Farbumschlags kann photometrisch bestimmt werden. Die Besonderheit von AlamarBlue im Vergleich zu anderen Wachstumsassays besteht darin, daß die Umsetzung von AlamarBlue kontinuierlich und linear verläuft, so daß es für unterschiedliche Meßpunkte einer Zeitreihe nur eines einzigen Ansatzes bedarf.

Die Durchführung des Wachstumsassays erfolgte in 96-Well-Platten. Pro Well wurden im Fall von HCT116 und HT29 1500 Zellen, im Falle der langsamer wachsenden HCT116 DNMT1-/- 3000 Zellen auf jeweils 100 µl Medium ausgesät. Die Zellen wurden 24 h lang im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit erfolgte ein Anheften an den Boden der Mikrotiterplatte. Anschließend wurden pro Well 50 µl frischen, mit Gefitinib bzw. Cetuximab versetzten Mediums, hinzugegeben. Die verschiedenen Konzentrationen wurden jeweils in Triplets pipettiert und analysiert, wobei die Endkonzentrationen 0, 5, 10, 15 und 20 µM bzw. 0, 5, 7,5, 10, 15 und 20 µM im Fall von Gefitinib und 2, 5, 10, 15 und 20 µg/ml im Fall von Cetuximab betragen. Außerdem wurde ein zellfreier Ansatz als Mediumleerwert pipettiert. Als Lösungsmittelkontrolle für Gefitinib diente DMSO. Zusätzlich wurde jedes Well mit 15 µl des Farbstoffs AlamarBlue versetzt. Die Messung der Absorption erfolgte nach jeweils 0, 24, 48, 72 und 96 Stunden photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm im ELISA-Reader, wobei die Absorption bei 600 nm als Referenz diente. Die Berechnung der prozentualen Umsetzung des Farbstoffs erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Reduktion von AlamarBlue (\%)} = \frac{(\varepsilon_{\text{ox}\lambda_2})(A\lambda_1) - (\varepsilon_{\text{ox}\lambda_1})(A\lambda_2)}{(\varepsilon_{\text{red}\lambda_1})(A'\lambda_2) - (\varepsilon_{\text{red}\lambda_2})(A'\lambda_1)} \times 100$$

$\varepsilon_{\text{red}\lambda_1}$...	molarer Extinktionskoeffizient des reduzierten AlamarBlue bei 570 nm = 155,677
$\varepsilon_{\text{red}\lambda_2}$...	molarer Extinktionskoeffizient des reduzierten AlamarBlue bei 600 nm = 14,652
$\varepsilon_{\text{ox}\lambda_1}$...	molarer Extinktionskoeffizient des oxidierten AlamarBlue bei 570 nm = 80,586
$\varepsilon_{\text{ox}\lambda_2}$...	molarer Extinktionskoeffizient des oxidierten AlamarBlue bei 600 nm = 117,216
$A\lambda_1$...	Absorption der Probe bei 570 nm
$A\lambda_2$...	Absorption der Probe bei 600 nm
$A'\lambda_1$...	Absorption des zellfreien Mediumleerwerts mit AlamarBlue bei 570 nm
$A'\lambda_2$...	Absorption des zellfreien Mediumleerwerts mit AlamarBlue bei 600 nm

4 Ergebnisse

4.1 Expression von EGFR, AREG und BTC in humanen Kolonkarzinomzellen

Aus Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war bekannt, daß AREG und BTC in Kolonkarzinomzellen abhängig vom DNMT-Status differentiell reguliert sind. Da die Aktivierung proliferationssteuernder Rezeptoren wie EGFR von der Konzentration der vorhandenen Liganden abhängig ist, wurde ein funktioneller Zusammenhang zwischen der Expression der Liganden, der Aktivierung von EGFR und nachfolgend des EGFR-abhängigen Zellwachstums vermutet. Zur näheren Klärung dieses Zusammenhangs wurde zunächst eine quantitative Bestimmung der beteiligten Einzelkomponenten vorgenommen. Dazu wurde in den Zelllinien HCT116 sowie in den DNA-Methyltransferase-defizienten Zelllinien HCT116 DNMT1^{-/-}, HCT116 DNMT3b^{-/-} und HCT116 DKO die Expression dieser Proteine bestimmt und jeweils miteinander verglichen.

4.1.1 Bestimmung der EGFR-Expression

Zunächst wurden die relativen EGFR-Konzentrationen in Zellysaten von parentalen und DNA-Methyltransferase-defizienten HCT116-Zelllinien mittels Western Blot bestimmt. Als Positivkontrolle diente die alveoläre Karzinomzelllinie A549, die den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor in hohem Maße exprimiert (Diaz et al., 2010). Als Beladungskontrolle diente β -Actin, das in allen Zelllinien konstitutiv in nahezu gleichen Mengen vorliegt.



Abb. 4.1: EGFR in HCT116 parental, DNMT1^{-/-}, DNMT3b^{-/-} und DKO Westernblot mit 50 μ g Gesamtprotein

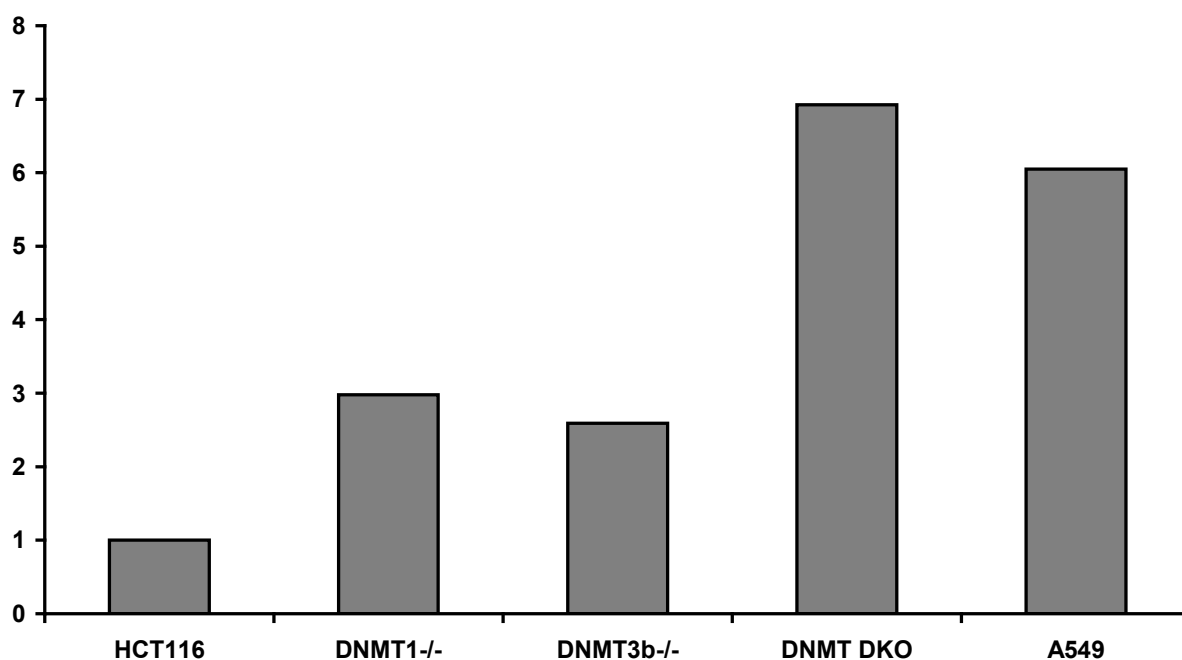


Abb. 4.2: Relativer EGFR-Gehalt der HCT116-Zelllinien im Vergleich

Graphische Auswertung von **Abb. 4.1** mit ImageJ. Die Menge von EGFR in HCT116 parental wurde als „1“ definiert und diente als Referenz für die EGFR-Mengen in den anderen Zelllinien

Das Experiment zeigte, daß das niedrigste Level von EGFR in den parentalen HCT116-Zellen vorliegt, während alle Methyltransferase-defizienten Zellen deutlich mehr EGFR exprimieren. Die höchste Expression fand sich in den „double knock-out“ (DKO) Zellen. Hier wurde ein sieben mal so hohes EGFR-Niveau wie in den parentalen HCT116 Zellen gemessen. Dies könnte auf eine negative Korrelation der Expression von DNA-Methyltransferasen und der Expression des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors EGFR in HCT116-Zellen schließen lassen.

4.1.2 Bestimmung der Expression der EGFR-Liganden AREG und BTC

4.1.2.1 Vergleich der AREG-Konzentration in parentalen HCT116 und DNMT-Knockout-Zellen

In Zellextrakten der bereits oben verwendeten Zelllinien wurde mittels Sandwich-ELISA die im Zytoplasma vorliegende Konzentration von Amphiregulin bestimmt.

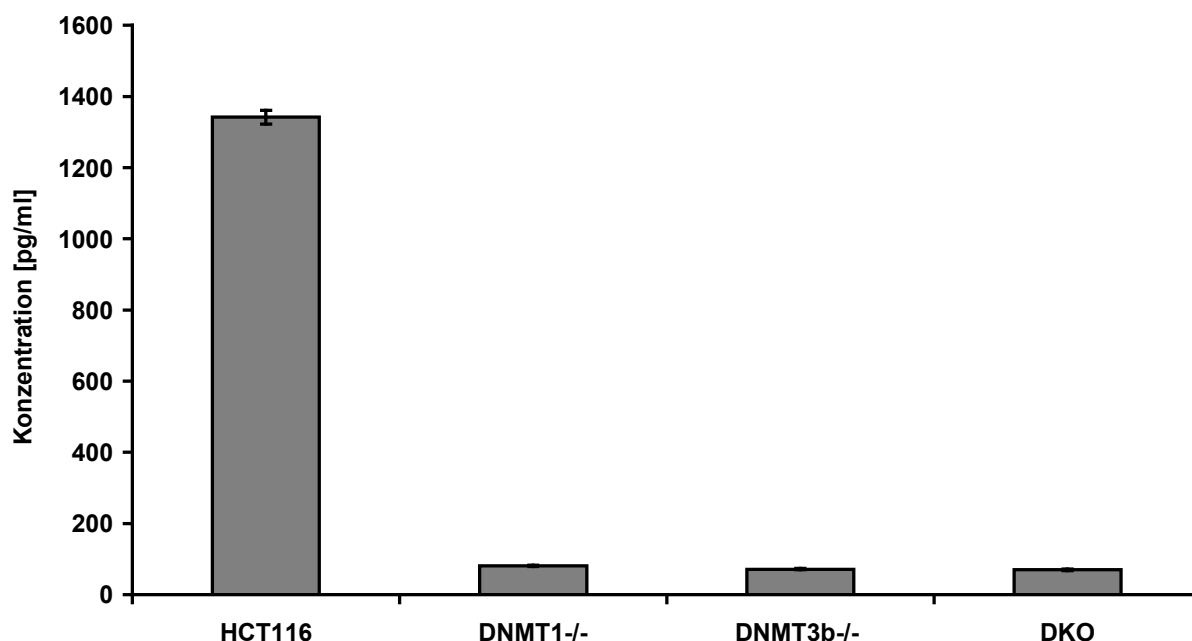


Abb. 4.3: Konzentration von AREG im Zellysat von HCT116, HCT116 DNMT1^{-/-}, HCT116 DNMT3b^{-/-} und HCT116 DKO
ELISA-Assay mit 40 µg Gesamtprotein

Hierbei zeigten sich in allen DNMT-defizienten Zellen deutlich niedrigere Protein-Spiegel als in den parentalen Zellen. Die Expression von Amphiregulin verhielt sich damit in HCT116 parental und DKO umgekehrt proportional zur Expression von EGFR.

4.1.2.2 Bestimmung der direkten Abhängigkeit der AREG-Proteinexpression vom Methylierungsstatus

Um die direkte kausale Abhängigkeit der AREG-Proteinmenge vom DNMT-Status zu untersuchen, wurde in einem weiteren Schritt die DNA-Methylierung durch den DNA-Methyltransferase-Inhibitor Zebularin gehemmt.

Zebularin bindet an die DNA-Methyltransferasen und bildet mit ihnen einen funktionell inaktiven Komplex. In dem hier betrachteten Zeitraum von maximal 96 Stunden ist dabei ausschließlich die DNA-Methyltransferase 1 betroffen (Marquez et al., 2005).

In einem vorgeschalteten Experiment wurde zunächst die regelrechte Funktion des Inhibitors überprüft. Dazu wurde die DNA Methyltransferase 1 in unbehandelten parental HCT116 Zellen sowie in solchen, die mit aufsteigenden Konzentrationen von Zebularin behandelt worden waren, mittels Western Blot bestimmt.

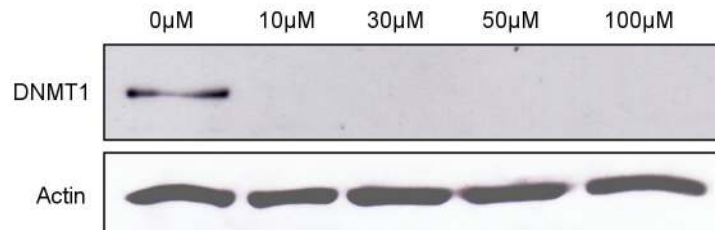


Abb. 4.4: Expression der DNMT1 in HCT116 nach Behandlung mit Zebularin
Westernblot mit 50 µg Gesamtprotein

Hierbei zeigte sich, daß bereits geringe Konzentrationen von Zebularin zu einem Verschwinden des Proteins unter die methodenspezifische Nachweisgrenze führten.

In einem weiteren Schritt wurden die parental HCT116 Zellen, die konstitutiv hohe Mengen an Amphiregulin exprimieren (vgl. **Abb. 4.3**), mit aufsteigenden Konzentrationen von Zebularin behandelt und die Amphiregulin-Konzentration mittels Sandwich-ELISA in Zellysat und Überstand bestimmt.

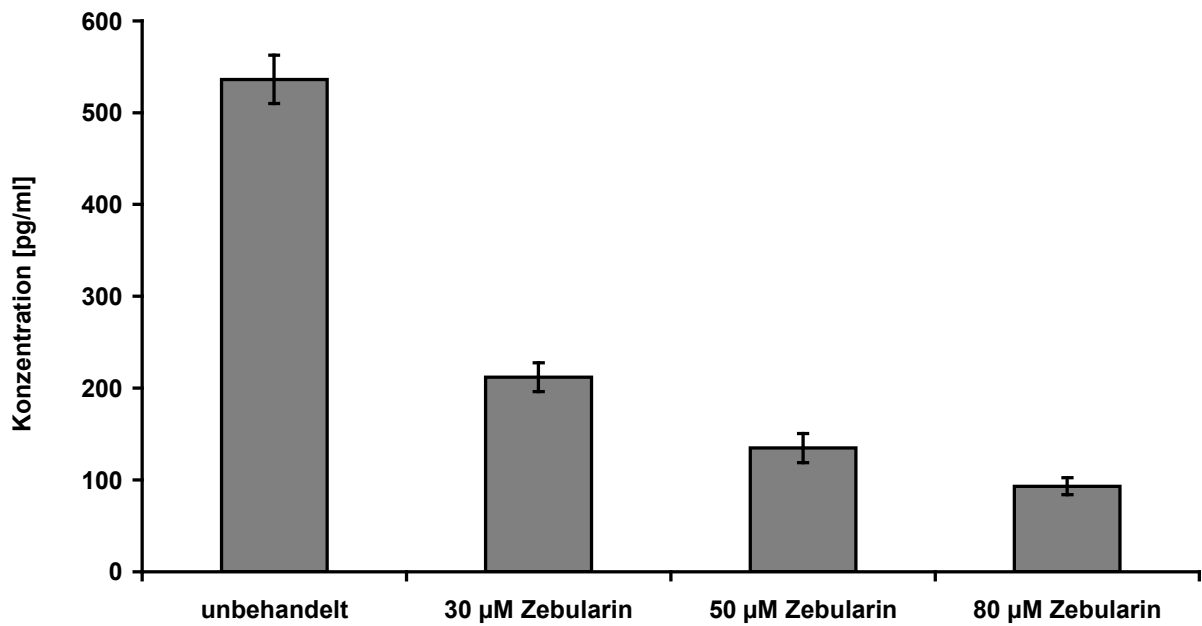


Abb. 4.5: Konzentration von AREG im Zellysat von HCT116 nach Behandlung mit Zebularin
ELISA-Assay mit 40 µg Gesamtprotein, 30 – 80 µM Zebularin für 96 h

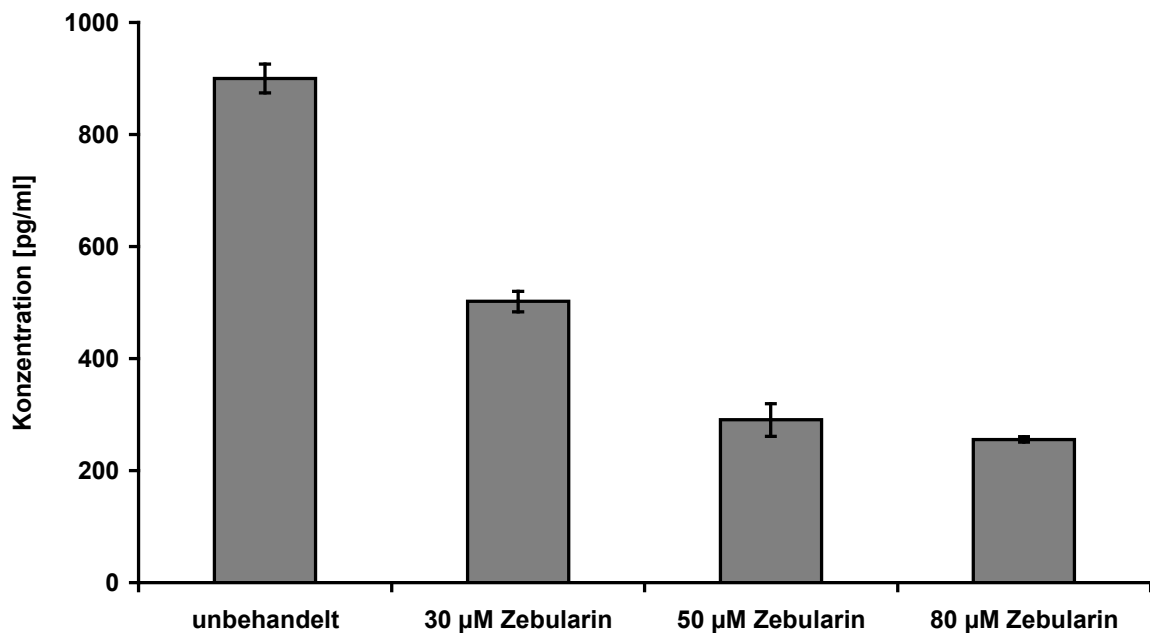


Abb. 4.6: Konzentration von AREG im Zellüberstand von HCT116 nach Behandlung mit Zebularin
ELISA-Assay mit 200 µg Gesamtprotein, 30 – 80 µM Zebularin für 96 h

Die Menge an Amphiregulin nahm mit steigender Zebularinkonzentration auf bis zu 17 % des Ausgangswerts bei der intrazellulär vorliegenden bzw. 28 % bei der sezernierten Form des Proteins deutlich ab (vgl. **Abb. 4.5** und **Abb. 4.6**). Nicht nur die genetische Hemmung der DNA-Methyltransferasen führte also zum Verlust von AREG, sondern auch die pharmakologische.

4.1.2.3 Bestimmung der mRNA-Expression von AREG in Abhängigkeit vom Methylierungsstatus

Um zu zeigen, ob der Einfluß des Zebularins auf die Konzentration des gebildeten Amphiregulins auf Transkriptionsebene und nicht posttranslational stattfindet, es sich also um eine direkte Abhängigkeit der Genexpression vom Methylierungsstatus des Amphiregulins handelt, sollte der Gehalt an AREG-mRNA in unbehandelten und mit Zebularin behandelten Zellen mittels Northern Blot bestimmt werden.

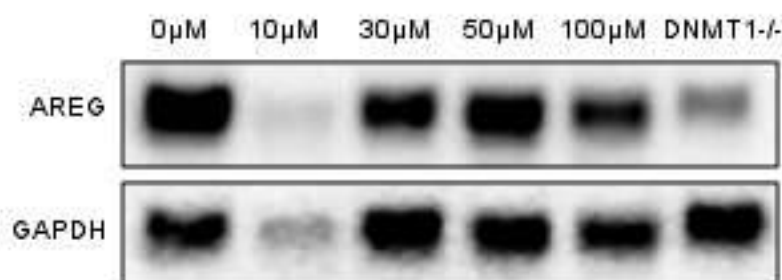


Abb. 4.7: AREG mRNA in HCT116 nach Behandlung mit Zebularin
Northern Blot mit 10 µg RNA, Behandlung mit Zebularin für 72 h

Bei der Auswertung von **Abb 4.7** fiel auf, daß für Spur zwei nicht auszuschließen ist, daß die RNA teilweise degradiert war. Diese Spur blieb daher in der Auswertung unberücksichtigt (vgl. **Abb. 4.8**).

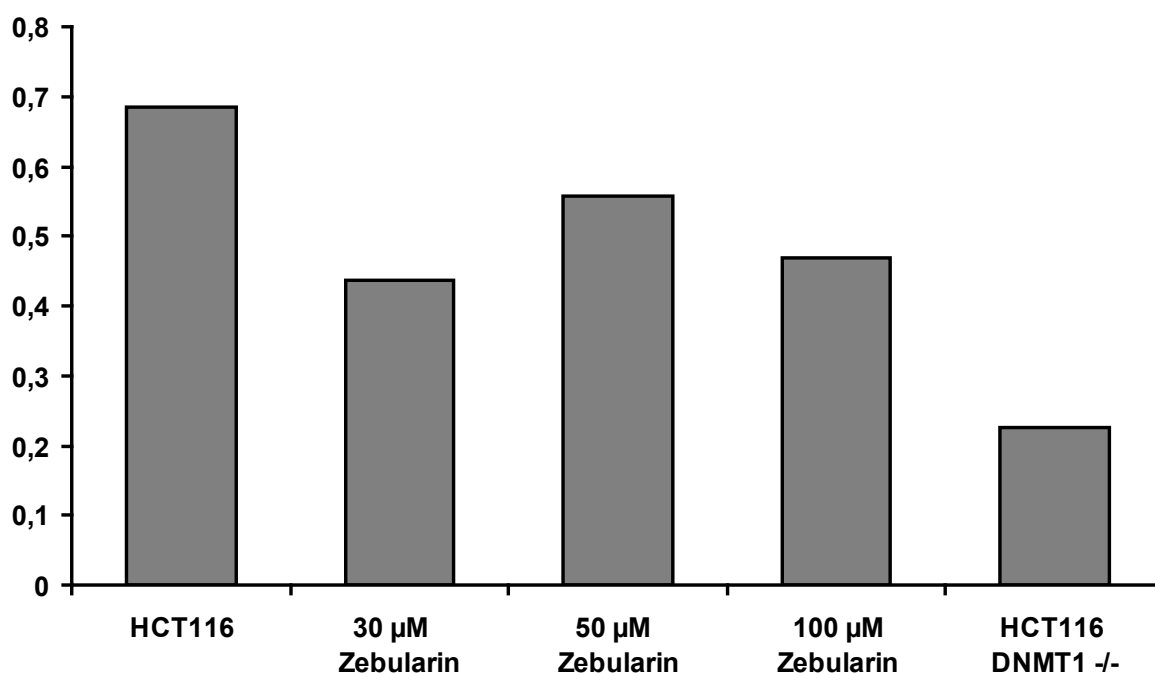


Abb. 4.8: Relativer AREG-mRNA-Gehalt in HCT116 nach Behandlung mit Zebularin und in HCT116 DNMT1-/-

Graphische Auswertung von **Abb. 4.7** mit ImageJ. Die Menge von AREG-mRNA in HCT116 parental wurde als „1“ definiert und diente als Referenz für die mRNA-Mengen in den anderen Zelllinien

Für die übrigen Spuren, die die Wirkung der Zebularinbehandlung abbilden, ist kein eindeutiger Effekt nachweisbar. Nach konstitutivem Knockdown der DNMT1 ist hingegen eine deutliche Verminderung der Expression von AREG zu beobachten. Es besteht also ein Widerspruch zwischen der Regulation von AREG durch Zebularin auf RNA- und Proteinebene.

4.1.2.2 Bestimmung der Konzentration von Betacellulin

Analog zu den Nachweisen von Amphiregulin wurden Versuchsreihen mit Betacellulin (BTC) durchgeführt. Die Konzentration der sezernierten Form von Betacellulin im Serum war dabei so niedrig, daß sie mit der verwendeten Methode nur sehr ungenau bestimmt bzw. nicht detektiert werden konnte. Daher bewirkten bereits geringe Meßwertschwankungen eine hohe Standardabweichung, die, wie in **Abb. 4.9** zu sehen ist, zum Teil nach Berechnung der BTC-Konzentration zu negativen Werten führte.

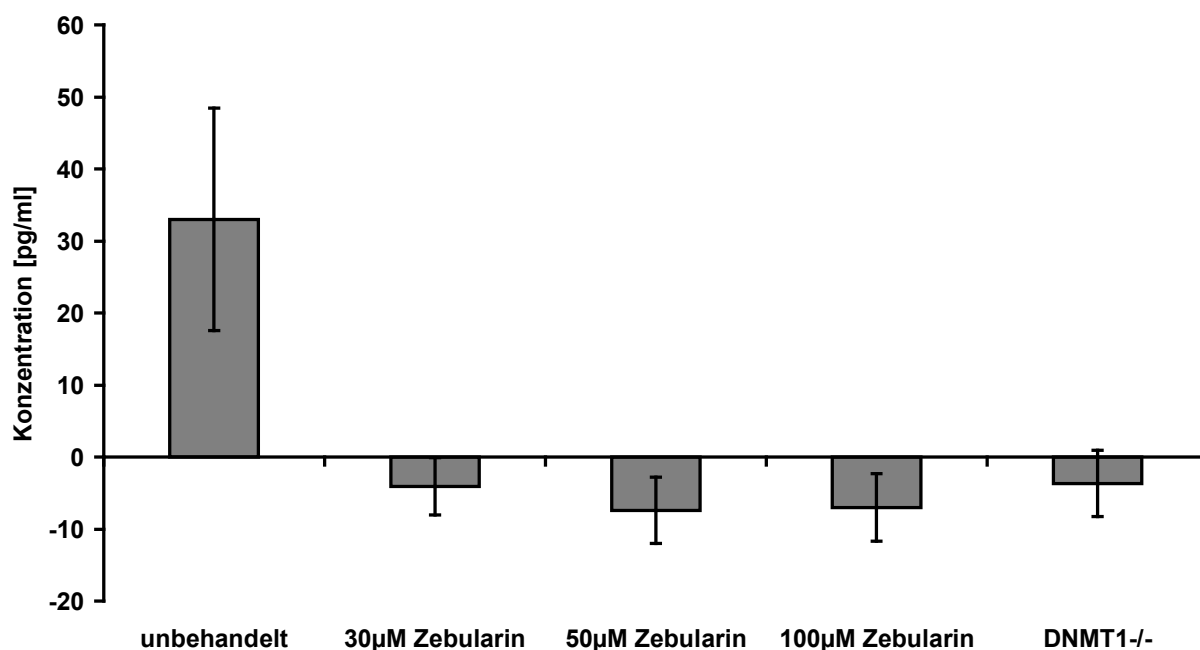


Abb. 4.9: Konzentration von BTC im Zellüberstand von HCT116 nach Behandlung der Zellen mit Zebularin sowie von HCT116 DNMT1-/-
ELISA Betacellulin, 200 µg Gesamtprotein, 30 – 100 µM Zebularin für 96 h

Für die weitere Analyse wurden aus diesem Grund ausschließlich die Meßwerte der im Zytoplasma vorliegenden Variante des Proteins verwendet (**Abb. 4.10** und **Abb. 4.11**). Insgesamt lag die Konzentration von Betacellulin in unbehandelten HCT116-Zellen deutlich unter der von Amphiregulin.

In den DNMT-defizienten Zellen war die Konzentration niedriger als in den parentalen HCT 116-Zellen (**Abb. 4.10**). Allerdings fiel auf, daß der Unterschied der Proteinmenge zwischen den parentalen und den methyltransferase-defizienten Zellen bei Betacellulin geringer ausfiel als bei Amphiregulin (vgl. **Abb. 4.3**).

Bei Zugabe des Methyltransferase-Inhibitors Zebularin reduzierte sich analog zum Amphiregulin auch die Proteinmenge von Betacellulin (**Abb. 4.11**).

Daher kann auch für Betacellulin eine methylierungsabhängige Regulation angenommen werden, wobei diese im Vergleich zu Amphiregulin weniger deutlich ausfällt.

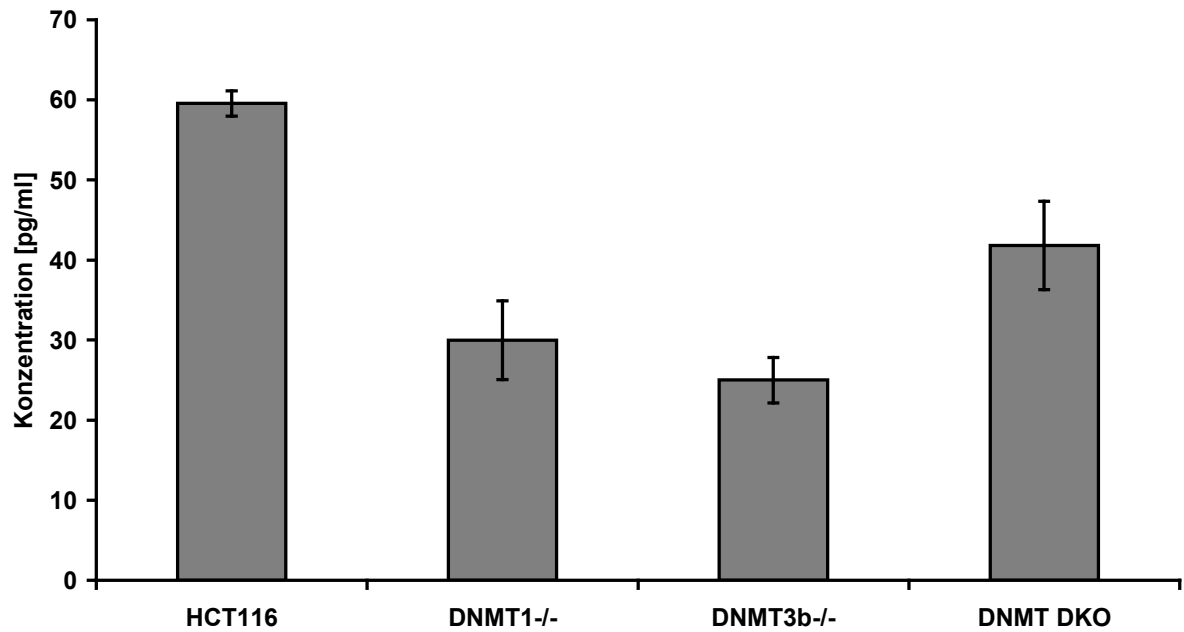


Abb. 4.10: Konzentration von BTC im Zellysat von HCT116, HCT116 DNMT1-/-, DNMT3b-/- und DKO
ELISA-Assay mit 40 µg Gesamtprotein

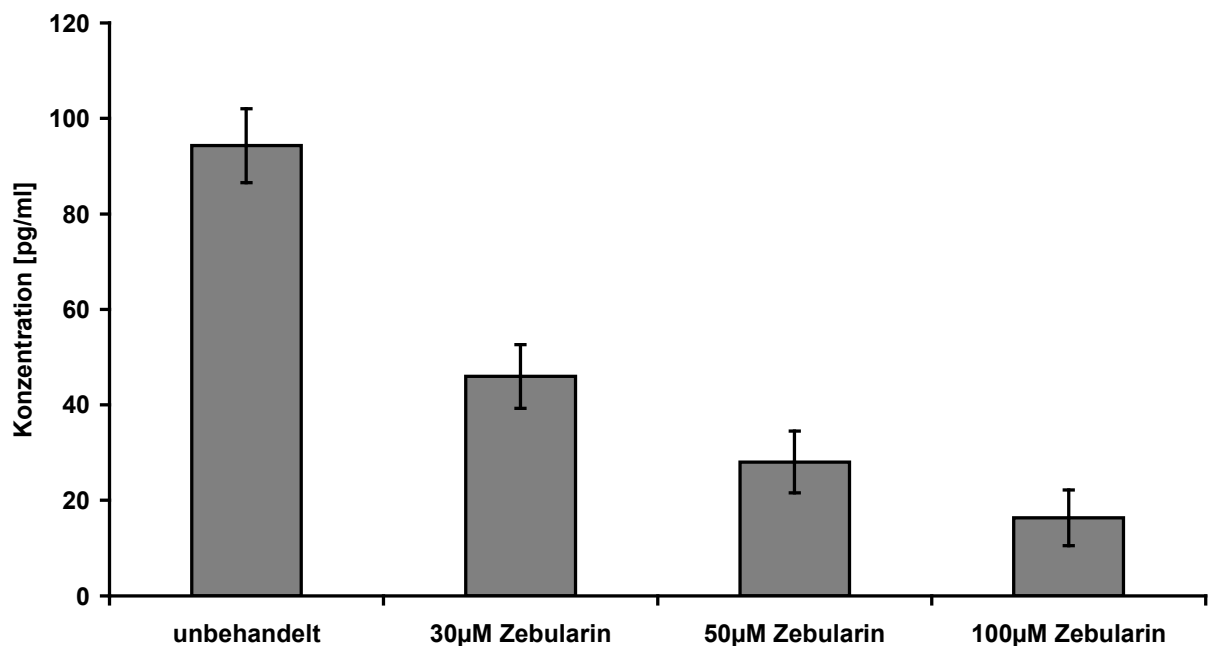


Abb. 4.11: Konzentration von BTC im Zellysat von HCT116 nach Behandlung mit Zebularin
ELISA-Assay mit 40 µg Gesamtprotein, 30 – 100 µM Zebularin für 96 h

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß in den untersuchten Zelllinien eine negative Korrelation zwischen der Expression des EGF-Rezeptors und seiner Liganden Amphiregulin und Betacellulin besteht. Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen dem Methylierungsgrad der DNA und dem Expressionsniveau des Rezeptors und seiner Liganden.

4.2 Die Rolle von Amphiregulin für die EGFR-Funktion und das Zellwachstum

4.2.1 Einfluß von Amphiregulin auf den Phosphorylierungsstatus des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors

Um die funktionelle Interaktion zwischen dem epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor und seinen Liganden genauer zu untersuchen, sollte ermittelt werden, inwiefern sich die Proteinmenge von AREG auf die Aktivität von EGFR auswirkt. Da EGFR auf externe Wachstumssignale mit einer Autophosphorylierung reagiert, sollte als Maß für die Aktivität zunächst der Phosphorylierungsstatus des Rezeptors dienen.

Zu diesem Zweck sollten in Zellen mit unterschiedlich hohen Expressionsniveaus von Amphiregulin der Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors bestimmt werden. Wie **Abb. 4.3** zeigt, exprimieren HCT116-Zellen konstitutiv hohe Level an Amphiregulin, die DNMT1-/--Variante hingegen sehr niedrige. Um weitere Abstufungen in den Expressionsniveaus von AREG zu gewinnen, wurden HCT116-Zellen auf der Grundlage des vorangegangenen Experiments mit aufsteigenden Konzentrationen von Zebularin behandelt und anschließend lysiert (vgl. 4.1.2). Die AREG-Konzentration wurde wie oben beschrieben mittels ELISA ermittelt. Anschließend sollte die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors im Western Blot bestimmt werden.

Trotz wiederholter Versuche mit verschiedenen pEGFR-Antikörpern und verschiedenen Versuchsbedingungen gelang jedoch kein Nachweis von phosphoEGFR im Western Blot.

Als alternative Methode sollte daher eine Möglichkeit etabliert werden, EGFR zunächst per Immunpräzipitation aus dem Zellysat zu extrahieren. Anschließend

sollte die Phosphorylierung des präzipitierten Rezeptors mit einem Panphospho-Antikörper im Western Blot nachgewiesen werden.

Im Rahmen der hierzu durchgeführten Versuche gelang allerdings keine zufriedenstellende Präzipitation von EGFR, so daß der Einfluß von AREG auf den Phosphorylierungsstatus des EGF-Rezeptors aus methodischen Gründen nicht untersucht werden konnte.

4.2.2 Wirkung des EGFR-Inhibitors Gefitinib auf die Proliferation von HCT116 und HCT116 DNMT1-/-

EGFR ist einer der wichtigsten bekannten Wachstumsfaktorrezeptoren und u.a. über seine Verbindung mit dem Ras-Signalnetzwerk maßgeblich an der Zellproliferation beteiligt. In der Klinik werden EGFR-Inhibitoren erfolgreich zur Eindämmung des Tumorwachstums eingesetzt. Die Proliferationsrate epidermaler Zellen ist also zumindest zum Teil EGFR-abhängig und erlaubt daher mittelbar Rückschlüsse auf die Aktivität dieses Rezeptors.

Im Wachstumsassay mit AlamarBlue wurde zunächst das Wachstumsverhalten von HCT116 parental und HCT116 DNMT1-/- verglichen (**Abb. 4.12** und **Abb. 4.13**, jeweils der mit „unbehandelt“ bezeichnete Graph). Wie zuvor gezeigt (**Abb. 4.1** und **Abb. 4.3**) exprimiert HCT116 geringe Level an EGFR und hohe Level an AREG, der DNMT1-Knockout hingegen hohe Level an EGFR und niedrige an AREG.

In der Routinekultur war bereits beobachtet worden, daß der parentale Zellklon von HCT116 wesentlich schneller wuchs als der Methyltransferase-defiziente Klon HCT116 DNMT1-/. Aufgrund dieses Wachstumsverhaltens wurden für die Versuche mit der langsamer wachsenden DNMT1-/- - Variante mehr Zellen eingesät als für die Versuche mit den parentalen HCT116-Zellen, um sicherzustellen, daß beide Zelllinien über einen Zeitraum von 96 Stunden möglichst logarithmisch wuchsen.

Nun sollte gezeigt werden, ob das Wachstum der Zellen tatsächlich von der Aktivität des EGFR abhing. Dazu wurde dessen Aktivität mithilfe des Tyrosinkinaseinhibitors Gefitinib gehemmt und das Wachstum der Zellen im Wachstumsassay bestimmt.

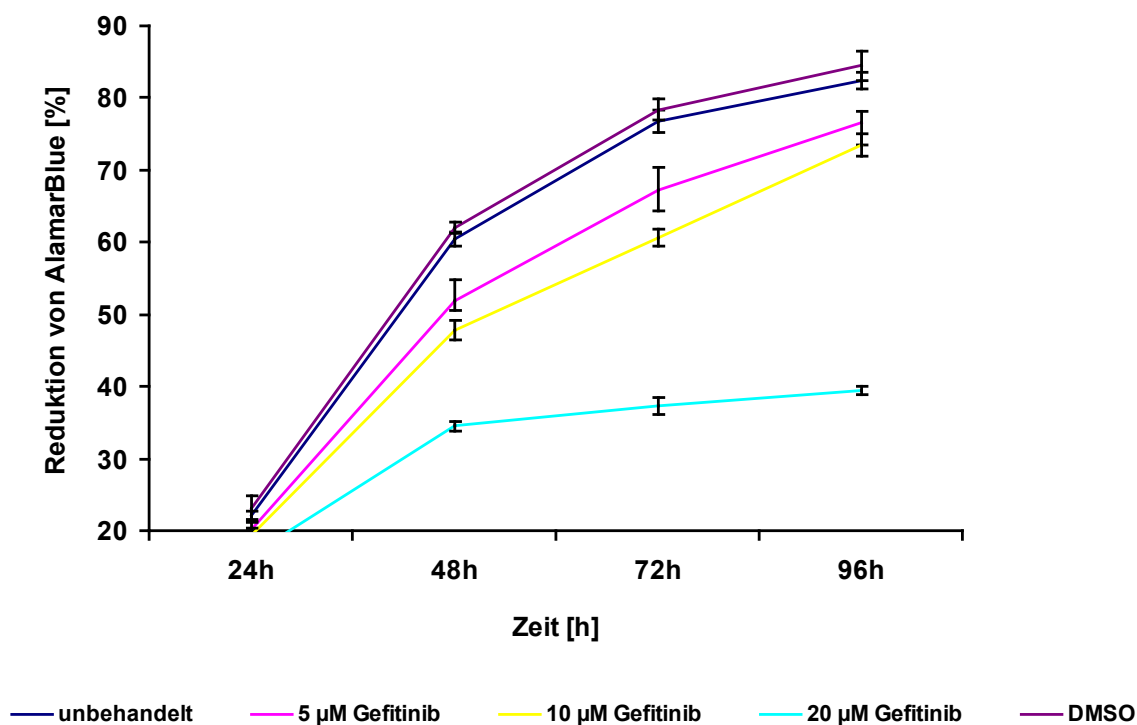


Abb. 4.12: Wachstum von HCT116 nach Behandlung mit Gefitinib

Wachstumsassay mit AlamarBlue, 1500 Zellen/Well, 5 – 20 µM Gefitinib in DMSO für 96 h

Es konnte beobachtet werden, daß das Wachstum der parentalen HCT 116-Zellen durch Zugabe von Gefitinib dosisabhängig gehemmt wurde. Die Ausprägung dieses Effekts nahm dabei mit steigender Dosis zu (**Abb. 4.12**).

Ein anderes Bild zeigte sich bei der Gefitinib-Behandlung der DNMT1-Knockoutzellen. Sie reagierten deutlich weniger sensitiv auf die Behandlung mit Gefitinib als die parentalen HCT116-Zellen. Erst bei einer Konzentration von 20 µM Gefitinib zeigte sich eine deutliche Inhibition des Zellwachstums (**Abb. 4.13**).

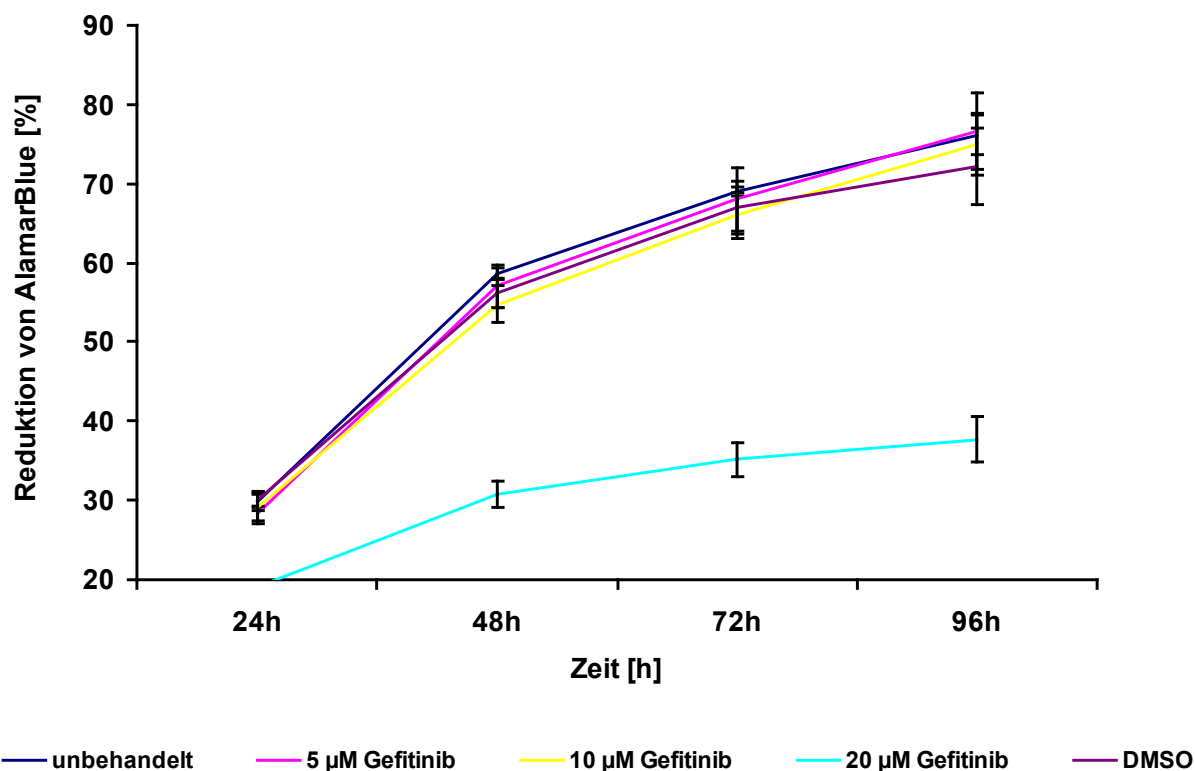


Abb. 4.13: Wachstum von HCT116 DNMT1^{-/-} nach Behandlung mit Gefitinib
Wachstumsassay mit AlamarBlue, 3000 Zellen/Well, 5 – 20 µM Gefitinib in DMSO für 96 h

4.2.3 siRNA-vermittelte Hemmung von Amphiregulin und Auswirkungen der Hemmung auf das Ansprechen der Zelle auf Gefitinib

In einem nächsten Schritt wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Empfindlichkeit der verschiedenen Zelllinien gegenüber Gefitinib und ihrem jeweiligen Gehalt an Amphiregulin untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Expression von Amphiregulin mithilfe von spezifischer siRNA unterdrückt.

Zunächst wurden die für die jeweiligen Zelllinien optimalen siRNA-Transfektionsbedingungen etabliert. Nach der erfolgreichen siRNA-vermittelten Hemmung von AREG (Proteinexpression um 58 % niedriger als in der scrambled-Kontrolle) wurde im Wachstumsassay überprüft, ob und inwiefern sich die partielle Hemmung von AREG auf die Empfindlichkeit gegenüber dem EGFR-Inhibitor Gefitinib auswirkt.

Die Effizienz der siRNA-vermittelten Hemmung von Amphiregulin wurde parallel zu jeder Messung mittels ELISA nachgewiesen (vgl. **Abb. 4.14**).

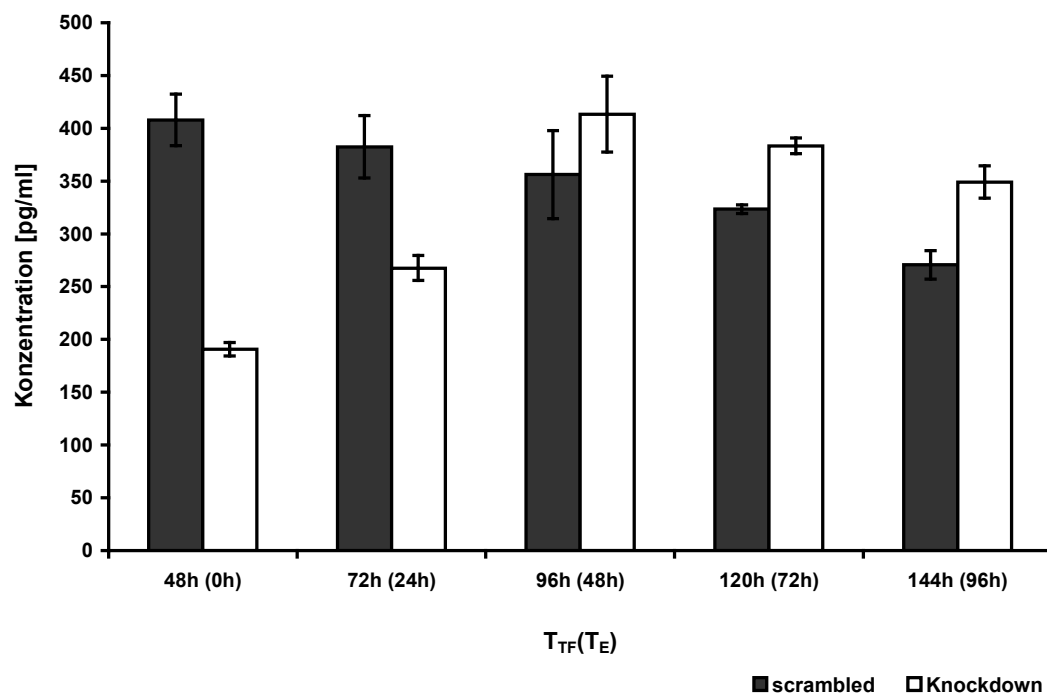
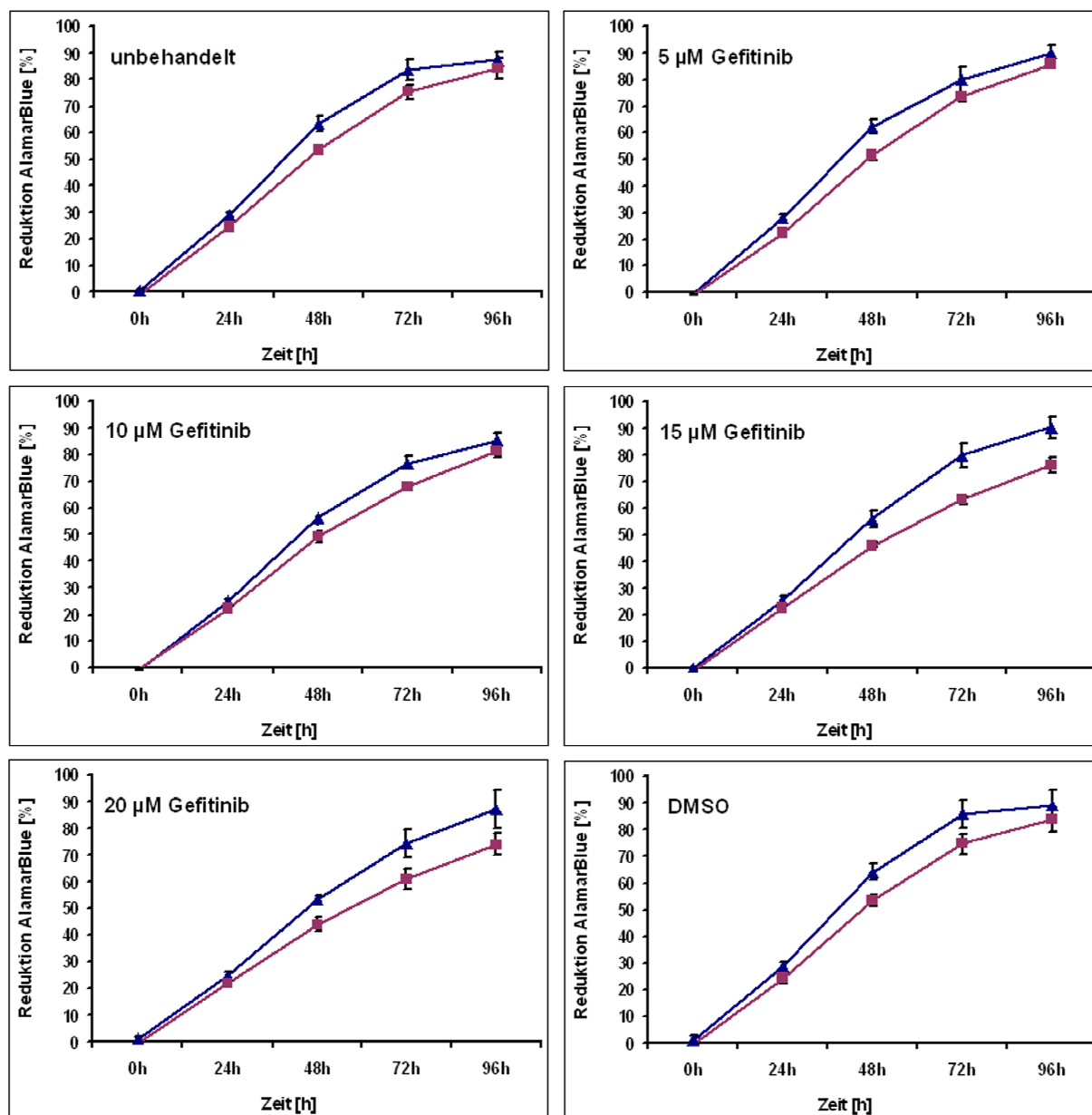


Abb. 4.14: Effizienz des siRNA-vermittelten Knockdowns von AREG in HCT116
ELISA-Assay mit 40 µg Protein, Bestimmung 48 – 144 h nach der 2. Transfektion mit siRNA,
TF – Zeit nach Transfektion, TE – Zeit nach Einsaat



▲ Kontrolle mit unspezifischen siRNA-Fragmenten (scrambled) ■ nach siRNA-vermittelter Hemmung von AREG (knockdown)

Abb. 4.15: Wachstum von HCT116 nach siRNA-vermittelter Hemmung von AREG und Behandlung mit Gefitinib

Wachstumsassay mit AlamarBlue, 1500 Zellen/Well, Einsaat 24 h nach 2. Transfektion mit siRNA, Behandlung mit 5 – 20 µM Gefitinib 24 h nach Einsaat (48 h nach Transfektion)

Bezüglich der Sensitivität gegenüber Gefitinib konnte lediglich ein schwacher Unterschied zwischen den unbehandelten und den transfizierten Zellen gesehen werden.

Allerdings war die Sensitivität bereits bei der Kontrolle mit den unspezifischen siRNA-Fragmenten (scrambled) im Vergleich zu den untransfizierten Zellen deutlich

geringer, so daß eine Beeinflussung des Ergebnisses durch die Transfektion selbst nicht auszuschließen ist.

Hinzu kommt, daß aus methodischen Gründen die Einsaat der Zellen in den Wachstumsassay erst 48 Stunden nach der zweiten Transfektion erfolgen konnte. Zu diesem Zeitpunkt war die Effizienz des Knockdowns jedoch bereits im Abklingen begriffen. Zum Meßzeitpunkt 48 h, also 96 h nach der zweiten Transfektion, war der Knockdown bereits nicht mehr nachweisbar. Die Amphiregulinspiegel lagen ab diesem Zeitpunkt sogar regelmäßig über denen der Kontrolle mit den unspezifischen siRNA-Fragmenten (scrambled) (**Abb. 4.14**). Aus diesem Grund kann auf der Grundlage der durchgeführten Experimente keine verlässliche Aussage über die möglichen Auswirkungen von Amphiregulin auf die Sensitivität gegenüber Gefitinib getroffen werden.

Aufgrund der oben beschriebenen Schwierigkeiten mit der Stabilität des Knockdowns in HCT116 wurden auch in anderen Zelllinien Amphiregulin-Knockdowns etabliert. Der effizienteste und stabilste gelang in der Zelllinie HT29 (**Abb. 4.16**).

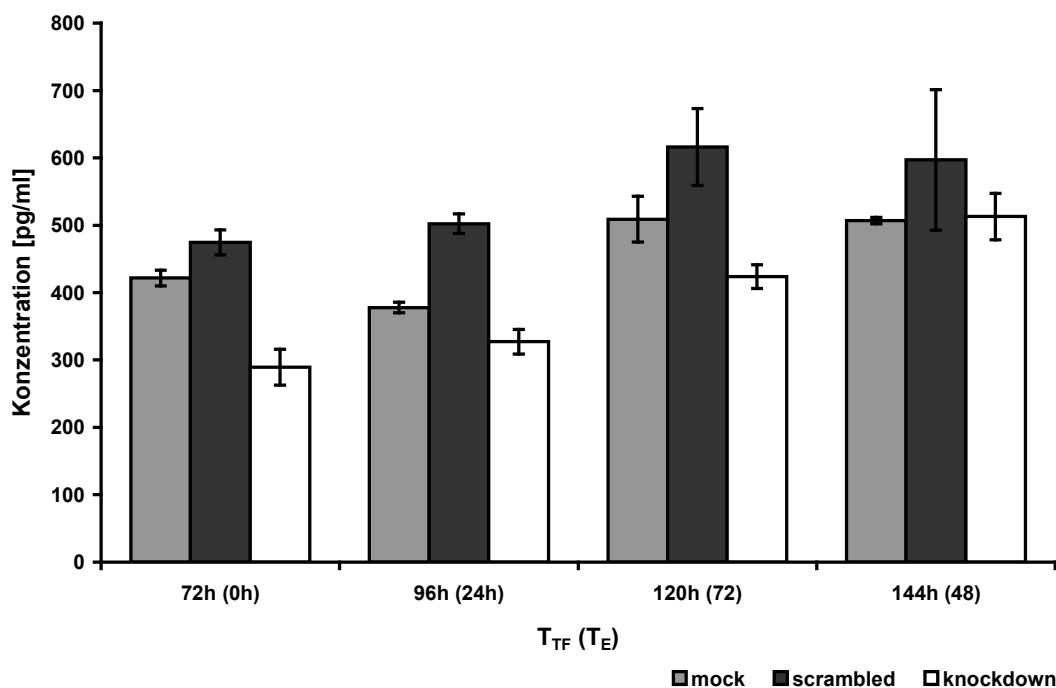


Abb. 4.16: Effizienz des siRNA-vermittelten Knockdowns von AREG in HT29-Zellen
ELISA-Assay mit 40 µg Protein, Bestimmung 48 – 144 h nach der 2. Transfektion mit siRNA,
TF – Zeit nach Transfektion, TE – Zeit nach Einsaat

Auf der Grundlage dieser Ergebnisse wurden im folgenden auch mit HT29 Wachstumsassays mit Gefitinib durchgeführt.

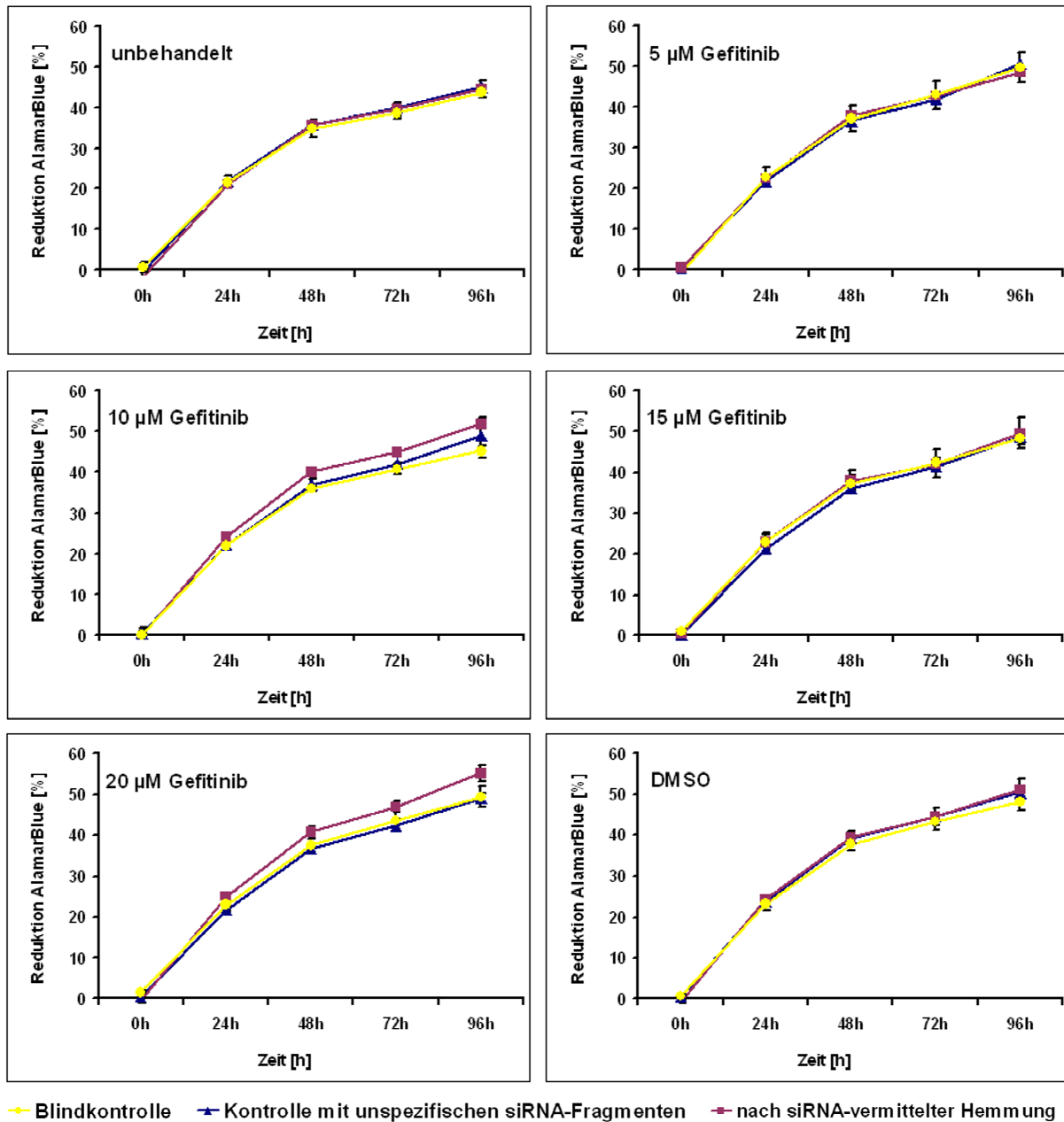


Abb. 4.17: Wachstum von HT29 nach siRNA-vermittelter Hemmung von AREG und Behandlung mit Gefitinib

Wachstumsassay mit AlamarBlue, 1500 Zellen/Well, Einsaat 24 h nach 2. Transfektion mit siRNA, Behandlung mit 5 – 20 µM Gefitinib 24 h nach Einsaat (48 h nach Transfektion)

Interessanterweise ließ sich auch hier in Bezug auf die Proliferation kein signifikanter Effekt des Knockdowns im Vergleich zu den unbehandelten oder Lösungsmittel-behandelten Zellen nachweisen. Es zeigte sich lediglich eine leichte Tendenz, nach der die Zellen nach siRNA-vermittelter Hemmung von Amphiregulin unter der Behandlung mit Gefitinib eher stärker proliferierten als ohne Gefitinibzusatz. Die Frage nach dem Einfluß von Amphiregulin auf die Wirksamkeit von Gefitinib kann daher im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

4.2.4 Wirkung des Antikörpers Cetuximab auf die Proliferation von HCT116 und HT29

Weiterhin wurden verschiedene Zelllinien mit dem EGFR-Antikörper Cetuximab behandelt und im Wachstumsassay verglichen. Für die Höhe der eingesetzten Dosis orientierte man sich an den in der klinischen Anwendung üblichen angestrebten Serumkonzentrationen.

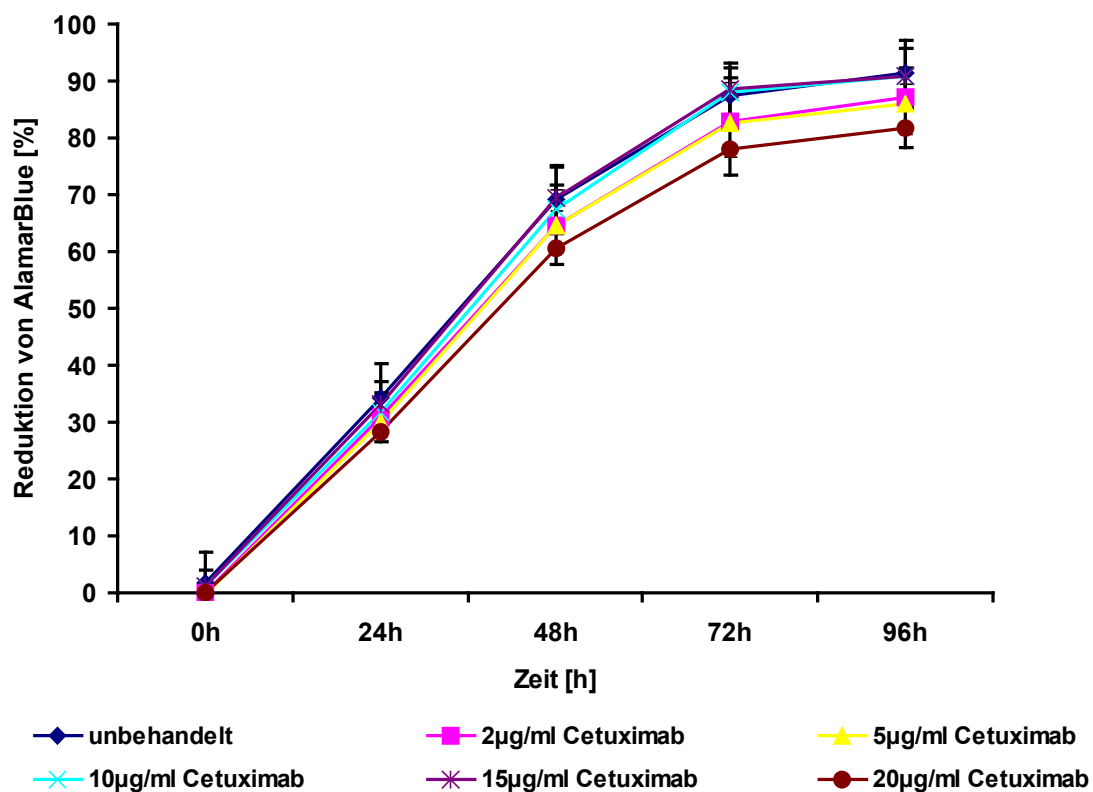


Abb. 4.18: Wachstum von HCT116 nach Behandlung mit Cetuximab
Wachstumsassay mit AlamarBlue, 1500 Zellen/Well, 2 – 20 µg/ml Cetuximab für 96 h

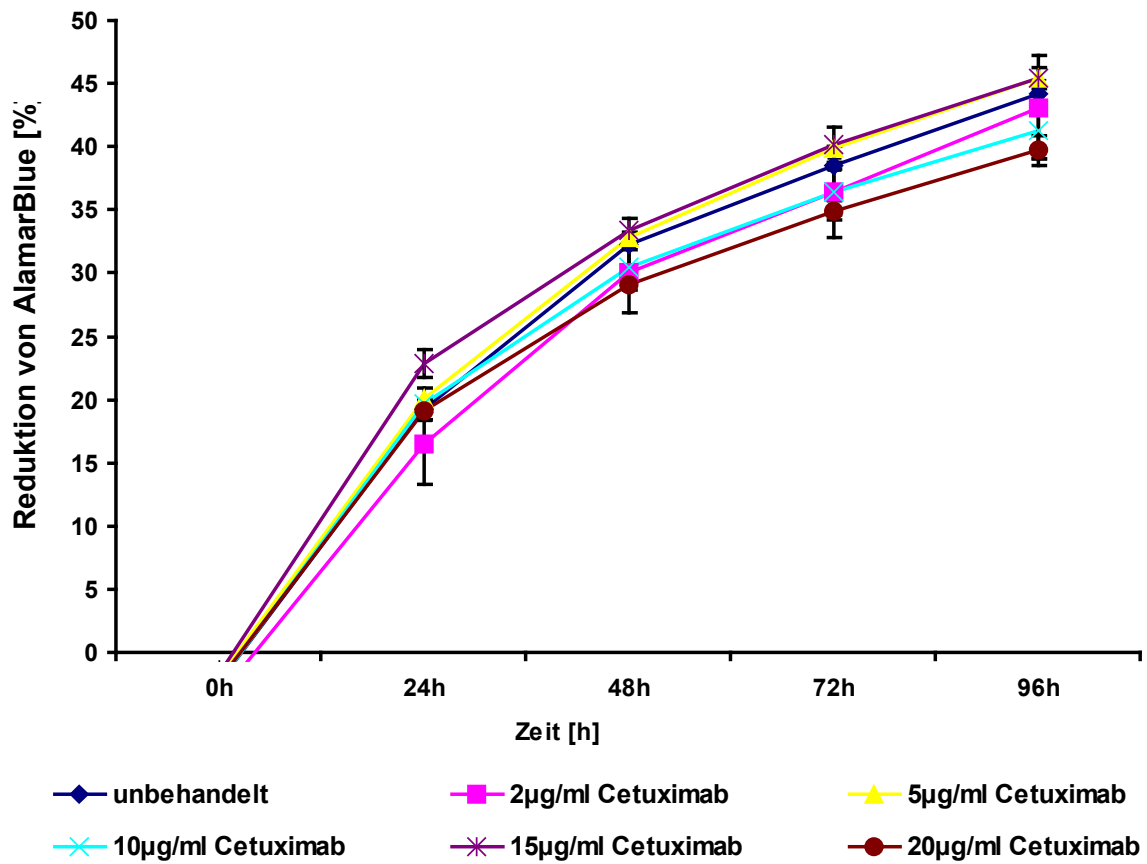


Abb. 4.19: Wachstum von HT29 nach Behandlung mit Cetuximab

Wachstumsassay mit AlamarBlue, 1500 Zellen/Well, 2 – 20 µg/ml Cetuximab für 96 h

Bei beiden untersuchten Zelllinien ist ein schwacher Effekt sichtbar, der im Fall von HT29 jedoch nicht reproduzierbar war.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Expression der EGF-Rezeptor-Liganden Amphiregulin und Betacellulin in HCT116-Zellen durch DNA-Methylierung direkt oder indirekt reguliert wird. Die Methylierung bewirkt dabei eine Zunahme ihrer Expression.

Dieser Zusammenhang war durch Vorarbeiten mit Chip-Analysen bereits auf mRNA-Ebene gesehen worden und konnte nun auf Proteinebene bestätigt werden. Zusätzlich wurden Hinweise darauf gefunden, daß ein Zusammenhang zwischen der Höhe der Amphiregulinexpression und der Empfindlichkeit gegenüber dem am EGFR wirksamen Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib existiert. Höhere Spiegel an Amphiregulin korrelierten dabei zum Teil mit einer gesteigerten Sensitivität. Ob dieser Zusammenhang ein kausaler oder lediglich ein korrelativer ist, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden.

5.1 Kritische Bewertung der Ergebnisse

5.1.1 Korrelation zwischen der Expression von EGFR und seinen Liganden

In den hier gezeigten Experimenten verhielten sich die Expressionen des EGF-Rezeptors und der untersuchten Liganden umgekehrt proportional (vgl. 4.1.1 und 4.1.2). Dies kann sowohl ein zufälliges Phänomen sein, als auch eine abhängige Regulierung zwischen dem EGF-Rezeptors und einzelner oder aller seiner Liganden abbilden.

Vorstellbar wäre beispielsweise, daß bei niedriger EGFR-Expression die Liganden im Sinne einer positiven Rückkopplungsschleife kompensatorisch aufreguliert würden. Umgekehrt käme es dann bei Vorliegen von geringen Mengen der Liganden zu einer vermehrten Expression des Rezeptors. Beides würde der Aufrechterhaltung einer bestimmten Proliferationsrate dienen und somit ein Tumorwachstum unabhängig von äußeren Wachstumsreizen ermöglichen. Wachstum in Unabhängigkeit von äußeren Reizen stellt eine herausragende Eigenschaft von Tumorzellen dar. Ein dazu beitragender Mechanismus ist die Entstehung autokriner Rückkopplungsschleifen,

deren Vorhandensein die Zelle in die Lage versetzt, Wachstumsfaktoren zu bilden, auf die sie selbst reagieren kann (Hanahan und Weinberg, 2000). Positive autokrine Rückkopplungsschleifen zwischen Amphiregulin und dem EGFR sind in einer Reihe von Tumoren beschrieben, darunter in Brust-, Leber- und Pankreastumoren und in Kolonkarzinomzelllinien (Castillo et al., 2006; Johnson et al., 1992; Willmarth und Ethier, 2006).

Allerdings können auf der Basis der vorliegenden Daten keine eindeutigen Erkenntnisse darüber gewonnen werden, ob der beobachtete Zusammenhang tatsächlich Ausdruck einer solchen autokrinen Rückkopplung ist. Hinzu kommt, daß von den am EGF-Rezeptor wirkenden Liganden nur Amphiregulin und Betacellulin betrachtet wurde. Es liegen keine Erkenntnisse darüber vor, ob eine Reduktion der Amphiregulinmenge zu einer Substitution durch andere, den gleichen Signalweg ansteuernde, EGFR-Liganden wie z.B. EREG, EGF oder TGF- α führt.

Zur näheren Klärung wäre es sinnvoll, einen oder mehrere der Liganden aus dem System zu entfernen und danach die Expression der jeweils anderen Komponenten zu bestimmen. Methodisch infrage kommen z.B. siRNA-induzierte Hemmungen von jeweils einem der Liganden mit anschließender Bestimmung der Expression der anderen Liganden, des Rezeptors und der Auswirkungen auf das Zellwachstum. Umgekehrt ist eine gezielte Vektor - Einschleusung von EGFR-Liganden in Zelllinien, die das Protein niedrig oder gar nicht exprimieren, möglich.

Als alternative Herangehensweise könnte man den Rezeptor oder seine Aktivität mittels siRNA oder mittels eines EGFR-Inhibitors hemmen und anschließend die Expression der Liganden auf mRNA- und auf Proteinebene bestimmen.

Bei beiden Ansätzen wäre allerdings zu beachten, daß es in der Literatur Hinweise für eine Aufregulierung von Amphiregulin als Reaktion auf Streß gibt. Belege für eine solche streßassoziierte Aufregulierung finden sich in bezug auf oxidativen und osmotischen Streß in Magenepithelzellen von Ratten (Miyazaki et al., 2001) und als Reaktion auf mechanischen Streß in humanen Bronchialepithelzellen (Chu et al., 2005). Ein ähnliches Phänomen als Folge von chemischem Streß, dem die Zelle beispielsweise während einer siRNA-Behandlung oder durch häufiges Ablösen und Wiedereinsäen ausgesetzt wäre, ist daher vorstellbar und sollte bei der Bewertung etwaiger Ergebnisse berücksichtigt werden.

Desweiteren ist zu bedenken, daß die Menge an nachweisbarem Protein häufig nicht die Menge an gebildeter mRNA widerspiegelt. Tatsächlich zeigen neue, bislang

unveröffentlichte Daten der Arbeitsgruppe keinen signifikanten Unterschied zwischen den Mengen an EGFR-mRNA in unveränderten und DNA-Methyltransferase-defizienten HCT116 - Zellen. Sollten sich diese Beobachtungen bestätigen, wäre die höhere Menge an EGFR-Protein in den DNMT-defizienten Zellen nicht als Folge einer vermehrten Transkription, sondern eher als Ausdruck einer posttranslationalen Stabilisierung von EGFR in der Membran zu werten. Umgekehrt könnte eine schwache Nachweisbarkeit auf Proteinebene auch Anzeichen für einen erhöhten Durchsatz des Proteins, also eine schnelle Abfolge von Synthese und Abbau sein. Für das Verständnis der Regulation eines Proteins sollten daher auf Proteinebene gewonnene Erkenntnisse stets zu den auf mRNA-Ebene gewonnenen in Beziehung gesetzt werden. Gleiches gilt für auf mRNA-Ebene gewonnene Resultate, da für die biologische Funktion eines Gens das Verhalten auf Proteinebene entscheidend ist.

5.1.2 Zusammenhang zwischen Protein-Expression und Zellproliferation

In der Routinezellkultur und in den Wachstumsassays fiel auf, daß die unveränderten HCT116-Zellen schnell, die verschiedenen DNMT-Knockoutzelllinien langsamer und die Doppelknockoutzellen sehr langsam proliferierten.

Die schnellwachsenden Zellen exprimierten dabei hohe Mengen an Amphiregulin, während die Menge an nachweisbarem EGFR vergleichsweise niedrig war. In den langsamwachsenden Doppelknockoutzellen hingegen fand sich nur sehr wenig Amphiregulin, dafür waren aber die EGFR-Spiegel sehr hoch. Die Expressionsrate von EGFR und das Zellwachstum standen also in einem umgekehrt proportionalen Verhältnis.

Dies legt den Schluß nahe, daß in den untersuchten Zellen andere Faktoren als die Proteinmenge von EGFR für die Wachstumsrate von ausschlaggebender Bedeutung sind. Infrage kommt hier zum Beispiel die Menge an exprimierten Wachstumsfaktoren wie Amphiregulin. In HCT116-Zellen, in denen K-Ras durch Mutation konstitutiv aktiv ist, ist die Transkriptionsrate der Ras-abhängigen Zielgene, zu denen die Wachstumsfaktoren am EGF-Rezeptor gehören, naturgemäß hoch.

Ein Zusammenhang zwischen der Expression des EGF-Rezeptors, der Expression seiner Liganden und dem Wachstumsverhalten sollte also eher in solchen Zellen bewertet werden, in denen das Wachstum durch äußere Reize gesteuert wird.

5.1.3 Zusammenhang DNA-Methylierung und Protein-Expression

Die überraschende Beobachtung, daß die im Labor durchgeführte Chip-Analyse auf eine Aufregulierung von Amphiregulin und Betacellulin infolge von DNA-Methylierung hinwies, konnte im Zuge dieser Arbeit auf Proteinebene bestätigt werden.

Lange Zeit wurde DNA-Methylierung ausschließlich mit der transkriptionellen Stilllegung von Tumorsuppressorgenen in Verbindung gebracht (Jones und Baylin, 2002). Für Amphiregulin und Betacellulin konnte nun der umgekehrte Fall, nämlich die Expressionssteigerung eines onkogen wirkenden Proteins als Folge von DNA-Methylierung, gezeigt werden. Unklar bleibt, ob dieser Zusammenhang ein direkter infolge einer DNA-Methylierung im Bereich des AREG-Gens oder ein indirekter ist.

Als Mechanismus für einen direkten Zusammenhang wäre eine Methylierung an der Bindestelle eines hemmenden Transkriptionsfaktors denkbar. Hinweise, die diese These unterstützen, liefert eine erst kürzlich veröffentlichte Studie, die für Lymphomzellen zeigt, daß DNA-Methylierung die Bindung des Enhancer-blockierenden Transkriptionsfaktors CTCF und somit die Transkription des Onkogens BCL6 erhöht (Lai et al., 2010).

Ist der oben beschriebene Zusammenhang hingegen ein indirekter, käme beispielsweise eine methylierungsbedingte Abregulierung eines anderen, am selben Signalweg beteiligten Proteins, z.B. des EGFR, infrage. Die Aufregulierung von Amphiregulin bzw. Betacellulin wäre dann als kompensatorische Reaktion zu betrachten. Tatsächlich ist eine solche Expressionsabnahme durch DNA-Methylierung für den epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor in verschiedenen Tumorzelllinien und Geweben beschrieben (Montero et al., 2006). Die DNA-Methylierung war hier sowohl mit einer transkriptionellen Stilllegung als auch mit einem Verlust der Expression auf Proteinebene assoziiert. Allerdings betrifft dieser Zusammenhang in der Hauptsache Brust- und Lungentumoren, in Kolonkarzinomzelllinien und speziell in HCT116-Zellen lag keine der möglichen Methylierungsstellen in methyliertem Zustand vor. Auch von den 15 im Rahmen dieser Studien untersuchten primären Kolonkarzinomen zeigte lediglich eines eine Hypermethylierung im Bereich der CpG-Insel des für den EGFR kodierenden Gens (Montero et al., 2006).

Insgesamt ist die Quellenlage zu den hier betrachteten Proteinen in Zusammenhang mit DNA-Methylierung spärlich. Gegensätzlich zu meinen Beobachtungen beschreiben Yamashita et al. in einer Screening-Untersuchung mit

Magenkarzinomzelllinien, die mit dem demethylierenden Agens 5-Aza-2-deoxycytidin behandelt wurden, die AREG-mRNA in einer der untersuchten Zelllinien als durch Methylierung abreguliert (Yamashita et al., 2006). Die Ursache für diese Diskrepanz zu den Daten der vorliegenden Arbeit könnte in der Verschiedenartigkeit der betrachteten Zelllinien liegen.

Hinweise auf eine Regulation von Betacellulin durch DNA-Methylierung sind in der Literatur bislang nicht beschrieben. Die hier gezeigten Experimente zeigen, daß sowohl Amphiregulin als auch Betacellulin methylierungsabhängig reguliert sind, allerdings scheint sich der zugrundeliegende Mechanismus zu unterscheiden. So war der Unterschied in der Proteinmenge zwischen unveränderten HCT116-Zellen und den Methyltransferase-defizienten Varianten für Betacellulin weniger deutlich ausgeprägt als für Amphiregulin. Auch lagen die Proteinmengen in den Doppelknockoutzellen über denen in denjenigen Zellen, in denen jeweils nur eine DNA-Methyltransferase stillgelegt war (vgl. **Abb. 4.10**). Die Hemmung mit Zebularin hingegen führte zu einem mit Amphiregulin vergleichbaren Effekt (**Abb. 4.11**).

Da sich in der Literatur speziell zu den hier betrachteten Proteinen im Zusammenhang mit DNA-Methylierung nur sehr wenige Daten finden, wäre es zur Klärung sinnvoll, im Bereich der Gene der EGFR-Liganden eine Analyse der möglichen Methylgruppen-Bindestellen auf Methylierung durchzuführen.

5.1.4 Sensitivität gegenüber Gefitinib

An möglichen prädiktiven Faktoren bezüglich des Therapieansprechens auf Gefitinib kommen verschiedene Parameter infrage, die bereits in der Einleitung diskutiert wurden.

Nach der derzeitigen Literaturlage sollte die Höhe der EGFR-Expression keinerlei Einfluß auf das Ansprechen der Zellen durch Tyrosinkinaseinhibitoren wie Gefitinib haben (Paz et al., 2003). Die hier durchgeführten Experimente zeigen jedoch einen signifikanten Unterschied in der Sensibilität gegenüber Gefitinib im Vergleich zwischen den DNMT1^{-/-} und den parental HCT116-Zellen. Wie in **Abb. 4.12** und **Abb. 4.13** gezeigt, reagieren die parental HCT116-Zellen, die relativ niedrige Mengen an EGFR exprimieren, bereits auf deutlich niedrigere Konzentrationen von Gefitinib als die DNMT1^{-/-} - Zellen, deren EGFR-Expression signifikant höher ist (vgl. **Abb. 4.1**).

Alternativ könnten die hier beobachteten Effekte aber auch mit den unterschiedlichen Expressionsniveaus von AREG zusammenhängen. In den durchgeführten Experimenten (vgl. **Abb. 4.12** und **Abb. 4.13**, jeweils der mit „unbehandelt“ bezeichnete Graph) zeigte sich in den Zellen mit hohen Amphiregulinspiegeln ein gutes Ansprechen auf Gefitinib. Die DNMT1-Knockoutzellen hingegen, die sehr niedrige Mengen an Amphiregulin produzieren, erwiesen sich als weitestgehend gefitinibresistent. Hohe Amphiregulinspiegel könnten also mit einer hohen Gefitinib-Sensitivität korrelieren.

Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen von Yonesaka et al., die sowohl in NSCLC-Zelllinien als auch in entsprechendem Tumormaterial eine deutliche positive Korrelation zwischen Amphiregulinspiegeln und Gefitinibsensitivität beschreiben (Yonesaka et al., 2008).

Auf den ersten Blick widersprüchlich dazu erscheinen Studien von Kakiuchi et al. und Ishikawa et al., denen zufolge das Vorhandensein von AREG eine Resistenz gegenüber Gefitinib bewirkt (Ishikawa et al., 2005; Kakiuchi et al., 2004). Dabei ist allerdings zu beachten, daß Kakiuchi seine Aussagen auf der Basis von Expressionsanalysen in Tumormaterial trifft, also ausschließlich cDNA/mRNA betrachtet. Über die Proteinebene kann hier keine Aussage getroffen werden. Auch andere Autoren berichten über eine deutliche Diskrepanz zwischen der Expression der EGFR-Liganden auf Transkriptionsebene und ihrer Anwesenheit auf Proteinebene als Hinweis für posttranskriptionelle Regulierung dieser Gene (Khambata-Ford et al., 2007).

Ishikawa et al. hingegen betrachten zwar das Vorhandensein von Amphiregulin und TGF- α im Serum, allerdings von solchen Patienten mit NSCLC, die im Rahmen ihrer Therapie bereits mit Gefitinib behandelt wurden. Daten über die entsprechenden Serumspiegel vor der Behandlung legen die Autoren nicht vor. Es kann daher keine Aussage darüber getroffen werden, ob sich hohe Serumspiegel von EGFR-Liganden, wie von den Autoren postuliert, zur Vorhersage eines positiven Therapieansprechens eignen oder ob sie nicht vielmehr bereits als Resultat der begonnenen Therapie im Sinne einer kompensatorischen Rückkopplungsschleife zu betrachten sind.

Grundsätzlich ist anzumerken, daß sich die Angaben in der Literatur bezüglich der Sensitivität gegenüber Gefitinib zum überwiegenden Teil auf nichtkleinzellige Lungenkarzinome, für deren Behandlung Gefitinib in der Klinik zugelassen ist,

beziehen. Inwieweit sich die in Lungentumoren und Lungenkarzinomzelllinien gewonnenen Erkenntnisse auf Kolonkarzinome ausweiten lassen, ist unklar.

Um den Einfluß von Amphiregulin auf die Gefitinibsensitivität weiter zu untersuchen, empfiehlt sich die Etablierung eines stabilen Amphiregulinknockdowns in den parental HCT116-Zellen sowie die Zugabe von rekombinantem Amphiregulin zu den HCT116 DNMT1^{-/-} - Zellen.

5.1.5 Sensitivität gegenüber Cetuximab

Unter den möglichen prädiktiven Faktoren für ein positives Therapieansprechen auf Cetuximab kommt dem Mutationsstatus des K-Ras-Gens eine entscheidende Rolle zu. Zum Zeitpunkt der Veröffentlichung dieser Arbeit ist das unmutierte Vorliegen des K-Ras-Gens der ausschlaggebende Faktor für den therapeutischen Einsatz des Antikörpers.

Es ist allerdings bekannt, daß es neben K-Ras andere Faktoren geben muß, die Vorhersagen über ein mögliches Therapieansprechen erlauben. So gibt es Patienten, die trotz K-Ras-Mutation von einer Behandlung mit Cetuximab profitieren (Khambata-Ford et al., 2007). Umgekehrt liegt das Therapienansprechen bei Vorliegen von unmutiertem K-Ras nur bei etwa 70 %. Innerhalb der beiden Subgruppen sind also weitere Differenzierungen vonnöten. Bei unmutiertem K-Ras sprechen beispielsweise ein hoher Expressionsstatus der EGFR-Liganden AREG und EREG für eine längere mediane Überlebenszeit und ein längeres progressionsfreies Überleben (Jacobs et al., 2009).

Zu möglichen Faktoren, die das Therapieansprechen trotz vorliegender K-Ras-Mutation beeinflussen, liegen insgesamt wenige Daten vor. Es ist aber bekannt, daß sich K-Ras-mutierte Tumoren abhängig von der Lokalisation, die von der Mutation betroffen ist, in ihren biologischen Eigenschaften unterscheiden. Eine Mutation an Codon 12 prädisponiert beispielsweise für eine höhere Apoptoseresistenz und eine größere Neigung zu anker-unabhängigem Wachstum als Mutationen an Codon 13 (Guerrero et al., 2000). Zellen, bei denen die K-Ras-Mutation Codon 13 betrifft, zeigten sich sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell in einem Maße sensitiv gegenüber Cetuximab, das mit dem der K-Ras-unmutierten Zellen vergleichbar ist.

Retrospektive Studien an Patientendaten zeigen zudem einen signifikanten Unterschied zwischen Codon-13-Mutationen und anderen K-Ras-Mutationen in

bezug auf die mediane Überlebenszeit und die mediane progressionsfreie Überlebenszeit (De Roock et al., 2010). Diese beiden Zielparameter entsprachen dabei bei Patienten mit K-Ras-Mutationen im Bereich von Codon 13 denen von jenen Patienten, deren K-Ras unmutiert vorlag. Dies traf sowohl auf Cetuximab in Monotherapie als auch in Kombination mit konventioneller Chemotherapie zu. In bezug auf die Ansprechrate, also die Reduktion der Tumormasse, gab es allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen Mutationen an Codon 13 und anderen K-Ras-Mutationen (De Roock et al., 2010).

Kolorektale Karzinome zeigen zu jeweils 79 % und 17,6 % Mutationen an Codon 12 bzw. Codon 13 (De Roock et al., 2010).

Von den hier betrachteten Zelllinien weist HCT116 eine K-Ras-Mutation an Codon 13 auf. Die Sensitivität gegenüber Cetuximab ist im vorliegenden Experiment nachweisbar, aber moderat. Dies könnte unter anderem darauf zurückzuführen sein, daß bei HCT116 neben K-Ras auch Gene, die an pro-apoptotischen Signalwegen beteiligt sind, in mutierter Form vorliegen.

Bei HT29 ist K-Ras unmutiert. Allerdings liegt hier eine B-Raf-Mutation vor. B-Raf-Mutationen sind in kolorektalen Karzinomen selten und werden mit einer schlechteren Prognose assoziiert (Van Cutsem E. et al., 2011). Die Sensitivität gegenüber Cetuximab wird durch das Vorliegen einer B-Raf-Mutation negativ beeinflusst (Di Nicolantonio F. et al., 2008; Laurent-Puig et al., 2009; Loupakis et al., 2009). Das Ansprechen der B-Raf mutierten HT29 Zellen war in den vorliegenden Experimenten allenfalls gering (vgl. **Abb. 4.19**). Dieses Ergebnis deckt sich mit Studien von Di Nicolantonio et al., die außerdem zeigen konnten, daß sich das Ansprechen der Zellen durch die Zugabe eines B-Raf-Inhibitors wiederherstellen ließ (Di Nicolantonio F. et al., 2008).

Die hier gezeigten Ergebnisse untermauern also, wenn auch nur schwach, die These, daß einerseits K-Ras-mutierte Zellen auf die Therapie mit EGFR-Antikörpern ansprechen können, sofern die Mutation Codon 13 betrifft, und andererseits, daß das Vorliegen einer B-Raf-Mutation einen negativen prädiktiven Faktor bezüglich der Sensitivität gegenüber Cetuximab darstellt. Beides sollte in Folgeexperimenten genauer untersucht werden.

Sollten sich die hier beobachteten Effekte in der Klinik bestätigen lassen, könnte dies zu einer differenzierteren Patientenauswahl beitragen und auf diese Weise einen gezielteren Einsatz von EGFR-Antikörpern erlauben.

5.2 Methodische Limitationen

5.2.1 Zelllinien

Es zeigte sich, daß sich die Expressionsprofile innerhalb ein und derselben Zelllinie offenbar mit steigender Anzahl von Kulturpassagen veränderten. So lagen beispielsweise die absoluten Amphiregulinspiegel in späteren Passagen un behandelter Zellen drastisch unter denen der frühesten Passagen. Dies konnte in mehreren Stichproben bestätigt werden. Um dieses Phänomen möglichst gering zu halten, wurden für jedes neue Experiment möglichst frühe Passagen aufgetaut und nach jeweils einer Passage in zehn gleiche Teile aufgeteilt, von denen neun sofort wieder eingefroren wurden, während der zehnte in Kultur blieb und nach einigen wenigen Passagen für das Experiment verwendet wurde. Trotzdem ist es angebracht, Expressionsspiegel vornehmlich relativ, z.B. vor und nach Behandlung der gleichen Zellpassage, nicht aber als absolute Werte zu betrachten.

5.2.2 siRNA

Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß zumindest ein Teil des beobachteten Effekts nicht allein auf die siRNA-Behandlung zurückzuführen ist, sondern auch als Antwort auf den massiven Streß anzusehen ist, dem die Zellen insbesondere durch das wiederholte Ablösen und Neueinsäen ausgesetzt waren. Ein Anstieg der Amphiregulinexpression als Reaktion auf verschiedene Arten von Streß ist in der Literatur beschrieben und unter 5.2.1 diskutiert.

Insbesondere der Umstand, daß es keinen sichtbaren Unterschied zwischen der scrambled-Kontrolle und dem Knockdown gibt (vgl. **Abb. 4.15** und **Abb. 4.17**), legt diesen Schluß nahe.

Ein zentrales Problem stellte außerdem die Stabilität des Knockdowns dar. Die Aussaat der Zellen erfolgte 24 h nach der zweiten Transfektion, die Inkubation mit dem Inhibitor weitere 24 h später. Dadurch betrug die Effizienz des Knockdowns in den HCT116-Zellen zum Zeitpunkt der ersten Messung bereits nur noch zwischen 40 und 53 %, zum Meßzeitpunkt 72 h, z.T. auch schon bei 48 h, war der Knockdown nicht mehr nachweisbar (vgl. **Abb. 4.14**). In den HT29-Zellen gelang ein etwas

besserer Knockdown. Zum Zeitpunkt der Einsaat der Zellen in den Wachstumsassay betrug er 39 %, zum letzten Meßzeitpunkt, 96 h nach der Einsaat, immerhin noch 14 %. Allerdings überstiegen auch in dieser Zelllinie die Amphiregulinspiegel im Verlauf des Experiments ihre Ausgangswerte.

Jeder der umfangreichen Versuche, Transfektion und Behandlung mit Inhibitor zeitlich anzunähern oder die Effizienz des Knockdowns durch eine dritte Transfektion zu verstärken, resultierte in allen untersuchten Zelllinien in einem Absterben der Zellen.

5.2.3 Northern Blot

Bei der Bestimmung der mRNA im Northern Blot fiel auf, daß zwar die mRNA-Spiegel des stabilen DNMT1-Knockouts den Erwartungen entsprechend deutlich niedriger ausfielen als die der unveränderten HCT116-Zellen, die Behandlung mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor Zebularin aber auf mRNA-Ebene keine eindeutige Wirkung zu zeigen schien. Die Wahl eines unzureichend großen Zeitfensters, um einen Effekt auf die Zielgene sehen zu können, kann als Ursache ausgeschlossen werden, da der Effekt nach gleicher Behandlungszeit auf Proteinebene sichtbar ist (vgl. **Abb. 4.5** und **Abb. 4.6**).

Als mögliche Ursache käme die Wirkung regulierender Faktoren in Betracht, die das Amphiregulin-Protein posttranslational modifizieren könnten. Diese Faktoren könnten ihrerseits ebenfalls methylierungsabhängig reguliert sein. Eine weitere Ursache könnte in der Haltbarkeit des verwendeten Zebularins zu suchen sein. Laut Hersteller ist in DMSO gelöstes Zebularin 3 Monate lang verwendbar. Für die hier vorliegenden Experimente wurde der Inhibitor allerdings in PBS gelöst, um die Eigenzytoxizität und die möglichen Einflüsse von DMSO auf die Genexpression zu umgehen. Die Effektivität war dabei mit der des in DMSO gelösten Zebularins vergleichbar. Zur Haltbarkeit von Zebularin in PBS liegen allerdings keine Erkenntnisse vor. Es muß aufgrund der Ergebnisse des Northern Blots vermutet werden, daß sie deutlich geringer ist als in DMSO. Eine Wiederholung des Experiments mit frisch angesetzttem Zebularin oder die Wahl einer anderen Methode zur Bestimmung der mRNA, z.B. rt-PCR, könnte zur Aufklärung beitragen.

5.2.4 Gefitinib

Hohe Gefitinibkonzentrationen bewirkten in beiden untersuchten Zelllinien eine massive Wachstumshemmung. Als mögliche Ursachen kommen sowohl ein spezifischer Effekt des Gefitinibs auf das EGFR-abhängige Signalnetzwerk als auch die Toxizität des eingesetzten Gefitinib oder DMSO infrage. Eine Unterscheidung ist in der vorliegenden Arbeit nur anhand der Wachstumsassays nicht möglich, weil trotz mehrmaligen Ändern der Versuchsparameter und des Einsatzes verschiedener Antikörper der Nachweis von Pospho-EGFR nicht gelang.

5.3 Klinische Einordnung

Das detaillierte Verständnis molekularer Mechanismen, die zur Tumorentstehung beitragen, hat in den letzten Jahrzehnten zu einem Paradigmenwechsel in der Krebstherapie geführt. Therapien, die gezielt gegen molekulare Besonderheiten verschiedener Tumorarten wirken, gewinnen im klinischen Alltag zunehmend an Bedeutung. Als herausragendes Beispiel ist hier Imatinib bei der Behandlung der chronischen myeloischen Leukämie zu nennen (Bumbea et al., 2010). Aber auch stark multi-genetisch determinierte Tumorentitäten wie kolorektale Karzinome weisen häufig Eigenschaften auf, die Angriffsfläche für eine gezielte, das Tumorstadium hemmende, medikamentöse Therapie bieten können. Tyrosinkinaseinhibitoren wie Gefitinib und Erlotinib werden erfolgreich bei der Behandlung von nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen eingesetzt, Antikörper gegen den Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor wie Cetuximab und Panitumumab ergänzen die Therapiemöglichkeiten bei kolorektalen Karzinomen. Allerdings hat sich gezeigt, daß nicht alle Patienten gleichermaßen von der Behandlung mit gezielten Therapeutika profitieren. Daher ist beispielsweise Cetuximab in Deutschland heute ausschließlich für diejenigen metastasierten Kolonkarzinome zugelassen, die keine K-Ras-Mutation aufweisen. Trotzdem beträgt das Therapieansprechen unter diesen vorselektierten Patienten nur etwa 50-80 % (Khambata-Ford et al., 2007; Lievre et al., 2006). Auch in Lungenkarzinomen liegt die Ansprechrate in einigen Studien nicht höher als 40 % (Takano et al., 2004).

Die Identifizierung weiterer molekularer Besonderheiten, die verlässliche Vorhersagen in Hinblick auf das Therapieansprechens erlauben, ist daher von essentieller Bedeutung. Auf diese Weise können potentiell belastende Therapien, von denen der Patient nicht profitieren würde und die zudem unnötige Kosten verursachen, vermieden werden.

Dabei stellt die Bestimmung von Parametern, die direkt im Patientenblut meßbar sind, einen weniger belastenden Eingriff dar als die Gewinnung originären Tumormaterials. Hinzu kommt, daß sich auf diese Weise auch Aussagen über Eigenschaften von solchen Tumoren treffen lassen, die sich der direkten Probeentnahme durch schwer erreichbare Lokalisation entziehen. Um solche im Blut bestimmbaren Faktoren handelt es sich auch bei den EGFR-Liganden Amphiregulin und Betacellulin.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwiefern das von kolorektalen Karzinomen sezernierte Amphiregulin eine Vorhersage über das Therapieansprechen auf Gefitinib erlaubt. Dabei wiesen hohe Spiegel an Amphiregulin auf ein gutes Therapieansprechen hin. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß die transkriptionelle Regulation von Amphiregulin und Betacellulin über DNA-Methylierung erfolgt. Das Wissen um die Rolle epigenetischer Phänomene bei der Tumorentstehung ist verhältnismäßig jung. Die DNA-Methylierung bewirkt dabei eine potentiell reversible Veränderung des Expressionsverhaltens einer Zelle. Damit ist es theoretisch möglich, die transkribierten Mengen beider Liganden durch hypomethylierende Agenzien gezielt zu beeinflussen. In der klinischen Anwendung kommen in Europa mit 5-Azacidin und in den USA zusätzlich mit 5-aza-2'-Deoxyazacidin (Decitabin) bereits zwei demethylierende Agenzien bei der Behandlung des Myelodysplastischen Syndroms, der chronischen Myelomonocytenleukämie und der akuten myeloischen Leukämie zum Einsatz (Fachinformation Vidaza, 2008; Griffiths und Gore, 2008).

5.4 Schlußfolgerung

Es konnte in der Arbeit gezeigt werden, daß die Höhe der Expression der EGF-Rezeptor-Liganden Amphiregulin und Betacellulin in HCT116-Zellen durch DNA-Methylierung reguliert wird. Überraschenderweise bewirkte eine vermehrte Methylierung eine vermehrte Proteinexpression. Bisher sind DNA-Methylierungen in

der Literatur hauptsächlich im Zusammenhang mit Expressionsminderungen beschrieben.

Außerdem zeigte sich, daß für die Zellproliferation weniger die Höhe der Expression des Rezeptors ausschlaggebend war, als die Anwesenheit von EGFR-Liganden und somit vermutlich die EGFR-Aktivität, auch wenn dieser Zusammenhang aus methodischen Gründen nur indirekt gezeigt werden konnte.

Ferner fanden sich Hinweise darauf, daß in HCT116-Zellen hohe Spiegel von Amphiregulin mit einer erhöhten Sensitivität auf den Tyrosinkinaseinhibitor Gefitinib einhergehen. Sollte sich diese Erkenntnis bestätigen und auf in-vivo-Verhältnisse übertragen lassen, könnte die Bestimmung der EGFR-Liganden im Serum bei bestimmten Tumorentitäten einen wertvollen prädiktiven Faktor in bezug auf das zu erwartende Therapieansprechen darstellen.

Offen bleibt vorerst, ob AREG die erhöhte Sensitivität ursächlich bewirkt oder ob sensitive Zellen mehr AREG sezernieren. Eine Wiederholung der Experimente mit stabilen AREG-Knockdowns ist für das weitere Verständnis daher unabdingbar. Ferner sollten die Experimente auf weitere Zellmodelle ausgeweitet werden, wobei ein besonderer Schwerpunkt auf solche Zellen gelegt werden sollte, deren K-Ras-Gen unmutiert vorliegt.

Weiterhin fanden sich Hinweise, die die in der Literatur diskutierte These stützen, nach der Mutationen des K-Ras-Gens nur dann eine Resistenz gegen den EGFR-Antikörper Cetuximab bewirken, wenn sich die fragliche Mutation im Bereich von Codon 12 befindet. Diese Ergebnisse sollten in Zelllinien verifiziert werden, die keine weiteren den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg betreffenden Mutationen aufweisen. Anschließend sollte analog zu den Versuchen mit Gefitinib der Einfluß der EGFR-Liganden auf das Ansprechen der Zelle auf Cetuximab untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Kolorektale Karzinome zählen zu den häufigsten malignen Erkrankungen des Menschen. Ihre Entstehung ist das Ergebnis einer Reihe molekularer Veränderungen, die in ihrer Summe zu unkontrolliertem Zellwachstum und unkontrollierter Zellvermehrung führen. Diese Veränderungen sind sowohl genetischer als auch epigenetischer Natur und werden von den Zellen an ihre Tochterzellen weitergegeben. Ein wichtiges Signalnetzwerk, das in kolorektalen Karzinomen häufig von Veränderungen betroffen ist, besteht aus der Ras-Raf-MEK-ERK-Signalkaskade, dem ihr vorgeschalteten Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) und dessen Liganden. Störungen in diesem komplexen Netzwerk tragen maßgeblich zur Entstehung und zum Fortschreiten einer Vielzahl von Tumoren bei. Bei der Behandlung kolorektaler Karzinome rücken zunehmend Therapeutika in den Vordergrund, die gezielt an molekularen Besonderheiten des jeweiligen Tumors angreifen. Dazu zählen der Tyrosinkinase-Inhibitor Gefitinib und EGFR-Antikörper wie Cetuximab. Für die Entwicklung solcher gezielten onkologischen Therapiestrategien ist das detaillierte Verständnis der molekularen Grundlagen der Tumorenstehung unabdingbar. In der klinischen Praxis bedarf es zudem zuverlässiger prognostischer Marker, die einen gezielten und individualisierten Einsatz dieser Medikamente erlauben. Zusätzlich zu bereits etablierten Markern wie dem Mutationsstatus des K-Ras-Gens erlangen hier zunehmend auch Liganden des Epidermalen Wachstumsfaktors an Bedeutung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in kolorektalen Tumorzellen die Regulationsmechanismen einiger EGFR-Liganden zu untersuchen. Weiterhin sollte der Einfluß dieser Liganden auf das Zellwachstum und auf das Ansprechen der Zelle auf gezielte molekulare Therapien beleuchtet werden.

In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe war aufgefallen, daß die mRNA-Expression der EGF-Rezeptorliganden Amphiregulin, Betacellulin und Epiregulin in kolorektalen Karzinomzellen abhängig vom DNMT-Status differentiell reguliert ist. Im Widerspruch zu den meisten in der Literatur beschriebenen Fällen korrelierte dabei ein hoher DNMT-Status mit einer vermehrten Expression der Liganden-mRNA. In der hier vorliegenden Arbeit konnte diese Beobachtung nun für die Liganden Amphiregulin

und Betacellulin auf Proteinebene bestätigt werden. Ferner konnte durch direkte Inhibierung der DNA-Methyltransferasen und anschließende Bestimmung der Ligandenmenge gezeigt werden, daß zwischen dem Methylierungsstatus der Zelle und der Menge an gebildeten Liganden ein kausaler Zusammenhang besteht. In Folgearbeiten der Arbeitsgruppe wurde inzwischen für den Liganden Amphiregulin bestätigt, daß es sich bei dem hier gezeigten Phänomen um eine direkte Abhängigkeit infolge von Promotormethylierung handelt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde der Einfluß von Amphiregulin auf die Funktion des Epidermalen Wachstumsfaktorrezeptors und auf das Zellwachstum untersucht. Da die Aktivität des EGF-Rezeptors in dieser Arbeit nicht direkt gezeigt werden konnte, erfolgte ein indirekter Nachweis über die Zellproliferation. Hier ergaben sich Hinweise auf einen möglichen Einfluß des EGFR-Liganden auf das Zellwachstum. Ein höherer Amphiregulinspiegel korrelierte mit einer höheren Wachstumsrate. Ferner wurde ein möglicher Zusammenhang zwischen der Sensitivität der Zelle auf Gefitinib und ihrem Amphiregulingehalt untersucht. Dabei zeigte sich, daß die parentale Variante der Zelllinie HCT116, die, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, hohe Mengen an Amphiregulin enthielt, wesentlich sensitiver auf Gefitinib reagierte als der methyltransferase-defiziente Klon HCT116 DNMT1^{-/-}, der niedrige Amphiregulinspiegel aufwies. In einem weiteren Schritt sollte daher untersucht werden, ob dieser Zusammenhang lediglich korrelativ ist oder ob die Amphiregulinmenge ursächlich für die erhöhte Sensitivität verantwortlich ist. Dazu wurde die Amphiregulin-Expression in mehreren Zelllinien mithilfe spezifischer siRNA unterdrückt. Allerdings gelang keine Hemmung, die über die gesamte für einen Wachstumsassay erforderliche Dauer anhielt, so daß die Frage nach dem Einfluß von Amphiregulin auf die Gefitinibsensitivität im Rahmen dieser Arbeit nicht abschließend geklärt werden konnte. Weiterhin wurden einzelne Zelllinien auf ihre Sensitivität gegenüber Cetuximab untersucht. Cetuximab ist in Deutschland für die Behandlung von kolorektalen Karzinomen zugelassen, deren K-Ras-Gen in unmutierter Form vorliegt. In der jüngeren Literatur finden sich aber Hinweise, nach denen K-Ras-mutierte Tumore nur dann resistent gegenüber Cetuximab sind, wenn die Mutation Codon 12 des K-Ras-Gens betrifft. Liegt die Mutation im Bereich von Codon 13, ist das Therapieansprechen mit dem der unmutierten K-Ras-Variante vergleichbar. Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse untermauern diese These, sollten aber in Zelllinien verifiziert werden, die keine weiteren den Ras-Raf-MEK-ERK-Signalweg betreffenden Mutationen aufweisen.

7 Anhang

7.1 Literaturverzeichnis

Abarzua,P., LoSardo,J.E., Gubler,M.L., and Neri,A. (1995). Microinjection of monoclonal antibody PAb421 into human SW480 colorectal carcinoma cells restores the transcription activation function to mutant p53. *Cancer Res.* 55, 3490-3494.

Bianco,R., Troiani,T., Tortora,G., and Ciardiello,F. (2005). Intrinsic and acquired resistance to EGFR inhibitors in human cancer therapy. *Endocr. Relat Cancer* 12 Suppl 1, S159-S171.

Bishop,J.M. (1991). Molecular themes in oncogenesis. *Cell* 64, 235-248.

Bumbea,H., Vladareanu,A.M., Voican,I., Cisleanu,D., Barsan,L., and Onisai,M. (2010). Chronic myeloid leukemia therapy in the era of tyrosine kinase inhibitors--the first molecular targeted treatment. *J. Med. Life* 3, 162-166.

Castillo,J., Erroba,E., Perugorria,M.J., Santamaria,M., Lee,D.C., Prieto,J., Avila,M.A., and Berasain,C. (2006). Amphiregulin contributes to the transformed phenotype of human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Res.* 66, 6129-6138.

Cengel,K.A., Voong,K.R., Chandrasekaran,S., Maggiorella,L., Brunner,T.B., Stanbridge,E., Kao,G.D., McKenna,W.G., and Bernhard,E.J. (2007). Oncogenic K-Ras signals through epidermal growth factor receptor and wild-type H-Ras to promote radiation survival in pancreatic and colorectal carcinoma cells. *Neoplasia.* 9, 341-348.

Chu,E.K., Foley,J.S., Cheng,J., Patel,A.S., Drazen,J.M., and Tschumperlin,D.J. (2005). Bronchial epithelial compression regulates epidermal growth factor receptor family ligand expression in an autocrine manner. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 32, 373-380.

Chung,K.Y., Shia,J., Kemeny,N.E., Shah,M., Schwartz,G.K., Tse,A., Hamilton,A., Pan,D., Schrag,D., Schwartz,L., Klimstra,D.S., Fridman,D., Kelsen,D.P., and Saltz,L.B. (2005). Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J. Clin. Oncol.* 23, 1803-1810.

Ciardiello,F., Caputo,R., Bianco,R., Damiano,V., Pomatico,G., De,P.S., Bianco,A.R., and Tortora,G. (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, 2053-2063.

- Cunningham,D., Humblet,Y., Siena,S., Khayat,D., Bleiberg,H., Santoro,A., Bets,D., Mueser,M., Harstrick,A., Verslype,C., Chau,I., and Van,C.E.** (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 351, 337-345.
- De Roock,W., Jonker,D.J., Di,N.F., Sartore-Bianchi,A., Tu,D., Siena,S., Lamba,S., Arena,S., Frattini,M., Piessevaux,H., Van,C.E., O'Callaghan,C.J., Khambata-Ford,S., Zalcborg,J.R., Simes,J., Karapetis,C.S., Bardelli,A., and Tejpar,S.** (2010). Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* 304, 1812-1820.
- Di Nicolantonio F., Martini,M., Molinari,F., Sartore-Bianchi,A., Arena,S., Saletti,P., De,D.S., Mazzucchelli,L., Frattini,M., Siena,S., and Bardelli,A.** (2008). Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 26, 5705-5712.
- Diaz,R., Nguewa,P.A., Parrondo,R., Perez-Stable,C., Manrique,I., Redrado,M., Catena,R., Collantes,M., Penuelas,I., az-Gonzalez,J.A., and Calvo,A.** (2010). Antitumor and antiangiogenic effect of the dual EGFR and HER-2 tyrosine kinase inhibitor lapatinib in a lung cancer model. *BMC. Cancer* 10, 188.
- Eckstein,N., Servan,K., Girard,L., Cai,D., von,J.G., Jaehde,U., Kassack,M.U., Gazdar,A.F., Minna,J.D., and Royer,H.D.** (2008). Epidermal growth factor receptor pathway analysis identifies amphiregulin as a key factor for cisplatin resistance of human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* 283, 739-750.
- Egger,G., Jeong,S., Escobar,S.G., Cortez,C.C., Li,T.W., Saito,Y., Yoo,C.B., Jones,P.A., and Liang,G.** (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, 14080-14085.
- Esteller,M.** (2007). Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. *Hum. Mol. Genet.* 16 Spec No 1, R50-R59.
- Fachinformation Erbitux.** Erbitux® 5mg/ml Infusionslösung.
<http://www.fachinfo.de/FachInfo/data/fi/pdf/00/84/008483.pdf> . 2010.
- Fachinformation Iressa.** IRESSA® 250mg Filmtabletten.
<http://www.fachinfo.de/FachInfo/data/fi/pdf/01/19/011905.pdf> . 2009.
- Fachinformation Tarceva.** Tarceva® 25,100,150 mg Filmtabletten.
<http://www.fachinfo.de/FachInfo/data/fi/pdf/00/92/009240.pdf> . 2010.
- Fachinformation Vidaza.** Vidaza® 25 mg/ml Pulver zur Herstellung einer Injektionssuspension.
<http://www.fachinfo.de/FachInfo/data/fi/pdf/01/15/011565.pdf> . 2008.
- Fakih,M. and Wong,R.** (2010). Efficacy of the monoclonal antibody EGFR inhibitors for the treatment of metastatic colorectal cancer. *Curr. Oncol.* 17 Suppl 1, S3-S17.
- Ferlay,J., Parkin,D.M., and Steliarova-Foucher,E.** (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur. J. Cancer* 46, 765-781.

Fraga,M.F. and Esteller,M. (2007). Epigenetics and aging: the targets and the marks. *Trends Genet.* 23, 413-418.

Fukuoka,M., Yano,S., Giaccone,G., Tamura,T., Nakagawa,K., Douillard,J.Y., Nishiwaki,Y., Vansteenkiste,J., Kudoh,S., Rischin,D., Eek,R., Horai,T., Noda,K., Takata,I., Smit,E., Averbuch,S., Macleod,A., Feyereislova,A., Dong,R.P., and Baselga,J. (2003). Multi-institutional randomized phase II trial of gefitinib for previously treated patients with advanced non-small-cell lung cancer (The IDEAL 1 Trial) [corrected]. *J. Clin. Oncol.* 21, 2237-2246.

Goll,M.G., Kirpekar,F., Maggert,K.A., Yoder,J.A., Hsieh,C.L., Zhang,X., Golic,K.G., Jacobsen,S.E., and Bestor,T.H. (2006). Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* 311, 395-398.

Griffiths,E.A. and Gore,S.D. (2008). DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin. Hematol.* 45, 23-30.

Guerrero,S., Casanova,I., Farre,L., Mazo,A., Capella,G., and Manges,R. (2000). K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Res.* 60, 6750-6756.

Hanahan,D. and Weinberg,R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.

Hinkle,C.L., Sunnarborg,S.W., Loisel,D., Parker,C.E., Stevenson,M., Russell,W.E., and Lee,D.C. (2004). Selective roles for tumor necrosis factor alpha-converting enzyme/ADAM17 in the shedding of the epidermal growth factor receptor ligand family: the juxtamembrane stalk determines cleavage efficiency. *J. Biol. Chem.* 279, 24179-24188.

Hirata,A., Ogawa,S., Kometani,T., Kuwano,T., Naito,S., Kuwano,M., and Ono,M. (2002). ZD1839 (Iressa) induces antiangiogenic effects through inhibition of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. *Cancer Res.* 62, 2554-2560.

Holbro,T., Beerli,R.R., Maurer,F., Koziczak,M., Barbas,C.F., III, and Hynes,N.E. (2003). The ErbB2/ErbB3 heterodimer functions as an oncogenic unit: ErbB2 requires ErbB3 to drive breast tumor cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 100, 8933-8938.

Holbro,T. and Hynes,N.E. (2004). ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44, 195-217.

Huang,S.M., Bock,J.M., and Harari,P.M. (1999). Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res.* 59, 1935-1940.

Huang,S.M. and Harari,P.M. (2000). Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas: inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin. Cancer Res.* 6, 2166-2174.

- Inoue,K., Slaton,J.W., Perrotte,P., Davis,D.W., Bruns,C.J., Hicklin,D.J., McConkey,D.J., Sweeney,P., Radinsky,R., and Dinney,C.P.** (2000). Paclitaxel enhances the effects of the anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody ImClone C225 in mice with metastatic human bladder transitional cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 6, 4874-4884.
- Ishikawa,N., Daigo,Y., Takano,A., Taniwaki,M., Kato,T., Hayama,S., Murakami,H., Takeshima,Y., Inai,K., Nishimura,H., Tsuchiya,E., Kohno,N., and Nakamura,Y.** (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. *Cancer Res.* 65, 9176-9184.
- Jacobs,B., De,R.W., Piessevaux,H., Van,O.R., Biesmans,B., De,S.J., Fieuws,S., Vandesompele,J., Peeters,M., Van Laethem,J.L., Humblet,Y., Penault-Llorca,F., De,H.G., Laurent-Puig,P., Van,C.E., and Tejpar,S.** (2009). Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 27, 5068-5074.
- Jenuwein,T. and Allis,C.D.** (2001). Translating the histone code. *Science* 293, 1074-1080.
- Jhaver,M., Goel,S., Wilson,A.J., Montagna,C., Ling,Y.H., Byun,D.S., Nasser,S., Arango,D., Shin,J., Klampfer,L., Augenlicht,L.H., Perez-Soler,R., and Mariadason,J.M.** (2008). PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res.* 68, 1953-1961.
- Johnson,G.R., Prigent,S.A., Gullick,W.J., and Stromberg,K.** (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, 18835-18843.
- Johnson,G.R., Saeki,T., Gordon,A.W., Shoyab,M., Salomon,D.S., and Stromberg,K.** (1992). Autocrine action of amphiregulin in a colon carcinoma cell line and immunocytochemical localization of amphiregulin in human colon. *J. Cell Biol.* 118, 741-751.
- Jones,P.A. and Baylin,S.B.** (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3, 415-428.
- Jones,P.L., Veenstra,G.J., Wade,P.A., Vermaak,D., Kass,S.U., Landsberger,N., Strouboulis,J., and Wolffe,A.P.** (1998). Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. *Nat. Genet.* 19, 187-191.
- Kakiuchi,S., Daigo,Y., Ishikawa,N., Furukawa,C., Tsunoda,T., Yano,S., Nakagawa,K., Tsuruo,T., Kohno,N., Fukuoka,M., Sone,S., and Nakamura,Y.** (2004). Prediction of sensitivity of advanced non-small cell lung cancers to gefitinib (Iressa, ZD1839). *Hum. Mol. Genet.* 13, 3029-3043.
- Karnoub,A.E. and Weinberg,R.A.** (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 517-531.

Khambata-Ford,S., Garrett,C.R., Meropol,N.J., Basik,M., Harbison,C.T., Wu,S., Wong,T.W., Huang,X., Takimoto,C.H., Godwin,A.K., Tan,B.R., Krishnamurthi,S.S., Burris,H.A., III, Poplin,E.A., Hidalgo,M., Baselga,J., Clark,E.A., and Mauro,D.J. (2007). Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 25, 3230-3237.

Kim,Y.H., Ishii,G., Goto,K., Nagai,K., Tsuta,K., Shiono,S., Nitadori,J., Kodama,T., Nishiwaki,Y., and Ochiai,A. (2004). Dominant papillary subtype is a significant predictor of the response to gefitinib in adenocarcinoma of the lung. *Clin. Cancer Res.* 10, 7311-7317.

Kitaeva,M.N., Grogan,L., Williams,J.P., Dimond,E., Nakahara,K., Hausner,P., DeNobile,J.W., Soballe,P.W., and Kirsch,I.R. (1997). Mutations in beta-catenin are uncommon in colorectal cancer occurring in occasional replication error-positive tumors. *Cancer Res.* 57, 4478-4481.

Klose,R.J. and Bird,A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 31, 89-97.

Lai,A.Y., Fatemi,M., Dhasarathy,A., Malone,C., Sobol,S.E., Geigerman,C., Jaye,D.L., Mav,D., Shah,R., Li,L., and Wade,P.A. (2010). DNA methylation prevents CTCF-mediated silencing of the oncogene BCL6 in B cell lymphomas. *J. Exp. Med.* 207, 1939-1950.

Lampugnani,M.G., Pedenovi,M., Niewiarowski,A., Casali,B., Donati,M.B., Corbascio,G.C., and Marchisio,P.C. (1987). Effects of dimethyl sulfoxide (DMSO) on microfilament organization, cellular adhesion, and growth of cultured mouse B16 melanoma cells. *Exp. Cell Res.* 172, 385-396.

Laurent-Puig,P., Cayre,A., Manceau,G., Buc,E., Bachet,J.B., Lecomte,T., Rougier,P., Lievre,A., Landi,B., Boige,V., Ducreux,M., Ychou,M., Bibeau,F., Bouche,O., Reid,J., Stone,S., and Penault-Llorca,F. (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, 5924-5930.

Lenz,H.J., Van,C.E., Khambata-Ford,S., Mayer,R.J., Gold,P., Stella,P., Mirtsching,B., Cohn,A.L., Pippas,A.W., Azarnia,N., Tsuchihashi,Z., Mauro,D.J., and Rowinsky,E.K. (2006). Multicenter phase II and translational study of cetuximab in metastatic colorectal carcinoma refractory to irinotecan, oxaliplatin, and fluoropyrimidines. *J. Clin. Oncol.* 24, 4914-4921.

Li,X. and Fan,Z. (2010). The epidermal growth factor receptor antibody cetuximab induces autophagy in cancer cells by downregulating HIF-1alpha and Bcl-2 and activating the beclin 1/hVps34 complex. *Cancer Res.* 70, 5942-5952.

Lievre,A., Bachet,J.B., Le,C.D., Boige,V., Landi,B., Emile,J.F., Cote,J.F., Tomasic,G., Penna,C., Ducreux,M., Rougier,P., Penault-Llorca,F., and Laurent-Puig,P. (2006). KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 66, 3992-3995.

Lin,C.K., Kalunta,C.I., Chen,F.S., Nguyen,T.T., Kaptein,J.S., and Lad,P.M. (1995). Dimethyl sulfoxide suppresses apoptosis in Burkitt's lymphoma cells. *Exp. Cell Res.* 216, 403-410.

Liu,B., Fang,M., Schmidt,M., Lu,Y., Mendelsohn,J., and Fan,Z. (2000). Induction of apoptosis and activation of the caspase cascade by anti-EGF receptor monoclonal antibodies in DiFi human colon cancer cells do not involve the c-jun N-terminal kinase activity. *Br. J. Cancer* 82, 1991-1999.

Loupakis,F., Ruzzo,A., Cremolini,C., Vincenzi,B., Salvatore,L., Santini,D., Masi,G., Stasi,I., Canestrari,E., Rulli,E., Floriani,I., Bencardino,K., Galluccio,N., Catalano,V., Tonini,G., Magnani,M., Fontanini,G., Basolo,F., Falcone,A., and Graziano,F. (2009). KRAS codon 61, 146 and BRAF mutations predict resistance to cetuximab plus irinotecan in KRAS codon 12 and 13 wild-type metastatic colorectal cancer. *Br. J. Cancer* 101, 715-721.

Lu,Q., Qiu,X., Hu,N., Wen,H., Su,Y., and Richardson,B.C. (2006). Epigenetics, disease, and therapeutic interventions. *Ageing Res. Rev.* 5, 449-467.

Lynch,T.J., Bell,D.W., Sordella,R., Gurubhagavatula,S., Okimoto,R.A., Brannigan,B.W., Harris,P.L., Haserlat,S.M., Supko,J.G., Haluska,F.G., Louis,D.N., Christiani,D.C., Settleman,J., and Haber,D.A. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 350, 2129-2139.

Malumbres,M. and Barbacid,M. (2003). RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat. Rev. Cancer* 3, 459-465.

Markowitz,S.D. and Bertagnolli,M.M. (2009). Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 2449-2460.

Marks,P.A. and Breslow,R. (2007). Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat. Biotechnol.* 25, 84-90.

Marquez,V.E., Kelley,J.A., Agbaria,R., Ben-Kasus,T., Cheng,J.C., Yoo,C.B., and Jones,P.A. (2005). Zebularine: a unique molecule for an epigenetically based strategy in cancer chemotherapy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1058, 246-254.

Massarelli,E., Varella-Garcia,M., Tang,X., Xavier,A.C., Ozburn,N.C., Liu,D.D., Bekele,B.N., Herbst,R.S., and Wistuba,I.I. (2007). KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. *Clin. Cancer Res.* 13, 2890-2896.

Mendelsohn,J. (2004). EGF receptors as a target for cancer therapy. *Trans. Am. Clin. Climatol. Assoc.* 115, 249-253.

Mitin,N., Rossman,K.L., and Der,C.J. (2005). Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr. Biol.* 15, R563-R574.

Miyazaki,Y., Hiraoka,S., Tsutsui,S., Kitamura,S., Shinomura,Y., and Matsuzawa,Y. (2001). Epidermal growth factor receptor mediates stress-induced expression of its ligands in rat gastric epithelial cells. *Gastroenterology* 120, 108-116.

- Montero,A.J., az-Montero,C.M., Mao,L., Youssef,E.M., Estecio,M., Shen,L., and Issa,J.P.** (2006). Epigenetic inactivation of EGFR by CpG island hypermethylation in cancer. *Cancer Biol. Ther.* 5, 1494-1501.
- Nguyen,C.T., Gonzales,F.A., and Jones,P.A.** (2001). Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Res.* 29, 4598-4606.
- Nowell,P.C.** (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- Omerovic,J., Hammond,D.E., Clague,M.J., and Prior,I.A.** (2008). Ras isoform abundance and signalling in human cancer cell lines. *Oncogene* 27, 2754-2762.
- Paez,J.G., Janne,P.A., Lee,J.C., Tracy,S., Greulich,H., Gabriel,S., Herman,P., Kaye,F.J., Lindeman,N., Boggon,T.J., Naoki,K., Sasaki,H., Fujii,Y., Eck,M.J., Sellers,W.R., Johnson,B.E., and Meyerson,M.** (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304, 1497-1500.
- Paz,M.F., Wei,S., Cigudosa,J.C., Rodriguez-Perales,S., Peinado,M.A., Huang,T.H., and Esteller,M.** (2003). Genetic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in colon cancer cells deficient in DNA methyltransferases. *Hum. Mol. Genet.* 12, 2209-2219.
- Perrotte,P., Matsumoto,T., Inoue,K., Kuniyasu,H., Eve,B.Y., Hicklin,D.J., Radinsky,R., and Dinney,C.P.** (1999). Anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits angiogenesis in human transitional cell carcinoma growing orthotopically in nude mice. *Clin. Cancer Res.* 5, 257-265.
- Pfeiffer,P., Qvortrup,C., and Eriksen,J.G.** (2007). Current role of antibody therapy in patients with metastatic colorectal cancer. *Oncogene* 26, 3661-3678.
- Prewett,M., Rothman,M., Waksal,H., Feldman,M., Bander,N.H., and Hicklin,D.J.** (1998). Mouse-human chimeric anti-epidermal growth factor receptor antibody C225 inhibits the growth of human renal cell carcinoma xenografts in nude mice. *Clin. Cancer Res.* 4, 2957-2966.
- Rhee,I., Bachman,K.E., Park,B.H., Jair,K.W., Yen,R.W., Schuebel,K.E., Cui,H., Feinberg,A.P., Lengauer,C., Kinzler,K.W., Baylin,S.B., and Vogelstein,B.** (2002). DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 416, 552-556.
- Riese,D.J., Gallo,R.M., and Settleman,J.** (2007). Mutational activation of ErbB family receptor tyrosine kinases: insights into mechanisms of signal transduction and tumorigenesis. *Bioessays* 29, 558-565.
- Robert-Koch-Institut.** Krebs in Deutschland 2003 - 2004. Häufigkeiten und Trends. Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. 2008.
- Roberts,P.J. and Der,C.J.** (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26, 3291-3310.

- Saeki,T., Stromberg,K., Qi,C.F., Gullick,W.J., Tahara,E., Normanno,N., Ciardiello,F., Kenney,N., Johnson,G.R., and Salomon,D.S.** (1992). Differential immunohistochemical detection of amphiregulin and cripto in human normal colon and colorectal tumors. *Cancer Res.* 52, 3467-3473.
- Salomon,D.S., Brandt,R., Ciardiello,F., and Normanno,N.** (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev. Oncol. Hematol.* 19, 183-232.
- Sasada,R., Ono,Y., Taniyama,Y., Shing,Y., Folkman,J., and Igarashi,K.** (1993). Cloning and expression of cDNA encoding human betacellulin, a new member of the EGF family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 1173-1179.
- Seno,M., Tada,H., Kosaka,M., Sasada,R., Igarashi,K., Shing,Y., Folkman,J., Ueda,M., and Yamada,H.** (1996). Human betacellulin, a member of the EGF family dominantly expressed in pancreas and small intestine, is fully active in a monomeric form. *Growth Factors* 13, 181-191.
- Shing,Y., Christofori,G., Hanahan,D., Ono,Y., Sasada,R., Igarashi,K., and Folkman,J.** (1993). Betacellulin: a mitogen from pancreatic beta cell tumors. *Science* 259, 1604-1607.
- Shoyab,M., Plowman,G.D., McDonald,V.L., Bradley,J.G., and Todaro,G.J.** (1989). Structure and function of human amphiregulin: a member of the epidermal growth factor family. *Science* 243, 1074-1076.
- Singh,A.B. and Harris,R.C.** (2005). Autocrine, paracrine and juxtacrine signaling by EGFR ligands. *Cell Signal.* 17, 1183-1193.
- Sunada,H., Magun,B.E., Mendelsohn,J., and MacLeod,C.L.** (1986). Monoclonal antibody against epidermal growth factor receptor is internalized without stimulating receptor phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 83, 3825-3829.
- Takano,T., Ohe,Y., Kusumoto,M., Tateishi,U., Yamamoto,S., Nokihara,H., Yamamoto,N., Sekine,I., Kunitoh,H., Tamura,T., Kodama,T., and Saijo,N.** (2004). Risk factors for interstitial lung disease and predictive factors for tumor response in patients with advanced non-small cell lung cancer treated with gefitinib. *Lung Cancer* 45, 93-104.
- Tokumo,M., Toyooka,S., Kiura,K., Shigematsu,H., Tomii,K., Aoe,M., Ichimura,K., Tsuda,T., Yano,M., Tsukuda,K., Tabata,M., Ueoka,H., Tanimoto,M., Date,H., Gazdar,A.F., and Shimizu,N.** (2005). The relationship between epidermal growth factor receptor mutations and clinicopathologic features in non-small cell lung cancers. *Clin. Cancer Res.* 11, 1167-1173.
- Torrington,N., Jorgensen,P.E., Sorensen,B.S., and Nexø,E.** (2000). Increased expression of heparin binding EGF (HB-EGF), amphiregulin, TGF alpha and epiregulin in androgen-independent prostate cancer cell lines. *Anticancer Res.* 20, 91-95.
- Valenzuela,D.M. and Groffen,J.** (1986). Four human carcinoma cell lines with novel mutations in position 12 of c-K-ras oncogene. *Nucleic Acids Res.* 14, 843-852.

- Vallbohmer,D., Zhang,W., Gordon,M., Yang,D.Y., Yun,J., Press,O.A., Rhodes,K.E., Sherrod,A.E., Iqbal,S., Danenberg,K.D., Groshen,S., and Lenz,H.J.** (2005). Molecular determinants of cetuximab efficacy. *J. Clin. Oncol.* 23, 3536-3544.
- Van Cutsem E., Kohne,C.H., Lang,I., Folprecht,G., Nowacki,M.P., Cascinu,S., Shchepotin,I., Maurel,J., Cunningham,D., Tejpar,S., Schlichting,M., Zube,A., Celik,I., Rougier,P., and Ciardiello,F.** (2011). Cetuximab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: updated analysis of overall survival according to tumor KRAS and BRAF mutation status. *J. Clin. Oncol.* 29, 2011-2019.
- Vogelstein,B. and Kinzler,K.W.** (1993). The multistep nature of cancer. *Trends Genet.* 9, 138-141.
- Wakeling,A.E., Guy,S.P., Woodburn,J.R., Ashton,S.E., Curry,B.J., Barker,A.J., and Gibson,K.H.** (2002). ZD1839 (Iressa): an orally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cancer therapy. *Cancer Res.* 62, 5749-5754.
- Watt,F. and Molloy,P.L.** (1988). Cytosine methylation prevents binding to DNA of a HeLa cell transcription factor required for optimal expression of the adenovirus major late promoter. *Genes Dev.* 2, 1136-1143.
- Willmarth,N.E. and Ethier,S.P.** (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, 37728-37737.
- Wu,X., Fan,Z., Masui,H., Rosen,N., and Mendelsohn,J.** (1995). Apoptosis induced by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody in a human colorectal carcinoma cell line and its delay by insulin. *J. Clin. Invest* 95, 1897-1905.
- Wu,X., Rubin,M., Fan,Z., DeBlasio,T., Soos,T., Koff,A., and Mendelsohn,J.** (1996). Involvement of p27KIP1 in G1 arrest mediated by an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody. *Oncogene* 12, 1397-1403.
- Yamashita,S., Tsujino,Y., Moriguchi,K., Tatematsu,M., and Ushijima,T.** (2006). Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer Sci.* 97, 64-71.
- Yang,J., Zhang,W., Evans,P.M., Chen,X., He,X., and Liu,C.** (2006). Adenomatous polyposis coli (APC) differentially regulates beta-catenin phosphorylation and ubiquitination in colon cancer cells. *J. Biol. Chem.* 281, 17751-17757.
- Yarden,Y. and Sliwkowski,M.X.** (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 127-137.
- Yonesaka,K., Zejnullahu,K., Lindeman,N., Homes,A.J., Jackman,D.M., Zhao,F., Rogers,A.M., Johnson,B.E., and Janne,P.A.** (2008). Autocrine production of amphiregulin predicts sensitivity to both gefitinib and cetuximab in EGFR wild-type cancers. *Clin. Cancer Res.* 14, 6963-6973.

7.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin Frau PD Dr. Christine Sers für die Überlassung des Projekts und die umfassende Betreuung in allen Phasen der Arbeit.

Für die herzliche Aufnahme und die unermüdliche Hilfsbereitschaft danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekulare Tumorphologie der Charité Berlin.

Der Akademischen Verwaltung der Charité Universitätsmedizin Berlin und der Berliner Krebsgesellschaft e.V. danke ich für die finanzielle Unterstützung.

Außerdem möchte ich mich bei meiner Familie und bei meinen Freunden bedanken.

7.3 Lebenslauf

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

7.4 Publikationsliste

Poster

C Sers, S Fonfara, R Kuner, **AS Kelm**, M Dietel, R Schäfer, W Weichert

“Regulation of the EGFR ligands AREG and BTC through a MAPK and DNA-methylation-dependent mechanism”

92. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie

C Sers, A Franke, S Fonfara, R Kuner, **AS Kelm**, A Kasajima, M Dietel, R Schäfer, W Weichert

“Regulation of the EGFR ligands AREG, EREG and BTC through a MAPK and DNA methylation-dependent mechanism”

AEK meeting 2009, Berlin

F Bormann, **AS Kelm**, M Dietel, S Tierling, J Walter, M Rivera-Markelova, I Fichtner, R Schäfer, W Weichert, C Sers

“Regulation of the EGFR ligands AREG, EREG and BTC through DNA methylation-dependent mechanisms in colorectal cancer”

MedSYS Statusseminar des BMBF, Freiburg 2010

7.5 Eigenständigkeitserklärung

Ich, Anne Sophie Kelm, erkläre, daß ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die Regulation der EGF-Rezeptor-Liganden Amphiregulin und Betacellulin in Kolonkarzinomzellen durch DNA-Methylierung“ selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt habe, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe und, auch in Teilen, keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift