

Molekularbiologische Untersuchungen von dysreguliert-exprimierten Genen im kolorektalen Karzinom



Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der Naturwissenschaftlichen Fakultät III –

Biologie und Vorklinische Medizin der

Universität Regensburg

vorgelegt von

Marcus Bettstetter

aus Regensburg

Juli 2007

Promotionsgesuch eingereicht am 12. Juli 2005

Die Arbeit wurde angeleitet von Herrn PD Dr. Wolfgang Dietmaier

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Reinhard Sterner

1. Gutachter: Prof. Dr. Stephan Schneuwly

2. Gutachter: PD Dr. Wolfgang Dietmaier

3. Prüfer: Prof. Dr. Ernst Tamm

Holzhacken ist deshalb so beliebt, weil man bei dieser Tätigkeit den Erfolg sofort sieht.

Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung	14
3	Materialien und Methoden	15
3.1	Materialien	15
3.1.1	Allgemeine Materialien.....	15
3.1.2	Geräte.....	16
3.1.3	Bakterien, Zelllinien und Vektoren.....	17
3.1.3.1	Bakterien.....	17
3.1.3.2	Humane CRC und CRC-Zelllinien.....	17
3.1.4	Vektoren.....	17
3.1.4.1	pcDNA3.1.....	17
3.1.4.2	pQE-TriSystem His-Strep 1.....	17
3.1.5	Oligonukleotide.....	18
3.1.5.1	Primer zur <i>real-time</i> PCR an cDNA.....	18
3.1.5.2	Sequenzierungsprimer	19
3.1.5.3	Primer zur Herstellung von Vektorkonstrukten.....	19
3.1.5.4	Primer für Methylierungsanalysen	19
3.1.6	Short Interfering RNAs (siRNA)	20
3.1.7	Medien, Puffer und Lösungen.....	20
3.1.7.1	Medien zur Anzucht von <i>E. coli</i> und Säugerzellkulturen.....	20
3.1.7.2	Puffer und Lösungen	20
3.2	Methoden	23
3.2.1	Arbeiten mit Escherichia Coli.....	23
3.2.1.1	Kultivierung von Bakterien	23
3.2.1.2	Transformation von <i>E. coli</i>	23
3.2.1.3	Herstellung kompetenter Bakterien	23
3.2.2	Isolierung von Plasmid DNA.....	24
3.2.3	Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen.....	24
3.2.4	Isolierung von RNA	24
3.3	Molekularbiologische Methoden	24
3.3.1	DNA- und RNA-Methoden.....	24
3.3.1.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	24
3.3.1.2	Gelelektrophorese von DNA	25
3.3.1.3	Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten	25
3.3.1.4	DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmungen.....	25
3.3.1.5	Reverse Transkription.....	25
3.3.1.6	Modifizierung von DNA mit Na-Bisulfit	25
3.3.1.7	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	26
3.3.1.8	<i>Real-time</i> PCR.....	26
3.3.1.9	Relative Quantifizierung.....	26
3.3.1.10	Sequenzierungen.....	27
3.3.2	Protein-Methoden	27
3.3.2.1	Herstellung von Gesamtproteinextrakten (RIPA-Lysaten).....	27
3.3.2.2	Fraktionelle Proteinisolierung	27
3.3.2.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	28
3.3.2.4	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)	28
3.3.2.5	<i>Western-Blot</i>	28
3.3.2.6	Proteindetektion auf <i>Western-Blots</i>	28

3.3.2.7	Coomassie-Färbung von SDS PAA-Gelen.....	29
3.3.2.8	Silberfärbung im SDS PAA-Gel.....	29
3.3.2.9	Co-Immunpräzipitation (CoIP).....	29
3.3.2.10	Herstellung und Aufreinigung von rekombinantem Maspin	29
3.3.2.11	Immunfluoreszenz.....	30
3.3.2.12	Immunhistochemie (IHC).....	31
3.3.2.13	Immuncytochemie (ICC).....	31
3.3.2.14	Auswertung der Maspin-IHC	31
3.3.3	Quantitative Methylierungsanalysen.....	32
3.3.3.1	QAMMOD-Methylierungsanalyse des <i>MLH1</i> -Promotors	32
3.3.3.2	QESD.....	35
3.3.3.2.1	Durchführung der QESD	36
3.4	Zellkulturmethoden.....	37
3.4.1	Kultivierung von CRC-Zelllinien	37
3.4.1.1	Synchronisation von CRC-Zelllinien	37
3.4.2	Durchflusszytometrische Analyse von Zellen (FACS).....	38
3.4.3	Stabile und transiente Transfektion von CRC-Zelllinien.....	38
3.4.3.1	DNA-Transfektionen.....	38
3.4.3.2	siRNA-Transfektionen.....	39
3.4.4	Assays.....	39
3.4.4.1	Δt -Adhäsions-Assays (Messung der Adhäsionsgeschwindigkeit).....	39
3.4.4.2	Δg -Adhäsions-Assays (Messung der Adhäsionsstärke).....	39
3.4.4.3	Migrations- und Invasions-Assays.....	40
3.4.4.3.1	Vorbereitung der Gelatine Filter.....	40
3.4.4.3.2	Herstellung des F5-Fibroblastenüberstandes	40
3.4.4.3.3	Durchführung der Assays.....	40
3.4.4.4	Proliferations-Assays	41
3.5	Statistische Auswertung.....	41
4	Ergebnisse.....	42
4.1	Auswahl und Verifizierung dysregulierter Gene in CRC	42
4.2	Maspin.....	44
4.2.1	Weitergehende Verifizierung der Maspin-Array-Daten an Einzelproben.....	44
4.2.2	Maspin-Proteinexpression in CRC.....	46
4.2.3	Maspinexpression in CRC-Zelllinien.....	47
4.2.3.1	Quantifizierung der Maspinexpression in CRC-Zelllinien.....	47
4.2.3.2	Verteilung und Lokalisation von Maspin in CRC-Zelllinien	48
4.2.4	Immunhistochemische Färbungen von CRC-Tumoren.....	49
4.2.5	Prognostische Bedeutung der Maspinexpression für Kolonkarzinom-Patienten	52
4.2.6	Regulation der Maspinexpression.....	54
4.2.6.1	Analyse der Promotormethylierung in CRC-Zelllinien.....	54
4.2.6.2	Analyse der Promotormethylierung in CRC.....	55
4.2.7	Funktionelle Studien	56
4.2.7.1	Maspin-Überexpression.....	56
4.2.7.1.1	Erstellung des pMS-Vektorkonstruktes aus pcDNA3.1	56
4.2.7.1.2	Stabile Transfektion des pMS-Konstruktes	57
4.2.7.1.3	Charakterisierung der SW480 MS-Klone.....	58
4.2.7.1.3.1	Morphologie der SW480 MS-Klone.....	58
4.2.7.1.3.2	Subzelluläre Lokalisation des rekombinanten Maspins (rMaspin).....	61
4.2.7.2	Maspin-Suppression durch ein Antisense-Vektorkonstrukt	62
4.2.7.2.1	Erstellung des pAS-Vektorkonstruktes aus pcDNA3.1	62
4.2.7.2.2	Stabile Transfektion des pAS-Konstruktes	63
4.2.7.2.3	Charakterisierung der SW48 AS-Klone.....	64

4.2.7.2.3.1	Morphologie	64
4.2.7.3	Maspin-Suppression durch siRNA	66
4.2.7.4	Adhäsions-Assays	68
4.2.7.4.1	Adhäsionsgeschwindigkeit (Δt -Assays)	68
4.2.7.4.1.1	Adhäsionsgeschwindigkeiten der Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klone	68
4.2.7.4.1.2	Adhäsionsgeschwindigkeiten der Maspin-supprimierten SW48 AS-Klone	69
4.2.7.4.1.3	Adhäsionsgeschwindigkeiten der Maspin-supprimierten SW48 siRNA-Transfektanden	70
4.2.7.4.2	Adhäsionsstärke (Δg -Assays)	70
4.2.7.4.2.1	Adhäsionsstärken der Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klone	70
4.2.7.4.2.2	Adhäsionsstärken der Maspin-supprimierten SW48 AS-Klone	71
4.2.7.4.2.3	Adhäsionsstärken der Maspin-supprimierten SW48 siRNA-Transfektanden	72
4.2.7.4.3	Vergleich der Ergebnisse der Adhäsionsversuche	73
4.2.7.5	Proliferation	73
4.2.7.5.1	Proliferation der Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klone	74
4.2.7.5.2	Proliferation der Maspin-supprimierten SW48 AS-Klone	74
4.2.7.6	Migrations-Assays	75
4.2.7.6.1	Motilität der Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klone	75
4.2.7.6.2	Motilität der Maspin-supprimierten SW48 AS-Klone	76
4.2.7.6.3	Motilität der Maspin-supprimierten SW48 siRNA-Transfektanden	76
4.2.7.7	Invasions-Assays	77
4.2.7.7.1	Invasivität der Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klone	77
4.2.7.7.2	Invasivität der Maspin-supprimierten SW48 AS-Klone	78
4.2.7.7.3	Invasivität der Maspin-supprimierten SW48 siRNA-Transfektanden	79
4.2.7.8	5-Fluoruracil-Sensitivität	80
4.2.7.8.1	5-FU-Sensitivität der Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klone	80
4.2.7.8.2	5-FU-Sensitivität der Maspin-supprimierten SW48 AS-Klone	81
4.2.8	Expressionsanalysen von Genen, die mit 5-FU-Sensitivität assoziiert sind	82
4.2.8.1	Expression 5-FU-Sensitivitäts-assoziiierter Gene bei den Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klonen	82
4.2.8.2	Expression 5-FU-Sensitivitäts-assoziiierter Gene bei den Maspin-supprimierten SW48 AS-Klonen	83
4.2.8.3	Expression 5-FU-Sensitivitäts-assoziiierter Gene und Korrelation zur Maspinexpression in CRC	84
4.2.8.3.1	TS-Expression in CRC	84
4.2.8.3.2	DPD-Expression in CRC	85
4.2.8.3.3	TP-Expression in CRC	85
4.2.9	Expression von Invasivitäts-assoziierten Genen	86
4.2.9.1	Expression von Invasivitäts-assoziierten Genen bei den Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klonen	86
4.2.9.2	Expression von Invasivitäts-assoziierten Genen bei den Maspin-supprimierten SW48 AS-Klonen	87
4.2.9.3	Expression Invasivitäts-assoziiierter Gene und Korrelation zur Maspinexpression in CRC	88
4.2.10	Expression von Invasivitäts- und 5-FU-Sensitivitäts-assoziierten Genen in CRC in Abhängigkeit von der Maspin-Kernfärbung	89
4.2.11	Expression von rekombinantem Maspin	90
4.2.11.1	Erstellung des pQSH-Maspin-Vektorkonstruktes aus pQE-TriSystem HisStrep1	90
4.2.11.2	Isolation von rMaspin	92
4.2.12	rMaspin-Proteininteraktionen	93
4.2.13	Maspin- Coimmunpräzipitation (CoIP)	94
4.2.14	Maspin-Mutationsanalysen	95
4.2.15	Korrelation der Maspinexpression mit dem Zellzyklus	96

4.3	Methylierungsanalysen	100
4.3.1	QAMMOD, eine Quantitative Methylierungsanalyse von Bisulfit-modifizierter DNA	100
4.3.1.1	Validierung der QAMMOD am Beispiel des <i>MLH1</i> -Promotors	100
4.3.1.1.1	Quantitative Validierung der <i>MLH1</i> -QAMMOD	100
4.3.1.1.2	Qualitative Validierung und Kontrolle der <i>MLH1</i> -QAMMOD	101
4.3.1.2	Evaluierung der QAMMOD an einer Referenzgruppe mit verifizierten HNPCC-Tumoren und sporadischen CRC	102
4.3.2	Methylierungsanalysen mittels QESD (Quantifizierung Endonuklease-resistenter DNA)....	104
4.3.2.1	Validierung der QESD zur Methylierungsanalyse des <i>MLH1</i> -Promotors	104
4.3.2.1.1	Sensitivität der QESD	104
4.3.2.1.2	Quantitative Präzision der QESD	105
4.3.2.1.3	Restriktionseffektivität und Spezifität der methylierungssensitiven Endonuklease <i>Hin6I</i>	106
4.3.2.2	Evaluierung der <i>MLH1</i> -QESD an einer Referenzgruppe mit verifizierten HNPCC-Tumoren und sporadischen CRC	107
4.3.3	Vergleich der <i>MLH1</i> -QAMMOD mit der <i>MLH1</i> -QESD	109
4.3.4	QESD-Methylierungsanalysen von P16 und MGMT	112
5	Diskussion	114
5.1	Maspin	114
5.1.1	Expression von Maspin in CRC und in CRC-Zelllinien	114
5.1.2	In vitro-Versuche: Maspin-Überexpression und Maspin-Suppression	117
5.1.2.1	Proliferation	119
5.1.2.2	Regulation der Maspinexpression	120
5.1.2.3	Migration und Invasion	121
5.1.3	Einfluss der Maspinexpression auf die Expression anderer tumorrelevanter Gene	122
5.1.3.1	Einfluss der Maspinexpression auf die Expression der Gene des 5-FU-Stoffwechsels	122
5.1.3.2	Angiogenese	124
5.1.3.3	Expression Invasivitäts-assoziiertes Gene in transfizierten CRC-Zelllinien und in CRC ..	124
5.1.4	Proteininteraktionen	126
5.1.5	Mutationsanalysen	127
5.1.6	Zusammenhänge von Lokalisation und Funktion von Maspin	128
5.2	Methylierungsanalysen	129
5.2.1	Promotormethylierung von P16, MGMT und <i>MLH1</i> in MSI und MSS CRC	130
5.2.2	<i>MLH1</i> -Methylierungsanalysen von HNPCC-Tumoren und sporadischen CRC	131
5.2.3	Empfehlungen zum Einsatz quantitativer <i>MLH1</i> -Methylierungsanalysen als zusätzliche Methoden in der HNPCC-Diagnostik	133
5.2.4	Vergleich der QAMMOD und der QESD	134
6	Zusammenfassung	137
	Ausblick	141
7	Eigene Publikationen	142
8	Literatur	143
	Danksagungen	148
	Erklärung	149

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Anatomie des Kolons und Rektums.	1
Abb. 1.2: Histologischer Querschnitt des Kolons.	2
Abb. 1.3: Struktur eines Maspinmoleküls.	8
Abb. 3.1: Lage der Primer, die zur QAMMOD-Methylierungsanalyse des <i>MLH1</i> -Promotors verwendet wurden.	32
Abb. 3.2: Prinzip der QAMMOD.	33
Abb. 3.3: Lage der Primer und <i>Hin6I</i> -Schnittstellen, die zur QESD-Methylierungsanalyse des <i>MLH1</i> -Promotors verwendet wurden.	35
Abb. 3.4: Das Prinzip der QESD.	36
Abb. 3.5: Schematischer Aufbau der Boydenkammer.	41
Abb. 4.1.1: Verifizierung der <i>Array</i> -Daten mittels <i>real-time</i> PCR an cDNA-Pools.	43
Abb. 4.2.1: Analyse der Maspinexpression mittels <i>Array</i> , <i>real-time</i> PCR mit cDNA-Pools bzw. Einzelproben.	45
Abb. 4.2.2: Analyse der Maspinexpression in CRC mittels <i>real-time</i> PCR mit cDNA-Einzelproben.	46
Abb. 4.2.3: Maspin-Proteinexpression in Kolonmucosa und in CRC.	47
Abb. 4.2.4: Maspinexpression in MSI und MSS CRC-Zelllinien.	48
Abb. 4.2.5: Maspin-IHC von CRC-Zelllinien.	49
Abb. 4.2.6: Maspin- <i>Western-Blot</i> mit Zellkompartimentfraktionen von SW48, LoVo und HCT116.	49
Abb. 4.2.7: Maspin-IHC von CRC.	51
Abb. 4.2.8: Einfluss nukleärer Maspinexpression auf das Überleben von Kolonkarzinom-Patienten mit und ohne Chemotherapie (Kaplan-Meier-Test).	54
Abb. 4.2.9: Methylierungsanalyse verschiedener CRC-Zelllinien.	55
Abb. 4.2.10: Methylierungsanalysen des Maspinpromotors in Kolonmucosa und CRC.	56
Abb. 4.2.11: Erstellung des pMS-Vektorkonstruktes.	57
Abb. 4.2.12: Stabile Überexpression von Maspin in SW480.	58
Abb. 4.2.13: Zellgröße der SW480 MS-Klone in μm^3	59
Abb. 4.2.14: Morphologie der SW480 MS-Klone.	60
Abb. 4.2.15: Maspin-IHC der SW480 MS-Klone.	61
Abb. 4.2.16: Immunfluoreszenz der SW480 MS-Klone.	62
Abb. 4.2.17: Maspin-AS-Konstrukt pAS.	63
Abb. 4.2.18: Maspin-Suppression bei den SW48 AS-Klone.	64
Abb. 4.2.19: Zellgröße der SW48 AS-Klone in μm^3	64
Abb. 4.2.20: Morphologie der SW48 AS-Klone.	65
Abb. 4.2.21: Transfektion von SW48 mit Kontroll-siRNA.	66
Abb. 4.2.22: Effektivität und Dauer einer Maspin-Suppression bei SW48 mit siRNAs.	67
Abb. 4.2.23: Maspin- <i>Western-Blot</i> der siRNA-transfizierten SW48-Zellen nach 4 Tagen.	67
Abb. 4.2.24: Durchschnittliche Maspinexpression von SW48, 3 und 4 Tage <i>post</i> siRNA-Transfektion. ..	67
Abb. 4.2.25: Adhäsion der SW480 MS-Klone nach verschiedenen Zeiten.	68
Abb. 4.2.26: Adhäsion der SW48 AS-Klone nach verschiedenen Zeiten.	69
Abb. 4.2.27: Adhäsion der siRNA SW48-Transfektanden nach verschiedenen Zeiten.	70
Abb. 4.2.28: Adhäsionsstärken der SW480 MS-Klone.	71
Abb. 4.2.29: Adhäsionsstärken der SW48 AS-Klone.	72
Abb. 4.2.30: Adhäsionsstärken der SW48 siRNA-Transfektanden.	73
Abb. 4.2.31: Proliferation der SW480 MS-Klone.	74
Abb. 4.2.32: 24h-Wachstumskonstanten der SW48 AS-Klone.	75
Abb. 4.2.33: Relative Migrationsraten der SW480 MS-Klone.	76
Abb. 4.2.34: Relative Migrationsraten der SW48 AS-Klone.	76
Abb. 4.2.35: Relative Migration der SW48 siRNA-Transfektanden.	77
Abb. 4.2.36: Invasivität der SW480 MS-Klone mit und ohne anti-Maspin-Antikörper.	78

Abb. 4.2.37: Invasivität der SW48 AS-Klone unter dem Einfluss von rMaspin und anti-Maspin-Antikörper.....	79
Abb. 4.2.38: Relative Invasivität der SW48 siRNA-Transfektanden.....	80
Abb. 4.2.39: Relative Überlebensraten der SW480 MS-Klone bei verschiedenen 5-FU-Konzentrationen.....	81
Abb. 4.2.40: Relative Überlebensraten der SW48 AS-Klone bei verschiedenen 5-FU-Konzentrationen.....	82
Abb. 4.2.41: Expression 5-FU-Sensitivitäts-assoziiierter Gene bei den SW480 MS-Klonen.....	83
Abb. 4.2.42: Expression 5-FU-Sensitivitäts-assoziiierter Gene bei den SW48 AS-Klonen.....	84
Abb. 4.2.43: Korrelationen zwischen Maspinexpression und 5-FU-Sensitivitäts-assoziierten Genen in CRC.....	86
Abb. 4.2.44: Expression Invasivitäts-assoziiierter Gene bei den SW480 MS-Klonen.....	87
Abb. 4.2.45: Expression Invasivitäts-assoziiierter Gene bei den SW48 AS-Klonen.....	88
Abb. 4.2.46: pQSH-Maspin-Vektorkonstrukt.....	91
Abb. 4.2.47: Isolation und Reinigung des rMaspin aus E.coli XL-2 blue.....	92
Abb. 4.2.48: Protein-Interaktionen zwischen rMaspin und SW48-Proteinen.....	94
Abb. 4.2.49: Maspin-Coimmunpräzipitation mit LoVo und SW48.....	95
Abb. 4.2.50: Zellzyklus-Synchronisation der SW48- und HCT116-Zellen.....	97
Abb. 4.2.51: Zellzyklusverteilung der synchronisierten SW48- und HCT116-Zellen.....	97
Abb. 4.3.1: Methylierungsquantifizierung verschiedener Mischungen aus methylierter und unmethylierter DNA aus CRC-Zelllinien.....	101
Abb. 4.3.2: Schmelzpunktanalysen verschiedener <i>Flank</i> -PCR-Produkte.....	102
Abb. 4.3.3: Sensitivität der <i>MLH1</i> -QESD.....	105
Abb. 4.3.4: QESD-Analyse verschiedener Mischungen aus methylierter und unmethylierter DNA aus CRC-Zelllinien.....	106
Abb. 4.3.5: Restriktionseffektivität von <i>Hin6I</i> an unmethylierter DNA.....	107
Abb. 4.3.6: Vergleich der <i>MLH1</i> -QAMMOD und der <i>MLH1</i> -QESD in Tumoren der Referenzgruppe.....	110
Abb. 4.3.7: Promotormethylierung von <i>P16</i> und <i>MGMT</i> bei MSI CRC mit negativer und positiver <i>MLH1</i> -Promotormethylierung (proximal).....	113
Abb. 5.1: Der 5-FU-Stoffwechsel.....	122
Abb. 5.2: Hypothese zur Tumorgenese von CIN/MSS und MSI Tumoren unter Beteiligung der <i>MGMT</i> -, <i>P16</i> - und <i>MLH1</i> -Methylierung.....	131

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1: Berichte von tumorassoziierter Reduktion der Maspinexpression und tumorsuppressiven Eigenschaften von Maspin.....	10
Tab. 1.2: Berichte von tumorassoziierter Maspinexpression und onkogenen Eigenschaften von Maspin.	12
Tab. 4.2.1: Maspinexpression in CRC.....	45
Tab. 4.2.2: Klinisch-pathologische und molekulare Daten bezogen auf die Maspin-IHC.....	50
Tab. 4.2.3: Univariate Analyse prognostischer Faktoren im Zusammenhang mit Gesamtüberleben (<i>overall survival</i> ; OS).....	53
Tab. 4.2.4: Relative Adhäsionsgeschwindigkeiten der SW480 MS-Klone.....	69
Tab. 4.2.5: Relative Adhäsionsgeschwindigkeiten der SW480 MS-Klone	69
Tab. 4.2.6: Relative Adhäsionsgeschwindigkeiten der SW48 siRNA-Transfektanden	70
Tab. 4.2.7: Relative Adhäsionsstärken der SW480 MS-Klone	71
Tab. 4.2.8: Relative Adhäsionsstärken der SW48 AS-Klone.....	72
Tab. 4.2.9: Relative Adhäsionsstärken der SW48 siRNA-Transfektanden.....	73
Tab. 4.2.10: Relative Invasivitätsraten der SW480 MS-Klone mit und ohne anti-Maspin-Antikörper.....	78
Tab. 4.2.11: Modulation der Invasivität der SW48 AS-Klone durch Zugabe von rMaspin bzw. anti-Maspin-Antikörper	79
Tab. 4.2.12: Korrelationen zwischen der Expression Invasivitäts-assoziierter Gene und der Maspinexpression in CRC.....	89
Tab. 4.2.13: Expression von Invasivitäts- und 5-FU-Sensitivitäts-assozierten Genen in CRC in Abhängigkeit von der Maspin-Kernfärbung	90
Tab. 4.2.14: Modulation der Maspinexpression während des Zellzyklusses (FACS-Analyse).....	98
Tab. 4.2.15: Modulation der Maspinexpression während des Zellzyklusses (<i>real-time</i> PCR-Analyse mit cDNA).....	99
Tab. 4.3.1: Ergebnisse der <i>MLHI</i> -QAMMOD der Tumore einer Referenzgruppe.....	104
Tab. 4.3.2: Ergebnisse der <i>MLHI</i> -QESD der Tumore der Referenzgruppe.....	109
Tab. 4.3.3: Klinische Parameter und <i>MLHI</i> -Methylierungsdaten der CRC-Referenzgruppen-Patienten....	111
Tab. 4.3.4: Promotormethylierung von <i>P16</i> und <i>MGMT</i> in MSI und MSS CRC.	112
Tab. 4.3.5: Promotormethylierung von <i>P16</i> und <i>MGMT</i> in bei MSI CRC mit negativer (< 18 %) und positiver (> 18 %) <i>MLHI</i> -Methylierung.	113

Abkürzungsverzeichnis

SI-Einheiten und Präfixe zur Bezeichnung von Vielfachen von Maßeinheiten werden als bekannt vorausgesetzt und finden deshalb im Abkürzungsverzeichnis keine Erwähnung.

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
bidest	zweifach destilliert
BGH	<i>bovine growth hormone</i>
BSA	bovine serum albumin
bp	Basenpaare
cDNA	copy DNA
CIN	Chromosomale Instabilität
CMV	<i>Cytomegavirus</i>
CRC	Kolorektales Karzinom (<i>engl. colorectal carcinoma</i>)
DAPI	4',6-Diamindinitro-2-Phenylindol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
dNTP	2'-Desoxyribonucleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylen-Diamin-Tetraacetat
<i>et al.</i>	lat.: und andere
FC	<i>fold change</i>
FdUM	5-Fluoro-2'-Desoxyuridin-5'-Monophosphat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
5-FU	5-Fluoruracil
HEPES	N-2-Hydroxyethyl-1-Piperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
HNPCC	Hereditäres nicht-polypöses Kolorektales Karzinom (<i>hereditary non-polyposis colorectal cancer</i>)
IHC	Immunhistochemie
ICC	Immuncytochemie
kDa	Kilo-Dalton
LB	Luria-Bertani (Bakterienkulturmedium)
LP	Leerplasmidkontrolle
Max	Maximum
mDNA	Bisulfit-modifizierte DNA
Med	Median
min	Minuten
Min	Minimum
MMP	Matrixmetalloproteinase
MSI	Hochgradig Mikrosatelliten-instabil (<i>MSI-high, MSI-H</i>)
MSS	Mikrosatelliten-stabil/geringe Mikrosatelliteninstabilität (<i>MSI-low, MSI-L</i>)
MW	Mittelwert
OD	Optische Dichte
PAA	Poly-acrylamid
PAGE	Poly-acrylamid Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>engl. polymerase chain reaction</i>)
rMaspin	rekombinantes Maspin
RNA	Ribonukleinsäure
RNT	relative normalisierte Transkription
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfat</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SP	Schmelzpunkt
Std.abw.	Standardabweichung
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TEMED	N,N,N',N'- Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris – Hydroxymethylaminomethan
TIMP	<i>tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases</i>
U	Enzymeinheit (<i>engl. unit</i>)
UpM	Umdrehungen pro Minute
(v/v)	Volumenverhältnis
WT	Wildtyp
(w/v)	Masse pro Volumen

Molekularbiologische Untersuchungen von dysreguliert-exprimierten Genen im kolorektalen Karzinom

1 Einleitung

Der kaudale Abschnitt des Magen-Darm-Kanals wird vom Dickdarm (Kolon) und Mastdarm (Rektum) gebildet und besitzt eine Länge von etwa 1,5 m. Das Kolon untergliedert sich in einen rechts liegenden, aufsteigenden Teil (*Colon ascendens*), einen von rechts nach links ziehenden Mittelteil (*Colon transversum*) sowie einen linksseitigen, absteigenden Abschnitt (*Colon descendens*), welcher über das S-förmige *Sigmoideum* in das Rektum mündet (Abb. 1.1). Je nach Position in der Bauchhöhle ist das Kolon gänzlich von Bauchfell (*Peritoneum*) umhüllt oder nur an seiner ventralen Seite mit ihm verwachsen. Das Rektum besitzt hingegen keinen Kontakt zum *Peritoneum*.

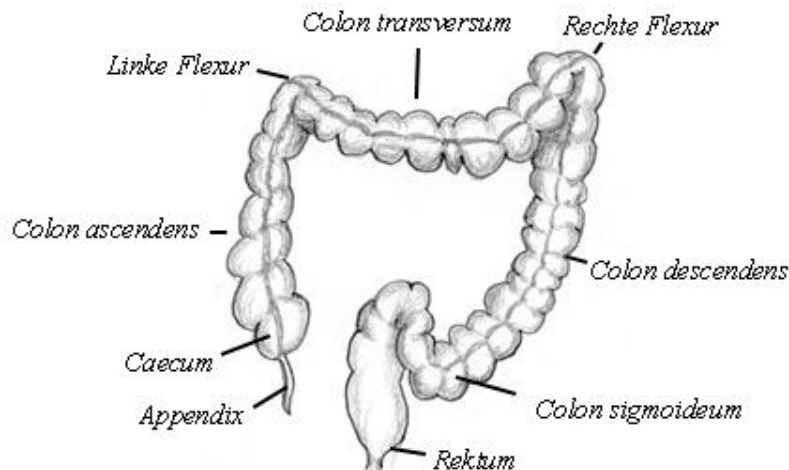


Abb. 1.1: Anatomie des Kolons und Rektums.

Histologisch sind Kolon und Rektum aus verschiedenen Gewebeschichten aufgebaut. Luminal findet man zunächst eine Schleimhautschicht (*Tunica mucosa*) mit einer dünnen Bindegewebs- und Muskelschicht. Weiter abluminal liegt eine bindegewebige Verschiebeschicht (*Tela submucosa*) gefolgt von einer Muskelschicht (*Tunica muscularis*), die sowohl aus einer Ring- als auch aus einer Längsmuskulatur besteht. Diese Längsmuskulatur ist im Bereich des Kolons zu

drei Streifen, den Tănien, gebündelt. Nach außen hin wird das Darmrohr schließlich durch eine fettreiche Bindegewebeschicht (*Tunica serosa*) abgegrenzt (Abb. 1.2).

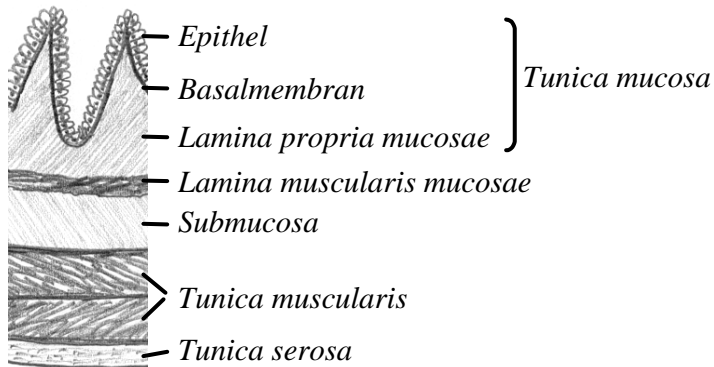


Abb. 1.2: Histologischer Querschnitt des Kolons.

Die Hauptfunktion des Kolons liegt in der Absorption von Wasser, Elektrolyten und kurzkettigen Fettsäuren, woraus eine Eindickung des Stuhls resultiert. Ring- und Längsmuskulatur bewirken eine Durchmischung und den Transport des Stuhls (Peristaltik). Dabei entstehen in regelmäßigen Abständen Einschnürungen des Kolons (Haustrien). Die lediglich aus einer Epithelzellschicht bestehende *Tunica mucosa* ist durch drüsenartige Einsenkungen, die Krypten, gekennzeichnet. Diese werden vorwiegend von den Schleim produzierenden Becherzellen ausgekleidet. Neben den Becherzellen findet man resorptive Zellen mit einem Mikrovilli-Saum auf der luminalen Seite, welche der Absorption dienen.

Das kolorektale Karzinom (*colorectal carcinom*, CRC) zeigt in den westlichen Industrieländern unter allen Malignitäten die jeweils zweithöchste Inzidenz und Mortalität. Mit einer jährlichen Anzahl von Neuerkrankungen in Höhe von 30 – 35 pro 100 000 Einwohner ist das kolorektale Karzinom eine der häufigsten malignen Erkrankungen in Europa und ist für etwa 15 % aller tumorbedingten Todesfälle verantwortlich. Die weltweite Inzidenz wird auf eine Million Neuerkrankungen pro Jahr geschätzt. Im Jahr 2006 lag in Europa die Zahl der CRC-Neudiagnosen bei 412 900, die der CRC-bedingten Sterbefälle bei 207 400 (Ferlay *et al.*, 2007). Darmkrebs ist in Deutschland bei Männern und Frauen die zweithäufigste Krebserkrankung, an der mehr als sechs Prozent aller Deutschen im Laufe ihres Lebens erkranken (Statistisches Bundesamt).

Die Heilungschancen durch Operation und Chemotherapie mit 5-Jahres-Überlebensrate von 40 – 60 % im Mittel hängen entscheidend vom Krankheitsstadium bei der Diagnose ab.

Maligne Tumore zeichnen sich prinzipiell durch folgende zwei Charakteristika aus:

(i) Ungehemmtes Wachstum aufgrund unkontrollierter Zellteilung. Diese Eigenschaft besitzen auch benigne Tumore.

(ii) Gewebegrenzen überschreitende Proliferation. Zunächst lokaler Einbruch in umliegende Gewebe, später systemische Ausbreitung in Lymphknoten und andere Organe.

Maligne Tumore mit epitheliale Ursprung bezeichnet man als Karzinome. Die meisten kolorektalen Karzinome entwickeln sich schrittweise über die Zwischenstufe des Adenoms aus gesunder Darmschleimhaut, wobei diese maligne Transformation mit der Anhäufung verschiedener genetischer Alterationen einhergeht. Grundlage dieser Adenom-Karzinom-Sequenz ist das genetische Modell der sequentiellen Akkumulation genomischer Läsionen (Vogelstein *et al.*, 1988). Durch diese Akkumulation von Mutationen in mindestens fünf Genen und der gleichzeitigen Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, entsteht bei klonaler Expansion einer Zelle ein kolorektales Karzinom (Vogelstein *et al.*, 1988; Fearon and Vogelstein, 1990). Sowohl die hereditären wie auch die sporadischen Formen des kolorektalen Karzinoms entstehen auf diesem Weg und beruhen auf zwei verschiedenen Grundmechanismen: Dem Suppressor-*Pathway* und dem Mutator-*Pathway*.

Der Suppressor-*Pathway* ist durch chromosomale Instabilität (CIN) gekennzeichnet und betrifft etwa 85 % der sporadischen CRC sowie auch die erblichen Tumore der familiären adenomatösen Polyposis (FAP). Die CIN manifestiert sich vor allem in Aneuploidie und Chromosomen-*Rearrangements*. Ein Schlüsselereignis des *Gatekeeper-Pathways* stellen Mutationen des Tumorsuppressorgens *APC* (*adenomatosis polyposis coli*) dar. *APC*-Mutationen treten bei 85 % der sporadischen Karzinome sowie bei der Familiäre Adenomatöse Polyposis (FAP) auf (Kinzler and Vogelstein, 1997; Lengauer *et al.*, 1998). *APC* ist in den *Wingless/Wnt-Pathway* involviert, indem es die proteasomale Degradierung von β -Catenin vermittelt. Nach funktionellem Verlust von *APC* kann β -Catenin vermehrt in den Zellkern translozieren, wo es im Verbund mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Transkription von Genen aktiviert, die den Zellzyklus beeinflussen (Fodde *et al.*, 2001). *APC*-Mutationen wurden bereits im Adenomstadium in über 60 % der Fälle nachgewiesen (Powell *et al.*, 1992). Weitere in den Suppressor-*Pathway* involvierte Gene sind

unter anderen die Protoonkogene *K-Ras* (*v-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog*) und *c-MYC* (*v-myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog*) sowie die Tumorsuppressorgene *p53* und *DCC* (*Deleted in Colorectal Cancer*) (Calvert and Frucht, 2002).

Der Mutator-*Pathway* ist durch die genomweite Anhäufung von Mutationen gekennzeichnet (Kinzler and Vogelstein, 1997; Lengauer *et al.*, 1998). Dieser Mutator-Phänotyp liegt in dem funktionellen Ausfall des *DNA-Mismatch-Reparatur-Systems* (MMR-System) begründet. Die Produkte der Gene des MMR-Systems (*MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, *PMS1*, *MSH3*, *MSH6*) erhalten die Integrität des Genoms, indem sie Basenfehlpaarungen im DNA-Doppelstrang beseitigt werden, die während der DNA-Replikation entstanden sind (Fishel *et al.*, 1993; Bronner *et al.*, 1994). Nicht reparierte Basenfehlpaarungen können Mutationen in Protoonkogenen oder Tumorsuppressorgenen hervorrufen, welche die Adenom-Karzinom-Sequenz vorantreiben.

Ein Merkmal der Tumoren des Mutator-Phänotyps sind Längenverschiebungen in verschiedenen sogenannten Mikrosatelliten. Mikrosatelliten sind sich in Tandem wiederholende, repetitive DNA-Motive mit einer Länge von ein bis sechs Basen und finden sich häufig in intronischen und intergenischen Bereichen. Tumore des Mutator-Phänotyps mit Längenverschiebungen in den Mikrosatelliten werden als Mikrosatelliten-instabil (MSI) bezeichnet. Etwa 15 % der sporadischen CRC zeigen eine hochgradige Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H; wird im Folgenden als MSI bezeichnet), die auf dem Ausfall des *mismatch repair* Gens *MLH1* beruht. Bei den sporadischen CRC führen epigenetische Veränderungen in Form von DNA-Methylierungen des *MLH1*-Promotors zur transkriptionellen Blockierung der *MLH1*-Expression (Cunningham *et al.*, 1998; Raedle *et al.*, 2001). MSI ist aber auch ein Kennzeichen vom hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinom (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*; HNPCC) (Aaltonen *et al.*, 1993; Ionov *et al.*, 1993; Thibodeau *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995; Thibodeau *et al.*, 1998).

HNPCC, auch Lynch-Syndrom genannt, betrifft etwa 3 % aller CRC und ist damit die häufigste Form von erblichen CRC mit einer circa 80%igen Penetranz (Vasen *et al.*, 1996; Umar *et al.*, 2004b). Charakteristisch für HNPCC ist das frühe Auftreten von überwiegend rechtsseitig lokalisierten CRC, das Auftreten von syn- und metachronen kolorektalen Karzinomen sowie von Karzinomen anderer Organlokalisationen, vor allem in Endometrium, Nierenbecken/ableitenden Harnwegen, Dünndarm, aber auch in Magen, Ovarien, Gallengang, Gehirn und Haut (Watson and Lynch, 1994; Boland *et al.*, 1998; Aarnio *et al.*, 1999).

Auch bei HNPCC entsteht der Tumor über eine Adenom-Karzinom-Sequenz, wobei im Vergleich zu den sporadischen Kolonkarzinomen die Adenome früher und häufiger vorkommen und diese eine deutlich aggressivere und schnellere Tumorprogression aufweisen (Lynch *et al.*, 1966; Jass and Stewart, 1992; Jass, 1995; Lynch and Smyrk, 1996; Lynch, 1999; Lynch *et al.*, 2006). HNPCC beruht auf einer inaktivierenden Keimbahnmutation in einem MMR-Gen, die autosomal-dominant vererbt wird, wobei Mutationen in *MLH1* und *MSH2* am häufigsten sind (Fishel *et al.*, 1993; Leach *et al.*, 1993; Bronner *et al.*, 1994; Papadopoulos *et al.*, 1994; Vasen *et al.*, 1996; Lynch and de la Chapelle, 2003).

Da HNPCC eine der häufigsten erblichen Krebserkrankungen überhaupt darstellt, ist die HNPCC-Diagnostik von herausragender Bedeutung. Einen ersten starken Hinweis auf HNPCC gibt eine positive Familienanamnese. Die klinische Diagnose ist durch die 1991 eingeführten Amsterdam-Kriterien definiert (Vasen *et al.*, 1991). Die klassischen Amsterdam I-Kriterien umfassen nur CRC, während die Amsterdam II-Kriterien auch extrakolonische Tumore einschließen (Vasen *et al.*, 1999):

Amsterdam I-Kriterien (Vasen *et al.*, 1991)

(alle Kriterien müssen erfüllt sein)

- mindestens drei Familienangehörige mit histologisch gesichertem kolorektalem Karzinom
- einer davon Verwandter ersten Grades der beiden anderen
- Erkrankungen in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Generationen
- mindestens ein Patient mit der Diagnose des kolorektalen Karzinoms vor dem 50. Lebensjahr
- Ausschluss einer familiären adenomatösen Polyposis

Amsterdam II-Kriterien (Vasen *et al.*, 1999)

(alle Kriterien müssen erfüllt sein)

- mindestens drei Familienangehörige mit HNPCC-assoziiertem Karzinom (Kolon/ Rektum, Endometrium, Dünndarm, Nierenbecken/Ureter)
- einer davon Verwandter ersten Grades der beiden anderen
- Erkrankungen in mindestens zwei aufeinanderfolgenden Generationen
- mindestens ein Patient mit der Diagnose eines Karzinoms vor dem 50. Lebensjahr
- Ausschluss einer familiären adenomatösen Polyposis

Da nicht alle Familien mit nachgewiesener Keimbahnmutation, vor allem Kleinfamilien, die sehr strengen Amsterdam-Kriterien erfüllen, wurden die Bethesda-Kriterien definiert (Rodriguez-Bigas *et al.*, 1997) und 2004 überarbeitet (Umar *et al.*, 2004a). Zur Erhärtung des Verdachts für

HNPCC werden bei positiven Bethesda-Kriterien auch eine MSI-Analyse und immunhistochemische Untersuchungen der MMR-Genprodukte von *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* und *PMS6* gefordert. Die Feststellung von MSI-H zieht die Mutationssuche in den MMR-Genen nach sich. Dabei können die immunhistochemischen Untersuchungen der MMR-Proteine Hinweise auf das mutierte MMR-Gen liefern. Bei CRC Patienten, die keine Amsterdam-Kriterien erfüllen, bestätigt erst der Nachweis einer Keimbahnmutation die Verdachtsdiagnose HNPCC. Wird bei einer Mutationssuche eine pathogene Mutation detektiert, kann eine prädiktive Mutationstestung bei den direkten Verwandten des Patienten durchgeführt werden. Die Prognose von Mutationsträgern kann durch engmaschige Untersuchungen und Präventionen stark verbessert werden, und im Gegenzug können Familienmitglieder mit negativer Mutationstestung von den Präventionsmaßnahmen ausgeschlossen werden.

Überarbeitete Bethesda-Kriterien (Umar *et al.*, 2004a)

(mindestens ein Kriterium muss erfüllt sein)

- Amsterdam-Kriterien positiv
- Patienten mit kolorektalem Karzinom vor dem 50. Lebensjahr.
- Patienten mit synchronen oder metachronen kolorektalen Karzinomen oder anderen HNPCC-assoziierten Tumoren*, unabhängig vom Alter.
- Patienten mit kolorektalem Karzinom mit MSI-H Histologie** vor dem 60. Lebensjahr.
- Patient mit kolorektalem Karzinom (unabhängig vom Alter), der einen Verwandten 1. Grades mit einem kolorektalen Karzinom oder einem HNPCC-assoziierten Tumor vor dem 50. Lebensjahr hat.
- Patient mit kolorektalem Karzinom (unabhängig vom Alter), der mindestens zwei Verwandte 1. oder 2. Grades hat, bei denen ein kolorektales Karzinom oder ein HNPCC-assoziiertes Tumor (unabhängig vom Alter) diagnostiziert wurde.

*zu den HNPCC-assoziierten Tumoren gehören Tumoren in: Kolorektum, Endometrium, Magen, Ovarien, Pankreas, Ureter oder Nierenbecken, Gallengang, Dünndarm und Gehirn (meist Glioblastome) sowie Talgdrüsenadenome und Keratoakanthome.

** Vorliegen von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten, Crohn-ähnlicher lymphozytärer Reaktion, muzinöser/Siegelring-Differenzierung, oder medullärem Wachstumsmuster.

Neben den fehlregulierten MMR-Genen bei den MSI CRC werden in Tumoren verschiedenste weitere Gene differentiell exprimiert. Einige dieser Gene, haben entscheidende biologische Funktionen und sind mit wichtigen klinisch-pathologischen Eigenschaften verknüpft. Die

Analysen von Genen, die im Tumor differentiell exprimiert werden, können neue Onkogene und Tumorsuppressorgene ans Tageslicht bringen, die einerseits zum grundlegenden Verständnis der Tumorbiologie beitragen und zum anderen auch vielversprechende Ziele neuer Therapien darstellen können.

Durch Vorarbeiten, in denen systematisch die Genexpressionsprofile von MSI und MSS kolorektaler Tumore mittels Affymetrix-Array-Technologie untersucht wurden, konnten bereits eine Reihe MSI- und MSS-tumorspezifischer Kandidatengene identifiziert werden (Dietmaier, unveröffentlicht). Eines dieser vielversprechenden Gene ist Maspin, das Gegenstand dieser Dissertation ist.

Das Gen *SERPINB5* (*serin proteinase inhibitor clade B member 5*) kodiert Maspin (*mammary serin proteinase inhibitor*), ein Protein von 42 kDa und 375 Aminosäuren. Maspin gehört zur Familie der Serin-Proteaseinhibitoren, weist aber als einziges Mitglied dieser Familie keine inhibitorische Aktivität auf (Pemberton *et al.*, 1995). Lokalisiert ist Maspin auf Chromosom 18q21.3-q23, einer Region, die neben den Tumorsuppressorgenen *PAI-2* (*plasminogen activator inhibitor-2*), *DCC* (*deleted in colorectal carcinoma*) und *DPC4* (*deleted in pancreatic carcinoma*; auch bekannt als *Smad4*) auch die Onkogene *BCL-2* (*B-cell leukaemia, chronic lymphatic, type 2*) und *SCCA1+2* (*squamous cell carcinoma antigene 1+2*) beherbergt. Im gesunden Gewebe ist die Maspinexpression auf die epithelialen Zellen von Brust, Prostata, Thymus, Hoden, Plazenta, Haut, Atemwege und Mund beschränkt (Pemberton *et al.*, 1997; Futscher *et al.*, 2002).

Untersuchungen an Mäusen bewiesen, dass Maspin für die Embryonalentwicklung essentiell ist, da *-/-* Maspin Knockout-Mäuse embryonal letal sind. In normalen Embryos wurde Maspin spezifisch im visceralen Endoderm exprimiert. Der homozygote Maspinverlust verhinderte bei den Embryos die Formierung der endodermalen Zellschicht und bewirkte das Fehlen einer Basalmembran (Gao *et al.*, 2004).

Mittlerweile gibt es über 300 Veröffentlichungen mit Fokus auf Maspin. In diesen wurde von sehr vielfältigen, verschiedenen Eigenschaften, Funktionen und Korrelationen berichtet, die teilweise in starkem Widerspruch zueinander stehen. Ein Teil der Autoren sieht Maspin als ein Tumorsuppressorgen, während andere viele Indizien liefern, die Maspin vielmehr als ein Onkogen erscheinen lassen.

Entdeckt wurde Maspin ursprünglich in Brust-Epithelzellen, die Maspin exprimierten, während die Maspinexpression in den entsprechenden Tumoren verloren gegangen war (Sager *et al.*, 1994). Aufgrund des Expressionsverlustes in den Brusttumoren wurde davon ausgegangen, dass Maspin ein Tumorsuppressorgen sei. Diese Vermutung wurde zunächst durch weitere Untersuchungen gestärkt, die verschiedene tumorsuppressive Eigenschaften von Maspin beschrieben: Maspinexpression reduzierte in der Brustkarzinom-Zelllinie MDA-MB-435 *in vivo* die Tumor- und Metastasenbildung und hemmte *in vitro* die Invasivität der Zellen durch eine künstliche Basalmembran (Zou *et al.*, 1994). Diese Reduktion der Invasivität wurde *in vitro* bei Mammakarzinom-Zelllinien auch durch Zugabe von geringen Mengen rekombinanten Maspin erreicht, während der Invasions-hemmende Effekt des rekombinanten Maspins ab Konzentrationen von 0,17 μM wieder abnahm (Sheng *et al.*, 1994). Die Inhibition der Invasion und Migration durch Maspin wurde neben Brust- auch für Prostatakarzinom-Zelllinien mit aktivierter Maspinexpression gezeigt (Sheng *et al.*, 1996).

Diese Inhibition der Motilität und Invasivität wurde aufgrund von Deletionsversuchen mit einer exponierten reaktiven Seitenkette (siehe Pfeil in Abb. 1.3 auf folgender Seite) in Verbindung gebracht (Sheng *et al.*, 1994; Ngamkitidechakul *et al.*, 2003).

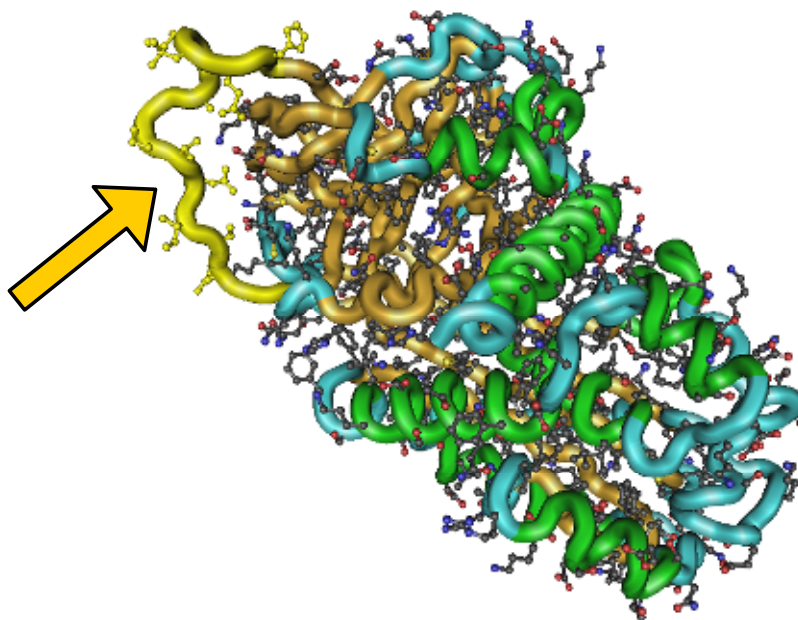


Abb. 1.3: Struktur eines Maspinmoleküls. Der Pfeil zeigt auf die gelb eingefärbte reaktive Seitenkette; (Law *et al.*, 2005).

Als weitere tumorsuppressive Wirkung von Maspin wurde dessen anti-angiogenetische Wirkung *in vitro* und *in vivo* beschrieben: Dabei inhibierte Maspin *in vitro* die Migration von Endothelzellen in Richtung BFGF (*basic fibroblast growth factor*) und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und blockierte die Gefäßbildung in der Hornhaut von Ratten (Zhang *et al.*, 2000). In Nacktmäuse injizierte, Maspin-transfizierte DU145 Prostatakarzinom-Zellen produzierten Tumore mit geringerer Gefäßdichte (Cher *et al.*, 2003). In Kehlkopf-Tumoren wurde Maspinexpression ebenfalls mit geringerer Gefäßdichte korreliert (Marioni *et al.*, 2006).

Hohe Maspinexpression wurde in Tumoren von verschiedenen Organen mit guter Prognose korreliert (Maass *et al.*, 2001a; Maass *et al.*, 2001b; Yasumatsu *et al.*, 2001; Boltze *et al.*, 2003a; Boltze, 2005; Marioni *et al.*, 2005; Beecken *et al.*, 2006; Katakura *et al.*, 2006; Lonardo *et al.*, 2006; Nakagawa *et al.*, 2006; Secord *et al.*, 2006). Berichte von tumorassoziierter Reduktion der Maspinexpression und tumorsuppressiven Eigenschaften von Maspin sind in Tabelle 1.1 auf folgender Seite zusammengefasst.

Gewebe	Referenz	Bemerkung
Brust	(Seftor <i>et al.</i> , 1998)	M inhibiert die Invasivität von Brustkarzinom-Zelllinien
Brust	(Shi <i>et al.</i> , 2001)	ME sinkt von No zu Tu; Maspin zeigt tumorsuppressive Aktivitäten von transfizierten Brustkarzinomzelllinien in Nacktmäusen
Brust	(Maass <i>et al.</i> , 2001a)	Geringere ME korreliert mit Fernmetastasen und kürzeren DFS
Brust	(Hojo <i>et al.</i> , 2001)	ME korreliert mit geringerem Grad der Malignität und geringerer Vaskularisierung
Brust	(Maass <i>et al.</i> , 2001b)	Verlust der ME ist mit Tumorprogression assoziiert
Brust	(Shi <i>et al.</i> , 2002)	Maspin zeigt tumorsuppressive Aktivitäten von transfizierten Brustkarzinomzelllinien in Nacktmäusen
Brust	(Jiang <i>et al.</i> , 2002)	M sensibilisiert Brustkarzinomzelllinien für induzierte Apoptose
Brust	(Sopel <i>et al.</i> , 2005)	ME korreliert mit geringerer Gefäßdichte
Haut	(Denk <i>et al.</i> , 2007)	Verlust der ME in Melanomen, M verringert Invasivität von Melanom-Zelllinien
Harnblase	(Beecken <i>et al.</i> , 2006)	CA-spezifische M Inaktivierung; geringe ME korreliert mit schlechter Prognose
Kehlkopf	(Marioni <i>et al.</i> , 2005)	Hohe nukleäre ME korreliert mit guter Prognose
Kolon	(Song <i>et al.</i> , 2002)	No M-positiv, Tu M-negativ, Maspinexpression korreliert mit geringerer MVD
Kolon	(Boltze, 2005)	Geringe ME korreliert mit schlechter Prognose
Kolon	(Zheng <i>et al.</i> , 2007)	Inverse Korrelation von ME mit Lebermetastasen
Lunge	(Katakura <i>et al.</i> , 2006)	Hohe ME korreliert mit guter Prognose in NSCLC
Lunge	(Nakagawa <i>et al.</i> , 2006)	Hohe ME korreliert mit guter Prognose in NSCLC
Lunge	(Lonardo <i>et al.</i> , 2006)	Alleinige Lokalisation von M im Zytoplasma korreliert mit guter Prognose in NSCLC
Magen	(Wang <i>et al.</i> , 2004)	No M-positiv, Tu M-negativ, Verlust der ME korreliert mit aggressivem Tumorwachstum
Magen	(Ito <i>et al.</i> , 2004a)	No M-positiv, Tu M-negativ
Magen	(Zheng <i>et al.</i> , 2004)	No M-positiv, Tu M-negativ
Niere	(Blandamura <i>et al.</i> , 2006)	ME korreliert mit geringerer Metastasierung
Ovar	(Secord <i>et al.</i> , 2006)	Geringe ME korreliert mit schlechter Prognose
Ovar	(Surowiak <i>et al.</i> , 2006)	Hohe ME indiziert gutes Ansprechen auf Cisplatin, geringe ME korreliert mit schlechtem Ansprechen, nukleäre ME indiziert sehr gutes Ansprechen
Prostata	(Cher <i>et al.</i> , 2003)	Hohe ME reduziert Tumorwachstum, Metastasierung und Osteolyse
Speicheldrüse	(Navarro Rde <i>et al.</i> , 2004)	No M-positiv, Tu M-negativ
Schilddrüse	(Boltze <i>et al.</i> , 2003a)	ME korreliert mit guter Prognose
Schilddrüse	(Boltze <i>et al.</i> , 2003b)	Aktivierung der ME nur im papillären Schilddrüsen CA
Zunge	(Yasumatsu <i>et al.</i> , 2001)	ME korreliert mit guter Prognose und weniger Lymphknotenmetastasen

Tab. 1.1: Berichte von tumorassoziierter Reduktion der Maspinexpression und tumorsuppressiven Eigenschaften von Maspin. CA: Karzinom, MVD: Gefäßdichte (*microvessel density*), No: Normalgewebe, Tu: Tumor, NSCLC: *non small cell lung cancer*, M: Maspin, ME: Maspinexpression, DFS: krankheitsfreies Überleben (*disease free survival*).

Diesen Berichten von tumorsuppressiven Eigenschaften steht eine steigende Zahl von Untersuchungen gegenüber, in denen Maspin eher die Eigenschaften eines Onkogenes zeigt. Inhaltlich stehen viele Veröffentlichungen, die Expression, Eigenschaften und Auswirkungen von Maspin in den jeweiligen Geweben beschreiben, in direktem Widerspruch zueinander.

So wurde die Aktivierung und Überexpression in Tumoren von Brust, Endometrium, Harnblase, Haut, Magen, Ovar, Pankreas, Kolon und Schilddrüse festgestellt (Son *et al.*, 2002; Sood *et al.*, 2002; Akiyama *et al.*, 2003; Fitzgerald *et al.*, 2003; Ohike *et al.*, 2003; Umekita and Yoshida, 2003; Ito *et al.*, 2004a; Ito *et al.*, 2004b; Ogasawara *et al.*, 2004; Abd El-Wahed, 2005; Bettstetter *et al.*, 2005; Terashima *et al.*, 2005; Dietmaier *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Murai *et al.*, 2006; Rose *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2006; Umekita *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Zheng *et al.*, 2007).

Die in neueren Berichten immer häufiger beschriebene Korrelation von hoher Maspinexpression mit besonders aggressivem Tumorwachstum, starker Dedifferenzierung und schlechter Prognose, steht ebenfalls im Widerspruch zu einem Tumorsuppressorgen (Sood *et al.*, 2002; Umekita *et al.*, 2002; Umekita and Yoshida, 2003; Ito *et al.*, 2004b; Lim *et al.*, 2004; Ogasawara *et al.*, 2004; Sugimoto *et al.*, 2004; Abd El-Wahed, 2005; Bettstetter *et al.*, 2005; Hirai *et al.*, 2005; Terashima *et al.*, 2005; Dietmaier *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2006; Nakashima *et al.*, 2006; Cao *et al.*, 2007; Mhaweck-Fauceglia *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007). Die Berichte von tumorassoziierter Maspinexpression und onkogenen Eigenschaften von Maspin sind in Tab. 1.2 auf folgender Seite zusammengefasst.

Gewebe	Referenz	Bemerkung
Brust	(Ballestrero <i>et al.</i> , 2001)	Disseminierte Brust CA Zellen sind durch ME im Knochenmark detektierbar
Brust	(Umekita <i>et al.</i> , 2002)	Hohe ME korreliert mit schlechter Prognose
Brust	(Umekita and Yoshida, 2003)	ME wird in CA aktiviert und korreliert mit hoher Invasivität, Tumorgroße und Dedifferenzierung
Brust	(Lee <i>et al.</i> , 2006)	Maspin-Überexpression in CA; ME korreliert mit hoher Invasivität, Tumorgroße, Dedifferenzierung und schlechter Prognose
Endometrium	(Murai <i>et al.</i> , 2006)	Tumorspezifische ME
Endometrium	(Li <i>et al.</i> , 2007)	Maspin-Überexpression in CA
Gallenblase	(Maesawa <i>et al.</i> , 2006)	Aktivierung der ME beim Vorhandensein intestinaler Metaplasien
Harnblase	(Sugimoto <i>et al.</i> , 2004)	Maspin-Überexpression in CA; ME korreliert mit Muskelinvasion
Haut	(Reis-Filho <i>et al.</i> , 2002)	Maspin-Überexpression in CA
Haut	(Wada <i>et al.</i> , 2004)	Einige Melanome und Melanomzelllinien zeigen Maspin-Überexpression
Kolon	(Bettstetter <i>et al.</i> , 2005)	Maspin-Überexpression in CA; ME korreliert mit MSI und undifferenzierten Tumoren, starke nukleäre ME in Tumorzellen der Invasionsfront
Kolon	(Umekita <i>et al.</i> , 2006)	Maspin-Überexpression in CA; ME korreliert mit aggressivem Tumorwachstum
Kolon	(Zheng <i>et al.</i> , 2007)	Steigende ME in der Adenom-Karzinom-Sequenz
Kolon	(Dietmaier <i>et al.</i> , 2006)	Nukleäre ME korreliert mit schlechter Prognose, aber mit gutem Ansprechen auf 5-FU
Lunge	(Woenckhaus <i>et al.</i> , 2007)	Starke nukleäre ME in NSCLC
Lunge	(Hirai <i>et al.</i> , 2005)	Maspin-Überexpression in NSCLC; ME korreliert mit schlechter Prognose
Magen	(Son <i>et al.</i> , 2002)	Maspin-Überexpression in Adenokarzinomen und in Epithelzellen mit intestinalen Metaplasien
Magen	(Akiyama <i>et al.</i> , 2003)	ME wird in CA aktiviert; normale Mucosa ist nur in Assoziation mit intestinalen Metaplasien M-positiv
Magen	(Terashima <i>et al.</i> , 2005)	Maspin-Überexpression in CA; ME korreliert mit Lymphknotenmetastasen
Magen	(Yu <i>et al.</i> , 2007)	ME korreliert mit Metastasen, Invasionstiefe, TNM-Stadium und schlechter Prognose
Ovar	(Solomon <i>et al.</i> , 2006)	Maspin-Überexpression in CA; Kernlokalisierung korreliert mit besserer Prognose und geringerer MVD; zytoplasmatische Lokalisierung korreliert mit schlechter Prognose
Ovar	(Sood <i>et al.</i> , 2002)	Maspin-Überexpression in CA; ME korreliert mit schlechter Prognose und geringer Differenzierung
Ovar	(Rose <i>et al.</i> , 2006)	Aktivierung der ME in CA, Normalgewebe ist M-negativ
Ovar	(Abd El-Wahed, 2005)	ME korreliert mit Metastasenbildung, schlechter Prognose und hohem Tumor-Grade
Pankreas	(Ohike <i>et al.</i> , 2003)	Aktivierung der ME in CA, Normalgewebe ist M-negativ
Pankreas	(Fitzgerald <i>et al.</i> , 2003)	Aktivierung der ME in CA, Normalgewebe ist M-negativ
Pankreas	(Lim <i>et al.</i> , 2004)	ME korreliert mit schlechter Prognose und hohem Tumor- Stadium
Pankreas	(Cao <i>et al.</i> , 2007)	ME ist ein Marker für schlechte Prognose
Speicheldrüse	(Nakashima <i>et al.</i> , 2006)	Maspin-Überexpression in CA korreliert mit hohem Tumor- Stadium
Schilddrüse	(Ito <i>et al.</i> , 2004b)	Maspin-Überexpression in CA, ME korreliert mit aggressivem Wachstum, hohem Tumor-Stadium und hoher Invasivität
Schilddrüse	(Ogasawara <i>et al.</i> , 2004)	Maspin-Überexpression in CA, ME korreliert mit undifferenzierten Tumoren
Kopf und Hals	(Mhaweck-Fauceglia <i>et al.</i> , 2007)	Maspin-Überexpression in CA korreliert mit schlechter Prognose

Tab. 1.2: Berichte von tumorassoziierter Maspinexpression und onkogenen Eigenschaften von Maspin. CA: Karzinom, MVD: Gefäßdichte (*microvessel density*), No: Normalgewebe, Tu: Tumor, NSCLC: *non small cell lung cancer*, M: Maspin, ME: Maspinexpression, 5-FU: 5-Fluoruracil.

In Tumoren beruht die Fehlregulation von Genen häufig auf epigenetischen Veränderungen durch die DNA-Methylierung von Promotoren (Robertson and Wolffe, 2000; Jones and Baylin, 2002; Plass, 2002). Die DNA-Methylierung betrifft nur die Cytosine der CpG-Dinukleotide, wobei die Cytosine zu 5-methyl-Cytosinen methyliert werden. Diese CpG-Dinukleotide sind im Genom unterrepräsentiert, akkumulieren jedoch am Promotorbereich von Genen an sogenannten CpG-Inseln. Ist der Promotor hypermethyliert, wird die Transkription des zugehörigen Gens blockiert, da Transkriptionsfaktoren nicht mehr an den methylierten Promotor binden können. So können wichtige Tumorsuppressorgene durch Promotormethylierung inaktiviert werden, obwohl die Gene mutationsfrei und intakt vorliegen (Greger *et al.*, 1994; Dobrovic and Simpfendorfer, 1997).

Neben den molekularbiologischen Untersuchungen von Maspin war auch die differentielle Expression von *MLH1* Gegenstand dieser Arbeit. Die Expression dieses MMR-Genes wird spezifisch in sporadischen MSI CRC durch eine Promotorhypermethylierung inhibiert, während bei HNPCC Keimbahnmutationen zum MLH1-Ausfall führen (Aaltonen *et al.*, 1993; Ionov *et al.*, 1993; Thibodeau *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1995; Kane *et al.*, 1997; Thibodeau *et al.*, 1998).

Ein weiteres Ziel epigenetischer Untersuchungen war das DNA-Reparaturgen *MGMT* (6-O-Methylguanine-DNA Methyltransferase) und das Tumorsuppressorgen *P16* (*P16^{INK4A}*; *CDKN2A*, *Cyclin-dependent kinase inhibitor-2A*). Das Genprodukt von *MGMT* entfernt Methylgruppen von der O6-Position des Guanins und trägt so zum Erhalt der Integrität des Genoms bei (Graves *et al.*, 1987; Gonzaga and Brent, 1989; Souliotis *et al.*, 1991). P16 bindet an die Cyclin-abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 und inhibiert dadurch die Aktivierung von Cyclin D, was zu einem Anhalten des Zellzyklusses in der G1-Phase führt. Der Ausfall von P16 führt daher zu beschleunigter Proliferation (Bruce *et al.*, 2000).

2 Zielsetzung

Diese Dissertation sollte erstmals vertiefte Einblicke in Expression, Regulation, Funktion und Bedeutung von Maspin im kolorektalen Karzinom gewähren und dazu beitragen, ein klareres Bild von diesem Protein und dessen vielfältigen Wirkungen zu gewinnen.

Dazu sollte die Maspinexpression mit verschiedenen, unabhängigen RNA-, DNA- und Protein-Analysemethoden an einer von gut charakterisierten CRC und in CRC-Zelllinien untersucht werden.

Mit Hilfe immunhistochemischer Untersuchungen von CRC sollten die Bedeutung von Expression, Lokalisation und Verteilung sowie deren Zusammenhänge mit dem Krankheitsverlauf analysiert werden.

Für funktionelle Untersuchungen *in vitro* sollte Maspin in verschiedenen CRC-Zelllinien einerseits überexprimiert und andererseits supprimiert werden, um mittels *in vitro*-Assays die Einflüsse der Maspinexpression auf tumorrelevante Vorgänge wie Invasion, Proliferation, Adhäsion und Chemosensitivität analysieren zu können.

Die Herstellung von rekombinantem Maspin sollte Proteininteraktionsstudien ermöglichen und *in vitro* den Einfluss von Maspin auf die Invasivität von CRC-Zelllinien klären.

Sequenzanalysen von Tumoren, Normalgeweben und Zelllinien sollten Hinweise auf funktionell relevante Mutationen liefern, die z. B. zur Entstehung eines Kernlokalisationssignals führen.

Die Regulation der Maspinexpression im normalen Kolon, in CRC und in CRC-Zelllinien sollte mit Hilfe von Methylierungsanalysen studiert werden.

Durch die Etablierung neuer Methoden zur quantitativen DNA-Methylierungsanalyse sollte die Untersuchung weiterer tumorrelevanter Gene wie *P16*, *MGMT* und *MLH1* ermöglicht werden, um Rückschlüsse auf molekulare Pathomechanismen abzuleiten und um zwischen pathophysiologisch verschiedenen Tumoren unterscheiden zu können.

Da bisher unklar war, wie hoch der Grad der Promotormethylierung des *mismatch-repair*-Gens *MLH1* in sporadischen CRC und in HNPCC ist, sollte dieser mit Hilfe neuer quantitativer Methoden zur Methylierungsanalyse bestimmt werden.

Mittels quantitativer Methylierungsanalysen der Gene *P16* und *MGMT* sollten deren Methylierungen in MSS und in MSI CRC verglichen werden um festzustellen, ob und in welchem Ausmaß Promotormethylierungen auch in den meist chromosomal instabilen MSS CRC eine Rolle spielen.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Allgemeine Materialien

Applied Biosystems, Californien, USA	ABI PRISM BigDye™ TerminatorCycle Sequencing Kit (Premix), Template Suppression Reagent
BD Biosciences, Bedford, USA	Matrigel™, anti-Maspin Antikörper (Klon G167-70)
BD Discovery Labware Falcon™,	Einmalartikel für Labor und Zellkultur,
BioRad, Richmond, USA	Immun- Blot™ PVDF Membran, Poly-Prep® Chromatographie Säulen
Biozym, Hess	Agarose, dNTPs, Pipettenspitzen
Carl Zeiss, München-Hallbergmoos	AxioCam, MR Grab Software
Fermentas, Burlington, Kanada	Restriktionsendonukleasen, Taq DNA Polymerase, RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, T4 DNA Ligase, Ribonuclease A (RNase A), Deoxyribonuclease I (DNase I), DNA Loading Dye (6x), PageRuler™ Prestained Protein Ladder
GE Healthcare, Piscataway, USA	Protein G Sepharose
Genra, Minneapolis, USA	Purgene™ DNA Tissue Kit, Purgene™ DNA Blood Kit,
Invitrogen, Carlsbad, USA	Lipofectamine PLUS™ Reagent, Lipofectamine™ Reagent, Ready-Load™ 100 bp DNA Ladder und 25 bp DNA Ladder, pcDNA3 Vektor, pcDNA3.1, Geneticin, TRIZOL™
Merck, Darmstadt	Silbernitrat, Coomassie® Brilliant Blue R-250, Bromphenolblau, ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit
Millipore, Eschborn	Einmal-Sterilfilter, Amicon Microcon YM-30 Ultrafilter
New England Biolabs GmbH, Frankfurt	SssI-Methyltransferase
PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	Dulbeccos Modified Eagle Medium, Fötale Kälberserum, Trypsin, PBS (<i>phosphate buffered saline</i>)
Pierce, München	BCA Protein Assay Kit
Qiagen, Hilden	Plasmid Mini Kit, Hs_SERPINB5_1 HP siRNA, Hs_SERPINB5_3 HP siRNA, HiPerFect Transfektionsreagens, RNeasy® Mini Kit, QIAquick® Gel Extraction Kit, MinElute® PCR Purification Kit, QuantiTect® SYBR Green PCR Kit, pQE-TriSystem His-Strep 1 Vektor, Ni-NTA-Agarose, Strep-Tactin Superflow®
Roche Diagnostics, Mannheim	LightCycler® DNA Master ^{plus} SYBR Green Kit, Primer 'random' (#1034731), LightCycler® Capillaries, Proteinase Inhibitor Cocktail, XTT Proliferation Kit, Ampicillin, High Pure PCR Template Kit, Lysozym
Roth, Karlsruhe	Rotiphorese® 40 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1), Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
Sigma, St. Louis, USA	BSA (bovine serum albumin), TEMED, Monoclonal anti-β-Actin Antikörper, 5-FU, Desthiobiotin, alle nicht aufgeführten Chemikalien in p.a. Qualität
Metabion, Martinsried	Oligonukleotide
Stratagene, Heidelberg	Epicurian Coli® XL2-Blue MRF' Ultracompetent Cells

Vector Laboratories, Burlingame, USA
 Whatman, Maidstone, England

Zymed, San Francisco, USA
 ZYMO Research, Orange, Kanada

Vectashield Mounting Medium with DAPI
 Whatman 3MM Filterpapier, Nucleopore® Track- Etch Membrane
 BCIP/NBT Substrate Kit
 EZ DNA Methylation Kit™

3.1.2 Geräte

Autoklaven

Tuttnauer/Systec, Wetzlar

Tischautoklav Modell 2540EL,
 Autoklav 2540 EK

Blotapparaturen

Whatman Biometra, Göttingen

Western-Blot-Apparatur Fastblot B34

Brutschränke

Heraeus, Hanau

Zellinkubator CO₂-Auto-Zero,
 Begasungsbrutschrank BB6220,
 CO₂-Inkubator HeraCell 240

Gelelektrophoreseapparaturen

BioRad, München

Wide Mini Sub® Cell GT
 Mini PROTEAN® 3 Cell

Heizblöcke

Eppendorf, Hamburg

Thermomixer compact

Mikroskope

Zeiss, Jena

Axiovert 10, Axiovert S100, Axio Imager.Z1

Spannungsgeräte

BioRad, München

PowerPac Basic, PowerPac HC

Sterilwerkbanken

Heraeus, Hanau

LaminAir HB 2448, HeraSafe KS18

Thermocycler

MJ Research, Waltham, USA
 Roche Diagnostics, Mannheim

Peltier Thermal Cycler PTC- 200,
 LightCycler II, RelQuant 1.0 Software

Waagen

Sartorius, Göttingen

R160P, L2200S

Zentrifugen

Eppendorf, Hamburg
 Heraeus, Hanau
 Roche Diagnostics, Mannheim

Centrifuge 5415 D, Centrifuge 5415 R
 Biofuge 13, Biofuge 22R, Megafuge 1.0, Varifuge 3.2RS
 LC Carousel Centrifuge

Sonstige Geräte

Applied Biosystems, Foster City,
 Californien, USA
 Bachofer, Reutlingen
 Bandelin, Berlin

ABI PRISM™ 310 Genetic Analyser
 ABI PRISM™ 3100 Genetic Analyser
 UV-Transilluminator IL 350 K, 254 nm
 SONOPULS Ultraschall-Homogenisator HD2070, MS 72
 Mikrospritze aus Titan
 FACSCalibur, CellQuest Software
 Magnetrührer MR 2000, MR 2002,
 Vortexer MS2 Minishaker
 ELISA-Reader Emax,
 Geldokumentationssystem 2001i
 CASY® Model DT
 pH-Meter pH522
 Stabhomogenisator 40/E

BD Biosciences, San Jose, USA
 Heidolph, Kehlheim
 IKA-Labortechnik, Staufen
 MWG Biotech, Ebersberg

Schärfe System GmbH
 WTW, Weilheim
 Xenox, Niersbach

3.1.3 Bakterien, Zelllinien und Vektoren

3.1.3.1 Bakterien

Epicurian Coli® XL2- Blue MRF' Ultracompetent *Escherichia Coli*

3.1.3.2 Humane CRC und CRC-Zelllinien

Der Großteil der CRC stammte vom Institut für Pathologie der Universität Regensburg. Zusätzlich wurden einige CRCs der Pathologischen Institute der Ludwigs-Maximilians-Universität München und der Technischen Universität München untersucht.

Die verwendeten humanen CRC-Zelllinien stammten vom ATCC.

Zelllinie	Herkunft	Literatur
SW48	kolorektales Adenokarzinom (<i>Grade IV</i>)	(Chen <i>et al.</i> , 1983)
LoVo	kolorektales Adenokarzinom (<i>Grade IV</i>)	(Drewinko <i>et al.</i> , 1978)
HCT116	kolorektales Karzinom	(Schroy <i>et al.</i> , 1995)
HT29	kolorektales Adenokarzinom	(von Kleist <i>et al.</i> , 1975)
SW480	kolorektales Adenokarzinom	(Leibovitz <i>et al.</i> , 1976)
CaCo-2	kolorektales Adenokarzinom	(Fogh <i>et al.</i> , 1977)

3.1.4 Vektoren

3.1.4.1 pcDNA3.1

Der pcDNA3.1 Vektor (Invitrogen, Carlsbad, USA) wird zur Expression von Genen unter Kontrolle des CMV-Promotors in Säugerzelllinien benutzt.

3.1.4.2 pQE-TriSystem His-Strep 1

Der pQE-TriSystem His-Strep 1 Vektor (Qiagen, Hilden) wurde zur Herstellung von rekombinantem Protein verwendet. Der Vektor besitzt Promotoren für *E. coli*, Insektenzellen, und Säugerzellen. Die rekombinanten Proteine tragen am N-Terminus einen 8x His-Tag und einen Strep-Tag, die der Aufreinigung dienen.

Die erstellten Vektorkonstrukte werden in 4.2.7.1.1, 4.2.7.2.1 und in 4.2.11.1 eingehend behandelt.

3.1.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden fast ausschließlich mit Hilfe der Primer 3 Software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) selbst designed und von der Firma Metabion in Martinsried hergestellt. Die Schmelztemperatur (*Annealing*-Temperatur) der Primer betrug ~ 60°C. (F: *Forward*, R: *Reverse*)

3.1.5.1 Primer zur *real-time* PCR an cDNA

<u>Name</u>	<u>Sequenz (5' → 3')</u>
SERPINB5 F1	GTCCACAGGCTTGGAGAAGA
SERPINB5	ACAAGCCTTGGGATCAATCA
TAX F	GGGTTGGTATATTCAAGGTTGG
TAX R	CATTTGGAAGGTAATATCCTTGG
GAPDH F	CCACTTTGTCAAGCTCATTTC
GAPDH R	GGTCCAGGGGTCTTACTCCTT
Actin F	ACTCTTCCAGCCTTCCCTTCT
Actin R	GTGTTGGCGTACAGGTCTTTG
PITX2 F1	AGTCCGGGTTTGGTTCAAG
PITX2 R1	GGGTACATGTCGTCGTAGGG
Cy2B6 F2	GGGGCACTGAAAAAGACTGA
Cy2B6 R1	AGTTCTGGAGGATGGTGGTG
ACE2 F3	TGGAGTTGTGATGGGAGTGA
ACE2 R3	TCGATGGAGGCATAAGGATT
CDH3 F3	GGCAGTGGCAGTAGTGGAGA
CDH3 R3	AGTGACCGTCAGCCTCTGC
MMP1 F1	GGGAGATCATCGGGACAACCTC
MMP1 R1	GGGCCTGGTTGAAAAGCAT
MMP2 F1	TGATCTTGACCAGAATAACCATCGA
MMP2 R1	GGCTTGCGAGGGAAGAAGTT
MMP3 F1	TGGCATTTCAGTCCCTCTATGG
MMP3 R1	AGGACAAAAGCAGGATCACAGTT
MMP7 F1	GTGGTCACCTACAGGATCGTA
MMP7 R1	CTGAAGTTTCTATTTCTTTCTTGA
TIMP1 F1	CTTCTGGCATCCTGTTGTTG
TIMP1 R1	AGAAGGCCGTCTGTGGGT
TIMP2 F1	GCGGTCAGTGAGAAGGAAGTGG
TIMP2 R1	GGAGATGTAGCACGGGATCATGG
TIMP3 F1	CCAGGACGCCTTCTGCAAC
TIMP3 R1	CCTCCTTTACCAGCTTCTTCCC
TS F1	GCAAAGAGTGATTGACACCATCAA
TS R1	CAGAGGAAGATCTCTTGGATTCCAA
DPD F1	GATTCTGGCTACCAGGCTAT
DPD R1	CATAAGGTGTTGTCTGGAA
TP F1	TGGCTCAGTCGGGACAGCAG
TP R1	TCCGCTGATCATTGGCACCT

3.1.5.2 Sequenzierungsprimer

<u>Name</u>	<u>Sequenz (5' → 3')</u>
Masp E2 F1	GCAGAATGCAGTTGAGAAAGACG
Masp E2 R1	GGCACTGCCTATGGGTTCTAAT
Masp E3 F1	CACGTGTCCACTTCAGTACAGC
Masp E3 R1	TTGTAGGTCTAACAGCATGAAAATG
Masp E4 F1	TTGTTAGAAGAGAATAACAATGCAA
Masp E4 R1	TTATGAGATGGAAGGCCCTGTT
Masp E5 F1	TGTGAATTTTCAGATGTAGTTTGAA
Masp E5 R1	TTTCACTCAGCTCAGATCCTTGA
Masp E6 F1	TGCATGTGTAAATTGAAAAGTAA
Masp E6 R1	AGACCTGTTGGCACAACCTCTTT
Masp E7 F1	TTATGTTTTCAATTGAGCCAGGT
Masp E7 R1	GGATGCAGAGTTTACAGAAATCG
Masp Insert seq 1	TGCAAATGAAATTGGACAGG
pQE Tri	GTTATTGTGCTGTCTCATCATTTT
Masp Ins Seq 2	CAAAGGAATTGGAACTGTTGACT
Masp Ins Seq 3	CATGTTTCATCCTACTACCCAAGGA
Masp Ins Seq 4	TACCCAAGGATGTGGAGGAT
T7 F	GTAATACGACTCACTATAGGG
Masp-sense_screen	CAAGTGACAGAGAGGTGGAGA

3.1.5.3 Primer zur Herstellung von Vektorkonstrukten

<u>Name</u>	<u>Sequenz (5' → 3')</u>
pQE SmaI MS Forward	AACCCGGGGTATGGATGCCCTGCAACTAGC
pQE NotI MS Reverse	AAAGCGGCCGCTGCCACTGAAGGAGAACAGAAATTTG
Forward MS HindIII	CGCAAGCTTGCAATGGATGCCCTGCAACTAGC
Reverse MS EcoRI	GGAATTCCTTAAACATGGGCTATGCCACTT
Forward AS EcoRI	GGAATTCGTTCTTTTCCACGCATTTTC
Reverse AS HindIII	CGCAAGCTTGGGTCTCTTCGTAGAGCTGATG

3.1.5.4 Primer für Methylierungsanalysen

<u>Name</u>	<u>Sequenz (5' → 3')</u>
MASP meth F11	GAAATTTGTAGTGTATTATTATTATA
MASP meth R11	AAAAACACAAAAACCTAAATATAAAAA
MGMT1 Msdig F1	CCCGGATATGCTGGGACAG
MGMT1 Msdig R1	CCCAGACACTCACCAAGTCG
MLH1 prox MSdig F2	CGGCATCTCTGCTCCTATTG
MLH1 prox MSdig R2	TGCCCGCTACCTAGAAGGAT
MLH1 dist MSdig F2	AAGTCGCCCTGACGCAGAC
MLH1 dist MSdig R2	ACTACGAGGCTGAGCACGAA
MLH1Prox Flank f	TTTTAAAAAYGAATTAATAGGAAGAG
MLH1Prox Flank r	AAATACCAATCAAATTTCTCAACTC
MLH1Prox MS r	CGATTTTTTAACGCGTAAGC
MLH1Dist Flank f	GAGTGAAGGAGGTTAYGGGTAAGT
MLH1Dist Flank r	AACRATAAAACCTATACTAATCTATC
MLH1Dist MS f	GAACGACGAACGCGCG
P16 MSDIG F2	AGCACCGGAGGAAGAAAAGAG
P16 MSDIG R2	CTGCCTGCTCTCCCCCTCTC

3.1.6 short interfering RNAs (siRNAs)

Folgende siRNAs wurden von der Firma Qiagen, Hilden synthetisiert:

Hs_SERPINB5_1 HP, Hs_SERPINB5_3 HP und Neg._Controll_siRNA_AF488.

Die Sequenzen sind vom Hersteller nicht angegeben.

3.1.7 Medien, Puffer und Lösungen

3.1.7.1 Medien zur Anzucht von *E. coli* und Säugerzellkulturen

Luria Bertani (LB) Medium	10 g/l Trypton 5 g/l Hefeextrakt 10 g/l NaCl Für Platten: + 15 g/l Agar Zur Selektion: + 100 µg/ml Ampicillin
DMEM (Dulbeccos Modified Eagle Medium) PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach	
Zusätze:	10 % (v/v) FKS 13 mg/ml Geneticin (nur bei Transfekanden)
Low Serum Medium	DMEM 20 mM HEPES 0,5 % (v/v) FKS
Einfriermedium	Pro 100 ml: 50 ml DMEM (mit 10 % FKS) 30 ml FKS 20 ml DMSO

3.1.7.2 Puffer und Lösungen

Lösungen für die Zellkultur

PBS (*phosphate buffered saline*)

Lösungen für Agarose-Gelelektrophorese (DNA-Auftrennung)

TAE (50x)	2 M Tris/Acetat pH 8,0 50 mM EDTA
DNA-Agarosegel	1 - 3,5 % (w/v) Agarose gelöst in TAE (1x)
DNA-Gel-Ladepuffer (6x)	Loading Dye
Ethidiumbromidlösung	0,04 % (w/v) in H ₂ O bidest

Lösungen und Gele für SDS-PAGE (Proteinauftrennung)

SDS-PAGE-Laufpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,5 200 mM Glycin 0,1 % (w/v) SDS
10 % Trenngel	25 % (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid 40 % 37,5 % (v/v) 1 M Tris pH 8,8 0,1 % (v/v) SDS 0,05 % (v/v) Ammoniumpersulfat 0,05 % (v/v) TEMED

4 % Sammelgel
 10 % (v/v) Acrylamid:Bisacrylamid 40 %
 12 % (v/v) 1 M Tris pH 6,8
 0,1 % (v/v) SDS
 0,05 % (v/v) Ammoniumpersulfat
 0,05 % (v/v) TEMED

Protein-Probenpuffer (5x)
 0,225 M Tris/Cl; pH 6,8
 50 % (v/v) Glycerin
 5 % (w/v) SDS
 0,25 M DTT
 0,05 % (w/v) Bromphenolblau

Lösungen für Western-Blots:

Western-Blot-Transferpuffer
 10 % (v/v) Methanol
 25 mM Tris
 190 mM Glycin
 TBS (10x)
 100 mM Tris-HCl
 1,5 mM NaCl
 mit HCl auf pH 8,0 einstellen

Blockierungslösung
 3 % (w/v) BSA in 1x TBS

Lösung zur Isolation von Gesamtprotein

RIPA Puffer
 50 mM Tris- HCl, pH 7,5
 150 mM NaCl
 1 % Nonidet[®] P40
 0,5 % Natriumdesoxycholat
 0,1 % SDS
 1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail je 10 ml

Lösungen zur Isolation von rekombinantem Protein

Ni-NTA Lysepuffer
 50 mM NaH₂PO₄xH₂O
 300 mM NaCl
 → mit NaOH ad pH 8,0

Ni-NTA Waschpuffer
 50 mM NaH₂PO₄xH₂O
 300 mM NaCl
 20 mM Imidazol
 0,05 % (w/v) Tween 20
 → mit NaOH ad pH 8,0

Ni-NTA Elutionspuffer
 50 mM NaH₂PO₄xH₂O
 300 mM NaCl
 300 mM Imidazol
 → mit NaOH ad pH 8,0

Strep-Tactin Elutionspuffer
 50 mM NaH₂PO₄xH₂O
 300 mM NaCl
 5 mM Desthiobiotin
 → mit NaOH ad pH 8,0

Färbelösungen

Zellfärbelösung
 50 % (v/v) Methanol
 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250

Coomassie Lösung zur Färbung von PAA-Gelen
 0,1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250
 40 % (v/v) Ethanol
 10 % (v/v) Essigsäure

Coomassie Entfärbelösung 40 % (v/v) Ethanol
10 % (v/v) Essigsäure

Lösungen zur Silberfärbung von PAA-Gelen

Fixierlösung 50 % (v/v) Methanol
10 % (v/v) Essigsäure

Blockierungslösung (50x) 2 % (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Silberlösung 0,1 % (w/v) AgNO_3
75 μl Formaldehyd (37 % (w/v)) pro 100 ml

Entwickler 6 % (w/v) Na_2CO_3
50 μl Formaldehyd (37 % (w/v)) pro 100 ml

Stoplösung 10 % (v/v) Essigsäure

Lösung für Immunhistochemie

Citrat-Puffer 10 mM Citronensäuremonohydrat
pH = 6,2

3.2 Methoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten sowie Arbeiten mit Bakterien und Säugerzellen wurden in sterilen, DNase- und RNase-freien Gefäßen und mit sterilen Lösungen durchgeführt. Experimente, bei denen nicht explizit die Reaktionstemperaturen angegeben werden, fanden bei Raumtemperatur statt.

3.2.1 Arbeiten mit Escherichia Coli

3.2.1.1 Kultivierung von Bakterien

Der Bakterienstamm XL2-Blue wurde sowohl auf festem Nährboden als auch in Schüttelkultur kultiviert. Für die Selektion transformierter Bakterien wurde das Medium beziehungsweise die Nährplatte mit 100 µg/ml Ampicillin versetzt. Zum Animpfen von Schüttelkulturen wurde eine Einzelkultur mit einer sterilen Spitze gepickt, bei Agarplatten wurden die Bakterien mit einem sterilen Trigalsky Spatel ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C im Brutschrank, die der flüssigen Kulturen bei 37°C im Schüttler bei 250 UpM.

3.2.1.2 Transformation von E. coli

Zur Transformation kompetenter *E. coli* wurden je 100 ng Plasmid-DNA zu 100 µl kompetenten Zellen, die auf Eis aufgetaut wurden, zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 30 min auf Eis inkubiert und dabei gelegentlich durch leichtes Schütteln durchmischt. Anschließend wurden die Zellen 80 sek einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, um die Plasmidaufnahme ins Zellinnere zu ermöglichen. Nach dem Hitzeschock kühlte man die Bakterien eine Minute auf Eis ab, gab pro Ansatz 500 µl LB Medium zu und lies die Kultur 60 min lange bei 37°C unter Schütteln anwachsen. Die transformierten *E. coli* wurden dann eine Minute bei 8000 U/min abzentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Bakterien im verbleibenden Medium wieder resuspendiert, um eine Aufkonzentrierung zu erreichen. Das Ausplattieren der Zellen erfolgte auf einem ampicillinhaltigem Medium.

3.2.1.3 Herstellung kompetenter Bakterien

Kompetente *E. coli* Bakterien (XL2) wurden freundlicherweise von Dr. Richard Bauer zur Verfügung gestellt. Die Herstellung dieser kompetenten Bakterien erfolgte nach der Kalziumchlorid-Methode und ist in der Dissertation von Richard Bauer dokumentiert.

3.2.2 Isolierung von Plasmid DNA

Die Isolierung der Plasmid DNA erfolgte mit Hilfe des Plasmid Mini Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers.

3.2.3 Isolierung genomischer DNA aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung erfolgte der Herkunft der DNA entsprechend mit der Hilfe verschiedener Kits nach den jeweiligen Herstellerangaben:

DNA aus Paraffinmaterial: Purgene™ DNA Tissue Kit (Gentra, Minneapolis, USA)

Blut-DNA: Purgene™ DNA Blood Kit (Gentra, Minneapolis, USA)

Zelllinien*: Purgene™ DNA Tissue Kit (Gentra, Minneapolis, USA)

* Präkonfluent gewachsene Zellen wurden aus T75 Zellkulturschale abgeerntet und in 200 µl PBS resuspendiert. Danach wurden 20 µl Proteinase K hinzugegeben.

Waren weniger als 10 000 Zellen vorhanden, wurde der High Pure PCR Template Kit von Roche verwendet.

3.2.4 Isolierung von RNA

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem TRIZOL™-Reagens (Invitrogen) nach den Herstellerangaben. Zur Elimination von DNA-Spuren wurde anschließend ein DNaseI –Verdau (100 U/ml DNaseI, 10 min bei 37°C) entfernt. Die DNaseI wurde durch Phenol-Chloroform-Extraktion (Sambrook, 1989) inaktiviert und entfernt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 DNA- und RNA-Methoden

3.3.1.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Die Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen zu analytischen Zwecken erfolgte meist in einem Volumen von 20 µl mit etwa 1,0 µg Plasmid- oder *Insert*-DNA, 10 U des entsprechenden Enzyms und der vom Hersteller empfohlenen Menge des Reaktionspuffers. Die Ansätze wurden für 2 - 3 h bei der optimalen Reaktionstemperatur inkubiert und die Enzyme anschließend bei 70°C für 20 min inaktiviert.

3.3.1.2 Gelelektrophorese von DNA

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten für analytische Zwecke erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese (1 - 3,5 % Agarose in TAE). Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Spannung von 10 V/cm durchgeführt. Das Anfärben der DNA erfolgte nachträglich in Ethidiumbromidlösung für 10 - 30 min. Die angefärbte DNA wurde durch UV-Licht sichtbar gemacht. Die Größe der Fragmente konnte aufgrund eines ebenfalls auf das Gel aufgetragenen DNA-Längenstandards abgeschätzt werden.

3.3.1.3 Isolierung und Reinigung von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente wurden mittels des MinElute[®] PCR Purification Kits (Qiagen) nach den Herstellerangaben gereinigt.

Sollte eine bestimmte Fraktion von DNA-Fragmenten isoliert werden, wurden diese in 1,5%igen Agarosegelen aufgetrennt und nach der Färbung in Ethidiumbromidlösung unter UV-Beleuchtung ausgeschnitten. Die eigentliche Gelextraktion wurde mit dem QIAquick[®] Gel Extraction Kit (Qiagen) nach dem beiliegenden Protokoll durchgeführt.

3.3.1.4 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmungen

Die Konzentration gelöster Nukleinsäuren wurde mittels UV-Absorption in einem Photometer bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Für optische Dichten kleiner 1 gilt näherungsweise folgender linearer Zusammenhang: 1 OD_{260nm} Einheit = 50 ng/μl doppelsträngige DNA und Plasmide; 40 ng/μl für RNA.

3.3.1.5 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription erfolgte mit dem RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) nach Herstellerangaben. Dazu wurde standardmäßig 1 μg RNA eingesetzt.

3.3.1.6 Modifizierung von DNA mit Na-Bisulfit

Durch die Behandlung der genomischen DNA mit Na-Bisulfit werden alle nicht methylierten Cytosine zu Uracilen deaminiert, die Thymidinen entsprechen, während nur 5-methyl-Cytosine als Cytosine erhalten bleiben. Die so entstandenen Sequenzänderungen spiegeln den ursprünglichen Methylierungsstatus wider.

Die Bisulfit-Modifizierung erfolgte mit minimal 100 ng genomischer DNA mit Hilfe des EZ DNA Methylation Kit™ (ZYMO Research, Orange, Kanada) nach den Angaben des Herstellers. Die modifizierte DNA wurde sofort in die nachfolgende PCR eingesetzt oder aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.3.1.7 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifizierung eines spezifischen DNA-Fragmentes wurde die Polymerasekettenreaktion (PCR) angewandt. Die Reaktion erfolgte üblicherweise in einem Volumen von 20 µl. Eingesetzt wurde 1x Taq-Polymerase-Puffer mit Mg²⁺, je 0,3 µM Primer, 0,2 µM dNTPs und 2 U Taq-Polymerase. Die Amplifikation erfolgte durch 35 repetitive Zyklen: Denaturierung (45 sek bei 94°C), Primerbindung (30 sek, Temperatur je nach Primer [generell 60°C]), und Elongation (1 min bei 72°C).

3.3.1.8 Real-time PCR

Zur relativen Quantifizierung verschiedener DNA- und cDNA-*Templates* wurde das LightCycler-System (Roche) in Verbindung mit dem LightCycler FastStart DNA Master^{Plus} SYBR Green I Kit (Roche) oder alternativ dem QuantiTect[®] SYBR Green PCR Kit (Qiagen) verwendet. Jeder 20 µl Ansatz enthielt 2 µl DNA, 0,5 µM Primer und 1x PCR SYBR Green Mix. Einer 10-minütigen (Roche) bzw. 15-minütigen (Qiagen) Denaturierung bei 95°C folgten 40 Zyklen von 10 sek bei 95°C, 17 sek bei der Bindetemperatur des Primerpaares (generell 60°C) und 10 sek bei 72°C. Die Schmelzpunktanalyse der PCR-Produkte erfolgte während einer Erhitzung um 0,2°C/sek von 50°C bis 95°C bei kontinuierlicher Fluoreszenzmessung. Die Auswertung der Methylierungsquantifizierung erfolgte mit der RelQuant[®] 1.0 Software (Roche) unter Verwendung von *fit coefficient files*. Zur Erstellung der *fit coefficient files* wurden DNA-Verdünnungen über fünf Log-Stufen in Duplikaten eingesetzt. Die PCR-Effizienzen ergaben sich aus den *fit coefficient files*. Die Bestimmung der Ct-Werte erfolgte standardmäßig automatisch über die *second derivative maximum*-Methode und bei ungleichmäßigem Fluoreszenzkurvenverlauf durch die manuelle Festlegung von *fit points*.

3.3.1.9 Relative Quantifizierung

Die transkriptionelle Genexpression wurde durch relative Quantifizierung von cDNA mittels *real-time* PCR untersucht. Die relative, normalisierte Transkription (RNT) gibt die Expression eines Zielgenes relativ zur entsprechenden Expression in einem Kalibrator an. Dabei wird die

Expression des Zielgenes relativ zu der Expression eines Referenzgenes (ein konstant exprimiertes Haushaltsgen) ermittelt und auf das Verhältnis von Zielgen-/Referenzgen-Expression eines Kalibrators (z. B. cDNA einer Zelllinie) bezogen. Ein RNT-Wert von beispielsweise 2 zeigt eine relative Verdopplung der Expression des Zielgenes im Vergleich zur entsprechenden relativen Expression im Kalibrator an. Ein RNT-Wert von beispielsweise 0,2 gibt an, dass die relative Expression des Zielgenes einem Fünftel der relativen Expression des Zielgenes beim Kalibrator entspricht. Der RNT-Wert des Kalibrators ist definitionsgemäß immer gleich 1. In dieser Arbeit wurde das Gen *TAX1BP1* als Referenzgen verwendet.

3.3.1.10 Sequenzierungen

Zu Sequenzanalysen wurden 10 - 50 ng genomische DNA und die jeweiligen Sequenzierungs-Primer eingesetzt. Die automatische Sequenzierung erfolgte an einem ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer, die Auswertung mit Hilfe der Bioedit Software (v 5.0.9).

3.3.2 Protein-Methoden

3.3.2.1 Herstellung von Gesamtproteinextrakten (RIPA-Lysaten)

Gesamtproteinextrakte sind gleichbedeutend mit RIPA-Lysaten. Die Extraktion von Gesamtprotein erfolgte auf Eis. Das Kulturmedium von präkonfluent wachsenden CRC-Zelllinien wurde abgesaugt, die Zellen einmal mit eiskaltem PBS gewaschen, mit dem Zellschaber abgeschabt und in 1 ml PBS aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 4000 UpM und 4°C für 5 min wurde das Zellpellet in 200 µl RIPA-Puffer lysiert und danach 15 min bei 4°C im Schüttelinkubator geschüttelt. Die in Puffer gelösten Proteine konnten dann durch eine zehnmünütige Zentrifugation bei 13 000 UpM und 4°C von den nicht-löslichen Zellbestandteilen abgetrennt werden. Das Proteinextrakt wurde in neue Gefäße überführt und bei -20°C gelagert.

3.3.2.2 Fraktionelle Proteinisolierung

Die Proteine aus Kern, Zytoplasma, Membranen und Zytoskelett wurden getrennt voneinander mit Hilfe des ProteoExtract® Subcellular Proteome Extraction Kit (Calbiochem) nach Angaben des Herstellers isoliert. Der Gesamtproteingehalt der Fraktionen wurde durch Verdünnen mit PBS äquilibriert.

3.3.2.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Lösungen wurde mit Hilfe des BCA-Protein-Assay Kits (Pierce) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Durch Messung bei 562 nm in einem ELISA-Reader wurden die Absorptionen bestimmt und anhand eines parallel quantifizierten BSA-Standards in Proteinkonzentrationen umgerechnet.

3.3.2.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Durch SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine nach ihrem Molekulargewicht in Polyacrylamidgelen aufgetrennt werden. Dabei werden deren Tertiär- und Quartärstruktur durch die Anlagerung von SDS-Molekülen zerstört, sodass die Proteine linear vorliegen. 20 µg Proteinproben wurden jeweils in 1x SDS-Probenbuffer 5 min bei 95°C aufgeköcht und anschließend bei 0,8 mA/cm² durch SDS-PAGE in 10 % PAA-Gelen aufgetrennt.

3.3.2.5 Western-Blot

Mittels *Western-Blotting* wurden durch SDS-PAGE aufgetrennte Proteine auf PVDF-Membran transferiert, um diese mit Antikörpern nachzuweisen. Hierzu wurden die SDS-Polyacrylamidgele nach dem Gellauf zusammen mit der PVDF-Membran 10 min in 1x Transfer Puffer getränkt und danach die Proteine mittels elektrophoretischem Transfer (*semidry*) 1 h bei 1,5 mA/cm² auf die Membran übertragen. Der *Blot* erfolgte in der Biometra Fastblot B34-Apparatur.

3.3.2.6 Proteindetektion auf Western-Blots

Die PVDF-Membranen wurden zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 - 2 h in TBS mit 2 % (w/v) BSA inkubiert und 1 - 2 h bei RT oder bei 4°C über Nacht mit dem 1. Antikörper in geeigneter Verdünnung in TBS mit 2 % (w/v) BSA (Maspin AK: 1:1000, anti-beta-Actin AK: 1:4000) geschwenkt. Nach dem Waschen (3x 15 min mit TBS) wurde die Membran mit einem gegen den konstanten Teil des 1. Antikörpers gerichteten 2. Antikörper (1:4000), der mit Alkalischer Phosphatase konjugiert war, für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde nochmals gewaschen (3x 10 min mit PBS) und das Substrat für die Alkalische Phosphatase (BCIP/ NBT Substrate Kit) zugegeben und 10 min bis zu 2 h inkubiert, bis sich eine Farbreaktion zeigte.

3.3.2.7 Coomassie-Färbung von SDS-PAA-Gelen

Die Gele wurden 1 h in Coomassie Färbelösung unter Schwenken inkubiert und dabei gefärbt. Anschließend wurden die Gele in Coomassie Entfärbelösung solange entfärbt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Dabei wurde die Entfärbelösung mehrfach gewechselt.

3.3.2.8 Silberfärbung im SDS-PAA-Gel

Zur sensitiven Silberfärbung wurden die SDS-PAAGele 30 min in der Fixierlösung inkubiert, anschließend je 10 min in 50 % und 10 % (v/v) Ethanol rehydriert und nach einminütiger Inkubation in 0,02%iger (w/v) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ -Lösung dreimal je 20 sek in Wasser gewaschen. Nach der Färbung für 20 min in 0,1%iger Silbernitratlösung mit 75 μl Formaldehyd (37%ig, (w/v)) pro 100 ml wurde das Gel erneut dreimal je 20 sek mit Wasser gewaschen und anschließend mit 6%iger (w/v) Natriumcarbonatlösung, die 50 μl 37%iges (w/v) Formaldehyd pro 100 ml enthielt, entwickelt. Die Entwicklung wurde mit 10%iger (v/v) Essigsäure gestoppt, sobald die Banden gut sichtbar waren.

3.3.2.9 Co-Immunpräzipitation (CoIP)

200 – 300 μl RIPA Zelllysat aus verschiedenen Zelllinien wurden mit 25 μl unverdünnter Protein G-Sepharose über Nacht bei 4°C vorgereinigt. Nach Zentrifugation für 3 min bei 1600 UpM wurde der Überstand in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und mit anti-Maspin-Antikörper (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde 1 h mit 25 μl unverdünnter Protein G-Sepharose inkubiert. Daraufhin wurde dreimal mit 1 ml PBS gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 20 μl 2,5x Protein-Probenpuffer (1 Volumen 5x Protein-Probenpuffer + 1 Volumen H_2O) aufgenommen und 5 min bei 95°C erhitzt. Die präzipitierten Proteine wurden durch Gelelektrophorese in 10%igen PAA-Gelen aufgetrennt.

3.3.2.10 Herstellung und Aufreinigung von rekombinantem Maspin

Die transformierten *E. coli* Zellen wurden in 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) unter Schütteln bei 37°C inkubiert und bei einer $\text{OD}_{600\text{nm}} \sim 0,5$ mit 1 mM IPTG induziert. Nach 5 Stunden weiterer Inkubation unter Schütteln bei 37°C wurde die Kultur in 50ml-Zentrifugenröhrchen überführt und für 15 min bei 3000 UpM in einer Varifuge 3.2RS zentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in insgesamt 5 ml Ni-NTA Lysepuffer resuspendiert und vereint. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Zur Lyse der Zellen

wurden Lysozym (1 mg/ml), DNase I (10 U/ml), RNase A (10 µg/ml) und Proteinase Inhibitor Cocktail (1 Tablette/5 ml) zugegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat mit Ultraschall behandelt (6 mal 10 Sekunden bei 300 Watt, dazwischen je 20 Sekunden Kühlung auf Eis). Das Lysat wurde in 2ml-Reaktionsgefäße überführt und die Zellfragmente wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 16 000 g und 4°C pelletiert. Der Überstand mit dem gelösten rMaspin wurde in 15ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die folgenden Schritte wurden auch bei der Untersuchung von rMaspin-Proteininteraktionen (siehe 4.2.12) angewandt.

Die verschiedenen rMaspin-haltigen Ansätze und Kontrollen wurden mit Ni-NTA Lysepuffer auf ein Volumen von 4 ml gebracht. Zur Aufreinigung über den 8xHis-Tag wurden jeweils 4 ml der Ansätze (*E. coli*-Lysat Überstände, rMaspin-Proteininteraktionsansätze) mit 1 ml unverdünnter Ni-NTA-Agarose unter Schütteln über Nacht bei 4°C inkubiert und am Folgetag in eine leere Poly-Prep Chromatographiesäule transferiert. Nach dem Auslauf des Filtrats wurde die Säule dreimal mit je 4 ml Ni-NTA Waschpuffer gewaschen. Das rMaspin wurde viermal mit je 0,5 ml Ni-NTA Elutionspuffer eluiert. Alle Fraktionen wurden einzeln gesammelt.

Je nach Bedarf wurden die Ni-NTA Eluate über den Strep-Tag weiter aufgereinigt. Diese Methode der Aufreinigung wurde ebenfalls zur Untersuchung von rMaspin-Proteininteraktionen (siehe 4.2.12) angewandt. Dazu wurden die rMaspin-enthaltenden Lösungen mit Ni-NTA Lysepuffer auf ein Volumen von 4 ml gebracht, mit 1 ml unverdünntem Strep-Tactin Superflow über Nacht bei 4°C unter Schütteln inkubiert und am Folgetag in eine leere Poly-Prep Chromatographiesäule transferiert. Nach zwei Waschschritten mit je 4 ml Ni-NTA-Lysepuffer wurde das rMaspin sechsmal mit je 0,5 ml Strep-Tactin Elutionspuffer eluiert.

Von allen Fraktionen der Ni-NTA- bzw. Strep-Tactin-Aufreinigung wurden 40 µl abgenommen, mit 10 µl 5x Protein-Probenpuffer für 5 min bei 95°C inkubiert und in die SDS-PAGE eingesetzt. Die Proteindetektion erfolgte durch Coomassie- oder Silberfärbung.

3.3.2.11 Immunfluoreszenz

In einem „4-chamber-cover-slide“ wurden auf einem Objektglas circa 50 000 Zellen in 1 ml Medium ausgesät und über Nacht inkubiert. Die weiteren Inkubationen erfolgten direkt auf dem Objektträger durch Überschichtung. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 300 µl Paraformaldehyd (4 % w/v) je Objektglas für 15 min fixiert. Zur Permeabilisierung wurden die Zellen 5 min mit 300 µl Triton-X-100 (0,1 % v/v) behandelt

und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Nach einstündiger Blockierung durch Überschichtung mit BSA/PBS (2 % (w/v)) wurden die Zellen 1 h mit 300 µl anti-Maspin-Antikörper in 1:1000-Verdünnung inkubiert, dreimal mit PBS gewaschen und für eine weitere Stunde mit 300 µl 1:100-verdünntem, FITC-konjugiertem anti-Maus-Sekundärantikörper in Dunkelheit inkubiert. Nach drei Waschschrritten mit PBS wurden die Zellen mit einem Tropfen Vectashield Versiegelungsmedium, das DAPI zur Kernfärbung enthielt, unter einem Deckglas versiegelt und standen zur Fluoreszenzmikroskopie bereit.

3.3.2.12 Immunhistochemie (IHC)

Zur IHC-Untersuchung wurden 2µm-Schnitte von Formalin-fixierten, paraffinisierten Gewebeproben verwendet, die nach Entparaffinisierung in 10 mM Citratpuffer (pH 7,2) durch Erhitzen in der Mikrowelle (35 min bei 250 Watt) demaskiert wurden. Die monoklonalen Antikörper wurden in einer 1:1000-Verdünnung eingesetzt und mittels des I-View DAB Detection Kit in Verbindung mit dem Ventana Nexes *Autostainer* (Ventana, Strassburg, France) detektiert.

3.3.2.13 Immuncytochemie (ICC)

Für die ICC wurden vereinzelte Zellen entweder auf einem Objektträger zentrifugiert (5 min bei 1200 UpM), oder das Wachstum erfolgte auf einem sterilen Objektträger. Die Zellen wurden 15 min in eiskaltem Aceton fixiert und wie in der IHC mit Antikörpern gefärbt.

3.3.2.14 Auswertung der Maspin-IHC

Sowohl die zytoplasmatische als auch die nukleäre Maspinfärbung wurde semiquantitativ von einem erfahrenen Pathologen, der nicht über den Mikrosatellitenstatus oder andere klinisch-pathologische Daten informiert war, bestimmt. Zusätzlich wurden die Auswertungen von naturwissenschaftlichen Mitarbeitern (PD Dr. rer. nat. und Dipl. Biol.) zur Kontrolle wiederholt. Die Intensität der Maspinfärbung wurde als negativ, schwach, mittel und stark klassifiziert. Ein Tumor wurde als Maspin-positiv gewertet, wenn mehr als 10 % der Tumorzellen mittlere oder starke Maspinfärbung zeigten. Negative Bewertung erfolgte bei negativer oder schwacher Färbung einer beliebigen Zahl von Tumorzellen, oder wenn der Anteil mittel oder schwach gefärbter Zellen weniger als 10 % der Tumorzellen ausmachte. Je nach gefärbtem Zellkompartiment wurde die Färbung zytoplasmatisch und/oder nukleär klassifiziert.

3.3.3 Quantitative Methylierungsanalysen

3.3.3.1 QAMMOD-Methylierungsanalyse des *MLH1*-Promotors

Die QAMMOD (Quantitative Methylierungsanalyse modifizierter DNA) wurde in dieser Dissertation zur quantitativen Methylierungsanalyse des *MLH1*-Promotors entwickelt. Untersucht wurden dabei die zwei Promotorbereiche mit der höchsten CpG-Dichte: distaler Bereich (-747 bis -569) und proximaler Bereich (-295 bis -152) relativ zum ATG. Für jeden Promotorbereich wurde ein methylierungsunabhängiges „Flank-Primerpaar“ (Prox Flank f + Prox Flank r, Dist Flank f + Dist Flank r) eingesetzt, das den CpG-Lokus flankiert sowie ein methylierungsspezifisches „MS-Primerpaar“ (Prox Flank f + Prox MS r, Dist MS f + Dist Flank r; Abb. 3.1).

Das Prinzip der QAMMOD ist in Abb. 3.2 illustriert.

```

-800 TAAGGTTAAGAGGCGGTTAGAGTTCGAGGTTTGTACGAGTAGTTTTTTTTTTT -751
-750 TAGGAGTGAAGGAGGTTACGGGTAAGTCGTTTTTGACGTAGACGTTTTTATT -701
-700 AGGGTCGCGCGTTCGTCGTTCGTTATATATCGTTCGTAGTATTCGTGTTT -651
-650 AGTTTCGTAGTGGCGTTTTGACGCGCGTTCGCGGGTAGTTACGATGAGGC -601
-600 GGCGATAGATTAGGTATAGGGTTTTATCGTTTTTTCGGAGGTTTTATTATT -551
-550 AAATAACGTTGGGTTTTATTCGGGTCGGAAAATTAGAGTTTTCGTCGATTTT -501
-500 TATTTTGTTTTTTTTTGGGCGTTATTTATATTTTCGGGGAGGTTATAAGAG -451
-450 TAGGGTTAACGTTAGAAAGGTCGTAAGGGGAGAGGAGGAGTTTGAGAAGC -401
-400 GTTAAGTATTTTTTTCGTTTTTCGTTAGATTATTTTAGTAGAGGTATATA -351
-350 AGTTCGGTTTCGGTATTTTTGTTTTTTATTGGTTGGATATTTCGTATTTTT -301
-300 CGAGTTTTTAAAAACGAATTAATAGGAAGAGCGGATAGCGATTTTTAACG -251
-250 CGTAAGCGTATATTTTTTTTAGGTAGCGGGTAGTAGTCGTTTTTAGGGAGGG -201
-200 ACGAAAGAGATTTAGTAATTTATAGAGTTGAGAAATTTGATTGGTATTTAA -151
-150 GTTGTTTAATTAATAGTTGTCGTTGAAGGGTGGGGTTGGATGGCGTAAGT -101
-100 TATAGTTGAAGGAAGAACGTGAGTACGAGGTATTGAGGTGATTGGTTGAA -1
+1 ATC

```

Abb. 3.1: Lage der Primer, die zur QAMMOD-Methylierungsanalyse des *MLH1*-Promotors verwendet wurden. Die dargestellte Sequenz entspricht der Bisulfit-modifizierten DNA. CpGs sind in **Fett**druck dargestellt. methylierungsspezifische *MLH1* MS-Primer, *MLH1* flank distal-Primer, *MLH1* flank proximal-Primer. Die *flank*-Primer sind methylierungsunabhängig.

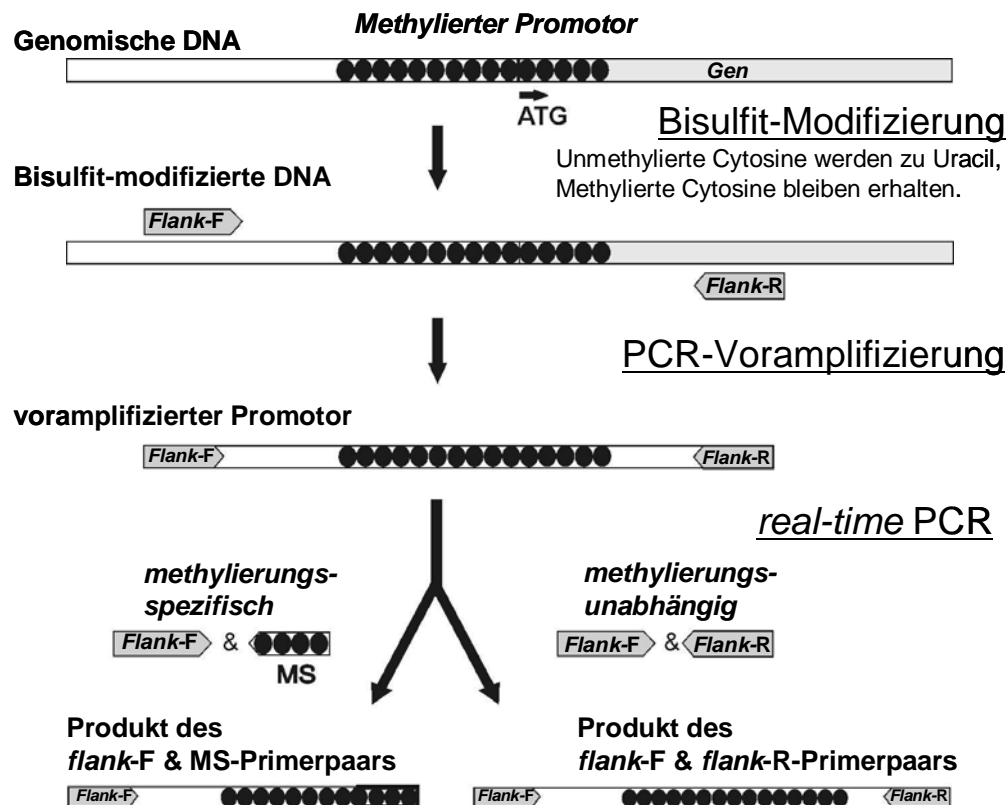


Abb. 3.2: Prinzip der QAMMOD. Bei der Bisulfit-Modifizierung werden alle unmethylierten Cytosine zu Uracilen umgewandelt, methylierte Cytosine bleiben als solche erhalten. Der Modifikation folgt eine Voramplifikation, um die instabile Bisulfit-modifizierte DNA zu stabilisieren. Die zur Voramplifikation verwendeten methylierungsunabhängigen *flank*-Primer flankieren die zu analysierende Sequenz. In der anschließenden SYBR-Green *real-time* PCR erfolgen je Probe eine methylierungsunabhängige PCR mit den *flank*-Primern und eine methylierungsspezifische PCR mit einem MS/*flank*-Primerpaar. Der relative Vergleich beider *real-time* PCRs ergibt den Anteil der methylierten DNA-Moleküle in der Probe.

Da die Bisulfit-modifizierte DNA einzelsträngig, sehr instabil und schlecht lagerfähig ist, erfolgt zunächst eine konventionelle PCR, um die zu untersuchenden DNA-Abschnitte zu amplifizieren und als doppelsträngige DNA zu konservieren. Die dabei eingesetzten *Flank*-Primer enthalten selbst möglichst keine Cytosine, die methyliert sein könnten. So amplifiziert diese PCR mit den *Flank*-Primern alle entsprechenden Promotor-Fragmente unabhängig von deren internen Methylierungsstatus.

Der 20 µl Ansatz der PCR enthielt 5 % (v/v) DMSO, 2,0 mM Mg²⁺, 0,2 mM dNTPs, 0,3 µM von jedem *Flank*-Primer, 10 % (v/v) 10x PCR-Reaktionspuffer, 0,5 U Taq-Polymerase (Fermentas) und 4 µl (minimal 20 ng) modifizierte DNA. Jeder der 15 PCR-Zyklen umfasste 20 sek bei 94°C, 1 min bei 55°C, 1 min bei 72°C. Die PCR-Produkte wurden mit dem MinElute[®] PCR Purification Kit (Qiagen) gereinigt, in 12 µl Tris/Cl (10 mM, pH 8,5) eluiert und 1:10 mit Wasser verdünnt.

Die Methylierungsquantifizierung entspricht einer relativen Quantifizierung (siehe 3.3.1.9), bei der je Probe eine methylierungsspezifische *real-time* PCR („MS-Primerpaar“; bestehend aus einem der Flank-Primer und einem methylierungsspezifischen MS-Primer) mit der methylierungsunabhängigen *real-time* PCR („Flank-Primerpaar“) verglichen werden (Abb. 3.2).

In die *real-time* PCR (siehe 3.3.1.8) wurden 2 µl 1:10-verdünntes, voramplifiziertes, gereinigtes PCR-Produkt als *Template* eingesetzt. Als Kalibrator-DNA wurden verdünnte Flank PCR-Produkte von der CRC-Zelllinie SW48, deren *MLH1*-Promotor methyliert ist, eingesetzt. Unmethylierte Blut-DNA diente als Kontrolle für negative Methylierung. Die Auswertung der Methylierungsquantifizierung erfolgte mit der RelQuant 1.0 Software (Roche) mit Effizienzkorrektur unter Verwendung von *fit coefficient files* (siehe 3.3.1.8).

Die Auswertung der *real-time* PCRs ergibt das Ratio aus methylierungsspezifischer und methylierungsunabhängiger PCR, das direkt den Anteil der methylierten DNA-Moleküle wiedergibt.

3.3.3.2 QESD

Bei der QESD (Quantifizierung Endonuklease-resistenter DNA) wird native DNA mit einer methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease (zum Beispiel *Hin6I*) verdaut. Anschließend wird der Anteil unverdauter und damit methylierter DNA-Spezies mittels *real-time* PCR quantifiziert. Die QESD des *MLH1*-Promotors wurde an denselben distalen und proximalen *MLH1*-Promotorbereichen durchgeführt, die schon mittels QAMMOD untersucht wurden (Abb. 3.3).

Die *P16*-QESD erfolgte an einem DNA-Bereich (+158 bis +253 vom Transkriptionsstart) mit zwei *Hin6I*-Schnittstellen, die *MGMT*-QESD wurde im Bereich -19 bis +82 ausgehend vom Transkriptionsstart unter Analyse von zwei *Hin6I*-Schnittstellen durchgeführt (ohne Abb.). Das Prinzip der QESD ist in Abb. 3.4 auf der folgenden Seite erläutert.

```

-800 CAAGGCCAAGAGGCGGCCAGAGCCCGAGGCCTGCACCGAGCAGCTCTCTCTT -751
-750 CAGGAGTGAAGGAGGCCACGGGCAAGTCGCCCTGACCGCAGACCGCTCCACC -701
-700 AGGGCCCGCGCGCTCGCCGTCCGCCCACATACCGCTCGTAGTATTCGTGCTC -651
-650 AGCCTCGTAGTGGCGCCTGACCGTCGCGTTCGCGGGTAGCTACGATGAGGC -601
-600 GGCGACAGACCAGGCACAGGGCCCCATCGCCCTCCGGAGGCTCCACCACC -551
-550 AAATAACGCTGGGTCCACTCGGGCCGGAAAACTAGAGCCTCGTCGACTTC -501
-500 CATCTTGCTTCTTTTGGGCGTCATCCACATTCTGCGGGAGGCCACAAGAG -451
-450 CAGGGCCAACGTTAGAAAGGCCCGCAAGGGGAGAGGAGGAGCCTGAGAAGC -401
-400 GCCAAGCACCTCCTCCGCTCTGCGCCAGATCACCTCAGCAGAGGCACACA -351
-350 AGCCCGGTTTCCGGCCATCTCTGCTCCTATTGGCTGGATATTTCGTATTCCC -301
-300 CGAGCTCCTAAAACGAACCAATAGGAAGAGCGGACAGCGATCTCTAACG -251
-250 CGCAAGCGCCATATCCTTCTAGGTAGCGGGCAGTAGCCGCTCAGGGAGGG -201
-200 ACGAAGAGACCCAGCAACCCACAGAGTTGAGAAATTTTGACTGGCATTCAA -151
-150 GCTGTCCAATCAATAGCTGCCCGCTGAAAGGGTGGGGCTGGATGGCGTAAGC -101
-100 TACAGCTGAAGGAAGAACGTGAGCACGAGGCACTGAGGTGATTGGCTGAA -51
-50 GGCACTTCCGTTGAGCATCTAGACCGTTTTCCTTGGCTCTTCTGCGCCAAA -1
+1 ATG

```

Abb. 3.3: Lage der Primer und *Hin6I*-Schnittstellen, die zur QESD-Methylierungsanalyse des *MLH1*-Promotors verwendet wurden. CpGs sind in **Fettdruck** dargestellt. *Hin6I*-Schnittstelle, *DraI*-Schnittstelle, *XbaI*-Schnittstelle, MLH1 dist MSDig Primer, MLH1 prox MSDig Primer. Die MSDig (*methylation specific digest*) Primer flankieren eventuell methylierte *Hin6I*-Schnittstellen und können nur unverdaute und damit methylierte DNA amplifizieren.

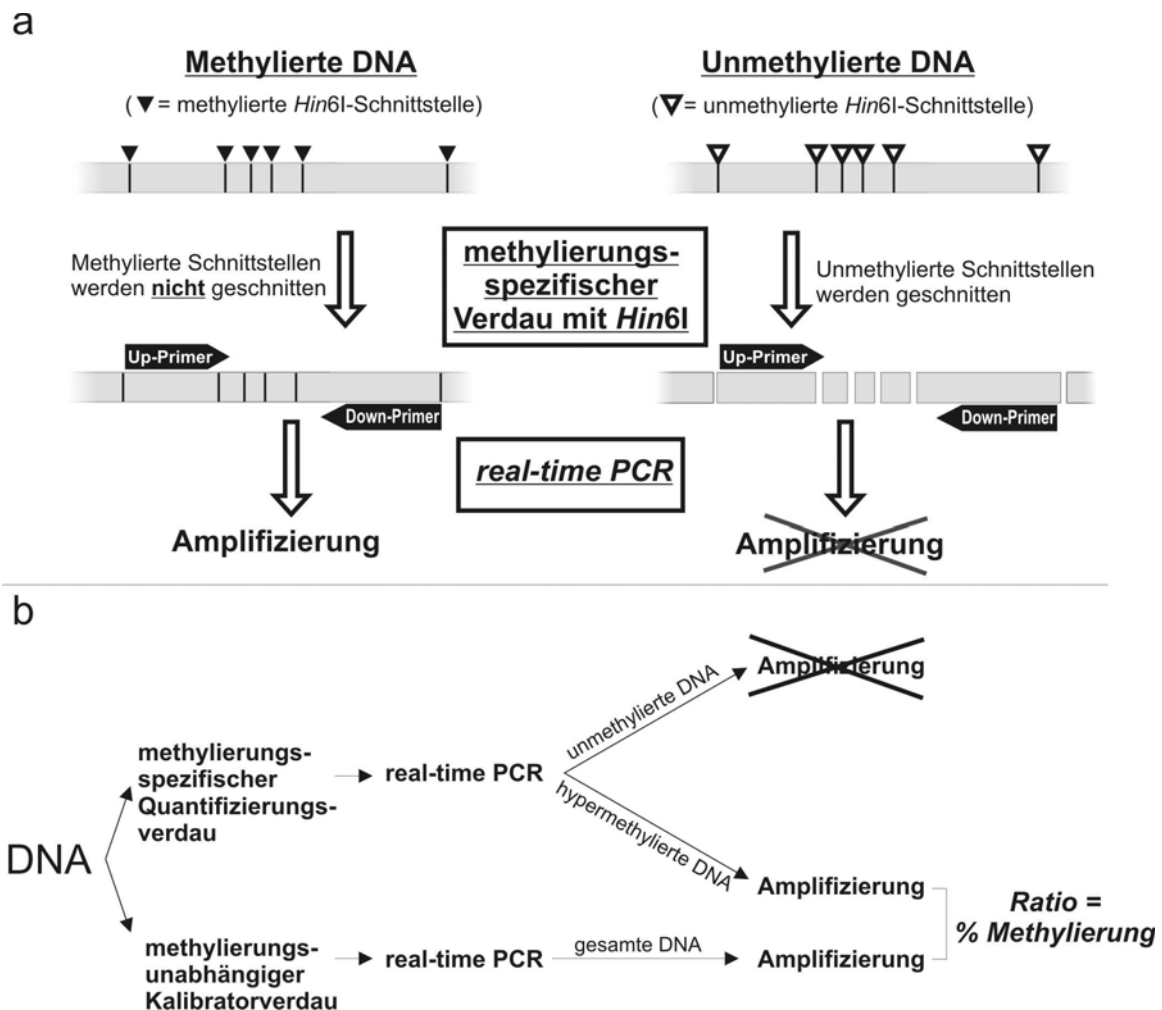


Abb. 3.4: Das Prinzip der QESD. (a) Je Probe werden zwei Restriktionsverdauere vorbereitet: Ein Quantifizierungsverdau mit *Hin6I* und ein Kalibratorverdau mit *XbaI/DraI*. Das Restriktionsenzym *Hin6I* schneidet NUR die unmethylierte Erkennungssequenz GCGC, bei Methylierung ist der Verdau blockiert. Die Primer der folgenden *real-time* PCR amplifizieren DNA-Fragmente in den jeweiligen Promotorbereichen, deren Methylierungsstatus die Genexpression beeinflusst. Die zu amplifizierenden Promotorfragmente enthalten *Hin6I*-Schnittstellen, d.h. nur hypermethylierter *MLH1*-Promotor bleibt nach dem *Hin6I*-Verdau als *Template* erhalten. Schnittstellen für *XbaI* und *DraI* sind in diesen Promotorfragmenten nicht enthalten. *XbaI* und *DraI* dienen der Fragmentierung und somit der besseren PCR-Zugänglichkeit der genomischen DNA, damit gleiche PCR-Effizienzen gelten. (b) Die verdauten DNAs werden als *Templates* in die *real-time* PCR eingesetzt und deren Ct-Werte werden bestimmt. Die Differenz aus Kalibrator-*real-time* PCR und Quantifizierungs-*real-time* PCR ist der ΔCt -Wert. Die Formel $E^{\Delta Ct} \times 100$ ergibt den Anteil der methylierten DNA-Moleküle der Probe (E = PCR-Effizienz). Als Kontrolle für positive Methylierung wird die DNA einer methylierten Zelllinie (z. B. SW48 für *MLH1*-, *P16*- und *MGMT*-Methylierungsanalysen) mitgeführt. Unmethylierte DNA (z. B. Blut-DNA) dient als Kontrolle für negative Methylierung. Das Ausbleiben der Amplifizierung bei der Quantifizierungs-PCR mit der *Hin6I*-verdauten DNA beweist 0 % Methylierung.

3.3.3.2.1 Durchführung der QESD

Je Probe werden zwei Verdauere angesetzt: Ein Quantifizierungsverdau mit *Hin6I* und ein Kalibratorverdau mit *XbaI/DraI*, wobei die DNA direkt in die Verdaulüssigkeit pipettiert wurde. Als Kontrollen dienten SW48-DNA für positive Methylierung und Blut-DNA für

0 % Methylierung. Die Verdauungen wurden in einem Volumen von 20 µl durchgeführt und enthielten je 5,0 µl DNA, 1x Tango Reaktionspuffer, und 40 U Enzym (Quantifizierungsansatz: *Hin6I*, Kalibratoransatz: *XbaI* und *DraI*, je 20 U). Um sicherzustellen, dass sämtliche DNA in Kontakt mit den Enzymen kam, wurden die Ansätze 1 min bei 13 000 UpM zentrifugiert, 10 sek stark gevortext und erneut 1 min bei 13 000 UpM zentrifugiert. Nach Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Enzyme bei 70°C für 20 min inaktiviert. Die Lagerung der Verdauungen erfolgte bei 4°C.

Die Methylierungsquantifizierung erfolgte mittels *real-time* PCR (siehe 3.3.1.8) am LightCycler-System (Roche) in Verbindung mit dem QuantiTect® SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Je 20 µl-Ansatz wurden 2 µl Verdauung als *Template* zugegeben.

Zur Auswertung wurden die ΔC_t -Werte ($\Delta C_t = C_{t \text{ Kalibratorverdau}} - C_{t \text{ Quantifizierungsverdau}}$) bestimmt. Die Formel $E^{-\Delta C_t} \times 100$ ergibt den Anteil der methylierten DNA-Moleküle im Quantifizierungsansatz. Das Ausbleiben der Amplifizierung bei der Quantifizierungs-PCR mit der *Hin6I*-verdauten DNA beweist 0 % Methylierung an den untersuchten Schnittstellen.

3.4 Zellkulturmethoden

3.4.1 Kultivierung von CRC-Zelllinien

Alle verwendeten Zelllinien wurden in DMEM mit 10 % (v/v) FKS bei 37°C und 5 % CO₂ im Brutschrank kultiviert. Zur Passage der Zellen wurden diese nach dem Waschen mit PBS für 5 min mit 0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA bei 37°C inkubiert, in DMEM mit 10 % FKS aufgenommen und 1:5 bis 1:10 verdünnt in neue Zellkulturflaschen verteilt. Ein Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag.

3.4.1.1 Synchronisation von CRC-Zelllinien

Die präkonfluenten Zellen wurden durch Serumstarvation für zwei Tage in Low Serum Medium vorsynchronisiert. Anschließend wurden die Zellen zum Eintritt in den Zellzyklus durch die Zugabe von Vollmedium (DMEM mit 10 % (v/v) FKS) mit 4 µg/ml Aphidicolin für 16 h stimuliert. Aphidicolin hemmt die DNA-Synthese, weshalb die Zellen nicht in die S-Phase eintreten können. Nach dem Waschen der Zellen mit PBS und der anschließenden Zugabe von Vollmedium ohne Aphidicolin durchschreitet die Zellpopulation den Zellzyklus synchron. Die Synchronisierung wurde mittels FACS-Analysen überprüft.

3.4.2 Durchflusszytometrische Analyse von Zellen (FACS)

Um die Zellzyklus-Synchronisation und die Maspinexpression der Zellen zu überprüfen wurde jeweils 1 ml PBS mit 10^6 Zellen zu 10 ml Methanol (70 %, (v/v)) unter Schwenken langsam zugegeben, für 1 h zur Fixierung inkubiert, mit 10 ml PBS gewaschen, in 1 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach 15-minütiger RNase A-Behandlung (10 µg/ml) in 1 ml Volumen wurden die Zellen 1 h mit anti-Maspin-Antikörper (1:50 in PBS mit 2 % (w/v) BSA) inkubiert. Nach drei Waschschritten mit je 1 ml PBS wurden die Zellen mit einem FITC-konjugierten anti-Maus-Antikörper aus Ziege (1:100 in 1 ml PBS mit 2 % (w/v) BSA) für 30 min inkubiert. Nach drei Waschschritten mit je 1 ml PBS wurden die Zellen in 1 ml PBS/Propidiumiodid (1 µg/ml (w/v)) aufgenommen, in ein FACS-Röhrchen überführt und in die FACS-Analyse eingesetzt. Die Auswertungen erfolgten mit dem Softwareprogramm Cellquest (Beckton Dickinson).

3.4.3 Stabile und transiente Transfektion von CRC-Zelllinien

3.4.3.1 DNA-Transfektionen

Vektoren und Vektorkonstrukte wurden durch Lipotransfektion mit Lipofectamine/Lipofectamine^{Plus} (Invitrogen) transfiziert. Je DNA wurden zweimal 50 000 Zellen in den *Wells* einer 6-Well-Platte in 2 ml DMEM mit 10 % (v/v) FKS ausgesät und über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Am Folgetag wurden zwei Mischungen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen hergestellt:

Mischung A (für zwei *Wells*): 5 µl Lipofectamine + 35 µl DMEM (ohne Serum) → mischen und 15 min inkubieren.

Mischung B (für zwei *Wells*): 3 µg DNA ad 34 µl mit serumfreiem DMEM + 6 µl Lipofectamine Plus → mischen und 15 min inkubieren.

Beide Mischungen wurden zum Transfektionsansatz vereint, dieser wurde gemischt und 15 min inkubiert. Inzwischen erfolgte bei den Zellen ein Mediumwechsel mit 1,5 ml DMEM (10 % FKS (v/v)). Je *Well* wurden nun 40 µl Transfektionsansatz zugegeben und verteilt. Am folgenden Tag wurde erneut das Medium gegen frisches DMEM mit 10 % (v/v) FKS ausgetauscht. Die Selektion auf stabil transfizierte Klone erfolgte mit 13 mg Geneticin/ml Medium.

3.4.3.2 siRNA-Transfektionen

Die siRNAs (Hs_SERPINB5_1, Hs_SERPINB5_3 und Neg. Controll siRNA AF488; alle von Qiagen) wurden standardmäßig je zu 5 nM mit dem Transfektionsreagens HiPerFect (Qiagen) nach Herstellerangaben transfiziert. Kurz vor der Transfektion wurden je *Well* einer 12-*Well*-Platte 15 000 bis 70 000 Zellen in 250 µl DMEM mit 10 % FKS (v/v) ausgesät und bis zur Transfektion im Brutschrank inkubiert. Inzwischen wurde der Transfektionsansatz in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen vorbereitet. Dazu wurden je *Well* 0,6 µl einer 20 µM siRNA-Stammlösung mit 100 µl serumfreiem DMEM und 3 µl HiPerFect gemischt und 10 min inkubiert. Anschließend wurden je *Well* 103 µl Transfektionsansatz zugegeben und verteilt. Die weitere Inkubation der Zellen erfolgte im Brutschrank. Zur Kontrolle wurde eine Kontroll-siRNA transfiziert, die keine Homologie zu einem humanen Transkript aufwies und mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexafluor-488 gekoppelt war. Die Aufnahme der Kontroll-siRNA wurde durch Fluoreszenzmikroskopie überprüft.

3.4.4 Assays

3.4.4.1 Δ t-Adhäsions-Assays (Messung der Adhäsionsgeschwindigkeit)

Die verschiedenen Zellen wurden präkonfluent durch Trypsinierung geerntet, in Kulturmedium aufgenommen und ausgezählt. Je Klon wurden genau gleiche Zellzahlen (3000 – 5000) auf die *Wells* einer 96-*Well*-Platte zu je 200 µl verteilt. Nach verschiedenen Zeitintervallen wurden die noch nicht adhärenierten Zellen vorsichtig unter Vermeidung von Verwirbelungen mit einer 1ml-Pipette abgesaugt. Die bereits adhärenierten Zellen wurden mit PBS unter der Verwendung einer 1ml-Pipette vorsichtig gewaschen und mit der Zellfärbelösung durch 5-minütige Inkubation fixiert und gefärbt. Die Quantifizierung der adhärenierten Zellen erfolgte durch Mikroskopie.

3.4.4.2 Δ g-Adhäsions-Assays (Messung der Adhäsionsstärke)

Aus einer 96-*Well*-Platte wurden die einzelnen *Wells* herausgeschnitten, sodass diese in 1,5ml-Reaktionsgefäße passten. In die isolierten Einzel-*Wells* wurden genau gleiche Zellzahlen (1000 – 5000) der jeweiligen Klone ausgesät und über Nacht zur Adhäsion in Kulturmedium inkubiert. Am folgenden Tag wurden die einzelnen *Wells* mit den adhärenierten Zellen vollständig mit Kulturmedium gefüllt und so mit der Öffnung voraus in ebenfalls mit Medium gefüllte 1,5ml-Reaktionsgefäße gesteckt, dass die Zellen luftblasenfrei unter Medium

lagen. Nun wurden die Zellen in einer Eppendorf 5415 D Zentrifuge für eine Minute so zentrifugiert, dass die Zentrifugalkräfte den Adhäsionskräften der Zellen entgegen wirkten. Die Δg -Assays wurden mit 3000 bis 6000 g in 500 g-Intervallen ($1 \text{ g} \sim 9,81 \text{ m/s}^2$) durchgeführt. Jedes *Well* wurde nur bei einer g-Zahl zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation im *Well* verbliebenen Zellen wurden mit der Zellfärbelösung durch 5-minütige Inkubation fixiert und gefärbt. Die Quantifizierung der nicht abgelösten Zellen erfolgte durch Mikroskopie.

3.4.4.3 Migrations- und Invasions-Assays

3.4.4.3.1 Vorbereitung der Gelatine Filter

Die Filter für die Migrations-Assays im Boydenkammer-Modell wurden mit Gelatine beschichtet, um den Zellen die Adhäsion zu erleichtern. Dazu wurden die Filter 20 min in 0,5%iger Essigsäure bei 50°C langsam gerührt, im Faltenfilter abfiltriert und zweimal mit Wasser gespült. Anschließend wurden die Filter eine Stunde in einer Gelatine-Lösung (5 mg/l) gekocht, wieder einzeln auf Papier ausgelegt und eine Stunde bei 100°C getrocknet.

3.4.4.3.2 Herstellung des F5-Fibroblastenüberstandes

Die F5-Fibroblasten wurden freundlicherweise von Anja Bosserhoff zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in DMEM mit 10 % (v/v) FKS im Brutschrank kultiviert, bis diese konfluent waren. Die konfluenten F5-Fibroblasten wurden mit PBS gewaschen und für 24 Stunden mit serumfreiem DMEM im Brutschrank kultiviert. Anschließend wurde F5-Fibroblastenüberstand abgenommen und in 2ml-Aliquots bei -20°C gelagert.

3.4.4.3.3 Durchführung der Assays

Die Migrations- und Invasions-Assays wurden in der Boydenkammer durchgeführt. In dieser sind zwei Kompartimente durch einen porösen (8 μm Porenweite) PVDF-Filter voneinander getrennt. Das obere Kompartiment enthielt 1 ml serumfreies DMEM und die zu testenden Zellen, das untere 360 μl F5-Fibroblastenüberstand, der als Attraktant wirkte. Der Filter war im Falle der Migration zuvor mit Gelatine beschichtet worden (siehe 3.4.4.3.1), damit die Zellen adhäreren konnten. Bei den Migrations-Assays konnten die Zellen ohne proteolytische Aktivität zum Attraktant gelangen, bei der Invasion wurde der Filter mit 30 μl 1:3 verdünntem Matrigel, einer künstlichen Basalmembran überschichtet, welche die Zellen nur durch proteolytische Aktivität durchdringen konnten (Abb. 3.5). Die eingesetzten Zellen

waren am Vortag gesplittet worden, und je Klon und Kammer wurde die gleiche Zellzahl (5000 bis 100 000) eingesetzt. Nach 16 bis 20 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen, die den Filter überwunden hatten und auf der Attraktant-zugewandten Seite lagen, durch 5-minütige Inkubation mit Zellfärbelösung fixiert und gefärbt. Die Quantifizierung der migrierten beziehungsweise invadierten Zellen erfolgte durch Mikroskopie.

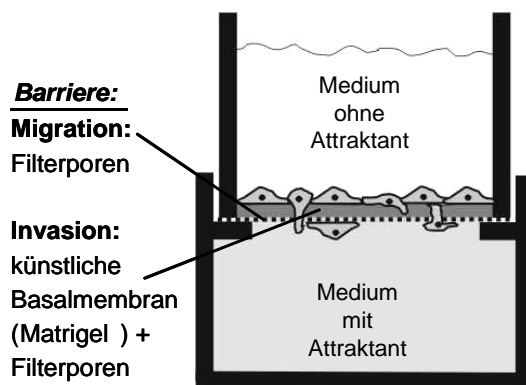


Abb. 3.5: Schematischer Aufbau der Boydenkammer. Um vom Medium ohne Attraktant (serumfreies DMEM) zum Medium mit Attraktant (F5 Fibroblastenüberstand) zu gelangen, müssen die Zellen bei Migrations-Assays die Poren des Filters passieren und bei Invasions-Assays eine Schicht aus künstlicher Basalmembran (Matrigel) durchdringen.

3.4.4.4 Proliferations-Assays

Zur Bestimmung der Proliferation wurden je Zellklon zwei verschiedene Zellkonzentrationen (3000 Zellen/Well und 6000 Zellen/Well) in 96-Well-Platten ausgesät. Die Zelldichte wurde nach 24 h Zeitintervallen mit Hilfe des XTT Cell Proliferation Kits (Roche) nach den Angaben des Herstellers bestimmt. Dabei erfolgten die Messungen mindestens in Duplikaten. Die 24h-Wachstumskonstante k wurde nach der Formel $k = \ln(\text{Wert nach } t + 24 \text{ h}) - \ln(\text{Wert nach } t)$ bestimmt. Die 24h-Proliferationsrate K ($N_{24h} = N_0 * K$) gibt den Faktor an, um den sich die Zellzahl während 24 Stunden vermehrt.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der SPSS Version 13.0 Software (SPSS Inc., Chicago, USA). Dabei wurde die statistische Korrelation von Parametern mit dem exakten Test nach Fisher untersucht. Bei nicht-parametrischen Signifikanztests von zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Die statistische Analyse von mehr als zwei Gruppen erfolgte mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test. Überlebenskurven wurden nach der Methode von Kaplan-Meier berechnet. Ein P -Wert kleiner als 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

4.1 Auswahl und Verifizierung dysregulierter Gene in CRC

Von allen Kandidatengenen mit einer tumorspezifischen Genexpression wurden folgende Gene, mit einem besonders hohen Grad der Fehlregulierung, für weiterführende molekulare Untersuchungen ausgewählt:

- *ACE2* (*angiotensin I converting enzyme 2*; Probenname 219962_at, gb:NM_021804.1)
- *CYP2B6* (*cytochrome P450, subfamily IIB (phenobarbital-inducible) polypeptide 6*, Probenname 206755_at und 206754_s_at, gb:NM_000767.2)
- *PTIX2* (*paired-like homeodomain transcription factor 2*, Probenname 207558_s_at, gb:NM_000325.1)
- *CDH3* (*cadherin 3, P-Cadherin*, Probenname 203256_at, gb:NM_001793.1)
- *SERPINB5* (*serine proteinase inhibitor clade B member 5*, Maspin, Probenname 204855_at, gb:NM_002639.1)

Zunächst erfolgte eine Verifizierung der *Array*-Expressionsdaten durch eine *real-time* PCR. Bei der *real-time* PCR dienten cDNA Pools, die äquivalente Mengen cDNA aus MSS* Tumoren bzw. MSI* Tumoren und entsprechenden Normalmucosae enthielten, als *Templates*. Als Kalibrator wurde die MSI CRC-Zelllinie HCT116 verwendet, und als Referenzgen diente *TAX1BP1*. Die relative, normalisierte Transkription (RNT) gibt das auf den Kalibrator normalisierte, relative Verhältnis Zielgen/Referenzgen wider. Da die absoluten Werte der *Array*-Signale mit denen der relativen Quantifizierung der *real-time* PCR nicht vergleichbar sind, wurden die Ratios der Werte gebildet und in Abb. 4.1.1 graphisch dargestellt. Die Ratios der mittels *real-time* PCR ermittelten Expressionsdaten der cDNA Pools spiegelten die entsprechenden Ratios der *Array*-Signale der Gene *ACE2*, *CYP2B6*, *PITX2* und *CDH3* wider (Abb. 4.1.1).

Die *real-time* PCR-Analysen der Pools zeigten bei Maspin insgesamt eine 8,4-fache Überexpression in den CRC. Verglichen zum entsprechenden Normalmucosa Pool war im MSI Pool die Maspinexpression 12,4-fach und im MSS Pool 3,3-fach erhöht.

(Tab. 4.2.1; Abb. 4.2.1 auf Seite 45).

***Anmerkung:** Die hochgradige Mikrosatelliteninstabilität (MSI-H) wird im Folgenden als MSI bezeichnet, Tumore mit geringer Mikrosatelliteninstabilität (MSI-L) werden mit den mikrosatellitenstabilen (MSS) Tumoren zusammengefasst und als MSS Tumore bezeichnet.

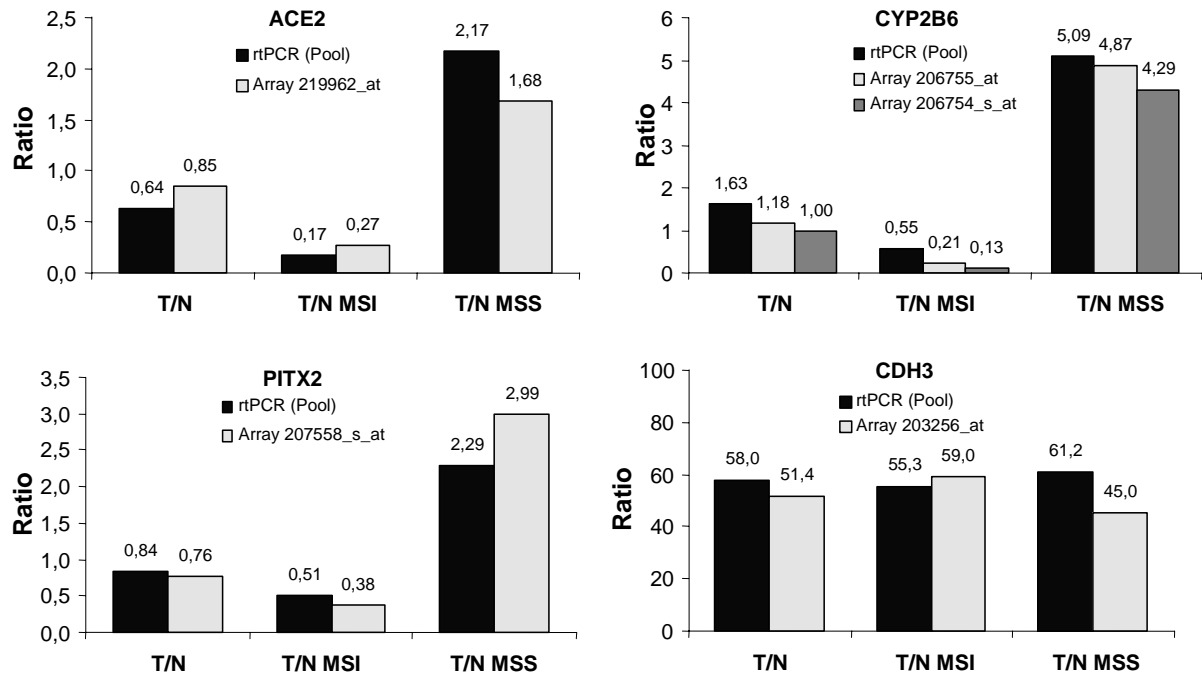


Abb. 4.1.1: Verifizierung der Array-Daten mittels *real-time* PCR an cDNA-Pools. Untersucht wurde die transkriptionelle Expression der Gene *ACE2* (a), *CYP2B6* (b), *PITX2* (c) und *CDH3* (*P-Cadherin*) (d). Die Ratios der jeweiligen medianen Array-Signale der Tumore (T) und Normalmucosae (N) wurden mit den Ratios der entsprechenden RNT-Werte der cDNA-Pools verglichen, die mittels *real-time* PCR ermittelt wurden.

4.2 Maspin

Bei der Analyse der *Array*-Daten trat das Gen *SERPINB5* (*serine proteinase inhibitor clade B member 5*, Probenname 204855_at, gb:NM_002639.1) besonders auffällig in Erscheinung, da es in normaler Mucosa sehr niedrig exprimiert wurde, während in CRC Maspin 14,4-fach überexprimiert wurde. Verglichen mit der Maspinexpression in den jeweiligen Normalgeweben war die Expression in den MSI CRC 31,5-fach, in den MSS CRC 3,2-fach erhöht. Maspin wurde in MSI CRC 6,4 mal höher exprimiert, als in MSS CRC und war damit eines der in MSI CRC und MSS CRC am unterschiedlichsten exprimierten Gene.

4.2.1 Weitergehende Verifizierung der Maspin-Array-Daten an Einzelproben

Die Verifizierung der Maspinexpression aus den *Array*-Daten erfolgte zusätzlich durch relative Quantifizierungen mit cDNAs einzelner Tumorproben durch *real-time* PCR. Die statistische Analyse erfolgte mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test.

Die *real-time* PCR-Analyse der Maspinexpression bei den Einzelproben bestätigte die Ergebnisse der *Array*-Untersuchungen, und die mathematischen Pools der Einzelproben spiegelten die Ergebnisse aus den cDNA Pools wider (Abb. 4.2.1, Tab. 4.2.1).

Die Untersuchungen der Einzelproben zeigten bei Normalmucosae (n=40) fehlende oder sehr niedrige Maspinexpression (mediane RNT: 0,15). Die Maspinexpression des Kalibrators HCT116 überschritten nur vier Normalmucosae geringfügig (RNT > 1). Die mediane Maspinexpression der Tumore (n=40; mediane RNT: 1,15) lag um den Faktor 7,90 über der der Normalmucosae ($P_{T \text{ vs. } N} < 0,000$). Bei den MSI Tumoren (n=19, mediane RNT: 4,30) war Maspin 26,88-fach überexprimiert ($P_{T \text{ MSI vs. } N \text{ MSI}} < 0,000$), bei den MSS Tumoren (n=21) 4,86-fach (mediane RNT: 0,68; $P_{T \text{ MSS vs. } N \text{ MSS}} < 0,000$). Somit war die Maspinexpression in den MSI Tumoren um den Faktor 6,32 höher als in den MSS Tumoren ($P_{T \text{ MSI vs. } T \text{ MSS}} < 0,001$) (Abb. 4.2.2, Tab. 4.2.1). Die Normalmucosae von MSI und MSS Patienten zeigten keine signifikanten Unterschiede ($P_{N \text{ MSI vs. } N \text{ MSS}} = 1,000$). Alle Tumore zeigten eine höhere Maspinexpression als die jeweiligen Normalmucosae.

Patientengewebe	Array [FE]	cDNA Pools	Median Einzelproben
		[RNT]	[RNT]
N gesamt	303,95	0,23	0,15
N MSS	368,05	0,19	0,14
N MSI	239,85	0,27	0,16
T gesamt	4375,00	1,94	1,15
T MSS	1187,00	0,62	0,68
T MSI	7562,30	3,25	4,30
Ratios			
T/N gesamt	14,39	8,41	7,63
T/N MSS	3,23	3,26	4,86
T/N MSI	31,53	12,04	26,88

Tab. 4.2.1: Maspinexpression in CRC. N: Normale Mucosa, T: Tumor, FE: Mediane der Fluoreszenzeinheiten, RNT: relative, normalisierte Transkription. (jeweils Mediane). Die relative normalisierte Transkription (RNT) gibt die Expression eines Zielgenes relativ zur entsprechenden Expression in dem hier verwendeten Kalibrator HCT116 an.

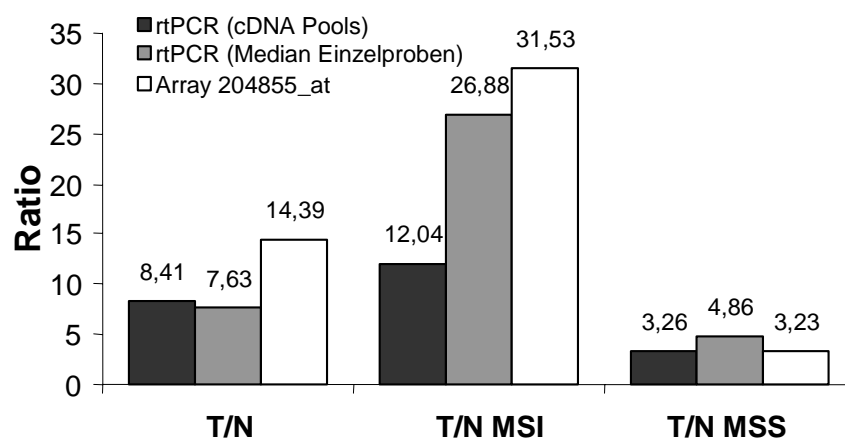


Abb. 4.2.1: Analyse der Maspinexpression mittels Array, real-time PCR mit cDNA-Pools bzw. Einzelproben. Die Ratios der jeweiligen medianen Array-Signale der Tumore (T) und Normalmucosae (N) wurden mit den Ratios der entsprechenden RNT-Werte der cDNA-Pools und den Medianen der RNT-Werte der Einzelbestimmungen verglichen. rtPCR: *real-time* PCR.

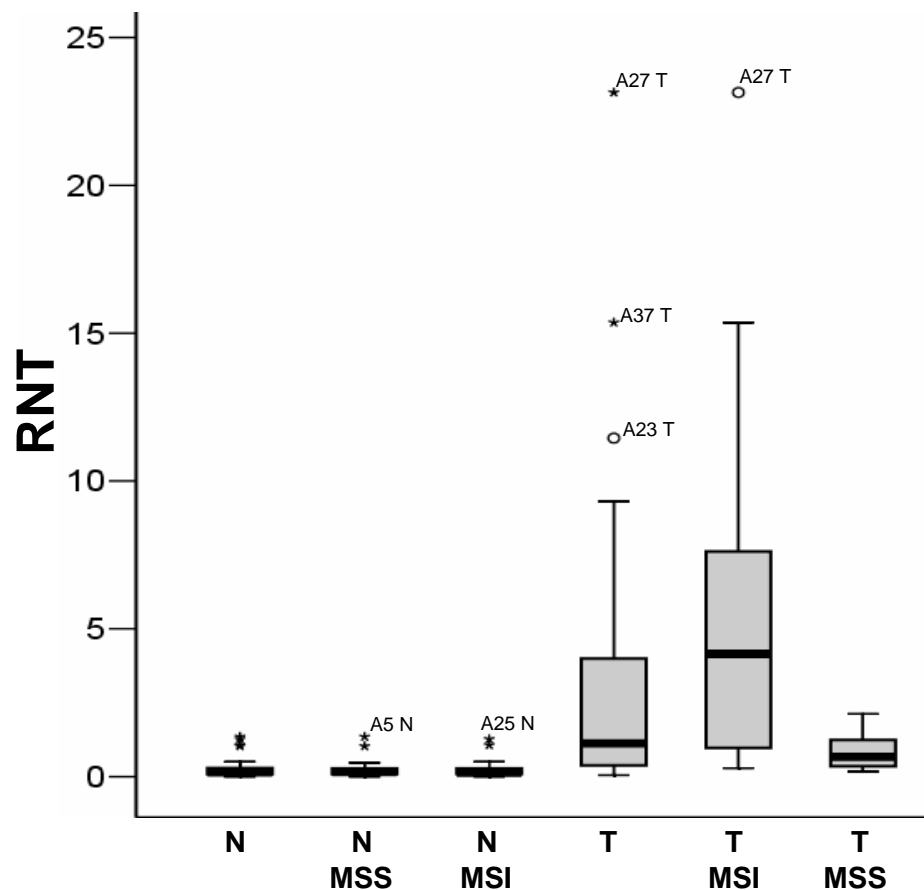


Abb. 4.2.2: Analyse der Maspinexpression in CRC mittels *real-time* PCR mit cDNA-Einzelproben. Der graue Bereich der Boxplots zeigt den Interquartilbereich (25. - 75. Perzentil). Die Schwarze Linie in den Boxen entspricht dem Median, die Enden der Antennen bezeichnen das 10. und 90. Perzentil. Ausreißer sind mit “o” und Extremwerte mit “*” indiziert. RNT: relative, normalisierte Transkription. N: Normal, T: Tumor.

4.2.2 Maspin-Proteinexpression in CRC

Zur Untersuchung der Maspinexpression auf Proteinebene dienten Gewebelysate, die mittels *Western-Blots* untersucht wurden. Auf Proteinebene spiegelten die *Western-Blots* das transkriptionelle Expressionsmuster wider. Die untersuchten Normalmucosae waren Maspin-negativ bis sehr schwach, wie auch Tumore mit einem RNT-Wert kleiner $\sim 0,5$. Bei Tumoren mit RNT-Werten größer $\sim 0,5$ ist eine Maspin-Bande gut sichtbar (Abb. 4.2.3).

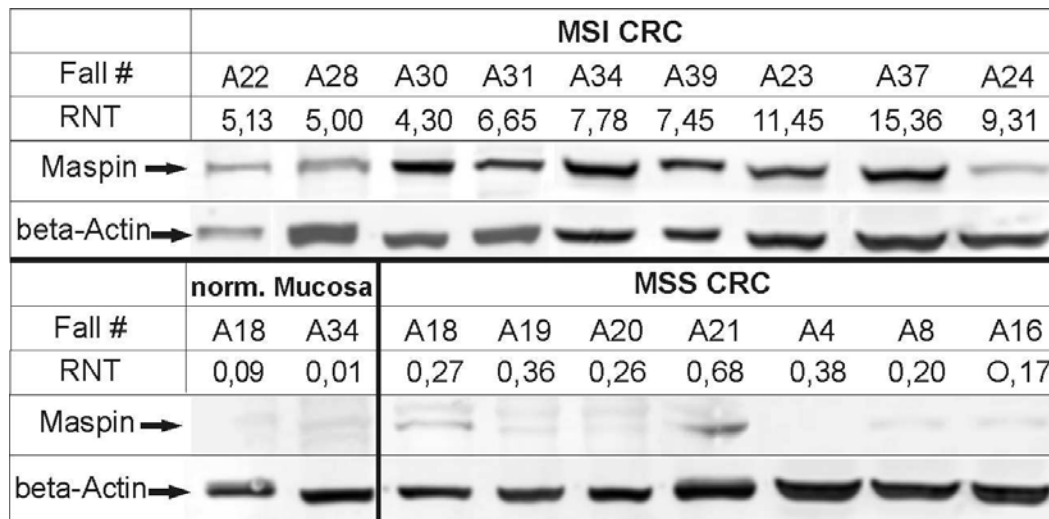


Abb. 4.2.3: Maspin-Proteinexpression in Kolonmucosa und in CRC. Der Maspingehalt von neun MSI und sieben MSS Tumor-Lysaten sowie von zwei Normalmucosae-Lysaten wurde mittels *Western-Blot* analysiert. Als Ladekontrolle wurde beta-Actin gefärbt. RNT: relative, normalisierte Transkription.

4.2.3 Maspinexpression in CRC-Zelllinien

Um zu überprüfen, ob sich der Trend zu MSI assoziierter Maspin-Überexpression auch in CRC-Zelllinien fortsetzt, wurden drei MSI CRC Zelllinien (SW48, LoVo und HCT116) und drei MSS CRC-Zelllinien (HT29, SW480 und CaCo-2) untersucht.

4.2.3.1 Quantifizierung der Maspinexpression in CRC-Zelllinien

Auf Transkriptionsebene zeigten die MSI Zelllinien mit einer mittleren RNT von 3,62 eine deutlich höhere Maspinexpression, als die MSS Zelllinien mit einer mittleren RNT von 0,13. CaCo-2 war vollständig Maspin-negativ (Abb. 4.2.4a). Damit übertraf die mittlere Expression der MSI Zelllinien die der MSS Zelllinien um das 27,9-fache. Das transkriptionelle Expressionsmuster spiegelte sich auf Proteinebene wider: Die *Western-Blot*-Analyse detektierte bei den MSI Zelllinien eine deutlich stärkere Maspinexpression, als bei den MSS Zelllinien, CaCo-2 war Maspin-negativ (Abb. 4.2.4b).

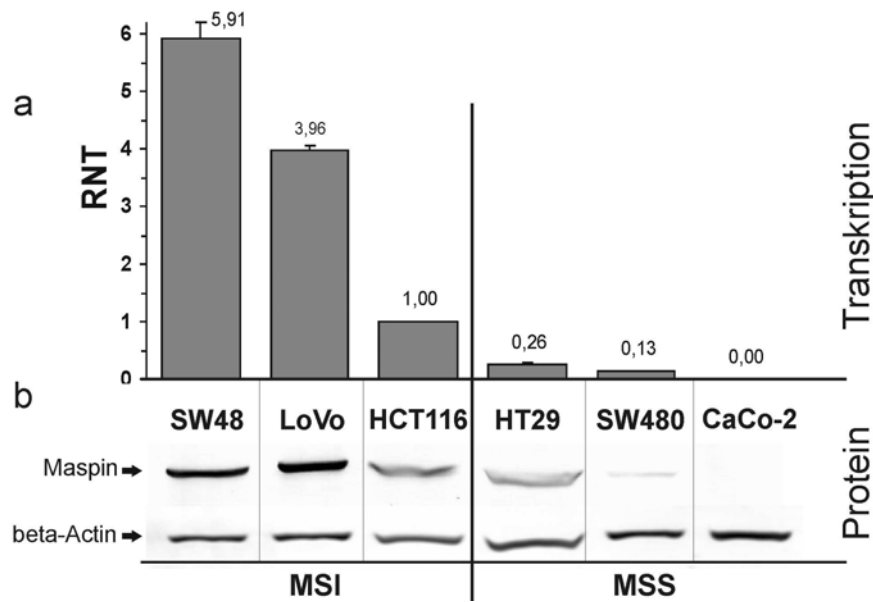


Abb. 4.2.4: Maspinexpression in MSI und MSS CRC-Zelllinien. (a) Transkriptionelle Maspinexpression. **(b)** Maspin-Proteinexpression. RNT : relative, normalisierte Transkription.

4.2.3.2 Verteilung und Lokalisation von Maspin in CRC-Zelllinien

Die Verteilung und subzelluläre Lokalisation wurde in den CRC-Zelllinien SW48, LoVo, HCT116, HT29 und SW480 mittels Immunocytochemie (ICC) untersucht. Die ICC zeigte in allen fünf untersuchten Zelllinien ungleichmäßige Verteilung. Einige Zellen waren sehr stark gefärbt, andere schwach oder negativ. Bei allen Zelllinien war die Färbung vorwiegend zytoplasmatisch und kaum nukleär. Ein Großteil der HCT116-Zellen war schwach bis negativ gefärbt, aber einige überdurchschnittlich große, mehrkernige Zellen zeigten starke, wiederum zytoplasmatische Maspinfärbung (Abb. 4.2.5).

Um die subzelluläre Lokalisation in den stärker Maspin-exprimierenden MSI Zelllinien genauer zu untersuchen, wurden Zytoplasma-, Zytoplasmamembran-, Zellkern- und Zytoskelett-Proteine getrennt voneinander isoliert und mittels *Western-Blot*-Analyse auf deren Maspingehalt analysiert. Dabei war der Gesamtproteingehalt der Fraktionen der einzelnen Zelllinien äquibriert. Bei allen MSI CRC-Zelllinien waren die stärksten Maspin-Banden in den Zytoplasma- und Membranfraktionen. Nur die Kernfraktionen von SW48 und LoVo zeigten je eine schwache Maspin-Bande, wie auch die Zytoskelettfraktionen aller untersuchten MSI CRC-Zelllinien (Abb. 4.2.6).

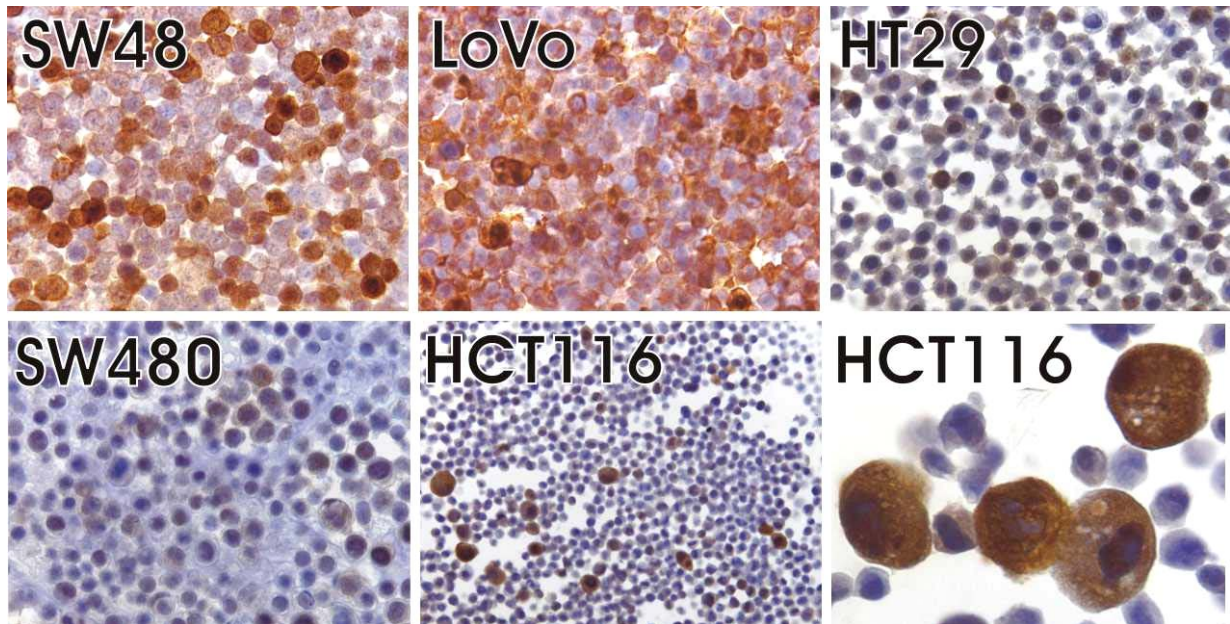


Abb. 4.2.5: Maspin-IHC von CRC-Zelllinien. Bei den CRC-Zelllinien wurde Maspin nach Fixierung immunhistochemisch nachgewiesen. Bei SW48, LoVo, HT29 und SW480 erfolgten die Aufnahmen in 40-facher, bei HCT116 in 10-facher bzw. 100-facher (rechts unten) Vergrößerung.

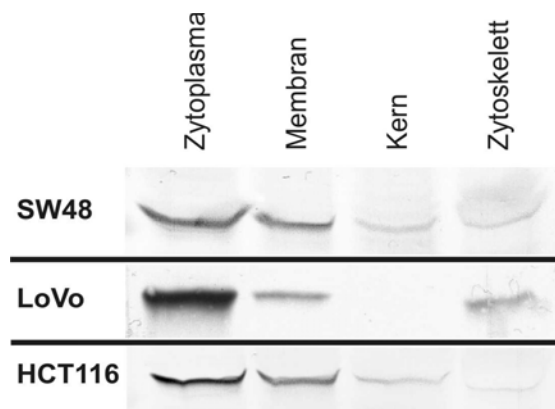


Abb. 4.2.6: Maspin-Western-Blot mit Zellkompartimentfraktionen von SW48, LoVo und HCT116. Die Zellkompartimentfraktionen enthielten je Zelllinie äquivalente Konzentrationen an Gesamtprotein.

4.2.4 Immunhistochemische Färbungen von CRC-Tumoren

Die Verteilung, Bedeutung und Lokalisation von Maspin in CRC wurde *in situ* auf subzellulärer Ebene in Gewebeschnitten von 202 CRC immunhistochemisch untersucht.

Stroma und tumorinfiltrierende Lymphozyten zeigten negative Maspinfärbung. Insgesamt zeigten 77,2 % (156/202) CRC eine starke Maspinfärbung, wobei die Färbung in allen Normalmucosae negativ bis sehr schwach war. In 75,5 % (120/159) MSS Tumoren und in 85,4 % (35/41) MSI Tumoren war eine positive Maspinfärbung zu beobachten.

Auf subzellulärer Ebene waren bei 54,5 % (110/202) der Tumoren die Zellkerne stark gefärbt, das Zytoplasma bei 78,7 % (159/202).

Innerhalb der MSS Gruppe zeigten 50,3 % (80/159) der Tumore positive nukleäre Färbung und 72,3 % (115/159) der Tumore zeigten eine positive Zytoplasmafärbung. Bei den MSI Tumoren war die Kernfärbung mit 73,2 % (30/41) kernpositiver Tumorzellen häufiger ($p = 0,013$), verglichen mit 78 % (32/41) der MSI Tumore mit zytoplasmatischer Maspinfärbung. Der Grad der Zelldifferenzierung korrelierte mit der subzellulären Maspinexpression: Gut differenzierte Tumorzellen wiesen meist eine schwache und zytoplasmatische Maspinfärbung auf, während eine starke Kernfärbung vorwiegend in dedifferenzierten Tumoren und entlang der Invasionsfront zu beobachten war (Abb. 4.2.7). Die starke Maspinexpression der Invasionsfront war bei 156 der gesamten 202 (77 %) Tumore zu beobachten. Auch in 46 der 92 als nukleär Maspin-negativ klassifizierten Tumore zeigten sich an der Invasionsfront positiv gefärbte Tumorzellen, die aber weniger als 10 % der gesamten Tumorzellen ausmachten. Starke Maspinfärbung korrelierte signifikant mit geringer Differenzierung ($p = 0,006$), aber nicht mit Tumor-Stadium und Lymphknotenstatus (Tab. 4.2.2).

Variable	Nukleäre Maspinfärbung			Zytoplasmatische Maspinfärbung				
	n analysierbar	pos.	neg	P^a	n analysierbar	pos.	neg	P^a
gesamt (n=202)	202	110	92		202	159	44	
Klinisch-pathologische Daten:								
Tumor Stadium ^b								
pT1 oder pT2	30	16	14	0,959	30	22	8	1,000
pT3	121	63	58		121	87	34	
pT4	49	27	22		49	35	14	
Lymphknotenstatus								
pN0	28	12	16	0,419	28	16	12	0,152
pN1	106	58	48		106	80	26	
pN2 oder pN3	66	38	28		66	50	16	
Histologischer Grad								
G2	116	52	64	0,006	116	80	36	0,422
G3	80	52	28		80	60	20	
Molekulare Daten								
Microsatelliteninstabilität								
MSS	159	80	79	0,013	159	115	44	0,554
MSI	41	30	11		41	32	9	

Tab. 4.2.2: Klinisch-pathologische und molekulare Daten bezogen auf die Maspin-IHC. ^a P Werte aus zweiseitigem Fisher Exact Test. ^b Stadiumeinteilung entspricht der TNM-Klassifizierung maligner Tumore von Sobin *and* Wittekind, *TNM classification of malignant tumors*. New York, NY: Wiley-Liss, Inc., 2002. Bei Fettdruck ist $p < 0,05$.

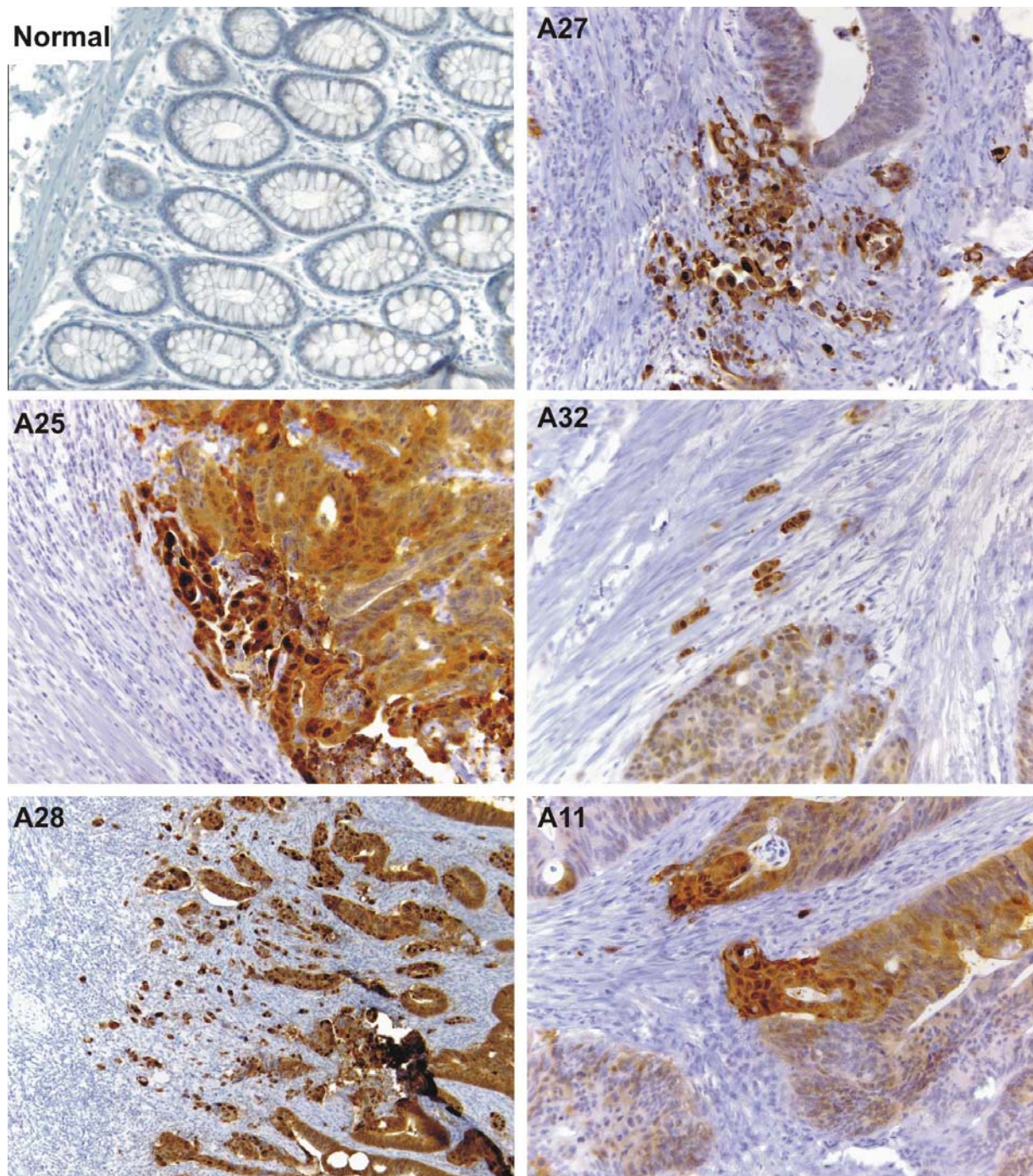


Abb. 4.2.7: Maspin-IHC von CRC. Das Stroma ist Maspin-negativ, normale Kolonmucosa negativ bis schwach gefärbt. Infiltrierende Tumorzellen und Tumorzellen der Invasionsfront zeigen starke Maspinfärbung im Zytoplasma und besonders auch im Kern. Vergrößerung 400-fach (bei A28 100-fach).

4.2.5 Prognostische Bedeutung der Maspinexpression für Kolonkarzinom-Patienten

Um den prognostischen Wert der Maspinexpression in Kolonkarzinomen zu untersuchen, wurden die Ergebnisse der Maspin-IHC von 172 Kolonkarzinomen im Stadium III [Lymphknotenmetastase(n) aber keine Fernmetastase(n)] in einer retrospektiven Studie mit verschiedenen klinischen Parametern korreliert. Besonderes Augenmerk galt dabei der Korrelation zwischen Maspinexpression, subzellulärer Lokalisation und dem Krankheitsverlauf sowie dem Ansprechen auf eine 5-Fluoruracil-basierte Chemotherapie. Von diesen 172 Kolonkarzinom-Patienten waren 76 nur chirurgisch behandelt worden, 96 Patienten hatten zusätzlich eine adjuvante, 5-FU-basierte Chemotherapie erhalten.

Die IHC lieferte in 94,2 % (62/172) der Fälle auswertbare Ergebnisse. Kernfärbung zeigten 52,3 % (90/162), die zytoplasmatische Färbung war in 71,5 % (123/162) der Fälle positiv. Eine nukleäre Maspinfärbung korrelierte signifikant mit höherem Tumorgrad ($p = 0,020$), aber nicht mit dem Alter der Patienten oder mit der Infiltrationstiefe. Die zytoplasmatische Maspinfärbung zeigte keine signifikanten Korrelationen mit klinisch-pathologischen oder molekularen Variablen.

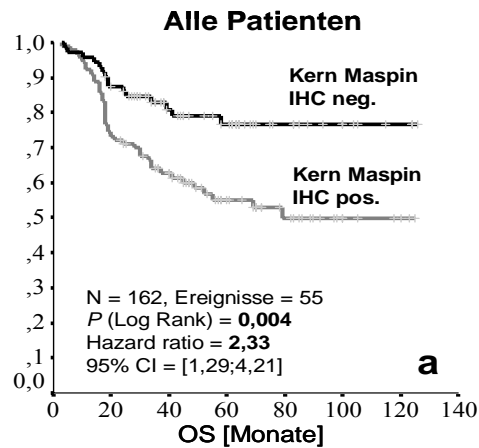
Univariable Analysen ergaben, dass nur nukleäre Maspinexpression ($p = 0,0039$), Alter über 70 Jahre ($p = 0,0016$) und die Tumortiefe ($p = 0,0034$) signifikant mit kürzerem Gesamtüberleben (*overall survival*, OS) assoziiert waren. Eine adjuvante 5-FU-Chemotherapie korrelierte mit längerem OS ($p = 0,0013$). Signifikante Korrelationen mit OS ergaben sich bei den 5-FU behandelten Patienten nur mit Tumortiefe ($p = 0,0443$) und in den nicht chemotherapierten Patienten für ein Alter über 70 Jahre ($p = 0,0077$) und Maspinexpression ($p < 0,000$) (Tab. 4.2.3).

Im Kaplan-Meier-Test zeigte sich, dass nukleär Maspin-negative Kolonkarzinom-Patienten eine schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit haben, als nukleär positive ($P_{\text{Log Rank}} = 0,004$; *Hazard Ratio* = 2,33). Unterscheidet man Patienten mit und ohne 5-FU-Chemotherapie, zeigten nukleär negative Patienten mit Chemotherapie in etwa gleich gutes OS wie Patienten ohne Chemotherapie ($P_{\text{Log Rank}} = 0,91$; *Hazard Ratio* = 0,94). Nukleär positive Patienten haben dagegen ohne Chemotherapie eine sehr schlechte Überlebenswahrscheinlichkeit, die sich aber stark verbesserte, wenn diese Patienten eine Chemotherapie erhielten ($P_{\text{Log Rank}} = 0,0004$; *Hazard Ratio* = 0,34). Somit hat positive Maspinfärbung des Zellkernes in Kolonkarzinomen einen prädiktiven Wert für gutes Ansprechen auf 5-FU-basierte Chemotherapie. Nukleär Maspin-negative Patienten profitieren dagegen nicht von einer Chemotherapie (Abb. 4.2.8).

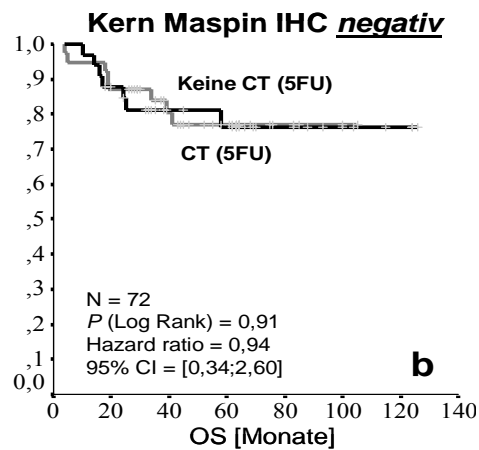
Variable Charakteristika	Tumor-bedingter Tod gesamt			Tumor-bedingter Tod 5-FU behandelt			Tumor-bedingter Tod nicht 5-FU behandelt		
	n	Ereignisse	<i>P</i> ^a	n	Ereignisse	<i>P</i> ^a	n	Ereignisse	<i>P</i> ^a
Chemotherapie									
gesamt	172	61	0,0003						
5-FU behandelt	110	28							
nicht 5-FU behandelt	62	33							
Klinisch-pathologische Daten									
Alter bei Diagnose									
<45 Jahre	7	2	0,0074	6	1	0,5714	1	1	0,0218
45-69 Jahre	93	24		66	15		27	9	
>69 Jahre	72	35		38	12		34	23	
Tumor Stadium ^b									
pT1 oder pT2	21	4	0,0034	12	1	0,0190	9	3	0,3980
pT3	104	30		74	14		30	15	
pT4	45	25		23	11		22	14	
Histologischer Grad									
G2	103	32	0,2331	69	14	0,1713	34	18	0,9427
G3	62	25		39	12		23	13	
Molekulare Charakteristika									
Maspin IHC (Kernfärbung)									
negativ	72	15	0,0039	47	8	0,2355	25	7	0,0014
positiv	90	40		59	17		31	23	

Tab. 4.2.3: Univariate Analyse prognostischer Faktoren im Zusammenhang mit Gesamtüberleben (*overall survival*; OS). ^a *P* Werte aus zweiseitigem Fisher-Test. ^b Stadiumeinteilung entsprechend der TNM-Klassifizierung maligner Tumore von Sobin and Wittekind, *TNM classification of malignant tumors*. New York, NY: Wiley-Liss, Inc., 2002. Bei **Fettdruck** ist $p < 0,05$.

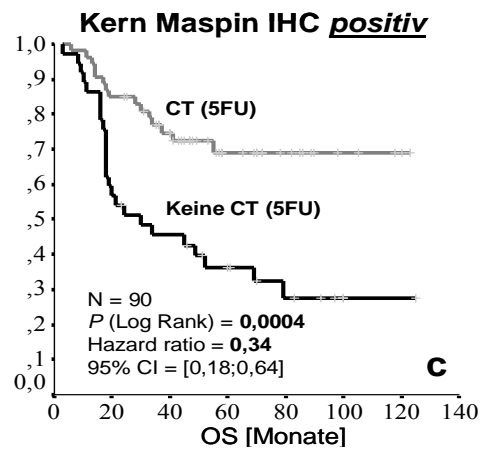
Abb. 4.2.8 auf folgender Seite: Einfluss nukleärer Maspinexpression auf das Überleben von Kolonkarzinom-Patienten mit und ohne Chemotherapie (Kaplan-Meier-Test). (a) Alle Patienten mit positiver und negativer Maspin-Kernfärbung. (b) und (c) Analyse der Untergruppen mit negativer (b) oder positiver (c) Maspin-Kernfärbung im Zusammenhang mit adjuvanter, 5-FU-basierter Chemotherapie. Die Zahlen unter den Diagrammen geben die Zahl der zum jeweiligen Zeitpunkt noch lebenden Patienten an. CT: Chemotherapie, OS: Gesamtüberleben (*overall survival*), 5FU: 5-Fluoruracil, CI: Konfidenzintervall, pos.: positiv, neg.: negativ, no 5-FU: keine 5-FU-Chemotherapie.



Maspin pos.	90	66	48	27	16	5	2	0
Maspin neg.	72	61	41	31	13	6	3	0



5FU:	39	27	18	16	9	5	3	0
no 5FU:	39	34	23	15	4	1	0	0



5FU:	37	21	16	10	6	2	1	0
no 5FU:	53	45	32	17	10	4	1	0

4.2.6 Regulation der Maspinexpression

4.2.6.1 Analyse der Promotormethylierung in CRC-Zelllinien

Um zu überprüfen, ob der Regulation der Maspinexpression ein epigenetischer Mechanismus zugrunde liegt, wurde der Methylierungsstatus des Maspinpromotors analysiert. Dazu wurde genomische DNA aus CRC-Zelllinien, Kolonmucosa und Tumoren mit Bisulfit modifiziert und mit Hilfe der Masp-TaqI-Primer ein 371bp-Fragment des regulatorischen Bereiches des Maspinpromotors (-361 bis +10 ausgehend vom Transkriptionsstart) amplifiziert. Die Restriktion an den vier *TaqI*-Schnittstellen innerhalb des Promotorfragmentes, die nur in methyliertem Zustand erhalten blieben, wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese untersucht. Die Promotorfragmente der CRC-Zelllinien SW48, LoVo, HCT116, HT29 und SW480, die alle Maspin exprimierten, blieben unverdaut und zeigten daher keine Promotormethylierung.

Der vollständige Abbau der Promotorfragmente der Maspin-negativen CRC-Zelllinie CaCo-2 zeigte Hypermethylierung aller vier *TaqI*-Schnittstellen (Abb. 4.2.9).

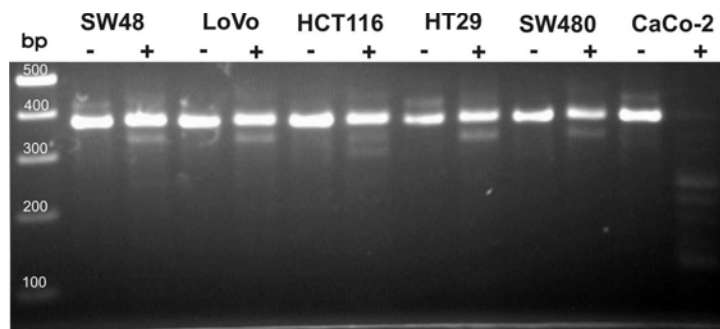
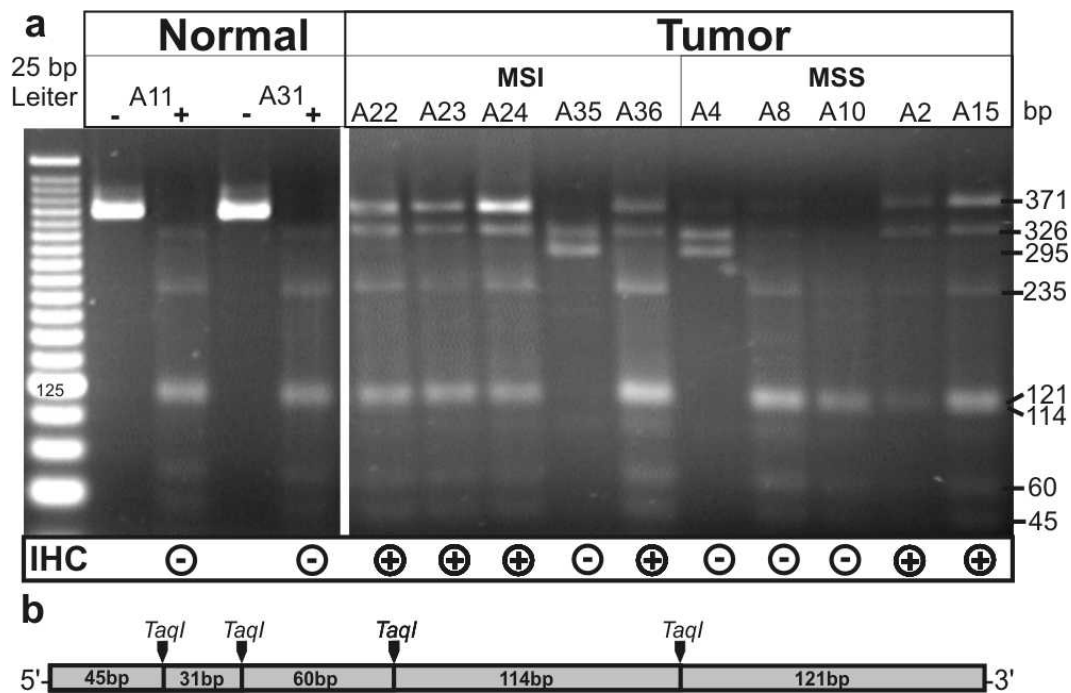


Abb. 4.2.9: Methylierungsanalyse verschiedener CRC-Zelllinien. Die Maspinpromotorfragmente der CRC-Zelllinien wurden aus Bisulfit-modifizierter DNA mittels PCR amplifiziert und mit der Restriktionsendonuklease *TaqI* behandelt (+). Als Kontrolle wurde jeweils die gleiche Menge unbehandeltes PCR-Produkt (-) eingesetzt. Gleiche Mengen von behandelten und unbehandelten Promotorfragmenten wurden durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Ursprünglich methylierte Promotorfragmente hatten *TaqI*-Schnittstellen und wurden durch *TaqI*-Behandlung abgebaut, ursprünglich aktive, unmethylierte Promotorfragmente blieben erhalten.

4.2.6.2 Analyse der Promotormethylierung in CRC

Die Methylierungsanalysen des Maspinpromotors von zwei Kolonmucosae- und zehn CRC-Gewebeproben ergab eine methylierungsabhängige Maspinexpression: Promotorfragmente von Kolonmucosae und Tumoren, die schon zuvor in *real-time* PCR-, *Western-Blot*- und IHC-Experimenten eine negative Maspinexpression zeigten (n=4), wurden abgebaut und hatten somit einen methylierten Maspinpromotor. Der unvollständige Abbau der Promotorfragmente aller Maspin-exprimierender Proben demonstrierte deren Hypomethylierung (Abb. 4.2.10). Der partielle Abbau des Promotorfragmentes bei den Maspin-exprimierenden Proben scheint von methylierten Allelen, oder von DNA-Kontaminationen aus methylierten, Maspin-negativen Stromazellen und Immunzellen zu stammen, die während der PCR coamplifiziert wurden.

Abb. 4.2.10 auf folgender Seite: Methylierungsanalysen des Maspinpromotors in Kolonmucosa und CRC. (a) Die Maspinpromotorfragmente der CRC und der normalen Kolonmucosae wurden aus Bisulfit-modifizierter DNA mittels PCR amplifiziert und mit der Restriktionsendonuklease *TaqI* behandelt. Bei den Normalgeweben wurden gleiche Mengen *TaqI*-behandelte (+) und unbehandelte (-) Promotorfragmente, bei den CRC wurde nur *TaqI*-behandelte Promotorfragmente aufgetragen und durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Ursprünglich methylierte Promotorfragmente hatten *TaqI*-Schnittstellen und wurden durch *TaqI*-Behandlung abgebaut, ursprünglich aktive, unmethylierte Promotorfragmente blieben erhalten. In der Box unterhalb des Gels sind die Befunde der Maspin-Immunhistochemie (IHC) mit (+) für positiv und (-) für negativ indiziert. (b) Schematische Darstellung des Maspinpromotors mit den *TaqI*-Schnittstellen und den jeweils entstehenden Fragmenten.



4.2.7 Funktionelle Studien

Die Bedeutung und Auswirkungen der Maspinexpression auf lebende Zellen wurden an zwei CRC-Zelllinien untersucht. Dabei wurden die Effekte von Überexpression und Expressions-Suppression auf Morphologie, Proliferation, Wachstumsverhalten, Adhäsion, Migration und Invasion eingehend untersucht.

4.2.7.1 Maspin-Überexpression

Maspin sollte in der sehr schwach exprimierenden MSS CRC-Zelllinie SW480 und in der Maspin-negativen MSS CRC-Zelllinie CaCo-2 mit Hilfe eines Vektorkonstruktes konstitutiv überexprimiert werden.

4.2.7.1.1 Erstellung des pMS-Vektorkonstruktes aus pcDNA3.1

Der pcDNA3.1 Vektor enthält Resistenzen für Ampicillin und Neomycin zur Selektion. Das *Insert* wird 5' vom CMV-Promotor flankiert, der für starke, konstitutionelle Expression sorgt und 3' von der BGH-Polyadenylierungssequenz, die die Stabilität der mRNA gewährleistet (Abb. 4.2.11). Die Maspin kodierende DNA Sequenz wurde aus cDNA der CRC-Zelllinie SW48 mit der Polymerase *Pfu* mit den Forward MS HindIII- und Reverse MS EcoRI-Primern amplifiziert. Diese Primer enthielten Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Hind* III (Forward-MS HindIII) und *Eco*R I (Reverse-MS EcoRI) zur gerichteten Insertion sowie das

Start- und Stopcodon (Abb. 4.2.11). Das fertige Vektorkonstrukt wurde pMS (Maspin sense) genannt, mit einem Set aus sieben Primern (Reverse-MS EcoRI, Forward-MS HindIII, Masp Insert seq 1, Masp Ins Seq 2, Masp Ins Seq 3, Masp Ins Seq 4, Masp-sense_screen) zur Kontrolle sequenziert und zur Transformation des *E. coli*-Stammes XL2 Blue verwendet.

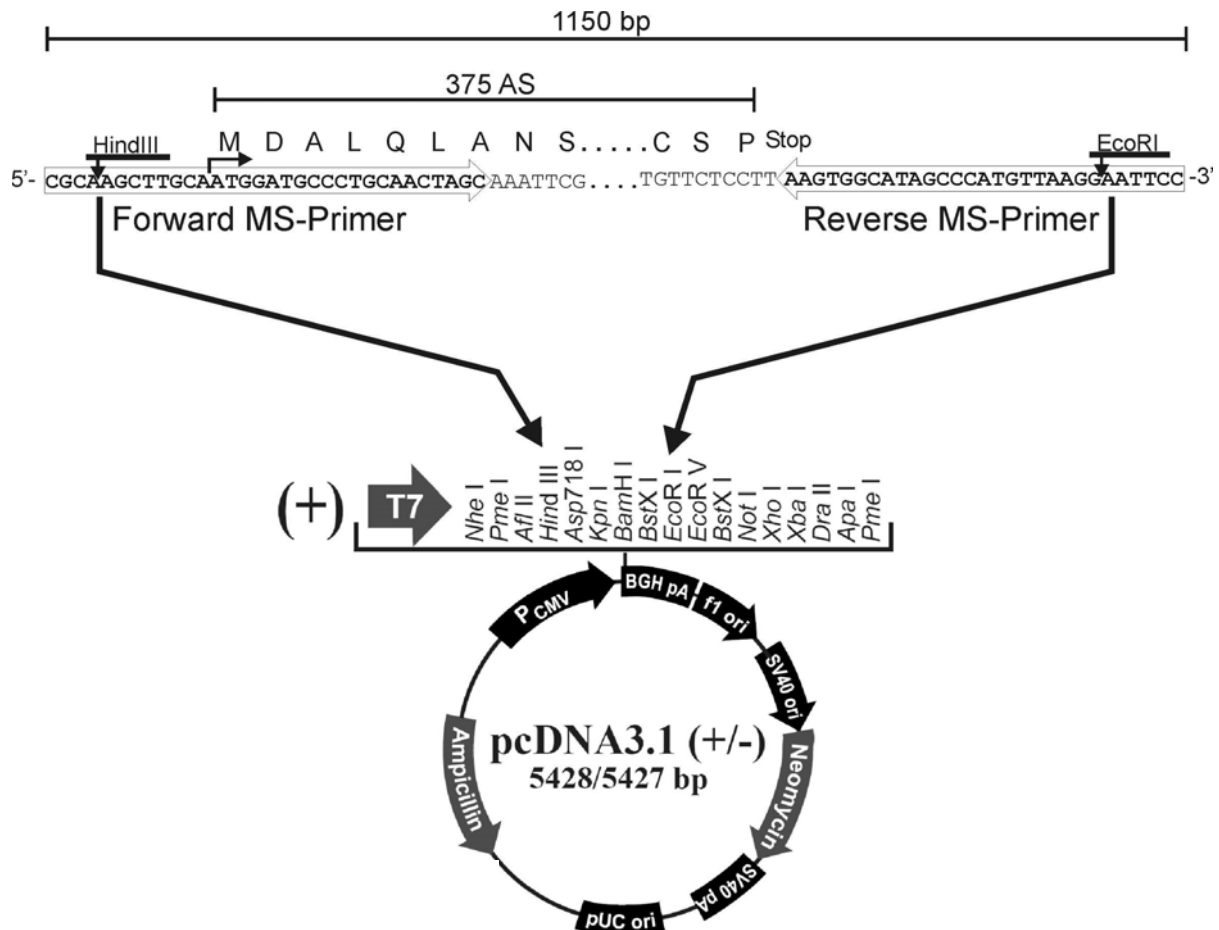


Abb. 4.2.11: Erstellung des pMS-Vektorkonstruktes. Das MS-Insert (1150 bp) mit der Maspin-codierenden Sequenz wurde mit dem MS-Primerpaar (Forward MS + Reverse MS) cDNA von SW48 amplifiziert. Die Primer enthielten eine HindIII- bzw. EcoRI-Schnittstelle zur gerichteten Insertion in pcDNA3.1+. AS: Aminosäuren, PCMV: CMV-Promotor, pA: Polyadenylierungssequenz, ori: *origin of replication*, Neomycin: Neomycinresistenz, Ampicillin: Ampicillinresistenz.

4.2.7.1.2 Stabile Transfektion des pMS-Konstruktes

Das gereinigte pMS-Konstrukt und der pcDNA3.1-Leervektor wurden mit Lipofectamine in SW480 und CaCo-2 transfiziert. Nach 20-tägiger Geneticinselektion (13 mg/ml) wurden 17 SW480 Klone isoliert und mittels *real-time* PCR auf ihre Maspinexpression untersucht. Die höchsten Maspinexpressionen wurden bei den SW480 Klonen MS2, MS3 und MS9 beobachtet. Diese Klone wurden für die weiteren Untersuchungen verwendet und deren

Maspinexpression wurde regelmäßig mittels *real-time* PCR überprüft. Bezogen auf die SW480 LP-Kontrolle, war die mittlere Maspinexpression bei SW480 MS2 um den Faktor 23,88, bei SW480 MS3 um den Faktor 19,30 und bei SW480 MS9 um das 26,8-fache erhöht (Abb. 4.2.12a). Die Überexpression bestätigte sich auch auf Proteinebene im *Western-Blot* (Abb. 4.2.12b).

Obwohl verschiedenste Transfektionsmethoden, wie Elektroporation, Lipotransfektion und Transfektion mit aktivierten Dendrimeren (SuperFect; Qiagen) angewendet wurden, gelang es nicht, die schwer transfizierbare CRC-Zelllinie CaCo-2 stabil zu transfizieren.

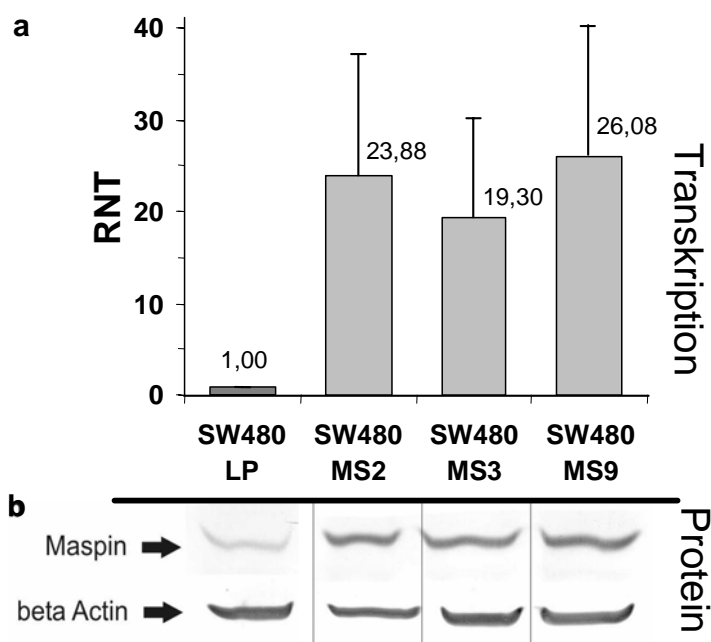


Abb. 4.2.12: Stabile Überexpression von Maspin in SW480. (a) Transkriptionelle Maspin-Überexpression (Mittelwerte). (b) Maspin-Protein-Überexpression. Als Ladekontrolle wurde beta-Actin gefärbt.

4.2.7.1.3 Charakterisierung der SW480 MS-Klone

4.2.7.1.3.1 Morphologie der SW480 MS-Klone

Die Vermessung der MS-Klone mit dem CASY-Gerät ergab bei diesen einen im Mittel um 11 % größeren Zelldurchmesser und damit ein um 36 % größeres Zellvolumen (Abb. 4.2.13). Während der SW480 Wildtyp und SW480 LPK als *Monolayer* mit Kontakthemmung wuchsen, zeigten die MS-Klone keine flächige Ausbreitung, sondern wuchsen aufeinander und bildeten klumpige Zellhaufen, wobei wiederum einige Zellen Pseudopodien ausbildeten (Abb. 4.2.14a,b und Abb. 4.2.15). Diese Wachstumsform zeigt den Verlust der Kontakthemmung. Nach längerem Wachstum war oft eine Ablösung ganzer klumpiger

Zellverbände zu beobachten. Die MS-Klone lösten sich durch Trypsinbehandlung um ein Vielfaches schneller als SW480 LP von den Kulturschalen, aber die Zellklumpen selbst waren sehr schwer zu dissoziieren und bildeten nach Dissoziation sehr schnell erneut Zellklumpen (ohne Abb.).

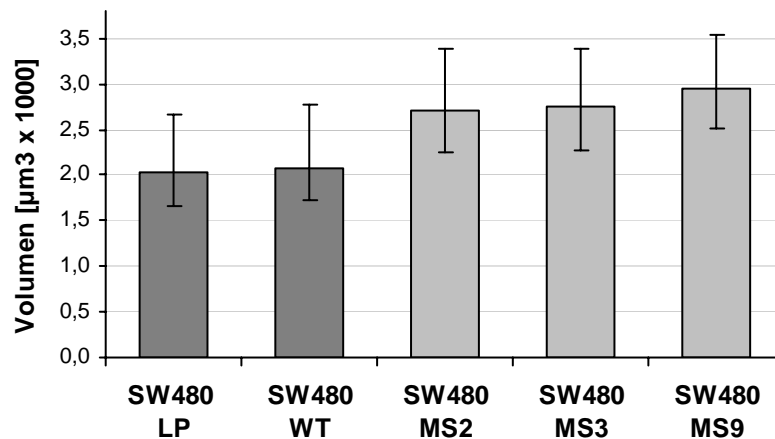
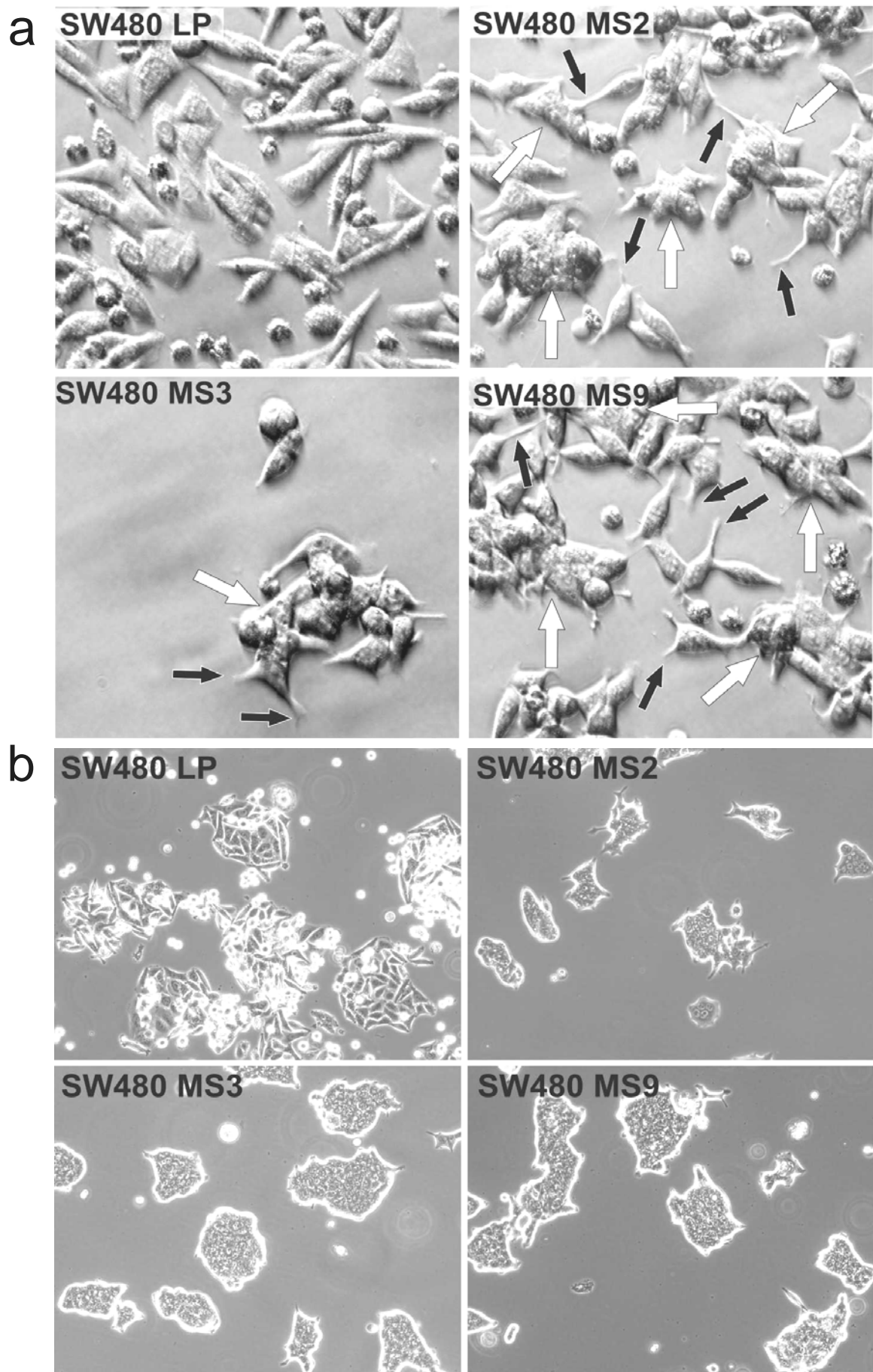


Abb. 4.2.13: Zellgröße der SW480 MS-Klone in μm^3 .

Abb. 4.2.14 auf folgender Seite: Morphologie der SW480 MS-Klone. (a) SW480 LP und SW480 MS-Klone bei 1000-facher Vergrößerung im Phasenkontrast (Seitenlicht). Die weißen Pfeile zeigen auf Verklumpungen bzw. Verschmelzungen der Zellen, die schwarzen Pfeile markieren filamentöse Pseudopodien der SW480 MS-Klone. **(b)** Aufnahmen der SW480 Klone bei 200-facher Vergrößerung im Phasenkontrast. SW480 LP wachsen als *Monolayer*, die SW480 MS-Klone in verklumpten Kolonien.



4.2.7.1.3.2 Subzelluläre Lokalisation des rekombinanten Maspins (rMaspin)

Die subzelluläre Lokalisation des rMaspins wurde durch ICC und Immunfluoreszenz bestimmt. Die ICC der SW480 MS-Klone (Abb. 4.2.15) zeigte erneut die klumpige Morphologie der Kolonien und Pseudopodien, welche die Leerplasmidkontrolle nicht ausbildete. Die intrazelluläre Lokalisation beschränkte sich auf das Zytoplasma, da die blaue Färbung der Zellkerne auf deren negative Maspinfärbung hinweist. Diese Ergebnisse bestätigten sich durch die Maspin-Immunfluoreszenz, die ebenfalls ausschließlich zytoplasmatische Maspinlokalisierung zeigte (Abb. 4.2.16).

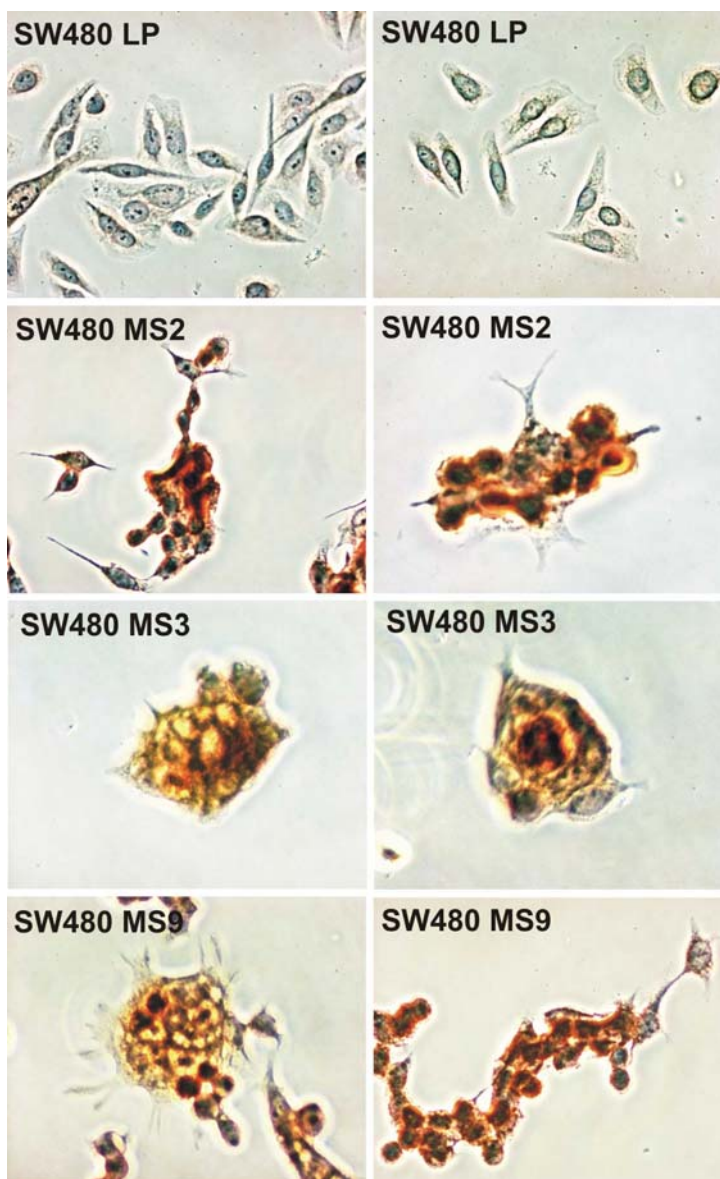


Abb. 4.2.15: Maspin-IHC der SW480 MS-Klone. Die SW480 LP-Klone zeigen negative Maspinfärbung und Wachstum als *Monolayer*. Die Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klone sind stark gefärbt, wachsen als Klumpen und bilden Pseudopodien aus. Die Aufnahmen erfolgten bei 400-facher Vergrößerung.

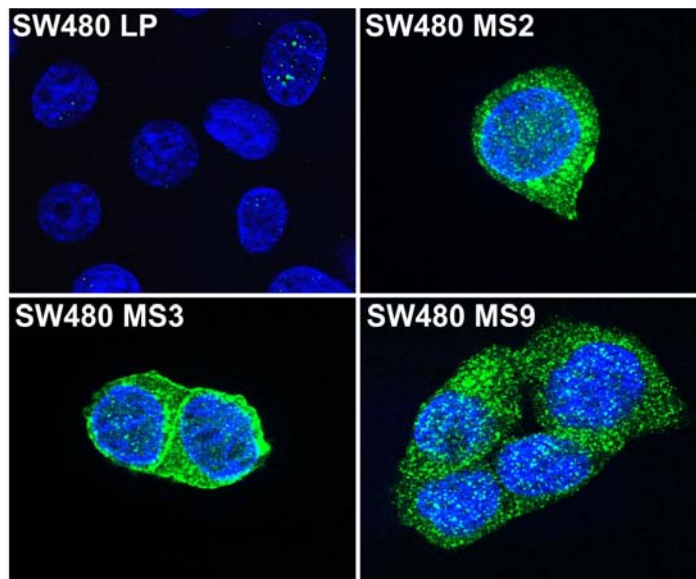


Abb. 4.2.16: Immunfluoreszenz der SW480 MS-Klone. Die FITC-Fluoreszenz der Maspinfärbung ist grün eingefärbt, die DAPI-Fluoreszenz der DNA/Kern-Färbung blau. Die Maspinsignale sind bei den SW480 MS-Klonen im Zytoplasma und teilweise an der Zytoplasmamembran (SW480 MS3) lokalisiert.

4.2.7.2 Maspin-Suppression durch ein Antisense-Vektorkonstrukt

Die Maspinexpression sollte durch die konstitutive Transkription einer RNA, die komplementär zur Maspin-mRNA war und mit dieser doppelsträngige RNA bildete, unterdrückt werden. Doppelsträngige RNA wird vom zellulären RISC/Dicer-Komplex erkannt und abgebaut.

4.2.7.2.1 Erstellung des pAS-Vektorkonstruktes aus pcDNA3.1

Zur Suppression der Maspinexpression wurde ein Antisense-Vektorkonstrukt (pAS) hergestellt. Als Vektor fand erneut das schon in 4.2.7.1.1 besprochene Expressionsplasmid pcDNA3.1 Verwendung. Das AS-Insert bestand aus einer 381 bp langen Sequenz aus dem 5'-Bereich des Maspin-Transkriptes, genauer von bp -48 bis +333 bezogen auf das ATG-Startcodon. Die zur Herstellung des AS-Inserts verwendeten Primer enthielten Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* (Forward AS *EcoRI*-Primer) und *HindIII* (Reverse AS *HindIII*-Primer), sodass das AS-Insert in revers-komplementärer Orientierung in den Vektor eingebaut wurde (Abb. 4.2.17). Bei der konstitutiven Transkription des AS-Inserts entstand eine mRNA, die dem 5'-Bereich der zellulär transkribierten Maspin-mRNA komplementär war und daher doppelsträngige RNA bildete.

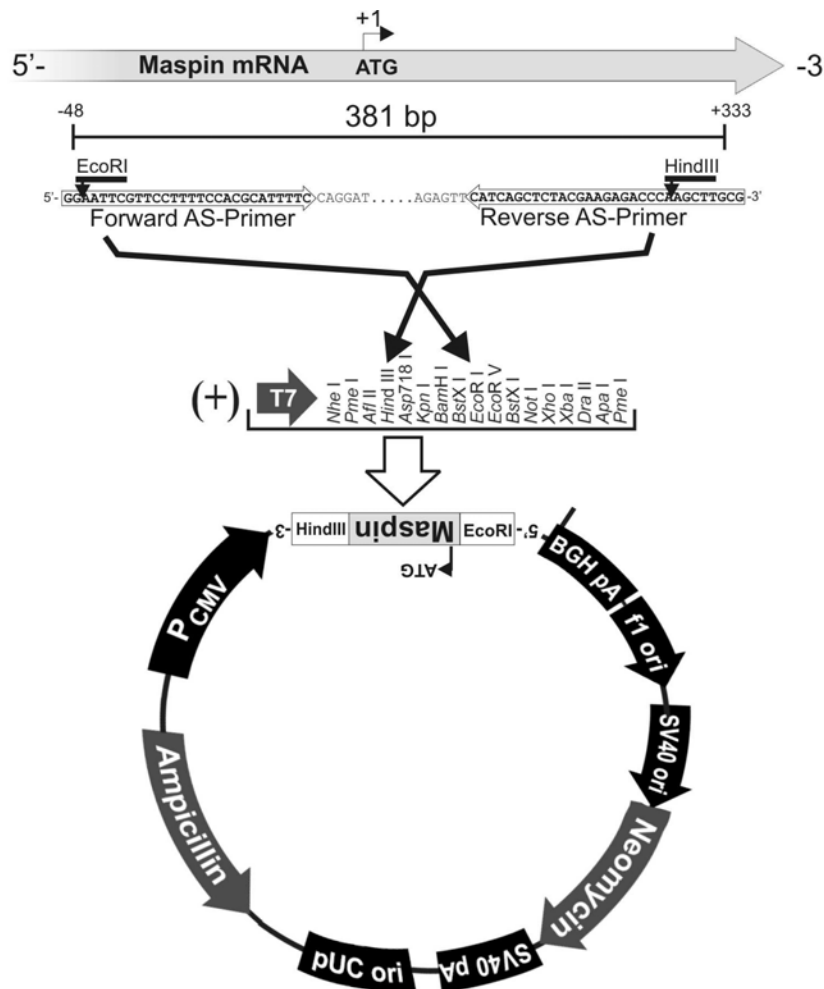


Abb. 4.2.17: Maspin-AS-Konstrukt pAS. Das AS-Insert (318 bp) wurde mit dem AS-Primerpaar (Forward AS + Reverse AS) von cDNA von SW48 amplifiziert. Die Primer enthielten eine *EcoRI*- bzw. *HindIII*-Schnittstelle zur gerichteten Insertion in pcDNA3.1. Die AS-Insert-Sequenz entsprach dem 5'-Bereich der Maspin-mRNA (-45 bis +333) und wurde so in pcDNA3.1+ kloniert, dass bei der Transkription vom Vektorkonstrukt eine RNA entstand, die komplementär zu der Maspin-mRNA war. AS: Aminosäuren, PCMV: CMV-Promotor, pA: Polyadenylierungssequenz, ori: *origin of replication*, Neomycin: Neomycinresistenz, Ampicillin: Ampicillinresistenz.

4.2.7.2.2 Stabile Transfektion des pAS-Konstruktes

Das pAS-Konstrukt wurde in XL-2 Blue kloniert und zur Kontrolle sequenziert. Das gereinigte AS-Konstrukt und der cpDNA3.1-Leervektor wurden mit Lipofectamin[®] in die Maspin-überexprimierende CRC-Zelllinie SW48 (vgl. 4.2.4.1) transfiziert. Nach 20-tägiger Geneticinselektion (13 mg/ml) wurden 37 SW48 Klone isoliert und mittels *real-time* PCR auf ihre Maspinexpression untersucht. Die Klone SW48 AS I35, AS II43, AS II5 und AS III1 zeigten im Vergleich zu SW48 LP die größten Reduktionen der Maspin-Transkription. Nach einigen Passagen stagnierte bei SW48 AS III1 (mittlere Maspin-Suppression: 79 %) die Proliferationsfähigkeit, weshalb dieser Klon von den folgenden Experimenten ausgeschlossen wurde. Die Maspin-Suppression von SW48 AS I35, SW48 AS II43 und SW48 AS II5 wurde

regelmäßig mittels *real-time* PCR überprüft und lag, bezogen auf die KSW48 LP-Kontrolle, durchschnittlich bei 87 %, 95 % und 89 % (Abb. 4.2.18a). Die Suppression der Maspinexpression bestätigte sich auch auf Proteinebene im *Western-Blot* (Abb. 4.2.18b).

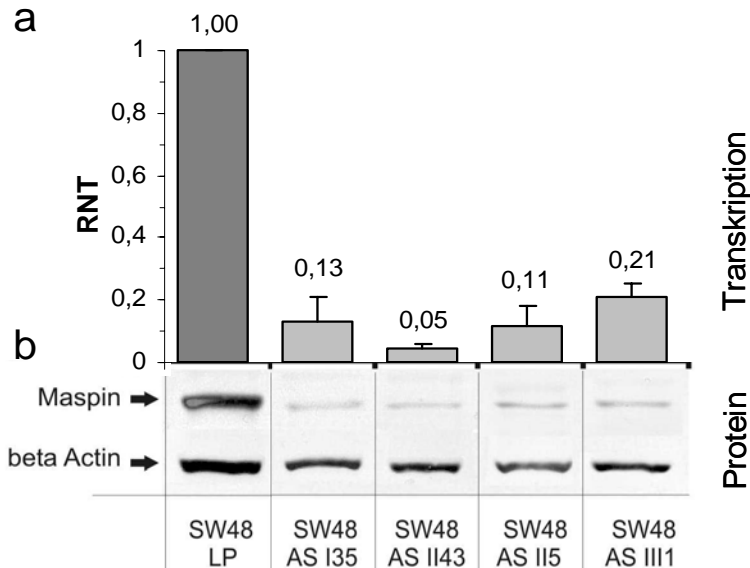


Abb. 4.2.18: Maspin-Suppression bei den SW48 AS-Klone. (a) Transkriptionelle Maspinexpression (Mittelwerte). **(b)** Maspin-Protein-Suppression. Als Ladekontrolle wurde beta Actin gefärbt. RNT: relative, normalisierte Transkription.

4.2.7.2.3 Charakterisierung der SW48 AS-Klone

4.2.7.2.3.1 Morphologie

Die Vermessung der SW48 AS-Klone mit dem CASY-Gerät ergab bei diesen, verglichen mit SW48 LP, einen im Mittel um 28 % größeren Durchmesser und damit ein um 113 % größeres Zellvolumen (Abb. 4.2.19). Im Gegensatz zum SW48 Wildtyp und SW48 LP bildeten die SW48 AS-Klone keine Pseudopodien aus. Wie die Kontrollen wuchsen die SW48 AS-Klone als *Monolayer*, zeigten eher kugelige Form und waren nur wenig abgeflacht (Abb. 4.2.20).

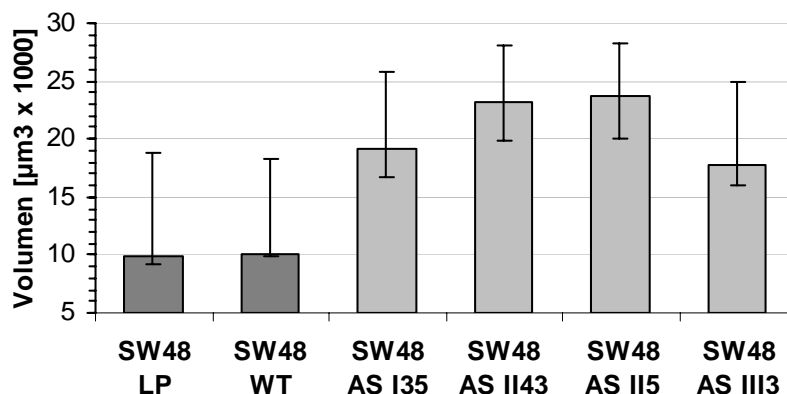


Abb. 4.2.19: Zellgröße der SW48 AS-Klone in μm^3 .

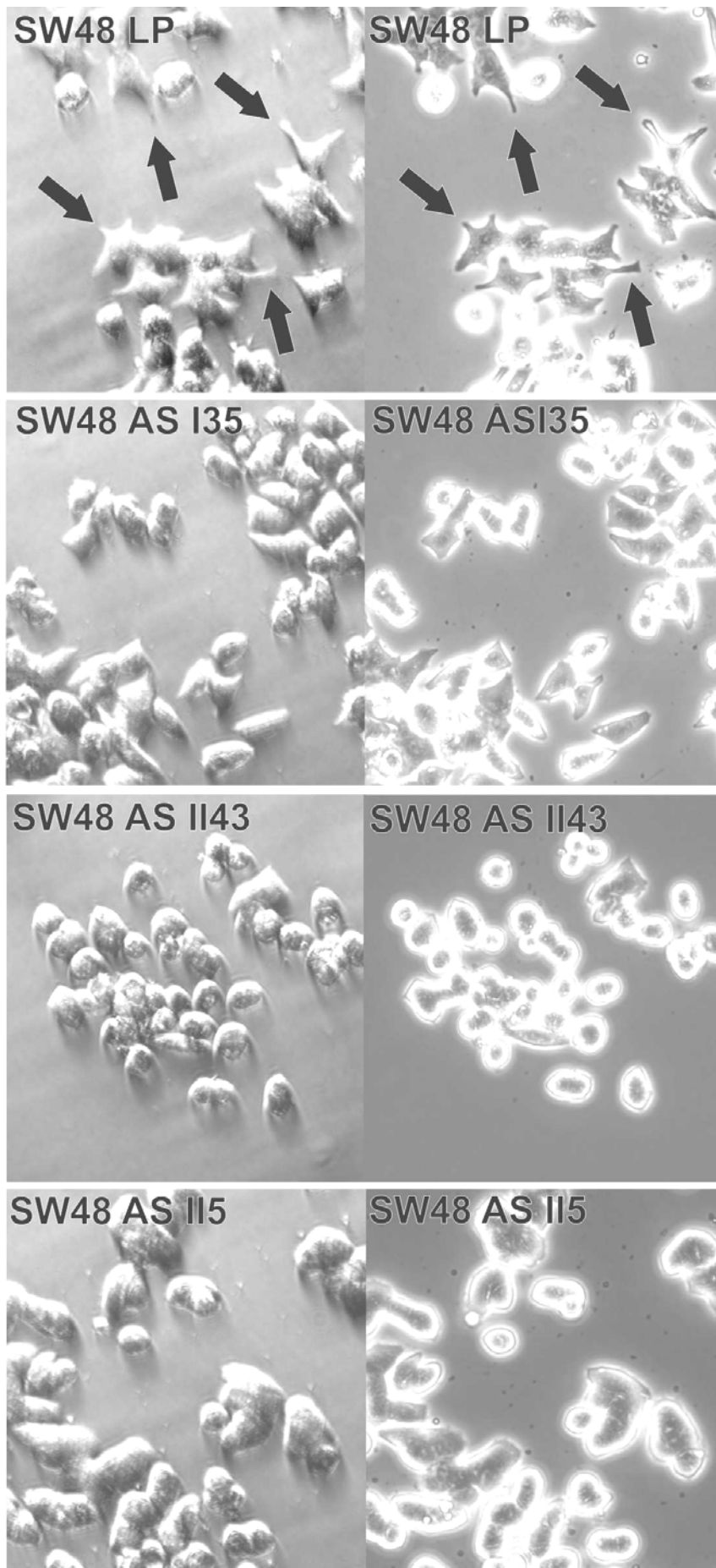


Abb. 4.2.20: Morphologie der SW48 AS-Klone. Die SW48 LP-Klone weisen Pseudopodien auf (schwarze Pfeile), die bei den SW48 AS-Klonen, die in kugelförmiger Form wachsen, fehlen. Die Aufnahmen entstanden bei 400-facher Vergrößerung im Seitlicht-Phasenkontrast (linke Spalte) und im normalen Phasenkontrast (rechte Spalte).

4.2.7.3 Maspin-Suppression durch siRNA

Zusätzlich zu den Versuchen mit antisense-RNA wurde die Maspinexpression durch siRNA-Technologie supprimiert. Als Kontrolle wurde eine nicht-regulative, fluoreszenzmarkierte Kontroll-siRNA (Ko siRNA) transfiziert, die keine Homologie zu einem bekannten humanen Transkript aufwies und zur Detektion mit Alexa Fluor 488 konjugiert war. Zur spezifischen Suppression der Maspinexpression wurden zwei siRNAs (siRNA I und siRNA III) mit unterschiedlicher Sequenz transfiziert.

Um die Effektivität und die Dauer der siRNA-Suppression auf die Maspinexpression zu überprüfen, wurden SW48-Zellen mit 5 nM siRNA transfiziert und deren Maspinexpression über einen Zeitraum von einer Woche überwacht. Die Aufnahme der siRNA wurde mit Hilfe der Ko siRNA durch Fluoreszenzmikroskopie überprüft und bestätigt (Abb. 4.2.21).

Bei diesem Experiment zeigte sich, dass die Maspin-Transkription bei beiden siRNAs bereits 4 h nach Transfektion um 25 % und 38,5 % reduziert worden war. Nach 24 h lag die Maspinexpression, bezogen auf die Kontroll-siRNA, durchschnittlich unter 10 %. Die siRNA-Suppression hielt die Maspinexpression eine Woche auf durchschnittlich unter 10 % (Abb. 4.2.22). Der siRNA-Effekt wurde auf RNA und Proteinebene verifiziert (Abb. 4.2.23).

Alle folgenden Experimente mit siRNA-supprimierten Zellen wurden 3 - 4 Tage nach der Transfektion durchgeführt, wobei die aktuelle Maspinexpression stets mittels *real-time* PCR überprüft wurde. Dabei waren die Effektivitäten der siRNA-induzierten Maspin-Suppression sehr unterschiedlich und schwankten bei SW48 siRNA I von 95 % bis 3 % mit einem Mittelwert von 72 % und bei SW48 siRNA III 94 % bis 23 % mit einem Mittelwert von 74 % (Abb. 4.2.24).

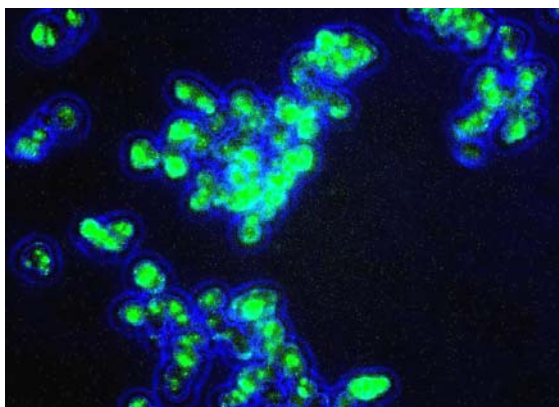


Abb. 4.2.21: Transfektion von SW48 mit Kontroll-siRNA. Die Kontroll-siRNA ist mit Alexa Fluor 488 konjugiert, dessen Fluoreszenz grün eingefärbt ist. Die blaue DAPI-Gegenfärbung wird vom Alexa Fluor 488-Signal überlagert. Die Aufnahme entstand bei 400-facher Vergrößerung.

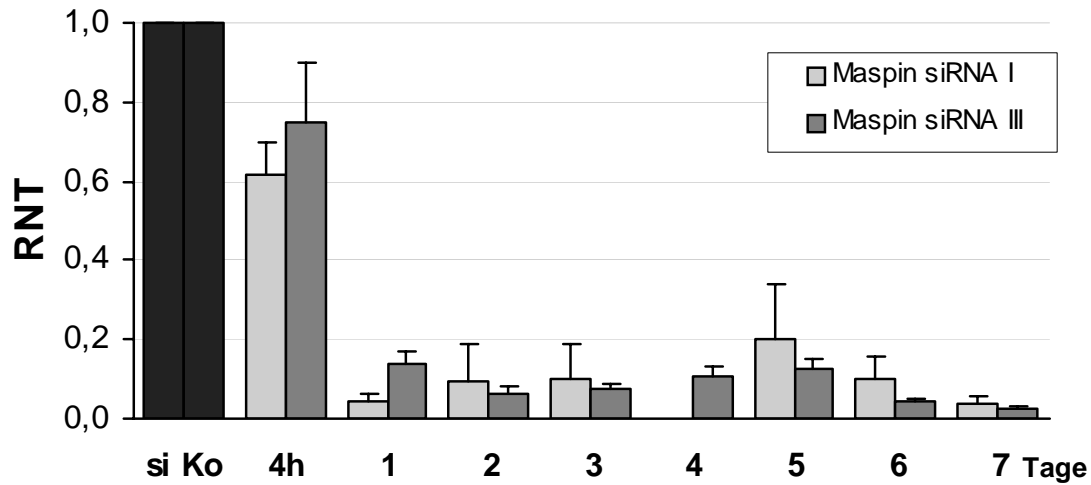


Abb. 4.2.22: Effektivität und Dauer einer Maspin-Suppression bei SW48 mit siRNAs. si KO: Kontroll-siRNA (Kalibrator).



Abb. 4.2.23: Maspin-Western-Blot der siRNA-transfizierten SW48-Zellen nach 4 Tagen. si KO: Kontroll-siRNA.

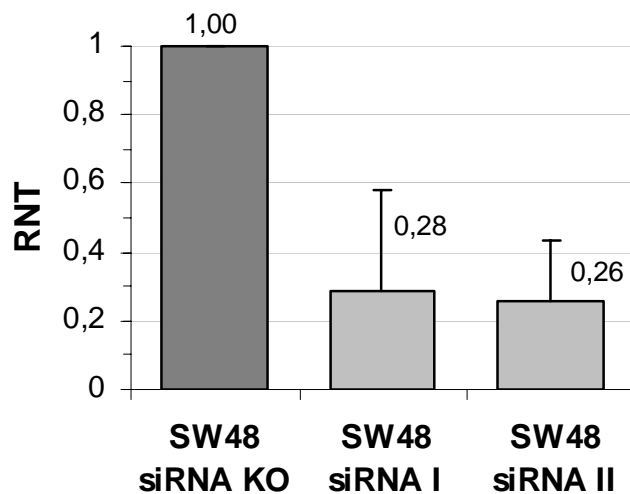


Abb. 4.2.24: Durchschnittliche Maspinexpression von SW48, 3 und 4 Tage *post* siRNA-Transfektion. siRNA KO: Kontroll-siRNA.

4.2.7.4 Adhäsions-Assays

Eine Eigenschaft vieler Tumorzellen ist die Verminderung der Adhäsion, zum einem untereinander, zum anderen auch zur Basalmembran, an der die normalen Epithelzellen verankert sind. Bei Zellen gibt es zwei Aspekte der Adhäsion: Die Adhäsionsgeschwindigkeit und die Adhäsionsstärke. Die Adhäsionsgeschwindigkeit gibt an, wie schnell die Zellen eine Verbindung mit ihrem Untergrund aufbauen können, die Adhäsionsstärke ist ein Maß für die Festigkeit dieser Verbindung.

4.2.7.4.1 Adhäsionsgeschwindigkeit (Δt -Assays)

4.2.7.4.1.1 Adhäsionsgeschwindigkeiten der Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klone

Die Messung der Adhäsionsgeschwindigkeit ergab ein deutlich langsameren Adhären der SW480 MS-Klone (Abb. 4.2.25). Verglichen mit SW480 LP (100 %) konnten 3 Stunden nach dem Aussäen durchschnittlich 15,1 % der MS-Klone adhären. Gemittelt über alle Messpunkte (10 min, 30 min, 1 h und 3 h) waren im Vergleich zur LPK um 80,5 % weniger MS-Klone adhären (Tab. 4.2.4).

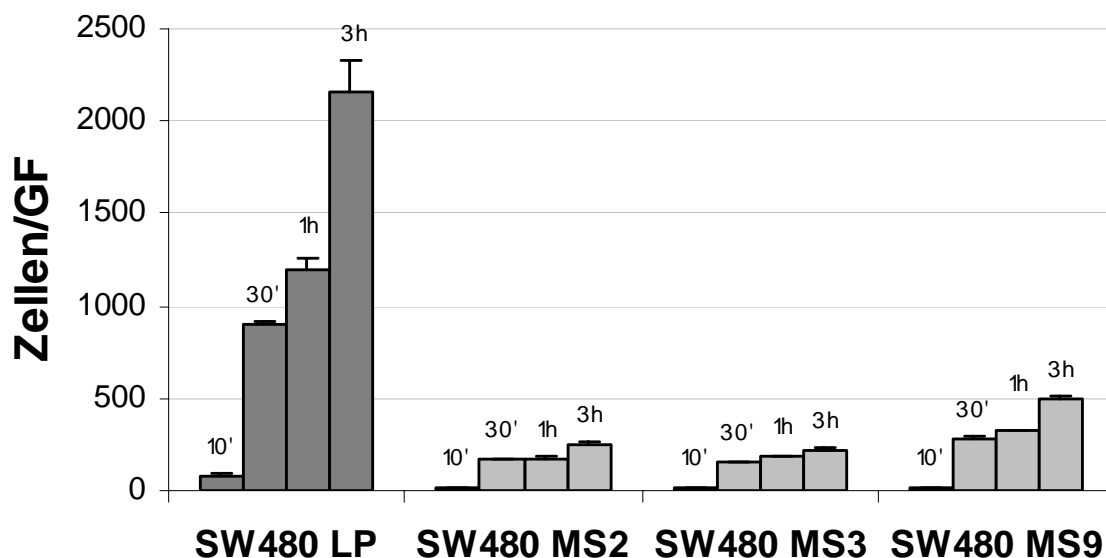


Abb. 4.2.25: Adhäsion der SW480 MS-Klone nach verschiedenen Zeiten. Die nicht adhären Zellen wurden nach verschiedenen Zeiten nach dem Aussäen entfernt, die bereits adhären wurden fixiert, gefärbt und ausgezählt. GF: Gesichtsfeld, ': Minuten.

Klon	10'	30'	1h	3h
SW480 LP	100%	100%	100%	100%
SW480 MS2	22,3%	18,8%	14,8%	11,8%
SW480 MS3	21,5%	16,4%	15,3%	10,3%
SW480 MS9	21,1%	31,3%	27,0%	23,1%
MW _{SW480 MSK}	21,6%	22,2%	19,0%	15,1%

ges MW_{SW480 MSK} :19,5%

Tab. 4.2.4: Relative Adhäsionsgeschwindigkeiten der SW480 MS-Klone (bezogen auf SW480 LP). MW: Mittelwert, MSK: MS-Klone, ges: gesamt, ' : Minuten.

4.2.7.4.1.2 Adhäsionsgeschwindigkeiten der Maspin-supprimierten SW48 AS-Klone

Bei der Messung der Adhäsionsgeschwindigkeit zeigten sich nach 10 und 30 Minuten durchschnittlich 34,4 % bzw. 32,2 % weniger adhärenzte SW48 AS-Klone im Vergleich zur Kontrolle. Nach 1 Stunde und nach 3 Stunden waren keine wesentlichen Unterschiede zur Kontrolle zu beobachten (Abb. 4.2.26; Tab. 4.2.5).

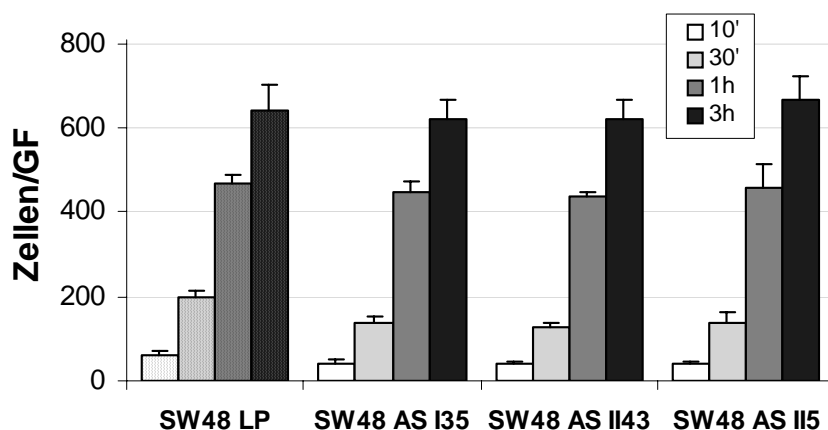


Abb. 4.2.26: Adhäsion der SW48 AS-Klone nach verschiedenen Zeiten. Die nicht adhärenzten Zellen wurden nach verschiedenen Zeiten nach dem Aussäen entfernt, die bereits adhärenzten wurden fixiert, gefärbt und ausgezählt. GF: Gesichtsfeld, ' :Minuten.

	10'	30'	1h	3h
SW48 LP	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
SW48 AS I35	68,9%	69,3%	95,7%	96,6%
SW48 AS II43	64,5%	64,5%	93,6%	96,3%
SW48 AS II5	63,3%	69,8%	97,9%	103,7%
MW _{SW48 ASK}	65,6%	67,8%	95,7%	98,9%

Tab. 4.2.5: Relative Adhäsionsgeschwindigkeiten der SW480 MS-Klone (bezogen auf SW48 LP). MW: Mittelwert, ASK: AS-Klone, ' : Minuten.

4.2.7.4.1.3 Adhäsionsgeschwindigkeiten der Maspin-supprimierten SW48 siRNA-Transfektanden

Die Messung der Adhäsionsgeschwindigkeit ergab ein langsames Adhären der SW48 siRNA-Transfektanden im Vergleich zur Kontrolle: Nach 10, 30 und 60 min adhärten durchschnittlich 54,7 % weniger siRNA Transfektanden. Nach 3 Stunden waren praktisch keine Unterschiede in der Anzahl adhärerter Zellen zu erkennen (Abb. 4.2.27; Tab. 4.2.6).

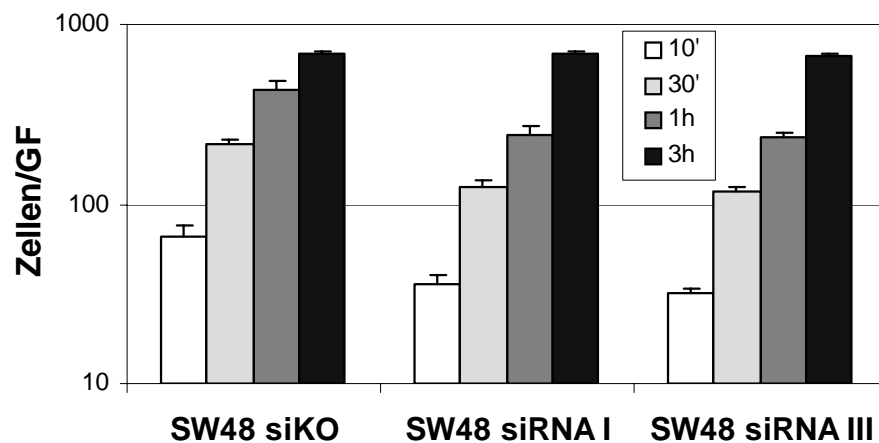


Abb. 4.2.27: Adhäsion der siRNA SW48-Transfektanden nach verschiedenen Zeiten. Die nicht adhärten Zellen wurden nach verschiedenen Zeiten nach dem Aussäen entfernt, die bereits adhärten wurden fixiert, gefärbt und ausgezählt. GF: Gesichtsfeld. siKO: Kontroll-siRNA, ' : Minuten.

	10'	30'	1h	3h
SW48 siKO	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%
SW48 siRNA I	55,6%	57,2%	57,2%	98,5%
SW48 siRNA III	48,7%	54,7%	54,7%	96,7%
SW48 siRNA MW	52,1%	56,0%	56,0%	97,6%

Tab. 4.2.6: Relative Adhäsionsgeschwindigkeiten der SW48 siRNA-Transfektanden (bezogen auf SW48 siKO). MW: Mittelwert, ' : Minuten.

4.2.7.4.2 Adhäsionsstärke (Δg -Assays)

4.2.7.4.2.1 Adhäsionsstärken der Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klone

Bis 3000 g ergaben sich praktisch keine Unterschiede zwischen den Adhäsionsstärken der Kontrolle und den SW480 MS-Klonen. Nach einer Kraft von 4000 g waren bezogen auf die 3000 g-Kontrolle im Mittel nur noch 21,8 %, nach 5000 g noch 7,8 % der MS-Klone adhären, d.h. 78,2 % bzw. 92,2 % (bezogen auf die 3000 g-Kontrolle) der SW480 MS-Klone

waren abgelöst worden, was eine deutlich schwächere Adhäsion der SW480 MS-Klone zeigte. Nach Einwirkung von 6000 g verblieben keine Zellen im *Well* (Abb. 4.2.28; Tab. 4.2.7).

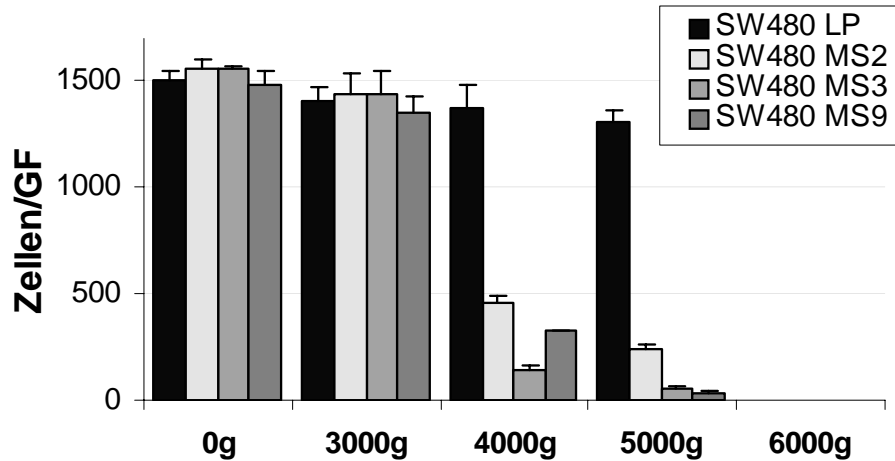


Abb. 4.2.28: Adhäsionsstärken der SW480 MS-Klone. Den Adhäsionskräften der adhärenen Zellen wurden verschiedene g-Zahlen entgegengesetzt. Die verbliebenen, noch adhärenen Zellen wurden fixiert, gefärbt und quantifiziert. GF: Gesichtsfeld, g: Erdbeschleunigung ($9,81\text{m/s}^2$).

Klon	3000g	4000g	5000g	6000g
SW480 LP	100,0%	97,4%	92,9%	-
SW480 MS2	102,1%	32,2%	16,7%	-
SW480 MS3	102,4%	10,1%	4,2%	-
SW480 MS9	95,7%	23,0%	2,4%	-
MW _{SW480 MSK}	100,1%	21,8%	7,8%	-

Tab. 4.2.7: Relative Adhäsionsstärken der SW480 MS-Klone (bezogen auf SW480 LP 3000 g). MW: Mittelwert, MSK: MS-Klone.

4.2.7.4.2.2 Adhäsionsstärken der Maspin-supprimierten SW48 AS-Klone

Im den Δg -Adhäsions-Assays zeigten die SW48 AS-Klone schwächere Adhäsionskräfte als die Kontrolle. Bei einem Schwerfeld von 4000 g hatten, bezogen auf die Kontrolle, im Mittel 76 % der SW48 AS-Klone die Haftung am Untergrund verloren. Nach Einwirkung von 5000 g waren alle SW48 AS-Klone abgelöst worden, während noch etwa die Hälfte der SW48 LP-Kontrolle adhärert war (Abb. 4.2.29; Tab. 4.2.8).

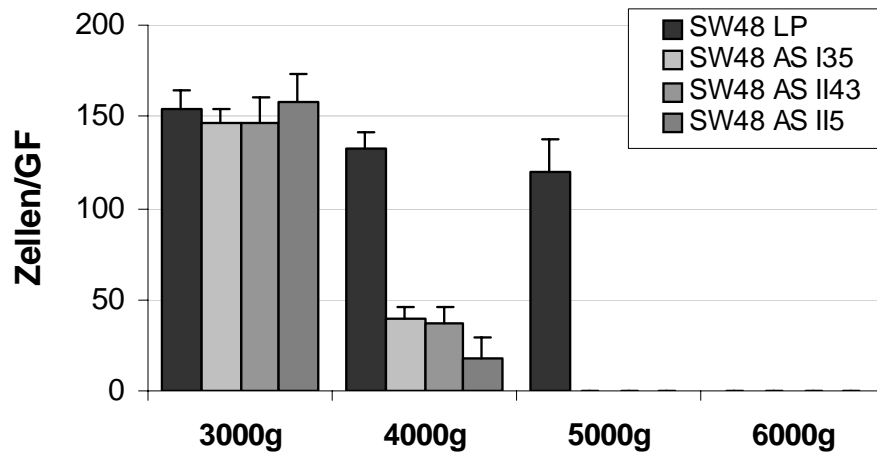


Abb. 4.2.29: Adhäsionsstärken der SW48 AS-Klone. Den Adhäsionskräften der adhärenen Zellen wurden verschiedene g-Zahlen entgegengesetzt. Die verbliebenen, noch adhärenen Zellen wurden fixiert, gefärbt und quantifiziert. GF: Gesichtsfeld, g: Erdbeschleunigung ($9,81\text{m/s}^2$).

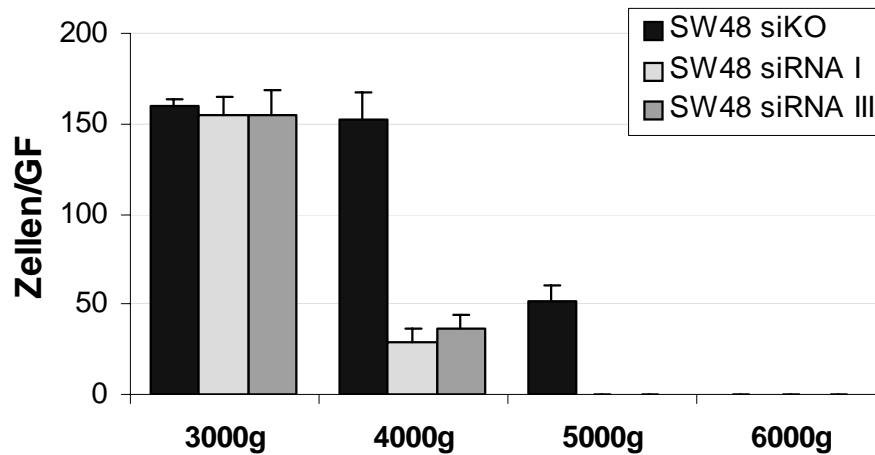
	3000g	4000g	5000g	6000g
SW48 LP	100,0%	99,0%	62,0%	-
SW48 AS I35	98,3%	26,9%	0,0%	-
SW48 AS II43	98,3%	24,9%	0,0%	-
SW48 AS II5	99,0%	19,9%	0,0%	-
MW_{SW48 ASK}	98,5%	23,9%	0,0%	-

Tab. 4.2.8: Relative Adhäsionsstärken der SW48 AS-Klone (bezogen auf SW48 LP 3000 g). MW: Mittelwert, ASK: AS-Klone.

4.2.7.4.2.3 Adhäsionsstärken der Maspin-supprimierten SW48 siRNA-Transfektanden

In den Δg -Assays zeigten die SW48 siRNA-Transfektanden geringere Adhäsionsstärken als die Kontrolle: ab 4000 g hatten, im Gegensatz zur Kontrolle, durchschnittlich 79,6 % der siRNA-Transfektanden die Haftung im *Well* verloren. Nach Einwirkung von 5000 g zeigte nur noch die Kontrolle Adhäsion, nach 6000 g hatten alle Zellen die Haftung verloren (Abb. 4.2.30; Tab. 4.2.9).

Abb. 4.2.30 auf folgender Seite: Adhäsionsstärken der SW48 siRNA-Transfektanden. Den Adhäsionskräften der adhärenen Zellen wurden verschiedene g-Zahlen entgegengesetzt. Die verbliebenen, noch adhärenen Zellen wurden fixiert, gefärbt und quantifiziert. GF: Gesichtsfeld, g: Erdbeschleunigung ($9,81\text{m/s}^2$).



	3000g	4000g	5000g	6000g
SW48 siKO	100,0%	95,0%	32,5%	-
SW48 siRNA I	97,1%	18,1%	0,0%	-
SW48 siRNA III	96,7%	22,7%	0,0%	-
MW _{SW48 siRNA}	96,9%	20,4%	0,0%	-

Tab. 4.2.9: Relative Adhäsionsstärken der SW48 siRNA-Transfektanden (bezogen auf SW48 siKO 3000 g). MW: Mittelwert.

4.2.7.4.3 Vergleich der Ergebnisse der Adhäsionsversuche

Die Maspin-Überexpression führte bei SW480 zu einer stark verlangsamten Adhäsion, da auch nach drei Stunden Inkubation im Brutschrank verglichen mit der Kontrolle 85 % weniger Zellen adhärirt waren. Die Adhäsionen der transient und stabil supprimierten SW48-Klone zeigten nach drei Stunden bzw. einer Stunde kaum Unterschiede zur Kontrolle.

Sowohl die Maspin-Überexpression als auch die Maspin-Suppression (stabil und transient) bewirkten eine Verminderung der Adhäsionsstärke gegenüber den Kontrollen.

4.2.7.5 Proliferation

Mit Hilfe von XTT-Assays wurde die Auswirkung der Maspinexpression auf die Proliferationsraten der Zellen gemessen. Die Formel $N_t = N_0 \cdot e^{kt}$ beschreibt das exponentielle Wachstum sich teilender Zellen, wobei k die Wachstumskonstante und t die Zeit darstellt ($k = (\ln N_t - \ln N_0)/t$). Die 24h-Proliferationsrate K ($N_{24h} = N_0 \cdot K$) gibt den Faktor an, um den sich die Zellzahl während 24 Stunden vermehrt. Mit den SW48 siRNA-Transfektanden wurden aufgrund stark schwankender Effektivitäten der Maspin-Suppressionen keine Proliferations-Assays durchgeführt.

4.2.7.5.1 Proliferation der Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klone

Die durchschnittliche 24h-Wachstumskonstante k der Kontrolle SW480 LP lag bei 0,58, die der SW480 MS-Klone bei 0,28, 0,23 und 0,30. Damit hatte die Überexpression von Maspin bei SW480 eine Erniedrigung der Proliferation zur Folge. Die 24h-Wachstumskonstanten k waren bei den überexprimierenden Klonen um durchschnittlich 53,4 % verringert (Abb. 4.2.31). Die 24h-Proliferationsrate K betrug durchschnittlich 1,31 bei den SW480 MS-Klonen und 1,78 bei der SW480 LP-Kontrolle.

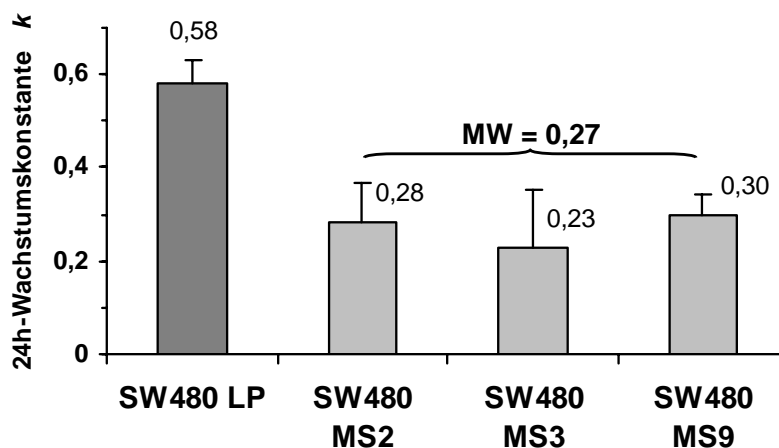


Abb. 4.2.31: Proliferation der SW480 MS-Klone. MW: mittlere 24h-Wachstumskonstante k der SW480 MS-Klone.

4.2.7.5.2 Proliferation der Maspin-supprimierten SW48 AS-Klone

Die mittlere 24h-Wachstumskonstante k von SW48 LP betrug 0,78, bei den SW48 AS-Klonen lagen diese zweimal bei 1,05 und einmal bei 0,95. So führte die Blockierung der Maspinexpression in den SW48 AS-Klonen zu einer erhöhten Proliferation. Die durchschnittliche 24h-Wachstumskonstante k betrug 1,01, was einer Erhöhung um 30,0 % gegenüber der Kontrolle entspricht. Die durchschnittliche 24h-Proliferationsrate K der SW48 AS-Klone betrug 2,79 und war damit um 27,6 % gegenüber der der Kontrolle mit einer K von 2,19 erhöht (Abb. 4.2.32).

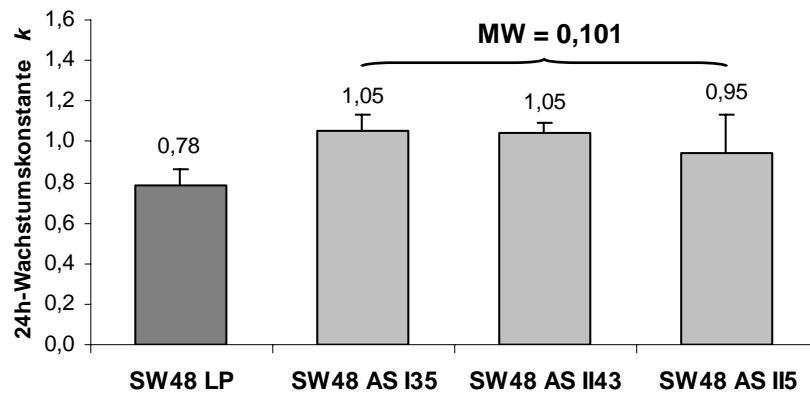


Abb. 4.2.32: 24h-Wachstumskonstanten der SW48 AS-Klone. MW: mittlere 24h-Wachstumskonstante k der SW48 AS-Klone.

4.2.7.6 Migrations-Assays

Beim Migrations-Assay wird die Motilität der Zellen bestimmt. Dazu ist der Filter, der das Kompartiment mit Chemoattraktant von den Zellen trennt, mit Gelatine beschichtet, damit die Zellen adhären können. Zur Überwindung des Filters ist keine proteolytische Aktivität nötig.

4.2.7.6.1 Motilität der Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klone

Wurden in Migrations-Assays mehr als 30 000 Zellen/Kammer eingesetzt, bildeten die SW480 MS-Klone sofort Klumpen und Zellaggregate und erschienen dann unbeweglich, während SW480 LP migrierte. Wurden 8000 Zellen/Kammer oder weniger eingesetzt, klumpten die SW480 MS-Klone kaum und migrierten. Im Vergleich zur Kontrolle waren die durchschnittlichen Migrationsraten bei SW480 MS2 um den Faktor 4,47, bei SW480 MS3 3,84-fach und bei SW480 MS9 2,15-fach höher (Abb. 4.2.33). Damit stellte sich bei den Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klonen eine durchschnittlich 3,48-fach höhere Migrationsrate ein, als bei der Kontrolle. Die Maspin-Überexpression erhöhte also die Motilität der SW480-Zellen.

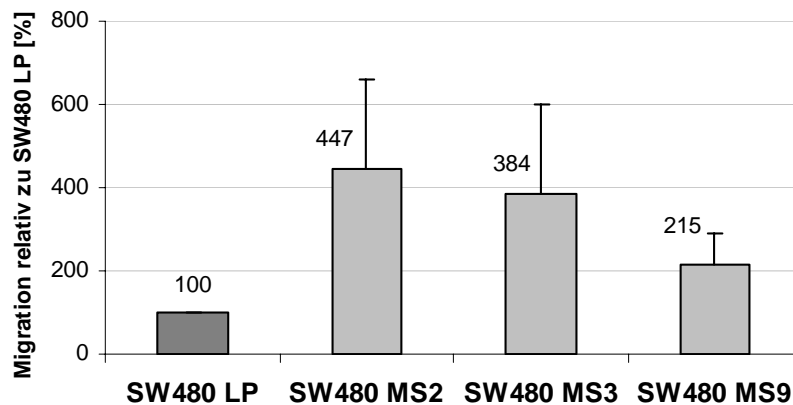


Abb. 4.2.33: Relative Migrationsraten der SW480 MS-Klone (bezogen auf SW480 LP).

4.2.7.6.2 Motilität der Maspin-supprimierten SW48 AS-Klone

Bezogen auf die LP-Kontrolle migrierte SW48 AS I35 im Mittel um 22,5 %, SW48 AS II43 um 28,5 % und SW48 AS II5 um 27,7 % weniger als die SW48 LP-Kontrolle. So zeigten die SW48 AS-Klone durchschnittlich nur 73,8 % der Migrationsrate der Kontrolle (Abb. 4.2.34).

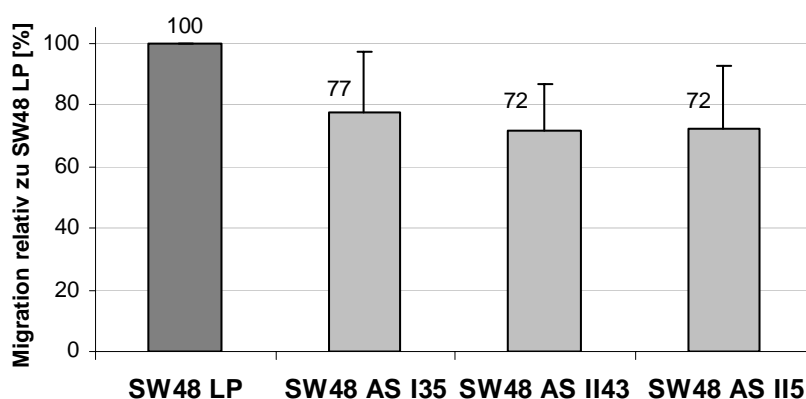


Abb. 4.2.34: Relative Migrationsraten der SW48 AS-Klone (bezogen auf SW48 LP).

4.2.7.6.3 Motilität der Maspin-supprimierten SW48 siRNA-Transfektanden

Bezogen auf die mit Kontroll-siRNA transfizierten SW48 Zellen, migrierten die mit siRNA I transfizierten SW48-Zellen durchschnittlich um 51,2 % mehr, die mit siRNA III transfizierten um 26,1 % mehr. So war der Anteil der migrierten Zellen bei den SW48 siRNA-Transfektanden durchschnittlich um 38,7 % höher, als bei der Kontrolle (Abb. 4.2.35). Die transiente Maspin-Suppression mittels siRNA bewirkte im Gegensatz zur stabilen Maspin-Suppression keine Erhöhung der Motilität der SW48 Zellen. Diese Diskrepanz der Ergebnisse wird in 5.1.2.3 diskutiert.

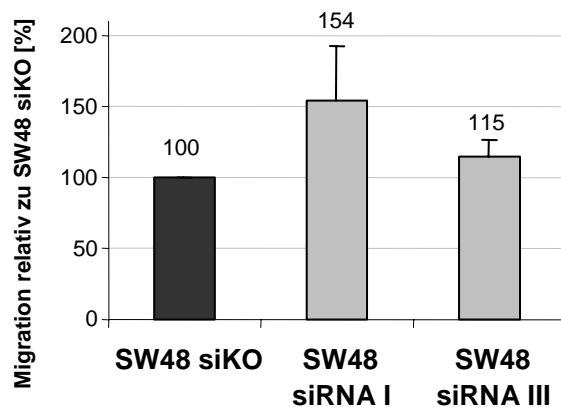


Abb. 4.2.35: Relative Migration der SW48 siRNA-Transfektanden (bezogen auf SW48 siKO).

4.2.7.7 Invasions-Assays

Um in Invasions-Assays den mit Matrigel beschichteten Filter zu überwinden, müssen die Zellen proteolytische Aktivität aufwenden.

4.2.7.7.1 Invasivität der Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klone

Wie bei den Migrations-Assays (siehe 4.2.8.6) bildeten die SW480 MS-Klone in Konzentrationen über 30 000 Zellen/ml im Invasions-Assay Klumpen und wurden dadurch immobil und nicht invasiv. Daher wurden in den folgenden Invasions-Assays 8000 Zellen/Kammer eingesetzt, was das Klumpen weitgehend verhinderte. Nun zeigten die SW480 MS-Klone durchschnittlich 5,50-fach höhere Invasionsraten als die Kontrolle. Durch die Zugabe von 25 µg anti-Maspin-Antikörper wurde der Anstieg der Invasivität bei den SW480 MS-Klonen auf den 1,69-fachen Wert der SW480 LP_{AK}-Kontrolle verringert. Die Invasivitätsraten der SW480 LP-Kontrolle wurden vom anti-Maspin-Antikörper um 17,9 % verringert, während sich die durchschnittliche Invasionsrate der SW480 MS-Klone durch die Antikörperzugabe um 69,3 % verringerte (Abb. 4.2.36; Tab. 4.2.10).

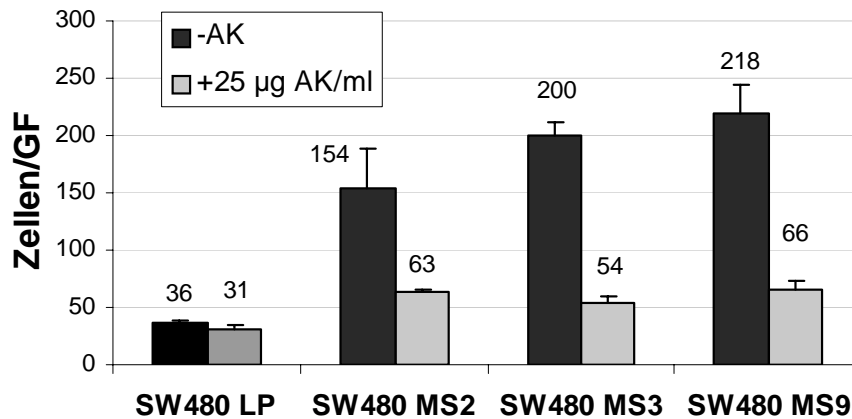


Abb. 4.2.36: Invasivität der SW480 MS-Klone mit und ohne anti-Maspin-Antikörper. –AK: ohne anti-Maspin-Antikörper, +25 µg AK/ml: mit 25 µg anti-Maspin-Antikörper/ml Medium, GF: Gesichtsfeld.

	- Maspin-AK	+ 25 µg Maspin-AK/ml
SW480 LP	100,0%	82,1%
SW480 MS2	525,6%	183,9%
SW480 MS3	537,2%	144,4%
SW480 MS9	587,4%	178,5%
MW_{SW480 MSK}	550,1%	168,9%

Tab. 4.2.10: Relative Invasivitätsraten der SW480 MS-Klone mit und ohne anti-Maspin-Antikörper (bezogen auf SW480 LP ohne anti-Maspin-Antikörper). AK: Antikörper, MW: Mittelwert, MSK: MS-Klone.

4.2.7.7.2 Invasivität der Maspin-supprimierten SW48 AS-Klone

In Invasions-Assays zeigten die SW48 AS-Klone durchschnittlich 37,1 % weniger Invasion als die SW48 LP-Kontrolle, dabei war die mittlere Invasivität, bezogen auf die Kontrolle, bei SW48 AS I35 um 46,6 %, bei SW48 AS II43 um 28,9 % und bei SW48 AS II5 um 35,9 % verringert. Die Zugabe von 1 µM rMaspin führte bei allen SW48 AS-Klonen, im Vergleich zu entsprechenden unbehandelten Zellen, zu einer durchschnittlich 21%igen Zunahme der Invasivität. Die Zugabe von 1 µM Maspin erhöhte auch die Invasivität der Kontrolle um 5,6 %. Wurde die rMaspin-Konzentration auf 2 µM erhöht, verklumpten die Zellen, wodurch sich die Invasivität der SW48 AS-Klone, verglichen mit entsprechenden Zellen ohne Mediumzusätze, im Mittel um 75,3 % und die der Kontrolle um 78,6 % verringerte. Der klumpende Effekt des 2 µM rMaspin konnte durch die Zugabe von anti-Maspin-Antikörper (25 µg/ml) aufgehoben werden, da die Zellen nach Antikörperzugabe wieder vereinzelt vorlagen. Als weitere Wirkung des anti-Maspin-Antikörpers nahm die Invasivität der SW48

AS-Klone bezogen auf die entsprechenden unbehandelten Zellen um durchschnittlich 9,5 % ab, die Invasivität der Kontrolle fiel um 19,7 % (Abb. 4.2.37; Tab. 4.2.11).

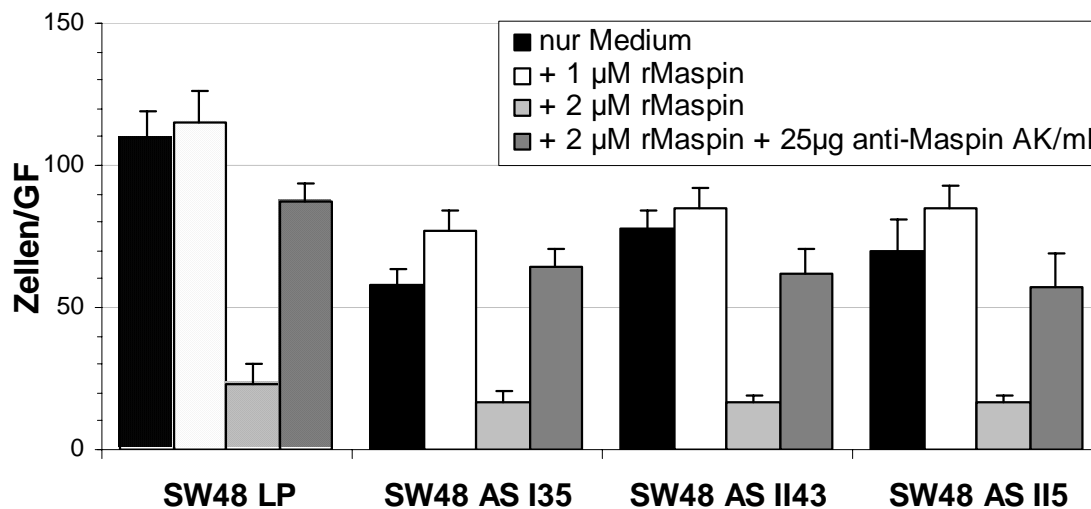


Abb. 4.2.37: Invasivität der SW48 AS-Klone unter dem Einfluss von rMaspin und anti-Maspin-Antikörper. GF: Gesichtsfeld, AK: Antikörper.

	nur Medium	+ 1 µM rMaspin*	+ 2 µM rMaspin*	+ 2 µM rMaspin + 25 µg anti-Maspin-Antikörper*
SW48 LP	+0%	+5,6%	-78,6%	-19,7%
SW48 AS I35	-46,6%	+32,6%	-71,7%	+10,3%
SW48 AS II43	-28,9%	+9,4%	-78,2%	-20,2%
SW48 AS II5	-35,9%	+21,4%	-76,0%	-18,6%
MW _{SW48 ASK}	-37,1%	+21,1%	-75,3%	-9,5%

*bezogen auf den entsprechenden Klon nur mit Medium

Tab. 4.2.11: Modulation der Invasivität der SW48 AS-Klone durch Zugabe von rMaspin bzw. anti-Maspin-Antikörper (bezogen auf SW48 LP nur Medium). * bezogen auf den jeweils entsprechenden Klon nur Medium, GF: Gesichtsfeld.

4.2.7.7.3 Invasivität der Maspin-supprimierten SW48 siRNA-Transfektanden

In den Invasions-Assays zeigten die SW48 siRNA-Transfektanden als Folge der Maspin-Suppression durchschnittlich nur 31,3 % der Invasionsrate der Kontrolle, dabei war die mittlere Invasivität, bezogen auf die Kontrolle, bei SW48 siRNA I 38,9 % und bei SW48 siRNA III 23,7 % (Abb. 4.2.38).

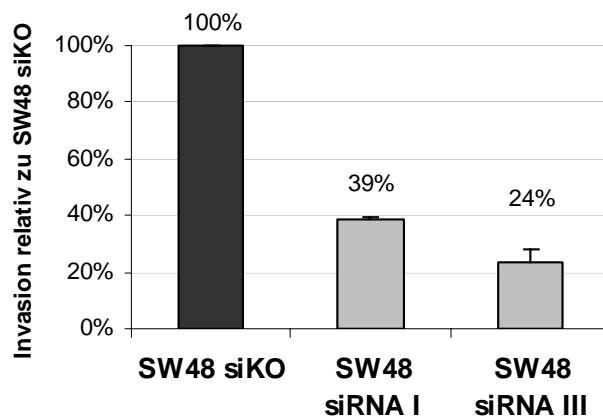


Abb. 4.2.38: Relative Invasivität der SW48 siRNA-Transfektanden (bezogen auf SW48 siKO).

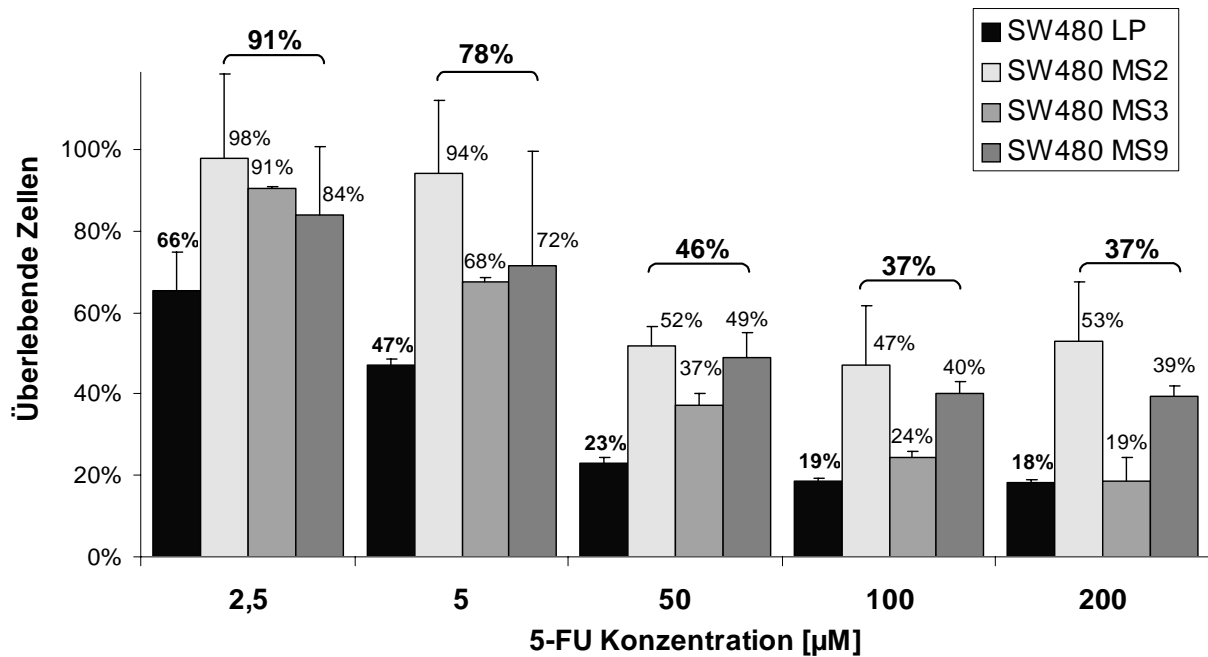
4.2.7.8 5-Fluoruracil-Sensitivität

Da, wie in 4.2.6 beschrieben, die Maspinexpression und Lokalisation in CRC ein prädiktiver Marker für das Ansprechen auf eine 5-FU basierte Chemotherapie ist, wurde der Einfluss der Maspinexpression auf die 5-FU-Sensitivität analysiert. Dazu wurden die Klone mit verschiedenen 5-FU-Konzentrationen behandelt und der Anteil der überlebenden Zellen nach 72 h mit Hilfe eines XTT-Assays durch Vergleich mit unbehandelten Zellen bestimmt.

4.2.7.8.1 5-FU-Sensitivität der Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klone

Alle SW480 MS-Klone zeigten im 5-FU-Konzentrationsbereich von 2,5 μM – 200 μM durchwegs höhere Überlebensraten bzw. niedrigere Sensitivitäten als die Kontrolle. Ab 50 μM 5-FU waren die mittleren Überlebensraten der überexprimierenden Klone doppelt so hoch wie bei der Kontrolle (Abb. 4.2.39).

Abb. 4.2.39 auf der folgenden Seite: Relative Überlebensraten der SW480 MS-Klone bei verschiedenen 5-FU-Konzentrationen (bezogen auf den jeweiligen Klon ohne 5-FU). Die Zahlen über den Klammern entsprechen den mittleren Überlebensraten der SW480 MS-Klone.

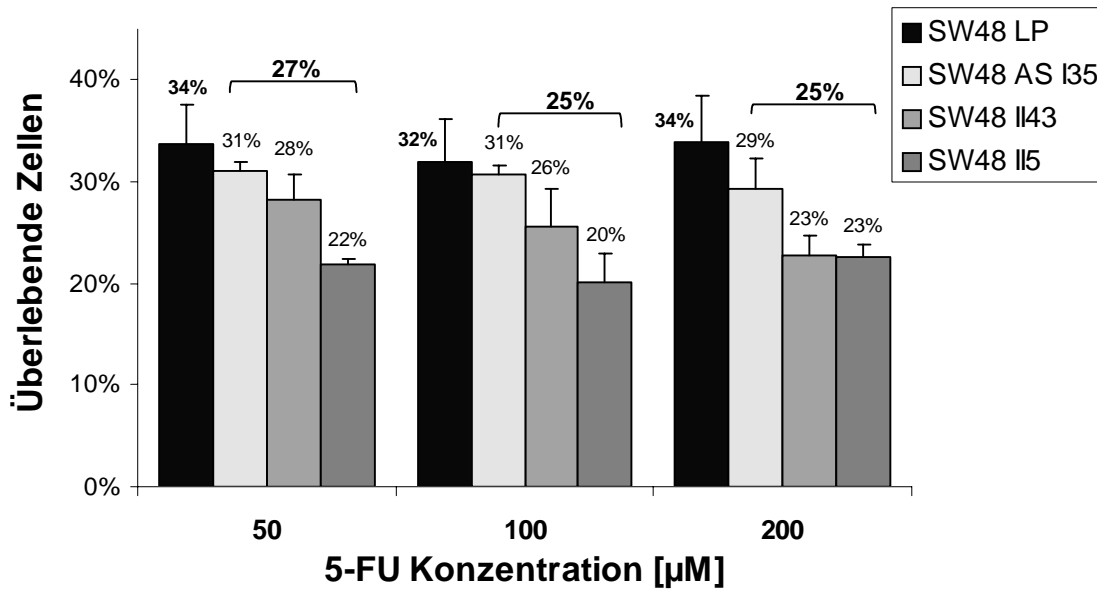


4.2.7.8.2 5-FU-Sensitivität der Maspin-supprimierten SW48 AS-Klone

Da die SW48 AS-Klone sehr schnell proliferierten (siehe 4.2.7.5.2), wurde der Anteil der überlebenden Zellen mit Hilfe eines XTT-Assays schon nach 48 h und nicht nach 72 h, wie bei den SW480 MS-Klonen, durch Vergleich mit unbehandelten Zellen bestimmt. Weil aus den vorangegangenen 5-FU-Assays mit den SW480 MS-Klonen (siehe 4.2.7.8.1) bekannt war, dass der toxische Effekt von 5-FU ab Konzentrationen von 50 µM am größten ist, wurden bei den SW48 AS-Klonen 5-FU-Konzentrationen ab 50 µM getestet.

Dabei zeigten alle SW48 AS-Klone niedrigere Überlebensraten bzw. höhere Sensitivitäten als die Kontrolle. Bei 50 µM 5-FU waren die Überlebensraten der SW48 AS-Klone gegenüber der Kontrolle durchschnittlich um 19 %, bei 100 µM um 21 % und bei 200 µM um 26 % erniedrigt (Abb. 4.2.40).

Abb. 4.2.40 auf folgender Seite: Relative Überlebensraten der SW48 AS-Klone bei verschiedenen 5-FU-Konzentrationen (bezogen auf den jeweiligen Klon ohne 5-FU). Die Zahlen über den Klammern entsprechen den mittleren Überlebensraten der SW48 AS-Klone.



4.2.8 Expressionsanalysen von Genen, die mit 5-FU-Sensitivität assoziiert sind

Da die Maspinexpression eine Modulation der 5-FU-Sensitivität zur Folge hatte (siehe 4.2.8.8), wurde der Einfluss von Maspin auf die Expression von Enzymen analysiert, die am 5-FU-Metabolismus beteiligt sind: Die für die *de novo* Synthese von Thymidylat verantwortliche Thymidylatsynthase (TS) wird von 5-FU gehemmt und ist das Hauptziel von 5-FU. Die Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD) inaktiviert 5-FU und verschlechtert dadurch das Ansprechen einer 5-FU-Chemotherapie. Die Thymidinphosphorylase (TP) oder auch *Platelet-derived endothelial cell growth factor* (PD-ECGF) genannt, aktiviert zum einem 5-FU zur therapeutisch wirksamen Molekülspezies, zum anderem ist die TP ein pro-angiogenetischer Wachstumsfaktor, der das Tumorwachstum propagiert. Die Analysen fanden auf transkriptioneller Ebene mittels *real-time* PCR statt.

4.2.8.1 Expression 5-FU-Sensitivitäts-assoziierter Gene bei den Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klonen

Im Vergleich zur SW480 LP-Kontrolle stieg bei den SW480 MS-Klonen die TS-Expression durchschnittlich um das 2,31-fache. Eine weit stärkere Aktivierung war bei der DPD-Expression zu beobachten, die durchschnittlich um den Faktor 32,53 anstieg. Im Gegensatz dazu wurde bei den SW480 MS-Klonen die TP-Expression inaktiviert und sank um durchschnittlich 97 % (Abb. 4.2.41).

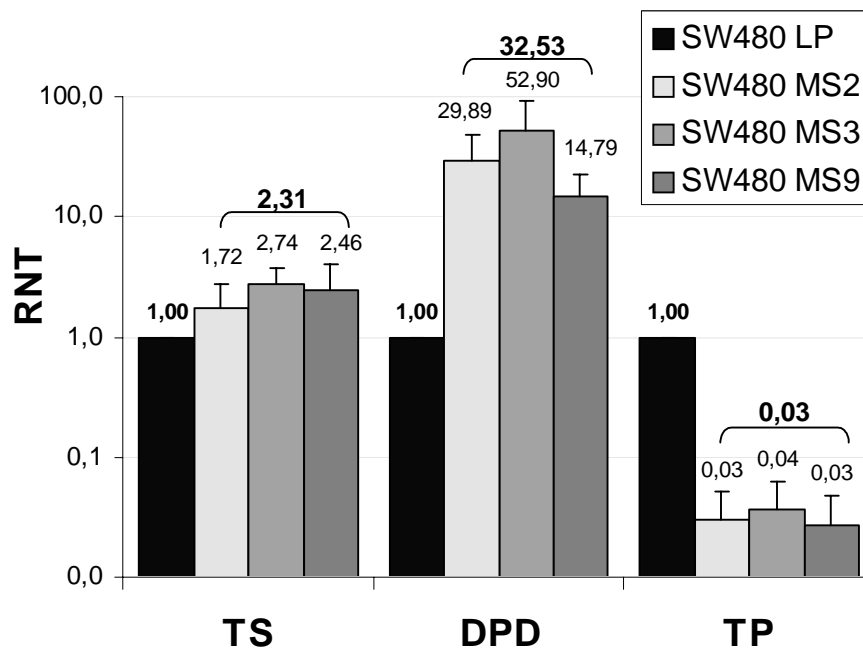


Abb. 4.2.41: Expression 5-FU-Sensitivitäts-assoziiierter Gene bei den SW480 MS-Klonen. SW480 MS MW: Mittelwerte der RNT-Werte der SW480 MS-Klone. Die Zahlen über den Klammern entsprechen den mittleren RNT-Werten der SW480 MS-Klone. (Logarithmische Skalierung!)

4.2.8.2 Expression 5-FU-Sensitivitäts-assoziiierter Gene bei den Maspin-supprimierten SW48 AS-Klonen

Im Vergleich zur SW48 LP-Kontrolle verringerte sich bei den SW48 AS-Klonen die TS-Expression: SW48 AS I35 zeigte eine Reduktion der TS-Expression um 59 %, SW48 AS II43 um 70 % und SW48 AS II5 um 95 %. Insgesamt verringerte sich die TS-Expression der Maspin-supprimierten SW48 AS-Klone um durchschnittlich 75 %.

Eine weit stärkere Inaktivierung war bei der DPD-Expression zu beobachten: Bei SW48 AS I35 und bei SW48 AS II43 lag die DPD-Expression unter 1 % der Kontrolle, SW48 AS II5 zeigte eine 95%ige Inaktivierung der DPD-Expression. Die durchschnittliche Verringerung der DPD-Expression lag bei den SW48 AS-Klonen bei 98 %.

Die TP-Expression sank bei SW48 AS I35 um 18 %, bei SW48 AS II43 um 85 % und bei SW48 AS II5 um 78 %, was eine durchschnittliche Reduktion von 58 % ergab (Abb. 4.2.42).

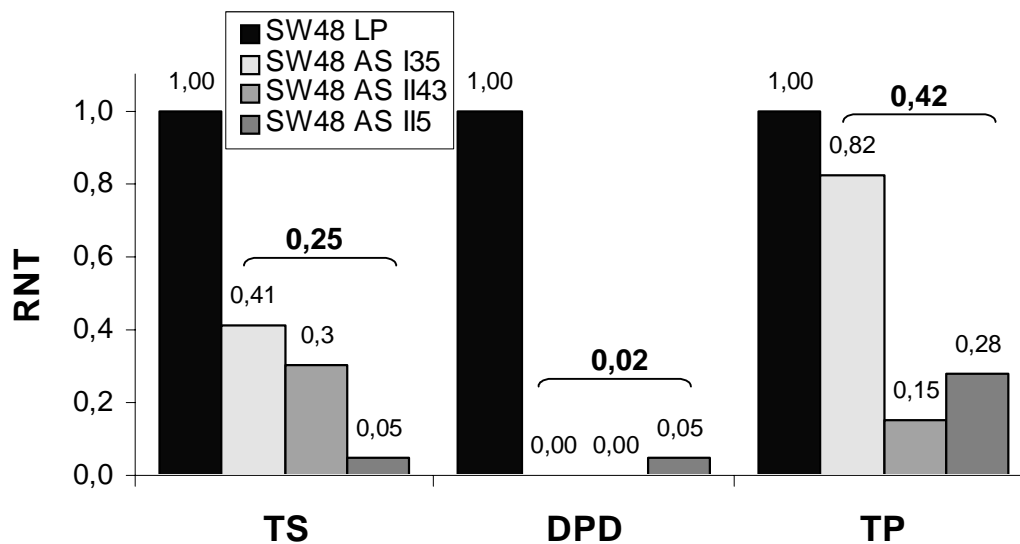


Abb. 4.2.42: Expression 5-FU-Sensitivitäts-assoziiierter Gene bei den SW48 AS-Klonen. Die Werte über den Klammern entsprechen den mittleren RNT-Werten der SW48 AS-Klone.

4.2.8.3 Expression 5-FU-Sensitivitäts-assoziiierter Gene und Korrelation zur Maspinexpression in CRC

Anhand der Affymetrix Genome U133A 2.0 *Array*-Daten konnte die transkriptionelle Expression der 5-FU-Sensitivitäts-assoziierten Gene *TS*, *DPD* und *TP* in 42 CRCs sowie deren Korrelation zur Maspinexpression analysiert werden.

Um die Expression der Gene mit der Maspinexpression vergleichen zu können, wurden die Tumore in drei Gruppen eingeteilt:

- Gruppe ME1: Schwache Maspinexpression (Maspin-Fluoreszenzen < 1000; n=14)
- Gruppe ME2: Mittlere Maspinexpression (Maspin-Fluoreszenzen > 1000 und < 5000; n=14)
- Gruppe ME3: Starke Maspinexpression (Maspin-Fluoreszenzen > 5000; n=14)

Zur Prüfung zweier Gruppen auf signifikante Unterschiede wurde der nicht-parametrische Mann-Whitney-U-Test angewandt. Bei der Analyse von mehr als zwei Gruppen wurden die Signifikanzen mit dem nicht-parametrischen Kruskal-Wallis-Test analysiert.

4.2.8.3.1 TS-Expression in CRC

Der Median der *TS-Array*-Signale war 4374 in der Gruppe ME1, 4003 in der Gruppe ME2 und 4642 in der Gruppe ME3. Die Unterschiede der *TS*-Expression von ME1 und ME2 zu ME3 waren signifikant ($p_{TS\ ME1\ vs.\ ME3} = 0,004$ bzw. $p_{TS\ ME2\ vs.\ ME3} < 0,000$). Der Unterschied zwischen ME1 und ME2 war nicht signifikant ($p_{TS\ ME1\ vs.\ ME2} = 0,285$)

(Abb. 4.2.43a). Der Kruskal-Wallis-Test (KW) zeigte signifikante Unterschiede der TS-Expression zwischen den Gruppen ME1, ME2 und ME3 ($P_{KW} < 0,000$).

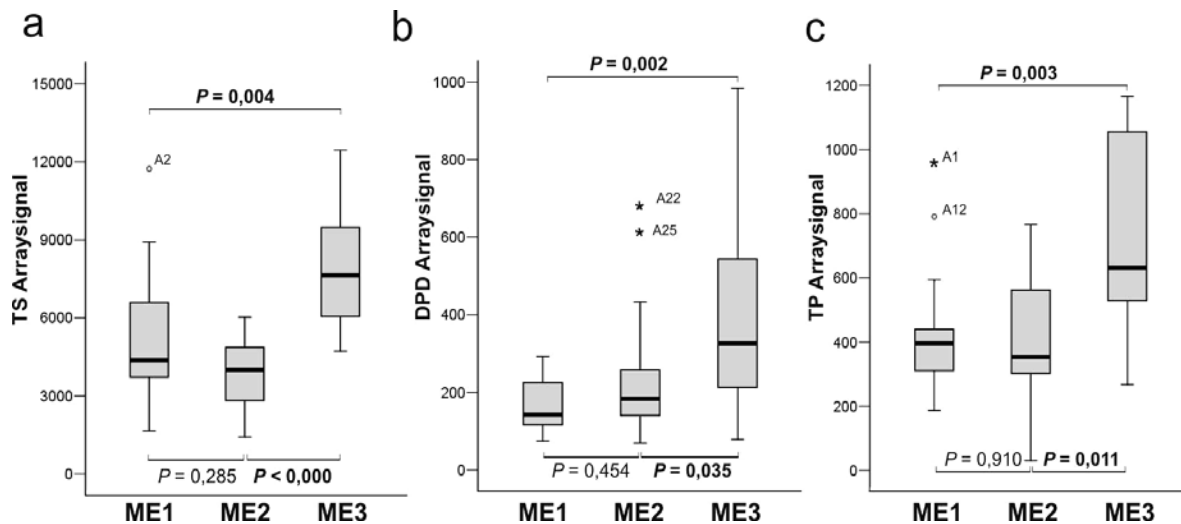
4.2.8.3.2 DPD-Expression in CRC

Die Mediane der DPD-Expression in den Gruppen ME1, ME2 und ME 3 waren 142, 184 und 326. Signifikante Unterschiede zeigten sich zwischen den Gruppen ME1 und ME3 ($p_{DPD\ ME1\ vs.\ ME3} = 0,002$) sowie zwischen ME2 und ME3 ($p_{DPD\ ME2\ vs.\ T3} = 0,035$). Zwischen den Gruppen ME1 und ME2 ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p_{DPD\ ME1\ vs.\ ME2} = 0,454$) (Abb. 4.2.43b). Im Kruskal-Wallis-Test zeigten sich signifikante Unterschiede für die DPD-Expression zwischen den Gruppen ME1, ME2 und ME3 ($P_{KW} = 0,010$).

4.2.8.3.3 TP-Expression in CRC

Bei der TP-Expression betragen die Mediane der *Array*-Signale in den Gruppen ME1, ME2 und ME3 396, 354 und 632. Die TP-Expressionen der Gruppen ME1 und ME2 unterschieden sich signifikant von der in Gruppe 3 ($p_{TP\ ME1\ vs.\ ME3} = 0,003$ und $p_{TP\ ME2\ vs.\ ME3} = 0,011$), zeigten jedoch untereinander keinen signifikanten Unterschied ($p_{TP\ ME1\ vs.\ ME2} = 0,910$) (Abb. 4.2.43c). Die Unterschiede der TP-Expression zwischen den Gruppen ME1, ME2 und ME3 waren ebenfalls signifikant ($P_{KW} = 0,007$).

Abb. 4.2.43 auf folgender Seite: Korrelationen zwischen Maspinexpression und 5-FU-Sensitivitäts-assoziierten Genen in CRC (Mann-Whitney-U-Test). Die CRC wurden nach Maspin-Signalstärken gruppiert. Dabei waren in Gruppe ME1 die CRC mit Maspin-Fluoreszenzen bis 1000, in Gruppe ME2 diese mit Signalstärken < 1000 bis 5000 und in Gruppe ME3 die CRC mit Signalstärken < 5000. Die Signalstärken der untersuchten Gene TS, DPD und TP sind als Boxplots dargestellt. Der graue Bereich der Boxplots zeigt den Interquartilbereich (25. - 75. Perzentil). Die Schwarze Linie in den Boxen entspricht dem Median, die Enden der Antennen bezeichnen das 10. und 90. Perzentil. Ausreißer sind mit “o” und Extremwerte mit “*” indiziert. Die Signifikanz (P) der Signalstärkenunterschiede zwischen zwei Gruppen wurde mit dem nicht-parametrischen Mann-Whitney-U-Test bestimmt. Signifikante P -Werte ($p < 0,05$) sind in **Fettdruck** dargestellt.



4.2.9 Expression von Invasivitäts-assoziierten Genen

Wie in 4.2.7.7 beschrieben, beeinflusste die Maspinexpression die Invasivität der CRC-Zelllinien SW480 und SW48 positiv. Daher wurde der Einfluss von Maspin auf die Expression einiger bekannter Invasivitäts-assoziiierter Gene untersucht: die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) bauen die extrazelluläre Matrix proteolytisch ab und ermöglichen so den Tumorzellen die Invasion von Geweben. Die Aktivität der MMPs wird wiederum von „tissue inhibitors of MMPs“ (TIMPs) negativ reguliert.

Bei allen Klonen wurden die Gene *MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP7*, *TIMP1*, *TIMP2* und *TIMP3* auf ihre transkriptionelle Expression untersucht. Dabei waren nur Transkripte von *MMP2*, *MMP3*, *TIMP1* und *TIMP3* im sensitiven Bereich der *real-time* PCR nachweisbar.

4.2.9.1 Expression von Invasivitäts-assoziierten Genen bei den Maspin-überexprimierenden SW480 MS-Klonen

Bei den SW480 MS-Klonen hatte die Maspin-Überexpression eine Erhöhung der Invasivität zur Folge (siehe 4.2.7.7.1). Verglichen mit der Kontrolle stieg deren Expression von *TIMP1* durchschnittlich auf das 1,79-fache an, während die Transkription von *TIMP3* im Mittel um 51 % erniedrigt war. Bei *MMP2* und *MMP3* bewirkte die Maspin-Überexpression eine fast vollständige Inaktivierung der Transkription. Die Expression von *MMP2* war im Durchschnitt zu 96 % inaktiviert worden; die Expression von *MMP3* ging durchschnittlich um 90 % zurück (Abb. 4.2.44). Diese unerwarteten Ergebnisse stehen im Widerspruch zur erhöhten Invasivität der SW480 MS-Klone (siehe 4.2.7.7.1) und werden in 5.1.2.3 und 5.1.3.3 diskutiert.

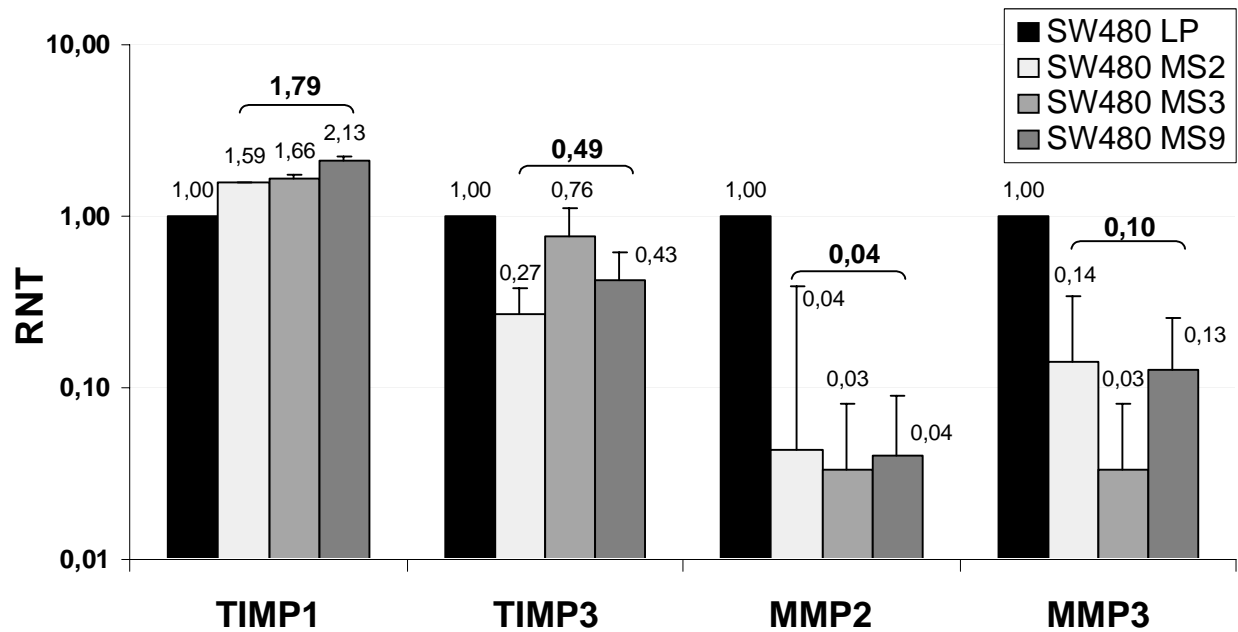


Abb. 4.2.44: Expression Invasivitäts-assoziiierter Gene bei den SW480 MS-Klonen. Die Werte über den Klammern entsprechen den mittleren RNT-Werten der SW480 MS-Klone. RNT: relative normalisierte Transkription. (Logarithmische Skalierung!).

4.2.9.2 Expression von Invasivitäts-assoziierten Genen bei den Maspin-supprimierten SW48 AS-Klonen

Wie in 4.2.7.7.2 beschrieben, ging die Maspin-Suppression der SW48 AS-Klone mit geringeren Invasivitätsraten einher. Auf transkriptioneller Ebene hatte die Maspin-Suppression das vollständige Erliegen der TIMP1- und TIMP3-Expression zur Folge.

Bei SW48 AS I35 zeigte die Expression von MMP2 einen Anstieg um den Faktor 2,44, im Gegensatz dazu verringerte sich diese bei SW48 AS II43 und SW48 AS II5 um 66 % bzw. 85 %. Die durchschnittliche MMP2-Expression lag bei einem RNT-Wert von 0,98.

MMP3 wurde von den SW48 AS-Klonen ebenfalls heterogen exprimiert: SW48 AS I35 und SW48 AS II5 zeigten eine Erhöhung der MMP3-Expression um den Faktor 1,90 bzw. 1,97, während bei SW48 AS II43 eine 85%ige Reduktion festgestellt wurde. Die mittlere MMP3-Expression betrug 1,34 (Abb. 4.2.45).

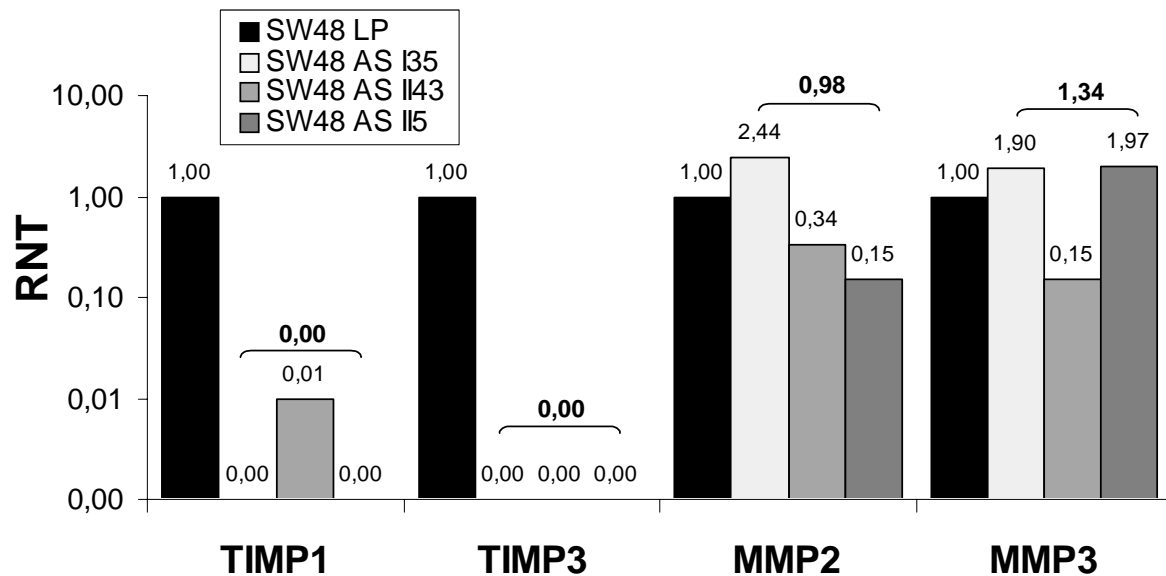


Abb. 4.2.45: Expression Invasivitäts-assoziiierter Gene bei den SW48 AS-Klonen. Die Werte über den Klammern entsprechen den mittleren RNT-Werten der SW48 AS-Klone. RNT: relative normalisierte Transkription. (Logarithmische Skalierung!)

4.2.9.3 Expression Invasivitäts-assoziiierter Gene und Korrelation zur Maspinexpression in CRC

In 42 CRC wurde, wie in 4.2.8.3 beschrieben, anhand der Affymetrix Genome U133A 2.0 Array-Daten die Expression der Invasivitäts-assoziierten Gene *MMP1*, *MMP2*, *MMP3*, *MMP7*, *TIMP1*, *TIMP2* und *TIMP3* und deren Korrelation mit der Maspinexpression untersucht.

Die Gene *MMP1*, *TIMP1* und *TIMP2* zeigten in den CRC der Gruppe ME3 (hohe Maspinexpression) signifikant höhere Expressionen, als in den CRC der Gruppe ME1 (niedrige Maspinexpression; $p_{MMP1\ ME1\ vs.\ ME3} = 0,031$; $p_{TIMP1\ ME1\ vs.\ ME3} = 0,001$; $p_{TIMP2\ ME1\ vs.\ ME3} = 0,001$).

Beim Vergleich der CRC der Gruppe ME2 (mittlere Maspinexpression) und der CRC der Gruppe ME3 (hohe Maspinexpression) war bei *MMP7* in Gruppe ME3 eine signifikante Erniedrigung zu beobachten ($p_{MMP7\ ME2\ vs.\ ME3} = 0,001$), während *TIMP1* und *TIMP2* erneut eine signifikant höhere Expression in Gruppe ME3 zeigten ($p_{TIMP1\ ME2\ vs.\ ME3} = 0,019$; $p_{TIMP2\ ME2\ vs.\ ME3} = 0,006$). Der Vergleich aller drei Gruppen (Kruskal-Wallis-Test) zeigte bei *MMP7*, *TIMP1* und *TIMP2* signifikante Unterschiede. Die Expressionen und Korrelationen der Invasivitäts-assoziierten Gene sind in Tab. 4.2.12 zusammengefasst.

	mediane Signalstärken			Korrelationen			
	CRC Maspin niedrig (ME1)	CRC Maspin mittel (ME2)	CRC Maspin hoch (ME3)	Mann-Whitney-U-Test (2 Parameter)			Kruskal-Wallis-Test (3 Parameter) ME1 vs. ME2 vs. ME3
				ME1 vs. ME3	ME2 vs. ME3	ME1 vs. ME2	
MMP1	2688	↑ 5222	↑ 7780	0,031	0,603	0,210	0,108
MMP2	1267	1411	2075	0,511	0,635	0,839	0,768
MMP3	1123	2488	1416	0,482	0,285	0,137	0,258
MMP7	1940	2895	↓ 1147	0,306	0,001	0,164	0,011
TIMP1	4486	↑ 5981	↑ 9856	0,001	0,019	0,667	0,004
TIPM2	213	↑ 311	↑ 549	0,000	0,006	0,401	0,001
TIPM3	1479	1447	1199	0,482	0,401	0,804	0,630

Tab. 4.2.12: Korrelationen zwischen der Expression Invasivitäts-assoziiertes Gene und der Maspinexpression in CRC. Die CRC wurden nach Maspin-Signalstärken gruppiert. Dabei waren in Gruppe ME1 die CRC mit Maspin-Fluoreszenzen bis 1000 (niedrig), in Gruppe ME2 diese mit Signalstärken > 1000 bis 5000 (mittel) und in Gruppe ME3 die CRC mit Signalstärken > 5000 (hoch). Die Werte der Korrelationen stellen *P*-Werte dar. Signifikante *P*-Werte ($p < 0,05$) sind in **Fettdruck** dargestellt. Die Richtung der signifikanten Expressionsänderungen zwischen den Gruppen ist mit den grauen Pfeilen angedeutet.

4.2.10 Expression von Invasivitäts- und 5-FU-Sensitivitäts-assoziierten Genen in CRC in Abhängigkeit von der Maspin-Kernfärbung

Zur Untersuchung der Korrelationen zwischen der Maspin-Kernfärbung und den Expressionen von Invasivitäts- und 5-FU-Sensitivitäts-assoziierten Genen wurden die mittels *Array* untersuchten CRC in drei Gruppen (MK: Maspin-Kernfärbung) aufgeteilt:

- **MK1**: CRC mit negativer oder schwacher Maspin-Kernfärbung (negative oder schwache Färbung; < 10 % der Zellen stark gefärbt; n=21)
- **MK2**: CRC mit mittlerer Maspin-Kernfärbung (> 10 % der Zellen mittel gefärbt; n=12)
- **MK3**: CRC mit starker Maspin-Kernfärbung (> 10 % der Zellen stark gefärbt; n=7)

Die medianen *Array*-Signale wurden mit dem Kruskal-Wallis-Test auf signifikante Unterschiede untersucht. Dabei zeigten die Expressionen von TIMP1, TIMP2, TS, DPD und TP jeweils signifikant unterschiedliche Expressionen ($P_{KW} < 0,05$) zwischen den Gruppen (Tab. 4.2.13 auf folgender Seite).

Gruppe	MK1	MK2	MK3	P_{KW}
MMP1	3828	6610	6804	0,495
MMP2	1353	1555	1999	0,472
MMP3	2079	1559	2122	0,918
MMP7	1959	2511	1284	0,648
TIMP1	4708	9091	10447	0,010
TIMP2	284	447	659	0,001
TIMP3	1464	1510	1690	0,984
TS	4315	5016	9189	0,003
DPD	1606	2292	5389	0,001
TP	3526	5496	5515	0,022

Tab. 4.2.13: Expression von Invasivitäts- und 5-FU-Sensitivitäts-assoziierten Genen in CRC in Abhängigkeit von der Maspin-Kernfärbung. MK1: CRC mit negativer und schwacher Maspin-Kernfärbung, MK2: CRC mit mittlerer Maspin-Kernfärbung, MK3: CRC mit starker Maspin-Kernfärbung. Die statistische Signifikanz P zwischen den drei Gruppen wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test (KW) berechnet. Bei **Fettdruck** ist $P_{KW} < 0,05$.

4.2.11 Expression von rekombinantem Maspin

Reines Maspin-Protein wurde für Invasionstests (siehe 4.2.7.7.2) und für Protein-Interaktionsstudien (siehe 4.2.12) in größeren Mengen benötigt. Diese Umstände erforderten die Herstellung und Reinigung von rekombinantem Maspin (rMaspin).

4.2.11.1 Erstellung des pQSH-Maspin-Vektorkonstruktes aus pQE-TriSystem HisStrep1

Als Vektor wurde das pQE-TriSystem HisStrep 1-Plasmid (Qiagen) gewählt, da dieses eine Expression in Säuger-, Insekten- und *E. coli*-Zellen erlaubt. Zudem sollten zwei *Tags*, die sich der *multiple cloning site* anschließen, eine sehr effiziente und gründliche Aufreinigung ermöglichen. Der 8xHis-*Tag* erlaubt eine Reinigung über Nickelsäulchen, der Strep-*Tag* II bindet sehr stark, aber durch Biotin reversibel, an Strep-Tactin-Säulchen. Der *T5*-Promotor und der *Lac*-Operator ermöglichen die induzierbare Expression in *E. coli* (Abb. 4.2.46).

Die kodierende, intronfreie Sequenz des Maspingenes (*SERPINB5*) wurde mittels PCR aus der cDNA der CRC-Zelllinie SW48 mit der Polymerase *Pfu* amplifiziert. Die dabei verwendeten Primer enthielten Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Sma* I (pQE *Sma*I MS Forward) und *Not* I (pQE *Not*I MS Reverse) zur gerichteten Insertion sowie das ATG-Startcodon. Das Stopcodon wurde im Reverse-Primer durch TCA ersetzt, das für Serin kodiert (Abb. 4.2.46). Das fertige Vektorkonstrukt wurde pQSH-Maspin genannt und zur

Transformation des *E. coli*-Stammes XL2 Blue verwendet. Das Konstrukt aus dem transformierten Klon pQSH-Maspin #22 wurde mittels Miniprep nach alkalischer Lyse isoliert und mit einem Set aus sechs Primern (pQE Tri, Masp Insert seq 1, Masp Ins Seq 2, Masp Ins Seq 3, Masp Ins Seq 4, Masp-sense_screen) zur Kontrolle sequenziert.

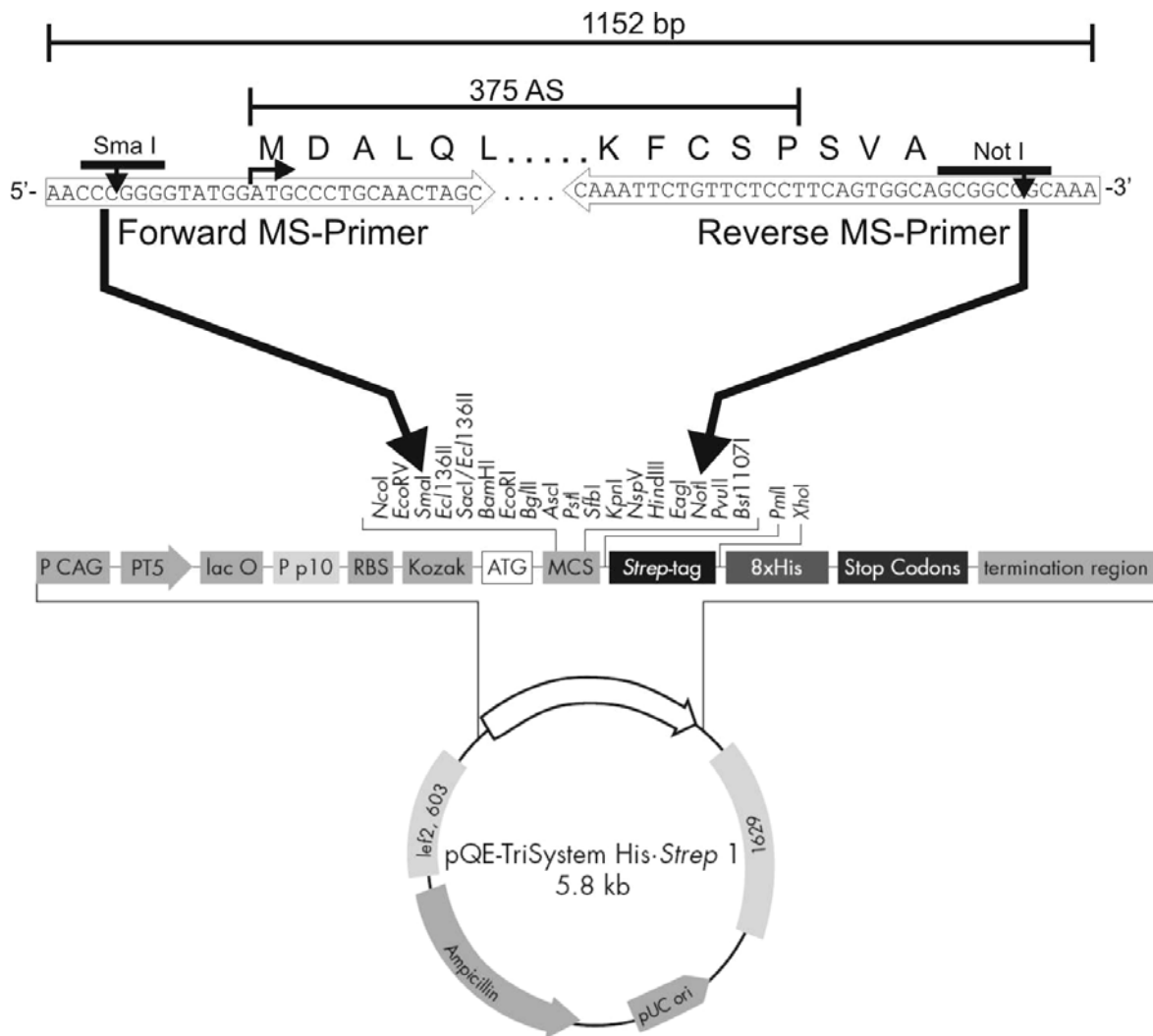


Abb. 4.2.46: pQSH-Maspin-Vektorkonstrukt. Die codierende Maspinsequenz (375 AS) wurde mit der *Pfu*-Polymerase und den rMS-Primerpaar aus cDNA von SW48 amplifiziert. Der Forward MS-Primer (pQE SmaI MS Forward) enthielt eine *SmaI*-Schnittstelle, der Reverse MS-Primer (pQE NotI MS Reverse) enthielt eine *NotI*-Schnittstelle und ersetzte das Stopcodon durch TCA (Stop → Serin [S]). PT5: T5-Promotor, lac O: Lac-Operator, RBS: Ribosomen-Bindestelle, ATG: Startcodon, 8xHis: His Tag, MCS: Multiple cloning site, Strep-tag: Strep-Tag-Sequenz, Stop-Codons in allen drei Leserahmen, Ampicillin: Ampicillinresistenz, P CAG: CMV/Actin/Globin Promotor, P p10: p10 Promotor, Kozak: Kozak Konsensus-Sequenz, termination region: Terminator-Region der Transkription, lef2, 603/1629: Flankierende Baculovirussequenzen zur Herstellung rekombinanter Baculoviren, pUC ori: pUC Origin of Replication, AS: Aminosäuren.

4.2.11.2 Isolation von rMaspin

Die Zellen aus 100 ml einer pQSH-Maspin #22-Kultur wurden 5 Stunden nach Induktion mit IPTG geerntet und lysiert. Das rMaspin wurde über den 8xHis-Tag an Ni-NTA-Agarose-Säulchen aufgereinigt. Alle Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE getrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Wie Abb. 4.2.47a zeigt, fand sich das rMaspin in den Eluaten 2 und hauptsächlich 3.

Das rMaspin der Ni-NTA Eluate 2 und 3 wurde über eine Strep-Tactin Superflow-Säule über den **Strep-Tag** weiter aufgereinigt und sechsmal mit je 0,5 ml Strep-Tactin Elutionspuffer eluiert. Das hochreine rMaspin befand sich in den Elutionen 2, 3 und 4 (Abb. 4.2.47a). Diese Eluate wurden vereint und das darin enthaltene rMaspin durch Ultrafiltration über einem Amicon Microcon YM-30 Ultrafilter auf 160 µg/ml aufkonzentriert. Die gepoolten Eluate der Strep-Tactin Superflow-Säule wurden nach SDS-PAGE einer hochsensitiven Silberfärbung unterzogen. Diese zeigte selbst beim aufkonzentrierten rMaspin keine Verunreinigungen (Abb. 4.2.47b). Die Spezifität des rMaspins wurde an 10 µl unkonzentriertem Pool der Strep-Tactin Eluate mittels *Western-Blot*-Analyse verifiziert (Abb. 4.2.47c).

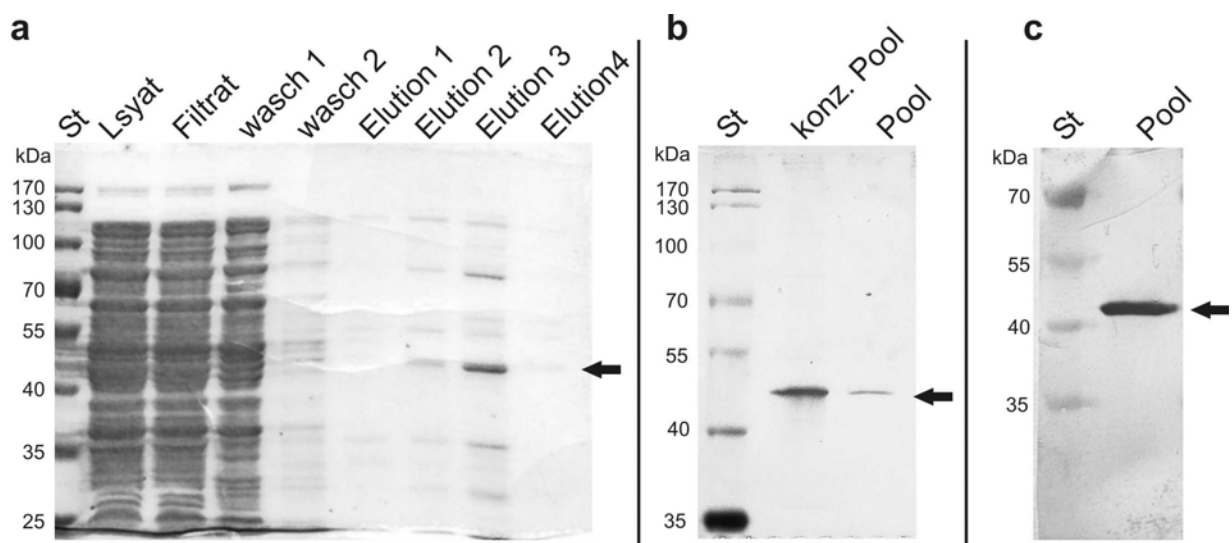


Abb. 4.2.47: Isolation und Reinigung des rMaspin aus *E. coli* XL-2 blue. (a) Reinigung über den His-Tag mit einer Ni-NTA-Agarosesäule (Coomassie-Färbung der SDS-PAGE). Das gereinigte rMaspin fand sich in den Eluaten 2 und 3. (b) Reinigung über den Strep-Tag mit Strep-Tactin Superflow (Silberfärbung der SDS-PAGE). Die Eluate 2 und 3 aus (a) wurden vereint und mit Strep-Tactin Superflow weiter aufgereinigt. Die Strep-Tactin Superflow-Eluate 2, 3 und 4 enthielten das reine rMaspin, wurden vereint (Pool) und durch 30 kDa-Ultrafiltration aufkonzentriert (konz. Pool). (c) *Western-Blot* des rMaspins.

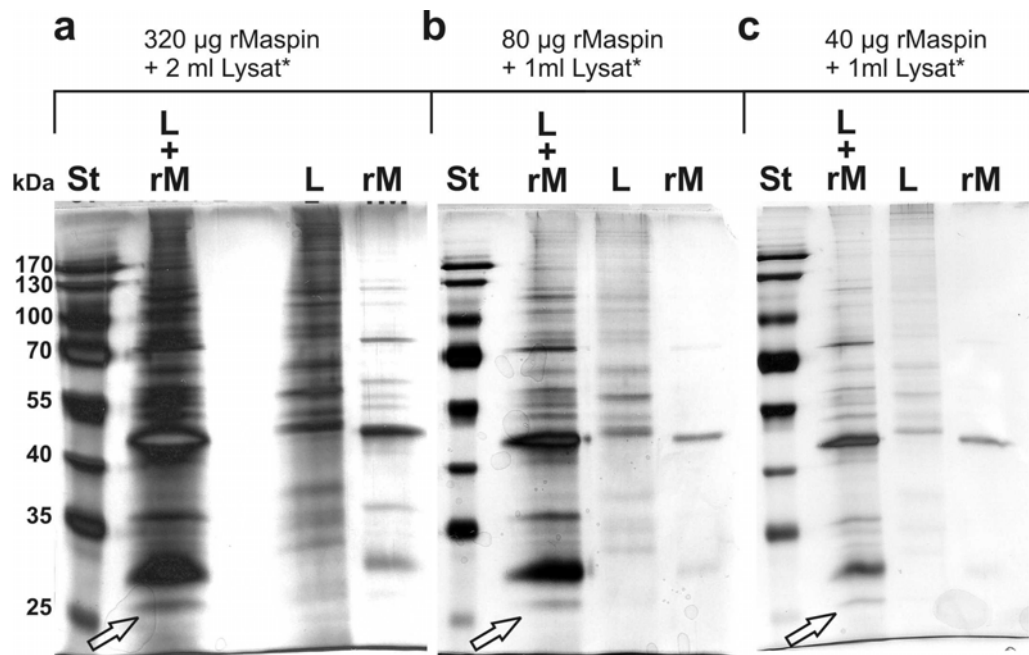
4.2.12 rMaspin-Proteininteraktionen

Mit Hilfe des rMaspins sollten mögliche interagierende Proteine identifiziert werden. Dazu wurde in mehreren Versuchen eine Strep-Tactin Superflow-Matrix zusammen mit rMaspin (40 - 320 µg) und mit frischen Gesamtproteinextrakten (1 – 2 ml RIPA-Lysate) aus der CRC-Zelllinie SW48 inkubiert. Die im RIPA-Puffer enthaltenen Proteinaseinhibitoren sollten einer Degradation vorbeugen. Die Bindung, Reinigung und Elution erfolgte unter nicht-denaturierenden Bedingungen. So sollten nach mehreren Waschschritten nur noch die an das rMaspin gebundenen Interaktionspartner zusammen mit dem rMaspin eluiert werden. Als Kontrolle wurde Strep-Tactin Superflow mit den jeweils selben Mengen SW48-Lysat und rMaspin, die auch im Interaktionsansatz enthalten war, jeweils alleine behandelt. Leider konnte nach mehreren Versuchen kein rMaspin, das zusammen mit Zelllysat inkubiert wurde, eluiert werden. Die Bindung des rMaspins über den **Strep-Tag** an die Strep-Tactin Superflow-Matrix wurde durch das Zelllysat blockiert.

Die Maspin-Protein-Bindestudien wurden daher über die **His-Tag**-Interaktion mit der Ni-NTA-Agarose wiederholt. Das Experiment wurde mit drei verschiedenen rMaspin- und Lysat-Mengen wiederholt: (i) 320 µg rMaspin + 2 ml Lysat, (ii) 80 µg rMaspin + 1 ml Lysat und (iii) 40 µg rMaspin + 1 ml Lysat. Die Eluate 2 und 4 wurden vereinigt und durch 30 kDa-Ultrafiltration circa 10-fach konzentriert.

Die Silberfärbung der am höchsten konzentrierten rMaspin-Kontrolle zeigte einige Spuren von Verunreinigungen, die in den niedrigeren Konzentrationen nicht detektierbar waren (Abb. 4.2.48a, b, c je Spur rM). Bei allen Coelutionen ist eine schwache Bande von circa 26 - 30 kDa zu erkennen, die in den Kontrollspuren nicht erscheint (Abb. 4.2.48a, b, c Pfeile). Diese Bande stellt wahrscheinlich einen zellulären Interaktionspartner von Maspin dar.

Abb. 4.2.48 auf der folgenden Seite: Protein-Interaktionen zwischen rMaspin und SW48-Proteinen. Verschiedene Mengen gereinigtes rMaspin und Lysate von SW48 wurden zusammen mit Ni-NTA-Agarose in Ni-NTA Lysepuffer inkubiert. Nach der Aufreinigung wurden jeweils die vereinigten Eluate 2 und 3, die das rMaspin samt coisolierten Proteinen enthielten, vereinigt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Silberfärbung unterzogen. * von den Proben „L+rM“ (Lysat + rMaspin) wurden, im Vergleich zu den Kontrollen L (Lysat) und rM (rMaspin) jeweils die doppelten Mengen in die SDS-PAGE eingesetzt. Die Pfeile markieren eine schwache Bande von ca. 26 - 30 kDa, die nur bei den „L+rM“-Proben erkennbar ist.



4.2.13 Maspin-Coimmunpräzipitation (CoIP)

Um die Ergebnisse der Maspin-Proteininteraktion aus dem Versuch mit rekombinantem Maspin zu überprüfen, wurden Maspin-Coimmunpräzipitationen (CoIPs) mit den Maspin-überexprimierenden CRC-Zelllinien SW48 und LoVo durchgeführt. Die Maspin-CoIP wurde einmal mit 30 µl Protein G-Sepharose + 300 µl SW48-Lysat + 10 µg anti-Maspin-Antikörper und einmal mit 50 µl Protein G-Sepharose + 500 µl LoVo-Lysat + 10 µg anti-Maspin-Antikörper durchgeführt.

In der Silberfärbung war bei beiden Zelllinien bei 42 kDa deutlich die Maspin-Bande sichtbar. Bei LoVo erschienen unterhalb der Maspin-Bande drei weitere Banden, die aber in den Kontrollen auch sichtbar und damit unspezifisch waren. Bei SW48 waren unterhalb der Maspin-Bande ebenfalls drei starke und drei sehr schwache Banden zu erkennen. Diese waren in den SW48-Kontrollen nicht sichtbar, entsprachen aber mit hoher Wahrscheinlichkeit denen der LoVo-Kontrollen (Abb. 4.2.49 auf folgender Seite). Da die Gele unterschiedliche Laufzeiten hatten, sind die Größen der kleineren Proteine nicht gut vergleichbar, und Aussagen über coisolierter Maspin-Interaktionspartner können nicht getroffen werden.

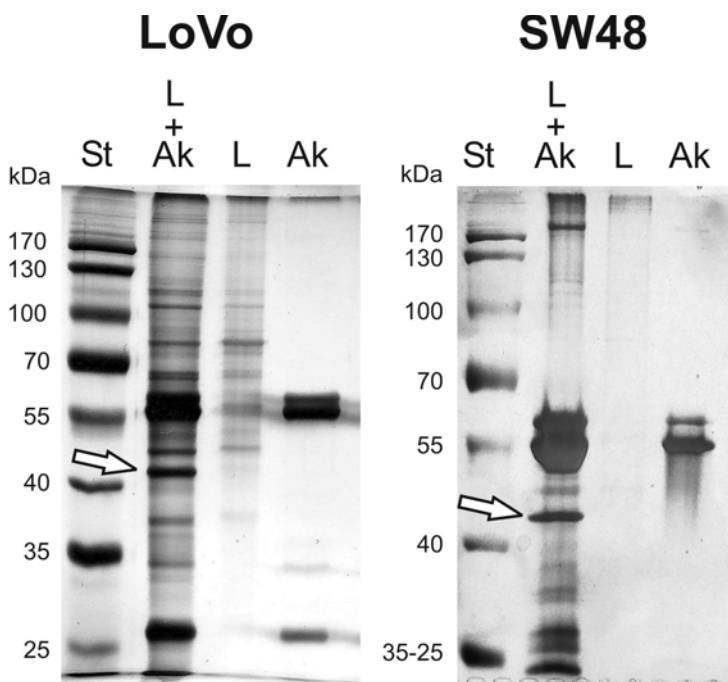


Abb. 4.2.49: Maspin-Coimmunpräzipitation mit LoVo und SW48. Zelllysate (L) von LoVo und SW48 wurden zusammen mit anti-Maspin-Antikörper (AK) inkubiert und über Protein G-Sepharose gereinigt. Der Pfeil zeigt das präzipitierte, zelluläre Maspin.

4.2.14 Maspin-Mutationsanalysen

Zur Identifizierung von Mutationen im Maspingen *SERPINB5*, die eventuell pathogen wirken oder mit subzellulärer Lokalisation korrelieren, wurden Sequenzierungen des Proteinkodierenden Bereiches inklusive der Intron-Exon-Übergänge vom Maspingen (*SERPINB5*) durchgeführt. Sequenziert wurden genomische DNAs von sechs CRC-Zelllinien und von sieben CRC Patienten (jeweils Tumor- und Normalgewebe). Die Maspin-IHC von den MSI Patienten A30, A31, A37 und A39 zeigte starke Kernfärbung, die Kernfärbung der MSS Patienten A9 und A11 war schwach und die des MSI Patienten A22 negativ. Der Grad der Maspinexpression der sequenzierten CRC-Zelllinien stieg von der Maspin-negativen Zelllinie CaCo-2 über SW480, HT29, HCT116, LoVo und SW48 an.

Die Sequenzdaten zeigten bei den CRC Patienten keine Unterschiede zwischen Normal- und Tumorgewebe. Folgende Sequenzunterschiede, die einen Aminosäureaustausch bezogen auf die Ensembl Referenzsequenz (ENST00000382771) verursachten, wurden festgestellt:

- D95H bei A9;
- S177P bei SW48, HCT116, SW480, CaCo-2, LoVo, A11, A30, A9, A22, A31 und A39;
- V279G bei SW480;
- S303F bei SW480;
- I320V bei in SW48, HT29, Lovo, HCT116, A30, A9, A22 und A39;
- E326K bei SW480 und A31.

Zudem konnten auf DNA-Ebene in der kodierenden Sequenz folgende Polymorphismen identifiziert werden (A vom ATG-Startcodon = 1):

- 333: G→C bei LoVo in A11, A30, A9, A22, A31 und A39
- 897: T→C bei in SW48, LoVo, HCT116, HT29, A37 und A11

Um die Relevanz der S177P-Mutation in Exon 5 abschätzen zu können, wurden zusätzlich Blut-DNAs drei gesunder Mitarbeiter des Institutes für Pathologie der Universität Regensburg untersucht. Diese Sequenzierungen ergaben für die Aminosäure 177 einmal biallelisch Serin, einmal biallelisch Prolin und einmal monoallelisch je Serin und Prolin. Somit handelte es sich bei der S177P Mutation um einen Polymorphismus in der Aminosäuresequenz.

4.2.15 Korrelation der Maspinexpression mit dem Zellzyklus

In 4.2.4.2 wurde beschrieben, dass die Maspinexpression in den Maspin-positiven CRC-Zelllinien SW48, LoVo und HCT116 inhomogen verteilt ist. In der IHC erschienen einige Zellen stark positiv, andere waren nur schwach gefärbt oder negativ. Bei HCT116 war der Großteil der Zellen negativ bis schwach, aber einige außergewöhnlich große Zellen zeigten positive Maspinfärbung (Abb. 4.2.5). Diese Beobachtungen ließen vermuten, dass Maspin vielleicht zellzyklusabhängig exprimiert werden könnte. Um dies zu überprüfen, wurde der Zellzyklus von SW48 und HCT116 mit Hilfe von Serumstarvation und Aphidicholin synchronisiert. Aphidicholin hemmt die DNA-Synthese und verhindert in Kombination mit der Serumstarvation, dass die Zellen in die S-Phase eintreten können. Werden die Zellen mit Vollmedium, das ebenfalls Aphidicholin enthält inkubiert, stehen die Zellen vor dem Eintritt in die S-Phase, werden aber durch die Hemmung der DNA-Synthese an dem endgültigen Eintritt gehindert. Nach dem Entfernen des Aphidicholins treten fast alle Zellen gleichzeitig in die S-Phase ein, wodurch deren DNA-Gehalt stetig bis auf das Doppelte (2n) steigt. Nach Abschluss der DNA-Synthese beginnen die Zellen mit der Mitose (G2/M-Phase). Nach der Teilung erscheinen die Zellen erneut in der G1-Fraktion.

Die synchrone Durchschreitung des Zellzyklusses wurde durch FACS-Analysen beobachtet und bestätigt (Abb. 4.2.50). Dabei wurde der zelluläre DNA-Gehalt mit Hilfe von Propidiumiodid (PI) nach verschiedenen Zeiten nach Entfernung des Aphidicholins gemessen. Vor Entfernung des Aphidicholins waren bei SW48 83,2 % und bei HCT116 86,5 % der Zellen in der G1-Phase arretiert. Nach 4 Stunden fanden sich bei SW48 82,1 % und bei HCT116 83,1 % der Zellen in der S-Phase. Nach 7 Stunden hatten 40,0 % der SW48-Zellen

und 58,3 % der HCT116-Zellen die G2/M-Phase erreicht, während bei SW48 noch 49,4 % und bei HCT116 noch 32,8 % der Zellen in der S-Phase waren (Abb. 4.2.50; Abb. 4.2.51).

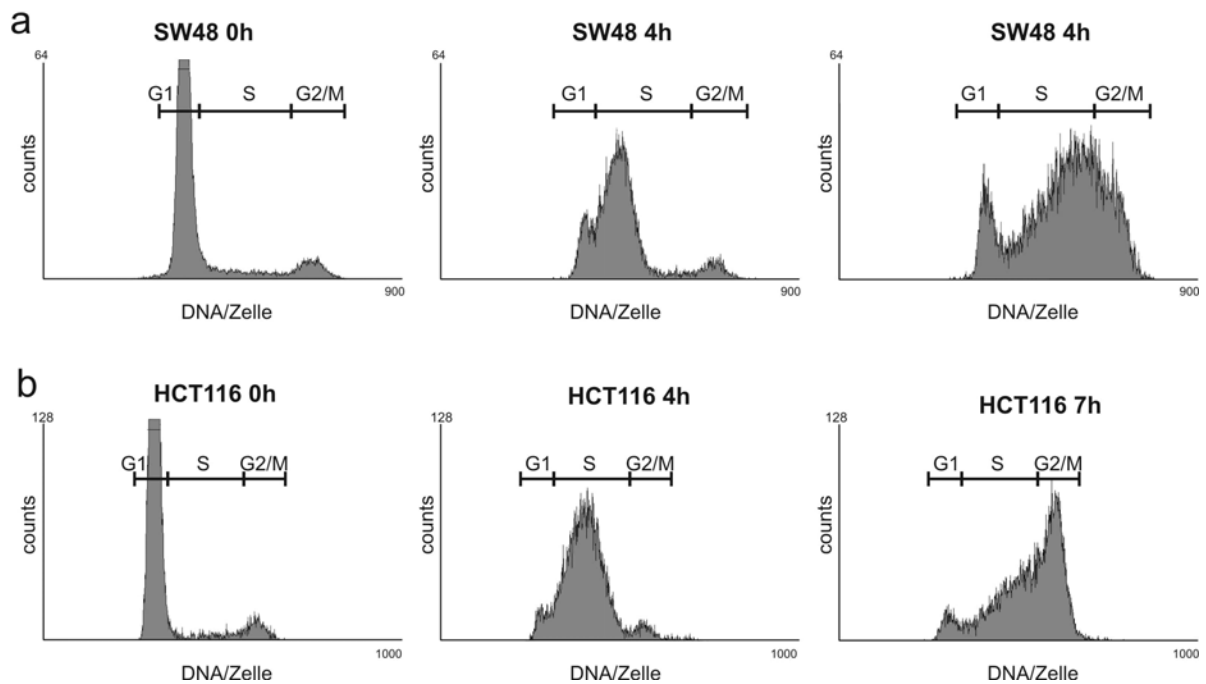


Abb. 4.2.50: Zellzyklus-Synchronisation der SW48- und HCT116-Zellen. Der DNA-Gehalt der Zellen wurde bei verschiedenen Zeiten (0 h, 4 h und 7 h) nach Entfernung des Aphidicholins über Propidiumiodid-Färbung durch FACS-Analysen bestimmt. Die X-Achse zeigt die PI-Signalstärke, die Y-Achse die entsprechenden Zellzahlen. Die Marker G1, S und G2/M selektionieren die Zellen in den entsprechenden Zellzyklusphasen.

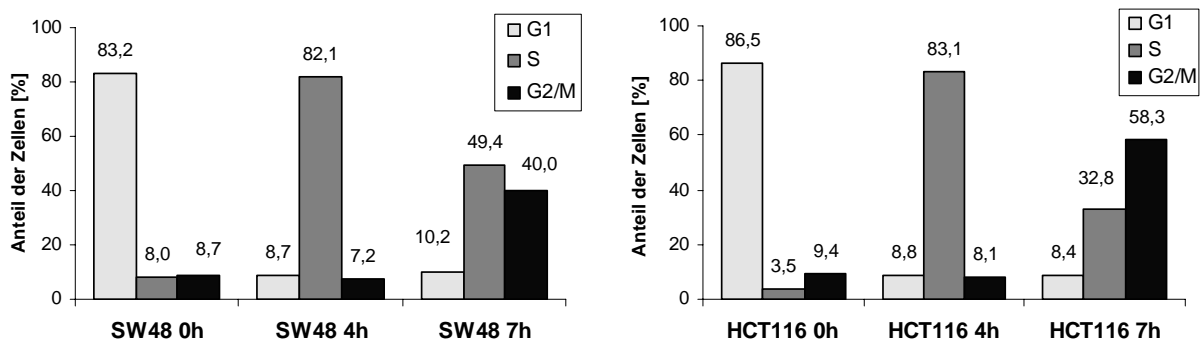


Abb. 4.2.51: Zellzyklusverteilung der synchronisierten SW48- und HCT116-Zellen. Die Abbildung zeigt die Anteile der Zellen, die sich 0 h, 4 h und 7 h nach Entfernung des Aphidicholins in den jeweiligen Phasen des Zellzyklusses befinden. Die Markierung der Zellzyklusphasen erfolgte durch die in Abb. 4.2.50 gezeigten Marker.

Die Maspinexpression während der verschiedenen Phasen des Zellzyklusses wurde durch FACS-Analysen, *real-time* PCR und *Western-Blot* bestimmt. Bei der FACS-Analyse wurden die oben beschriebenen, synchronisierten Zellen, neben PI, mit anti-Maspin-Antikörper behandelt, der mit einem FITC-konjugierten Sekundärantikörper nachgewiesen wurde.

Bei SW48 lag die FITC-Fluoreszenz, die der Maspinexpression entspricht, bei den G1-Phase-Zellen (0 h) bei 308, bei den S-Phase-Zellen (4 h) bei 413 und bei den G2/M-Phase-Zellen (7 h) bei 582. HCT116 zeigte in der G1-Phase (0 h) FITC-Fluoreszenzen von 317, in der S-Phase (4 h) 536 und in der G2/M-Phase 574 (Tab. 4.2.14).

Damit stieg die Maspinexpression, bezogen auf die G1-Phase, in der S-Phase bei SW48 um den Faktor 1,34 und bei HCT116 um 1,69. In der G2/M-Phase war bei SW48 ein Anstieg um den Faktor 1,89 und bei HCT116 um den Faktor 1,81 zu beobachten (Tab. 4.2.14).

	Anteil der Zellen [%]			FITC-Fluoreszenz (Maspinexpression)	
	G1	S	G2/M	absolut	relativ
SW48 0h	83,2	8,0	8,7	308	1,00
SW48 4h	8,7	82,1	7,2	413	1,34
SW48 7h	10,2	49,4	40,0	582	1,89
HCT116 0h	86,5	3,5	9,4	317	1,00
HCT116 4h	8,8	83,1	8,1	536	1,69
HCT116 7h	8,4	32,8	58,3	574	1,81

Tab. 4.2.14: Modulation der Maspinexpression während des Zellzyklusses (FACS-Analyse). Die Signalstärke der FITC-Fluoreszenz entspricht der Maspinexpression. Diese wurde auch relativ zur Maspinexpression in der G1-Phase (0 h) bestimmt.

Die Synchronisation der Zellen wurde in einem neuen Versuch wiederholt um Maspinexpression mittels *real-time* PCR und *Western-Blot*-Analyse auf RNA- bzw. Protein-Ebene zu untersuchen. Dazu wurden die SW48- und HCT116-Zellen wie beschrieben synchronisiert und nach 3, 5 und 8 Stunden geerntet. Ein Teil wurde zur FACS-Analyse mit PI gefärbt, aus den restlichen Zellen wurde RNA isoliert bzw. wurden Lysate für die Proteinanalysen bereit.

Die FACS-Analysen ergaben, dass sich vor Aphidicholin-Entfernung (0 h) bei SW48 83,4 % und bei HCT116 75,5 % der Zellen in der G1-Phase arretiert waren. Nach 3 und 5 Stunden befand sich in beiden Zelllinien der Großteil der Zellen in der S-Phase (SW48: 3 h 52,1 %, 5 h 57,0 %; HCT116: 3 h 76,6 %, 5 h 56,6 %). Nach 8 Stunden waren 19,7 % der SW48-Zellen und 67,4 % der HCT116-Zellen in der G2/M-Phase.

Auf transkriptioneller Ebene war die Maspinexpression 3 Stunden nach Entfernung von Aphidicholin (S-Phase) bei SW48 um den Faktor 2,14 und bei HCT116 um den Faktor 1,14

gestiegen. Nach 5 Stunden betrug der Faktor bei SW48 1,03 und bei HCT116 2,03; nach 7 Stunden bei SW48 1,57 und bei HCT116 1,64. Die Ergebnisse der *real-time* PCR sind in Tab. 4.2.15 zusammengefasst.

Im *Western-Blot* zeigten die Maspin-Banden der entsprechenden Zell-Lysate keine Unterschiede (ohne Abb.).

	Anteil der Zellen [%]			Maspin-expression [RNT]
	G1	S	G2/M	
SW48 0h	83,0	9,6	6,8	1,00
SW48 3h	41,1	52,1	6,5	2,14
SW48 5h	34,0	57,0	8,6	1,03
SW48 7h	26,0	54,8	19,7	1,57
HCT116 0h	75,5	11,8	11,1	1,00
HCT116 3h	8,6	76,6	15,1	1,14
HCT116 5h	10,6	56,6	32,7	2,03
HCT116 7h	18,0	15,0	67,4	1,64

Tab. 4.2.15: Modulation der Maspinexpression während des Zellzyklusses (*real-time* PCR-Analyse mit cDNA). Die Maspinexpression ist in RNT-Werten angegeben, die jeweils auf den 0 h-Wert kalibriert sind. RNT: relative normalisierte Transkription

4.3 Methylierungsanalysen

Die Entwicklung und Anwendung neuer, quantitativer Methylierungsanalysen für biologische und klinisch relevante Fragestellungen stellten einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Im Verlauf dieser Arbeit wurden quantitative Methylierungsanalysen für die tumorbiologisch wichtigen Gene *GSTP1*, *MGMT*, *p16*, *GRO3*, *RASSF1*, *SFRP1*, *PITX2*, *CDH3* (*P-Cadherin*), *APC*, *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* und *TS* etabliert. Der Fokus der Anwendungen lag dabei auf den Methylierungsanalysen der DNA-Reparaturgene *MLH1* und *MGMT* (*O*(6)-*Methylguanin-DNA Methyltransferase*) und des Tumorsuppressorgenes *P16* (*P16^{INK4A}*; *CDKN2A*, *Cyclin-dependent kinase inhibitor-2A*). Die Methylierungsanalysen von *P16* und *MGMT* sollten Hinweise auf das Vorkommen von DNA-Methylierungen in chromosomal instabilen MSS CRC liefern. Mit Hilfe der *MLH1*-Methylierungsanalyse sollte geprüft werden, zu welchem Grad *MLH1*-Methylierung in HNPCC vorkommt und ob eine quantitative *MLH1*-Methylierungsanalyse die Identifizierung von negativ bis schwach methylierten HNPCC-Kandidaten unter den stark methylierten sporadischen MSI CRC Patienten ermöglicht.

Dabei wurden zwei neue Methoden zur quantitativen Methylierungsanalyse entwickelt:

QAMMOD, eine Quantitative Methylierungsanalyse von Bisulfit-modifizierter DNA und QESD, die Quantifizierung Endonuklease-resistenter DNA.

Im Folgenden versteht sich unter „Methylierung“ der Anteil methylierter DNA-Moleküle.

4.3.1 QAMMOD, eine Quantitative Methylierungsanalyse von Bisulfit-modifizierter DNA

QAMMOD erlaubt zum einen eine präzise Quantifizierung des Anteils der methylierten DNA einer Probe und bietet zum anderen die Möglichkeit der qualitativen Analyse der Methylierung innerhalb des untersuchten DNA-Abschnittes. QAMMOD basiert auf SYBR-Green *real-time* PCR und benötigt keine teuren und unter Umständen schwierig zu erstellenden fluoreszenzmarkierte Hybridisierungssonden.

4.3.1.1 Validierung der QAMMOD am Beispiel des *MLH1*-Promotors

4.3.1.1.1 Quantitative Validierung der *MLH1*-QAMMOD

Zur präzisen Evaluierung der quantitativen Methylierungsanalyse wurden verschiedene Mischungen aus methylierter und unmethylierter Zelllinien-DNA untersucht. Der Promotor der MSI CRC-Zelllinie SW48 ist hypermethyliert, der von SW480 ist zu 100 % unmethyliert.

Die DNAs von SW48 und SW480 wurden in den Verhältnissen 1:1, 19:20, 4:5, 1:2, 1:5, 1:20 und 0:1 gemischt, sodass die Mischungen 100 %, 95 %, 80 %, 50 %, 20 %, 5 % und 0 % methylierte SW48-DNA enthielten. Die Ergebnisse der QAMMOD des distalen und proximalen *MLH1*-Promotors sind in Abb. 4.3.1 dargestellt. Die Anteile von detektierter und eingesetzter methylierter DNA zeigten eine hohe Übereinstimmung, was den hohen Grad an Genauigkeit widerspiegelt.

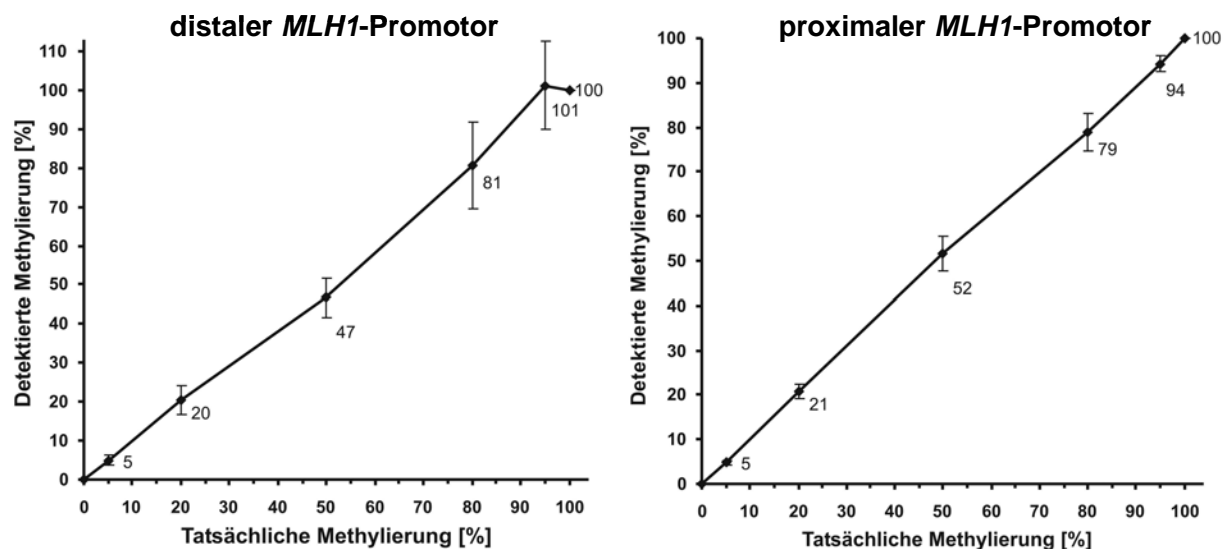


Abb. 4.3.1: Methylierungsquantifizierung verschiedener Mischungen aus methylierter und unmethylierter DNA aus CRC-Zelllinien. Detektierter und eingesetzter Anteil von methylierter *MLH1*-Promotor-DNA stimmen sehr genau überein. Die Zahlen im Diagramm entsprechen den Mittelwerten der detektierten Anteile methylierter DNA.

4.3.1.1.2 Qualitative Validierung und Kontrolle der *MLH1*-QAMMOD

Die Sequenz der Bisulfit-modifizierte DNA enthält nur noch Cytosine, die ursprünglich 5-Methyl-Cytosine waren. So spiegelt sich der Grad der Methylierung im CG-Gehalt der modifizierten DNA wider, weshalb *Flank*-PCR-Produkte von ursprünglich methylierter DNA einen höheren SP zeigen, als *Flank*-PCR-Produkte von ursprünglich unmethylierter DNA (Prinzip: Abb. 4.3.2a).

Proben mit ausschließlich unmethylierter DNA zeigten einen SP bei niedriger Temperatur, methylierte DNA-Spezies zeigten entsprechend einen SP bei höherer Temperatur. Wurde in einer Probe mit der quantitativen Methylierungsanalyse methylierte DNA-Spezies detektiert, so zeigte sich diese in der SP-Analyse in einem Schmelzpunkt bei höherer Temperatur (Abb. 4.3.2b). Der mediane SP der distalen *Flank*-PCR-Produkte betrug bei den methylierten DNA-Spezies 85,0°C und bei den unmethylierten DNA-Spezies 79,0°C. Die entsprechenden SP der proximalen *Flank*-PCR-Produkte lagen bei 78,5°C (methyliert) und 73,0°C (unmethyliert).

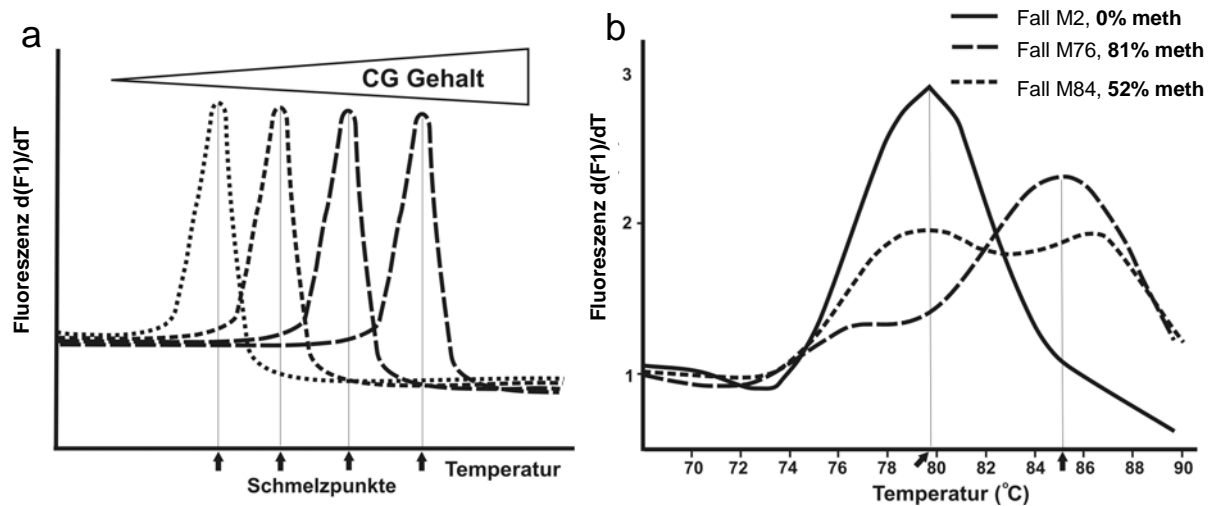


Abb. 4.3.2: Schmelzpunktanalysen verschiedener *Flank*-PCR-Produkte. (a) Der Grad der Methylierung spiegelt sich im GC-Gehalt der *Flank*-PCR-Produkte wider, deren Schmelzpunkte proportional zum GC-Gehalt ansteigen (schematische Darstellung). (b) Schmelzpunktanalyse von CRC-Proben am Beispiel von distalen *Flank*-PCR-Produkten. Unmethylierte DNA (0 % meth) zeigt einen Schmelzpunkt unter 80°C. Sind neben unmethylierten auch methylierte DNA-Moleküle vorhanden, so zeigen sich diese in einem zweiten Schmelzpunkt um 85°C (52 % und 81 % meth). Die Y-Achse skaliert die Änderung der Fluoreszenz während der Temperaturerhöhung $[d(F1)/dT]$. meth: Anteil methylierter DNA-Spezies.

4.3.1.2 Evaluierung der QAMMOD an einer Referenzgruppe mit verifizierten HNPCC-Tumoren und sporadischen CRC

Zur Evaluierung der QAMMOD wurde jeweils der Methylierungsstatus des distalen und des proximalen *MLH1*-Promotors in drei Referenz-Tumorgruppen quantifiziert:

- HNPCC (Amsterdam I-Kriterien erfüllt und / oder pathogene *MLH1*-Keimbahnmutation vorhanden, MSI, *MLH1* IHC negativ; n=28)
- sporadische MSI CRC (*MLH1* IHC negativ, Alter bei Diagnose ≥ 75 Jahre, keine *MLH1*-Keimbahnmutation, keine erfüllten Amsterdam-Kriterien, BRAF V600E-Mutation; n=14)
- sporadische MSS CRC (*MLH1* IHC positiv, MSS; n=16)

Die detektierten Methylierungswerte reichten von 0 % bis 100 %. Bei keinem der 16 MSS CRC wurde eine nennenswerte *MLH1*-Methylierung festgestellt: distale *MLH1*-Promotormethylierung: Median 2,50 %, Minimum 0 %, Maximum 6 %, Standardabweichung 2,11 %. Proximale *MLH1*-Promotormethylierung: Median 0,00 %, Minimum 0 %, Maximum 1 %, Standardabweichung 0,40 %. Mittelwert distal/proximal: Median 1,58 %, Minimum 0 %, Maximum 3 %, Standardabweichung 1,06 %.

Bei allen 14 sporadischen MSI CRC wurde an beiden Bereichen des *MLH1*-Promotors eine Methylierung festgestellt: distal: Median 56,00 %, Minimum 31 %, Maximum 100 %,

Standardabweichung 23,93 %; proximal: Median 38,00 %, Minimum 20 %, Maximum 80 %, Standardabweichung 18,40 %; Mittelwert distal/proximal: Median 50,44 %, Minimum 33 %, Maximum 81 %, Standardabweichung 15,76 %.

In den 24 Tumoren der HNPCC-Referenzgruppe wurden folgende *MLHI*-Promotormethylierungen festgestellt: distal: Median 0,00 %, Minimum 0 %, Maximum 16 %, Standardabweichung 4,67 %; proximal: Median 1 %, Minimum 0 %, Maximum 15 %, Standardabweichung 3,25 %; Mittelwert distal/proximal: Median 0,66 %, Minimum 0 %, Maximum 15 %, Standardabweichung 3,28 % (Tab. 4.3.1 auf folgender Seite).

Anhand der Daten aus der HNPCC-Referenzgruppe wurden Grenzwerte für positive Wertung der Methylierung definiert, die aus der aufgerundeten Summe des jeweiligen Mittelwertes (MW) + 5-facher Standardabweichung bestanden: Grenzwert für positive Methylierung MW distal/proximal = 19 % (1,9 + 16,4 = 18,3), distal = 27 % (2,2 + 23,3 = 26,5), proximal = 18 % (1,6 + 16,2 = 17,8). Die Einteilung der Patienten der Referenzgruppe in methylierungsnegativ und methylierungspositiv anhand dieser Grenzwerte brachte, unabhängig davon, ob der proximale, oder der distale Methylierungswert oder der Mittelwert aus beiden zur Einteilung verwendet wurde, identische Ergebnisse.

Alle sporadischen MSI CRC der Referenzgruppe waren methylierungspositiv und zeigten ein Minimum von 31 % mittlerer Methylierung. Die MSS CRC dienten als Kontrolle und waren durchwegs methylierungsnegativ mit einem Maximum von 3 % mittlerer Methylierung. Die Methylierungswerte (MW distal/proximal) lagen in der HNPCC-Gruppe bei 86 % der Tumore (24/28) unter 2 %, wobei 14 % (4/28) geringe Methylierung (MW distal/proximal 5 %, 7 %, 8 % und 15 %) zeigten.

Sowohl die *MLHI*-Methylierungsanalysen des proximalen als auch des distalen Promotors sowie der MW beider Analysen zeigten in nicht-parametrischen Signifikanztests signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen ($P_{\text{Kruskal-Wallis}} < 0,001$ bei allen Analysen). Obwohl in der Referenzgruppe sowohl die proximale als auch die distale Methylierungsanalyse des *MLHI*-Promotors alleine sicher zwischen den HNPCC- und MSI CRC unterscheiden konnte ($P_{\text{Mann-Whitney}} < 0,001$ bei proximaler und distaler Analyse), scheint der Mittelwert beider Analysen die sicherste Unterscheidung der beiden Gruppen zu gewährleisten.

Die Ergebnisse der *MLHI*-Methylierungsanalyse mittels QAMMOD sind in Tab. 4.3.1, in Tab. 4.3.3 auf Seite 111 und in Abb. 4.3.5 auf Seite 110 (linke Spalte) zusammengefasst.

	Methylierung [%]								
	sporadische MSS-CRC (n=16)			sporadische MSI CRC (n=14)			HNPCC (n=28)		
	prox	dist	MW (dist/prox)	prox	dist	MW (dist/prox)	prox	dist	MW (dist/prox)
n gültig	16	16	16	14	14	14	28	28	28
Min	0	0	0	20	31	33	0	0	0
Max	1	6	3	80	100	81	15	16	15
MW	0,19	2,75	1,56	40,64	64,57	52,56	1,57	2,21	1,94
Median	0,00	2,50	1,58	38,00	56,00	50,44	1,00	0,00	0,66
Std.abw.	0,40	2,11	1,06	18,40	23,93	15,76	3,25	4,67	3,28

Tab. 4.3.1: Ergebnisse der *MLHI*-QAMMOD der Tumore einer Referenzgruppe. Min: Minimalwert, Max: Maximalwert, MW: Mittelwert, Std.abw.: Standardabweichung.

4.3.2 Methylierungsanalysen mittels QESD (Quantifizierung Endonuklease-resistenter DNA)

Zur Vermeidung einer zeitaufwendigen Bisulfitbehandlung und zur Möglichkeit auch kleinste Probenmengen (zum Beispiel Feinnadelbiopsien) untersuchen zu können, wurde eine weitere, vereinfachte und zuverlässige Methode zur quantitativen Methylierungsanalyse Namens QESD etabliert. Bei QESD erfolgt die Methylierungsanalyse über eine Kombination aus Restriktionsverdau mit methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen und der Quantifizierung der methylierten, nicht verdaubaren DNA. QESD basiert auf SYBR Green *real-time* PCR, benötigt damit keine fluoreszenzmarkierten Sonden und erfordert im Gegensatz zur QAMMOD keine Bisulfit-Modifizierung der DNA.

4.3.2.1 Validierung der QESD zur Methylierungsanalyse des *MLHI*-Promotors

4.3.2.1.1 Sensitivität der QESD

Zur Abschätzung, welche minimale DNA-Menge nötig ist, um valide Ergebnisse zu erhalten, wurden verschiedene Verdünnungen *Hin6I*-behandelter SW48 DNA mittels QESD analysiert. Die Auswertung der Standardkurven ergab eine PCR-Effizienz von 2,00 für die QESD des proximalen *MLHI*-Promotors, die PCR-Effizienz der distalen *MLHI*-QESD betrug 1,88. Damit die QESD beim proximalen *MLHI*-Promotor 0 % ergibt, müssen die Beträge der ΔC_t -Werte ($C_t_{\text{Kalibratorverdau}} - C_t_{\text{Quantifizierungsverdau}}$) mindestens 7,97 ($2,00^{-7,97}=0,004$), beim distalen *MLHI*-Promotor entsprechend mindestens 8,53 ($1,88^{-8,53}=0,004$) betragen. Wie die Abb. 4.3.3 zeigt, lagen die Nachweisgrenzen jeweils bei 3,2 pg verdaute DNA/PCR-Ansatz. Um kleine

Anteile methylierter DNA noch sensitiv detektieren zu können, müssen für die QESD des *MLH1*-Promotors minimal 400 pg DNA in die *real-time* PCR eingesetzt werden, d.h. je 20µl-Verdau werden mindestens 4 ng, für die zwei Verdau insgesamt 8 ng DNA benötigt. Da in die Verdau standardmäßig 5 µl DNA eingesetzt wurden, war die minimale DNA-Konzentration für die QESD des *MLH1*-Promotors 0,8 ng DNA/µl. Natürlich lassen sich die Volumina der Verdau den Anforderungen entsprechend anpassen.

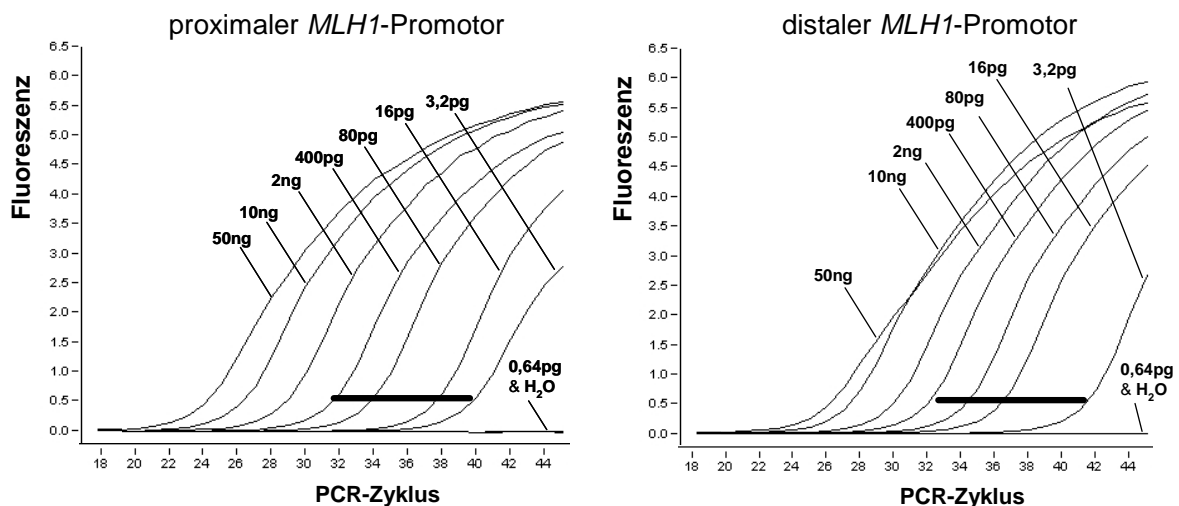


Abb. 4.3.3: Sensitivität der *MLH1*-QESD. Die Mengen *Hin6I*-behandelter SW48-DNA in Nanogramm (ng) je *real-time* PCR-Ansatz sind im Diagramm angegeben. Die Länge der schwarzen Balken entspricht dem Δ CT-Wert, ab dem die QESD 0 % Methylierung ergibt.

4.3.2.1.2 Quantitative Präzision der QESD

Zur präzisen Evaluierung der QESD, wurde methylierte SW48 DNA und unmethylierte Blut-DNA in den Verhältnissen 1:1, 19:20, 4:5, 1:2, 1:5, 1:20 und 0:1 gemischt, sodass die Mischungen 100 %, 95 %, 80 %, 50 %, 20 %, 5 % und 0 % methylierte DNA enthielten. Gleiche Mengen der DNA-Mischungen wurden jeweils mit der methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease *Hin6I* (Quantifizierungsverdau) und einer Mischung der methylierungsunabhängigen Restriktionsendonukleasen *XbaI* und *DraI* (Kalibratorverdau) behandelt. Die Ergebnisse der QESD des distalen und proximalen *MLH1*-Promotors sind in Abb. 4.3.4 dargestellt. Die hohe Übereinstimmung der detektierten und der eingesetzten Anteile methylierter DNA zeigt eine hohe Präzision der QESD.

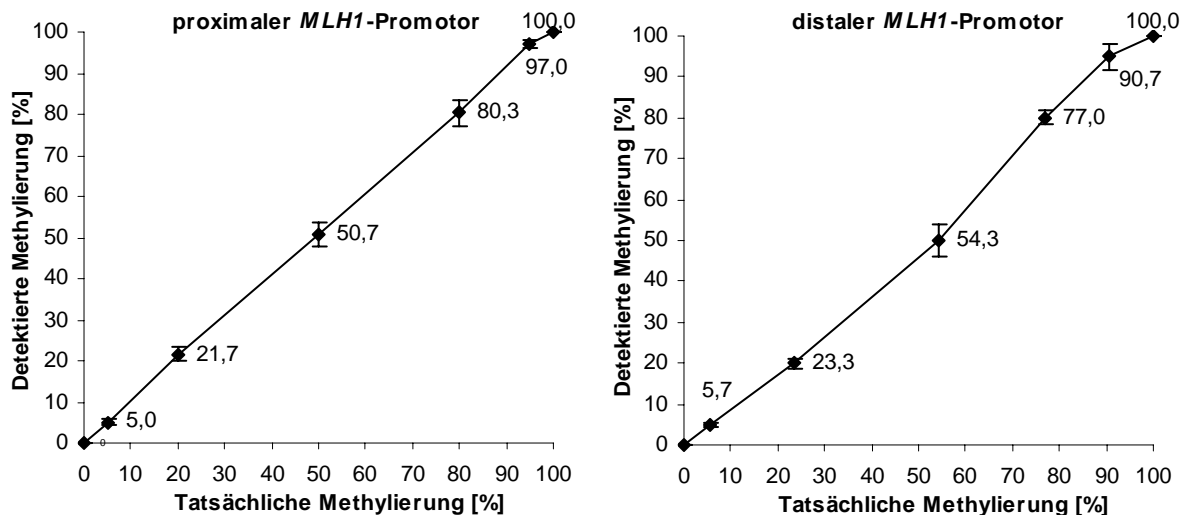


Abb. 4.3.4: QESD-Analyse verschiedener Mischungen aus methylierter und unmethylierter DNA aus CRC-Zelllinien. Detektierter und eingesetzter Anteil von methylierter *MLH1*-Promotor-DNA stimmen sehr genau überein. Die Zahlen im Diagramm entsprechen den Mittelwerten der detektierten Anteile methylierter DNA.

4.3.2.1.3 Restriktionseffektivität und Spezifität der methylierungssensitiven Restriktionsendonuklease *Hin6I*

Um abzuschätzen, wie viel Zeit die eingesetzte Menge (2 U/ μ l) *Hin6I* benötigt, um unmethylierte DNA vollständig zu verdauen, wurden 20 μ l-Ansätze mit je 1300 ng Blut-DNA und 40 U *Hin6I* nach verschiedenen Zeiten (30 min, 1 h, 2 h, 4,5 h, 7,75 h und 30 h) inaktiviert. Der Anteil unverdauter DNA wurde anschließend mittels (proximaler) *MLH1*-QESD bestimmt. Bereits nach 30 min war der Anteil unverdauter DNA bei 0,16 %, nach 1 h lagen noch 0,10 % vor, nach zwei Stunden 0,00 %. Der Versuch wurde mit DNA aus Paraffinmaterial von drei verschiedenen Kolonmucosae wiederholt. Die Ansätze (40 U Enzym pro 20 μ l) enthielten 125 ng, 250 ng und 535 ng Paraffin-DNA und wurden nach 1 h inaktiviert. Die Quantifizierung der unverdauten DNA ergab bei den Proben mit 125 ng und 250 ng Paraffin-DNA jeweils 0 %, bei der Probe mit 535 ng Paraffin-DNA 1 % (0,96 %) (Abb. 4.3.5). Die 40 U Enzym, die je Verdau eingesetzt wurden, sollen ausschließen, dass unverdaute unmethylierte DNA zu falsch positiven Ergebnissen führt.

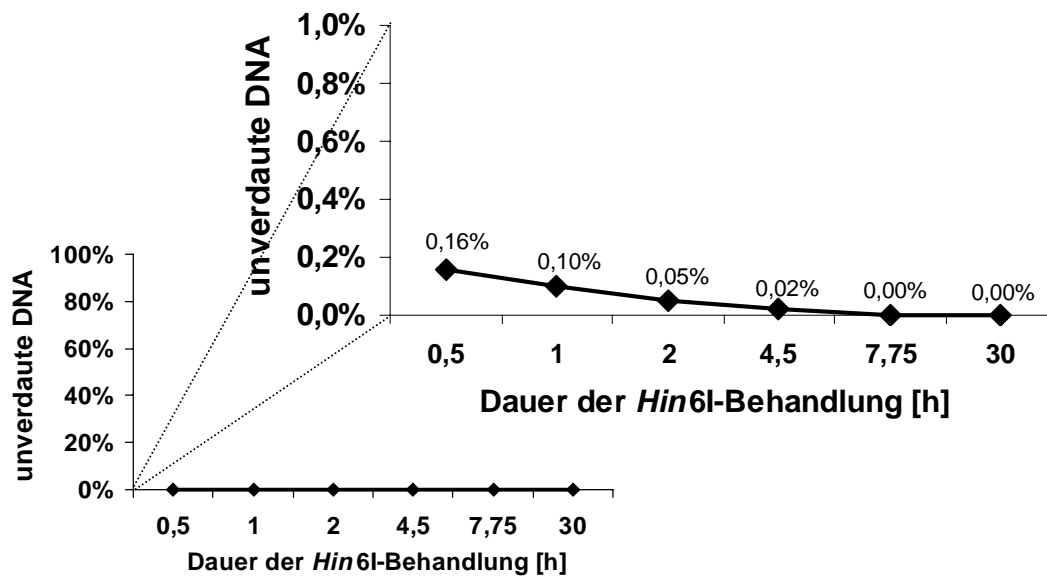


Abb. 4.3.5: Restriktionseffektivität von *Hin6I* an unmethylierter DNA. 1,3 µg Blut-DNA wurden mit 40 U *Hin6I* behandelt und nach verschiedenen Zeiten inaktiviert. Das Diagramm zeigt die Anteile von unverdauter unmethylierter DNA nach den verschiedenen Inkubationszeiten. Die Y-Achse ist in Prozent skaliert!

Um festzustellen, ob diese große Konzentration von *Hin6I* nicht zu unspezifischer Restriktion methylierter DNA und damit zu einer Unterschätzung der DNA-Methylierung führt, wurden 20 µl-Ansätze mit 500 µg SW48 DNA für verschiedene Zeiten (1 h, 4 h, 8 h, 20 h und 30 h) mit 40 U *Hin6I* behandelt. Die QESD zeigte dabei auch nach 30 h Inkubation keine Restriktion der SW48 DNA, wodurch eine intrinsische Restriktion methylierter DNA durch *Hin6I* ausgeschlossen werden kann.

4.3.2.2 Evaluierung der *MLH1*-QESD an einer Referenzgruppe mit verifizierten HNPCC-Tumoren und sporadischen CRC

Zur Evaluierung der *MLH1*-QESD wurde jeweils der Methylierungsstatus des distalen und des proximalen *MLH1*-Promotors in denselben drei Referenz-Tumorgruppen quantifiziert, die auch zur Evaluierung der *MLH1*-QAMMOD (siehe 4.3.1.2) dienen:

- HNPCC (Amsterdam I-Kriterien erfüllt und / oder pathogene *MLH1*-Keimbahnmutation vorhanden, MSI, *MLH1* IHC negativ; n=25¹)
- sporadische MSI CRC (*MLH1* IHC negative, Alter bei Diagnose ≥ 75 Jahre, keine *MLH1*-Keimbahnmutation, keine erfüllten Amsterdam-Kriterien, BRAF V600E Mutation; n=14)
- sporadische MSS CRC (*MLH1* IHC positiv, MSS; n=16)

¹ Da die QESD nach der QAMMOD etabliert wurde, waren einige Proben nicht mehr verfügbar.

Bei keinem der 16 MSS CRC wurde eine nennenswerte **proximale** *MLHI*-Methylierung festgestellt: Median 0,00 %, Minimum 0 %, Maximum 3 %, Standardabweichung 0,89 %. Bei allen 14 sporadischen MSI CRC wurde Methylierung des proximalen *MLHI*-Promotors festgestellt: Median 32,50 %, Minimum 21 %, Maximum 55 %, Standardabweichung 9,18 %. In den 25 Tumoren der HNPCC-Referenzgruppe zeigte der proximale *MLHI*-Promotor negative bis schwache Methylierung: Median 0,00 %, Minimum 0 %, Maximum 13 %, Standardabweichung 3,21 %. In der HNPCC-Gruppe zeigten 8 % der Tumore (2/24) Methylierungswerte (proximal) über 2 %. Keiner der sporadischen MSI CRC der Referenz-Tumorgruppe zeigte proximale *MLHI*-Methylierungswerte unter 21 % und keiner der HNPCC-CRC Werte über 13 % (Abb. 4.3.6 auf Seite 110 oben rechts).

Bei 14 der 16 MSS CRC wurden keine nennenswerte **distale** *MLHI*-Methylierung festgestellt, aber zwei MSS CRC zeigten distale Methylierungswerte von 22 % und 37 %: Median 1,00 %, Minimum 0 %, Maximum 37 %, Standardabweichung 10,11 %. Bei allen 13 analysierbaren sporadischen MSI CRC war der distale *MLHI*-Promotor methyliert: Median 39,00 %, Minimum 18 %, Maximum 55 %, Standardabweichung 9,16 %. In 22 der 25 Tumore der HNPCC-Referenzgruppe wurde negative bis schwache distale *MLHI*-Promotormethylierung festgestellt. Anders als beim proximalen *MLHI*-Promotor stellte die QESD bei vier der HNPCC-Tumore distale Methylierung über 12 % fest (17 %, 22 %, 60 % und 75 %). Der Median der distalen *MLHI*-Methylierung war 0,00 %, das Minimum 0 %, der Maximalwert 75 %, die Standardabweichung betrug 18,44 % (Abb. 4.3.5 auf Seite 110 Mitte rechts).

Durch die teilweise hohen distalen Methylierungswerte der *MLHI*-QESD in der HNPCC- und MSS-Tumorgruppe wurden die Mittelwerte entsprechend beeinflusst. MSS CRC (n=16): Median 1,00 %, Minimum 0 %, Maximum 19 %, Standardabweichung 5,29 %. Sporadische MSI CRC (n_{analysierbar}=13): Median 38,00 %, Minimum 20 %, Maximum 49 %, Standardabweichung 7,75 %. HNPCC-Tumore (n_{analysierbar}=24): Median 1,50 %, Minimum 0 %, Maximum 44 %, Standardabweichung 10,89 % (Abb.4.3.6 auf Seite 110 unten rechts).

Nur bei der **proximalen** *MLHI*-QESD waren die Methylierungswerte der HNPCC-Tumore und der sporadischen MSI CRC völlig separiert, da keiner der sporadischen MSI CRC proximale *MLHI*-Methylierungswerte unter 21 % und keiner der HNPCC CRC Werte über 13 % zeigte. Anhand der Daten aus der HNPCC-Referenzgruppe wurde ein Grenzwert für positive Wertung der Methylierung von 18 % definiert (Mittelwert (MW) + 5-facher Standardabweichung: $1,04 + 5 \times 3,21 = 17,45$; aufgerundet 18 %).

Sowohl die *MLHI*-QESD des proximalen als auch des distalen Promotors sowie der MW beider Analysen zeigten in nicht-parametrischen Signifikanztests signifikante Unterschiede zwischen den drei Gruppen ($P_{\text{Kruskal-Wallis}} < 0,001$ bei allen Analysen). Trotz der Ausreißer bei der distalen *MLHI*-QESD, zeigten die proximale und distale *MLHI*-QESD sowie auch der Mittelwert beider, signifikante Unterschiede zwischen den HNPCC und sporadischen MSI CRC der Referenzgruppe ($P_{\text{Mann-Whitney}}$ jeweils $< 0,001$), obwohl die distale Methylierungsanalyse oder deren Einbeziehung keine sichere Unterscheidung der beiden Gruppen gewährleistete. Die Ergebnisse der *MLHI*-Methylierungsanalyse mittels QESD sind in Tab. 4.3.2, in Tab. 4.3.3 auf Seite 111 und in Abb. 4.3.6 auf Seite 110 zusammengefasst.

	Methylierung [%]								
	sporadische MSS-CRC (n=16)			sporadische MSI CRC (n=14)			HNPCC (n=25)		
	prox	dist	MW (dist/prox)	prox	dist	MW (dist/prox)	prox	dist	MW (dist/prox)
n gültig	16	16	16	14	13	13	25	25	24
Min	0	0	0	21	18	20	0	0	0
Max	3	37	19	55	55	49	12	75	44
MW	0,38	4,81	2,88	34,15	37,92	36,23	1,04	9,83	5,63
Median	0,00	1,00	1,00	34,00	39,00	38,00	0,00	2,50	1,50
Std.abw.	0,89	10,11	5,29	9,18	9,16	7,75	3,11	18,73	10,89

Tab. 4.3.2: Ergebnisse der *MLHI*-QESD der Tumore der Referenzgruppe. Min: Minimalwert, Max: Maximalwert, MW: Mittelwert, Std.abw.: Standardabweichung.

4.3.3 Vergleich der *MLHI*-QAMMOD mit der *MLHI*-QESD.

In der Referenzgruppe führten Methylierungsanalysen mittels *MLHI*-QAMMOD (MW distal/proximal) und *MLHI*-QESD (nur proximal) zu 100 % identischen Ergebnissen: die Einteilung in methylierungspositive und methylierungsnegative Tumore war unabhängig von der angewandten Methylierungsanalyse. Die medianen Beträge der Differenzen zwischen den jeweiligen *MLHI*-Methylierungswerten der QAMMOD und der QESD lagen bei 1,00 % (proximal), 3,47 % (distal) und 2,66 % (Mittelwert proximal/distal).

Die QESD detektierte in vier Tumoren der Referenzgruppe (M1, M46, M93 und M106) distale *MLHI*-Methylierung > 20 %, die mittels QAMMOD nicht festgestellt wurde. Umgekehrt zeigte die distale *MLHI*-QAMMOD beim Tumor M78 einen Wert von 48 %, während mit der entsprechenden QESD ein Wert < 20 % (17 %) detektiert wurde (Tab. 4.3.3 auf Seite 111). Die Ergebnisse der *MLHI*-QAMMOD und der *MLHI*-QESD in der Tumor-Referenzgruppe sind in Abb. 4.3.6 und in Tabelle 4.3.3 gegenübergestellt.

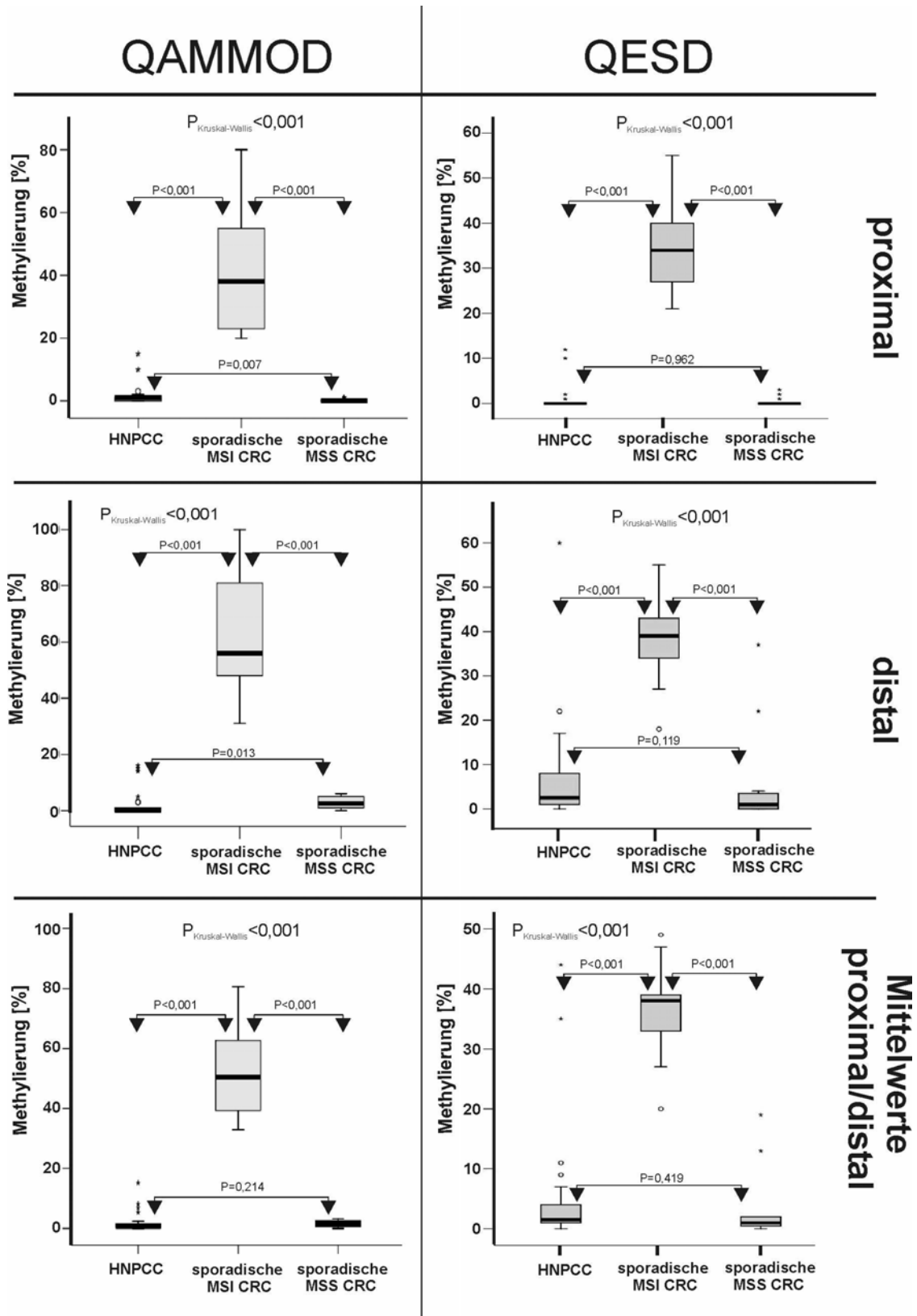


Abb. 4.3.6: Vergleich der *MLH1*-QAMMOD und der *MLH1*-QESD in Tumoren der Referenzgruppe. Mit beiden Methoden wurde die Methylierung des proximalen und distalen *MLH1*-Promotors analysiert. Der graue Bereich der Boxplots zeigt den Interquartilbereich (25. - 75. Perzentil). Die Schwarze Linie in den Boxen entspricht dem Median, die Enden der Antennen bezeichnen das 10. und 90. Perzentil. Extremwerte sind mit "*" und Ausreißer mit "o" indiziert.

Pat. ID	R1: HNPCC, R2: spor. MSI-H CRC, R3: MSS CRC	Alter bei Diagnose	1: MSI-H, 2: MSS	MLH1-IHC 0: negativ 1: positiv	Amst. 1 oder 2; -: neg.	Beth. 1: erfüllt -: neg.	Pathogene MLH1- Mutation 0: negativ 1: positiv	BRAF V600E- Mutation 1: positiv 0: negativ	MLH1-Methylierung in %					
									QAMMOD			QESD		
									Proximal	Distal	MW proximal & distal	Proximal	Distal	MW proximal & distal
M1	R1	25	1	0	-	1	1	0	0	16	8	0	22	11
M3	R1	34	1	0	1	1	-	0	1	0	1	0	0	0
M8	R1	51	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	2	1
M14	R1	51	1	0	1	1	1	0	0	5	2	0	1	1
M18	R1	42	1	0	1	1	1	n.a.	1	0	1	n.a.	0	n.a.
M19	R1	41	1	0	1	1	1	n.a.	0	0	0	n.a.	n.a.	n.a.
M22	R1	33	1	0	-	1	1	n.a.	2	0	1	n.a.	n.a.	n.a.
M23	R1	37	1	0	1	1	1	n.a.	1	0	1	0	n.a.	n.a.
M26	R1	37	1	0	1	1	1	n.a.	0	0	0	0	0	0
M30	R1	36	1	0	2	1	1	0	1	0	1	2	12	7
M33	R1	30	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	2	1
M34	R1	37	1	0	2	1	1	n.a.	1	0	1	0	6	3
M35	R1	37	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	4	2
M38	R1	34	1	0	-	1	1	0	1	0	1	0	10	5
M39	R1	30	1	0	-	1	1	0	1	0	1	0	5	3
M41	R1	31	1	0	1	1	1	n.a.	1	0	1	0	0	0
M42	R1	46	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1
M43	R1	65	1	0	1	1	1	0	2	0	1	0	3	2
M44	R1	42	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	2	1
M46	R1	62	1	0	-	1	1	0	10	1	5	10	60	35
M47	R1	24	1	0	-	1	1	0	0	1	0	0	3	2
M48	R1	35	1	0	1	1	1	0	3	1	2	0	1	1
M49	R1	27	1	0	2	1	1	0	1	1	1	0	2	1
M50	R1	37	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	2	1
M53	R1	49	1	0	-	1	1	0	0	3	1	0	1	1
M55	R1	28	1	0	1	1	1	0	0	3	2	1	5	3
M59	R1	33	1	0	-	1	1	0	0	14	7	0	17	9
M61	R1	63	1	0	1	1	1	0	15	15	15	12	75	44
M70	R2	93	1	0	-	0	-	1	41	100	71	24	34	29
M72	R2	89	1	0	-	0	-	1	20	100	60	34	43	39
M74	R2	79	1	0	-	0	-	1	55	100	78	55	39	47
M76	R2	83	1	0	-	0	-	1	80	81	81	26	27	27
M77	R2	82	1	0	-	0	-	1	48	77	63	40	38	39
M78	R2	79	1	0	-	1	-	1	23	74	48	21	18	20
M80	R2	90	1	0	-	1	-	1	48	57	53	31	35	33
M81	R2	75	1	0	-	0	-	1	24	55	39	35	40	38
M84	R2	75	1	0	-	0	-	1	22	52	37	41	33	37
M85	R2	75	1	0	-	0	-	1	32	48	40	27	45	36
M86	R2	78	1	0	-	0	-	1	62	48	55	23	n.a.	n.a.
M88	R2	83	1	0	-	0	-	1	22	44	33	43	55	49
M90	R2	82	1	0	-	0	-	1	35	37	36	31	46	39
M91	R2	75	1	0	-	1	-	1	57	31	44	36	40	38
M92	R3	71	0	1	-	0	-	0	0	0	0	0	3	2
M93	R3	78	0	1	-	0	-	0	0	0	0	3	22	13
M94	R3	69	0	1	-	0	-	0	0	0	0	0	4	2
M95	R3	81	0	1	-	1	-	0	0	1	1	0	2	1
M96	R3	82	0	1	-	0	-	0	0	1	1	1	0	1
M97	R3	75	0	1	-	1	-	0	1	2	2	0	0	0
M98	R3	77	0	1	-	1	-	0	0	2	1	0	1	1
M99	R3	78	0	1	-	0	-	0	1	3	2	0	0	0
M100	R3	76	0	1	-	0	-	n.a.	0	3	2	0	0	0
M101	R3	77	0	1	-	0	-	0	0	3	2	0	1	1
M102	R3	78	0	1	-	0	-	0	0	5	3	0	1	1
M103	R3	68	0	1	-	0	-	0	0	5	3	0	4	2
M104	R3	76	0	1	-	0	-	0	0	5	3	0	0	0
M105	R3	61	0	1	-	0	-	0	0	6	3	2	1	2
M106	R3	70	0	1	-	0	-	0	0	6	3	0	37	19
M107	R3	89	0	1	-	0	-	1	1	2	2	0	1	1

Tab. 4.3.3: Klinische Parameter und MLH1-Methylierungsdaten der CRC-Referenzgruppen-Patienten. Pat. ID: Patienten Identifizierungsnummer, R1: HNPCC-CRC Patienten der Referenzgruppe, R2: sporadische MSI CRC Patienten, R3: MSS CRC Patienten, MLH1-IHC: MLH1-Expressionsbestimmung mittels Immunhistochemie, Amst.: erfüllte Amsterdam-Kriterien, Beth.: Bethesda Kriterien, pos.: positiv, neg.: negativ, n.a.: nicht analysiert, QAMMOD: Quantitative Methylierungsanalyse modifizierter DNA, QESD: Quantifizierung Endonuklease-resistenter DNA.

4.3.4 QESD-Methylierungsanalysen von P16 und MGMT

Mit Hilfe der QESD wurde die Promotormethylierung von *P16* und *MGMT* in 42 MSI CRC und in 16 MSS CRC untersucht. Dabei zeigten 48 % (20/42) der MSI CRC eine *P16*-Methylierung unter 10 %, 10% (4/42) zeigten Werte von 10 bis 20 % und bei 43% (18/42) der CRC lag die *P16*-Methylierung über 20 % (Tab. 4.3.4a).

Die *MGMT*-Methylierung war bei 40 MSI CRC analysierbar und lag in 63 % (25/40) der Fälle unter 10 %; 15 % (6/40) der MSI CRC zeigten Methylierungswerte von 10 bis 20 % und 23 % (9/40) Methylierungswerte über 20 % (Tab. 4.3.4a).

Bei 40 % (16/40) der MSI CRC lagen die Methylierungswerte von *P16* und von *MGMT* gemeinsam unter 10 %. In der MSI-Gruppe waren die Methylierungswerte beider Gene bei 30 % (12/40) der CRC größer 10 % und bei 15 % der (6/40) CRC größer 20 % (Tab. 4.3.4b).

In der Gruppe der MSS CRC lagen die Werte der *P16*-Methylierung bei 63 % (10/16) der CRC unter 10 %, bei 6 % (1/16) zwischen 10 und 20 % und bei 31 % (5/16) über 20 %. Die *MGMT*-Methylierungswerte bewegten sich bei 56 % (9/16) der MSS CRC unter 10 %, bei 13 % (2/16) zwischen 10 und 20 % und bei 31 % der MSS CRC (5/16) lagen die Werte über 20% (Tab. 4.3.4a). Dabei zeigten 44 % (7/16) der MSS CRC Methylierungswerte unter 10 % bei beiden Genen, während bei 25 % (4/16) der MSS CRC die Werte beider Gene über 20 % lagen (Tab. 4.3.4b).

Die Methylierungswerte beider Gene zeigten zwischen MSI und MSS CRC keine signifikanten Unterschiede.

Bei den MSI CRC korrelierte die Methylierung von *P16* und *MGMT* signifikant mit positiver (proximaler) *MLH1*-Promotormethylierung ≥ 18 % (Abb. 4.3.7; Tab. 4.3.5).

a	Anteil der CRC				b	Anteil der CRC	
	MSI		MSS			MSI	MSS
Meth	<i>P16</i>	<i>MGMT</i>	<i>P16</i>	<i>MGMT</i>	Meth	<i>P16</i> und <i>MGMT</i>	<i>P16</i> und <i>MGMT</i>
< 10%	48%	63%	63%	56%	≤ 10%	40%	44%
10 - 20%	10%	15%	6%	13%	> 10%	30%	25%
> 20%	43%	23%	31%	31%	> 20%	15%	25%
n gesamt	42	40	16	16	n gesamt	40	16

Tab. 4.3.4: Promotormethylierung von *P16* und *MGMT* in MSI und MSS CRC. Meth: Grad der Methylierung.

	Anteil der MSI CRC			
	P16		MGMT	
MLH1 Meth	Meth < 20%	Meth ≥ 20%	Meth < 20%	Meth ≥ 20%
< 18%	63%	11%	55%	0%
≥ 18%	38%	89%	45%	100%
n gesamt	24	18	29	11

Tab. 4.3.5: Promotormethylierung von *P16* und *MGMT* in bei MSI CRC mit negativer (< 18 %) und positiver (≥ 18 %) *MLH1*-Methylierung. Meth: Grad der Methylierung.

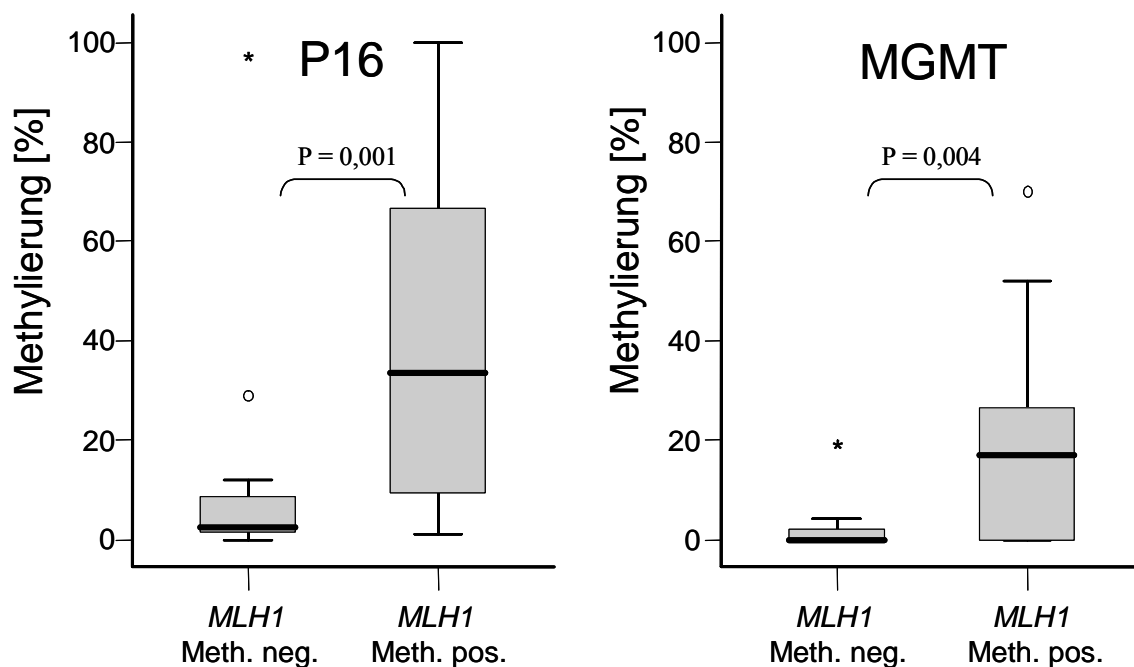


Abb. 4.3.7: Promotormethylierung von *P16* und *MGMT* bei MSI CRC mit negativer und positiver *MLH1*-Promotormethylierung (proximal). Der graue Bereich der Boxplots zeigt den Interquartilbereich (25. - 75. Perzentil). Die Schwarze Linie in den Boxen entspricht dem Median, die Enden der Antennen bezeichnen das 10. und 90. Perzentil. Extremwerte sind mit "*" und Ausreißer mit "o" indiziert. Eine positive *MLH1*-Promotormethylierung (Methylierung proximal > 18 %) korrelierte signifikant mit höheren Methylierungswerten von *P16* und *MGMT*. *MLH1* neg: *MLH1*-methylierungsnegativ (< 18 %), *MLH1* pos: *MLH1*-methylierungspositiv (≥ 18 %).

5 Diskussion

5.1 Maspin

Das Thema dieser Dissertation war die Untersuchung dysregulierter Gene im kolorektalen Karzinom. Bei den Arbeiten wurde festgestellt, dass die Expression von Maspin zwischen Normal- und Tumorgewebe und auch zwischen verschiedenen Tumortypen starke Unterschiede zeigte. Maspin ist ein einzigartiges Protein der Familie der Serinproteaseinhibitoren mit vielfältigen Eigenschaften und Wirkungen. In den letzten Jahren stand Maspin im Fokus intensiver Forschung, aber in CRC waren zu Beginn dieser Dissertation die Expression, Funktion und Bedeutung von Maspin praktisch unerforscht. Diese Dissertation stellt die erste detaillierte Untersuchung von Maspin im normalen Kolon und in kolorektalen Karzinomen dar. In dieser Arbeit wurde die Bedeutung von Maspin für verschiedenste tumorrelevante Aspekte wie Invasion, Proliferation, Prognose, Sensitivität gegen Chemotherapeutika und die Auswirkung auf die Expression anderer tumorassoziierter Gene untersucht. Die Untersuchungen erfolgten mit verschiedenen, unabhängigen Methoden an gut charakterisierten CRC, *in vitro* durch Experimente an verschiedenen CRC-Zelllinien sowie an RNA, DNA und Protein.

5.1.1 Expression von Maspin in CRC und in CRC-Zelllinien

Das Vorliegen von Affymetrix-Expressionsdaten aus über 40 CRC und 34 normalen Kolonmucosae ermöglichte die Untersuchung und Identifizierung von dysregulierten Genen. Die Validität der *Array*-Daten wurde exemplarisch mittels *real-time* PCR an den in Normalgewebe und Tumoren differentiell exprimierten Genen *SERPINB5*, *ACE2*, *CYP2B6*, *PITX2* und *CDH3* überprüft und bestätigt (Abb. 4.1.1). Bei den Auswertungen der *Array*-Daten trat das Gen Maspin (*SERPINB5*) besonders auffällig in Erscheinung, da es generell in Tumoren überexprimiert wurde - insbesondere in MSI Tumoren, während normale Kolonmucosa Maspin nicht oder nur sehr schwach exprimierte. Die CRC-spezifische Überexpression von Maspin wurde auf transkriptioneller Ebene durch die Ergebnisse der *Array*-Analysen und durch *real-time* PCR gesichert (Tab. 4.2.1; Abb. 4.2.1; Abb. 4.2.2) und auf Proteinebene von den Ergebnissen der *Western-Blot*-Analysen (Abb. 4.2.3) und IHC bestätigt (Abb. 4.2.7). Sowohl auf transkriptioneller als auch auf Proteinebene wurden in der Gruppe der MSI Tumore die stärksten Expressionswerte detektiert. Die Korrelation von MSI und starker Maspinexpression setzt sich auch in CRC-Zelllinien fort: Die Maspinexpression der MSI Zelllinien SW48, LoVo und HCT116 übertraf die der MSS Zelllinien HT29, SW480

und CaCo-2 im Mittel um den Faktor 28 (Abb. 4.2.4). Die Assoziation von besonders starker Maspinexpression und MSI lässt einen Zusammenhang zwischen dem Mutator-*Pathway* und der Maspinexpression vermuten.

Die Maspin-Immunocytochemie der CRC-Zelllinien SW48, LoVo und HCT116 zeigte eine unerwartete Heterogenität der Färbintensitäten in den jeweiligen klonalen Zellpopulationen (Abb. 4.2.5). Das Vorkommen von Zellen mit sehr starker Maspinfärbung, neben sehr schwach bis negativ gefärbten Zellen ließ vermuten, dass die Maspinexpression im Verlauf des Zellzyklusses differentiell exprimiert werden könnte. Die bei den Experimenten mit synchronisierten CRC-Zelllinien wurde eine Erhöhung der Maspinexpression im Verlauf der S-Phase festgestellt. Ob diese Expressionserhöhung um den Faktor ~ 2 (Tab. 4.2.14 und Tab. 4.2.15) für die stark unterschiedlichen Färbintensitäten die Verantwortung trägt ist ungewiss. Die Maspinexpression *einzelner* Zellen von Tumorzelllinien wurde in der Literatur bisher nicht beschrieben. Die Gründe und die Regulationsmechanismen für diese heterogene Expression sind unbekannt.

Die heterogene interzelluläre Verteilung von Maspin wurde auch in den CRC festgestellt, die zudem auch eine sehr unterschiedliche intrazelluläre Verteilung zeigten. Die stärksten Maspinfärbungen waren in den Tumorzellen der Invasionsfront, in disseminierten, infiltrierenden Tumorzellen und in stark undifferenzierten Tumoren zu beobachten, während gut differenzierte Tumorbereiche deutlich schwächer gefärbt waren. Normale Mucosa und Stroma waren negativ oder selten sehr schwach gefärbt (Abb. 4.2.7). Somit markierte die Maspinfärbung spezifisch Tumorzellen und betonte dabei besonders aggressive Tumorzellpopulationen.

Nicht nur die Verteilung zwischen den Tumorzellen, sondern auch die intrazelluläre Lokalisation von Maspin, korrelierte mit der Histologie des Tumors: In allen positiv gefärbten Tumorzellen war Maspin im Zytoplasma vorhanden, aber in Tumorzellen der Invasionsfront, in disseminierten Tumorzellen und teilweise in dedifferenzierten Tumorbereichen zeigte sich zusätzlich eine sehr starke Färbung des Zellkerns (Abb. 4.2.7). Diese Kernfärbung korrelierte statistisch signifikant mit MSI und dedifferenzierten Tumoren, während die zytoplasmatische Färbung mit keinen klinisch-pathologischen Parametern signifikant korrelierte (Tab. 4.2.2). Umekita *et al.* berichtete ebenfalls von tumorspezifischer Maspin-Überexpression in CRC und zeigte deren Korrelation mit größerer Invasionstiefe und einer größeren Zahl infiltrierender Tumorzellen. Die verstärkte Expression an der Invasionsfront von CRC wurde ebenfalls beschrieben (Umekita *et al.*, 2006). Zheng *et al.* berichtete von der Zunahme der Maspinexpression innerhalb der Adenomen-Karzinom-Sequenz und einer negativen

Korrelation mit Lebermetastasen, ohne dabei aber auf die subzelluläre Lokalisation einzugehen (Zheng *et al.*, 2007). Im Kontrast dazu berichtete Boltze von Maspin-positiver normaler Kolonmucosa und einem Rückgang der Maspinexpression in CRC. Bei den Untersuchungen von Boltze wurden Gewebe-*MicroArrays* mit Antikörpern von anderer Herkunft und mit anderen Spezifitäten verwendet. Auf Analysen der transkriptionellen Expression wurde gänzlich verzichtet. Die in der Veröffentlichung von Boltze abgebildeten IHCs, die angeblich eine starke Maspinfärbung zeigen sollen, lassen kaum eine Färbung erkennen und wären in dieser Dissertation eindeutig negativ gewertet worden (Boltze, 2005). Eine weitere IHC-basierte Veröffentlichung von Song *et al.* beschreibt den Rückgang der Maspinexpression von Adenomen zu Karzinomen, wobei die Identität und Herkunft des verwendeten Antikörpers nicht erwähnt und die Maspinfärbung nicht gezeigt wurde (Song *et al.*, 2002).

Die tumorspezifische Überexpression von Maspin wurde nicht nur in CRC, sondern auch in Karzinomen von Ovar, Magen, Pankreas, Schilddrüse, Endometrium, Gallenblase, Haut, Harnblase und Brust beschrieben (Reis-Filho *et al.*, 2002; Umekita *et al.*, 2002; Akiyama *et al.*, 2003; Fitzgerald *et al.*, 2003; Ito *et al.*, 2004b; Sugimoto *et al.*, 2004; Abd El-Wahed, 2005; Maesawa *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2007). Dabei wurde in Tumoren von Magen, Ovar, Schilddrüse, Brust und Harnblase eine hohe Maspinexpression mit besonders aggressivem Tumorwachstum in Verbindung gebracht (Umekita and Yoshida, 2003; Ito *et al.*, 2004b; Sugimoto *et al.*, 2004; Abd El-Wahed, 2005; Yu *et al.*, 2007). Die tumorspezifische Überexpression und die Korrelation der Maspinfärbung mit aggressivem Tumorwachstum deuten stark auf onkogene Eigenschaften von Maspin hin.

In dieser Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass eine nukleäre Maspinfärbung einen vielversprechenden Marker für die Prognose und für die Therapiestrategie von CRC Patienten darstellt. In einer retrospektiven Studie von 162 Stadium III Kolonkarzinom-Patienten wurde die nukleäre Maspinfärbung als ein Marker für eine schlechte Prognose identifiziert (Tab. 4.2.3; Abb. 4.2.8). Dies erscheint einleuchtend, da die Maspin-Kernfärbung besonders heterogene, invasive und aggressive Tumore mit hohem Metastasierungspotenzial markiert. Die intrazelluläre Lokalisation von Maspin hatte darüber hinaus einen großen Einfluss auf das Ansprechen auf eine adjuvante, 5-Fluoruracil-basierte Chemotherapie: **Nur** Kolonkarzinom-Patienten mit **positiver** nukleärer Maspinfärbung zeigten eine stark verbesserte Prognose, wenn diese mit einer adjuvanten 5-Fluoruracil-basierten Chemotherapie behandelt worden waren. Patienten mit negativer Maspin-Kernfärbung hatten mit und ohne 5-Fluoruracil (5-FU)

Chemotherapie eine sehr gute Prognose (Dietmaier *et al.*, 2006). Surowiak berichtete ebenfalls von einem sehr guten Ansprechen von Ovarkarzinom Patienten mit nukleärer Maspinfärbung auf eine Chemotherapie mit Cisplatin (Surowiak *et al.*, 2006).

Aus Mangel an validen prospektiven Markern profitieren derzeit profitieren leider nur circa 15 % der CRC Patienten von einer Chemotherapie (mündliche Mitteilung von W. Dietmaier). Um die Maspin-IHC in Zukunft als prognostischen Marker in der Diagnostik einsetzen zu können, sollten weitere randomisierte, multizentrische, prospektive Studien durchgeführt werden. In der Studie von Zheng *et al.* konnte keine signifikante Korrelation zwischen der Maspinexpression und der Prognose von CRC Patienten gezeigt werden (Zheng *et al.*, 2007). Dies lag möglicherweise daran, dass bei der Analyse der IHC nicht zwischen zytoplasmatischer und nukleärer Färbung unterschieden wurde. Die Gründe für die Modulation der 5-FU-Sensitivität und die dazugehörigen *in vitro* Versuche werden in 5.1.3.1 diskutiert.

Die Ursachen für die nukleäre Lokalisation von Maspin in CRC sind nach derzeitigem Wissensstand unklar. Maspin weist kein Kernlokalisierungssignal auf. Bei den Mutationsanalysen von Tumoren mit starker Maspin-Kernfärbung konnte keine Mutation identifiziert werden, die zur Entstehung eines Kernlokalisierungssignales geführt hätte (4.2.14). Ob sich das nukleäre Maspin innerhalb des Kerns oder außen an der Kernmembran befindet, kann durch weitere Untersuchungen mittels konfokaler Mikroskopie oder Elektronenmikroskopie geklärt werden. Yin *et al.* beschrieb die Interaktion von Maspin mit dem nukleären Transkriptionsfaktor IID, was auf eine Lokalisation und Funktion von Maspin innerhalb des Zellkerns hinweist (Yin *et al.*, 2005).

5.1.2 In vitro-Versuche: Maspin-Überexpression und Maspin-Suppression

Der Einfluss der Maspinexpression auf verschiedene tumorrelevante Aspekte konnte zum einen durch stabile Überexpression in der schwach Maspin-exprimierenden Zelllinie SW480 und zum anderen durch die Suppression der stark exprimierenden Zelllinie SW48 untersucht werden. Die konstante und effektive Suppression mit Hilfe des Antisense-Vektorkonstruktes (Abb. 4.2.18) beruhte einerseits darauf, dass die Maspin-mRNA mit der vom Vektorkonstrukt konstitutiv transkribierten Antisense-RNA hybridisierte und nicht translatiert werden konnte. Andererseits aktivierte diese doppelsträngige RNA den zellulären RNA-Interferenz-Mechanismus, der ebenfalls den Abbau neuer Maspin-Transkripte forcierte. Die starken Effektivitätsschwankungen (Abb. 4.2.24) bei der transienten, siRNA-vermittelten Suppression

könnten durch unterschiedliche Transfektionseffizienzen und dem Abbau der siRNA durch sekretierte RNasen begründet werden.

Der Modulation der Maspinexpression folgten morphologische Veränderungen der Zellen. Dabei bewirkte die Überexpression von Maspin die Bildung von Pseudopodien (Abb. 4.2.14; Abb. 4.2.15), die umgekehrt durch die Maspin-Suppression zurückgebildet wurden (Abb. 4.2.20). Pseudopodien sind Ausstülpungen der Zellen und dienen der Fortbewegung. Dabei strecken die Zellen die Pseudopodien in Bewegungsrichtung aus, verankern diese und bewegen ihre Zellmasse durch Umschichtungen und Kontraktionen zum Verankerungspunkt. Bei Tumorzellen ermöglichen die Pseudopodien die aktive Migration und sind wichtige Invasivitätsfaktoren (Le *et al.*, 1998). Diese Maspin-assoziierte Pseudopodienbildung könnte eine Ursache für die erhöhte Motilität und Invasivität der stabil transfizierten SW480 Klone und die entsprechend niedrigere Motilität und Invasivität der stabil supprimierten SW48 Klone sein, die in 5.1.2.3 weiter diskutiert wird.

Die Überexpression hob bei den SW480 Klonen die Kontakthemmung und damit das Wachstum als *Monolayer* auf (Abb. 4.2.14; Abb. 4.2.15). Die Kontakthemmung und das damit verbundene Wachstum als *Monolayer* ist ein wichtiges Merkmal epithelialer Zellen. Der Verlust dieser Eigenschaften stellt einen wichtigen Schritt bei der malignen Transformation dar, weil dadurch die Formation solider Tumore ermöglicht wird. Zudem bewirkte Maspin sowohl bei intrazellulärer Überexpression als auch als rekombinantes Maspin im Kulturmedium eine starke Erhöhung der interzellulären Adhäsionskräfte, was zur Bildung schwer dissoziierbarer Zellaggregate führte. Dies beweist die Aktivität von Maspin direkt auf der Zelloberfläche. Die Sekretion von Maspin wurde bereits beschrieben (Katz and Taichman, 1999; Khalkhali-Ellis and Hendrix, 2007), weshalb vermutlich das intrazellulär überexprimierte Maspin - zumindest teilweise - an die Zelloberfläche transportiert wurde (siehe auch Abb. 4.2.16 links unten), wo es die verstärkten Zell-Zell-Kontakte direkt oder indirekt bewirkte. Im Gegenzug wurden als Folge der Suppression die interzellulären Kontakte der SW48 Klone deutlich verringert, und die Zellen ließen sich durch Trypsin leichter von der Kulturschale ablösen und dissoziieren als die Kontrollen. Maspin bindet an verschiedenen Komponenten der extrazellulären Matrix wie Fibronectin, Laminin, Kollagen I und Kollagen IV (Ngamkitidechakul *et al.*, 2001; Abraham *et al.*, 2003; Ngamkitidechakul *et al.*, 2003; Odero-Marah *et al.*, 2003; Cella *et al.*, 2006). Da natives Maspin Dimere bildet (Al-Ayyoubi *et al.*, 2004; Law *et al.*, 2005), könnten die verstärkten Zell-Zell-Kontakte möglicherweise über die Dimerisierung von Maspinmolekülen vermittelt werden, die wiederum an Komponenten der extrazellulären Matrix verankert sind.

Die Überexpression bewirkte neben den verstärkten interzellulären Kontakten eine Verringerung der Adhäsionsgeschwindigkeit und der Adhäsionsstärke an zellkultur-behandeltem Polystyrol (Abb. 4.2.25; Abb. 4.2.28). Diese Ergebnisse zeigten erstmals die Verringerung der Adhäsion im Zusammenhang mit der Überexpression von Maspin. Die Maspin-Suppression hatte keine derartig starke Abnahme der Adhäsionsgeschwindigkeit zur Folge (Abb. 4.2.26; Abb. 4.2.27), bewirkte aber ebenfalls einen Rückgang der Adhäsionsstärke (Abb. 4.2.29; Abb. 4.2.30). Dass sowohl die Überexpression als auch die Suppression von Maspin eine Reduktion der Adhäsionsstärke zur Folge hatte, ist schwer in Konsens zu bringen, ist aber einzeln betrachtet stimmig: Die geringere Adhäsion der überexprimierenden Klone wird von der Maspinverteilung in den CRC gestützt. Dort zeigten die infiltrierten Zellen, die den Kontakt zur Basalmembran verloren hatten, besonders intensive Maspinfärbung. Hätte die Maspinexpression die Adhäsion dieser Zellen verstärkt, wären diese nicht zur Invasion in der Lage gewesen. Da Maspin an verschiedene Komponenten der extrazellulären Matrix bindet, könnte die Adhäsionsfähigkeit dieser Moleküle durch die Absättigung mit Maspin herabgesetzt werden.

Die Reduktion der Adhäsion als Folge der Maspin-Suppression steht im Einklang mit den Daten anderer Gruppen, die von erhöhter Adhäsion als Folge hoher Maspinexpression in Brust und Prostatakarzinomzelllinien berichteten (Ngamkitidechakul *et al.*, 2001; Abraham *et al.*, 2003; Odero-Marrah *et al.*, 2003; Cella *et al.*, 2006).

5.1.2.1 Proliferation

Die Maspinexpression hemmte die Proliferation der stabil transfizierten Klone. Die Suppression bewirkte eine starke Erhöhung der Proliferation (Abb. 4.2.32), die Überexpression hatte den gegenteiligen Effekt zur Folge (Abb. 4.2.31). Die Untersuchung der Maspinexpression von SW48- und HCT116-Zellen in den verschiedenen Phasen des Zellzyklusses ergab einen Expressionsanstieg im Verlauf der S-Phase (Tab. 4.2.14; Tab. 4.1.15). Andererseits korreliert eine hohe Maspinexpression mit niedrigerer Proliferation. Diese Ergebnisse lassen folgende Spekulationen zu: Möglicherweise liegt eine Funktion von Maspin darin, den Zellzyklus und damit die Proliferation negativ zu regulieren. So könnte Maspin möglicherweise in Tumoren überexprimiert werden, um der beschleunigten Proliferation der Tumorzellen entgegenzusteuern. Als ein Effekt der Maspin-Überexpression in der Brusttumor-Zelllinie MDA-MB-231 wurden die Erhöhungen der Expression der anti-proliferativ wirkenden Gene CDKN2C (P18 INK4c) und CDKN3 beschrieben (Bailey *et al.*,

2006). Die maspinabhängige Regulation dieser Gene könnte möglicherweise die Modulationen der Proliferationsgeschwindigkeit in den CRC-Zelllinien erklären. Weiterhin könnte die Maspin-Überexpression aufgrund erhöhter Proteinsyntheseleistung die Proliferation verlangsamen, während die Suppression der Maspinexpression weitere Ressourcen für das Wachstum der Zellen freigibt, was möglicherweise höhere Proliferationsraten zur Folge haben könnte. Die Verdopplung des Zellvolumens bei den supprimierten Klonen (Abb. 4.2.19) bestärkt diese Theorie.

5.1.2.2 Regulation der Maspinexpression

Die Regulation der Maspinexpression ist transkriptionell reguliert, da sowohl in den CRC (Abb. 4.2.3) als auch in den CRC-Zelllinien (Abb. 4.2.4) der Maspin-mRNA-Level den Protein-Level widerspiegelt. Stets korrelierte eine größere Menge an Maspin-mRNA mit einer starken Maspinfärbung des *Western-Blots* oder der Immunfärbung von Zellen oder Geweben.

Die grundlegende Aktivierung der Maspintranskription liegt in der Demethylierung des Maspinpromotors begründet. Bei Maspin-negativer, normaler Kolonmucosa sowie bei der Maspin-negativen CRC-Zelllinie CaCo-2, ist der Maspinpromotor hypermethyliert. Dagegen weisen alle Maspin-exprimierenden CRC und CRC-Zelllinien einen unmethylierten Maspinpromotor auf (Abb. 4.2.10; Abb. 4.2.9) (Bettstetter *et al.*, 2005). Diese tumorspezifische Aktivierung der Maspinexpression durch die Demethylierung des Promotors wurde auch in Tumoren von Pankreas, Magen, Ovar, Endometrium und Schilddrüse beschrieben (Fitzgerald *et al.*, 2003; Ohike *et al.*, 2003; Ogasawara *et al.*, 2004; Terashima *et al.*, 2005; Murai *et al.*, 2006). Wie verschiedene Arbeiten zeigten, konnte die Maspinexpression in verschiedenen Maspin-negativen Zelllinien durch die Demethylierung des Maspinpromotors mit 5-Aza-2-deoxycytidin aktiviert werden, was einen weiteren Beweis für eine epigenetische Kontrolle der Expression darstellt (Domann *et al.*, 2000; Ogasawara *et al.*, 2004; Sugimoto *et al.*, 2004; Murai *et al.*, 2006).

Die tumorspezifische Aktivierung von Maspin durch die Promotor-Demethylierung stellte einen Sonderfall dar, da Tumore generell einen Trend zur Promotorhypermethylierung von z. B. Tumorsuppressor- und DNA-Reparaturgenen zeigen (Bird and Wolffe, 1999). Die Methylierungsanalysen von *P16*, *MGMT* und *MLH1* werden in 5.2 diskutiert. Neben Maspin werden in Tumoren beispielsweise die Onkogene *c-myc* (Cheah *et al.*, 1984) und *IGF2* (Cui *et al.*, 2003) als Folge von Promotor-Demethylierung (*loss of imprinting*) aktiviert.

5.1.2.3 Migration und Invasion

Die Motilität und die Fähigkeit zur Invasion ermöglichen es den Tumorzellen, sich vom Primärtumor abzusetzen, gesundes Gewebe zu infiltrieren und andernorts Metastasen zu bilden. Nicht nur im CRC zeigen die infiltrierenden Tumorzellen der Invasionsfront und bereits disseminierte Tumorzellen besonders hohe Maspinexpression (Abb. 4.2.7), sondern auch in Tumoren von Magen, Ovar, Schilddrüse, Brust und Harnblase wurde hohe Maspinexpression mit besonders aggressivem Tumorwachstum in Verbindung gebracht (Umekita and Yoshida, 2003; Ito *et al.*, 2004b; Sugimoto *et al.*, 2004; Abd El-Wahed, 2005; Yu *et al.*, 2007). Mit Hilfe der stabil transfizierten CRC-Zelllinien konnten diese Ergebnisse erstmals *in vitro* bestätigt und untermauert werden. Die Überexpression von Maspin verursachte eine starke Erhöhung der Motilität und der Invasivität (Abb. 4.2.33; Abb. 4.2.36). In Gegensatz dazu hemmte die stabile Maspin-Suppression die Motilität und Invasivität (Abb. 4.2.34; Abb. 4.2.37). Dabei scheint Maspin unmittelbar an der Zelloberfläche zu wirken, da die Zugabe von rekombinantem Maspin zum Medium die Invasivität erhöhte, wohingegen ein anti-Maspin-Antikörper einen negativen Einfluss auf die Invasion hatte. Die Gründe für die erhöhte Motilität (Abb. 4.2.35) der siRNA-Transfektanden sind unklar, da die transiente Maspin-Suppression erwartungsgemäß eine niedrigere Invasivität zur Folge hatte (Abb. 4.2.38).

Bei den CRC zeigten die Tumorzellen der Invasionsfront zusätzlich zur Kernfärbung auch starke zytoplasmatische Maspinfärbung (Abb. 4.2.7). Vermutlich wird Maspin nicht nur in Keratinozyten (Katz and Taichman, 1999) und Brusttumor-Zelllinien (Khalkhali-Ellis and Hendrix, 2007), sondern auch in CRC teilweise sekretiert und propagiert nach der Sekretion die Invasivität der Tumorzellen über unbekannte Mechanismen an der Zelloberfläche.

Die Ergebnisse der *in vitro*-Versuche stehen im Kontrast zu Berichten anderer Gruppen, die eine Verringerung der Invasivität und Motilität durch Maspin feststellten (Zou *et al.*, 1994; Sheng *et al.*, 1996). Es ist anzumerken, dass Sheng *et al.* von einem deutlichen Rückgang des Invasivitäts-hemmenden Effektes von rMaspin ab einer Konzentration von 0,17 μM berichtete. (Bei den eigenen Versuchen wurden rMaspin-Konzentrationen von 1 und 2 μM eingesetzt.) Diese Befunde beruhen jedoch nicht auf Versuchen mit CRC-Zelllinien, sondern wurden mit Brust- und Prostatazelllinien durchgeführt.

5.1.3 Einfluss der Maspinexpression auf die Expression anderer tumorrelevanter Gene

5.1.3.1 Einfluss der Maspinexpression auf die Expression der Gene des 5-FU-Stoffwechsels

In den Experimenten mit stabil transfizierten CRC-Zelllinien bewirkte die Maspinexpression eine Verringerung der Sensitivität gegen 5-FU. Dabei hatte die Überexpression eine Verdopplung der 5-FU-Überlebensraten zur Folge (Abb. 4.2.39), während die Maspin-supprimierten Klone sensitiver auf 5-FU reagierten (Abb. 4.2.40). Dieser Effekt wird durch die Analyse der Gene, die am 5-FU-Stoffwechsel beteiligt sind, sehr gut erklärt. Der 5-FU-Stoffwechsel ist in Abb. 5.1 in vereinfachter Form dargestellt.

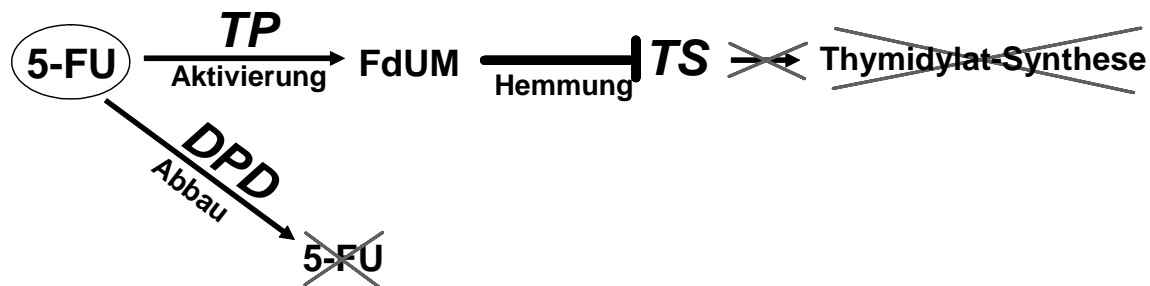


Abb. 5.1: Der 5-FU-Stoffwechsel. Die Abbildung ist im folgenden Text beschrieben.

5-FU ist selbst inaktiv und entfaltet seine zytotoxische Wirkung erst, wenn es in die Nukleotide Fluorouridin-5'-triphosphat, 5'-Fluoro-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat und 5-Fluoro-2'-desoxyuridin-5'-monophosphat (FdUM) metabolisiert wird (Pinedo and Peters, 1988). An dieser Aktivierung ist das Enzym Thymidinphosphorylase (TP) beteiligt, das identisch mit dem pro-angiogenetischen Wachstumsfaktor PD-ECGF (*Platelet-derived endothelial cell growth factor*) ist. 5'-Fluoro-2'-desoxyuridin-5'-triphosphat wird in DNA inkorporiert und entfaltet dadurch einen Teil seiner zellschädigenden Wirkung. Das Hauptziel der 5-FU-Therapie ist die Thymidylatsynthase (TS), die für die *de novo* Synthese von Thymidin verantwortlich ist und durch FdUMP gehemmt wird. Thymidin ist für die DNA-Synthese und das damit verbundene Zellwachstum essentiell. Der Abbau von 5-FU erfolgt durch das Enzym Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD) (Peters *et al.*, 1987; Pinedo and Peters, 1988) (Abb. 5.1).

Bei den SW480-Klonen bewirkte die Maspin-Überexpression Modulationen der Expressionen dieser 5-FU-Sensitivitäts-assoziierten Gene, die in einer niedrigeren 5-FU-Sensitivität

resultierten: Die TP-Expression wurde praktisch völlig blockiert, wodurch 5-FU nicht aktiviert werden konnte. Die DPD-Expression war stark erhöht, was zum schnellen Abbau von aktiviertem 5-FU führte. Zusätzlich wirkte der ausreichenden Hemmung der TS der erhöhte TS-Spiegel entgegen (Abb. 4.2.41).

Die Expressionsanalyse dieser Gene liefert auch sehr gute Erklärungen für die erhöhte 5-FU-Sensitivität der Maspin-supprimierten SW48-Klone: Die Maspin-Suppression bewirkte die vollständige Blockierung der DPD-Expression. Dadurch wurde der Abbau von aktiviertem 5-FU verhindert. Die Expression von TS zeigte einen Rückgang um durchschnittlich 75 %, was eine vollständigere Hemmung begünstigte. Der leichte Rückgang der TP-Expression konnte die ausreichende Aktivierung von 5-FU nicht verhindern (Abb. 4.2.42). Die möglichen Mechanismen der Genregulation durch Maspin werden auf Seite 126 diskutiert.

Die Maspin-assoziierte Erhöhung der TS- und DPD-Expression wurde von den *Array*-Daten der untersuchten CRC bestätigt (Abb. 4.2.43). Die Hemmung der TP in den untersuchten CRC mit hoher Maspinexpression konnte nicht beobachtet werden. Bezogen auf die Intensität der Maspin-Kernfärbung und dem Anteil der Zellen mit Kernfärbung, stiegen alle drei 5-FU-Sensitivitäts-assoziierten Gene statistisch signifikant an (Tab. 4.2.13). Dabei stiegen aber nur die DPD- und TS-Expressionen um den Faktor 3,4 bzw. 2,1 von CRC mit negativer/schwacher zu starker Maspin-Kernfärbung an, während die Expression von TP keinen starken Anstieg (Faktor 1,6) und somit keine Korrelationen mit Intensität und Verteilung der Kernfärbung zeigte. Die Tatsache, dass Stadium III Kolonkarzinom-Patienten mit positiver Maspin-Kernfärbung sehr stark von einer adjuvanten 5-FU-basierten Chemotherapie profitierten (Abb. 4.2.8), steht im Widerspruch zu der Expressionserhöhung von DPD und TS. Da die Expressionen von DPD, TS und TP keine Erklärung für die erhöhte 5-FU-Sensitivität liefern, muss die Kernlokalisierung von Maspin mit weiteren unbekanntem Mechanismen in Verbindung stehen, welche die CRC gegen 5-FU sensibilisieren. Dabei ist zu beachten, dass die Korrelation von Maspin-Kernfärbung und dem Ansprechen auf 5-FU in einem anderen Patientenkollektiv von Stadium III Kolonkarzinom-Patienten mittels IHC analysiert wurde, während die *Array*-Analysen auf transkriptioneller Ebene an CRC mit uneinheitlichen Krankheitsstadien durchgeführt wurden.

Die gute Prognose der chemotherapierten CRC Patienten liegt in der effektiven Abtötung verbliebener Tumorzellen begründet. Die Wirkung von zellschädigenden Chemotherapeutika beruht zum großen Teil auf der Bereitschaft von Tumorzellen, in die Apoptose einzutreten. Verschiedene Gruppen konnten zeigen, dass Maspin Tumorzellen für den Eintritt in die Apoptose sensibilisiert (Jiang *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2005). Die erhöhte

Sensitivität für apoptotische Stimuli, wie die DNA-Schäden und andere 5-FU-induzierte Noxen, könnten das gute Ansprechen der CRC Patienten mit nukleärer Maspinfärbung erklären. Da die hauptsächlich zytoplasmatische Maspin-Überexpression (Abb. 4.2.16) eine erniedrigte Sensitivität gegen 5-FU zur Folge hatte (Abb. 4.2.39; siehe auch 5.1.3.1), scheint die zytoplasmatische Maspin-Überexpression *in vitro* nicht mit einer gesteigerten Apoptoserate assoziiert zu sein. Diese Vermutung muss durch weitere, gezielte Untersuchungen, wie zum Beispiel Apoptose-Assays, verifiziert werden.

5.1.3.2 Angiogenese

Wie erwähnt, ist TP identisch mit dem Wachstumsfaktor PD-ECGF, der die Angiogenese fördert (Ishikawa *et al.*, 1989). Es wurde gezeigt, dass eine hohe TS/PD-ECGF-Expression in Magenkarzinomen mit Metastasierung korreliert (Maeda *et al.*, 1996). Diese Metastasierung konnte *in vitro* durch die Hemmung von TS/PD-ECGF inhibiert werden (Takahashi *et al.*, 1998). Die Tatsache, dass *in vitro* die Überexpression von Maspin die Expression von TS/PD-ECGF blockiert, könnte eine Erklärung für die vielfach berichtete Hemmung der Angiogenese durch Maspin sein. In den CRC zeigten die Tumore mit starker Maspinexpression eine Erhöhung der TP/PD-ECGF-Expression. Dies steht zwar im Widerspruch zu den *in vitro* Daten, liefert aber dennoch eine weitere Erklärung für die schlechtere Prognose, da der höhere TP/PD-ECGF-Spiegel in den Tumoren mit starker Maspinexpression eine erhöhte Angiogenese zur Folge haben könnte. Die Angiogenese begünstigt wiederum das Tumorwachstum und die Metastasierung, was in einer schlechteren Prognose resultiert.

5.1.3.3 Expression Invasivitäts-assoziiertes Gene in transfizierten CRC-Zelllinien und in CRC

Die Expressionsanalysen verschiedener in CRC relevanter Matrixmetalloproteinasen (MMP) und der TIPMs (*Tissue Inhibitor of Matrixmetalloproteinases*), die MMP inhibieren, sollten Aufschluss darüber geben, ob die Expression dieser Gene von der Maspinexpression abhängt. In den stabilen Transfektanden waren die Transkripte von *MMP1*, *MMP7* und *TIMP2* mittels *real-time* PCR nicht nachweisbar, was auf eine sehr geringe Expression schließen lässt.

MMP2 (Gelatinase A) und *MMP3* (Stromelysin 1) werden in CRC generell überexprimiert, wobei beide Gene größtenteils von Immunzellen an der Tumordinvasionsfront exprimiert werden (Liabakk *et al.*, 1996; Collins *et al.*, 2001; Roeb *et al.*, 2004). *In vitro* hemmte die Überexpression von Maspin die Expression von *MMP2* und *MMP3* (Abb. 4.2.44), während die Expression dieser beiden MMPs in den CRC nicht signifikant mit der Maspinexpression

korrelierte (Tab. 4.2.12). Die Maspin-Suppression hatte die vollständige Blockierung der Expression der MMP-inhibierenden Gene TIMP1 und TIMP3 zur Folge (Abb. 4.2.45). Dieses Expressionsmuster der genannten MMPs und TIMPs widerspricht dem Verhalten der Zellen in den Invasions-Assays. Da trotz der Hemmung von MMP2 und MMP3 die Maspin-Überexpression mit einer Erhöhung der Invasivität einherging, scheint der pro-invasive Effekt von Maspin unabhängig von der Expression der Matrixmetalloproteinasen MMP2 und MMP3 zu sein. Weiterhin führte die Expressions-Blockierung der MMP-Inhibitoren TIMP1- und TIMP3 bei den Maspin-supprimierten Klonen nicht zu erhöhter Invasivität, was ebenfalls ein Indiz dafür ist, dass die Invasivitätsmechanismen von Maspin von den MMPs abhängig sind. Diese Ergebnisse legen außerdem nahe, dass in den CRC-Zelllinien der pro-invasive Effekt von Maspin die Effekte der MMPs und TIMPs dominierte.

Um in den CRC die Korrelation von Maspinexpression und der Expression verschiedener Gene mittels *MicroArray*-Technologie untersuchen zu können, wurden die Tumore in drei Gruppen mit schwacher, mittlerer und starker Maspinexpression eingeteilt.

In den CRC korrelierte eine hohe Maspinexpression signifikant mit einer erhöhten MMP1-Expression (Tab. 4.2.12). Obwohl diese Korrelation *in vitro* nicht nachweisbar war, könnte in den CRC ein hoher MMP1-Spiegel die Invasivität der stark Maspin-exprimierenden Tumorzellen der Invasionsfront (Abb. 4.2.7) fördern. Berichte von einer besonders hohen MMP1-Expression in invasiven CRC stützen diese Vermutung (Shiozawa *et al.*, 2000). Da die Maspin-Überexpression *in vitro* keine Aktivierung der MMP1-Expression bewirkte, kommen zwar MMP1- und Maspinexpression gemeinsam vor, stehen aber vermutlich nicht in direktem Zusammenhang.

Die Überexpression der MMP7 in CRC ist bekannt und stellt einen wichtigen Invasivitätsfaktor dar (Yoshimoto *et al.*, 1993; Yamamoto *et al.*, 1995). Überraschenderweise korrelierte die MMP7-Expression in den CRC invers mit der Maspinexpression (Tab. 4.2.12), obwohl die *Array*-Daten eine starke tumorspezifische Überexpression von MMP7 zeigten.

Da *in vitro* die Maspin-Suppression die Blockierung von TIMP1 bewirkte, beruht die signifikante Korrelation von hoher TIMP1-Expression mit hoher Maspinexpression und starker Maspin-Kernfärbung, vermutlich nicht auf einem direkten kausalen Zusammenhang.

Der Expressionsanstieg von TIMP2 korrelierte in CRC statistisch signifikant mit starker Maspinexpression (Tab. 4.2.12) und starker Maspin-Kernfärbung (Tab. 4.2.13). Da die absoluten TIMP2-Expressionswerte allerdings sehr gering waren, hatte die Expressionserhöhung vermutlich keine biologische Relevanz.

Die hohe Aggressivität der Tumorzellen mit starker Maspin-Kernfärbung, kann nicht mit der transkriptionellen Expression der analysierten Gene erklärt werden.

Da die Maspinexpression ebenso mit MSI Tumoren und mit undifferenzierten Tumoren in Verbindung steht, müssen die für CRC beschriebenen Korrelationen nicht kausal mit Maspin assoziiert sein. Es muss auch bemerkt werden, dass die Expression der MMPs und TIMPs nur transkriptionell untersucht wurde und keine Aussagen über die entsprechenden Proteinlevels getroffen werden können. Zudem muss der Expressionslevel der MMPs nicht mit deren Aktivität korrelieren. Die genauen molekularen Mechanismen, durch die Maspin die Invasivität *in vitro positiv* beeinflusst und die Auswirkungen der nukleären Maspinexpression, sind bisher unbekannt.

Auf welchen Wegen Maspin Gene wie *TS*, *DPD*, *TP*, *MMP2*, *MMP3*, *TIMP1* und *TIMP3* reguliert, ist unklar und bedarf weiterer Untersuchungen. Einerseits lässt die zytoplasmatische Lokalisation des *in vitro* überexprimierten Maspins (Abb. 4.2.16) vermuten, dass Maspin vom Zytoplasma aus über Interaktion mit anderen Proteinen genregulatorische Signale in den Kern senden kann, welche zur Aktivierung oder Blockierung anderer Gene führen. Andererseits lässt die Maspin-Kernfärbung in den CRC spekulieren, dass Maspin in den Zellkern transloziert und dort möglicherweise über andere Transkriptionsfaktoren Gene reguliert oder selbst als Transkriptionsfaktor wirken könnte. Bei diesen Aspekten könnte die Dimerisierung von Maspin eine entscheidende Rolle spielen, da diese möglicherweise die Bindung von Maspindimeren an andere genregulatorisch aktive Proteine oder auch direkt an DNA ermöglichen könnte. Um diese offenen Fragen zu beantworten, sollen weitere Analysen wie Chromatin-Immünpräzipitations-Studien (*ChIP-Assays*) und Affymetrix *Micro-Array*-Analysen der Maspin-überexprimierenden und der Maspin-supprimierten Klone erfolgen. Bei *yeast two-hybrid* Studien konnten bereits die Transkriptionsfaktoren IID und EGR-1 (*early growth response protein 1*) sowie der Transkriptionsrepressor GCF2 (*GC-binding factor 2*) als mögliche Interaktionspartner von Maspin identifiziert werden (Yin *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2006). Eine Affymetrix *MicroArray*-Analyse von Maspin-transfizierten MDA-MB-231 Brusttumorzellen zeigte den Expressionsanstieg von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie E2F1 und WT1 und von BRM, das unter anderem die Chromatinstruktur verändern kann (Bailey *et al.*, 2006).

5.1.4 Proteininteraktionen

Bei Proteininteraktionsstudien an Ni-NTA-Agarose konnte nach Silberfärbung eine Bande von 26 - 28 kDa sichtbar gemacht werden (Abb. 4.2.48). Diese stellt mit hoher

Wahrscheinlichkeit ein Protein dar, das mit rekombinantem Maspin (rM) interagierte. Diese Bande konnte durch Coomassie-Färbung nicht detektiert werden und weist daher auf eine Proteinmenge von unter 50 ng hin. Vermutlich handelt es sich bei diesem interagierenden Protein um Glutathion S-Transferase (GST), da die Interaktion zwischen Maspin und Glutathion S-Transferase ω 1 (27 kDa) und Glutathion S-Transferase μ 3 (26,5 kDa) bereits gezeigt wurde (Yin *et al.*, 2005). Yin *et al.* beschrieb dabei nicht nur die direkte Bindung von Maspin an GST, sondern auch deren Aktivierung durch Maspin. Die GSTs neutralisieren reaktive Sauerstoffspezies, die durch oxidativen Stress gebildet werden und schützen so vor Schäden durch Oxidation (Perquin *et al.*, 2000; Maulik and Das, 2002). Da bei den eigenen Versuchen kein *Western-Blot* mit spezifischem Antikörpernachweis durchgeführt wurde, ist die tatsächliche Identität dieser Bande nicht bewiesen.

Die Bindung von rMaspin an Strep-Tactin Matrix wurde durch die Coinkubation mit Zelllysate unterbunden. Vermutlich störte ein zelluläres Protein, das an rMaspin gebunden hatte, die Strep-Tactin/Strep-Tag-Interaktion durch sterische Hinderung. Die Ergebnisse der Protein-Interaktionsstudien an Ni-NTA-Agarose konnten durch Maspin-Coimmunpräzipitationen nicht bestätigt werden, weil mit diesen keine eindeutigen Interaktionspartner identifiziert werden konnten (Abb. 4.2.49).

5.1.5 Mutationsanalysen

Die Mutationsanalysen (4.2.14) des Maspingens *SERPINB5* deckten einen Serin/Prolin-Polymorphismus der Aminosäure 144 auf, der auch in der Blut-DNA gesunder Menschen natürlich vorkommt. Dieser Polymorphismus ist ungewöhnlich, da die Aminosäure Prolin, im Gegensatz zu Serin starke Konformationsänderungen der Proteinstruktur bewirken kann. Weiterhin konnten verschiedene Mutationen in CRC-Zelllinien und CRC-Tumoren detektiert werden, die den Austausch von Aminosäuren bewirkten, deren Bedeutung aber unklar ist. Von diesen Aminosäuren-Austauschen war die reaktive Seitenkette, die für verschiedene Funktionen von Maspin essentiell ist (Sheng *et al.*, 1994; Ngamkitidechakul *et al.*, 2003), nicht betroffen. Die detektierten Mutationen führten nicht zur Entstehung eines Kern-Lokalisationssignales, das die nukleäre Maspinlokalisierung erklären würde.

5.1.6 Zusammenhänge von Lokalisation und Funktion von Maspin

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit scheint Maspin sehr unterschiedliche Funktionen zu haben, die von der subzellulären Lokalisation abhängen.

Zelloberfläche

Auf der Zelloberfläche von CRC-Zelllinien verstärkt Maspin die interzellulären Kontakte und erhöht die Motilität und Invasivität der Zellen. Diese Effekte treten sowohl bei intrazellulärer Expression auf als auch bei externer Zugabe von rekombinantem Maspin und sind durch einen anti-Maspin-Antikörper hemmbar.

Zytoplasma

Die Überexpression hatte eine hohe Konzentration von Maspin im Zytoplasma zur Folge. Diese zytoplasmatische Expression bewirkte den Verlust der epithelialen Kontakthemmung, wodurch die Zellen nicht länger als *Monolayer* wuchsen. Ferner löste die zytoplasmatische Expression eine Verringerung der Proliferation, die Bildung von Pseudopodien und eine geringere Sensitivität gegen 5-FU aus. Die Verstärkung der interzellulären Kontakte, der Anstieg der Motilität und Invasivität und die Verringerung der Adhäsionsgeschwindigkeit und -stärke könnten auch auf Wirkungen von sekretiertem Maspin an der Zelloberfläche zurückzuführen sein. Weiterhin beeinflusste die zytoplasmatische Überexpression die Expression verschiedener Gene.

Zellkern

Viele kolorektale Karzinome zeigten eine deutliche Färbung des Zellkerns. Diese war mit Tumorzellen der Invasionsfront, mit disseminierten Tumorzellen und mit undifferenzierten Tumoren assoziiert. Zudem ist die nukleäre Maspinlokalisierung ein Marker für gutes Ansprechen auf eine 5-FU-basierte Chemotherapie und für eine schlechte Prognose, wenn bei positiver Kernfärbung keine Chemotherapie verabreicht wurde.

Die Wirkungen und Funktionen von Maspin erscheinen sehr vielfältig und komplex. Obwohl Maspin die Proliferation verlangsamt, scheinen in CRC doch die onkogenen Eigenschaften in Anbetracht der tumorspezifischen Maspin-Überexpression – insbesondere bei invasiven Tumorzellen, der Erniedrigung der 5-FU-Sensitivität bei Maspin-Überexpression *in vitro* und der Korrelation nukleärer Maspinfärbung mit einer schlechten Prognose bei nicht chemotherapierten CRC zu überwiegen. Auf welchen Wegen Maspin diese vielfältigen Funktionen vermittelt ist derzeit unklar, aber die Suche nach Antworten auf die offenen Fragen stellt einen Schwerpunkt der zukünftigen Arbeiten dar.

5.2 Methylierungsanalysen

Die DNA-Methylierung ist ein epigenetischer Mechanismus und betrifft ausschließlich Cytosine von CpG-Dinukleotiden, die in den Promotorbereichen vieler Gene in so genannten CpG-Inseln akkumuliert sind. In transkriptionell aktiven Promotoren ist die DNA unmethyliert, während die Hypermethylierung regulatorischer Promotorbereiche die Blockierung der Transkription zur Folge hat. Fehlerhafte DNA-Methylierungen spielen besonders bei Tumorerkrankungen häufig entscheidende Rollen, da Onkogene aktiviert und Tumorsuppressorgene stillgelegt werden können (Laird and Jaenisch, 1996). Methylierungsanalysen ermöglichen neue Einblicke in die Biologie von Tumoren und stellen wertvolle molekulare Werkzeuge für die Forschung und Diagnostik dar. Bei rein qualitativen Analysemethoden, wie die konventionelle methylierungsspezifische PCR (MSP) oder andere qualitative PCR-basierte Methylierungsanalysen können auch irrelevante Spuren von methylierter Ziel-DNA falsch positive Signale bewirken. Das Vorhandensein differentiell methylierter DNA in einer Probe kann verschiedene Ursachen haben. Einerseits kann die aus Tumoren isolierte DNA Spuren von DNA aus nicht-Tumorzellen (z. B. Immunzellen) mit potenzieller Methylierung enthalten. Andererseits kann sich die Tumor-Heterogenität der Zellen auch in differentiellen Methylierungsmustern verschiedener Tumorzellpopulationen niederschlagen. Die zu Beginn der Arbeit bereits vorhandenen Methoden zur quantitativen Methylierungsanalyse schienen entweder zur Beantwortung der biologischen Fragestellungen dieser Arbeit ungeeignet (MethylQuant; analysiert nur ein Cytosin) (Thomassin *et al.*, 2004) oder erforderten Gerätschaften (TaqMan für MethyLight (Eads *et al.*, 2000) und ConLight-MSP (Rand *et al.*, 2002); *Pyrosequencer* für Methylierungsanalysen mittels *Pyrosequencing* (Colella *et al.*, 2003)), die nicht zur Verfügung standen. Aufgrund dieser Umstände wurden in dieser Dissertation zwei neue *quantitative* Methylierungsanalyse-Methoden etabliert: die QAMMOD (Quantitative Methylierungsanalyse modifizierter DNA) und die QESD (Quantifizierung Endonuklease-resistenter DNA). Die QAMMOD wurde erstmals zur quantitativen Analyse der DNA-Promotormethylierung von *MLH1* in sporadischen CRC und HNPCC eingesetzt, mit Hilfe der QESD wurden neben der *MLH1*-Methylierung auch die Promotormethylierungen von *P16* und *MGMT* untersucht.

5.2.1 Promotormethylierung von P16, MGMT und MLH1 in MSI und MSS CRC

Bisher wurde davon ausgegangen, dass anormale, tumorspezifische DNA-Methylierung hauptsächlich in Tumoren des Mutator-Phänotyps, der mit MSI assoziiert ist, vorkommt (Kinzler and Vogelstein, 1997; Lengauer *et al.*, 1998). Die Daten dieser Arbeit zeigen hingegen, dass in kolorektalen Karzinomen die Gene *P16* und *MGMT* in den meist chromosomal instabilen (CIN) MSS Tumoren in etwa genauso häufig Promotormethylierungen zeigen wie in MSI Tumoren (Tab. 4.3.4). Bezieht man in den MSI Tumoren die *MLH1*-Methylierung mit ein, zeigt sich eine signifikante Korrelation von positiver *MLH1*-Methylierung mit der Methylierung von *P16* und *MGMT* (Abb. 4.3.7; Tab 4.3.5). Interessanterweise zeigten 100 % der MSI Tumore mit positiver *MLH1*-Methylierung auch eine starke *MGMT*-Methylierung von mindestens 20 % (Tab. 4.3.5). Diese Beobachtungen lassen folgende Spekulationen zur Tumorgenese zu: Möglicherweise ist die methylierungsbedingte Inaktivierung von *P16* und *MGMT* ein frühes Ereignis in der Tumorgenese, das bei den Entstehungsmechanismen von MSI *und* MSS CRC eine wichtige Rolle spielt. Die initiale Methylierung von *P16* und *MGMT* könnte beispielsweise durch fehlregulierte DNA-Methyltransferasen verursacht werden. Der Ausfall des DNA-Reparaturenzyms *MGMT* könnte möglicherweise inaktivierende Mutationen in Genen zur Folge haben, die zu chromosomaler Instabilität führen (z. B. „*mitotic spindle checkpoint*“-Gene (Cahill *et al.*, 1998)). Als mögliche Folge dieser chromosomalen Instabilität könnten Deletionen oder auch weitere Mutationen zum Ausfall der einst hyperaktiven DNA-Methyltransferasen führen. Die Entstehung von CIN in Folge des Verlusts von DNA-Methyltransferasen wurde bereits gezeigt (Karpf and Matsui, 2005).

Wird während der Tumorgenese das *mismatch repair* Gen *MLH1* durch Methylierung stillgelegt, entsteht MSI und es entwickelt sich ein Tumor vom Mutator-Phänotyp.

Der methylierungsbedingte Funktionsverlust von dem Tumorsuppressorgen *P16* begünstigt die Tumorprogression sowohl bei den CIN/MSS als auch bei den MSI Tumoren durch eine beschleunigte Proliferation.

Diese Hypothese zur Tumorgenese von CIN/MSS und MSI Tumoren unter Beteiligung der *MGMT*-, *P16*- und *MLH1*-Methylierung ist in Abb. 5.2 illustriert.

Gestützt werden diese Hypothesen durch Berichte von *MGMT*-Methylierung in normaler Kolonmucosa von CRC Patienten („*field defect*“) (Shen *et al.*, 2005). Andere Arbeitsgruppen stellten die Promotormethylierungen von *P16*, *MGMT* und *MLH1* auch in Polypen, den potenziellen Vorstufen von CRC, fest (Petko *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2006). Die Hypothesen

zur Tumorgenese von CRC sollten durch die Methylierungsanalysen weiterer Gene und die Untersuchungen der DNA-Methyltransferasen an größeren Fallzahlen von Tumoren erhärtet werden

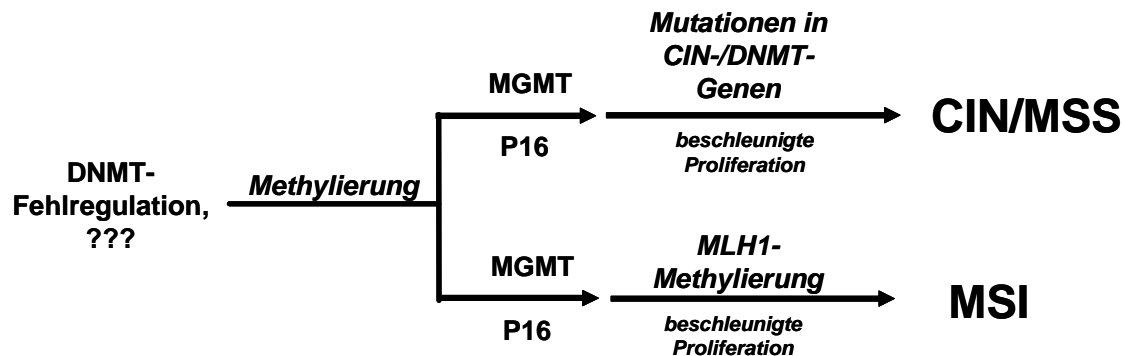


Abb. 5.2: Hypothese zur Tumorgenese von CIN/MSS und MSI Tumoren unter Beteiligung der *MGMT*-, *P16*- und *MLH1*-Methylierung. CIN-Gene: Gene, welche die chromosomale Integrität bewahren. Die Abbildung wird im vorausgegangenen Text beschrieben (siehe oben).

5.2.2 *MLH1*-Methylierungsanalysen von HNPCC-Tumoren und sporadischen CRC

Mit Hilfe der neu etablierten quantitativen Methylierungsanalysen konnte die *MLH1*-Promotormethylierung bei HNPCC-Patienten erstmals quantitativ analysiert werden. Dabei wurde nicht nur eine negative, sondern teilweise auch eine schwache *MLH1*-Methylierung festgestellt (Abb. 4.3.6; Tab. 4.3.1; Tab. 4.3.2; Tab.4.3.3) (Bettstetter *et al.*, 2007). Diese Beobachtung von schwacher *MLH1*-Promotormethylierung bei HNPCC-Patienten mit pathogener Keimbahnmutation deckt sich mit den Ergebnissen anderer (Esteller *et al.*, 2001) und lässt vermuten, dass bei den betreffenden Tumoren ein Allel des *MLH1*-Genes durch die Promotormethylierung inaktiviert wurde, während das andere die Mutation trägt. Da in den *MLH1*-Promotoren dieser Patienten keine Sequenzpolymorphismen vorkamen, konnten weitere Untersuchungen leider nicht zwischen maternalen und paternalen Allelen unterscheiden.

Da der Grad der *MLH1*-Methylierung bei den sporadischen MSI Tumoren signifikant höher war als bei den HNPCC-Tumoren, konnte in dieser Dissertation mit Hilfe der neuen quantitativen Methylierungsanalysen zwischen HNPCC-Tumoren und sporadischen MSI CRC deutlich unterschieden werden (Abb. 4.3.6) (Bettstetter *et al.*, 2007). Somit können die in dieser Arbeit entwickelten quantitativen Methylierungsanalysen des *MLH1*-Promotors

wesentliche Informationen zur Unterscheidung von sporadischen CRC Patienten und HNPCC-Kandidaten liefern und in Zukunft möglicherweise als hilfreiche, zusätzliche, molekulare Werkzeuge in der HNPCC-Diagnostik eingesetzt werden.

Aufgrund des Vorkommens von methylierter *MLH1*-Promotor-DNA schließen sich rein qualitative Methoden der Methylierungsanalyse für diagnostische Fragestellungen aus, während die quantitativen *MLH1*-Methylierungsanalysen die Erstellung von Grenzwerten erlaubten. Mittlerweile konnten bei Methylierungsanalysen von weiteren MSI CRC mit unvollständigen klinischen Datensätzen zum einen mehrere HNPCC-Kandidaten und zum anderen sporadische MSI CRC Patienten, die unter HNPCC-Verdacht standen, identifiziert werden (Bettstetter *et al.*, 2007).

Anzumerken ist, dass bei der *MLH1*-QESD nur die Analyse des **proximalen *MLH1***-Promotorbereiches eine sichere Unterscheidung zwischen HNPCC und sporadischen MSS Tumoren gewährleistete. Die Detektion von hohen Methylierungswerten durch die QESD des distalen *MLH1*-Promotorbereiches bei HNPCC und MSS Tumoren schließt diese zwar für diagnostisch relevante Anwendungen aus, zeigt aber, dass die Methylierung der beiden *Hin6I*-Schnittstellen (Abb. 3.3) nicht zur Blockierung *MLH1*-Transkription führen. Die distale *MLH1*-QESD analysiert den Methylierungsstatus derselben zwei Cytosine, die auch im 5'-Bereich des distalen methylierungsspezifischen MS-Primers (vgl. Abb. 3.1; Abb. 3.3) der QAMMOD liegen. Sind diese Cytosine methyliert, kann *Hin6I* nicht schneiden und die QESD detektiert korrekterweise diese Methylierung der *Hin6I*-Schnittstellen. Der entsprechende MS-Primer der distalen *MLH1*-QAMMOD deckt im 3'-Bereich noch vier weitere eventuell methylierte Cytosine ab und bindet nur bei ursprünglicher Methylierung aller sechs Cytosine der Primerbindestelle. Da die distale *MLH1*-QAMMOD bei den entsprechenden HNPCC- und MSS Tumoren kein Signal lieferte (Tab. 4.3.3), waren deren Cytosine im 3'-Bereich der MS-Primerbindestelle zumindest teilweise unmethyliert. Bei den Untersuchungen weiterer CRC wurde bei einem höchstwahrscheinlich sporadischen CRC Patienten mit negativer *MLH1*-Expression alleinige Methylierung des distalen *MLH1*-Promotorbereiches festgestellt (Bettstetter *et al.*, 2007). Dies lässt darauf schließen, dass auch die alleinige Hypermethylierung des distalen *MLH1*-Promotorbereiches (Abb. 3.1) die *MLH1*-Expression blockieren kann, steht aber in Kontrast zu den Untersuchungen anderer (Deng *et al.*, 1999).

5.2.3 Empfehlungen zum Einsatz quantitativer MLH1-Methylierungsanalysen als zusätzliche Methoden in der HNPCC-Diagnostik

Die quantitative *MLH1*-Methylierungsanalyse ist in der Lage HNPCC-Kandidaten für weitere Untersuchungen (z. B. MMR-Sequenzanalysen) zu detektieren, die mit den anderen HNPCC-Kriterien nicht detektiert werden können. Dies betrifft vor allem HNPCC-Patienten, die aufgrund kleiner Familien oder einem Alter über 60 Jahre keine Amsterdam- bzw. Bethesda-Kriterien erfüllen können oder Neumutationen entwickelt haben. Daher sollte die Methylierungsanalyse des *MLH1*-Promotors grundsätzlich bei allen MSI CRC mit negativer *MLH1*-IHC unabhängig vom Alter routinemäßig durchgeführt werden.

Das Ergebnis einer quantitativen Methylierungsanalyse hängt entscheidend vom Tumoranteil der Probe und damit von der Präzision der Mikrodissektion ab. Um einen repräsentativen Tumoranteil zu erfassen, sollten nur Proben mit einem Tumoranteil von mindestens 80 % zur quantitativen Methylierungsanalyse verwendet werden.

Als ein weiteres molekulares Hilfsmittel zur Unterscheidung von sporadischen MSI CRC und HNPCC hat sich die Detektion einer BRAF V600E-Mutation herausgestellt (Deng *et al.*, 2004; Domingo *et al.*, 2005; Bettstetter *et al.*, 2007; Kadiyska *et al.*, 2007; Loughrey *et al.*, 2007). Bisher wurden BRAF V600E-Mutationen bei HNPCC-Patienten mit pathogener *MLH1*-Keimbahnmutation weder in dieser Arbeit, noch bei den Untersuchungen anderer festgestellt (Wang *et al.*, 2003; Deng *et al.*, 2004; Domingo *et al.*, 2004; McGivern *et al.*, 2004; Domingo *et al.*, 2005; Bettstetter *et al.*, 2007; Loughrey *et al.*, 2007). Andererseits kommen BRAF V600E-Mutationen spezifisch in vielen sporadischen MSI CRC und seltener in sporadischen MSS CRC vor (Deng *et al.*, 2004; Domingo *et al.*, 2004; McGivern *et al.*, 2004; Bettstetter *et al.*, 2007). Nach derzeitigem Wissensstand schließt die Detektion einer BRAF V600E-Mutation HNPCC aus und kann als zusätzlicher diagnostischer Marker dienen. Daher sollte eine BRAF-Mutationsanalyse parallel zur *MLH1*-Methylierungsanalyse durchgeführt werden.

Grundsätzlich sollten bei MSI CRC mit positiver *MLH1*-Methylierung und negativem BRAF V600E Mutations-Befund eine entsprechende Methylierungsanalyse an DNA aus Blut oder Normalgewebe durchgeführt werden, um eine potenzielle Keimbahnmethylierung auszuschließen, die in einem Fall festgestellt wurde (Gazzoli *et al.*, 2002; Miyakura *et al.*, 2004; Suter *et al.*, 2004; Hitchins *et al.*, 2005; Bettstetter *et al.*, 2007).

Da die QESD im Vergleich zur QAMMOD aufgrund der schnelleren und einfacheren Durchführbarkeit besser für die Routinediagnostik geeignet ist und zudem eine höhere Sensitivität bietet, sollte die *MLHI*-Methylierungsanalyse am proximalen Promotorbereich mit der hier vorgestellten *MLHI*-QESD erfolgen.

Es muss betont werden, dass die klinische Diagnose von HNPCC bei Patienten, die keine Amsterdam-Kriterien erfüllen, erst durch die Detektion einer pathogenen MMR-Keimbahnmutation endgültig bestätigt wird.

5.2.4 Vergleich der QAMMOD und der QESD

Die QAMMOD detektiert die hypermethylierten Bindestellen der methylierungsspezifischen MS-Primer, die QESD dagegen detektiert hypermethylierte Schnittstellen von methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen innerhalb einer über Primer definierten Zielsequenz. Beide Methoden ermöglichen die quantitative Methylierungsanalyse mehrerer CpGs und benötigen keine fluoreszenzmarkierten Hybridisierungs sonden, die oft schwierig zu erstellen sind. Da der Anteil der methylierten DNA der Probe wiedergegeben wird, sind beide Methoden unsensibel gegen Spuren von DNA-Kontaminationen mit potenzieller Methylierung und ermöglichen prinzipiell die Definition von Grenzwerten, die eine Unterscheidung zwischen negativen und positiven Ergebnissen gewährleisten. Die hohe quantitative Präzision beider Methoden wurde überprüft und bestätigt (Abb. 4.3.1 und 4.3.4).

Im Gegensatz zur QESD muss bei der QAMMOD die genomische DNA mit Bisulfit modifiziert werden. Die Probleme, die mit der hohen Instabilität der einzelsträngigen, modifizierten DNA einhergehen, konnten bei der QAMMOD dadurch gelöst werden, dass der zu untersuchende DNA-Bereich mittels einer PCR-Voramplifikation in Form von gewöhnlicher doppelsträngiger DNA stabilisiert wurde. Die Gefahr von Kontaminationen durch diese Voramplifikation bleibt aber durch die Begrenzung auf 15 PCR-Zyklen weitgehend minimal.

Bei der QAMMOD stellt die Schmelzpunktanalyse innerhalb des *real-time* PCR-Programms eine qualitative Kontrolle der quantitativen Methylierungsanalyse dar. Während die Flank-PCR-Produkte von ursprünglich methylierter DNA Cytosine enthalten, die den Schmelzpunkt ansteigen lassen, sind solche Cytosine in den Flank-PCR-Produkten von unmethylierter DNA nicht enthalten. Wird bei der Methylierungsquantifizierung methylierte DNA detektiert, so zeigt sich diese auch in der Schmelzpunktanalyse durch einen distinkten Schmelzpunkt bei

höherer Temperatur (Abb. 4.3.2). Der Anteil der unmethylierten DNA bei methylierungspositiven Patienten könnte von coisolierten Normal- oder Immunzellen, von unmethylierten Tumorzellsubpopulationen (Zellmosaik) oder von unmethylierten Allelen monoallelisch methylierter Tumorzellen stammen.

Der Aufwand einer QESD-Methylierungsanalyse ist vergleichsweise sehr gering, da native DNA fast beliebiger Konzentration in die beiden Verdauungen eingesetzt werden kann. Externe Standards oder Kalibratoren sind bei der QESD nicht erforderlich, da jede DNA-Probe gegen sich selbst normalisiert wird. Dabei ermittelt die *real-time* PCR für jede Probe das Verhältnis zwischen dem Kalibratoransatz (entsprechend 100 %) und dem Quantifizierungsansatz, dessen Gehalt an amplifizierbarer DNA dem Anteil methylierter DNA entspricht. Da je Probe genau gleiche DNA-Mengen auf Quantifizierungs- und Kalibratorverdau verteilt werden, ist die Konzentration der DNA-Probe irrelevant und muss nicht zwingend bestimmt werden.

Die hohe Sensitivität der QESD erlaubt die präzise Methylierungsanalyse von wenigen Nanogramm DNA. Wie das Beispiel der QESD des *MLH1*-Promotors zeigt, sind theoretisch insgesamt nur 0,8 ng (je 0,4 ng DNA für Quantifizierungs- und Kalibratorverdau) für eine Methylierungsanalyse ausreichend (Abb. 4.3.3).

Die verdaute DNA ist stabil, ohne weitere Behandlung lagerfähig und kann unverdünnt direkt als *Template* in die *real-time* PCR eingesetzt werden. Ein weiterer großer Vorteil der QESD ist die Möglichkeit, ein und dieselbe verdaute DNA für viele weitere QESD-Methylierungsanalysen verschiedener Gene verwenden zu können. So musste für die Methylierungsanalysen von *P16*, *MGMT* und *MLH1* je CRC-Probe nur ein Quantifizierungs- und Kalibratorverdau hergestellt werden. Die hohe Restriktionseffektivität der Restriktionsendonuklease *Hin6I* schließt falsch positive Signale durch unmethylierte aber unverdaute DNA aus. Selbst große Mengen von Blut-DNA (1,2 µg) und DNA aus paraffinisiertem Normalgewebe (0,5 µg) werden binnen einer Stunde zu 99,90 %, bzw. 99,04% verdaut (Abb. 4.3.4). Damit scheint eine Inkubationszeit der Verdauung von circa drei Stunden zur quantitativen Restriktion unmethylierter DNA ausreichend zu sein. Da *Hin6I* keine intrinsische Aktivität an methylierter DNA aufweist und *DraI* und *XbaI* keine Sternaktivität zeigen, konnten Verdauungen standardmäßig über Nacht inkubiert werden.

Somit ermöglicht die QESD präzise und effiziente Methylierungsanalysen verschiedenster Gene und ist damit auch für routinediagnostische Zwecke sehr geeignet.

Bei der QAMMOD gestaltet sich die Erstellung von Primern für die degenerierte Sequenz modifizierter DNA oft problematisch und macht die Analyse mancher interessanter DNA-

Sequenzen sogar unmöglich. Diese Probleme treten bei der QESD kaum auf, da die Primer für die Sequenz nativer DNA erstellt werden. Zudem sind in den meisten regulatorischen CpG-Inseln die Schnittstellen für methylierungssensitive Restriktionsendonukleasen wie z. B. *Hin6I* (GCGC) oder *HpaII* (CCGG) in großer Zahl vorhanden und ermöglichen ein flexibles Primerdesign. Eine sorgfältige Auswahl von *Hin6I*-Schnittstellen, deren Methylierung für die Genexpression entscheidend ist, macht die QESD zur derzeit schnellsten quantitativen Methylierungsanalyse mit einer hohen Aussagekraft.

Innerhalb dieser Dissertation wurden weitere QESD-Methylierungsanalysen für die Gene, *GSTP1*, *GRO3*, *RASSF1*, *SFRP1*, *PITX2*, *CDH3* (*P-Cadherin*), *APC*, *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* und *TS* etabliert und stehen für zukünftige quantitative Methylierungsanalysen zur Verfügung. Entsprechende Untersuchungen sind sowohl in der Forschung als auch in der Diagnostik (z. B. *MGMT*-QESD zur Prädiktion von Prognose und Chemosensitivität bei Glioblastom-Patienten (Esteller *et al.*, 2000; Paz *et al.*, 2004)) in Arbeit.

6 Zusammenfassung

Diese Dissertation befasst sich mit fehlregulierten Genen im kolorektalen Karzinom (CRC), das in den Industrieländern unter den malignen Krankheiten die zweithäufigste Inzidenz und Mortalität zeigt. Das Ziel der Arbeit war die molekularbiologische Charakterisierung dysreguliert-exprimierter Gene im CRC, um neue Einblicke in die Biologie von kolorektalen Tumoren zu gewinnen und um neue diagnostische und prädiktive Marker zu identifizieren.

Die Arbeiten umfassten Analysen auf DNA-, RNA- und Proteinebene unter Verwendung unabhängiger Methoden, und erfolgten sowohl an CRC als auch an verschiedenen CRC-Zelllinien. Dabei lag der Fokus der Untersuchungen auf der Genexpression und deren biologischer und klinischer Bedeutung. Die biologische Funktion und die Auswirkungen der Expression tumorrelevanter Gene wurde *in vitro* sowohl mittels Überexpression als auch durch die Suppression der Expression studiert.

Da in Tumoren den Fehlregulationen von Genen häufig epigenetische Veränderungen durch DNA-Methylierung von Promotoren zugrunde liegen, stellen Methylierungsanalysen tumorrelevanter Gene einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit dar. Da die aus Tumoren isolierte DNA oft sowohl methylierte als auch unmethylierte DNA-Moleküle enthält, waren neue quantitative Methoden der Methylierungsanalyse erforderlich, die in dieser Arbeit etabliert und validiert wurden.

Basierend auf *Array*-Expressionsdaten erwies sich das Gen SERPINB5, das für Maspin codiert, als vielversprechendes Kandidatengen mit differentieller Expression. Da zu Beginn dieser Dissertation die Rolle von Maspin in CRC unbekannt war, stellen die Analysen von Expression, Funktion und Bedeutung den Schwerpunkt dieser Dissertation dar.

Maspin wird in kolorektalen Karzinomen tumorspezifisch überexprimiert. Besonders hohe Expressionswerte auf RNA- und Proteinebene zeigten sich in undifferenzierten Tumoren, in Mikrosatelliten-instabilen (MSI) Tumoren, in den Tumorzellen der Invasionsfront und in disseminierten Tumorzellen. Die Maspinexpression von MSI CRC-Zelllinien übertraf die von Mikrosatelliten-stabilen (MSS) CRC-Zelllinien um den Faktor 28.

In Normalmucosae, in Maspin-negativen Tumoren sowie in der Maspin-negativen MSS CRC-Zelllinie CaCo-2 wurde eine Hypermethylierung des Maspinpromotors festgestellt. Bei allen untersuchten Maspin-exprimierenden Tumoren und CRC-Zelllinien war der Maspinpromotor unmethyliert. Somit erfolgt die Aktivierung der Maspinexpression durch die Demethylierung des Maspinpromotors.

Die stabile Überexpression bewirkte bei den adhären wachsenden Zellen die Ausbildung von Pseudopodien und die Änderung von der Wachstumsform als *Monolayer* zu einer sphäroiden Wuchsform als Zellklumpen mit starken interzellulären Kontakten. Die Maspin-Überexpression hatte zudem eine Verringerung der Proliferationsrate zur Folge. Im Gegensatz dazu bildeten die Maspin-supprimierten Klone die Pseudopodien zurück und zeigten beschleunigte Proliferation.

Die überexprimierenden Klone zeigten deutlich langsamere Adhäsion an zellkulturbehandeltem Polystyrol, während die Adhäsionsstärke bei beiden Arten von Klonen reduziert war.

In dieser Arbeit wurde erstmals der positive Einfluss von Maspin auf die Motilität und Invasivität von CRC-Zelllinien gezeigt: Die Maspin-Überexpression hatte einen Anstieg der Motilität und Invasivität zur Folge, *vice versa* resultierte die Suppression in einer Verringerung der Motilität und Invasivität.

Maspin entfaltet seine invasionsverstärkende Wirkung an der Zelloberfläche, da die Zugabe von rekombinantem Maspin die Invasivität forcierte, aber ab Konzentrationen von $> 2 \mu\text{M}$ die Aggregation der Zellen bewirkte. Die Invasivität und die Wirkungen des rekombinanten Maspins waren durch einen anti-Maspin-Antikörper hemmbar.

In vitro ging die Überexpression von Maspin mit einer niedrigeren Sensitivität gegen das Chemotherapeutikum 5-Fluoruracil (5-FU) einher. Entsprechend hatte die Maspin-Suppression eine höhere Sensitivität gegen 5-FU zur Folge. Dabei beeinflusste die Maspinexpression die Expression der Gene des 5-FU-Stoffwechsels. Die Expression der 5-FU-metabolisierenden Dihydropyrimidindehydrogenase (DPD) war in den überexprimierenden Klonen stark erhöht, in den supprimierten Klonen hingegen vollständig blockiert. Bei dem Hauptzielmolekül von 5-FU, der Thymidylatsynthase (TS), wurde als Folge der Maspin-Überexpression eine erhöhte Expression und bei den supprimierten Klonen entsprechend eine erniedrigte Expression festgestellt. Die Maspin-Überexpression bewirkte zudem die Expressionsblockierung der Thymidinphosphorylase (TP), welche für die Aktivierung von 5-FU mit verantwortlich ist.

Bei den CRC-Zelllinien war die Maspin-Überexpression mit einer transkriptionellen Blockierung von der Matrixmetalloproteinase 2 (MMP2) und MMP3 assoziiert. Die Maspin-Suppression ging mit dem Expressionsausfall von TIMP1 (*tissue inhibitor of matrixmetalloproteinases 1*) und TIMP3 einher. Die Daten der Array-basierten Transkriptomanalysen am CRC zeigten einen signifikanten Expressionsanstieg von TS, DPD, TP, MMP1, TIMP1 und MMP10 bei Tumoren mit starker Maspinexpression.

Protein-Interaktionsstudien konnten ein Maspin-bindendes Protein von circa 26 – 28 kDa identifizieren, bei dem es sich aufgrund des Molekulargewichtes um Glutathion S-Transferase zu handeln schien und dessen Interaktion mit Maspin bereits beschrieben wurde.

Die Sequenzanalysen von Tumoren, Normalgewebe und CRC-Zelllinien deckten einen Serin/Prolin Polymorphismus der Aminosäure 144 auf, konnten aber keinen Hinweis auf die Entstehung eines Kernlokalisierungssignals, auf Mutationen innerhalb der reaktiven Seitenkette von Maspin oder auf *nonsense*-Mutationen liefern.

Die nukleäre Lokalisation von Maspin tritt spezifisch bei dedifferenzierten Tumoren und invasiven Tumorzellen auf. In einer retrospektiven Studie an Stadium III Kolonkarzinom-Patienten erwies sich die nukleäre Maspinlokalisierung als ein unabhängiger Marker für eine schlechte Prognose ohne eine 5-FU-basierte Chemotherapie. Im Gegensatz zu Patienten mit positiver Maspin-Kernfärbung profitierten demnach Patienten ohne nukleäre Maspinfärbung nicht von einer Chemotherapie.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden zwei neue quantitative DNA-Methylierungsanalysen etabliert: QAMMOD (Quantitative Methylierungsanalyse von modifizierter DNA) und QESD (Quantifizierung Endonuklease-resistenter DNA).

Bei der QAMMOD erfolgt die Methylierungsquantifizierung an stabilisierter, Bisulfit-modifizierter DNA. Die QESD basiert auf der methylierungsspezifischen Restriktion nativer DNA mit methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen. Die Quantifizierung des Anteils methylierter DNA erfolgt bei beiden Methoden mittels SYBR Green *real-time* PCR.

Die QESD wurde für die quantitative Promotor-DNA-Methylierungsanalyse von *P16*, *MGMT* und *MLH1* eingesetzt. Dabei zeigten die Intensitäten und Häufigkeiten der *P16*- und *MGMT*-Methylierung zwischen den MSI Tumoren und den chromosomal instabilen MSS CRC keine signifikanten Unterschiede, korrelierten aber innerhalb der MSI CRC signifikant mit der Methylierung von *MLH1*.

Mit Hilfe der QAMMOD und der QESD wurde erstmals die *MLH1*-Promotormethylierung in hereditären nicht-polypösen kolorektalen Karzinomen (HNPCC) und sporadischen MSI Tumoren analysiert. Dabei wurde bei den HNPCC-Tumoren negative oder schwache *MLH1*-Methylierung festgestellt. Der Grad der *MLH1*-Methylierung war bei den HNPCC-Tumoren signifikant niedriger als bei den am *MLH1*-Promotor durchwegs stark methylierten sporadischen MSI Tumoren. Mit Hilfe der neuen quantitativen Methylierungsanalysen konnten erstmals Grenzwerte der *MLH1*-Methylierung definiert werden, welche

methylierungsnegative HNPCC-Kandidaten unter den methylierungspositiven sporadischen MSI CRC Patienten für weitere diagnostische Untersuchungen selektionieren können.

Die QESD ist zur quantitativen Methylierungsanalyse verschiedenster Gene anwendbar und wurde innerhalb dieser Dissertation zusätzlich für die quantitative Methylierungsanalyse der Gene *GSTP1*, *CA4*, *RASSF1*, *SFRP1*, *PITX2*, *CDH3*, *APC*, *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B* und *TS* etabliert.

Ausblick

Um zu klären, ob die Invasivität von Maspin im Zusammenhang mit dem Urokinase-Plasminogen-Aktivator System steht, sollte bei den bereits vorhandenen Maspin-überexprimierenden und Maspin-supprimierten Klonen die Expression der entsprechenden Gene uPA (*urokinase-type plasminogen activator*), uPAR (*urokinase-type plasminogen activator receptor*), PAI1 (*plasminogen activator inhibitor 1*) und PAI2 auf RNA und Proteinebene untersucht werden.

Mit Hilfe von Matrixmetalloproteinase-Aktivitäts-Assays ist die maspinabhängige Aktivierung von Matrixmetalloproteinasen zu überprüfen.

Mittels Elektronenmikroskopie von Immun-Gold-markierten Dünnschnitten von Tumoren mit nukleärer Maspinfärbung sollte geklärt werden, ob Maspin innerhalb des Zellkerns oder auf der Kernmembran lokalisiert ist. Analog sind entsprechende Analysen mittels konfokaler Mikroskopie durchzuführen.

Um Einblicke in die Mechanismen der verschiedenen Funktionen von Maspin zu erhalten, sollten mittels Affymetrix-Array-Analysen der Maspin-überexprimierenden und Maspin-supprimierten Klone weitere Maspin-abhängig exprimierte Gene identifiziert werden.

Mittels Chromatin-Immunpräzipitation (ChIP) sollte überprüft werden, ob Maspin direkt oder indirekt an DNA (z. B. an Promotoren von *TS*, *DPD*, *TP*, *MMP2*, *MMP3*, *TIMP1* und *TIMP3*) binden kann.

Der Einfluss der Maspinexpression auf verschiedene Stimuli, wie z. B. 5-FU-Behandlung ist mittels Apoptose-Assays zu untersuchen.

Mit Hilfe der quantitativen Methylierungsanalysen weiterer tumorrelevanter Gene bei CIN/MSS Tumoren sollte die Bedeutung der Promotormethylierung für die Tumorgenese dieser Tumorgruppe weiter untersucht werden. Dabei sollte auch die Bedeutung von Expression und Mutationsstatus der DNA-Methyltransferasen untersucht werden.

7 Eigene Publikationen

Bettstetter M, Woenckhaus M, Wild PJ, Rümmele P, Blaszyk H, Hartmann A, Hofstädter F, Dietmaier W.: Elevated nuclear maspin expression is associated with microsatellite instability and high tumour grade in colorectal cancer. *J Pathol.* 2005 Apr;205(5):606-14.

Dietmaier W, Bettstetter M, Wild PJ, Woenckhaus M, Rümmele P, Hartmann A, Dechant S, Blaszyk H, Pauer A, Klinkhammer-Schalke M, Hofstadter F.: Nuclear Maspin expression is associated with response to adjuvant 5-fluorouracil based chemotherapy in patients with stage III colon cancer. *Int J Cancer.* 2006 May 1;118(9):2247-54.

Bettstetter M, Rümmele P, Hofstädter F, Dietmaier W: Eine neue, robuste und präzise *real-time* PRC Methode zur quantitativen Bestimmung von Promotor-DNA-Methylierung als ein hilfreiches Mittel zur Unterscheidung vom sporadischen kolorektalen Karzinom und HNPCC. *Verh. Dtsch. Ges. Path.* 2006; 90: 236-43

Bettstetter M, Dechant S, Rümmele P, Grabowski M, Keller G, Holinski-Feder E, Hartmann A, Hofstädter F, Dietmaier W.: Distinction of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic microsatellite-unstable colorectal cancer through quantification of MLH1 methylation by *real-time* PCR. *Clin Cancer Res.* 2007 Jun 1;13(11):3221-8

8 Literatur

- Aaltonen, L. A., Peltomaki, P., Leach, F. S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J. P., Jarvinen, H., Powell, S. M., Jen, J., Hamilton, S. R., and et al. (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260, 812-816.
- Aarnio, M., Sankila, R., Pukkala, E., Salovaara, R., Aaltonen, L. A., de la Chapelle, A., Peltomaki, P., Mecklin, J. P., and Jarvinen, H. J. (1999). Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 81, 214-218.
- Abd El-Wahed, M. M. (2005). Expression and subcellular localization of maspin in human ovarian epithelial neoplasms: correlation with clinicopathologic features. *J Egypt Natl Canc Inst* 17, 173-183.
- Abraham, S., Zhang, W., Greenberg, N., and Zhang, M. (2003). Maspin functions as tumor suppressor by increasing cell adhesion to extracellular matrix in prostate tumor cells. *J Urol* 169, 1157-1161.
- Akiyama, Y., Maesawa, C., Ogasawara, S., Terashima, M., and Masuda, T. (2003). Cell-type-specific repression of the maspin gene is disrupted frequently by demethylation at the promoter region in gastric intestinal metaplasia and cancer cells. *Am J Pathol* 163, 1911-1919.
- Al-Ayyoubi, M., Gettins, P. G., and Volz, K. (2004). Crystal structure of human maspin, a serpin with antitumor properties: reactive center loop of maspin is exposed but constrained. *J Biol Chem* 279, 55540-55544.
- Bailey, C. M., Khalkhali-Ellis, Z., Seftor, E. A., and Hendrix, M. J. (2006). Biological functions of maspin. *J Cell Physiol* 209, 617-624.
- Ballestrero, A., Coviello, D. A., Garuti, A., Nencioni, A., Fama, A., Rocco, L., Bertorelli, R., Ferrando, F., Gonella, R., and Patrone, F. (2001). Reverse-transcriptase polymerase chain reaction of the maspin gene in the detection of bone marrow breast carcinoma cell contamination. *Cancer* 92, 2030-2035.
- Beecken, W. D., Engl, T., Engels, K., Blumenberg, C., Oppermann, E., Camphausen, K., Shing, Y., Reinecke, G., Jonas, D., and Blaheta, R. (2006). Clinical relevance of maspin expression in bladder cancer. *World J Urol* 24, 338-344.
- Bettstetter, M., Dechant, S., Ruemmele, P., Grabowski, M., Keller, G., Holinski-Feder, E., Hartmann, A., Hofstaedter, F., and Dietmaier, W. (2007). Distinction of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer and Sporadic Microsatellite-Unstable Colorectal Cancer through Quantification of MLH1 Methylation by Real-time PCR. *Clin Cancer Res* 13, 3221-3228.
- Bettstetter, M., Woenkhaus, M., Wild, P. J., Rummele, P., Blaszyk, H., Hartmann, A., Hofstadter, F., and Dietmaier, W. (2005). Elevated nuclear maspin expression is associated with microsatellite instability and high tumour grade in colorectal cancer. *J Pathol* 205, 606-614.
- Bird, A. P., and Wolffe, A. P. (1999). Methylation-induced repression--belts, braces, and chromatin. *Cell* 99, 451-454.
- Blandamura, S., Giacomelli, L., Leo, G., Segato, P., and Ninfo, V. (2006). Nuclear maspin detection in renal cell tumours: possible diagnostic role and correlation with p53 status. *Histopathology* 49, 274-282.
- Boland, C. R., Thibodeau, S. N., Hamilton, S. R., Sidransky, D., Eshleman, J. R., Burt, R. W., Meltzer, S. J., Rodriguez-Bigas, M. A., Fodde, R., Ranzani, G. N., and Srivastava, S. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58, 5248-5257.
- Boltze, C. (2005). Loss of maspin is a helpful prognosticator in colorectal cancer: a tissue microarray analysis. *Pathol Res Pract* 200, 783-790.
- Boltze, C., Schneider-Stock, R., Meyer, F., Peters, B., Quednow, C., Hoang-Vu, C., and Roessner, A. (2003a). Maspin in thyroid cancer: its relationship with p53 and clinical outcome. *Oncol Rep* 10, 1783-1787.
- Boltze, C., Schneider-Stock, R., Quednow, C., Hinze, R., Mawrin, C., Hribaschek, A., Roessner, A., and Hoang-Vu, C. (2003b). Silencing of the maspin gene by promoter hypermethylation in thyroid cancer. *Int J Mol Med* 12, 479-484.
- Bronner, C. E., Baker, S. M., Morrison, P. T., Warren, G., Smith, L. G., Lescoe, M. K., Kane, M., Earabino, C., Lipford, J., Lindblom, A., and et al. (1994). Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 368, 258-261.
- Bruce, J. L., Hurford, R. K., Jr., Classon, M., Koh, J., and Dyson, N. (2000). Requirements for cell cycle arrest by p16INK4a. *Mol Cell* 6, 737-742.
- Cahill, D. P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 392, 300-303.
- Calvert, P. M., and Frucht, H. (2002). The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med* 137, 603-612.
- Cao, D., Zhang, Q., Wu, L. S., Salaria, S. N., Winter, J. W., Hruban, R. H., Goggins, M. S., Abbruzzese, J. L., Maitra, A., and Ho, L. (2007). Prognostic significance of maspin in pancreatic ductal adenocarcinoma: tissue microarray analysis of 223 surgically resected cases. *Mod Pathol* 20, 570-578.
- Cella, N., Contreras, A., Latha, K., Rosen, J. M., and Zhang, M. (2006). Maspin is physically associated with [beta]1 integrin regulating cell adhesion in mammary epithelial cells. *Faseb J* 20, 1510-1512.
- Cheah, M. S., Wallace, C. D., and Hoffman, R. M. (1984). Hypomethylation of DNA in human cancer cells: a site-specific change in the c-myc oncogene. *J Natl Cancer Inst* 73, 1057-1065.
- Chen, T. R., Hay, R. J., and Macy, M. L. (1983). Intercellular karyotypic similarity in near-diploid cell lines of human tumor origins. *Cancer Genet Cytogenet* 10, 351-362.
- Cher, M. L., Biliran, H. R., Jr., Bhagat, S., Meng, Y., Che, M., Lockett, J., Abrams, J., Fridman, R., Zachareas, M., and Sheng, S. (2003). Maspin expression inhibits osteolysis, tumor growth, and angiogenesis in a model of prostate cancer bone metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 7847-7852.
- Colella, S., Shen, L., Baggerly, K. A., Issa, J. P., and Krahe, R. (2003). Sensitive and quantitative universal Pyrosequencing methylation analysis of CpG sites. *Biotechniques* 35, 146-150.
- Collins, H. M., Morris, T. M., and Watson, S. A. (2001). Spectrum of matrix metalloproteinase expression in primary and metastatic colon cancer: relationship to the tissue inhibitors of metalloproteinases and membrane type-1-matrix metalloproteinase. *Br J Cancer* 84, 1664-1670.
- Cui, H., Cruz-Correa, M., Giardiello, F. M., Hutcheon, D. F., Kafonek, D. R., Brandenburg, S., Wu, Y., He, X., Powe, N. R., and Feinberg, A. P. (2003). Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 299, 1753-1755.
- Cunningham, J. M., Christensen, E. R., Tester, D. J., Kim, C. Y., Roche, P. C., Burgart, L. J., and Thibodeau, S. N. (1998). Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 58, 3455-3460.
- Deng, G., Bell, I., Crawley, S., Gum, J., Terdiman, J. P., Allen, B. A., Truta, B., Sleisenger, M. H., and Kim, Y. S. (2004). BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 10, 191-195.
- Deng, G., Chen, A., Hong, J., Chae, H. S., and Kim, Y. S. (1999). Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res* 59, 2029-2033.

- Denk, A. E., Bettstetter, M., Wild, P. J., Hoek, K., Bataille, F., Dietmaier, W., and Bosserhoff, A. K. (2007). Loss of maspin expression contributes to a more invasive potential in malignant melanoma. *Pigment Cell Res* 20, 112-119.
- Dietmaier, W., Bettstetter, M., Wild, P. J., Woenckhaus, M., Rummele, P., Hartmann, A., Dechant, S., Blaszyk, H., Pauer, A., Klinkhammer-Schalke, M., and Hofstadter, F. (2006). Nuclear Maspin expression is associated with response to adjuvant 5-fluorouracil based chemotherapy in patients with stage III colon cancer. *Int J Cancer* 118, 2247-2254.
- Dobrovic, A., and Simpfendorfer, D. (1997). Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res* 57, 3347-3350.
- Domann, F. E., Rice, J. C., Hendrix, M. J., and Futscher, B. W. (2000). Epigenetic silencing of maspin gene expression in human breast cancers. *Int J Cancer* 85, 805-810.
- Domingo, E., Laiho, P., Ollikainen, M., Pinto, M., Wang, L., French, A. J., Westra, J., Frebourg, T., Espin, E., Armengol, M., *et al.* (2004). BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 41, 664-668.
- Domingo, E., Niessen, R. C., Oliveira, C., Alhopuro, P., Moutinho, C., Espin, E., Armengol, M., Sijmons, R. H., Kleibeuker, J. H., Seruca, R., *et al.* (2005). BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene* 24, 3995-3998.
- Drewinko, B., Yang, L. Y., Barlogie, B., Romsdahl, M., Meistrich, M., Malahy, M. A., and Giovannella, B. (1978). Further biologic characteristics of a human carcinoembryonic antigen-producing colon carcinoma cell line. *J Natl Cancer Inst* 61, 75-83.
- Eads, C. A., Danenberg, K. D., Kawakami, K., Saltz, L. B., Blake, C., Shibata, D., Danenberg, P. V., and Laird, P. W. (2000). MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. *Nucleic Acids Res* 28, E32.
- Esteller, M., Fraga, M. F., Guo, M., Garcia-Foncillas, J., Hedenfalk, I., Godwin, A. K., Trojan, J., Vaurs-Barriere, C., Bignon, Y. J., Ramus, S., *et al.* (2001). DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 10, 3001-3007.
- Esteller, M., Garcia-Foncillas, J., Andion, E., Goodman, S. N., Hidalgo, O. F., Vanaclocha, V., Baylin, S. B., and Herman, J. G. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343, 1350-1354.
- Fearon, E. R., and Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-767.
- Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., and Boyle, P. (2007). Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. *Ann Oncol* 18, 581-592.
- Fishel, R., Lescoe, M. K., Rao, M. R., Copeland, N. G., Jenkins, N. A., Garber, J., Kane, M., and Kolodner, R. (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75, 1027-1038.
- Fitzgerald, M., Oshiro, M., Holtan, N., Krager, K., Cullen, J. J., Futscher, B. W., and Domann, F. E. (2003). Human pancreatic carcinoma cells activate maspin expression through loss of epigenetic control. *Neoplasia* 5, 427-436.
- Fodde, R., Smits, R., and Clevers, H. (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 1, 55-67.
- Fogh, J., Fogh, J. M., and Orfeo, T. (1977). One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice. *J Natl Cancer Inst* 59, 221-226.
- Futscher, B. W., Oshiro, M. M., Wozniak, R. J., Holtan, N., Hanigan, C. L., Duan, H., and Domann, F. E. (2002). Role for DNA methylation in the control of cell type specific maspin expression. *Nat Genet* 31, 175-179.
- Gao, F., Shi, H. Y., Daughy, C., Cella, N., and Zhang, M. (2004). Maspin plays an essential role in early embryonic development. *Development* 131, 1479-1489.
- Gazzoli, I., Loda, M., Garber, J., Syngal, S., and Kolodner, R. D. (2002). A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* 62, 3925-3928.
- Gonzaga, P. E., and Brent, T. P. (1989). Affinity purification and characterization of human O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase complexed with BCNU-treated, synthetic oligonucleotide. *Nucleic Acids Res* 17, 6581-6590.
- Graves, R. J., Li, B. F., and Swann, P. F. (1987). Repair of synthetic oligonucleotides containing O6-methylguanine, O6-ethylguanine and O4-methylthymine, by O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *IARC Sci Publ*, 41-43.
- Greger, V., Debus, N., Lohmann, D., Hopping, W., Passarge, E., and Horsthemke, B. (1994). Frequency and parental origin of hypermethylated RB1 alleles in retinoblastoma. *Hum Genet* 94, 491-496.
- Hirai, K., Koizumi, K., Haraguchi, S., Hirata, T., Mikami, I., Fukushima, M., Yamagishi, S., Kawashima, T., Okada, D., Shimizu, K., and Kawamoto, M. (2005). Prognostic significance of the tumor suppressor gene maspin in non-small cell lung cancer. *Ann Thorac Surg* 79, 248-253.
- Hitchins, M., Williams, R., Cheong, K., Halani, N., Lin, V. A., Packham, D., Ku, S., Buckle, A., Hawkins, N., Burn, J., *et al.* (2005). MLH1 germline epimutations as a factor in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 129, 1392-1399.
- Hoyo, T., Akiyama, Y., Nagasaki, K., Maruyama, K., Kikuchi, K., Ikeda, T., Kitajima, M., and Yamaguchi, K. (2001). Association of maspin expression with the malignancy grade and tumor vascularization in breast cancer tissues. *Cancer Lett* 171, 103-110.
- Ionov, Y., Peinado, M. A., Malkhosyan, S., Shibata, D., and Perucho, M. (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for clonic carcinogenesis. *Nature* 363, 558-561.
- Ishikawa, F., Miyazono, K., Hellman, U., Drexler, H., Wernstedt, C., Hagiwara, K., Usuki, K., Takaku, F., Risau, W., and Heldin, C. H. (1989). Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 338, 557-562.
- Ito, R., Nakayama, H., Yoshida, K., Oda, N., and Yasui, W. (2004a). Loss of maspin expression is associated with development and progression of gastric carcinoma with p53 abnormality. *Oncol Rep* 12, 985-990.
- Ito, Y., Yoshida, H., Tomoda, C., Uruno, T., Takamura, Y., Miya, A., Kobayashi, K., Matsuzuka, F., Matsuura, N., Kuma, K., and Miyauchi, A. (2004b). Maspin expression is directly associated with biological aggressiveness of thyroid carcinoma. *Thyroid* 14, 13-18.
- Jass, J. R. (1995). Colorectal adenoma progression and genetic change: is there a link? *Ann Med* 27, 301-306.
- Jass, J. R., and Stewart, S. M. (1992). Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 33, 783-786.
- Jiang, N., Meng, Y., Zhang, S., Mensah-Osman, E., and Sheng, S. (2002). Maspin sensitizes breast carcinoma cells to induced apoptosis. *Oncogene* 21, 4089-4098.
- Jones, P. A., and Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 3, 415-428.
- Kadiyska, T. K., Konstantinova, D. V., Atanasov, V. R., Kremensky, I. M., and Mitev, V. I. (2007). Frequency and application of the hot spot BRAF gene mutation (p.V600E) in the diagnostic strategy for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Cancer Detect Prev*.
- Kane, M. F., Loda, M., Gaida, G. M., Lipman, J., Mishra, R., Goldman, H., Jessup, J. M., and Kolodner, R. (1997). Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 57, 808-811.
- Karpf, A. R., and Matsui, S. (2005). Genetic disruption of cytosine DNA methyltransferase enzymes induces chromosomal instability in human cancer cells. *Cancer Res* 65, 8635-8639.
- Katakura, H., Takenaka, K., Nakagawa, M., Sonobe, M., Adachi, M., Ito, S., Wada, H., and Tanaka, F. (2006). Maspin gene expression is a significant prognostic factor in resected non-small cell lung cancer (NSCLC). Maspin in NSCLC. *Lung Cancer* 51, 323-328.
- Katz, A. B., and Taichman, L. B. (1999). A partial catalog of proteins secreted by epidermal keratinocytes in culture. *J Invest Dermatol* 112, 818-821.

- Khalkhali-Ellis, Z., and Hendrix, M. J. (2007). Elucidating the function of secreted maspin: inhibiting cathepsin D-mediated matrix degradation. *Cancer Res* 67, 3535-3539.
- Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature* 386, 761, 763.
- Laird, P. W., and Jaenisch, R. (1996). The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet* 30, 441-464.
- Law, R. H., Irving, J. A., Buckle, A. M., Ruzyla, K., Buzza, M., Bashtannyk-Puhhalovich, T. A., Beddoe, T. C., Nguyen, K., Worrall, D. M., Bottomley, S. P., *et al.* (2005). The high resolution crystal structure of the human tumor suppressor maspin reveals a novel conformational switch in the G-helix. *J Biol Chem* 280, 22356-22364.
- Le, P. U., Nguyen, T. N., Drolet-Savoie, P., Leclerc, N., and Nabi, I. R. (1998). Increased beta-actin expression in an invasive moloney sarcoma virus-transformed MDCK cell variant concentrates to the tips of multiple pseudopodia. *Cancer Res* 58, 1631-1635.
- Leach, F. S., Nicolaides, N. C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomaki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L. A., Nystrom-Lahti, M., and *et al.* (1993). Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75, 1215-1225.
- Lee, M. J., Suh, C. H., and Li, Z. H. (2006). Clinicopathological significance of maspin expression in breast cancer. *J Korean Med Sci* 21, 309-314.
- Leibovitz, A., Stinson, J. C., McCombs, W. B., 3rd, McCoy, C. E., Mazur, K. C., and Mabry, N. D. (1976). Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* 36, 4562-4569.
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643-649.
- Li, H. W., Leung, S. W., Chan, C. S., Yu, M. M., and Wong, Y. F. (2007). Expression of maspin in endometrioid adenocarcinoma of endometrium. *Oncol Rep* 17, 393-398.
- Li, Z., Shi, H. Y., and Zhang, M. (2005). Targeted expression of maspin in tumor vasculatures induces endothelial cell apoptosis. *Oncogene* 24, 2008-2019.
- Liabakk, N. B., Talbot, I., Smith, R. A., Wilkinson, K., and Balkwill, F. (1996). Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) type IV collagenases in colorectal cancer. *Cancer Res* 56, 190-196.
- Lim, Y. J., Lee, J. K., Jang, W. Y., Song, S. Y., Lee, K. T., Paik, S. W., and Rhee, J. C. (2004). Prognostic significance of maspin in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Korean J Intern Med* 19, 15-18.
- Liu, B., Nicolaides, N. C., Markowitz, S., Willson, J. K., Parsons, R. E., Jen, J., Papadopoulos, N., Peltomaki, P., de la Chapelle, A., Hamilton, S. R., and *et al.* (1995). Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet* 9, 48-55.
- Liu, J., Yin, S., Reddy, N., Spencer, C., and Sheng, S. (2004). Bax mediates the apoptosis-sensitizing effect of maspin. *Cancer Res* 64, 1703-1711.
- Lonardo, F., Li, X., Siddiq, F., Singh, R., Al-Abbadi, M., Pass, H. I., and Sheng, S. (2006). Maspin nuclear localization is linked to favorable morphological features in pulmonary adenocarcinoma. *Lung Cancer* 51, 31-39.
- Loughrey, M. B., Waring, P. M., Tan, A., Trivett, M., Kovalenko, S., Beshay, V., Young, M. A., McArthur, G., Boussioutas, A., and Dobrovic, A. (2007). Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Fam Cancer* 6, 301-310.
- Lynch, H. T. (1999). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cytogenet Cell Genet* 86, 130-135.
- Lynch, H. T., Boland, C. R., Gong, G., Shaw, T. G., Lynch, P. M., Fodde, R., Lynch, J. F., and de la Chapelle, A. (2006). Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. *Eur J Hum Genet* 14, 390-402.
- Lynch, H. T., and de la Chapelle, A. (2003). Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 348, 919-932.
- Lynch, H. T., Shaw, M. W., Magnuson, C. W., Larsen, A. L., and Krush, A. J. (1966). Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med* 117, 206-212.
- Lynch, H. T., and Smyrk, T. (1996). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. *Cancer* 78, 1149-1167.
- Maass, N., Hojo, T., Rosel, F., Ikeda, T., Jonat, W., and Nagasaki, K. (2001a). Down regulation of the tumor suppressor gene maspin in breast carcinoma is associated with a higher risk of distant metastasis. *Clin Biochem* 34, 303-307.
- Maass, N., Teffner, M., Rosel, F., Pawaresch, R., Jonat, W., Nagasaki, K., and Rudolph, P. (2001b). Decline in the expression of the serine proteinase inhibitor maspin is associated with tumour progression in ductal carcinomas of the breast. *J Pathol* 195, 321-326.
- Maeda, K., Chung, Y. S., Ogawa, Y., Takatsuka, S., Kang, S. M., Ogawa, M., Sawada, T., Onoda, N., Kato, Y., and Sowa, M. (1996). Thymidine phosphorylase/platelet-derived endothelial cell growth factor expression associated with hepatic metastasis in gastric carcinoma. *Br J Cancer* 73, 884-888.
- Maesawa, C., Ogasawara, S., Yashima-Abo, A., Kimura, T., Kotani, K., Masuda, S., Nagata, Y., Iwaya, T., Suzuki, K., Oyake, T., *et al.* (2006). Aberrant maspin expression in gallbladder epithelium is associated with intestinal metaplasia in patients with cholelithiasis. *J Clin Pathol* 59, 328-330.
- Marioni, G., Blandamura, S., Giacomelli, L., Calgaro, N., Segato, P., Leo, G., Fischetto, D., Staffieri, A., and de Filippis, C. (2005). Nuclear expression of maspin is associated with a lower recurrence rate and a longer disease-free interval after surgery for squamous cell carcinoma of the larynx. *Histopathology* 46, 576-582.
- Marioni, G., D'Alessandro, E., Giacomelli, L., De Filippis, C., Calgaro, N., Sari, M., Staffieri, A., and Blandamura, S. (2006). Maspin nuclear localization is related to reduced density of tumour-associated micro-vessels in laryngeal carcinoma. *Anticancer Res* 26, 4927-4932.
- Maulik, N., and Das, D. K. (2002). Redox signaling in vascular angiogenesis. *Free Radic Biol Med* 33, 1047-1060.
- McGivern, A., Wynter, C. V., Whitehall, V. L., Kambara, T., Spring, K. J., Walsh, M. D., Barker, M. A., Arnold, S., Simms, L. A., Leggett, B. A., *et al.* (2004). Promoter hypermethylation frequency and BRAF mutations distinguish hereditary non-polyposis colon cancer from sporadic MSI-H colon cancer. *Fam Cancer* 3, 101-107.
- Mhaweche-Fauceglia, P., Dulguerov, P., Beck, A., Bonet, M., and Allal, A. S. (2007). Value of ezrin, maspin and nm23-H1 protein expressions in predicting outcome of patients with head and neck squamous-cell carcinoma treated with radical radiotherapy. *J Clin Pathol* 60, 185-189.
- Miyakura, Y., Sugano, K., Akasu, T., Yoshida, T., Maekawa, M., Saitoh, S., Sasaki, H., Nomizu, T., Konishi, F., Fujita, S., *et al.* (2004). Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2, 147-156.
- Murai, S., Maesawa, C., Masuda, T., and Sugiyama, T. (2006). Aberrant maspin expression in human endometrial cancer. *Cancer Sci* 97, 883-888.
- Nakagawa, M., Katakura, H., Adachi, M., Takenaka, K., Yanagihara, K., Otake, Y., Wada, H., and Tanaka, F. (2006). Maspin expression and its clinical significance in non-small cell lung cancer. *Ann Surg Oncol* 13, 1517-1523.
- Nakashima, D., Uzawa, K., Kasamatsu, A., Koike, H., Endo, Y., Saito, K., Hashitani, S., Numata, T., Urade, M., and Tanzawa, H. (2006). Protein expression profiling identifies maspin and stathmin as potential biomarkers of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Int J Cancer* 118, 704-713.
- Navarro Rde, L., Martins, M. T., and de Araujo, V. C. (2004). Maspin expression in normal and neoplastic salivary gland. *J Oral Pathol Med* 33, 435-440.

- Ngamkitidechakul, C., Burke, J. M., O'Brien, W. J., and Twining, S. S. (2001). Maspin: synthesis by human cornea and regulation of in vitro stromal cell adhesion to extracellular matrix. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42, 3135-3141.
- Ngamkitidechakul, C., Warejcka, D. J., Burke, J. M., O'Brien, W. J., and Twining, S. S. (2003). Sufficiency of the reactive site loop of maspin for induction of cell-matrix adhesion and inhibition of cell invasion. Conversion of ovalbumin to a maspin-like molecule. *J Biol Chem* 278, 31796-31806.
- Odero-Marrah, V. A., Khalkhali-Ellis, Z., Chunthapong, J., Amir, S., Seftor, R. E., Seftor, E. A., and Hendrix, M. J. (2003). Maspin regulates different signaling pathways for motility and adhesion in aggressive breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 2, 398-403.
- Ogasawara, S., Maesawa, C., Yamamoto, M., Akiyama, Y., Wada, K., Fujisawa, K., Higuchi, T., Tomisawa, Y., Sato, N., Endo, S., et al. (2004). Disruption of cell-type-specific methylation at the Maspin gene promoter is frequently involved in undifferentiated thyroid cancers. *Oncogene* 23, 1117-1124.
- Ohike, N., Maass, N., Mundhenke, C., Biallek, M., Zhang, M., Jonat, W., Luttes, J., Morohoshi, T., Kloppel, G., and Nagasaki, K. (2003). Clinicopathological significance and molecular regulation of maspin expression in ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Cancer Lett* 199, 193-200.
- Papadopoulos, N., Nicolaides, N. C., Wei, Y. F., Ruben, S. M., Carter, K. C., Rosen, C. A., Haseltine, W. A., Fleischmann, R. D., Fraser, C. M., Adams, M. D., and et al. (1994). Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 263, 1625-1629.
- Paz, M. F., Yaya-Tur, R., Rojas-Marcos, I., Reynes, G., Pollan, M., Aguirre-Cruz, L., Garcia-Lopez, J. L., Piquer, J., Safont, M. J., Balana, C., et al. (2004). CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas. *Clin Cancer Res* 10, 4933-4938.
- Pemberton, P. A., Tipton, A. R., Pavloff, N., Smith, J., Erickson, J. R., Mouchabeck, Z. M., and Kiefer, M. C. (1997). Maspin is an intracellular serpin that partitions into secretory vesicles and is present at the cell surface. *J Histochem Cytochem* 45, 1697-1706.
- Pemberton, P. A., Wong, D. T., Gibson, H. L., Kiefer, M. C., Fitzpatrick, P. A., Sager, R., and Barr, P. J. (1995). The tumor suppressor maspin does not undergo the stressed to relaxed transition or inhibit trypsin-like serine proteases. Evidence that maspin is not a protease inhibitory serpin. *J Biol Chem* 270, 15832-15837.
- Perquin, M., Oster, T., Maul, A., Froment, N., Untereiner, M., and Bagrel, D. (2000). The glutathione-related detoxification pathway in the human breast: a highly coordinated system disrupted in the tumour tissues. *Cancer Lett* 158, 7-16.
- Peters, G. J., Laurensse, E., Leyva, A., and Pinedo, H. M. (1987). Purine nucleosides as cell-specific modulators of 5-fluorouracil metabolism and cytotoxicity. *Eur J Cancer Clin Oncol* 23, 1869-1881.
- Petko, Z., Ghiassi, M., Shuber, A., Gorham, J., Smalley, W., Washington, M. K., Schultenover, S., Gautam, S., Markowitz, S. D., and Grady, W. M. (2005). Aberrantly methylated CDKN2A, MGMT, and MLH1 in colon polyps and in fecal DNA from patients with colorectal polyps. *Clin Cancer Res* 11, 1203-1209.
- Pinedo, H. M., and Peters, G. F. (1988). Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 6, 1653-1664.
- Plass, C. (2002). Cancer epigenomics. *Hum Mol Genet* 11, 2479-2488.
- Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235-237.
- Raedle, J., Trojan, J., Brieger, A., Weber, N., Schafer, D., Plotz, G., Staib-Sebler, E., Kriener, S., Lorenz, M., and Zeuzem, S. (2001). Bethesda guidelines: relation to microsatellite instability and MLH1 promoter methylation in patients with colorectal cancer. *Ann Intern Med* 135, 566-576.
- Rand, K., Qu, W., Ho, T., Clark, S. J., and Molloy, P. (2002). Conversion-specific detection of DNA methylation using real-time polymerase chain reaction (ConLight-MSP) to avoid false positives. *Methods* 27, 114-120.
- Reis-Filho, J. S., Torio, B., Albergaria, A., and Schmitt, F. C. (2002). Maspin expression in normal skin and usual cutaneous carcinomas. *Virchows Arch* 441, 551-558.
- Robertson, K. D., and Wolffe, A. P. (2000). DNA methylation in health and disease. *Nat Rev Genet* 1, 11-19.
- Rodriguez-Bigas, M. A., Boland, C. R., Hamilton, S. R., Henson, D. E., Jass, J. R., Khan, P. M., Lynch, H., Perucho, M., Smyrk, T., Sobin, L., and Srivastava, S. (1997). A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 89, 1758-1762.
- Roeb, E., Arndt, M., Jansen, B., Schumpelick, V., and Matern, S. (2004). Simultaneous determination of matrix metalloproteinase (MMP)-7, MMP-1, -3, and -13 gene expression by multiplex PCR in colorectal carcinomas. *Int J Colorectal Dis* 19, 518-524.
- Rose, S. L., Fitzgerald, M. P., White, N. O., Hitchler, M. J., Futscher, B. W., De Geest, K., and Domann, F. E. (2006). Epigenetic regulation of maspin expression in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 102, 319-324.
- Sager, R., Sheng, S., Anisowicz, A., Sotiropoulou, G., Zou, Z., Stenman, G., Swisshelm, K., Chen, Z., Hendrix, M. J., Pemberton, P., and et al. (1994). RNA genetics of breast cancer: maspin as paradigm. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 59, 537-546.
- Sambrook, J., et al. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Press: New York, 1.
- Schroy, P. C., 3rd, Brown-Shimer, S., Kim, K., Johnson, K. A., Murnane, M. J., Yang, S., O'Brien, M. J., Carney, W. P., and Kupchik, H. Z. (1995). Detection of p21ras mutations in colorectal adenomas and carcinomas by enzyme-linked immunosorbent assay. *Cancer* 76, 201-209.
- Secord, A. A., Lee, P. S., Darcy, K. M., Havrilesky, L. J., Grace, L. A., Marks, J. R., and Berchuck, A. (2006). Maspin expression in epithelial ovarian cancer and associations with poor prognosis: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 101, 390-397.
- Seftor, R. E., Seftor, E. A., Sheng, S., Pemberton, P. A., Sager, R., and Hendrix, M. J. (1998). maspin suppresses the invasive phenotype of human breast carcinoma. *Cancer Res* 58, 5681-5685.
- Shen, L., Kondo, Y., Rosner, G. L., Xiao, L., Hernandez, N. S., Vilaythong, J., Houlihan, P. S., Krouse, R. S., Prasad, A. R., Einspahr, J. G., et al. (2005). MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 97, 1330-1338.
- Sheng, S., Carey, J., Seftor, E. A., Dias, L., Hendrix, M. J., and Sager, R. (1996). Maspin acts at the cell membrane to inhibit invasion and motility of mammary and prostatic cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11669-11674.
- Sheng, S., Pemberton, P. A., and Sager, R. (1994). Production, purification, and characterization of recombinant maspin proteins. *J Biol Chem* 269, 30988-30993.
- Shi, H. Y., Liang, R., Templeton, N. S., and Zhang, M. (2002). Inhibition of breast tumor progression by systemic delivery of the maspin gene in a syngeneic tumor model. *Mol Ther* 5, 755-761.
- Shi, H. Y., Zhang, W., Liang, R., Abraham, S., Kittrell, F. S., Medina, D., and Zhang, M. (2001). Blocking tumor growth, invasion, and metastasis by maspin in a syngeneic breast cancer model. *Cancer Res* 61, 6945-6951.
- Shiozawa, J., Ito, M., Nakayama, T., Nakashima, M., Kohno, S., and Sekine, I. (2000). Expression of matrix metalloproteinase-1 in human colorectal carcinoma. *Mod Pathol* 13, 925-933.
- Solomon, L. A., Munkarah, A. R., Schimp, V. L., Arabi, M. H., Morris, R. T., Nassar, H., and Ali-Fehmi, R. (2006). Maspin expression and localization impact on angiogenesis and prognosis in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 101, 385-389.
- Son, H. J., Sohn, T. S., Song, S. Y., Lee, J. H., and Rhee, J. C. (2002). Maspin expression in human gastric adenocarcinoma. *Pathol Int* 52, 508-513.
- Song, S. Y., Lee, S. K., Kim, D. H., Son, H. J., Kim, H. J., Lim, Y. J., Lee, W. Y., Chun, H. K., and Rhee, J. C. (2002). Expression of maspin in colon cancers: its relationship with p53 expression and microvessel density. *Dig Dis Sci* 47, 1831-1835.

- Sood, A. K., Fletcher, M. S., Gruman, L. M., Coffin, J. E., Jabbari, S., Khalkhali-Ellis, Z., Arbour, N., Seftor, E. A., and Hendrix, M. J. (2002). The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma. *Clin Cancer Res* 8, 2924-2932.
- Sopel, M., Kasprzyk, I., and Berdowska, I. (2005). Maspin and c-erbB-2 expression in correlation with microvessel density in invasive ductal breast cancer. *Folia Histochem Cytobiol* 43, 109-116.
- Souliotis, V. L., Boussiotis, V. A., Pangalis, G. A., and Kyrtopoulos, S. A. (1991). In vivo formation and repair of O6-methylguanine in human leukocyte DNA after intravenous exposure to dacarbazine. *Carcinogenesis* 12, 285-288.
- Sugimoto, S., Maass, N., Takimoto, Y., Sato, K., Minei, S., Zhang, M., Hoshikawa, Y., Junemann, K. P., Jonat, W., and Nagasaki, K. (2004). Expression and regulation of tumor suppressor gene maspin in human bladder cancer. *Cancer Lett* 203, 209-215.
- Surowiak, P., Materna, V., Drag-Zalesinska, M., Wojnar, A., Kaplenko, I., Spaczynski, M., Dietel, M., Zabel, M., and Lage, H. (2006). Maspin expression is characteristic for cisplatin-sensitive ovarian cancer cells and for ovarian cancer cases of longer survival rates. *Int J Gynecol Pathol* 25, 131-139.
- Suter, C. M., Martin, D. I., and Ward, R. L. (2004). Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet* 36, 497-501.
- Takahashi, Y., Bucana, C. D., Akagi, Y., Liu, W., Cleary, K. R., Mai, M., and Ellis, L. M. (1998). Significance of platelet-derived endothelial cell growth factor in the angiogenesis of human gastric cancer. *Clin Cancer Res* 4, 429-434.
- Terashima, M., Maesawa, C., Oyama, K., Ohtani, S., Akiyama, Y., Ogasawara, S., Takagane, A., Saito, K., Masuda, T., Kanzaki, N., *et al.* (2005). Gene expression profiles in human gastric cancer: expression of maspin correlates with lymph node metastasis. *Br J Cancer* 92, 1130-1136.
- Thibodeau, S. N., Bren, G., and Schaid, D. (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260, 816-819.
- Thibodeau, S. N., French, A. J., Cunningham, J. M., Tester, D., Burgart, L. J., Roche, P. C., McDonnell, S. K., Schaid, D. J., Vockley, C. W., Michels, V. V., *et al.* (1998). Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of hMLH1. *Cancer Res* 58, 1713-1718.
- Thomassin, H., Kress, C., and Grange, T. (2004). MethylQuant: a sensitive method for quantifying methylation of specific cytosines within the genome. *Nucleic Acids Res* 32, e168.
- Umar, A., Boland, C. R., Terdiman, J. P., Syngal, S., de la Chapelle, A., Ruschoff, J., Fishel, R., Lindor, N. M., Burgart, L. J., Hamelin, R., *et al.* (2004a). Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 96, 261-268.
- Umar, A., Risinger, J. I., Hawk, E. T., and Barrett, J. C. (2004b). Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 4, 153-158.
- Umekita, Y., Ohi, Y., Sagara, Y., and Yoshida, H. (2002). Expression of maspin predicts poor prognosis in breast-cancer patients. *Int J Cancer* 100, 452-455.
- Umekita, Y., Souda, M., and Yoshida, H. (2006). Expression of maspin in colorectal cancer. *In Vivo* 20, 797-800.
- Umekita, Y., and Yoshida, H. (2003). Expression of maspin is up-regulated during the progression of mammary ductal carcinoma. *Histopathology* 42, 541-545.
- Vasen, H. F., Mecklin, J. P., Khan, P. M., and Lynch, H. T. (1991). The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 34, 424-425.
- Vasen, H. F., Watson, P., Mecklin, J. P., and Lynch, H. T. (1999). New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116, 1453-1456.
- Vasen, H. F., Wijnen, J. T., Menko, F. H., Kleibeuker, J. H., Taal, B. G., Griffioen, G., Nagengast, F. M., Meijers-Heijboer, E. H., Bertario, L., Varesco, L., *et al.* (1996). Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 110, 1020-1027.
- Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M., and Bos, J. L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525-532.
- von Kleist, S., Chany, E., Burtin, P., King, M., and Fogh, J. (1975). Immunohistology of the antigenic pattern of a continuous cell line from a human colon tumor. *J Natl Cancer Inst* 55, 555-560.
- Wada, K., Maesawa, C., Akasaka, T., and Masuda, T. (2004). Aberrant expression of the maspin gene associated with epigenetic modification in melanoma cells. *J Invest Dermatol* 122, 805-811.
- Wang, L., Cunningham, J. M., Winters, J. L., Guenther, J. C., French, A. J., Boardman, L. A., Burgart, L. J., McDonnell, S. K., Schaid, D. J., and Thibodeau, S. N. (2003). BRAF mutations in colon cancer are not likely attributable to defective DNA mismatch repair. *Cancer Res* 63, 5209-5212.
- Wang, M. C., Yang, Y. M., Li, X. H., Dong, F., and Li, Y. (2004). Maspin expression and its clinicopathological significance in tumorigenesis and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 10, 634-637.
- Watson, P., and Lynch, H. T. (1994). The tumor spectrum in HNPCC. *Anticancer Res* 14, 1635-1639.
- Woenckhaus, M., Bubendorf, L., Dalquen, P., Foerster, J., Blaszyk, H., Mirlacher, M., Soler, M., Dietmaier, W., Sauter, G., Hartmann, A., and Wild, P. J. (2007). Nuclear and cytoplasmic Maspin expression in primary non-small cell lung cancer. *J Clin Pathol* 60, 483-486.
- Yamamoto, H., Itoh, F., Hinoda, Y., and Imai, K. (1995). Suppression of matrilysin inhibits colon cancer cell invasion in vitro. *Int J Cancer* 61, 218-222.
- Yasumatsu, R., Nakashima, T., Hirakawa, N., Kumamoto, Y., Kuratomi, Y., Tomita, K., and Komiyama, S. (2001). Maspin expression in stage I and II oral tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck* 23, 962-966.
- Ye, C., Shrubsole, M. J., Cai, Q., Ness, R., Grady, W. M., Smalley, W., Cai, H., Washington, K., and Zheng, W. (2006). Promoter methylation status of the MGMT, hMLH1, and CDKN2A/p16 genes in non-neoplastic mucosa of patients with and without colorectal adenomas. *Oncol Rep* 16, 429-435.
- Yin, S., Li, X., Meng, Y., Finley, R. L., Jr., Sakr, W., Yang, H., Reddy, N., and Sheng, S. (2005). Tumor-suppressive maspin regulates cell response to oxidative stress by direct interaction with glutathione S-transferase. *J Biol Chem* 280, 34985-34996.
- Yoshimoto, M., Itoh, F., Yamamoto, H., Hinoda, Y., Imai, K., and Yachi, A. (1993). Expression of MMP-7(PUMP-1) mRNA in human colorectal cancers. *Int J Cancer* 54, 614-618.
- Yu, M., Zheng, H., Tsuneyama, K., Takahashi, H., Nomoto, K., Xu, H., and Takano, Y. (2007). Paradoxical expression of maspin in gastric carcinomas: correlation with carcinogenesis and progression. *Hum Pathol*.
- Zhang, M., Volpert, O., Shi, Y. H., and Bouck, N. (2000). Maspin is an angiogenesis inhibitor. *Nat Med* 6, 196-199.
- Zheng, H., Tsuneyama, K., Cheng, C., Takahashi, H., Cui, Z., Murai, Y., Nomoto, K., and Takano, Y. (2007). Maspin expression was involved in colorectal adenoma-adenocarcinoma sequence and liver metastasis of tumors. *Anticancer Res* 27, 259-265.
- Zheng, H. C., Wang, M. C., Li, J. Y., Yang, X. F., Sun, J. M., and Xin, Y. (2004). Expression of maspin and kail1 and their clinicopathological significance in carcinogenesis and progression of gastric cancer. *Chin Med Sci J* 19, 193-198.
- Zou, Z., Anisowicz, A., Hendrix, M. J., Thor, A., Neveu, M., Sheng, S., Rafidi, K., Seftor, E., and Sager, R. (1994). Maspin, a serpin with tumor-suppressing activity in human mammary epithelial cells. *Science* 263, 526-529.

Danksagungen

Nachfolgend möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während dieser Arbeit unterstützt haben.

Ganz besonders herzlich bedanken will ich mich bei PD. Dr. Wolfgang Dietmaier für die engagierte Betreuung dieser Arbeit. Ich danke Dir für ein immerzu offenes Ohr, die ständige Diskussionsbereitschaft und den Freiraum, den Du mir bei meiner Arbeit gewährt hast.

Mein besonderer Dank gilt auch meinem Doktorvater Prof. Dr. Stephan Schneuwly für die bereitwillige Betreuung meiner Doktorarbeit an der naturwissenschaftlichen Fakultät.

Vielen Dank an Herrn Prof. Dr. Ferdinand Hofstädter für die Möglichkeit diese Arbeit am Institut für Pathologie am Klinikum der Universität Regensburg durchführen zu können und auch für die finanzielle Unterstützung bei Fortbildungen.

Ein ganz großes Dankeschön geht an die gesamte AG Dietmaier für die vielen Hilfen bei den Arbeiten.

Dabei gilt mein ganz besonderer Dank vor allem Irene! Die hohe Qualität Deiner Arbeit und Dein „Mitdenken“ waren stets eine sehr große Hilfe. Ohne Dich wäre die Arbeit in diesem Umfang kaum möglich gewesen, und der Ergebnisteil dieses Manuskripts wäre ohne Deine Hilfe wohl um einige Seiten dünner ausgefallen. ;-)

Vielen Dank auch an Steffi für so viele unterstützende Handgriffe und die stets vorhandene Hilfsbereitschaft.

Ein riesiges Dankeschön natürlich auch an meine Eltern, die mich, mein Studium und die Promotion erst möglich gemacht haben. Danke an Euch für alles!

Julia, Dir vielen Dank für Deine Geduld und Hilfe beim Verfassen dieser Dissertation und für so vieles mehr... ♥

Erklärung

Hiermit erkläre ich, Marcus Bettstetter, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Ort, Datum

Marcus Bettstetter