

Aus dem Zentrum für Innere Medizin  
Klinik für Gastroenterologie und Stoffwechsel  
Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold  
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg und des  
Unversitätsklinikums Gießen und Marburg, Standort Marburg

---

**Klonierung methylierungsabhängiger Gene in  
Neuroendokrinen Pankreastumorzellen durch  
cDNA Representational Difference Analysis  
(cDNA-RDA)**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
gesamten Medizin  
(Dr. med.)**

dem Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Nils Habbe**

Herten/Westfalen

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin  
der Philipps-Universität Marburg am: 8. 12. 2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches  
Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch  
Referentin: Prof. Dr. med. B. Simon, M.Sc. HCM  
Korreferent: PD Dr. med. P. Langer

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1. Neuroendokrine Tumore.....	1
1.1.1. Klassifikation, Klinik und Diagnostik der Neuroendokrinen Tumore.....	1
1.1.2. Therapie.....	2
1.2. Mechanismen der Tumorentstehung.....	2
1.2.1. Deregulation der Proliferationskontrolle.....	3
1.2.2. Immortalisierung.....	5
1.2.3. Inhibition der Apoptose.....	6
1.2.3.1. Der extrinsische Pfad.....	9
1.2.3.2. Der intrinsische Pfad.....	9
1.2.4. Induktion der Angiogenese.....	11
1.2.5. Metastasierung.....	12
1.2.6. Suppression der Immunabwehr.....	13
1.3. Epigenetische Genregulation.....	14
1.3.1. Histonmodifikation.....	15
1.3.2. Imprinting.....	17
1.3.3. Methylierung.....	17
1.3.3.1. Hypermethylierung und Transkriptioninhibition.....	18
1.3.3.2. Hypomethylierung und Transkriptionsaktivierung.....	20
1.3.4. Epigenetische Therapie.....	22
1.4. Fragestellung.....	24
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
2.1. Geräte.....	26
2.1.1. Laborgeräte.....	26
2.1.2. Elektrophorese-Geräte und Zubehör.....	26
2.1.3. Zellkultur.....	26
2.1.4. Analytische Geräte.....	26
2.1.5. Kühlgeräte.....	26
2.2. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien.....	27

2.2.1. Bakterienkultur.....	27
2.2.2. Enzyme.....	27
2.2.3. Sequenzierung.....	27
2.2.4. Elektrophorese.....	28
2.2.5. Primer.....	28
2.2.6. Chemikalien und Puffer.....	29
2.2.7. Zellkultur.....	30
2.2.8. Verbrauchsmaterialien.....	30
2.3. Zelllinien, Kultivierung und Behandlung.....	31
2.3.1. Zelllinie und Kultivierung.....	31
2.3.2. 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-CdR) Behandlung.....	31
2.4. cDNA Representational Difference Analysis (RDA).....	32
2.4.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen.....	33
2.4.2. Quantifizierung von Gesamt-RNA.....	33
2.4.3. mRNA-Extraktion.....	34
2.4.4. Synthese doppelsträngiger cDNA.....	35
2.4.5. Restriktion der doppelsträngigen cDNA.....	36
2.4.6. Adaptersequenzen.....	37
2.4.7. Ligation der R-Bgl-24 Adapter.....	38
2.4.8. Ampliconsynthese.....	39
2.4.9. Entfernung der R-Bgl-24 Adapter.....	41
2.4.10. Präparation des Tester.....	41
2.4.11. Überprüfung der Ligation mittels PCR.....	42
2.4.12. Subtraktive Hybridisierung.....	43
2.4.13. Erzeugung des ersten Differenzproduktes.....	44
2.4.14. Erzeugung des zweiten Differenzproduktes.....	46
2.4.15. Restriktionsspaltung DP2.....	47
2.5. Klonierung der Differenzprodukte.....	48
2.5.1. Vektorpräparation.....	48
2.5.1.1. Restriktionsverdau mit BamHI.....	49
2.5.1.2. Dephosphorylierung des Plasmidvektors.....	51
2.5.2. Ligation der Fragmente.....	51
2.5.3. Transformation und Kultivierung der Bakterienklone.....	52
2.5.4. Präparation der Plasmide.....	52

2.6. Agarose-Gelelektrophorese.....	53
2.7. Sequenzierung und Identifikation der cDNA-Fragmente.....	54
2.8. Überprüfung der differentiellen Genexpression.....	55
2.8.1. Synthese einzelsträngiger cDNA.....	55
2.8.2. Standard-PCR zur Überprüfung der differentiellen Expression....	56
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>59</b>
3.1. Klonierung methylierungsabhängig differentiell exprimierter Genfragmente anhand der cDNA-RDA in neuroendokrinen Pankreastumorzellen QGP-1.....	59
3.2. Charakterisierung der klonierten methylierungsabhängig differenziell exprimierten cDNA-Fragmente.....	65
3.3. Bestätigung der klonierten methylierungsabhängig differentiell exprimierten Gene in QGP-1 Zellen.....	70
3.4. Funktionelle Kategorisierung der bestätigten methylierungs- abhängig differentiell exprimierten Gene in QGP-1 Zellen.....	75
3.4.1. Zellproliferation-, Signaltransduktion-, Ribosomensynthese und Proteinhomöostase-assoziierte Gene .....	75
3.4.2. Apoptose-assoziierte Gene.....	80
3.4.3. Metastasierungs-assoziierte Gene.....	81
3.4.4. Immunabwehr-assoziierte Gene.....	82
3.4.5. Genfragmente mit bisher unbekannter Funktion.....	84
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>86</b>
4.1. Die cDNA Representational Difference Analysis (cDNA-RDA) ist eine geeignete Methode zur Identifizierung einer Vielzahl differenziell exprimierter Gene in zwei Tumorzellpopulationen.....	86
4.2. Identifizierung methylierungsabhängig exprimierter Gene in neuroendokrinen Pankreastumoren.....	89
4.3. Relevanz methylierungsabhängiger Gene in Zellproliferation, Signaltransduktion, Ribosomenbiogenese und Proteinhomöostase in QGPZellen.....	91
4.4. Bedeutung der in QGP-1 Zellen methylierungsabhängig exprimierten Gene in der Apoptoseregulation.....	98

4.5. Funktionelle Bedeutung methylierungsabhängig regulierter Gene in QGP-1 Zellen.....	103
4.6. Methylierungsabhängige Expression von Immunsystem-assoziierten Genen in QGP-1 Zellen.....	106
4.7. Schlussfolgerungen und Ausblicke.....	108
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>112</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>113</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>148</b>
7.1. Abkürzungsverzeichnis.....	148
7.2. Curriculum Vitae.....	153
7.3. Publikationen.....	155
7.4. Akademische Lehrer.....	156
7.5. Erklärung.....	157
7.6. Danksagung.....	158

# 1. Einleitung

## 1.1. Neuroendokrine Tumore

### 1.1.1. Klassifikation, Klinik und Diagnostik

Maligne neuroendokrine Tumore des gastroenteropankreatischen Systems (GEP-NET) sind mit einer Inzidenz von 1-2/100000 eine seltene Krankheitsentität. Williams und Sandler unterteilten die Karzinoide 1963 erstmals nach embryologischen Gesichtspunkten in Vorderdarm- (Lunge, Magen, Duodenum, oberes Jejunum), Mitteldarm- (hinteres Jejunum, Ileum, Appendix und Zökum) sowie Enddarm-Karzinoide (Kolon und Rektum). Diese Klassifikation erwies sich als zu wenig differenziert, so dass Capella 1994 eine neue, ebenfalls nach embryologischen Gesichtspunkten definierte Klassifikation der neuroendokrinen Tumore vorlegte. Die 2000 erschienene WHO- Klassifikation wurde maßgeblich nach Konzepten von Klöppel gestaltet (Klöppel et al., 1996; 2004).

Klinisch fallen ca. 50 % der neuroendokrinen Tumoren durch Symptome auf, die durch exzessive Hormonproduktion entstehen. Mehr als die Hälfte dieser funktionellen NET haben bei der Erstdiagnose schon lokoregionäre oder hämatogene Metastasen, insbesondere in der Leber. Bei den nicht-funktionellen GEP-NET handelt es sich häufig um einen Zufallsbefund. Durch das meist langsame Wachstum reicht die Symptomatik vom palpablen Tumor über Obstipation oder unspezifische Symptome bis zur manifesten Metastasierung (Klöppel et al., 2004).

Die sichere Diagnosestellung ist speziell bei den nicht-funktionellen GEP-NET nicht einfach. Bei eindeutigen klinischen Symptomen ist eine Hormonbestimmung sinnvoll, bei normalen Serum-Hormonwerten können endokrinologische Funktionstest wie z. B. der Sekretintest zur Diagnostik eines Gastrinoms, der Fastentest beim Insulinom oder die Serum-Glukagonkonzentration nach Stimulation mit Arginin oder Tolbutamid beim Glukagonom Anwendung finden. Als Tumormarker eignet sich Chromogranin A (Schürmann et al. 1992).

Zur Lokalisationdiagnostik eignen sich die Endosonographie sowie die Somatostatinrezeptor-Szintigraphie mit einer hohen Spezifität insbesondere bei Metastasen von Gastrinomen. Bei der Metastasensuche sind Computertomographie und vor allem die Magnetresonanztomographie von entscheidender Bedeutung (Debray et al. 2001).

### **1.1.2. Therapie**

Oberstes therapeutisches Prinzip ist die chirurgische Tumorentfernung, die die einzige kurative Behandlungsmöglichkeit darstellt. Da die Tumoren bei Diagnosestellung häufig bereits metastasiert sind, muss sich die Therapie individuell an der Symptomatik, der Wachstumsgeschwindigkeit und dem Allgemeinzustand des Patienten orientieren. Die Therapie verfolgt dabei 2 Ziele: 1. die Kontrolle der hormonassoziierten Symptome und 2. die Beeinflussung des Tumorwachstums. Neben systemischen Therapieansätzen kann eine operative Tumorverkleinerung oder Einsatz lokoregionaler Verfahren sinnvoll sein. Experimentell wird auch die Radioligandentherapie eingesetzt. Aufgrund der niedrigen Inzidenz, fehlender prospektiver Studien und niedriger Ansprechraten konventioneller Therapieformen gibt es für neuroendokrine GEP-Tumore bisher keine allgemeingültigen Behandlungsrichtlinien (Simon, 2005).

## **1.2. Mechanismen der Tumorentstehung**

Mit der Einführung und Weiterentwicklung molekularbiologischer Techniken wurde es möglich, Tumore nicht nur makro- oder mikroskopisch zu beschreiben, sondern auch Veränderungen im Genom oder an den Eiweißbausteinen eines Tumors zu identifizieren. Aus der Fülle der bekannten genomischen Veränderungen bei Tumorzellen leiteten Hanahan und Weinberg im Jahre 2000 sechs essentielle Mechanismen der Tumorentstehung ab (Hanahan und Weinberg, 2000):

1. Deregulation der Proliferationskontrolle
2. Immortalisierung
3. Inhibition der Apoptose

4. Induktion der Tumorangiogenese
5. Metastasierung
6. Suppression der Immunabwehr.

### **1.2.1. Deregulation der Proliferationskontrolle**

Zur Proliferation benötigen normale Zellen Wachstumssignale, um aus einem Ruhestadium in ein aktives Proliferationsstadium überführt zu werden. Diese Wachstumssignale, seien es lösliche Wachstumsfaktoren wie z. B. PDGF oder  $TGF\alpha$ , Komponenten der extrazellulären Matrix Zell/Zell-Interaktionsmoleküle, binden an bestimmte Oberflächenrezeptoren einer Zelle. Erst dadurch können die Zellen proliferieren. Tumorzellen hingegen schaffen sich durch verschiedene Mechanismen eine gewissen Autonomie. Die molekularen Mechanismen, die zu dieser Wachstumsautonomie führen sind Veränderungen der extrazellulären Wachstumssignale, Änderungen an Transmembranrezeptoren, die die Signale in die Zelle vermitteln, oder Veränderungen an intrazellulären Kreisläufen, die diese Signale in der Zelle umsetzen (Hanahan et al., 2002).

Die Fähigkeit, Wachstumsfaktoren selbst zu produzieren, wie es z. B. für das Glioblastom gezeigt wurde (Fedi et al., 1997) führt zu einer autokrinen Stimulation und so zur Proliferation der Zellen. Bei vielen Tumorzellen kommt es im Vergleich zum korrespondierenden normalen Gewebe zu einer Überexpression von Transmembranrezeptoren, wodurch Tumorzellen in der Lage sind, auf niedrige Wachstumsfaktorensekretion mit Proliferation zu reagieren. Bei verschiedenen Tumorarten konnte die Überexpression von bestimmten Rezeptoren nachgewiesen werden, so z. B. der Rezeptor für den Epidermalen Wachstumsfaktor (EGF-R/erbB) beim Magenkarzinom oder der Her-2/neu Rezeptor beim Mamma-karzinom (Slamon et al., 1987; Gasparini et al., 2005). Die aktivierten Rezeptoren können, ebenso wie wachstumsfördernde Integrine (s. 1.2.6), den intrazellulären SOS-Ras-Raf-MAP-Kinase Zyklus aktivieren. Dieser Zyklus führt zu einer veränderten Genexpression und zur einer weiteren Ausschüttung wachstumsstimulierender Faktoren (Medema et al., 1993).

Nicht nur die autokrine und autonome Wachstumsstimulation führen zum Tumorwachstum. Das Wachstum im Zellverband setzt Zell-Zell-Verbindungen und -Signalpfade voraus. Fibroblasten oder Entzündungszellen in der Nachbarschaft der Tumorzellen beeinflussen ebenfalls das Wachstum der malignen Zellen (Cordon-Cardo et al., 1999).

Ein weiterer wichtiger Mechanismus der veränderten Proliferationskontrolle ist die Fähigkeit, wachstumshemmende Signale zu umgehen. Dazu muss man kurz den Zellzyklus betrachten, der sich in die Interphase, in der die Zelle ihre Funktionen ausübt, DNA repliziert und an Masse zunimmt, sowie die M-Phase, in der es zur Kern- und Zytoplasmateilung kommt. Die Interphase wird in die S-Phase (S=Synthese), in der die DNA synthetisiert wird, und in die G-Phasen (G=gap, d.h. Wartezeit) unterteilt. Die G-Phasen werden nach Ablauf in die erste G-Phase (=G1), die zweite G-Phase (=G2) sowie die G0 Phase unterteilt. In der G0-Phase tritt ein irreversibler Wachstumsstillstand ein. Innerhalb dieses Zellzyklus gibt es sogenannte Checkpoints, um eine fehlerlose Weitergabe der genetischen Information sicherzustellen (Lee et al., 2005). Hier können Reparaturmechanismen greifen, die entstandene DNA Schäden korrigieren. Verzögerungsmechanismen helfen, diese Fehler zu entdecken, können aber auch zum Zyklusarrest oder zur Apoptose führen.

Der G1/S-Checkpoint hat die größte Bedeutung für die Zellzyklus-Regulation. Für den Übergang von G1 zu S-Phase sind die Tumorsuppressorgene *p53* und *pRb* (Retinoblastomprotein) von Bedeutung. Weiterhin steuern zyclin-abhängige Kinasen (CDKs=cyclin dependent kinases) und deren Inhibitoren (CKI) diesen Vorgang. In der S-Phase führen die Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie zur Replikation der DNA. Im hypophosphorylierten Zustand blockiert *pRb* die Freisetzung von *E2F* und wirkt so wachstumshemmend.

Nach Anlagerung von Zyklinen der D-Gruppe (D1, D2, D3) erfolgt durch die Kinasen *CDK 4* und *6* eine Phosphorylierung von *pRb*, was die proliferationshemmende Wirkung von *pRb* aufhebt und den Übergang in die S-Phase bahnt (Ortega et al., 2002). TGF $\beta$  induziert über den spezifischen TGF $\beta$ -Rezeptor die Proteine *p15<sup>INK4B</sup>* und *p21<sup>Cip1</sup>*, die

Cyclin:CDK Komplexe hemmen und so die Phosphorylierung verhindern (Datto et al., 1997; Martin et al., 2005).

Veränderungen in dieser komplexen Signalkaskade sind häufig in Tumoren verschiedenster Gewebe zu finden. Eine verminderte Expression des TGF $\beta$ -Rezeptors ebenso wie mutierte, nichtfunktionelle Rezeptoren führen zu einem Verlust der wachstumshemmenden Wirkung von TGF $\beta$  (Fynan et al., 1993). Das zytoplasmatische Protein Smad4 vermittelt die vom Liganden-aktivierten TGF $\beta$ -Rezeptor ausgesendeten proliferationshemmenden Signale in die Zelle. Der Verlust der Smad4-Expression oder mutierte Smad4-Proteine liegen häufig bei Kolon- sowie Pankreaskarzinomen vor (Fink et al., 2003). Der Verlust von *pRb*, vermittelt insbesondere durch virale Onkoproteine wie z. B. *E7*-Onkoprotein des Humanen Papillomavirus (Dyson et al., 1989) ist häufig in Zervixcarzinomen zu finden (Thierry et al., 2004).

### 1.2.2. Immortalisierung

Ein wesentlicher Mechanismus der Tumorentstehung ist Veränderung der Pfadwege die zur Seneszenz, d. h. zur Zellalterung, führen. Schon vor 40 Jahren konnte Hayflick nachweisen, dass in Zellkultur gezüchtete Fibroblasten nach einer gewissen Anzahl von Zellteilungen ihr Wachstum einstellen und sich nicht weiter teilen. Mit der Inaktivierung von Tumorsuppressorproteinen wie *p53* oder *pRb* konnte dieses so genannte "Hayflick Limit" umgangen werden, sodass die kultivierten Zellen noch bis zu 20 Zellteilungen vollziehen konnten, ehe sie einer erneuten "Krise" anheim fielen, die sich durch massiven Zelluntergang und End-zu-End Fusionen von Chromosomen auszeichnet. Etwa 1 in  $10^7$  Zellen ist dabei in der Lage, sich weiter zu teilen (Wright et al. 1989).

Einen großen Anteil an der Seneszenz haben dabei die Telomere. Während jeden Zellzyklus kommt es zu einem Verlust von bis zu 100 Basenpaaren dieser Telomere (Smogozewska et al., 2004). Der zugrunde liegende Mechanismus ist die Unfähigkeit der DNA-Polymerase, die 3'-Enden der Chromosomen während der S-Phase zu replizieren. Durch die ständige Verkürzung der chromosomalen Enden kommt es nach vielen

Zellzyklen gehäuft zu End-zu-End Fusionen von Chromosomen, was zu Wachstumsstop und Zelluntergang führt (Counter et al., 1992). Die hTERT- Expression ist bei Fibroblasten vornehmlich nukleolär, in der S-Phase kommt es dann zu einer Ausschleusung. Im Gegensatz dazu kommt es bei malignen Zellen zu einer Zellzyklus unabhängigen Ausschleusung (Wong et al., 2002; Meeker et al., 2004).

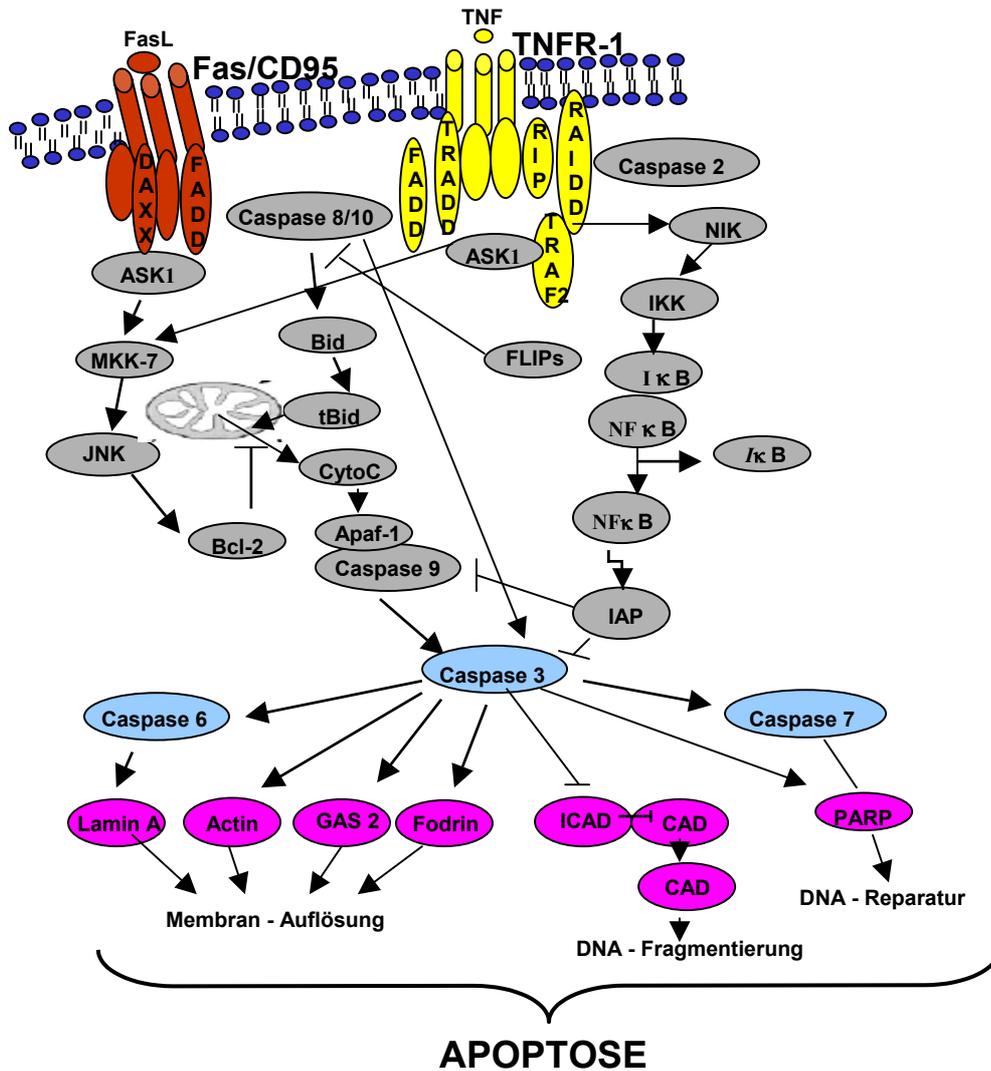
Die Verhinderung des Telomerenverlustes ist bei 90% aller maligner Zellen beobachtet worden (Shay, 1997; Granger et al., 2002; Shay et al., 2004), was im Wesentlichen auf zwei verschiedenen Mechanismen beruht: 1. Die Zellen exprimieren das Enzym Telomerase das sich wiederholende Hexanukleotid-Sequenzen (TTAGGG) an die Telomer-DNA anfügt (Bryan und Cech, 1999). Die Telomerase besteht aus einer katalytischen Protein- Untereinheit (hTERT) und einer RNA-Untereinheit (hTR). Immortalisierung durch gesteigerte hTERT- Expression kann bei Epithelzellen eines Barrett-Ösophagus (Palanca-Wessels et al., 2003) oder fetalen Hepatozyten (Wege et al., 2003) gefunden werden.

2. An anderer Teil der Zellen ist in der Lage, auf der Grundlage von Rekombinationen zwischen Chromosomen Sequenzen auszutauschen, die die Telomere stabilisieren. Dieser Mechanismus wird ALT genannt (alternate lengthening of telomeres). Diese beiden Mechanismen stabilisieren die Telomer-DNA auf einer Länge, die eine ungehemmte Zellteilung möglich macht.

### **1.2.3. Inhibition der Apoptose**

Der Anstieg der Tumorzellanzahl ist nicht nur bestimmt durch die Proliferationsrate sondern auch durch den Zelluntergang, wobei der programmierte Zelltod - Apoptose - einen Großteil dieses Zelluntergang ausmacht. Ist der Apoptose-Mechanismus in Gang gesetzt, kommt es zur Auflösung zellulärer Membranen, Zerstörung des Zytoskeletts und zur Fragmentation des Zellkerns. Diese Vorgänge laufen alle in einer Zeitspanne von 30- 120 Minuten ab (Green, 2005).

Auf der molekularen Ebene kann man zwei Pfade zur Apoptose-Initiation unterscheiden (Abbildung 1): der extrinsische Pfadweg, basierend auf rezeptorvermittelter Signalweitergabe, wobei sich spezifische Rezeptoren ("Death receptors") an der Oberfläche der Zellmembran finden lassen, sowie dem intrinsischen Pfad, der als Antwort auf DNA Schäden, Hypoxie oder anderen schweren Zellschädigungen zu einer mitochondrial getriggerten Apoptose führt (Malaguarnera et al., 2004).



**Abbildung 1.** Apoptose Pfadwege. Der Zelltod kann durch Membranrezeptoren der TNFR-Überfamilie (Fas/Apo1/CD95, TNFR-1, DR3/Apo3L, DR4 und DR5/Apo2l) vermittelt werden. Nach Bindung eines spezifischen Liganden an die Rezeptoren kommt es zur Signalvermittlung in die Zelle. Die intrazellulären Proteinkaskaden führen dann zur Apoptose (nach Malaguarnera, 2004)

### 1.2.3.1. Extrinsischer Pfadweg

Eine Gruppe der Transmembranrezeptoren, die zur Apoptose führen können, sind die Tumor Nekrose Faktor (TNF)- Rezeptoren, die Fas-Rezeptoren, und die *APO2L/ TRAIL*- Rezeptoren. Diese Liganden *APO2L/ TRAIL* werden bevorzugt auf Natürlichen Killerzellen (Kayagaki et al., 1999), Monozyten (Griffith et al., 1999) und CD4+ sowie CD8+ positiven T-Zellen (Kayagaki et al. 1999) exprimiert und führen zur Apoptose der als Ziel erkannten Tumorzellen. Die für *APO2L/ TRAIL* spezifischen Transmembranrezeptoren sind die "Death receptor" genannten Rezeptoren DR3, DR4 und DR5.

Allen oben genannten transmembranär gelegenen "Death receptors" haben intrazellulär sogenannte "Death domains", an welche sich Adapter-Proteine anlagern, z. B. "Fas-associated death domain/ mediator of receptor induced toxicity, (*FADD/ MORT-1*)". Bindet der spezifische Ligand an die oben genannten Rezeptoren kommt es über diese Domänen zur Aktivierung der hierarchisch geordneten Caspase-Kaskade. Nach Aktivierung der Initiator-Caspasen 8 oder 9 kommt es konsekutiv zur Aktivierung der Effektor-Caspasen 3, 6 und 7, die dann zur Apoptose führen. Ein weiterer Weg, die Caspase-Kaskade zu aktivieren ist, wie beim intrinsischen Pfad, über mitochondriales Cytochrom C, das zusammen mit *Apaf-1* und *Procaspase 9* das Apoptosome bildet (Malaguarnera et al., 2004, Hao et al., 2005).

### 1.2.3.2. Der intrinsische Pfad

DNA-Schäden, Hypoxie, Zellzyklus-Störungen und andere Zellschädigungen führen zur Aktivierung des Tumorsuppressorgens *p53*, einem zentralen Faktor der Apoptoseinduktion. Über die durch *p53* aktivierten Effektoren *PUMA* und *Noxa* kommt es zur Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C. Diesen Effekt zeigt auch die Aktivierung von pro-apoptotischen Proteinen der Bcl2- Familie wie *Bax*, *Bad*, *Bam*, *Bid* oder *Bim*. Zusammen mit *Apaf-1* und *Procaspase 9* kommt es zur

Aktivierung der Caspase-Kaskade und Apoptose. Zwei Wege zur Apoptose- Inhibition können unterschieden werden.

a) Verlust pro- apoptotischer Mechanismen

Als einer der wichtigsten Faktoren der Apoptoseinduktion (Vogelstein et al., 2000) sind Schäden am *p53* Tumorsuppressorgen von besonderer Bedeutung bei der Tumorentstehung. Durch Mutationen können veränderte *p53* Proteine entstehen, die weitere Proteine aus der *p53* Familie, z. B *p63* und *p73*, hemmen und so die Apoptose verhindern. Der Verlust von Mediatoren in der *p53* Signalkette führt ebenfalls zum Apoptoseverlust, was für *PUMA* in Tumorzellen gezeigt werden konnte (Yu et al., 2003).

Die Ubiquitin-Ligase *MDM2* ist in der Lage, *p53* zu degradieren. Die Inhibition von *MDM2* führt zur Stabilisierung von *p53*. Bei Defekten in diesem Pfad mit Überexpression von *MDM2* kommt es somit zum Verlust der *p53* vermittelten Apoptose (Vousden, 2002; Lu, 2005).

Mutationen in der *Bax*-Familie sind bei vielen Karzinomen identifiziert worden, so z. B. beim Magen- und Kolonkarzinom (Meijerink et al., 1998) oder bei Leukämien (Yin C et al., 1997). Nicht nur veränderte *Bax*-Expression, sondern auch Expression von Proteinen, die die Translokation von Proteinen der *Bax*-Familie in die mitochondriale Außenmembran verhindern, wie z. B. *Ku70* (Sawada et al., 2003; Lum et al., 2005), können zur Apoptoseinhibition führen.

Veränderungen in der Caspase-Kaskade sind in der Vergangenheit bei vielen Karzinomen beschrieben worden. So wurde der Verlust von Procaspase 1, 4, 8 und 10 bei Zellen des kleinzelligen Lungenkarzinoms beschrieben (Joseph et al., 1999). Verminderte *Caspase 1* Level sind ein wichtiger Schritt beim Verlust der Apoptose während der Genese des Prostatakarzinoms (Winter et al., 2001).

b) Aktivierung anti-apoptotischer Mechanismen

Das proto-Oncogen *Bcl2* ist bei ca. 80 % aller Patienten mit follikulärem B-Zelllymphom zu finden. Es handelt sich um dabei um eine chromosomale Translokation t(14:18) (q32;q21)(Bakhshi et al., 1985).

eine erhöhte Bcl2- Expression konnte auch bei Karzinomen der Brust, der Prostata, der Lunge und der Ovarien nachgewiesen werden (Olie et al., 2001). Durch Hemmung der Cytochrom C-Ausschüttung der Mitochondrien und somit der Bildung des Apoptosome wirkt *Bcl2* antiapoptotisch. Die *Bcl2*- Homologe *Bcl-XL* und *Bcl-W* wirken auf gleiche Weise. Synergistisch wirkt *Bcl2* mit dem Onkogen *c-Myc*. Dabei verhindert *Bcl2* die von *c-Myc* induzierte Apoptose, ohne die *c-Myc* vermittelte Proliferationssteigerung zu hemmen (Jager et. al., 1997). Eine erhöhte Expression von IAP (inhibitor proteins of apoptosis) führt ebenfalls zur Apoptosehemmung durch direkte Hemmung der Caspasen 3, -7 und 9 (Miller, 1999; Daniel et al., 2004).

#### **1.2.4. Induktion der Angiogenese**

Die Versorgung von Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen ist ein wesentlicher Faktor für deren Funktion und Überleben. Dazu erfordert es ein Gefäßsystem, das diese Faktoren zu den Zellen transportiert. Gerade Zellverbände mit einer hohen Proliferationsrate, wie z. B. Tumore, müssen im Verlaufe der Proliferation die Fähigkeit entwickeln, Gefäße neu zu bilden, um weiter wachsen zu können (Tonini et al., 2003). Eine Vielzahl von pro- und antiangiogenetischen Faktoren ist in den vergangenen Jahren identifiziert worden (Gupta et al., 2005). Die bekanntesten Angiogenese-Faktoren sind VEGF sowie FGF (Kim et al., 1993). Eine Blockierung des VEGF-Rezeptors Flt-1 mittels spezifischen Peptiden führte im Mausmodell zu einer geringeren Tumorgroße (An et al., 2004).

Als ein wichtiger antiangiogenetischer Faktor konnte Thrombospondin-1 identifiziert werden, welches an einen Src-ähnlichen Tyrosinkinase-Rezeptor auf der Endotheloberfläche bindet (Bull et al., 1994). Bei einigen Tumoren konnte eine verringerte *Thrombospondin-1* Expression nachgewiesen werden. Eine Regulation von *Thrombospondin-1* durch *p53* wurde ebenfalls nachgewiesen. Der Verlust der *p53*-Expression, der bei Tumoren sehr häufig zu finden ist, kann eine geringere *Thrombospondin-1* Expression zur Folge haben (Dameron et al., 1994).

Ein weiterer Mechanismus der Neoangiogenese bei Tumoren ist die Expression von Proteasen. Diese Proteasen sind in der Lage, bFGF, welches in der extrazellulären Matrix gespeichert wird, freizusetzen (Whitelock et al., 1996).

### **1.2.5. Metastasierung**

Während ihrer Entwicklung erlangen maligne Tumoren eine Fähigkeit, die sie maßgeblich von benignen Tumoren unterscheidet: invasiv in umliegendes Gewebe einzuwachsen und Metastasen an anderen Körperstellen zu bilden (Hanahan et al., 2002).

Die Stabilität von Geweben wird durch Zelladhäsionsmoleküle (CAM) gewährleistet. Diese stammen aus der Immunglobulin-Superfamilie oder Cadherin Familie. Integrine verbinden die Zellen mit der Extrazellulären Matrix. Das bekannteste Molekül, welches in allen Epithelzellen exprimiert wird ist E-Cadherin. Die Bindung zweier Zellen durch E-Cadherin vermittelt Signale via  $\beta$ -Catenin auf eine intrazelluläre Signalkaskade, die über den Lef/Tcf Transkriptionsfaktor wachstumshemmend wirken (Christofori et al., 1999). Durch mutationsbedingte Inaktivierung, Transkriptionshemmung oder Proteolyse der extrazellulären Cadherin-Domäne kommt es bei den meisten epithelialen Tumoren zum Verlust der E-Cadherin Wirkung (Christofori et al., 1999). Eine Überexpression von E-Cadherin im Mausmodell führte zu geringerer Invasivität und Metastasenbildung, eine niedrige E-Cadherin-Funktion hat dagegen eine erhöhte Metastasierung zur Folge (Christofori et al., 1999).

Eine veränderte Integrin-Expression konnte für invasiv wachsende Zellen oder Metastasen nachgewiesen werden. Dabei änderten maligne Zellen die Expression von Integrin  $\alpha$  und  $\beta$ -Untereinheiten, um sich so ihrer neuen Umgebung anzupassen und sich an das durch Proteasen degradierte Stroma zu binden (Varner et al., 1996).

Die Expression von Integrin  $\beta 6$  führte bei oralen Plattenepithelkarzinomzellen zur Aktivierung der Matrixmetalloproteinasen (MMP) 3 und 9, die Degradierung der extrazellulären Matrix bewirken (Dang et al., 2004). Degradation der extrazellulären Matrix durch extrazellulären Proteasen ist

ein weitere Metastasierungsmechanismus. Tumorzellen können in umgebenden Stromazellen die Urokinase Expression induzieren, die an Urokinaserezeptoren auf der Zelloberfläche der Tumorzellen bindet (Johnsen et al., 1998).

### 1.2.6. Suppression der Immunabwehr

Ein ebenso wichtiger Mechanismus der Krebsentstehung ist das Umgehen der Immunabwehr, wobei drei Stufen der unterschieden werden können: die Elimination, d.h. die Möglichkeit des Körpers malignes Gewebe zu entfernen, das Stadium des Nebeneinanders (Equilibrium), sowie die endgültige Umgehung der Immunabwehr (Escape) (Dunn et al., 2004). Der menschliche Körper verfügt über eine Vielzahl an Möglichkeiten, einen Tumor zu eliminieren. CD4<sup>+</sup> sowie CD8<sup>+</sup>  $\alpha\beta$ T-Zellen können Tumorantigene erkennen, wenn sie durch Proteine des MHC I oder MHC II Komplexes präsentiert werden. Diese Tumorantigene können in 5 Kategorien unterteilt werden: 1. Differenzierungs-Antigene (z. B. *Melan-A/MART-1*), 2. durch Mutation entstandene Antigene (z. B. neue Formen des *p53*), 3. überexprimierte Antigene (z. B. *HER-2/neu* Rezeptor beim Mammakarzinom), 4. Cancer-testis-Antigene (z. B. *MAGE*) und 5. virale Antigene (z. B. EBV, HPV) (Boon et al., 1996; Rosenberg et al., 1999; Old et al., 2003).

Zur Elimination des Tumorgewebes ist endogenes Interferon $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) ein wichtiger Wirkstoff. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Tiere, die genügend IFN $\gamma$  bildeten, vor dem Wachstum von spontanen oder chemischinduzierten Tumoren relativ geschützt sind (Street et al., 2001; 2002). Die Inhibition von IFN $\gamma$  durch spezifische Antikörper führte ebenfalls im Mausmodell zu einem schnelleren Wachstum von transplantierten Tumoren (Dighe et al., 1994). Als wichtige Quelle von IFN $\gamma$  bei der Immunantwort wurden  $\gamma\delta$  T-Zellen durch Versuche mit IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup> sowie IFN $\gamma$ <sup>+/+</sup> Mäusen, die mit T-Zell-Rezeptor (TCR) $\beta$ <sup>-/-</sup> sowie TCR $\delta$ <sup>-/-</sup> gekreuzt und bestrahlt wurden, identifiziert (Gao et al., 2003). Mit der Fähigkeit, CD4<sup>+</sup> TH1-T-Zell sowie zytotoxische T-Zellen sowie Makrophagen zu stimulieren, ist IFN $\gamma$  ein wichtiger Wirkstoff des

Immunsystems. Ein ebenso wichtiger Vertreter der Interferone ist  $IFN_{\alpha\beta}$ . Neutralisation von  $IFN_{\alpha\beta}$  führt bei Mäusen zu einem schnelleren Wachstum von transplantierten Tumoren (Gresser et al., 2002).

Tumorzellen haben ein Genom von enormer Plastizität und besitzen viele Mutationen (Loeb et al., 2003). Durch Mikrosatelliten-Instabilität, nicht funktionierende Reparatur-Mechanismen, Punktmutationen oder chromosomale Instabilität mit Translokationen, Inversionen und anderen Abberationen kommt es zu immer wieder wechselnden Phänotypen, mit denen sich das Immunsystem auseinandersetzen hat (Equilibrium). Aus diesem Stadium gibt es drei Auswege: 1. durch die oben beschriebenen Mechanismen doch eliminiert zu werden; 2. weiterhin in diesem Stadium zu bleiben oder 3. dem Immunsystem zu entfliehen (Dunn et al., 2004).

Als Fluchtmechanismus dienen den Tumorzellen verschiedene Vorgänge. Viele Tumoren zeigen einen Verlust an HLA-I Proteinen (Marincola et al., 2000) oder anderen Proteinen dieser Signalkaskade, wie z. B. TAP1, oder den Untereinheiten des Immunproteasoms, LMP2 und LMP7 (Selinger et al., 2000).

Ebenso können Tumoren die Fähigkeit erlangen, immunsuppressive Faktoren wie TGF- $\beta$  oder IL-10 zu bilden und zu sezernieren (Khong et al., 2002). Die Überproduktion von Galectin-1 inhibiert die T-Zell-Antwort (Rubinstein et al., 2004). Weiterhin können Tumore die Differenzierung immunsuppressiver T-Zell-Populationen, wie die IL-13-produzierenden Natürlichen Killerzellen oder die CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulativen T-Zellen (Tregs) stimulieren (Terabe et al., 2000; 2004).

### **1.3. Epigenetische Genregulation**

Epigenetische Veränderungen der zellulären Informationen sind definiert als Veränderungen jenseits der eigentlichen DNA-Sequenz, sodass Informationen übermittelt werden, ohne die eigentliche Basensequenz des DNA-Stranges zu verändern. Insbesondere kommt der Regulation der Genexpression durch epigenetische Mechanismen in Form der Transkriptionskontrolle nicht nur eine entscheidende Bedeutung bei der

Gewebisdifferenzierung in der embryonalen Entwicklung zu, sondern auch bei der Tumorgenese. Mehrere epigenetische Mechanismen konnten bisher identifiziert werden: Histonmodifikation durch De-/Acetylierung, genomische Prägung ("Imprinting") sowie Methylierung (Feinberg et al., 2004).

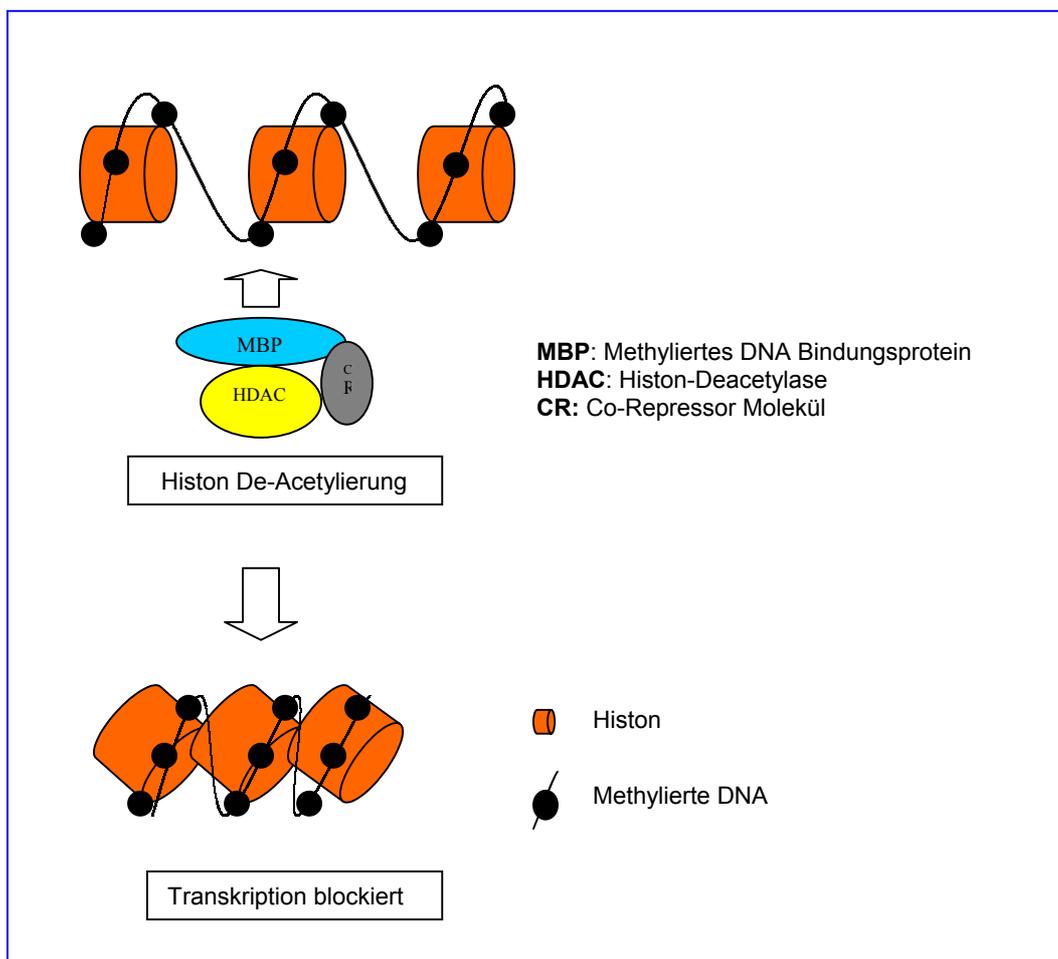
### 1.3.1. Histonmodifikation

Das Nucleosom eines eukaryontischen Zellkerns besteht aus einer Protein-Familie, den Histonen, um die die doppelsträngige DNA in Schleifen gewickelt ist. Die aminoterminalen Enden der Histone können durch Methylierung, Acetylierung und Phosphorylierung modifiziert werden. Die Acetylierung führt zu einer offenen Chromatinstruktur, sodass die Gene in diesem Bereich transkribiert werden können (Roth et al., 2001). Histone-Deacetylase 1 (HDAC1) bildet einen Komplex mit den Methyl-CpG-Bindenden-Proteinen und der DNA-Methyltransferase (El-Osta et al., 2000). Dies führt zur Chromatin-Kondensation und durch Transkriptionshemmung zur Geninaktivierung (Abbildung 2). Dieser Mechanismus wurde bereits bei mehreren karzinomatös entarteten Geweben beobachtet. Beim Magenkarzinom sowie beim Kolonkarzinom wurde die Deacetylierung des Histon H4 nachgewiesen. Dabei konnte gezeigt werden, dass die Expression von acetyliertem H4 in Magenkarzinomen bis zu 70% reduziert ist. Zudem korrelierte die Histon-Deacetylierung mit der Invasionstiefe, dem Tumorstadium und dem Lymphknoten-Metastasen-Status (Yasui et al., 2002).

Die Methylierung von Lysin 9 des Histon H3 (H3-K9) korreliert mit der Inaktivierung des *CDKN2A* Tumorsuppressorgens (Nguyen et al., 2002). Im Gegensatz dazu wird die Methylierung des Lysin 4 des Histon 3 (H3-K4) bei Promotoren aktiver Gene gefunden (Lachner et al., 2002, Liang et al., 2004).

Ein weiterer Mechanismus ist die Bildung von Fusionsproteinen. Histon-acetyltransferasen sowie Histonmethyltransferasen bilden einen Teil dieser Fusionsproteine und führen zur gesteigerten Genexpression (Hake et al., 2004). Bei der akuten Promyelozytenleukämie werden die Gene, die

zur Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen führen, durch das Fusionsprotein PML-RAR $\alpha$  (promyelocytic leukaemia-retinoic receptor  $\alpha$ ) in Zusammenarbeit mit der HDAC supprimiert (Grignani et al., 1998).



**Abbildung 2.** Repression der Transkription durch Veränderung der Chromatinstruktur. Methylierte DNA bindet an einen Proteinkomplex (MBP), ein Co-Repressor-Molekül sowie an die Histon-Deacetylase. Nach der Bindung des Komplexes an die methylierte DNA kommt es zur Deacetylierung der Histone und somit zu Kompaktierung der Chromatinstruktur. Dieses führt zur Transkriptionshemmung (nach Wajed et al., 2001; Laird, 2005).

### 1.3.2. Imprinting

Genomisches Imprinting ist in der Embryogenese des Menschen ein natürlicher Vorgang. Mütterliche oder väterliche Allele werden im Verlauf der Entwicklung des Menschen abgeschaltet und inaktiviert. Die eigentliche Inaktivierung eines elterlichen Alleles wird durch Methylierung vermittelt (Li et al., 1993).

Dieser Mechanismus wurde besonders bei neuronalen Entwicklungsstörungen wie dem Prader-Willi-Syndrom (PWS) sowie dem Angelmann-Syndrom (AS) als Auslöser identifiziert. Bei Patienten mit Wilms-Tumoren, einem embryonalen Nierenkarzinom, ist ein Verlust des Imprinting ("loss of imprinting", LOI) nachgewiesen worden, wobei zwei spezifische Gene auf Chromosom 11 betroffen sind: *IGF2* und *H19*.

*IGF2* ist ein autokriner Wachstumsfaktor, wohingegen *H19* als Proliferationsinhibitor wirkt. Um das Zellwachstum zu kontrollieren, werden diese Gene reziprok exprimiert, sodass es zu einer Balance zwischen Wachstumsstimulation und Proliferationsinhibition kommt. Durch den Verlust des Imprinting kommt es zu einer Expression der paternalen Allele (Rainier et al., 1993; Steenman et al., 1994). Der Verlust des Tumorsuppressor-Gens *ARHI* am *Locus 1p31* wird häufig beim Mamma- sowie beim Ovarialkarzinom gefunden. Dabei ist der Verlust der Genexpression durch die Hypermethylierung der paternalen Allele bedingt (Yuan et al., 2003).

### 1.3.3. DNA Methylierung

DNA-Methylierung ist eine enzym-vermittelte chemische Modifikation der DNA-Struktur. Die kovalente Bindung einer Methyl-Gruppe (-CH<sub>3</sub>) an das C-Atom in Position 5 der Cytosin-Base wird von einer Gruppe von Enzymen vermittelt, die als Methyltransferasen bezeichnet werden. Dabei wird die Methyl-Gruppe durch S-Adenosyl-Methionin bereitgestellt, welches selbst wieder zu S-Adenosyl-Homocystein wird. Dieses wiederum wird nach Durchlaufen der Folat- und Cobalamin-Kreisläufe zu S-Adenosyl-Methionin. Bei Vertebraten ist Methylierung nur an Cytosin-

Basen möglich, die direkt durch eine Phosphor-Brücke an eine Guanin-Base gebunden sind, sodass es zu einem CpG-Dinukleotid wird (Wajed et al., 2001).

Die reziproke Beziehung zwischen DNA-Methylierung und Genexpression ist insbesondere dann signifikant, wenn die methylierten CpG-Abschnitte in der Promotorregion eines Gens liegen. Diese CpG-Abschnitte werden in der Literatur CpG-Inseln ("CpG-Islands") genannt. Spezifische Proteine, die über eine Methyl-Bindungs-Domäne (MBD) verfügen, wie MeCP2, binden an die methylierten CpG-Sequenzen. Zusammen mit der Transcriptional Repression Domain (TRD) und verschiedenen Ko-Repressoren (z. B. mSim3A) sowie Histon-Deacetylasen (HDAC1) wird ein Komplex geformt, der sich an die methylierte DNA lagert. Durch Änderungen in der Histon-Konfiguration kondensiert die DNA und verhindert somit die Transkription (Laird, 2005).

Die Methylierung von Cytosin hat auch mutagene Eigenschaften. So kommt es durch spontane ebenso wie durch Enzym-vermittelte Deaminierung von 5-Methylcytosin zu einer C-zu-T-Punktmutation, die eine G-zu-A-Mutation auf dem gegenüberliegenden DNA-Strang nach sich zieht. Dieser Mechanismus wurde auch bei Mutationen im p53-Tumorsuppressorgen beobachtet (Tornaletti et al., 1995).

### **1.3.3.1. Hypermethylierung und Transkriptioninhibition**

Die Prävalenz der oben beschriebenen CpG-Inseln im menschlichen Genom ist geringer als man statistisch erwarten würde. Diese Dinukleotid-Paare treten nur in 1% im Gegensatz zu 6% statistischer Erwartung auf. Die Hypothese, dass Hypermethylierung dieser CpG-Inseln im Promotorbereich eines Gens zur Transkriptioninhibition führt kann durch Wiederherstellung der Genexpression durch Demethylierung entweder mittels demethylierender Agentien oder genetischen "knockout" von Methyltransferasen im Tier- oder Zellmodel bewiesen werden (siehe Abbildung 3). Schon 1986 zeigte Baylin, dass Locus-spezifische Hypermethylierung beim kleinzelligen Bronchialkarzinom die Calcitonin-

Expression hemmt. Mäuse, die Mutationen im *APC*-Gen tragen entwickeln in den ersten 6 Monaten ihres Lebens eine adenomatöse Polyposis Coli mit über 100 Darmpolypen. Durch die Behandlung mit 5-Aza-2-Deoxycytidin, einem Methyltransferasehemmstoff oder durch Kreuzung mit der Folge einer verminderten DNA Methyltransferaseexpression konnte die Anzahl an Polypen drastisch reduziert werden (Laird et al., 1995).

Die CpG-Insel Hypermethylierung in der Promotorregion des Reparaturgens *MLH1* wurde häufig bei kolorektalen Karzinomen (KRK) mit Mikrosatelliteninstabilität gefunden (Miyakura et al., 2004). Mikrosatelliten sind kurze, repetitive DNA-Sequenzen von 1 bis 4 Basenpaaren, die über das gesamte Genom verteilt sind. Bei sporadischem KRK ist Mikrosatelliteninstabilität verknüpft mit dem Verlust der Expression des *MLH1*-Gens durch Promotorhypermethylierung, hier insbesondere durch *hMLH1* und *hMSH2*. Die Behandlung von KRK- Zelllinien durch 5-Aza-2-Deoxycytidin führte zur Reexpression von *MLH1* und zur Wiederherstellung der Reparaturfunktion (Herman et al., 1998). Diese Reexpression und Aktivierung ist reversibel und abhängig von der 5-Aza-2-Deoxycytidin-Behandlung, sodass ein Verlust der Reexpression möglich ist (Veigl et al., 1998). Erst kürzlich konnte die Promotor-assoziierte Methylierung von *MLH1* in normalem Gewebe inklusive Spermatozoen gefunden werden. Diese epigenetische Mutation prädisponiert zu multiplen Karzinomen (Suter et al., 2004).

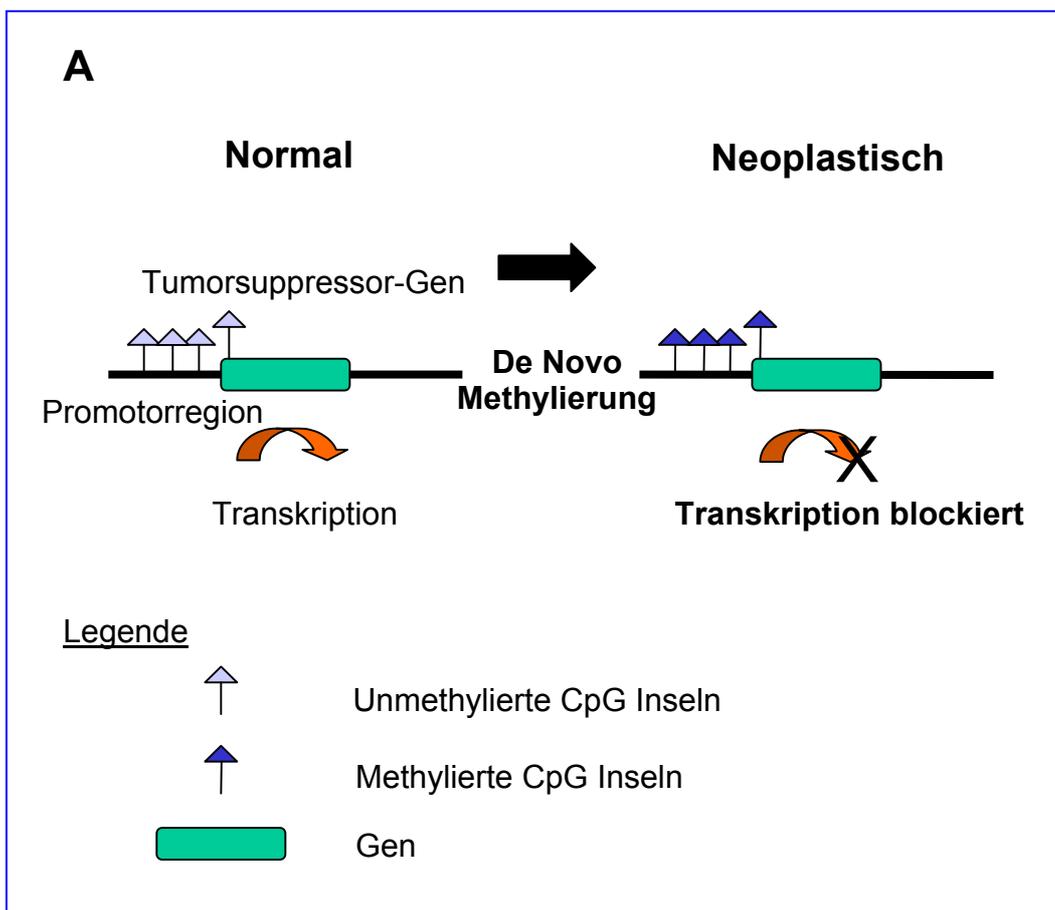
Das Tumorsuppressorgen *p16<sup>INK4a</sup>* ist ein Cyclin-abhängiger Kinase (CDKN2A) Inhibitor und hemmt die Proliferation der Zelle durch das Eingreifen in den Zellzyklus. Lokalisiert ist dieses Gen auf dem kurzen Arm des Chromosom 9, *Genlocus 9p21*. Der Verlust der Heterozygotie des *p16<sup>INK4a</sup>* Gens ist bei Adenokarzinomen des Ösophagus sowie bei der Barrett Metaplasie zu finden (Barrett et al., 1996). Hypermethylierung der Promotorregion von *p16<sup>INK4a</sup>* ist mittlerweile eine der meist beschriebenen epigenetischen Veränderungen der Krebsentwicklung beim Menschen. In vielen karzinomatös entarteten Geweben konnte die Hypermethylierung des *p16<sup>INK4a</sup>* Gens nachgewiesen werden, beispielhaft sei das Bronchialkarzinom (Esteller et al., 1999), das Pankreaskarzinom (Schutte

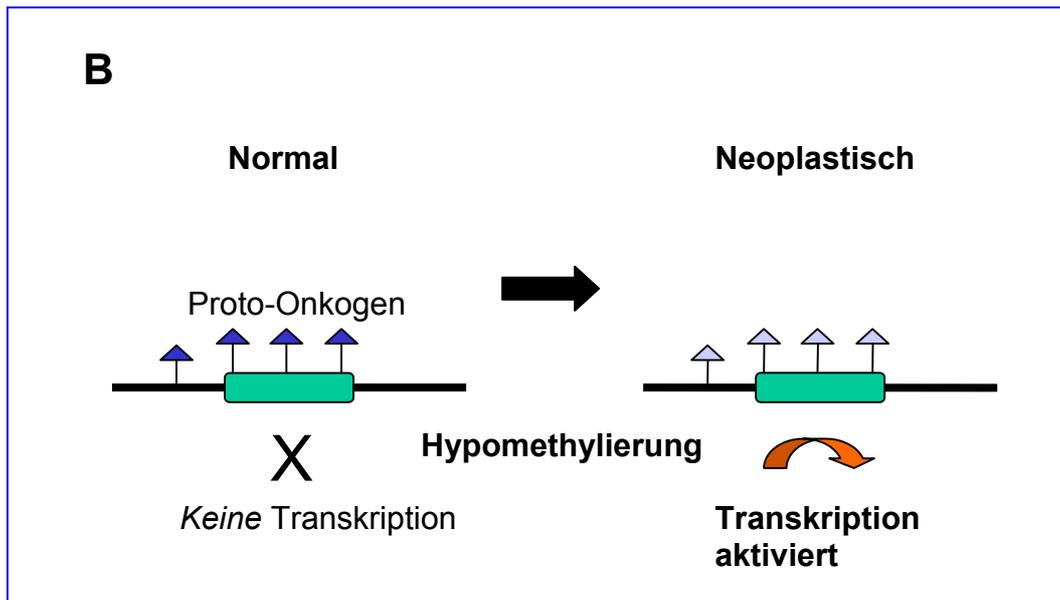
et al., 1997) die bereits oben erwähnten Tumoren, das kolorektale Karzinom (Herman et al., 1995) sowie das Klarzellsarkom (Takahira et al., 2004). Durch die demethylierende Behandlung mit 5-Aza-CdR konnte die  $p16^{INK4a}$  Genexpression sowohl beim Gallenblasenkarzinom (Gonzalzo et al., 1998) als auch bei neuroendokrinen Pankreaskarzinomzellen wiederhergestellt werden. Bei neuroendokrinen Pankreaskarzinomzellen ging dies mit Wachstumsinhibition einher (Lubomierski et al., 2001). Im Rahmen einer Pilotstudie wurde die Promotor-Hypermethylierung von *CDH1*, *APC*, *MGMT*, *RASSF1A*, *GSTP1*,  $p16^{INK4a}$ , *RAR-β2* und *ARF* in Urin- sowie Serum-DNA-Proben bei Patienten mit Nierenkarzinom versus gesunden Personen verglichen. Bei Kombination von Serum und Urin konnte eine Spezifität von 94% erzielt werden (Hoque et al., 2004).

### 1.3.3.2. Hypomethylierung und Transkriptionsaktivierung

Im Gegensatz zur Hypermethylierung von umschriebenen CpG-Islands betrifft die Hypomethylierung große Bereiche des Genoms. Dabei zeigen viele Karzinome einen global verringerten Anteil an 5-Methylcytosin (Gama-Sosa et al., 1983). Die Hypomethylierung des Genoms kann über mehrere Mechanismen zur Aktivierung von Genen führen (siehe Abbildung 3). An pericentromerisch gelegenen Satellitensequenzen kommt es durch Hypomethylierung zu unbalancierten chromosomalen Translokationen, so beim Wilms Tumor zwischen Chromosom 1 und 16 (Qu et al., 1999). Der Verlust der Methyltransferase DNMT3B hat die Hypomethylierung von Satelliten-DNA zur Folge, was als Auslöser des ICF-Syndroms (Immundefizienz, chromosomale Instabilität, faciale Anomalien) beschrieben wurde (Hansen et al., 1999). Der Methylierungs-Status des Genoms wird u.a. durch Helicasen der SNF2-Familie aufrecht erhalten, die wiederum die katalytische Dömane der SWI/SNF-Familie sind. Durch das Abschalten von Lsh, einem SNF2-Familien-Mitglied kam es zur chromosomalen Instabilität (Fan et al., 2003). Ebenso tritt der Verlust von SNF5 gehäuft bei pädiatrischen Tumoren auf. Die ATPase-

Untereinheiten BRM und BRG1 sind bei einer Vielzahl von Tumoren mutiert, wobei dieses mit einer schlechteren Prognose verknüpft ist (Roberts et al., 2004). Beim Zervixkarzinom führt die Hypermethylierung des auslösenden HPV16 Virusgenoms zum latenten Wachstum, wohingegen die Hypomethylierung dieses Bereiches mit einer Progression einhergeht (Li et al., 2003; De Capoa et al., 2003). Die Retrovirus-Familie HERV-K konnte im Zusammenhang mit der Onkogenese durch Hypomethylierung von Retrotransposons und damit der Expression von Virus-DNA im menschlichen Genom bei der Entstehung von Blasenkarzinomen (Flori et al., 1999) und Stammzelltumoren (Herbst et al., 1996) identifiziert werden. Beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas wurde gezeigt, dass die Expression eines calcium-bindenden Proteins, S100A4, bei undifferenzierten Karzinomen höher ist und die Metastasierungsrate dadurch gesteigert ist. Bei verschiedenen Pankreaskarzinom-Zelllinien sowie bei Tumorproben konnte eine Hypomethylierungs-vermittelt gesteigerte Genexpression nachgewiesen werden (Rosty et al., 2002).





**Abbildung 3.** Mechanismen der Karzinogenese durch Veränderung des Methylierungsstatus. (A) Repression von Tumorsuppressorgenen nach Methylierung. (B) Aktivierung von nicht exprimierten Proto-Onkogenen nach Hypomethylierung (nach Wajed et al., 2001).

#### 1.3.4. Epigenetische Therapie

Die Ätiologie vieler Krankheiten, insbesondere von Tumorerkrankungen, liegt in epigenetischen Veränderungen. Dieses führte zur Entwicklung sogenannter "Epigenetischer Therapien", dem Einsatz von Wirkstoffen, die entweder am Methylierungsstatus der DNA ansetzen oder acetylierte Histone deacetylieren. Dabei haben einige Wirkstoffe bereits Eingang in klinische Studien gefunden (Egger et al., 2004).

Die Prototypen und ersten demethylierenden Wirkstoffe sind 5-Aza-Cytidin und 5-Aza-2'-Deoxycytidin. Diese Nukleoside werden in Deoxynukleotid-Triphosphate umgewandelt und anstatt Cytosin in die DNA eingebaut. Hier binden sie kovalent die DNA-Methyltransferase (DNMT) und führen zur Demethylierung. Ebenso wirken Zebularin, Pseudoisocytosin und 5-Fluorocytosin (Jones et al., 1980; Zhou et al., 2002). Ein weiterer Wirkstoff, der als demethylierendes Agens erkannt wurde, ist das

Antiarrhythmikum Procainamid, welches zur Reaktivierung der Glutathion-S-Transferase Pi (GSTP1) bei Prostatakarzinomzellen führte (Lin et al., 2001). In klinischen Studien wurden zudem gezeigt, dass 5-Aza-2'-Deoxycytidin in niedriger Dosierung bei AML, MDS und ALL zu günstigen Effekten führt (Issa et al., 2004).

Eine andere Wirkstoff-Gruppe sind die HDAC-Hemmstoffe. Diese sollen die unter 1.3.1. beschriebenen Histonmodifikationen, die zur Transkriptionshemmung führen rückgängig machen und supprimierte Gene reaktivieren. Auch Wirkstoffe dieser Gruppe befinden sich derzeit in der klinischen Prüfung (Marks et al., 2003).

Aus der Erkenntnis um die Verknüpfung zwischen DNA-Methylierung und Histon-Modifikation wurden auch Kombinationsbehandlungen mit demethylierenden und HDAC-inhibierenden Wirkstoffen durchgeführt. Beim Mammakarzinomzellen bewirkte dies eine Reaktivierung mehrerer Tumorsuppressorgene und führte zu einem geringeren Wachstum (Bovenzi et al., 2001). Weiterhin gibt es Ansätze, nach einer "epigenetischen" Therapie diese mit Chemotherapie, Interferontherapie und Immuntherapie weiterzuführen (Egger et al., 2004).

#### 1.4. Fragestellung

Vorarbeiten hatten gezeigt, dass DNA Demethylierung in QGP-1 Zellen zur Reexpression des Tumorsuppressorgenes  $p16^{INK4a}$  führt und unter anderem mit Wachstumsinhibition einhergeht (Lubomierski et al, 2001). Da es unwahrscheinlich war, dass die Restoration der  $p16^{INK4a}$  Expression alleine für die phänotypischen Veränderungen verantwortlich ist, hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel,

- 1) weitere tumorassoziierte Gene in QGP-1 Zellen in Abhängigkeit des DNA Methylierungsstatus der Zellen zu klonieren
- 2) festzustellen, welche der klonierten Gene in QGP-1 Zellen durch die Behandlung mit der demethylierenden Substanz 5-Aza-2'-Deoxycytidin verstärkt transkribiert oder neu exprimiert werden
- 3) festzustellen, welche der klonierten Gene in QGP-1 Zellen durch die Behandlung mit der demethylierenden Substanz 5-Aza-2'-Deoxycytidin herunter reguliert oder vollständig supprimiert werden
- 4) Antwort zu geben auf die Frage, welche potentielle Funktion den klonierten methylierungsabhängig exprimierten Genen im Hinblick auf die Onkogenese der neuroendokrinen QGP-1 Tumorzellen zukommen könnte.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Geräte

#### 2.1.1. Laborgeräte

Analysenwaage: AE 163	Mettler, Gießen
Autoklav: Laborautoklav Typ GLA 40	Fritz Gössner, Hamburg
Bakterien-Brutschrank: BE 400	Memmert, Schwabach
Bakterien-Inkubator:	
Inkubationshaube CERTOMAT H/HK	Braun, Melsungen
Tisch-Rundschüttler CERTOMAT R	Braun, Melsungen
Bunsenbrenner	Roth, Karlsruhe
Heizblock:	
DRI-Block DB1 und DB2A	Techne, Princeton, N.J.
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Kühlfalle: Uni Cryo MC 2L-60.0 C	UniEquip, Martinsried
Magnetrührer: MR3001	Heidolph, Gießen
PCR-Cycler:	
Thermo-Dux PHC-3	Techne, Princeton, N.J.
Robocycler Gradient 40	Stratagene, Heidelberg
Pipetten: 10, 20, 100, 200, 1000	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe: Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Rotoren:	
JA-14, JA-20	Beckman, München
SW 27	Beckman, München
Tischzentrifugen:	
Biofuge 13, Sepatech	Heraeus, Hanau
Biofuge 15R, Sepatech	Heraeus, Hanau
MicroCen 13	Herolab, Wiesloch
Ultrazentrifuge: L8-70M	Beckman, München
Vakuumzentrifuge: Uni Vapo 100 H	UniEquip, Martinsried
Vortex: REAX 2000	Heidolph, Kelheim
Waage: 572-33	Kern, Albstadt

Wasserbad Köttermann, Hänigsen  
Zentrifuge: J2-21 Beckman, München

### 2.1.2 Elektrophorese-Geräte und Zubehör

Agarosegelapparaturen: HE 99, HE 33 Minigel Hoefer, Heidelberg  
Netzgeräte:  
PS 500 XT Hoefer, Heidelberg  
3000 Xi Bio-Rad, München  
Transilluminator: TFX-20M MWG-Biotech, München  
Video-Dokumentationssystem:  
DocuGel V Scanalytics MWG-Biotech, München  
Verstärkerschirme DuPont, Bad Nauheim

### 2.1.3. Zellkultur

Inkubator: Cytoperm 8080 Heraeus, Karlsruhe  
Mikroskop: Olympus IX 50 Olympus, Hamburg  
Neubauer-Kammer Schreck, Hofheim  
Sterile Werkbank: Lamin Air HLB 2448 Heraeus, Karlsruhe  
Stickstoff-Tank: 35 VHC tec-Lab, Königstein  
Zentrifuge: Labofuge GL Heraeus, Karlsruhe

### 2.1.4. Analytische Geräte

Spektralphotometer: Uvikon 860 Kontron, Eching

### 2.1.5. Kühlgeräte

-80°C: UF 75-45 DS, E80 Colora Messtechnik mbH  
Lorch  
-20°C Liebherr, Ochsenhausen  
+4°C Liebherr, Ochsenhausen  
Eismaschine: 50-35 Ziegra, Isernhagen

## 2.2. Chemikalien, Enzyme und Verbrauchsmaterialien

Für molekularbiologische Routinearbeiten wurden die gängigen Stammlösungen aus bidestilliertem Wasser sowie den üblichen Chemikalien in p.A. Qualität hergestellt.

### 2.2.1. Bakterienkultur

Agar	Gibco BRL, Eggenstein
Ampicillin	Sigma, München
Glycerol	Sigma, München
Hefeextrakt	Difco, Detroit, USA
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe
Trypton	Difco, Detroit, USA

### 2.2.2. Enzyme

Taq Polymerase	QIAGEN, Hilden
Taq Polymerase RDA	Gibco BRL, Eggenstein
Restriktionsendonukleasen:	
Bam HI	New England Biolabs
Dpn II	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	Promega, Madison, USA

### 2.2.3. Sequenzierung

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer, Braunschweig
ABI Prism 310 Sequencer	Perkin Elmer, Braunschweig

### 2.2.4. Elektrophorese

Agarose	Sigma, München
Ammoniumpersulfat	BioRad, München
Bromphenolblau/Xylencyanol-Lösung	Sigma, München
Ethidiumbromid	Sigma, München
Harnstoff	Merck, Darmstadt
Marker III	Böhringer, Mannheim
Marker VIII	Böhringer, Mannheim

### 2.2.5. Primer

**Tabelle 1.** Angewandten Primer zur RT-PCR aus 5'-Aza-2'-Deoxycytidin behandelten Zellen isolierter Genfragmente

<i>QGP</i> + <i>DAC</i>	<i>Forward-Primer</i>	<i>Reverse-Primer</i>	<i>AT</i> [°C]
D3	5-gct tgg ttg ctg gtg ccc tg-3	5-tgt gcc aag cac ggc ctc ag-3	60
D4	5-aac tga agc act acg ggc ctg-3	5-tta tcc cgg ctg tct gtc ttg-3	63
D8	5-gtg atg acc ttc tgg cag gag-3	5-ctg gag ccc tac aag ccc cag-3	60
D9	5-agc cag tct gca atg ctg tg-3	5-ctc tgc tct cct ctc aca cg-3	63
D10	5-cac aca ctg ggg gaa cgc ctg-3	5-ggg cca cgt gtt cga gga g-3	59
D11	5-aga ggc tgc cag gac ttt gg-3	5-gcc tcc tcc agc tgc aga ag-3	63
D12	5-agg atg atg aag cca cag aag- 3	5-atc ggc ttc gac atc atc gcg-3	59
D13	5-aga cat ccg gcc cca ata tg-3	5-gac tgg act gta cgt ctc ag-3	63
D14a	5-aac cat ggc ttc tat gtc ag-3	5-cgt tgt agg gca tgc tga ag-3	60
D14b	5-aga ttt ccc ttt aga ccc ag-3	5-agc acc cca agg agt tga ca-3	60
D15	5-agc cat tgc cac gac cac ag-3	5-tcc cac aat gtc cac tct tg-3	63
D17	5-ggt tcc tcg tcc agg atg gtg-3	5-gct gga gca cgg tga acc tg-3	60
D18a	5-aca cat ccc cag cag ccc ctg-3	5-aag aag cgg gtg gac cactg-3	60
D18b	5-agc tcc tca tgt act ccc atg-3	5-ggt tgt cgt ggc cag cga gg-3	60
D19	5-cat cga gac caa agc cgc tg-3	5-ggc aca ggc agc ggt cag gg-3	60
D20	5-tat gct gcc caa ctc cac cg-3	5-ttg gcc gcc cgc gca gat g-3	63
D22	5-cag gct ttg ctc agc ctc cg-3	5-atg tct gaa tac ttg ggg tg-3	63
D23	5-ctt ggg gag cct ctg ccc tg-3	5-tgg aat cac agg gct ggt tg-3	63
D24	5-agg ctg ttg tca tac ttc tc-3	5-ctg gcg tct tca cca cca tg-3	60
D25	5- gtg act tcc tca cca tct ca-3	5-tcc agg tgg att ttt tcc ag-3	63
D26	5-aca tct ggc gct tct atc tg-3	5-gca cca tct cag gca cat ag-3	63
D28	5-gac tca agt aca act ccc gg-3	5-cgg ctg cca gca cca ccc ag-3	60
D32	5-aga agg cca agc tgg ccg ag-3	5-gct gca act tct tgt cgg ag-3	63
D41	5-tcc ggt ctg gca gga agg gg-3	5-att gca agc aaa ctg cta cg-3	60
D42	5-tca ccg tct cac aca gct tg-3	5-tgg gag gac aac agc gat gag- 3	59

D49	5-tgc tgc cgg tac agc agg gg-3	5-cct ctt cta cat ctt gac ct-3	59
D51	5-ggg gtg acc aag ggc aaa gg-3	5-ccc caa tac agg cca cct tg-3	63
D52	5-gca tgt ccc ttc gcg gga ag-3	5-agt gag gtc ctc ctt ggt g-3	60
D53	5-tcc gca ggg tag agg ccc ag-3	5-cac gtg ctg gga cgg gct ccg-3	59
D55	5-tct ctg aag gga tgg aat g-3	5-agt aca aag gcc att gtt ttc-3	63
D56	5-gtt gac ctc gtc tgt tat g-3	5-ctt ttc cta aca ctc aca ac-3	57
D61	5-gat cat cga ccg ccg ctc cg-3	5-acg gga gcg gaa acc acc gg-3	63
D62	5-cag gcg ggc cag cgc gcc ag-3	5-tac cgc cat cta ctt cac tg-3	60
D66	5-tgc cac att cct cct gcg ag-3	5-tgg tgg ggg tct cga ggg tg-3	60
D67	5-agg cag tgg gtg tct gca cc-3	5-gat cta ccc tgc tca cga tt-3	60
D72	5-gca ttg tgt ggc cac act tg-3	5-tga ttc ctc cac gag ggt gg-3	60
D82	5-gac ccc cat ccc agc agg tag-3	5-ggg tcc tgg ctg ccc acc tg-3	60
D83	5-cag ctg tgg agg ggc cac tg-3	5-aat gag ggc atg ggg tgg tc-3	60

DAC (+) , mit 5'-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung; D3-83, isolierte Klone; AT, Annealing Temperatur

**Tabelle 2.** Angewandten Primer zur RT-PCR aus unbehandelten Zellen isolierter Genfragmente.

QQP DAC (-)	<i>Forward-Primer</i>	<i>Reverse-Primer</i>	AT [°C]
U1	5-agg agc agg gcc ccc tgg acg-3	5-gag cgg tca agc agg gtt ctg-3	60
U2	5-cca cag cca cac ccg tct tg-3	5-cac caa caa cac ctg ctg tg-3	63
U5	5-tga cat gcg aag cca ata tg-3	5-gcc tgg ata tgc gcc agc tg-3	63
U6	5-gga tgt ccc ggg tct tgg gg-3	5-aga gta tgc cct tcc gca gg-3	60
U8	5-cag cga gac ctc cgt gcc cg-3	5-cgg tca cgt cgc caa cca tc-3	59
U10	5-atc tat gac att cgg gcc ag-3	5-cgt tga caa tgg acg gca ac-3	59
U13	5-gac gct act cag atg aaa gtg-3	5-tcc agg tga ctc cta tag-3	57
U17	5-gcc tga aga cgc tgc tgg ag-3	5-cca ctt cgt cca gca gca ag-3	60
U18	5-gtt gtc tgg ccg aat cca ctg-3	5-agt cag gtg gta gtg gcc ag-3	59
U23	5-cat ctc aga gtg gcc tca tgg-3	5-tgc gtg gac ggg ctc cgc ag-3	60
U27	5-aga ggg act cac aca ttc cg-3	5-ctt ata ccc tca tga gca tc-3	63
U29	5-cga tgg cct tgt cca tgt tg-3	5-agc ctc cag gga ggg agc ag-3	63
U31	5-tgg acc tgg ctt ctg agg tg-3	5-agt tgc ctg agg aat cac aa-3	60
U34	5-gtg aag ctc act gcc tca ag-3	5-cag gaa gcc gcc tat gtc tg-3	59

DAC (-) , ohne 5'-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung; U1-34, isolierte Klone; AT, Annealing Temperatur

### 2.2.6. Chemikalien und Puffer

Borsäure	Merck, Darmstadt
BSA	Sigma, München
DTT	Sigma, München
EDTA	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Riedel de Han AG, Seelze

Glykogen	Sigma, München
HBSS (Hank's balanced salt solution)	PAA, Linz
Isopropanol	Sigma, München
Kaliumhydroxid	Sigma, München
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck, Darmstadt
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol 25:24:1	Biomol, Hamburg
Tris-Base	USB, Cleveland

### 2.2.7. Zellkultur

DMSO	Sigma, München
Fötale Kälberserum	PAA GmbH, Linz, Österreich
Gewebekulturflaschen und -schalen	Greiner, Frickenhausen
Medium (RPMI, DMEM, DMEM/HAM F12)	Gibco, Eggenstein
Reporter Lysis Buffer 5x	Promega, Madison, USA
Penicillin-Streptomycin	Gibco, Eggenstein
Trypsin	Gibco, Eggenstein
5-Aza-2'-Deoxycytidin	Sigma, München
pBluescript II SK+ Vektor	Stratagene, Heidelberg

### 2.2.8. Verbrauchsmaterialien

NucleoSpin Plasmid Kit	Machery-Nagel, Düren
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polypropylenröhrchen (15, 50 ml)	Greiner, Frickenhausen
QIA- EX Kit	Qiagen, Hilden
Quarzküvetten	Hellma, Mühlheim/Baden
Reaktionsgefäße (0,5, 1,5, 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifugengefäße: UltraClear 25x89 mm	Beckman, München
PolyAtract mRNA Isolation-Kit	Promega, Madison, USA

## **2.3. Zelllinien, Kultivierung und Behandlung**

### **2.3.1. Zelllinie und Kultivierung**

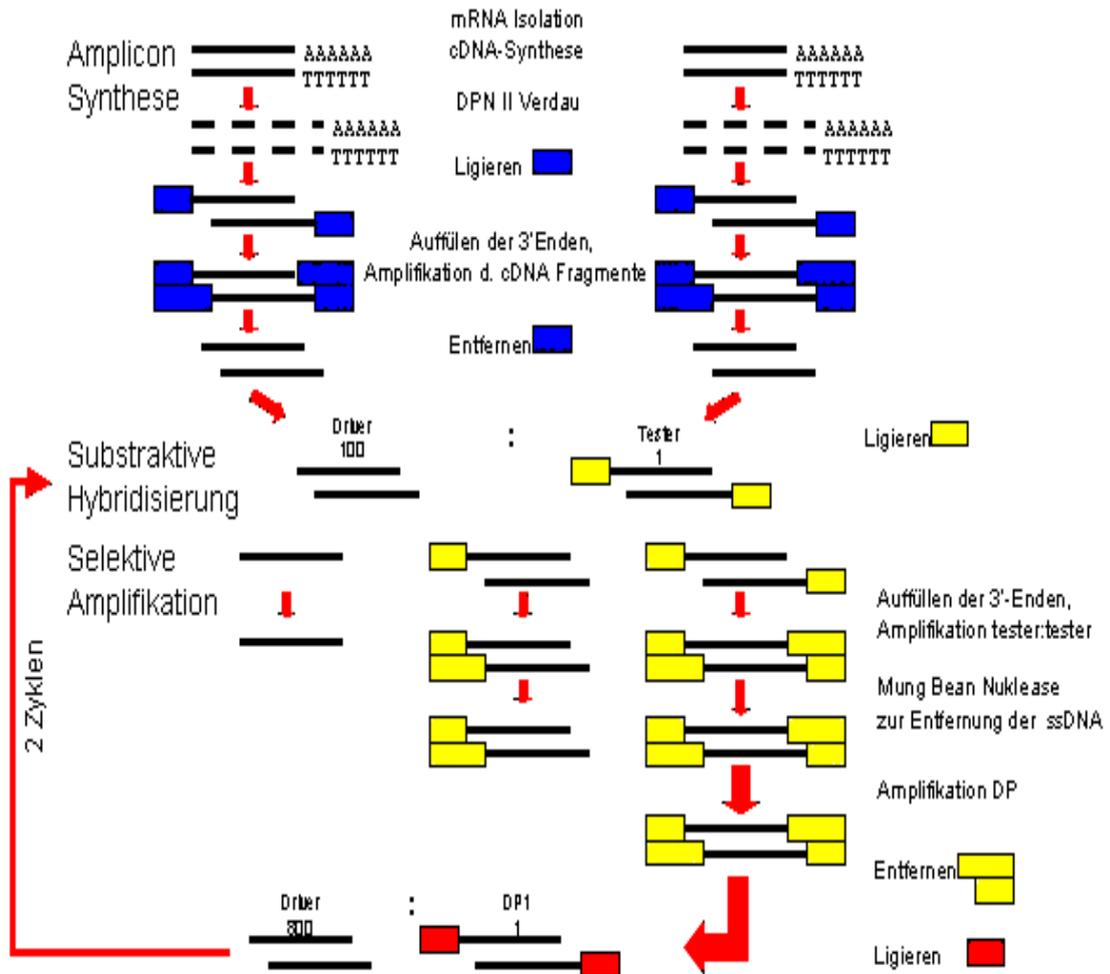
Bei der Zelllinie QGP-1 handelt es sich um eine humane Tumorzelllinie, die aus einem Karzinoid des Pankreas gewonnen wurde (Kaku et al., 1980, Evers et. al., 1991). Die QGP-1 Zellen erhielten RPMI Medium mit 10% FCS und 100µg/ml Penicillin-Streptomycin. Die Kultivierung der Zellen erfolgte routinemäßig in 75 cm<sup>3</sup> Gewebekulturflaschen in wassergesättigter Atmosphäre bei 37<sup>0</sup> C unter Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luft. Die Passagierung erfolgte 1-2 x wöchentlich. Dazu wurden die konfluent bewachsenen Kulturflaschen in einer sterilen Werkbank von Medium befreit und mit PBS gewaschen. Durch 4 ml Trypsin-EDTA-Lösung wurden die Zellen vom Boden gelöst, die darauf folgende Zugabe von Medium bewirkte die Inaktivierung des Trypsins. Mit der Neubauer-Zählkammer erfolgte die Ermittlung der Zellzahl/ml Medium, um in gewünschter Dichte aussäen zu können.

### **2.3.2. 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-CdR) Behandlung**

Die Identifizierung der durch Methylierung differentiell exprimierten Gene setzte voraus, dass eine Gruppe der QGP-1 Zelllinie unter Zugabe des Methyltransferase-Hemmstoffs 5-Aza-2'-Deoxycytidin kultiviert wurde. Dafür wurden die Zellen ausgesät und zunächst 24h unter Normalbedingungen gezüchtet. Es erfolgte ein Mediumwechsel und die Zugabe von 5-Aza-2'-Deoxycytidin in einer Konzentration von 1µM. Im Verlauf von weiteren 72 h wurde alle 24 h das Medium gewechselt und 5-Aza-2'-Deoxycytidin hinzugefügt. Danach erfolgte die Isolation von Gesamt-RNA. Als Kontrolle dienten gleichzeitig kultivierte Zellen der QGP-1 Linie, die nicht mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelt wurden.

## 2.4. cDNA Representational Difference Analysis ( RDA )

Die einzelnen Schritte der cDNA Representational Difference Analysis sind zur besseren Übersicht in Abbildung 4 schematisch dargestellt.



**Abbildung 4:** Schematischer Ablauf der cDNA Representational Difference Analysis. Nach mRNA-Isolation und cDNA-Synthese wurde mittels Oligonukleotidadapter-Ligation und Vervielfältigung durch PCR das Amplicon generiert. Es folgten zwei Zyklen bestehend aus subtraktiver Hybridisierung und selektiver Amplifikation nach jeweiliger Ligation neuer Adapter.

### 2.4.1. Isolierung von Gesamt-RNA aus Zellen

Das Nährmedium wurde aus den Zellkulturflaschen mittels steriler Pasteurpipetten und einer Absaugpumpe entfernt und die Zellen mit 1x PBS gewaschen. Nach Zugabe von je 4 ml RNA Clean wurden die Flaschen 5 min bei Raumtemperatur niedrigfrequent geschüttelt und der Inhalt anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Danach erfolgte die Zugabe von 1/10 Volumen (= 400µl) Chloroform und eine 15 minütige Inkubation auf Eis. Anschließend wurden die Proben bei 4 °C mit 5000 UpM für 20 Minuten zentrifugiert. Die oberen Phasen wurde in ein neues Röhrchen abgenommen, danach wurde das gleiche Volumen an Isopropanol zugegeben und abermals 15 Minuten auf Eis inkubiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation mit 14000 UpM bei 4°C. Nach diesem Schritt wurde das Pellet leicht getrocknet und anschließend in 200µl DNase I Puffer gelöst. Nach Zugabe von 200 U DNase I wurde der Ansatz 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Die Entfernung der Proteine nach der Enzymatischen Reaktion erfolgte durch einmalige Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) - Extraktion. Dazu wurde 200µl PCI zu der Reaktion gegeben und der Ansatz nach Mischung bei 4°C 10 Minuten mit 14000 UpM zentrifugiert.

Die obere Phase wurde in ein neues Röhrchen überführt und zur Präzipitation mit 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat und 3x Volumen 100%igen Ethanol versetzt. Nach 2 h Kühlung bei -80°C und Zentrifugation bei 4°C mit 14000 UpM für 15 Minuten erfolgte die Abnahme des Überstandes und ein Waschvorgang mit 70% Ethanol. Nach kurzer Zentrifugation und Entfernung des Alkohols folgte die Trocknung des Pellets bei 37°C im Heizblock. Das Pellet wurde schließlich in 400 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

### 2.4.2. Quantifizierung von Gesamt-RNA

Die Bestimmung der Konzentration einer RNA-Lösung erfolgte photometrisch bei 260 nm. Die Ausgangslösung wurde abhängig von der vermuteten Konzentration 1:100 auf ein Volumen von 500 µl mit

bidestilliertem Wasser verdünnt und in eine Quarzküvette gegeben. Die gemessene optische Dichte sollte im Bereich von 0,1 bis 1,0 liegen. Der RNA-Gehalt konnte so annähernd errechnet werden.

Einzelsträngige RNA:

1 OD<sub>260</sub> = 40 µg/ml

Nach Messung ergab sich folgende Gesamt-RNA-Konzentration:

---

QGP (+): 0,64 µg/µl

QGP (-): 0,55 µg/µl

---

### 2.4.3. mRNA-Extraktion

Die mRNA macht nur ungefähr 2-3% der Gesamt-RNA aus. Da die Isolation der mRNA nicht quantitativ ist, muss die Ausgangsmenge so gewählt werden, dass man mindestens 2 µg mRNA erhält. Dieses ist einerseits die Mindestmenge für das cDNA-Synthesystem und andererseits ein Richtwert für die Mindestmenge mRNA, bei der man von einer Repräsentation sprechen kann, d. h. dass alle in den Zellen enthaltenen Transkripte entsprechend ihrer Abundanz vertreten sind. Für die mRNA-Isolation wurden etwa 400 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Die Isolation erfolgte mit dem PolyAtract mRNA Isolationssystem (Promega). Bei diesem Verfahren macht man sich zu nutze, dass eukaryontische mRNAs 3'-Polyadenin-Anhänge enthalten. Diese können mit hinzugegebenen biotinmarkierten Oligo-dT-Primern hybridisieren. Streptavidin-assoziierte paramagnetische Partikel (Abk.: SA-PmP) binden wiederum an das Biotin und erlauben mittels eines Magnetständers die Fixierung der mRNA an der Gefäßwand. Zu den mRNA-Lösungen wurden je 100 µl H<sub>2</sub>O hinzugegeben und die Lösungen anschließend für 10 Minuten bei 65°C inkubiert. Danach wurde je 13 µl 20x SSC sowie 3 µl biotinmarkierte Oligo-dT-Primer zugefügt. Die Proben wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die SA-PmP wurden mit 300 µl 0,5x SSC gewaschen und mittels Magnetständer abgetrennt, so daß der klare Überstand abgenommen werden konnte. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt

und die Partikel in 100 µl 0,5x SSC aufgenommen. Die RNA-Lösungen wurden zu je einer dieser Partikel-Lösungen gegeben und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die Lösungen alle 2 Minuten gemischt wurden. Die Lösungen wurden im Magnetständer aufgetrennt, der klare Überstand abgenommen und zu die SA-PmP wiederholt mit 0,5x SSC sowie 0,2x SSC gewaschen, wobei die Lösungen zwischen den Waschschritten mittels Magnetständer aufgetrennt und der Überstand abgenommen wurde. Anschließend wurde die mRNA in zwei Schritten mit insgesamt 250µl RNase-freiem Wasser eluiert. Zu diesen 250 µl mRNA wurden 600 µl 100% Ethanol sowie 25 µl Natrium-Acetat gegeben und die Lösung 20 Minuten bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation bei 15000 UpM für 15 Minuten bei 4°C wurde der Überstand verworfen, 500 µl 70% Ethanol hinzugefügt und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und das Pellet nach kurzer Trocknung in 10 µl RNase-freiem Wasser aufgenommen.

#### **2.4.4. Synthese doppelsträngiger cDNA**

Zur Synthese doppelsträngiger cDNA wurde das cDNA Synthesis System (Gibco BRL) verwendet. Es wurde dabei die gesamte isolierte mRNA der QGP (+) - sowie QGP (-) Zellen eingesetzt.

Die Erststrangsynthese, bei der die mRNA als Matrize diente erfolgte durch die Aktivität des Enzyms M-MLV Reverse Transkriptase. Als Primer diente dabei Oligo-dT-DNA von 12-18 Basen Länge.

Zu den mRNA-Lösungen wurden je 15 µl RNase freies Wasser sowie 5 µl Oligo-dT-Primer (50 µg/ml) gegeben und die Ansätze für 10 Minuten bei 70° C inkubiert und danach auf Eis gelegt. Je 10 µl First-Strand-Buffer, 5µl DTT (0,1M) und 2,5 µl dNTP-Mischung (10mM) wurden hinzugefügt und die Ansätze für 2 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt wurden 2,5 µl M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/µl) zu den Ansätzen gegeben und die Reaktionen für eine Stunde bei 37°C inkubiert und anschließend auf Eis gelegt.

Die M-MLV Reverse Transkriptase besitzt zusätzlich eine endogene RNase H -Aktivität. Bei der Synthese der Erststrang-cDNA wird der RNA-

Strang des RNA/cDNA Hybrids in regelmäßigen Abständen geschnitten und zum Teil verdaut. Es bleiben nur noch RNA-Oligomere komplementär an die cDNA gebunden. Diese dienen dann als Primer für die Zweitstrangsynthese durch die E. coli Polymerase I. Weiterhin schneidet E. coli RNase H als Endonuklease die RNA, sodass zum Teil sehr kurze RNA-Oligomere entstehen, deren komplementäre Bindung sich löst und diese somit auch nicht als Primer für die Polymerase I dienen.

Der am 5'-Ende gelegene RNA-Oligomer wird schließlich durch die RNase H Exonuklease-Aktivität der Polymerase I entfernt. Die dabei entstehende endständige einzelsträngige cDNA ist Substrat für die 3'Exonuklease Aktivität der Polymerase I. Es kommt bei der Synthese somit zu einem Sequenzverlust von ungefähr 10 Nukleotiden.

Zu den Reaktionsansätzen der Erststrangsynthese wurden 290 µl DEPC-behandeltes Wasser, 7,5 µl dNTP-Mischung (10mM), 40 µl Zweitstrangpuffer, 10 µl E. coli Polymerase I (5U), 1,75 µl E. coli RNase H (5U) sowie 1,25 µl E. coli Ligase hinzugefügt. Die Reaktion wurde 2 Stunden bei 16°C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt und durch Zugabe von 6,25 µl EDTA (1M) gestoppt.

Es folgte eine einmalige Extraktion mit 406,25 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) zur Entfernung der Proteine. Anschließend wurden die Phenolspuren mittels Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) entfernt.

Die Fällung der DNA erfolgte nach Zugabe von je 43 µl 3M Natrium-Acetat (pH 5,4), 940 µl 100% Ethanol und 2 µl Glykogen (1 µg/µl) bei -20° C für 20 Minuten. Nach Zentrifugation bei 15000 UpM für 15 Minuten bei 4°C wurde das jeweilige Pellet mit 500 µl Ethanol 70% gewaschen, ein weiteres Mal zentrifugiert, getrocknet und in 20µl TE (pH 8,0) aufgenommen.

#### **2.4.5. Restriktion der doppelsträngigen cDNA**

Die cDNA Populationen wurden mit dem Restriktionsenzym Dpn II (New England Biolabs) behandelt. Dieses ist ein rekombinantes Enzym, welches aus E. coli Populationen gewonnen wird, die das Dpn II Gen von

Diplococcus pneumoniae G41 tragen. Das Enzym benötigt die Erkennungssequenz GATC und schneidet den cDNA Doppelstrang versetzt, sodass an den Schnittstellen ein einzelsträngiger 5'-Überhang entsteht. Durch den Verdau mit Dpn II entstehen cDNA-Fragmente von durchschnittlich 256 bp Länge, was eine effiziente subtraktive Hybridisierung und Amplifikation ermöglicht.

Weiterhin können die an den 5'-Überhang ligierten Oligonukleotid-Adapter durch Dpn II-Behandlung wieder entfernt werden.

Restriktionsansatz:

Komponente	Volumen
cDNA	20 µl
10x Dpn II-Puffer	5 µl
Bidestilliertes Wasser	22 µl
DpnII ( 10 U/µl )	3 µl
Endvolumen	50 µl

Die Reaktion wurde 4 Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mit TE (pH 8.0) auf 100 µl aufgefüllt. Es folgte eine zweimalige Phenol/Chloroform/Isoamylalhol (25:24:1)- Extraktion sowie eine einmalige Chloroform/Isoamylalkohol (24:1)- Extraktion. Die cDNA wurde dann durch Zugabe von 33 µl 7,5 M Ammonium-Acetat, 330 µl Ethanol p. a. und 1 µl Glykogen ( 2 µg/µl ) 20 Minuten bei - 20°C gefällt.

Nach Zentrifugation bei 14000 Umdrehungen für 15 Minuten wurde der Überstand abgenommen, das Pellet mit 300 µl Ethanol 75% gewaschen und für 15 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 12 µl TE aufgenommen.

#### 2.4.6. Adaptersequenzen

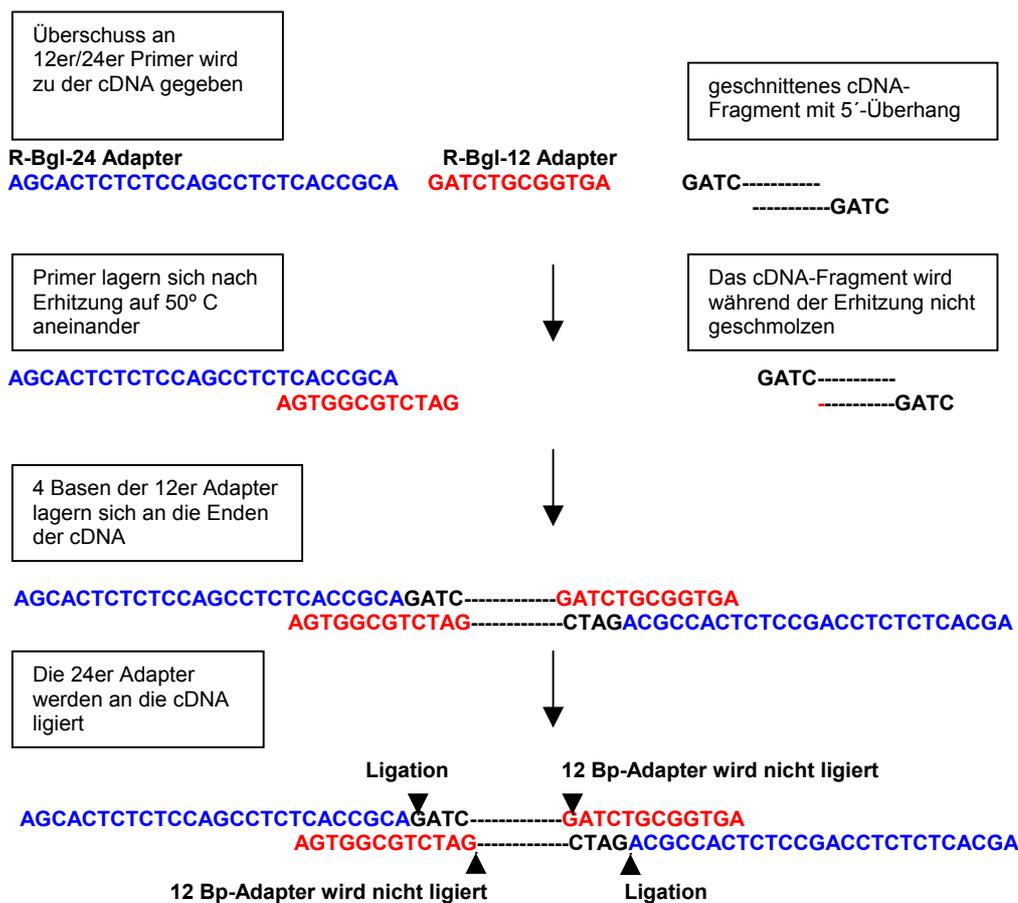
Für die Adapter wurden folgende Oligonukleotid-Adapter eingesetzt. Die Synthese der Adapter wurde bei Metabion in Auftrag gegeben, diese wurden mittels HPLC aufgereinigt und lyophilisiert geliefert.

Sequenzen:

R-Bgl-12: 5'-GATCTGCGGTGA-3'  
 R-Bgl-24: 5'-AGCACTCTCCAGCCTCTCACCGCA-3'  
 J-Bgl-12: 5'-GATCTGTTTCATG-3'  
 J-Bgl-24: 5'-ACCGACGTCGACTATCCATGAACA-3'  
 N-Bgl-12: 5'-GATCTTCCCTCG-3'  
 N-Bgl-24: 5'-AGGCAACTGTGCTATCCGAGGGAA-3'

**2.6.7. Ligation der R-Bgl-24 Adapter**

Durch die Ligation von Adaptern bekannter Sequenz können die cDNA-Populationen mit Primern, die den Adaptern entsprechen, mittels PCR amplifiziert werden, sodass die Menge an Ausgangsmaterial für die Differenzanalyse erhöht wird (siehe Abbildung 5).



**Abbildung 5:** Ligationsreaktion. Die 12-bp Adapter dienen als Bindeglied zwischen cDNA und 24 bp-Oligonukleotid (nicht kovalent gebunden).

Um weiterhin die ursprüngliche mRNA-Population zu repräsentieren sollten die Sequenzen in ihrer Anzahl untereinander nicht verschoben werden. Während der Ligation lagern sich am 5'-Ende der 12 Basenpaar-Adapter die Überhänge der Dpn II behandelten cDNA an, am 3'-Ende die 24-Basenpaar-Adapter, sodass eine direkte Ligation der benötigten 24-Bp-Adapter möglich wird. Ligationsansatz ( je für **QGP (-)** und **QGP (+)** ) :

Komponente	Volumen
Verdaute cDNA	12 µl
R-Bgl-12 Oligomere ( 1 µg/µl )	4 µl
R-Bgl-24 Oligomere ( 2 µg/µl )	4 µl
5x Ligasepuffer	12 µl
Bidestilliertes Wasser	25 µl
T4 DNA Ligase ( 1 U/µl )	3 µl

Endvolumen	60 µl
------------	-------

Für diese "Brückenbildung" ist ein langsames Absenken der Anlagerungstemperatur (Annealing) notwendig. Dieses geschieht in einem Thermal Cycler. Der Ligationsansatz wird zunächst 1 Minute bei 50°C erhitzt und dann innerhalb einer Stunde kontinuierlich auf 10°C abgekühlt, das heißt alle 90 Sekunden um 1 °C herabgesetzt. Bei 10°C wurden 3 µl T4 DNA-Ligase (Gibco BRL) hinzugegeben und die Reaktion bei 14°C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Reaktionen durch Zugabe von 140 µl TE (pH 8.0) auf 200 µl verdünnt.

#### 2.4.8. Ampliconsynthese

Vor der Ampliconsynthese wurden die Mindestmengen an Ligat ermittelt, die nach PCR-Amplifikation maximale und vergleichbare Mengen an DNA liefern. Dazu wurden verschieden starke Verdünnungen der Ligationsreaktion als Ausgangsmaterial für die PCR benutzt.

Die Mengen an PCR-Produkt (Amplicon) wurden anhand von gelelektrophoretischer Auftrennung und photometrischer Quantifizierung verglichen. Das Temperaturprogramm des Thermal Cyclers betrug 72°C

für 3 Minuten, in denen sich die R-Bgl-12 Oligomere ablösen. Diese Temperatur wurde gehalten und die Taq-Polymerase zum Ansatz gegeben. Die Temperatur wurde für weitere 5 Minuten bei 72°C gehalten, welches zur Auffüllung der einzelsträngigen 3'-Enden führte.

Ampliconsynthesereaktion:

Komponente	Volumen
Verdünnte Ligationsreaktion	1 µl
5x- PCR-Puffer	40 µl
dNTP-Mischung (10 mM)	6,8 µl
R-Bgl-24 Primer (2µg/µl)	1 µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	1 µl
Bidestilliertes Wasser	150,2 µl
Endvolumen	200 µl

Danach folgten 20 Zyklen mit je 1 Minute bei 95°C zur Denaturierung der DNA und 3 Minuten bei 72°C zur Anlagerung der Primer und DNA-Synthese. Die abschließende DNA-Synthese fand bei 72°C für 10 Minuten statt. Danach wurde das Amplicon auf 4°C abgekühlt.

Um genügend Ausgangsmaterial für die Differenzanalyse zu erhalten, wurden 45 der 200 µl PCR-Ansätze für QGP (+) und QGP (-) in die PCR-Reaktion eingesetzt.

Die Produkte wurden in je einem 50 ml Röhrchen vereint und zweimal mit 9 ml Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol(25:24:1) und einmal mit 9 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 900 µl Natrium-Acetat und 30 ml Isopropanol bei -20 °C gefällt und 15000 UpM zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 10 ml 75% Ethanol gewaschen, zentrifugiert und getrocknet. Danach wurde das Pellet in 100 µl TE (pH 8.0) aufgenommen und photometrisch quantifiziert.

---

QGP (+): 4,75 µg/µl

QGP (-): 3,94 µg/µl

---

### 2.4.9. Entfernung der R-Bgl-24 Adapter

Jeweils 350 µg von jedem Amplicon wurden mit Dpn II behandelt, wodurch die Adapter selektiv entfernt wurden.

Restriktionsansatz:

Komponente	QGP (+)	QGP (-)
Amplicon-cDNA (350 µg):	74 µl	89 µl
10x Dpn II-Puffer:	140 µl	140 µl
Dpn II (10 U/µl):	60 µl	60 µl
Bidestilliertes Wasser:	1126 µl	1111 µl
Endvolumen:	1400 µl	1400 µl

Die Reaktionen wurden für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde jede Reaktion in zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und einer zweifachen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol sowie einer einfachen Chloroform/Isoamylextraktion unterzogen. Nach Zugabe von 70 µl 3M Natrium-Acetat (pH 5,4) und 770 µl Isopropanol wurde die DNA 30 Minuten bei -20°C gefällt und mit 15000 UpM für 15 Minuten zentrifugiert. Nach Waschung mit 75% Ethanol, Zentrifugation und Trocknung der Pellets wurden diese in jeweils 100 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen und die zugehörigen Proben vereint. Die so erhaltene Population wird im Folgenden als **Driver** bezeichnet.

---

QGP (+): 725 ng/µl

QGP (-): 696 ng/µl

---

### 2.4.10. Präparation des Tester

Jeweils 10 µg der Driver wurden zur Entfernung der noch in Lösung befindlichen R-Bgl-24 Adapter in einem 1% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Aufgrund ihrer geringen Größe laufen diese Oligonukleotide

schneller und sind als distinkte Bande von der repräsentativen DNA unterscheidbar. Die jeweiligen Gelblöcke wurden ausgeschnitten und die DNA mittels QIA-Ex-Kit aus dem Gel extrahiert. Die aufgereinigte cDNA wurde durch Zugabe von von 40 µl 3 M Natrium-Acetat, 440 µl Isopropanol sowie 2 µl Glykogen (1 µg/µl) bei -20° C für 20 Minuten gefällt und bei 15000 UpM 15 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde nach Waschung mit 75% Ethanol getrocknet und in 20 µl TE (pH 8,0) aufgenommen.

Zur Ligation neuer, Tester-spezifischer Adapter ( J-Bgl-24), wurden jeweils 2 µg cDNA eingesetzt. Die Reaktion, d.h. die langsame Anlagerung durch Absenkung der Temperatur und Zugabe der Ligase bei 10°C, wurde identisch zur Ligationsreaktion der R-Bgl-Adapter im Thermal Cycler durchgeführt und die Ansätze anschließend mit je 120 µl TE (pH 8,0) auf etwa 10 ng pro ligiertem µl Tester verdünnt.

Reaktionsansatz:

Komponente	Volumen
cDNA (0,5 µg/µl)	4 µl
J-Bgl-12 Oligomere ( 1 µg/µl )	4 µl
J-Bgl-24 Oligomere ( 2 µg/µl )	4 µl
5x Ligasepuffer	12 µl
Bidestilliertes Wasser	33 µl
T4 DNA Ligase ( 1 U/µl )	3 µl
Endvolumen	60µl

#### 2.4.11. Überprüfung der Ligation mittels PCR

Dieser Schritt wurde entwickelt, um vor der subtraktiven Hybridisierung sicher zu stellen, daß die J-BGL-24-Oligomere an die DNA-Fragmente ligiert wurden. Eine mögliche Hybridisierung ohne J-BGL-24 markierte Tester macht die folgende Amplifikation unmöglich und führt so zu einem Verlust an Tester und Driver-DNA.

Reaktionsansatz:

Komponente	Volumen
Tester-Ligat-DNA	4 µl
5x-PCR-Puffer	20 µl
dNTP-Mischung (10 mM)	3,4 µl
J-Bgl-24-Primer (2 µg/µl)	0,5 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 µl
Bidestilliertes Wasser	71,1 µl

Endvolumen: 100 µl

Als Primer wurden die J-BGL-24-Oligomere verwendet. Ein DNA-Fragment, an welches sicher J-BGL-24-Oligomere ligiert wurden, diente bei dieser PCR als Positivprobe.

#### 2.4.12. Subtraktive Hybridisierung

Bei der ersten subtraktiven Hybridisierung wurden Driver und Tester im Verhältnis 100:1 eingesetzt. Dazu wurden jeweils 40 µg Driver mit 0,4 µg Tester gemischt und das Volumen mit bidestilliertem Wasser auf 120 µl eingestellt.

	<u>QGP (+)-Driver</u>	<u>QGP (-)-Driver</u>
Driver 40 µg:	55,17 µl	57,47 µl
	<b>Tester (-)</b>	<b>Tester (+)</b>
Tester 0,4 µg:	40 µl	40 µl
	95,17 µl	97,47 µl

Die Mischungen wurden zweimal mit 120 µl Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und einmal mit Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert und anschließend durch Zugabe von 30 µl Ammonium-Acetat und 380 µl 100% Ethanol 10 Minuten bei - 70°C gefällt. Vor der Zentrifugation wurden die Ansätze zur Minimierung des Ausfallens von Salzen 2 Minuten bei 37°C

inkubiert. Es folgte ein zweimaliger Waschvorgang mit 75% Ethanol und anschließende Trocknung der Pellets.

Durch 2 minütiges Auf-und Abpipettieren wurden die Pellets in jeweils 4 µl EEx3-Puffer gründlich resuspendiert und durch 5 minütige Inkubation bei 37°C vollständig gelöst. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Ansätze mit je 35 µl Mineralöl (Sigma) überlagert. Dieses führt zu einem annähernd runden Flüssigkeitstropfen.

Die subtraktiven Hybridisierungen fanden in einem Thermal Cycler statt. Zunächst wurden die Proben zur Denaturierung der DNA für 5 Minuten auf 98°C erhitzt. Unmittelbar nach Abkühlung auf 67°C wurden jeweils 1 µl 5 M Natriumchloridlösung direkt zur DNA pipettiert. Während der folgenden 20-stündigen Inkubation bei 67°C kommt es zur vollständigen Hybridisierung der DNA-Einzelstränge.

Im Anschluss daran wurde das Mineralöl vorsichtig entfernt und die Hybridisierungsmischung schrittweise mit insgesamt 379 µl TE (pH 8,0) sowie 21 µl TE (pH 8,0), welches 2 µg/µl Hefe-RNA enthielt, verdünnt.

Subtraktive Hybridisierung:

<u>Komponente</u>	<u>Volumen</u>
Tester-DNA (0,4 µg)	
Driver-DNA (40 µg)	
EEx3-Puffer	4 µl
NaCl (5 M)	1 µl
<hr/>	
Endvolumen:	5 µl

#### **2.4.13. Erzeugung des ersten Differenzproduktes (DP1)**

Die Erzeugung des ersten Differenzproduktes ist in drei Schritte aufgeteilt. In einem ersten Schritt wird das Hybridisierungsprodukt mittels PCR mit wenigen Zyklen amplifiziert. Es folgt ein Verdau mit Nuklease zur Entfernung einzelsträngiger DNA und ein weiterer, längerer PCR-Schritt zur selektiven Amplifikation doppelsträngiger, mit J-Bgl-24-Oligonukleotid-gekoppelter Sequenzen.

## Reaktionsansatz:

Komponente	Volumen
Hybridisierungs-DNA	20 $\mu$ l
5x-PCR-Puffer	40 $\mu$ l
dNTP-Mischung (10 mM)	6,8 $\mu$ l
J-Bgl-24-Primer (2 $\mu$ g/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Taq-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Bidestilliertes Wasser	131,2 $\mu$ l
Endvolumen:	200 $\mu$ l

Die Proben wurden im Thermal-Cycler für 3 Minuten auf 72°C erwärmt, was zur Ablösung der J-Bgl-12-Adapter führte. Nach dieser Zeit wurde die Taq-Polymerase hinzugegeben und die Proben nochmals 5 Minuten bei 72°C inkubiert. Nach Zugabe der J-Bgl-24 Adapter folgten 11 Zyklen, wobei jeder Zyklus aus 1 Minute bei 95°C und 3 Minuten bei 70°C bestand.

Abschließend fand die DNA-Synthese bei 72°C für 10 Minuten statt. Es wurden je 8 Proben für QGP (+) und QGP (-) eingesetzt. Diese wurden in oben beschriebener Weise mit PCI extrahiert, gefällt und gewaschen. Das entstandene Pellet wurde in 40  $\mu$ l 0,2x TE-Puffer gelöst.

Zur Entfernung einzelsträngig vorliegender nicht amplifizierter Driver-DNA wurden 20  $\mu$ l der Proben mit Mung Bean Nuklease (New England Biolabs) behandelt. Diese Nuklease greift ausschließlich einzelsträngige DNA an.

## Reaktionsansatz:

Komponente	Volumen
PCR-Produkt	20 $\mu$ l
10x Mung Bean Nuklease-Puffer	4 $\mu$ l
Mung Bean Nuklease (10 U/ $\mu$ l)	2 $\mu$ l
Bidestilliertes Wasser	14 $\mu$ l
Endvolumen:	40 $\mu$ l

Die Reaktionen wurden 35 Minuten bei 30°C inkubiert, durch Zugabe von 160 µl 50 mM Tris-HCl (pH 8,9) gestoppt und für weitere 5 Minuten bei 98°C im Thermocycler inkubiert. Auf diesen Schritt folgte eine erneute selektive Amplifikation mit verändertem PCR-Programm.

Reaktionsansatz:

Komponente	Volumen
Nuklease-behandelte-DNA	20 µl
5x-PCR-Puffer	40 µl
dNTP-Mischung (10 mM)	6,8 µl
J-Bgl-24-Primer (2 µg/µl)	1 µl
Taq-Polymerase (5 U/µl)	1 µl
Bidestilliertes Wasser	131,2 µl

Endvolumen: 200 µl

Die Proben wurden für eine Minute bei 95°C denaturiert und auf 80°C abgekühlt. Bei dieser Temperatur wurde die Taq-Polymerase zu den Ansätzen gegeben. Es folgten 20 Zyklen, die aus einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 1 Minute und einem Annealing und Syntheseschritt bei 70°C für 3 Minuten bestanden. Abschließend folgte wieder ein Syntheseschritt bei 72°C für 10 Minuten.

Es wurden wieder 8 Ansätze für je QGP (+) und QGP (-) eingesetzt. Im Gegensatz zu der ersten selektiven Amplifikation wurden die Primer direkt zu den Proben gegeben.

Die jeweiligen Proben wurden vereint und mit PCI extrahiert, gewaschen und gefällt. Das Pellet wurde in 100 µl TE (pH8,0) aufgenommen.

#### **2.4.14. Erzeugung des zweiten Differenzproduktes (DP2)**

Die Herstellung des zweiten Differenzproduktes erfolgt in der selben Art und Weise wie in den vorhergehenden Schritten. Zum Abschneiden der J-BGL-24- Adapter wird ein Teil des DP1 mit Dpn II behandelt. Die Präparation des Testers erfolgte nach gelelektrophoretischer Auftrennung und Gelextraktion zur Entfernung der J-BGL-24 Adapter. Nach photometrischer Messung wurden 2 µg der aufgereinigten DP1 zur Ligation von

neuen Adaptern, N-BGL-24, eingesetzt. Ein Aliquot der Ligations-reaktion wurde mittels TE auf eine Konzentration von 1,25 ng/ $\mu$ l eingestellt. Vor der Hybridisierung wurde zur Überprüfung der Ligation eine PCR durchgeführt, bei der der Tester als Template diente und die N-BGL-24-Adapter als Primer eingesetzt wurden. Für die anschließende subtraktive Hybridisierung wurde ein Tester/ Driver- Verhältnis von 1:800 gewählt, welches einer DNA-Menge von 40  $\mu$ g Driver und 50 ng des Testers entspricht. Das gewählte Verhältnis erhöht die Selektivität des Verfahrens ohne zu einem zu großen Verlust an Sequenzen zu führen. Nach der sich anschließenden selektiven Amplifikation erhält man das zweite Differenzprodukt.

#### 2.4.15. Restriktionsspaltung DP2

Das neu entstandene zweite Differenzprodukt wurde wiederum mit Dpn II-Enzym bei 37<sup>0</sup>C für 4 Stunden behandelt, gefällt und gelelektrophoretisch aufgetrennt.

Komponente	QGP (+)	QGP (-)
DP2- DNA	40 $\mu$ l	40 $\mu$ l
10x Dpn II-Puffer:	30 $\mu$ l	30 $\mu$ l
Dpn II (10 U/ $\mu$ l):	15 $\mu$ l	15 $\mu$ l
Bidestilliertes Wasser:	215 $\mu$ l	215 $\mu$ l
Endvolumen:	300 $\mu$ l	300 $\mu$ l

Nach PCI-Aufreinigung und Ethanol-Fällung wurde die DNA in 30  $\mu$ l TE aufgenommen. Danach erfolgte eine Auftrennung in einem 2% Agarose-Gel. Die dabei sichtbar werdenden Banden wurden ausgeschnitten, einzeln mittels QIA EX-Kit aufgereinigt und in je 30  $\mu$ l bidestilliertem Wasser aufgenommen. Dadurch entstehen Restriktionsfragmente mit überhängenden GATC-Enden. Mittels dieser Enden lassen sich die cDNA-Fragmente in die Bam HI Schnittstelle des vorbereiteten pBluescript SKII+ Vektor ligieren.

## 2.5. Klonierung der Differenzprodukte

Die RDA-Differenzprodukte enthalten eine Vielzahl von differentiell exprimierten cDNA-Fragmenten. Um diese zu Sequenzieren und auf differentielle Expression testen zu können, muss man ein Verfahren wählen, diese Fragmente zu vermehren und sie gleichzeitig zu separieren. Dazu kloniert man diese Fragmente in einen Plasmidvektor, der dann in einen E. coli- Stamm transformiert wird. Das schnelle Wachstum der E.coli Bakterien schafft eine große Anzahl von Bakterien, die diesen fragmenttragenden Plasmidvektor besitzen. Weiterhin trägt durch das entsprechende Ausimpfen der Bakterien eine Kolonie einen Plasmidvektor-Klon. Somit ist eine Separation gewährleistet. Nach Isolation der Plasmidvektoren aus den Bakterien lässt sich das Fragment leicht sequenzieren, da die Sequenz des sie umgebenden Vektors bekannt ist und so spezielle Primer entworfen werden können.

### 2.5.1. Vektorpräparation

Die cDNA-Representational Difference Analysis hat als Ergebnis eine Anzahl von Genfragmenten, die differentiell exprimiert werden. Eine Identifikation dieser Fragmente erfordert zunächst eine Sequenzierung. Um diese Fragmente sequenzieren zu können müssen diese stark vermehrt werden, da die Sequenzierung eine gewisse Ausgangsmenge voraussetzt, und eine bekannte Anfangssequenz besitzen, an der die Sequenzierungs-PCR ansetzen kann.

Um diese Bedingungen zu erfüllen kloniert man die Fragmente in einen Plasmidvektor, der dann in E.coli Bakterien transformiert und durch deren Wachstum vermehrt wird. Durch die bekannte Sequenz des Vektors wird weiterhin die Sequenzierung ermöglicht, eine Ampicillin-Resistenz-Sequenz innerhalb des Vektors erlaubt eine selektive Kultur der transformierten Bakterien auf Ampicillin-haltigen Nährböden. Für die Klonierung der RDA-Fragmente wurde der pBluescript SK II + Plasmidvektor verwendet (siehe Abbildung 6). Dieser Vektor verfügt neben der Ampicillin-Resistenz-Sequenz über eine Multiple Cloning Site, die eine

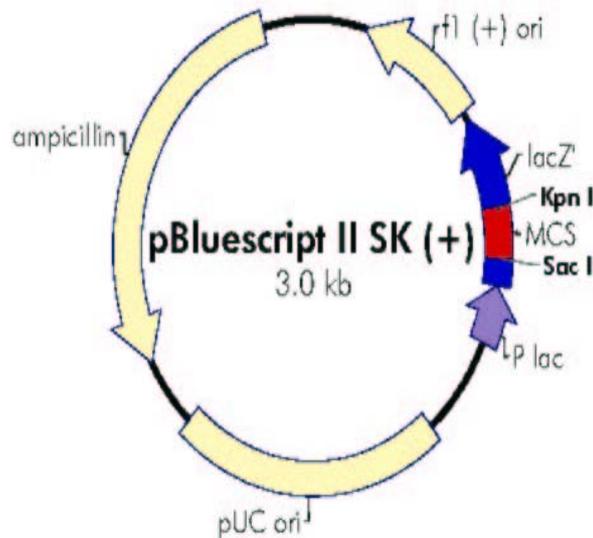
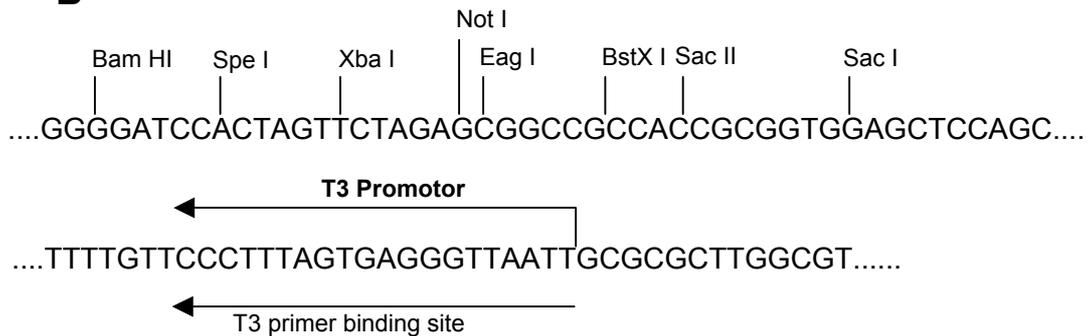
große Anzahl von Schnittstellen für definierte Restriktionsendonukleasen bietet. Die Schnittstellen sind von Sequenzen eingerahmt, anhand derer man Primer generieren kann, die eine Sequenzierung der einklonierten Fragmente möglich machen. Vor der eigentlichen Klonierung musste der Vektor zur Aufnahme von Fragmente vorbereitet werden. Diese Vorbereitungen waren das Schneiden des Vektors mit dem Restriktionsenzym Bam HI sowie die Dephosphorylierung der Schnittstellen.

### 2.5.1.1. Restriktionsverdau mit Bam HI

Der Schneiden des Plasmidvektor mit dem Enzym Bam HI führte zu einer Öffnung des Plasmidvektorrings mit überhängenden GATC-Schnittenden. An diese konnten die RDA-Fragmente komplementär binden und einligiert werden. Der Ansatz wurde bei 37°C 14 Stunden inkubiert. Zur Kontrolle des Verdau wurden 10 µl des Ansatzes gelektrophoretisch aufgetrennt

Reaktionsansatz:

Komponente	Volumen
Plasmidvektor (3,5 µg/µl)	2 µl
Sure Cut Buffer	10 µl
Bidestilliertes Wasser	81 µl
Bam HI ( 10 U/µl )	7 µl
Endvolumen	100 µl

**A****B**

**Abbildung 6.** Karte des pBluescript II SK (+)- Vektors. A) Die Vektorkarte zeigt die funktionellen Abschnitte des Plasmidvektors B) Ausschnitt aus der Multiple Cloning Site (MCS) mit Schnittstelle für das Bam HI- Restriktionsenzym. Der für die T3 Primer Binding Site spezifische Primer diente als Sequenzierungsprimer (Vektorkarte erstellt durch Stratagene)

### 2.5.1.2. Dephosphorylierung des Plasmidvektors

Die Schnittenden des Plasmidvektors mussten in einem weiteren Schritt dephosphoryliert werden, um zu verhindern, dass der linearisierte Vektor während des Einligierens der Fragmente sich zu seiner Ringform schließt, ohne ein Fragment aufzunehmen.

Reaktionsansatz:

Komponente	Volumen
Plasmidvektor	95 $\mu$ l
10x Puffer	12 $\mu$ l
Bidestilliertes Wasser	9 $\mu$ l
Alkalische Phosphatase	4 $\mu$ l
Endvolumen	120 $\mu$ l

Der Dephosphorylierungsansatz wurde bei 37°C eine Stunde inkubiert. Anschließend erfolgte eine Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion sowie eine Ethanol-Fällung. Das getrocknete Pellet wurde in 40  $\mu$ l TE aufgenommen und bei -20°C gelagert.

### 2.5.2. Ligation der Fragmente

Die GATC-Überhänge der cDNA-Fragmente werden bei 23°C für eine Stunde in die Bam HI Schnittstelle des pBluescript SK II+ Vektors ligiert.

Komponente	Volumen
cDNA-Fragmente	15 $\mu$ l
Plasmidvektor	3 $\mu$ l
5x Ligasepuffer	5 $\mu$ l
Bidestilliertes Wasser	1 $\mu$ l
Ligase ( 1 U/ $\mu$ l )	1 $\mu$ l
Endvolumen	25 $\mu$ l

Der Ligationsansatz wurde nach der Reaktion mittels Ethanol gefällt und das entstehende Pellet in 10 µl bidestilliertem Wasser aufgenommen.

### **2.5.3. Transformation und Kultivierung der Bakterienklone**

Die neu geschaffenen fragmenttragenden Plasmidvektoren wurden durch Elektrotransporation in die DH10b E. coli Bakterien transformiert. Das Anlegen einer hohen elektrischen Spannung für eine sehr kurze Zeit führt zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Bakterienmembran, sodass der Vektor eindringen kann.

Zur Transporation wurden je 5 µl des klonierten Vektors und 25 µl der DH10B Bakterien für eine Minute auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz auf den Boden einer vorgekühlten Elektroporationsküvette gegeben, diese in den Elektroporator eingesetzt und die Spannung von 2,5 kV für 5ms angelegt. Sofort darauf wurde zu diesem Ansatz 100 µl LB-Medium gegeben, der Ansatz durch eine sterile Glaspipette in ein Eppendorff-Cup überführt und bei 37<sup>0</sup>C für 30 Minuten inkubiert.

Nach der Inkubation wurden 100 µl des Ansatzes auf je eine Ampicillin-Agar-Platte überimpft und mit einer sterilen Öse ausgestrichen.

Die Platten wurden bei 37<sup>0</sup>C in einem Brutschrank für 24 Stunden bebrütet. Durch den Ampicillin-Zusatz im Medium überleben nur die Bakterienzellen, die den Vektor mit dem Ampicillin-Resistenz-Gen aufgenommen haben. Die entstandenen Klonkolonien wurde mittels steriler Zahnstocher gepickt, in beschriftete Reagenzgläser mit 5 ml flüssigem LB-Ampicillin-Medium überführt und wiederum für 24 Stunden bei 37<sup>0</sup>C inkubiert.

### **2.5.4. Präparation der Plasmide**

Die auf die oben genannte Weise isolierten Bakterienklone enthalten nur eine einziges, aber stark vervielfältigtes cDNA-Fragment aus der entsprechenden Bande des zweiten Differenzproduktes.

Die Isolierung des fragmenttragenden Vektors aus den Bakterienzellen erfolgte durch Plasmid-Präparation-Protokoll mittels NucleoSpin Plasmid

Kit (Macherey-Nagel). Die abschließend in 35 µl Wasser aufgenommenen Plasmide wurde im Verhältnis 1:10 mit Wasser verdünnt.

## 2.6. Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente können mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese durch Wanderung im elektrischen Feld aufgetrennt werden. Die Phosphatreste der DNA liegen bei neutralem pH-Wert in ionisierter Form vor, daher wandern sie in einem elektrischen Feld in Richtung der Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei abhängig von der Molekülgröße der DNA, der Gesamtladung des Moleküls, der Agarose-Konzentration, der Zusammensetzung des Elektrophorese-Puffers, interkallierenden Substanzen wie Ethidiumbromid und der angelegten Spannung.

Zur Herstellung eines 1% Agarosegels wurde die entsprechende Menge Agarose (200mg in 200ml) 0,5% TBE-Puffer (1X TBE: 90 mM TRIS/Cl pH 8,3; 90 mM Borsäure, 2,5 mM EDTA) aufgeköcht. Nach kurzer Abkühlung wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt und das Gel in eine Horizontalkammer mit eingesetztem Kamm gegossen. Nach Festigung des Gels wurden die Kämmen entfernt und die Kammer in eine mit Laufpuffer gefüllte Gelkammer eingesetzt. Die PCR-Ansätze wurden vor Beladen des Gels mit 6x Ladepuffer (0,2% Bromphenolblau, 0,2% Xylenol, 60% Glycerin/60 mM EDTA, 39,6% H<sub>2</sub>O) (1/6 x Probenvolumen, bei 25µl PCR-Produkt 5µl Ladepuffer) gemischt. Danach wurde das Gel mit den Proben beladen, ein Längenmarker mit definierten DNA-Fragmenten diente zur Abschätzung der PCR-Fragment-Größen. Nach Beendigung der Auftrennung wurden die Fragmente auf einem UV-Transilluminator (302 nm) sichtbar gemacht und fotografiert. Die Bilder wurden mit einem CanoScan 3000-Scanner in einen PC eingelesen und durch die Adobe Photoshop-Software verarbeitet.

## 2.7. Sequenzierung und Identifikation der cDNA-Fragmente

Die Identifikation der cDNA-Fragmente umfasst zwei Arbeitsschritte; die Sequenzierung des Fragments und den Vergleich der dann vorliegenden Sequenz mit Sequenzen in der Genbank, sodass am Ende der Arbeitsschritte jedem Fragmente ein Gen zugeordnet werden kann, dessen Teil es darstellt.

Zur Sequenzierung mit dem BigDyeTerminator Cycle Sequencing Kit (Abi Prism, Perkin Elmer) wurden die cDNA-Fragmente mittels PCR vervielfältigt und die einzelnen Nukleotide mit Farbstoffen markiert, dessen unterschiedliche Absorbtionen durch den automatischen Sequenzierer gemessen und die Sequenz errechnet werden konnte.

Als Primer für die PCR diente eine das Fragment flankierende Vektorsequenz, sodass erst ein Teil des Vektors und dann das Fragment amplifiziert wurde. Es folgte die PCR mit 25 Zyklen, wobei ein Zyklus aus je einem Denaturierungsschritt bei 96<sup>0</sup>C für 10 Sekunden, einem Anlagerungsschritt bei 52<sup>0</sup>C für 30 Sekunden und einem Syntheseschritt bei 60<sup>0</sup>C für 4 Minuten bestand.

Reaktionansatz:

Komponente	Volumen
BigDye Term-preMix	4 µl
Präpariertes Plasmid	3 µl
T3-Primer (10µmol/µl )	1 µl
Bidestilliertes Wasser	14 µl
Endvolumen	20 µl

Es folgte die PCR mit 25 Zyklen, wobei ein Zyklus aus je einem Denaturierungsschritt bei 96<sup>0</sup>C für 10 Sekunden, einem Anlagerungsschritt bei 52<sup>0</sup>C für 30 Sekunden und einem Syntheseschritt bei 60<sup>0</sup>C für 4 Minuten bestand.

Das PCR-Produkt wurde mittel Natriumacetat und Ethanol gefällt, gewaschen und das entstehen Pellet in 20 µl Termination Buffer

aufgenommen. Direkt vor der Sequenzierung wurden die Proben bei 90°C für 2 Minuten denaturiert und in den automatischen Sequenzierer eingesetzt. Die Sequenzen wurden mittels AbiPrism Software auf einem Apple Macintosh errechnet und ausgedruckt. Die so gewonnenen Sequenzen wurden zur Identifikation in die Online-Genbank des National Centre for Biotechnology Information eingegeben und mittels BLAST-Algorithmus mit allen dort gespeicherten Gensequenzen verglichen. Wenn Fragmente keinem bekannten menschlichen Gen zugeordnet werden konnten, wurde nach Homologien mit bekannten tierischen Genomen gesucht. Durch den Vergleich mit der Genbank war es möglich, jedem Fragment einer spezifischen Accession-Nummer zuzuordnen, unter der es in der Genbank zu finden ist. Auch der Genlocus und die komplette cDNA-Sequenz des jeweiligen Gens war dadurch zugänglich.

## **2.8. Überprüfung der differentiellen Genexpression**

Die in der RDA isolierten Genfragmente mussten im folgenden auf ihre differentielle Expression geprüft werden, wozu die PCR-Technik verwendet wurde. Dazu musste für jedes Gen-Fragment ein spezifisches Primer-Paar entwickelt und synthetisiert werden.

Es wurde darauf geachtet, dass das Primer-Paar in der Sequenz des isolierten Fragments lag, obwohl nach der Identifikation des Gens die gesamte cDNA-Sequenz vorlag. Dieses Vorgehen führte auf der einen Seite zu einem PCR-Fragment von geringerer Größe, auf der anderen Seite war es aber möglich, den fragmenttragenden Plasmidvektor als Matrize für die Positiv-Kontrolle zu verwenden und so auch die Anlagerungstemperatur (Annealing Temperature) der Primer zu bestimmen.

Die Primer-Sequenzen wurden ihrerseits wieder in die Online-Genbank eingegeben, um so sicherzustellen, dass der jeweilige Primer spezifisch für das zu überprüfende Gen ist. Die Primersynthese wurde dann bei Metabion in Auftrag gegeben.

### 2.8.1. Synthese einzelsträngiger cDNA

Als Ausgangsmaterial für die PCR, anhand der die Fragmente auf differentielle Expression getestet wurden, diente einzelsträngige cDNA. Diese wurde aus je 5 µg der unter 2.4.1. isolierten Gesamt-RNA unter Verwendung des Superscript 3- Kit ( Gibco BRL ) hergestellt.

#### Priming-Ansatz

Komponente	QGP (+)	QGP (-)
Gesamt-RNA ( 5 µg )	7,8 µl	9,1 µl
Oligo dT ( 50 µM )	1 µl	1 µl
Bidestilliertes Wasser:	14,2 µl	12,9 µl
Endvolumen:	23 µl	23 µl

Die Ansätze wurden für 10 Minuten bei 70°C inkubiert und anschließend auf Eis gelagert. Während der Inkubation kam es zur Bindung der Oligo dT-Primer an den Poly-Adenin-Schwanz der RNA. Der Primer diente dann als Start-Matrize für die eigentliche cDNA-Synthese. Zur Synthese wurden die beiden Proben für 50 Minuten bei 42°C und anschließend bei 70°C für im Thermocycler inkubiert.

#### Syntheseansatz

Komponente	Volumen
Priming-Ansatz ( je QGP(+) u. (-) )	23 µl
dNTP-Mix ( 10mM )	2 µl
5x Puffer	10 µl
DTT	4 µl
Superscript ( 1 U/µl )	1 µl
Endvolumen	40 µl

### 2.8.2. Standard-PCR zur Überprüfung der differentiellen Expression

Die Überprüfung der differentiellen Expression erfolgte anhand einer standardisierten PCR. Bei jeder PCR diente der jeweilige fragmenttragende Plasmidvektor als Positiv-Kontrolle, ein Ansatz ohne cDNA als Negativ-Kontrolle. Die Amplifikation der vorbereiteten Ansätze erfolgte in dem jeweils gleichen Thermocycler.

Reaktionsansatz

Komponente	Volumen
cDNA	1 µl
10x-PCR-Puffer	2,5 µl
dNTP-Mischung (2 mM)	2,5 µl
Vorwärtsprimer (10 pmol/µl)	1 µl
Rückwärtsprimer (10 pmol/µl)	1 µl
Q-Solution	5 µl
Taq-Polymerase (5U/µl)	0,1 µl
Bidestilliertes Wasser	12,9 µl
Endvolumen:	25 µl

Das Standard-PCR-Programm enthielt einen initialen Denaturierungsschritt von 5 Minuten bei 95°C, gefolgt von 30 Zyklen mit je 1 Minute Denaturierung bei 95°C, 1 Minute Annealing bei primerspezifischer Temperatur sowie 1 Minute DNA-Synthese bei 72°C. Auf die 30 Zyklen folgte ein abschließender Syntheseschritt bei 72°C für 10 Minuten.

Um vor der Überprüfung auf differentielle Expression eventuelle Differenzen bei der cDNA Synthese auszugleichen, wurde eine Kontrolle durch Oligonukleotide für das konstitutiv exprimierte Housekeeping-Gen  $\beta$ -Aktin durchgeführt. Dadurch war eine semi-quantitative Auswertung der Expression der identifizierten Gene gewährleistet.

Desweiteren wurde eine PCR für das Gen  $p16^{INK4a}$  durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Behandlung der QGP-Zellen mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin ausreichte, um eine differentielle Expression von Genen zu induzieren.

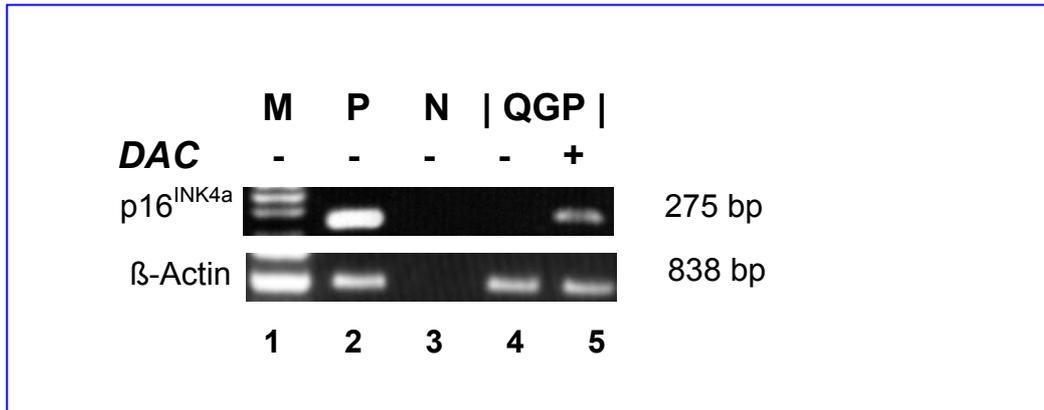
Nach der Amplifikation wurden die PCR-Produkte mit je 5 µl 6x-Ladepuffer versetzt und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, unter UV-Licht sichtbar gemacht, photographiert und eingescannt.

### **3. Ergebnisse**

#### **3. 1. Klonierung methylierungsabhängig differentiell exprimierter Genfragmente anhand der cDNA-RDA in neuroendokrinen Pankreastumorzellen QGP-1**

In der vorliegenden Arbeit wurde die cDNA-RDA und RT-PCR angewandt, um Gene zu identifizieren, die in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen QGP-1 methylierungsabhängig reguliert sind. Die cDNA-RDA ist eine sensitive und effiziente auf PCR basierende Subtraktionsmethode, die die unvoreingenommene Klonierung differentiell exprimierter Fragmente erlaubt. Wiederholte Subtraktions- und Amplifikationsrunden erzielen eine effiziente Depletion von häufigen Genfragmenten beider cDNA Populationen, wodurch die Gene kloniert werden, die am stärksten unterschiedlich exprimiert sind.

Dazu wurde die QGP-1 Zelllinie ohne oder mit Zugabe des Methyltransferase-Hemmstoffs (1 $\mu$ M) 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-Cdr) für 72h kultiviert, wobei alle 24h das Medium gewechselt wurde. Nach mRNA Isolation aus unbehandelten und behandelten Zellen wurde cDNA hergestellt und der Demethylierungserfolg zunächst getestet. Die aus vorausgegangenen Untersuchungen bekannte demethylierungsabhängige *p16<sup>INK4a</sup>* Neu-Expression konnte anhand von RT-PCR in QGP-1 Zellen nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin bestätigt werden (Abbildung 7, Spalte 5), sodass von einer ausreichenden demethylierenden Behandlung der QGP-1 Zellen für die folgende cDNA-RDA ausgegangen werden konnte.

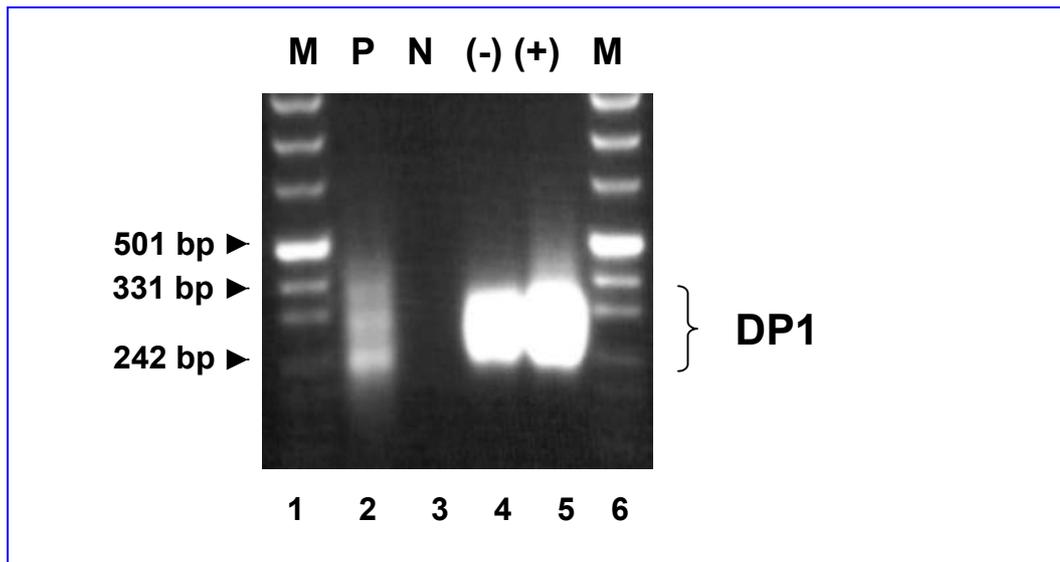


**Abbildung 7.** RT-PCR Analyse der  $p16^{INK4a}$  Expression nach 5'-Aza-2-Deoxycytidin (5-Aza-Cdr) Behandlung in QGP-1 Zellen. Links ist der Genname, rechts die Größe der Amplifikate angegeben. Die  $\beta$ -Actin Amplifikation diente als interner Standard. M, Marker, P, Positiv-Kontrolle ( $p16^{INK4a}$  Fragment als Template), N, Negativ-Kontrolle ( $H_2O$  statt Template), bp, Basenpaare, DAC – (+), ohne (mit) 5-Aza-2'-Deoxycytidin.

Die cDNAs wurden mit einem Restriktionsenzym gespalten, welches vier Basenpaare als Erkennungssequenz nutzt (Dpn II). Statistisch lieferte dieses Restriktionsenzym Fragmente von 256 Basenpaar Länge und überhängenden 5'-Enden. Nach Ligation von DNA-Oligonukleotiden (R-Bgl-24) an die Fragmente beider cDNA-Populationen wurde mittels PCR das sogenannte Amplicon erzeugt, wobei R-Bgl-24-Oligomere als Primer eingesetzt wurden. Dieses Amplicon sollte alle cDNA-Fragmente repräsentieren, die ein PCR-amplifizierbares Dpn II-Fragment enthielten. Nach einer weiteren Dpn II Behandlung zur Entfernung der Adapter folgte ein Vergleich der beiden Populationen in zwei reziproken Ansätzen.

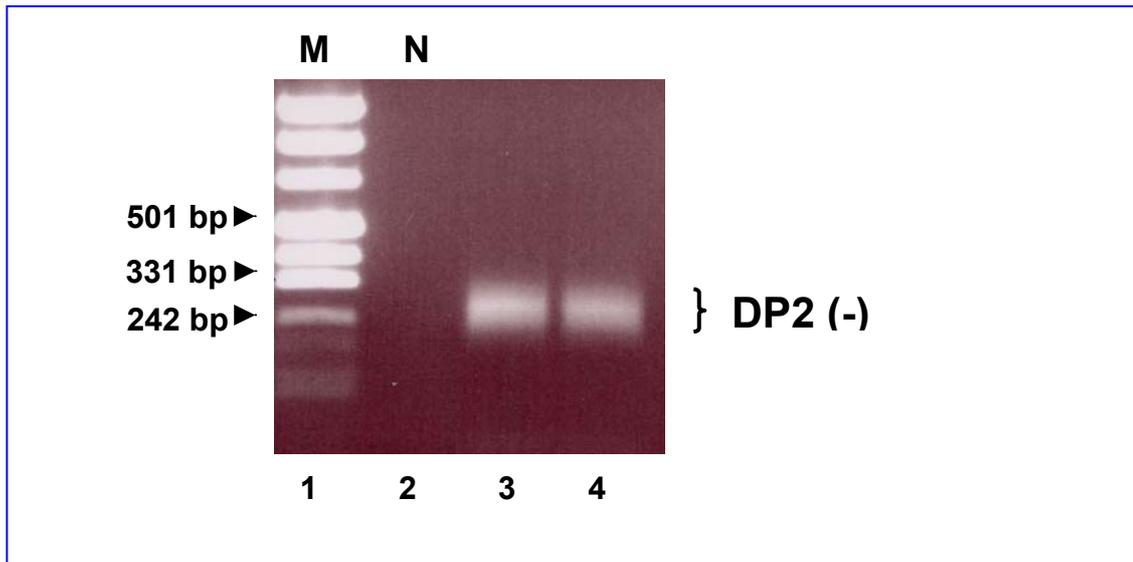
Die verdaut und amplifizierte cDNA aus den unbehandelten und mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelten QGP-1 Zellen wurde als Driver (unbehandelt, QGP-) und Tester (behandelt, QGP+), oder andersherum, eingesetzt, um differentiell exprimierte Genfragmente herzustellen, die in behandelten Zellen induziert oder supprimiert waren. An die jeweiligen Tester wurden erneut Oligonukleotid-Adapter (J-Bgl-24) ligiert.

Anschließend wurde der Tester im Verhältnis 1:100 mit dem entsprechenden Driver gemischt und zur Hybridisierung hitzedenaturiert. Im Verlaufe dieser subtraktiven Hybridisierung bildeten sich drei Arten von Hybriden: die Driver:Driver-Hybride verfügten nicht über Oligonukleotid-Adapter und wurden in den folgenden PCR-Reaktionen nicht amplifiziert. Sequenzen, die sowohl im Tester als auch Driver vorhanden waren führten aufgrund des Überschusses an Driver mit hoher Wahrscheinlichkeit zu Tester:Driver-Hybriden. Da nur der Testerstrang einen J-Bgl 24-Adapter besitzt, wurden die Tester:Driver-Hybrid-Sequenzen linear amplifiziert. Nur Sequenzen, die ausschließlich oder in größerer Anzahl im Tester enthalten waren, bildeten Tester:Tester-Hybride und wurden aufgrund der Adapter an beiden 5'-Enden exponentiell amplifiziert. Dieses führte zu einer Anreicherung differentieller Sequenzen der Tester-Population, die auch die Identifikation von in sehr geringer Kopienzahl vorliegenden Transkripten erlaubt. Ein Durchgang subtraktiver Hybridisierung und selektiver Amplifikation führte zum ersten Differenzprodukt (DP1). Wie in Abbildung 8 dargestellt, sind beim Differenzprodukt 1 noch keine distinkten Banden zu erkennen.

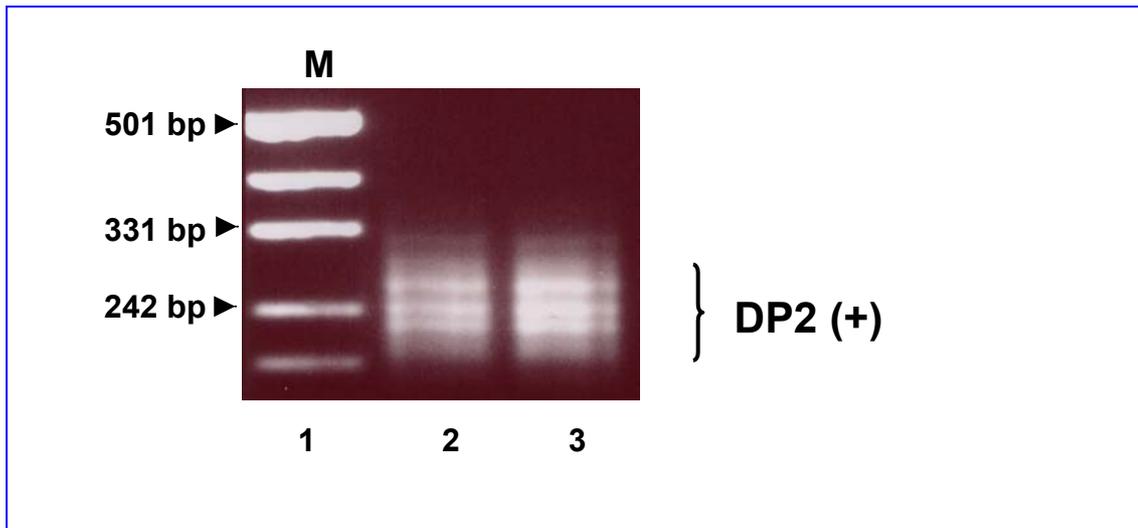


**Abbildung 8.** Agarose Gelelektrophorese des ersten Differenzproduktes DP1 identifiziert durch cDNA-RDA. Die Ethidiumbromid sichtbaren Banden korrespondieren mit: (1) M8 Marker, (2) Positivkontrolle (DP1 aus RDA), (3) Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O statt Template), (4) cDNA von 5'-Aza-2-Deoxycytidin behandelten QGP-Zellen war Tester im Differenzprodukt DP1(-) zu herzustellen, (5) cDNA von unbehandelten QGP-1 Zellen war Tester um Differenzprodukt DP1(+) herzustellen. DP1, Differenzprodukt nach einer Runde Subtraktion und Amplifikation. bp, Basenpaare .

Da noch keine ausreichende Anreicherung der differentiellen Sequenzen stattgefunden hatte, folgte ein zweiter Durchgang von subtraktiver Hybridisierung und selektiver Amplifikation. Bei der Herstellung des zweiten Differenzproduktes (DP2) wurde DP1 als *Tester* eingesetzt, der *Driver* blieb der vorherige. Zur Erhöhung der Stringenz wurden Tester und Driver im Verhältnis 1:800 eingesetzt. Nach zwei Runden von Subtraktion und Amplifikation wurden die Differenzprodukte (DP2) im Agarosegel visualisiert (Abbildung 9 und 10). Während sich das DP1 Produkt eher noch als Schmier darstellte (Abbildung 8), zeigte DP2 sichtbare Banden in der Größe von ca.190 bis ca 330 Basenpaare (Abbildung 9 und 10).



**Abbildung 9.** Agarose Gelelektrophorese des zweiten Differenzproduktes DP2 (-) identifiziert durch cDNA-RDA. Die Ethidiumbromid sichtbaren Banden korrespondieren mit: (1) M8 Marker (M), (2) Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O statt Template), (3 und 4) Hybridisierungsprodukt aus Driver (QGP+, 5'-Aza-2-Deoxycytidin behandelt) und Tester DP1(-). cDNA von behandelten QGP-Zellen war Tester im Differenzprodukt DP1(-). DP2, Differenzprodukt nach zwei Runden Subtraktion und Amplifikation. bp, Basenpaare.



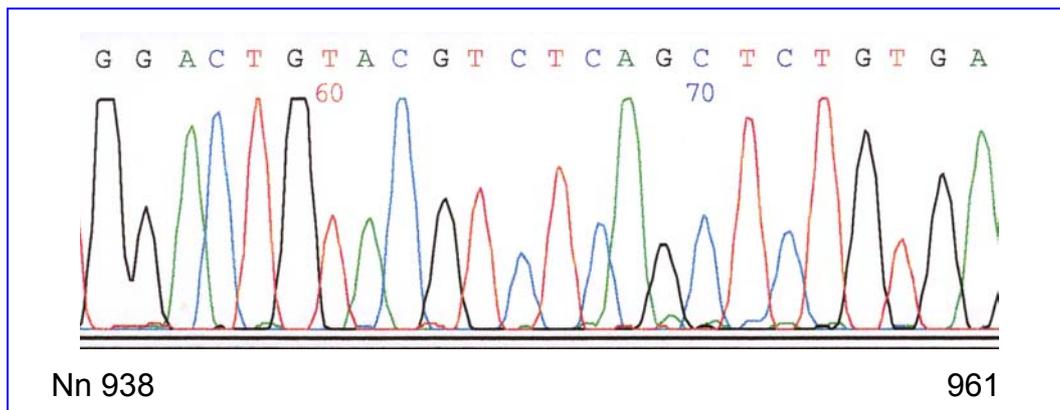
**Abbildung 10.** Agarose Gelelektrophorese des zweiten Differenzproduktes DP2(+) identifiziert durch cDNA-RDA. Die Ethidiumbromid sichtbaren Banden korrespondieren mit: (1) M8 Marker (M), (2 und 3) Hybridisierungsprodukt aus Driver (QGP-, -unbehandelt) und Tester DP1(+). cDNA von unbehandelten QGP-Zellen war Tester im Differenzprodukt DP1(+). DP2, Differenzprodukt nach zwei Runden Subtraktion und Amplifikation. bp, Basenpaare.

Die cDNA-RDA führte zur Reduktion der Komplexität der zwei Zellpopulationen ausgehend von den Repräsentationen zum DP2. Weitere Durchgänge hätten die Stringenz der Subtraktion erhöhen können, aber auch die Gefahr des Verlustes von Zielsequenzen gehabt. Da diese Arbeit zum Ziel hatte, möglichst viele Gene zu identifizieren, wurden DP2 (+) und DP2 (-) zur Klonierung verwendet. Nach Exzision und Elution aus dem Gel wurden die Banden individuell in die BAM HI Seite des pBlueskript II SK+ Vektors kloniert. So wurden aus dem DP2 der Analyse auf Gene, deren Transkripte nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin stärker exprimiert sind, 3 Banden ausgeschnitten; die Bakterienklone erhielten den Buchstaben D vor ihrer Nummerierung. Aus dem zweiten Differenzprodukt der reziproken Analyse auf Gene, die nach der Behandlung weniger stark exprimiert sind, wurden 6 Banden ausgeschnitten, die mit dem

Buchstaben U vor der Nummerierung versehen wurden. Insgesamt konnten 101 isolierte Bakterienkolonien des Typus D und 56 des Typus U gepickt und angezchtet werden.

### 3.2. Charakterisierung der klonierten methylierungsabhängig differentiell exprimierten cDNA-Fragmente

Um die nach der Plasmid-Präparation gewonnenen 101 D-Klon-Plasmide sowie die 56 U-Klon-Plasmide zu identifizieren wurden die klonierten Genfragmente sequenziert. In Abbildung 11 ist ein Ausschnitt aus der Sequenzierungsanalyse des Bakterienklons D13 exemplarisch dargestellt. Klone, bei denen nach mehrfacher Sequenzierung keine eindeutige Sequenz bestimmt werden konnte wurden nicht weiter analysiert.



**Abbildung 11.** Ausschnitt aus der Sequenzanalyse des Klons D13. Die klonierten Genfragmente wurden mittels fluoreszenzmarkierten Nucleotiden G, A, C, T und einem PCR-basierten Sequenzierungssystem identifiziert (Abi Prism, Perkin Elmer). Der Klon D13 entspricht der Sequenz des Genes Keratin 18. Dargestellt sind die Nucleotide 938 bis 961 (Genbank<sup>TM</sup> Accession NM 000224). Nn, Nucleotide; G, Guanin; A, Adenin; C, Cytosin; T, Thymin.

Eine eindeutige Sequenzanalyse war bei 49 D-Klonen sowie 18 U-Klonen möglich. Nach Überführung der Sequenzen in ein Microsoft-Word-Format wurden diese mit den in der Genbank des National Centers of Biotechnology Information enthaltenen Sequenzen mit Hilfe des BLAST Algorithmus ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) verglichen. Die RDA-Klone wurden als dasjenige Gen identifiziert, dessen Sequenz die größte Homologie mit der des isolierten Klons hatte. Der zugehörige Genlocus wurde mit Hilfe von LocusLink ([www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink)) ermittelt. Funktionelle Aussagen wurden unter Verwendung von Informationen bei Unigene ([www.ncbi.nlm.nih.gov/Unigene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Unigene)) und der Medline Datenbank getroffen. In Tabelle 3 sind die durch cDNA-RDA isolierten und identifizierten Klone zusammengestellt.

**Tabelle 3.** Durch cDNA-RDA isolierte und identifizierte Genfragmente des Differenzproduktes DP2

Klon	Genbank™ Accession Number	Name (Symbol)	FG (bp)	Genlocus
D3	NM_021727	Homo sapiens fatty acid desaturase 3 (FADS3)	208	11q12-q13.1
D4	NM_000942	Cyclophilin B (CYP B)	210	15q21-q22
D8	NM_021098	Homo sapiens T-type calcium channel alpha 1H subunit (CACNA1H)	143	16p13.3
D9	NM_014770	KIAA0167, PIKE-A	176	12q13.2
D10	NM_001961	Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2)	150	19pter-q12
D11	NM_033453	Inosin triphosphatase (ITPA)	188	20p
D12	NM_022121	p53-effector protein (PERP)	201	6q24
D13	NM_000224	Keratin 18 (KRT13)	184	12q13
D14a	NM_015937	Phosphatidyl inositol glycan class T (PIGT)	211	20q12-q13.12
D14b	NM_012179	F-box only protein 7 (FBXO7)	153	22q12-q13
D15	NM_153280	Ubiquitin activating enzyme E1 (UBE1)	193	Xp11.23
D17	NM_005146	SART1, squamous cell carcinoma antigen	164	11q13.1
D18a	NM_057092	FK 506 Bindungsprotein 2 (FKBP2)	211	11q13.1-q13.3
D18b	NM_005273	Guanine nucleotide binding protein, beta polypeptide 2 (GNB2)	161	7q22
D19	NM_005918	Malate dehydrogenase 2 (MDH2)	212	7p12.3-q11.2
D20	NM_006196	poly(rC) binding protein 1 (PCBP1)	225	2p13-p12
D22	XM_009973	Histon 1	87	22q13.1
D23	BC006182	Similar to Calmodulin 2	204	19q13.2-q13.3
D24	NM_002046	similar to Glyceraldehyd-3-phosphat-phosphatase	193	12p13.31
D25	NM_006755	Transaldolase 1	157	11p15.5-p15.4
D26	NM_004990	Methionin-t-RNA synthetase (MARS)	192	12q13.2
D28	NM_021978	Matriptase (MT-SP1)	153	11q24-q25
D29	BC020982	Keratin 18 (KRT18)	184	12q13
D32	NM_006826	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein (YWHAQ),	232	2p25.1
D34	NM_006755	Transaldolase 1 (TA1)	157	11p15.5-p15.4
D36	NM_033453	Inosin Triphosphatase (ITPA)	201	20p
D41	NM_005507	Cofilin-1 (CFL1)	206	11q13
D42	NM_020314	Esophageal cancer -	194	16p13.11

		associated protein (ECAP)		
D47, D59	NM_006755	Transaldolase1 (TA 1)	197	11p15.5-p15.4
D48 /D29	NM_000224	Keratin 18 (KRT 18)	184	12q13
D49	NM_005619	Reticulon 2 (RTN2)	185	19q13.32
D51	NM_000967	Ribosomal protein L3 (RPL3)	149	22q13
D52	NM_001002	Ribosomal prtoein large P0 (RPLP0)	160	12q24.2
D53	NM_002116	MHC class I antigen (HLA-A)	200	6p21.3
D55	NM_002696	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G (PolR2G)	187	11q13.1
D56	AY195792	Teil des mitoch Genoms	188	
D58	AC011500	Chromosom 19 Klon	72	19q13.2
D61	NM_000445	Plectin 1 (PLEC1)	225	8q24
D62	NM_016016	CGI-69	205	17q12
D64	AL157996.8	Klon human Genome Project	44	
D66	NM_004140	Hum Homol Lethal giant larvae Drosophila mel (LLGL1)	215	17q12-p11.2
D67	NM_014297	YF13H12	194	19q13.32
D72	NM_001350	DAXX (death associated protein) 6	194	6p21.3
D77	NM_020210	Semaphorin B	93	15q25
D80	NM_033453	Inosin triphosphatase	201	20p
D81	NM_001961	Translation Elongation factor 2	157	19pter-q12
D82	NM_006319	Phosphatidylinositol- Synthetase (CDIPT)	175	16p21.1
D83	NM_006184	Nucleobindin 1 (NUCB1)	234	19q13.2-q13.4
D89	NM_007263	Coatomer protein complex, subunit Epsilon	38	19p13.11
U1	NM_014216	Inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	215	14q31
U2	NM_024923	Nucleoporin 210 (NUP 210)	281	3p25.1
U3	AF465980	clone YAN0650 mitochondrion	237	Mitochondrien
U4	NM_032377	Protein MGC4549	173	19p13.2
U5	NM_002276	Keratin 19 (KRT19)	285	17q21.2
U6	NM_004145	Myosin-IXb splice variant	150	19p13.1
U8	NM_021034	Interferon induced transmembrane protein 3 (IFITM3)	190	11p15.5
U10	NM_007273	Repressor of estrogen receptor activity (REA)	243	12p13
U13	NM_001749	similar to Calpain, small subunit 1	244	19q13.13
U16	NM_002276	Keratin 19 (KRT19)	284	17q21.2
U17	AF289557	Clone pp5382 unknown mRNA	156	11q13
U18	NM_006986	MAGE D1	217	Xp11.23

U23	NM_002116	MHC class I antigen (HLA-A)	195	6p21.3
U27	NM_002795	Proteasome (prosome, macropain) subunit $\beta$ 3	232	17q12
U29	NM_017623	Cyclin M3 (CM3)	193	2p12-p11.2
U31	NM_032118	hypothetical protein FLJ12953	211	2p13.1
U33	NM_007273	Repressor of estrogen receptor activity (REA)	199	12p13
U34	NM_009587 Long isoform	Galectin 9 (Gal9)	206	17q11.1

Klon, Klon-Nummerierung; FG, isolierte Fragmentgröße; bp, Basenpaare. Der Sequenz des Klons D68 entsprach Vektorsequenz.; D, isolierte Genfragmente aus 5-Aza-Cdr behandelten QGP-1 Zellen; U, isolierte Genfragmente aus unbehandelten QGP-1 Zellen.

Einige der Genfragmente wurden anhand der Sequenzierungsanalyse als mehrfach isoliert identifiziert und sind in Tabelle 4 aufgeführt. Zur Überprüfung der differentiellen Expression mittels semiquantitativer RT-PCR wurde nur ein repräsentativer Klon eingesetzt.

**Tabelle 4.** Durch cDNA-RDA mehrfach identifizierte Genfragmente des Differenzproduktes DP2

Klon	Genbank™ Accession Number	Name (Symbol)	FG	Genlocus
D10/ D82	NM_001961	Homo sapiens eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2)	150	19pter-q12
D13/ D29 / D48	NM_000224	Keratin 18 (KRT 18)	184	12q13
D25/D4 7/ D59	NM_006755	Transaldolase 1 (TA 1)	197	11p15.5-p15.4
D11/ D36 / D80	NM_033453	Inosin Triphosphatase (ITPA)	201	20p
U5/U16	NM_002276	Keratin 19 (KRT 19)	285	17q21.2

Klon, Klon-Nummerierung, FG, Fragmentgröße; Der Sequenz des Klons D68 entsprach Vektorsequenz.; D, isolierte Genfragmente aus 5-Aza-Cdr behandelten QGP-1 Zellen; U, isolierte Genfragmente aus unbehandelten QGP-1 Zellen

### **3.3. Bestätigung der klonierten methylierungsabhängig differentiell exprimierten Gene in QGP-1 Zellen**

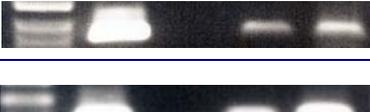
Um zu überprüfen, ob die erhaltenen RDA Klone auch tatsächlich eine unterschiedliche Expression in 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelten und unbehandelten QGP-1 Zellen aufweisen wurden die Klone anhand der semi-quantitativen PCR gescreent. Die dazu benötigten Primer wurden so gewählt, dass sie in der Sequenz des klonierten Fragments oder in den flankierenden Sequenzen lagen. Die Spezifität der Primer wurde durch Anwendung des BLAST-Algorithmus der Online-Genbank überprüft ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) und so gewählt, dass Amplifikate mit einer Länge von 120-250 Basenpaaren resultierten. Der initial isolierte Klon wurde als Template für die Positiv-Kontrolle eingesetzt. Die Bestätigung der differentiellen Expression erfolgte durch zweimalige semi-quantitative RT-PCR.

Die photodokumentierten Ergebnisse der Überprüfung der differentiellen Genexpression mittels RT-PC sind in Tabelle 5 und 6 dargestellt. Es konnten insgesamt 42 Klone aus dem Differenzprodukt DP2 (-) hinsichtlich methylierungsabhängig differentieller Expression bestätigt werden, wobei die mehrfach klonierten identischen Gene nicht mitgezählt sind (Tabelle 5). Von den 42 Klonen aus dem Differenzprodukt DP2 (-) zeigten erwartungsgemäß 25 eine höhere oder neue Expression in den mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelten im Vergleich zu den unbehandelten QGP-1 Zellen. 5 Klone wurden aufgrund einer zu kurzen homologen Sequenz nicht weiter analysiert. Bei zwei Klonen konnte anhand der semiquantitativen RT-PCR kein sicherer Expressionsunterschied festgestellt werden. Die übrigen 10 Klone zeigten unerwartet eine Herunterregulation oder Suppression der Expression in den 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelten QGP-1 Zellen. Diese wurden dennoch weiter berücksichtigt, da sie klar eine methylierungsabhängige differentielle Expression in den QGP-1 Zellen zeigten.

**Tabelle 5.** Bestätigte methylierungsabhängig differentiell exprimierte Gene der Klone aus dem Differenzprodukt DP2 (-)

Klone QGP	PCR (bp)	PCR	REG	REG				
				M	pos	neg	-	+
D3	Fatty acid desaturase 3 (FADS3)	167	Ja	↑				
D4	Peptidylprolyl isomerase B (CyclophilinB) CYPB	190	Ja	↑				
D8	T-type calcium channel alpha 1H subunit (CACNA1H)	103	Ja	↑				
D9	PIKE-A	140	Ja	↑				
D10	Eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2)	136	Ja	↑				
D11	ITPA Inosin triphosphatase	140	Ja	↓				
D12	PERP	197	Ja	↑				
D13	Keratin 18 (KRT18)	165	Ja	↑				
D14a	Phosphatidyl inositol glycan class T (CGI-06)	202	Ja	↑				
D14b	F-box only protein 7 (FBX07)	135	Ja	↓				
D15	UBE1 Ubiquitin activating enzyme E1	192	Ja	↓				
D17	SART1 squamous cell carcinoma antigen	80	Ja	↑				
D18a	FK 506 binding protein 2 (FKBP2)	187	Ja	↔				
D18b	GTP-Bindungsprotein (GNB2) Guanine nucleotide binding protein, beta subunit 2	161	Ja	↑				
D19	Malate dehydrogenase 2 (MDH2)	179	Ja	↑				
D20	Poly (rC) binding protein 1(PCBP1)	187	Ja	↓				

D22	Histon 1	zk	Nein		
D23	Similar to Calmodulin 3	197	Ja	↓	
D24	Glyceraldehyde-3-phosphate-phosphatase dehydrogenase (GAPDH)	139	Ja	↓	
D25	Transaldolase 1 (TA1)	146	Ja	↓	
D26	Methionine-tRNA synthetase (MARS)	177	Ja	↑	
D28	Matriptase (ST14) MT-SP1 (suppression of tumorigenicity 14)	129	Ja	↓	
D32	YWHAQ Tyrosine 3-monooxygenase activation protein thetapolypeptide	210	Ja	↑	
D41	Cofilin 1 (non muscle)	187	Ja	↑	
D42	Esophageal cancer - associated protein (ECAP)	175	Ja	↑	
D49	Reticulon 2 (RTN2)	105	Ja	↓	
D51	Ribosomal protein L3 (RPL3)	106	Ja	↑	
D52	Ribosomal protein large P0 (RPLP0)	158	Ja	↓	
D53	MHC class I antigen (cell surface antigen)	150	Ja	↑	
D55	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G	141	Ja	↑	
D56	Teil des mitoch Genoms	167	Ja	↔	
D 58	Hypothetical protein MGC20452	zk			
D61	Plectin 1 (PLEC1)	160	Ja	↑	
D62	CGI-69	111	Ja	↑	
D64	Human chromosome 14 DNA sequence BAC C-2525P14	zk			

D66	LLGL1 lethal giant larvae homolog 1 (Drosophila)	205	Ja	↑	
D67	YF13H12	194	Ja	↑	
D72	DAXX (death- associated protein 6)	145	Ja	↑	
D77	SEMA4B: (semaphorin B)	zk	Nein		
D82	CDIPT (CDP-diacylglycerol- inositol 3- phosphatidyl- transferase)	121	Ja	↑	
D83	NUCB1 Nucleobindin 1	88	Ja	↑	
D89	COPE Coatomer protein complex, subunit epsilon	zk	Nein		

Klon, Klon-Nummer, Name, bp, Basenpaare (Größe RT-PCR-Fragment), M, Marker, pos, Positiv-Kontrolle (Genfragment), neg, Negativ-Kontrolle (Wasser ohne Template), -, cDNA von unbehandelten QGP-1-Zellen, +, cDNA von 5-Aza-Cdr-behandelten QGP-1 Zellen. zk, homologe Sequenz zu kurz um durch RT-PCR nachweisbar. REG (RT-PCR): ↑, Genexpression nach 5-Aza-Cdr-Behandlung heraufreguliert, ↓, Genexpression nach 5-Aza-Cdr-Behandlung herunterreguliert; ↔, Genexpression nach 5-Aza-Cdr-Behandlung unverändert. Die β-Aktin Amplifikation zur Kontrolle der eingesetzten QGP-1 cDNA ist Abbildung 7 zu entnehmen.

Es konnten insgesamt 16 Klone aus dem Differenzprodukt DP2 (+) hinsichtlich methylierungsabhängig differentieller Expression bestätigt werden, wobei mehrfach klonierte identische Gene nicht mitgezählt sind (Tabelle 5). Von den 16 Klonen aus dem Differenzprodukt DP2 (+) zeigten erwartungsgemäß 12 eine niedrigere oder supprimierte Expression in den mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelten im Vergleich zu den unbehandelten QGP-1 Zellen. Ein Klon wurde aufgrund einer zu kurzen homologen Sequenz nicht weiter analysiert, ein weiterer Klon zeigte anhand semiquantitativen RT-PCR keinen sicheren Expressionsunterschied. Nur ein Klon zeigte unerwartet eine leichte Heraufregulation der Expression in den 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelten QGP-1 Zellen, wurde aber dennoch weiter berücksichtigt.

**Tabelle 6.** Bestätigte methylierungsabhängig differentiell exprimierte Gene der Klone aus dem Differenzprodukt DP2 (+)

Klone DAC QQP-	Name (Symbol)	RT- PCR (bp)	PCR	REG	RT-PCR-Bild				
					M	pos	neg	-	+
U1	ITPK1 Inositol 1,3,4- triphosphate 5/6 kinase	173	Ja	↓					
U2	Nucleoporin 210 NUP210	244	Ja	↓					
U3	Clone YAN0650				vgl. D56				
U4	MGC4549 hypothetical protein	zk	Nein						
U5	Keratin 19	270	Ja	↓					
U6	MYO9B: Myosin-IXb	120	Ja	↓					
U8	IFITM3 Interferon induced transmembrane protein 3	137	Ja	↓					
U10	REA Repressor of estrogen receptor activity	178	Ja	↓					
U13	similar to CAPNS1 / Calpain, small subunit 1	209	Ja	↔					
U17	Clone pp5382 unknown mRNA	149	Ja	↓					
U18	MAGE D1	215	Ja	↓					
U23	MHC class I antigen	119	Ja	↑					
U27	Proteasome subunit, beta type, 3 (PSMB3)	210	Ja	↓					
U29	Cyclin M3 (CNNM3)	143	Ja	↓					
U31	FLJ12953 hypothetical protein	177	Ja	↓					
U34	Galectin 9 (Gal 9)	145	Ja	↓					

Klon, Klon-Nummer, Name, bp, Basenpaare (Größe RT-PCR-Fragment), REG, Regulation nach 5-Aza-Cdr-Behandlung sowie RT-PCR-Bild. M, Marker, pos, Positiv-Kontrolle (Genfragment), neg, Negativ-Kontrolle (Wasser ohne Template), -, cDNA aus unbehandelten QGP-1-Zellen, +, cDNA aus 5-Aza-Cdr-behandelten QGP-1-Zellen. ↑, Genexpression nach 5-Aza-Cdr-Behandlung heraufreguliert; ↓, Genexpression nach 5-Aza-Cdr-Behandlung herunterreguliert; ↔, Genexpression erscheint nach 5-Aza-Cdr-Behandlung unverändert. Die  $\beta$ -Aktin Amplifikation zur Kontrolle der eingesetzten QGP-1 cDNA ist Abbildung 7 zu entnehmen.

### **3.4. Funktionelle Kategorisierung der bestätigten methylierungsabhängig differentiell exprimierten Gene in QGP-1 Zellen**

In der vorliegenden Arbeit wurden die in der cDNA-RDA identifizierten differentiell exprimierten Gene in funktionelle Kategorien entsprechend der unter 1.2. beschriebenen Mechanismen der Tumorentstehung eingeteilt. Dies war nicht immer eindeutig möglich, da manche Gene multifunktionell sind und in verschiedenen Schritten der Onkogenese eine Rolle spielen können, oder deren genaue Funktion derzeit noch nicht bekannt ist und sich daher nicht klassifizieren ließen.

#### **3.4.1. Zellproliferation-, Signaltransduktion-, Ribosomenbiosynthese- und Proteinhomöostase-assoziierte Gene**

Die durch cDNA-RDA identifizierten und anhand der RT-PCR bestätigten methylierungsabhängig regulierten Gene, die hinsichtlich ihrer Funktion in der Regulation der Zellproliferation, Signaltransduktion sowie Ribosomenbiosynthese und Proteinhomöostase eine mögliche Rolle spielen, wurden in einer Gruppe zusammengefasst.

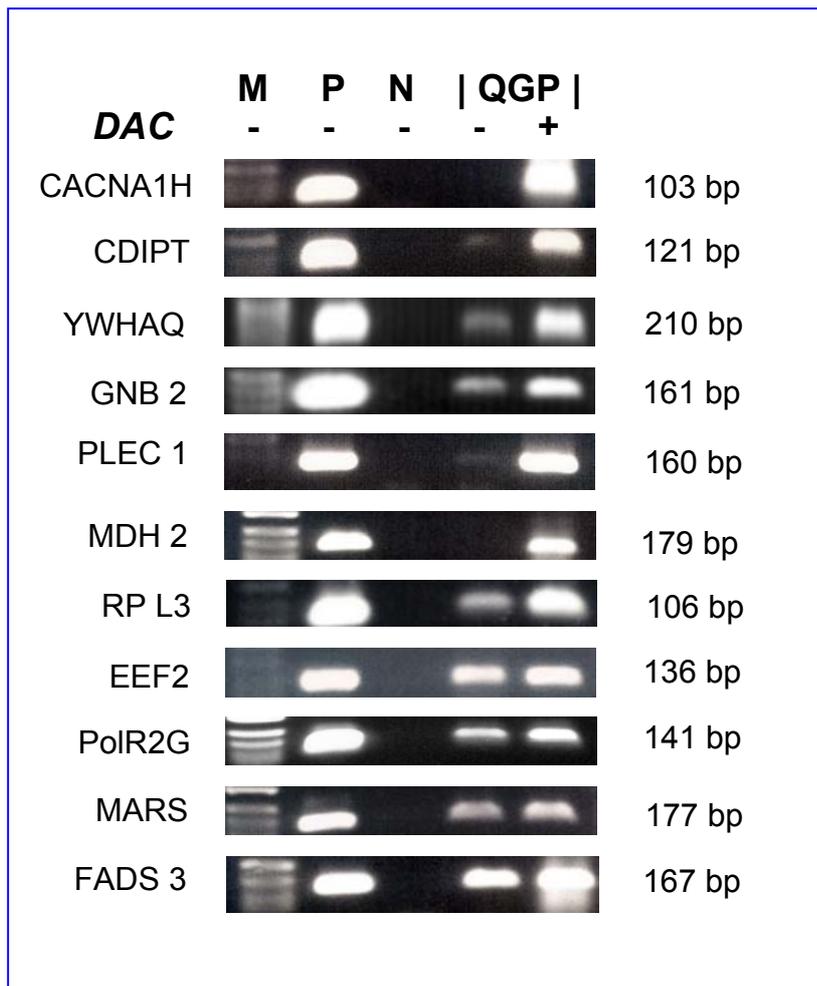
In den neuroendokrinen Pankreastumorzellen QGP-1 konnte für insgesamt 23 klonierte Gene durch RT-PCR die methylierungsabhängige Expression bestätigt werden.

Darunter waren 11 distinkte Gene, deren Expression durch DNA Demethylierung heraufreguliert oder reexprimiert wurde: CACNA1H, T-type calcium channel alpha 1H subunit; CDIPT, Phosphatidylinositol synthase; YWHAQ, Tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide; GNB 2, Guanine nucleotide binding protein, beta subunit 2; Plec1, Plectin 1; CENT G1, Centaurin gamma 1; MDH 2, Malate dehydrogenase 2; RP L3, Ribosomal Protein 3; EEF2, Eukaryotic translation elongation factor 2; PolR2G, Polymerase (RNA) II (DNA directed)

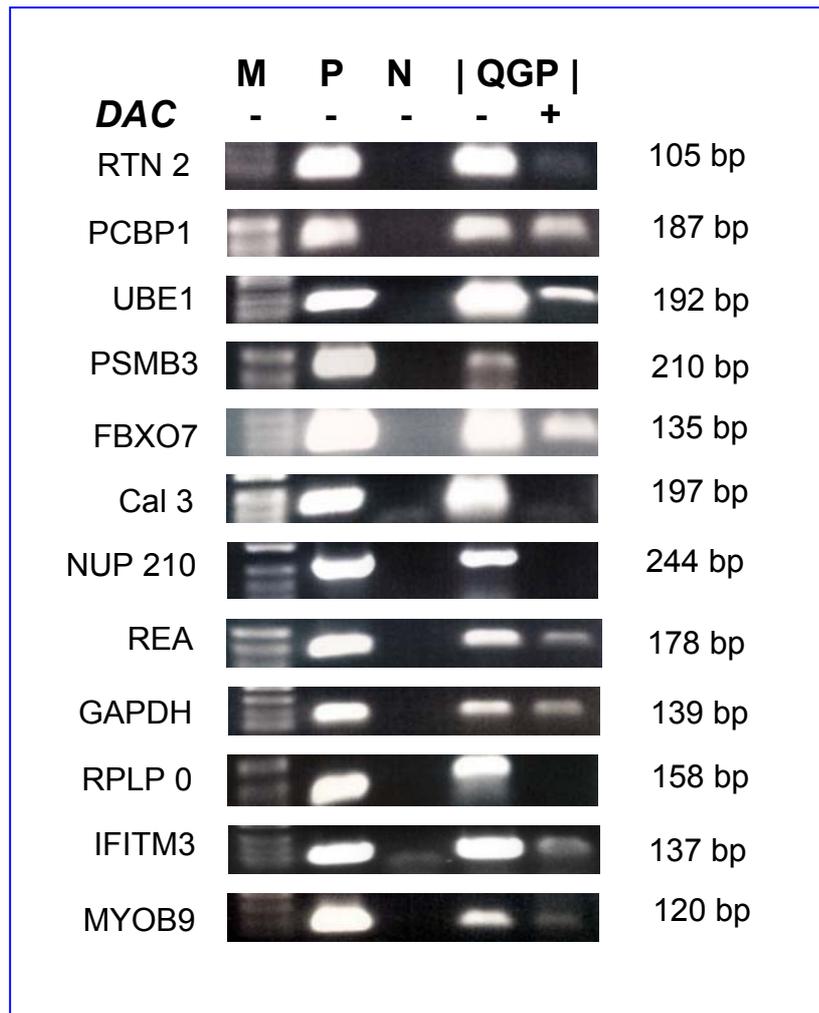
polypeptide G; MARS, Methionine -tRNA synthetase; FADS3, Fatty acid desaturase 3.

Insgesamt konnten 12 distinkte klonierte Gene identifiziert werden, deren Expression in den mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelten QGP-1 Zellen herunterreguliert bzw. supprimiert wurde: RTN 2, Reticulon 2; PCBP1, Poly (rC) binding protein 1; UBE1, Ubiquitin activating enzyme E1; PSMB3, Proteasome subunit beta type 3; FBXO7, F-box only protein 7; Cal 2, Calmodulin 2; NUP210, Nucleoporin 210; REA, Repressor of Estrogen Activity; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphate-phosphatasehydrogenase; IFITM3, Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U) und MYOB9, Myosin Splice Variante 9b.

Die Ergebnisse der RT-PCR zur Bestätigung der methylierungsabhängig differentiellen Expression der Gene sind in Abbildungen 12 und 13 zusammengefasst.



**Abbildung 12.** Überprüfung der methylierungsabhängigen Expression von Genen assoziiert mit Proliferation, Signaltransduktion, Ribosomenbiosynthese oder Proteinhomöostase in QGP-1 Zellen durch RT-PCR. Links ist der Gennamen, rechts die Größe des RT-PCR Fragments angegeben. CACNA1H, T-type calcium channel alpha 1H subunit; CDIPT, Phosphatidylinositol synthase; YWHAQ, Tryptophan 5-monooxygenase activation protein, theta polypeptide; GNB 2, Guanine nucleotide binding protein, beta subunit 2; Plec1, Plectin 1; CENT G1, Centaurin gamma 1; MDH 2, Malate dehydrogenase 2; RP L3, Ribosomal Protein 3; EEF2, Eukaryotic translation elongation factor 2; PoIR2G, Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G; MARS, Methionine-tRNA synthetase; FADS3, Fatty acid desaturase 3. M, Marker, P, Positiv-Kontrolle (Genfragment), N, Negativ-Kontrolle (PCR ohne cDNA Template), bp, Basenpaare, DAC, 5-Aza-2'-Deoxycytidin.



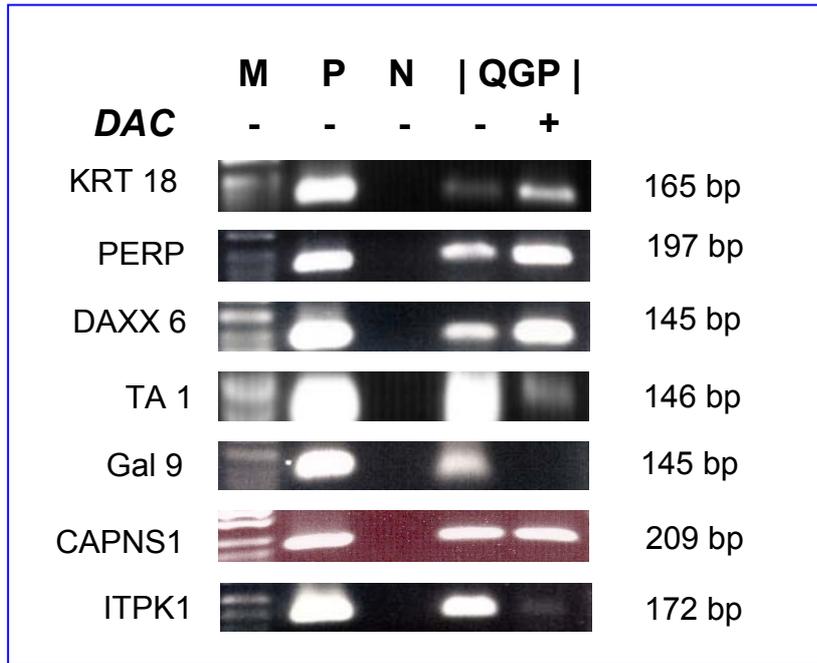
**Abbildung 13.** Überprüfung der methylierungsabhängigen Expression von Genen assoziiert mit Proliferation, Signaltransduktion, Ribosomenbiosynthese oder Proteinhomöostase in QGP-1 Zellen durch RT-PCR. Links ist der Genname, rechts die Größe des RT-PCR Fragments angegeben. RTN 2, Reticulon 2; PCBP1, Poly (rC) binding protein 1; UBE1, Ubiquitin activating enzyme E1; PSMB3, Proteasome subunit beta type 3; FBXO7, F-box only protein 7; Cal 2, Calmodulin 2; NUP210, Nucleoporin 210; REA, Repressor of Estrogen Activity; GAPDH, Glyceraldehyde-3-phosphatase dehydrogenase; IFITM3, Interferon induced transmembrane protein 3 (1-8U); MYOB9, Myosin Splice Variante 9b. M, Marker, P, Positiv-Kontrolle (Genfragment), N, Negativ-Kontrolle (PCR ohne cDNA Template), bp, Basenpaare, DAC, 5-Aza-2'-Deoxycytidin.

### 3.4.2. Apoptose-assoziierte Gene

Die Hemmung des programmierten Zelltodes durch Expression von Apoptoseinhibitoren oder die transkriptionelle Repression von Apoptoseinduktoren ist ein wichtiger Mechanismus der Tumorentstehung.

Durch die cDNA-RDA konnten 7 ( 8 mit MAGE D1) distinkte Genfragmente kloniert werden, die eine putative Rolle in der Apoptoseregulation spielen. Darunter konnte für 6 (7 mit MAGE D1) Gene eine differentielle methylierungsabhängige Expression bestätigt werden. Drei Gene, Keratin 18 (KRT18), p53 Effectorprotein (PERP) und Death-associated Protein 6 (DAXX6) wurden durch die 5-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung heraufreguliert, während Transaldolase 1 (TA1), Galectin 9 (Gal9) und Inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 Kinase (ITPK1) herunterreguliert bzw. vollständig supprimiert wurden. Auch MAGE D1 kann zu den apoptose-assoziierten Genen gerechnet werden und wurde durch die 5-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung herunterreguliert. Da MAGE D1 auch eine putative Rolle im Immunsystem spielt, ist der isolierte Klon dort katalogisiert worden und die RT-PCR Analyse in Abbildung 16 zu entnehmen. Die initial durch cDNA-RDA isolierte Calpain small subunit (CAPNS1) zeigte dagegen keine wesentliche Veränderung der Expressionslevel, sodass die differentielle Expression nicht bestätigt werden konnte.

Die Ergebnisse der RT-PCR zur Überprüfung der differentiellen methylierungsabhängigen Expression sind in Abbildung 14 dargestellt.

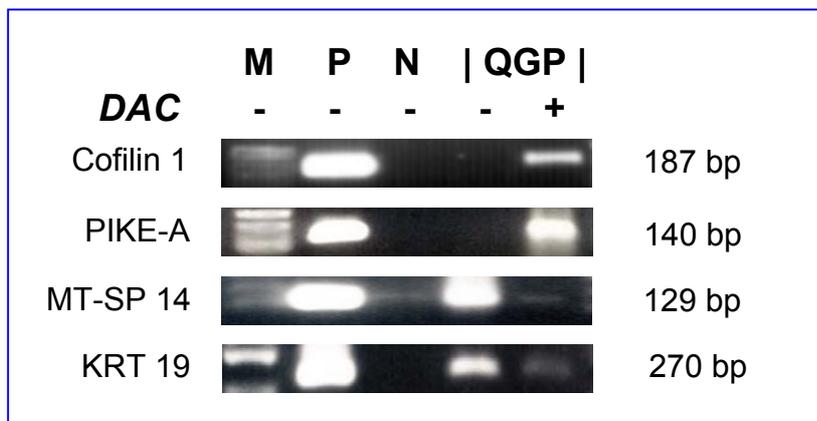


**Abbildung 14.** Überprüfung der methylierungsabhängigen Expression apoptose-assoziiierter Gene in QGP-1 Zellen durch RT-PCR. Links ist der Genname, rechts die Größe des RT-PCR Fragments angegeben. KRT 18, Keratin 18; PERP, p53 effector protein; Daxx 6, Death-associated protein 6; TA 1, Transaldolase 1; Gal 9, Galectin 9; CAPNS1, Calpain, small subunit; ITPK1, Inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase. M, Marker, P, Positiv-Kontrolle (Genfragment), N, Negativ-Kontrolle (PCR ohne cDNA Template), bp, Basenpaare, DAC, 5-Aza-2'-Deoxycytidin.

### 3.4.3. Metastasierungs-assoziierte Gene

Die Fähigkeit, Metastasen zu bilden ist ein Hauptcharakteristikum maligner Tumore. Anhand der cDNA-RDA konnten 4 distinkte Genfragmente identifiziert werden, deren Proteine eine Funktion im Abbau der extrazellulären Matrix oder in der Stabilisierung amöboider Bewegung haben. Somit könnten diese Proteine eine Rolle im Prozess der Metastasierung von Tumorzellen haben. Nach 5-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung der QGP-1 Zellen wurden 2 Gene reexprimiert, Cofilin 1 und PIKE-A, während die Expression der beiden anderen Gene, Matriptase und Keratin-19 supprimiert wurde.

Die Ergebnisse der RT-PCR zur Überprüfung der differentiellen methylierungsabhängigen Expression sind in Abbildung 15 dargestellt.



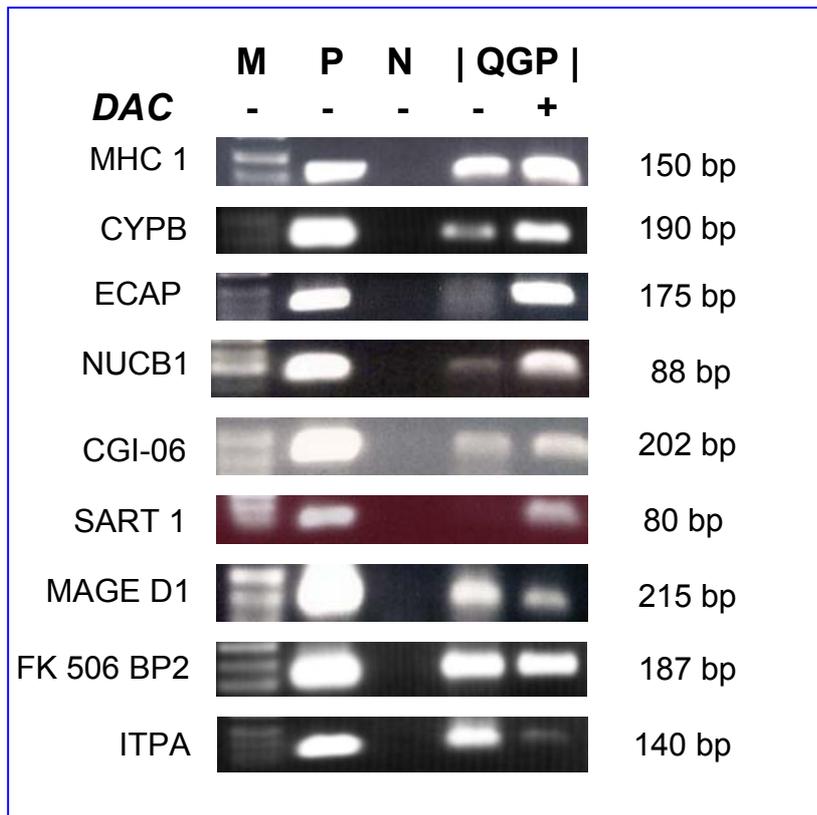
**Abbildung 15.** Überprüfung der methylierungsabhängigen Expression metastasierungs-assoziiierter Gene in QGP-1 Zellen durch RT-PCR. Links ist der Genname, rechts die Größe des RT-PCR Fragments angegeben. M, Marker, P, Positiv-Kontrolle (Genfragment), N, Negativ-Kontrolle (PCR ohne cDNA Template), bp, Basenpaare, DAC, 5-Aza-2'-Deoxycytidin. MT-SP 14, Matriptase; KRT19, Keratin-19.

#### **3.4.4. Immunabwehr-assoziierte Gene**

Durch die cDNA-RDA wurden 9 Genfragmente kloniert, die die Immunabwehr auf verschiedene Art beeinflussen können: MHC1, MHC class I antigen (HLA-A); CYPB, CyclophilinB; ECAP, Esophageal cancer - associated protein; CGI-06, Phosphatidyl inositol glycan class T; SART 1, Squamous cell carcinoma antigen; MAGE D1, Melanoma associated gene D1; SART 1, squamous cell carcinoma antigen; FK 506 BP2, FK 506 binding protein 2 und ITPA, Inosin triphosphatase. Es konnten somit neben Oberflächenantigenen und Rezeptoren auch Bindungsproteine identifiziert werden.

Die RT-PCR Analyse zeigte nach 5-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung der QGP-1 Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine verstärkte Expression von 5 Genen: MHC 1, CYPB, ECAP, NUCB1 und CGI-06. SART 1 wurde durch die Demethylierung reexprimiert, während MAGE D1 und ITPA niedrigere Expressionslevel aufwiesen. Für FK 506 BP2 konnte dagegen keine differentielle Expression bestätigt werden.

Die Ergebnisse der RT-PCR zur Überprüfung der differentiellen Immunabwehr-assoziierten Expression sind in Abbildung 16 dargestellt.



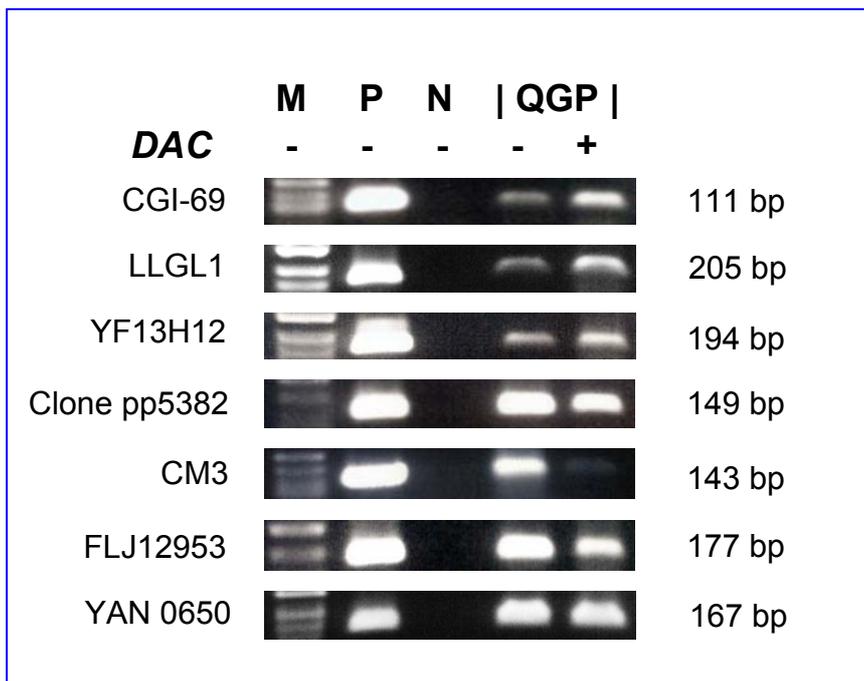
**Abbildung 16.** Überprüfung der methylierungsabhängigen Expression Immunabwehr-assoziiierter Gene in QGP-1 Zellen durch RT-PCR. Links ist der Genname, rechts die Größe des RT-PCR Fragments angegeben. MHC1, MHC class I antigen (HLA-A); CYPB, CyclophilinB; ECAP, Esophageal cancer-associated protein; CGI-06, Phosphatidyl inositol glycan class T; SART 1, Squamous cell carcinoma antigen; MAGE D1, Melanoma associated gene D1; SART 1, squamous cell carcinoma antigen; FK 506 BP2, FK 506 binding protein 2; ITPA, Inosin triphosphatase. M, Marker, P, Positiv-Kontrolle (Genfragment), N, Negativ-Kontrolle (PCR ohne Template), bp, Basenpaare, DAC, 5-Aza-2'-Deoxycytidin.

#### **3.4.5. Genfragmente mit bisher unbekannter Funktion**

Im Rahmen der cDNA-RDA wurden Genfragmente kloniert, über deren Funktion nach dem derzeitigen Kenntnisstand nur wenig oder nichts bekannt ist: CGI-69, Integral to membrane; LLGL1, ethal giant larvae homolog 1; YF13H12; Clone pp5382, unknown; CM3, CNNM3/Cyclin M3; FLJ12953, hypothetical protein und YAN 0650, Mitochondriales Protein.

Die RT-PCR Analyse zeigte nach 5-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung der QGP-1 Zellen im Vergleich zu den unbehandelten Zellen eine verstärkte Expression für 3 cDNA-Fragmente, CGI-69, LLGL1 und YF1H12. Weitere drei cDNA-Fragmente, Clone pp5382, CM3 und FLJ12953 wurden nach Behandlung niedriger exprimiert bzw. in der Expression supprimiert. YAN 0650 entspricht einer Teilsequenz des mitochondrialen Genoms und zeigte keine Veränderung der Expressionslevel.

Die Ergebnisse der RT-PCR zur Überprüfung der methylierungs-abhängigen differentiellen Expression sind in Abbildung 17 dargestellt.



**Abbildung 17.** Überprüfung der methylierungsabhängigen Expression von Genen mit unbekannter Funktion in QGP-1 Zellen durch RT-PCR. Links ist der Genname, rechts die Größe des RT-PCR Fragments angegeben. CGI-69, Integral to membrane; LLGL1, ethal giant larvae homolog 1; YF13H12; Clone pp5382, unknown; CM3, CNNM3/Cyclin M3; FLJ12953, hypothetical protein; YAN 0650, Mitochondriales Protein. M, Marker, P, Positiv-Kontrolle (Genfragment), N, Negativ-Kontrolle (PCR ohne Template), bp, Basenpaare, DAC, 5-Aza-2'-Deoxycytidin.

## 4. Diskussion

### 4.1. Die cDNA Representational Difference Analysis (cDNA-RDA) ist eine geeignete Methode zur Identifizierung einer Vielzahl differentiell exprimierter Gene in zwei Tumorzellpopulationen

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine große Anzahl möglicherweise in der Genese neuroendokriner Pankreastumorzellen relevante methylierungsabhängig exprimierte Gene aus unterschiedlich behandelten QGP-1 Tumorzellpopulationen identifiziert werden.

Zum Screening von genomweiten Veränderungen der DNA Methylierung stehen verschiedene Methoden zur Verfügung (Ushijima et al, 2005). In der vorliegenden Arbeit wurde die cDNA-RDA zur Suche nach methylierungsabhängig exprimierten Genen in einer Tumorzelllinie angewandt. Obwohl diese Methode den Einsatz einer Zelllinie erfordert, ist sie eine einfache und effektive Methode durch Methylierung stillgelegte Gene zu identifizieren.

Zur Untersuchung differentieller Genexpression standen Methoden wie Differential Display (Liang et al, 1992), Arbitrarily Primed PCR (RAP-PCR) (Mathieu-Daude et al, 1999), die Subtraktive Hybridisierung (Diatchenko et al, 1996) zur Verfügung. Zur Identifizierung wurde die Methode der Representational Difference Analysis (RDA) angewandt, die initial 1993 von Lisitsyn zur Identifikation von Unterschieden zwischen zwei komplexen Genomen entwickelt wurde (Lisitsyn et al, 1993; Lisitsyn, 1995). Die RDA beruht auf dem Prinzip der subtraktiven Hybridisierung und der selektiven Amplifikation mittels PCR, sodass nur DNA-Fragmente in der Größe von 150-1000 Basenpaaren amplifiziert werden, was zu einer Reduktion auf bis zu 2-10 % der initial eingesetzten genomischen DNA führt (Lisitsyn et al, 1993). Hubank und Schatz adaptierten die RDA, um die differentielle Genexpression zwischen zwei mRNA-Population zu

identifizieren (Hubank und Schatz, 1994). Ein wesentlicher Vorteil der cDNA-RDA ist die Möglichkeit der Identifikation der zeitnahen Genexpression, wodurch in einem beliebigen biologischen Kontext wichtige Informationen zu Änderungen in Regulationsvorgängen geliefert werden können.

Die Methode der cDNA-RDA für mRNA-Populationen wurde immer wieder optimiert (Pastorian et al, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde ein zusätzlicher Schritt zur Optimierung eingeführt, um frustrane Hybridisierungsversuche effektiver zu verhindern. Dazu wurde die Adapter-Ligation mittels PCR überprüft und diente der Sicherstellung einer suffizienten Ligation der Adapter an den Tester, was eine Voraussetzung für die nachfolgende subtraktive Hybridisierung und selektive Amplifikation über diese Adapter darstellte.

Zur Bestätigung der differentiellen Genexpression nach cDNA-RDA wurde in der vorliegenden Arbeit die RT-PCR gewählt. Alternativ wäre auch der Einsatz der Northern Blot oder Microarray Analyse möglich gewesen. Die Microarray Analyse hätte zwar den Vorteil nur eines Arbeitsganges zur Überprüfung einer Vielzahl von Genen geboten. Die cDNA-RDA Klone weisen jedoch je nach verwendetem Restriktionsenzym in der Regel eine Länge von 100-500 Basenpaaren auf und die optimale Länge für Microarrays liegt bei 1000 Basenpaaren, sodass ein wesentlicher Teil der isolierten Klone nicht als differentiell exprimiert erkannt worden wäre und große Differenzen zwischen der Anzahl der isolierten und der bestätigten Klone zu erwarten gewesen wäre (Boeuf et al, 2001; Linder et al, 2004).

Die cDNA-RDA wurde in zwei Richtungen eingesetzt: zum einen mit cDNA aus unbehandelten QGP-1 Zellen subtrahiert mit cDNA aus 5-Aza-2'-Deoxycytidin behandelten Zellen, und umgekehrt. In der vorliegenden Arbeit lag der RDA Output initial bei 157 Bakterienkolonien. Davon konnten 67 (45%) erfolgreich sequenziert werden. Die Komplexität der RDA Klone wurde weiter reduziert durch Sequenzredundanz und Ausschluss von klonierter Vektorsequenz, wobei noch 62 (39%)

nichtredundante Klone zur weiteren Analyse verblieben, deren Anzahl durch Validierung der differentiellen Expression mittels RT-PCR nochmals reduziert wurde. So konnten zum Schluss insgesamt 48 (31%) einzigartige differentiell exprimierte Genen, davon 26 als methylierungsabhängig heraufreguliert, und 22 als methylierungsabhängig herunterreguliert in QGP-1 Zellen identifiziert werden.

Die in dieser Arbeit angewandte Kombination aus cDNA-RDA und RT-PCR hatte zwar den Nachteil eines hohen Arbeitsaufwandes, erlaubte jedoch die Identifizierung eines großen Anteils an differentiell exprimierten Genen und deren Überprüfung und wird in dieser Kombination mittlerweile von vielen Arbeitsgruppen eingesetzt (Boräng et al, 2004; Yamada et al, 2004). Ein weiterer Vorteil ist die Anwendbarkeit auch bei anderen Zelllinien oder Tumorentitäten, da eine einmal etablierte PCR problemlos auch zur Klärung anderer Fragestellungen eingesetzt werden kann. Zudem erhält man durch die RDA eine Bibliothek isolierter Genfragmente, die für weitere Versuche zur Verfügung stehen.

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist die Limitierung der Methodik zu berücksichtigen. Probleme existieren hinsichtlich der Korrelation zwischen mRNA und Proteinlevel, wobei weiterführende Untersuchungen auf Proteinebene Klärung schaffen können. Da die differentielle *p16<sup>INK4a</sup>* Expression anhand der cDNA-RDA nicht nachgewiesen wurde ist es wahrscheinlich, dass die wahren Unterschiede zwischen den beiden QGP-1 Zellpopulation in dieser Studie unterschätzt werden.

## **4.2. Identifizierung methylierungsabhängig exprimierter Gene in neuroendokrinen Pankreastumoren**

Der Untersuchung des Methylierungszustandes putativer tumorassoziierter Gene in Tumorzellen galt in den letzten Jahren ein zunehmendes Interesse. So konnten bisher eine Reihe von Genen identifiziert werden, die häufig in unterschiedlichen Tumorentitäten methylierungsabhängig reguliert werden (Ahuja et al, 2000, Tabelle 7). Auch in der Pathogenese neuroendokriner Pankreastumoren scheinen nicht nur genetische, sondern vor allem auch epigenetische Veränderungen bedeutsam (Tabelle 7) (Simon und Lubomierski, 2004; Arnold et al, 2004; Dammann et al, 2003; Wild et al, 2003, House et al, 2003; Li et al, 2002).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen das Konzept der epigenetischen Bedeutung in der Pathogenese neuroendokriner Pankreastumore und haben zur Identifizierung weiterer interessanter Kandidatengene beigetragen, deren Relevanz noch an Primärtumoren zu bestätigen ist. Ein Teil der identifizierten Gene, die nach Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin in QGP-1 Zellen reexprimiert wurden sind interessanterweise bisher in der Literatur weder als methylierungsabhängig beschrieben noch in Zusammenhang mit Tumorgenese gebracht worden.

**Tabelle 7.** Häufig in humanen Tumoren durch Methylierung inaktivierte Gene (modifiziert nach Ahuja et al, 2000)

Schritte der Tumorgenese	Inaktivierte Gene
Zellzyklus	<i>Retinoblastom-Gen (Rb)</i> <i>p16<sup>INK4a</sup></i> <i>p15<sup>INK4b</sup></i> <i>14-3-3<math>\sigma</math></i> <i>p14<sup>ARF</sup></i>
Signaltransduktion	<i>RASSF1</i> <i>LKB/STK11</i> <i>APC</i>
Apoptose	<i>DAPK</i> <i>Caspase 8</i>
DNA-Reparatur	<i>MGMT</i> <i>MLH1</i> <i>BRCA1</i>
Karzinogen-Metabolismus	<i>GSTP1</i>
Hormonantwort	<i>Östrogen-Rezeptor-Gen (ER)</i> <i>Progesteron-Rezeptor-Gen</i> <i>Retinoic acid receptor <math>\beta</math>2 Gen (RAR-<math>\beta</math>2)</i>
Seneszenz	<i>TERT</i> <i>TERC</i>
Invasion, Metastasierung	<i>TIMP3</i> <i>E-Cadherin</i> <i>VHL</i>

Blau gekennzeichnet sind bisher in humanen neuroendokrinen Pankreastumorzellen identifizierte epigenetische Veränderungen. *p16<sup>INK4a</sup>*, *p14<sup>INK4a</sup>*, Simon und Lubomierski, 2004; *RASSF1*, Dammann et al, 2003; *APC*, Arnold et al, 2004; *MGMT*, *MLH1*, *RAR- $\beta$ 2*, House et al, 2003; *TIMP3*, Wild et al, 2003; *E-Cadherin*, Li et al, 2002, House et al, 2003).

Die Interpretation der RDA-basierten Daten und die Validierung der Ergebnisse für ihre Anwendung in Primärtumoren bleibt eine Herausforderung. Von Interesse ist die funktionelle Bedeutung der methylierungsabhängig exprimierten Proteine in der Pathogenese der neuroendokrinen Pankreastumorzellen. Wenn die in QGP-1 Zellen identifizierten Gene entsprechend der von Hanahan und Weinberg vorgeschlagenen Mechanismen der Tumorentstehung kategorisiert

werden so zeigt sich, dass eine ganze Reihe von identifizierten Genen multifunktionell sind und nicht immer eindeutig zugeordnet werden konnten (Hanahan und Weinberg, 2000). Dennoch waren mit Ausnahme der sieben hinsichtlich ihrer Funktion unbekanntem Gene, die meisten der isolierten Gene an der Zellproliferation, Signaltransduktion, Ribosomenbiosynthese und Proteinhomöostase beteiligt, der zweitgrößte Anteil direkt oder indirekt mit dem Immunsystem assoziiert, und die übrigen Gene im Prozess der Apoptose oder Tumorerkrankung bzw. Metastasierung involviert.

#### **4.3. Relevanz methylierungsabhängiger Gene der Zellproliferation, Signaltransduktion, Ribosomenbiogenese und Proteinhomöostase in QGP-1 Zellen**

Zellzyklusassoziierte Gene können in Tumorzellen einerseits zum Fortbestehen von Wachstumsreizen beitragen, andererseits kann ihre Repression die Umgehung der Proliferationskontrolle begünstigen (Hanahan und Weinberg, 2000). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen darauf hin, dass neben den bereits bekannten (s. Tabelle 7) weitere an der Zellproliferation beteiligte Gene in neuroendokrinen Pankreastumorzellen QGP-1 Zellen methylierungsabhängig reguliert werden. Da die Über- oder Herunterregulation einiger dieser Gene im Zusammenhang mit der Onkogenese in anderen Tumoren steht, könnte eine pathogenetische Rolle auch in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen QGP-1 vermutet werden.

So ist die Reexpression des  $\alpha_{1H}$  **spannungsabhängigen Calcium-Kanals (CACNA1H)** in den mit 5'-Aza-2'-Deoxycytidin behandelten QGP-1 Zellen eine interessante Beobachtung, da die CACNA1H-Überexpression in Prostatakarzinomzellen mit neuroendokriner Differenzierung, Synchronisation in Phase G1 des Zellzyklus und Zellzyklusarrest assoziiert ist (Mariot et al, 2002). Die Suppression des

**Calcium-bindenden Proteins Calmodulin 3 (Cal 3, CaM)** nach Demethylierung in QGP-1 Zellen steht im Einklang mit vorausgegangenen Untersuchungen an anderen Tumorentitäten. Schon früh wurde über eine positive Korrelation zwischen CaM und dem Wachstum von Lebertumoren, später auch über die erfolgreiche Chemotherapie von neuroendokrinen Lungentumoren in Hamstern durch CaM-Antagonisten berichtet (Schuller et al, 1990). Erst im vergangenen Jahr konnte gezeigt werden, dass das Curcumin-Derivat HBC durch Antagonisierung von CaM die Zellzyklusprogression in Kolonkarzinomzellen inhibiert, was vermuten ließ, dass dies über eine Aktivierung von ERK1/2 und die nachfolgenden Targets u.a. p21<sup>WAF1</sup> und Egr-1 geschieht (Shim et al, 2004). Die mögliche Bedeutung von CaM in der Onkogenese wird unterstrichen durch die Überexpression des ErbB2/HER2/NEU-Rezeptors, einem CaM-bindenden Protein in Mammakarzinomzellen (Li et al, 2004). Calmodulin könnte so über die ErbB2/ERK1/2-RAS-RAF und PI3-Akt-Signalkaskade in den Zellzyklus eingreifen.

Durch die Behandlung mit 5'-Aza-2'-Deoxycytidin wurde die Expression des **Repressors der Östrogen-Rezeptor Aktivität (REA)** signifikant in QGP-1 Zellen gesenkt. Eine methylierungsabhängige Regulation war bisher unbekannt. REA ist ein transkriptioneller Repressor, der über Bindung an nukleäre Hormonrezeptoren und Rekrutierung der Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC5 die Transkription hemmt (Kurtev et al, 2004). Klasse 1 HDACs (u.a. HDAC1) sind bei der Regulation der Zellzyklusprogression, Zelldifferenzierung und Entwicklung involviert und einige Studien weisen auch auf eine Rolle in der Karzinogenese hin (Ng und Bird, 2000; Cress et al, 2000). Inwiefern REA eine Rolle in der Pathogenese neuroendokriner Pankreastumorzellen spielt ist unbekannt.

Das **Interferon-induzierte Transmembranprotein M3 (IFITM3)** gehört zur 1-8U-Familie, deren Mitglieder homotypische Adhäsion und Transduktion antiproliferativer Signale vermitteln (Brem et al, 2003). Während in Melanomazellen der antiproliferative Effekt von IFN- $\alpha$  mit 1-8U Induzierung vergesellschaftet ist (Brem et al, 2003), zeigten die QGP-1

Zellen nach 5'-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung überraschend eine deutlich schwächere Genexpression im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Der Mechanismus der IFITM3 Regulation durch Demethylierung ist unbekannt, sodass die Relevanz dieser Beobachtung nicht bewertet werden kann.

Die Expression von **Phosphatidyl-inositol-Synthetase (CDIPT)**, des **Theta-Polypeptid des Tyrosin/Tryptophan-Aktivierungsprotein (YWHAQ)** und dem G-Protein  **$\beta$ -Polypeptid (GNB2)** wurde durch die 5'-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung der QGP-1 Tumorzellen heraufreguliert. CDIPT ist ein auf der zytoplasmatischen Seite des Endoplasmatischen Retikulums gelegenes integrales Membranprotein, während YWHAQ ein Mitglied der 14-3-3- Familie ist, die Signaltransduktion vermittelt. GNB2 ist die Beta-Untereinheit des G-Protein-Komplexes. Ein Zusammenhang zwischen abberanter Expression und maligner Transformation wurde bisher für alle drei Kandidaten nicht beschrieben, auch ist eine methylierungsabhängige Regulation bisher nicht bekannt gewesen. Die Relevanz dieser Gene in der Pathogenese neuroendokrinen Pankreastumorzellen bleibt unklar.

Die Modulation von Crosstalk zwischen Signalstransduktionswegen ist zunehmend von Interesse. Die Reexpression von **Plectin 1 (PLEC 1)** in nach 5'-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung könnte in QGP-1 Zellen einen zytoskeleton-assoziierten Komplex mit RACK1 (Rezeptor der aktivierten Kinase C 1) und der Proteinkinase C (PKC) ermöglichen. Plectin 1 ist ein zytoskelettaler Regulator des Proteinkinase C Signaling und möglicherweise weiterer Signalingereignisse. Plectin 1 Defizienz führt zu einer Verschiebung des Gleichgewichts hin zum löslichen Zytosol und die Zellperipherie, ähnlich wie nach EGF- oder PMA Behandlung der Zellen (Osmanagic-Myers et al, 2004). Die Funktion im Prozess der Transformation und Onkogenese ist unklar.

Die Bedeutung der **Myosin 9b (MYOB9, Myosin-IXb)** Herunterregulation nach Demethylierung in QGP-1 Zellen ist unklar. MYOB9 ist eine Myosin-

Untereinheit, die primär der Filamentbewegung dient und aus einer schweren sowie mehreren leichten Ketten besteht. Eine Besonderheit der Myosin 9-Gruppe ist die Fähigkeit das GTP-Bindungsprotein Rho zu aktivieren und so in der GTP-abhängigen Signaltransduktionskaskade teilzunehmen (Post et al, 2002). Ob MYO9B Bedeutung für maligne Transformation von Zellen hat ist bisher nicht geklärt.

In der vorliegenden Arbeit konnten 5 Gene isoliert werden, die entweder ribosomale Proteine oder Translationsfaktoren kodieren. Der **Eukaryotische Elongationsfaktor 2 (EEF2)**, **Ribosomal Protein 3 (RPL3)**, **RNA-Polymerase-II-Polypeptid G (POLR2G)** sowie **Methionin-t-RNA-Synthetasen (MARS)** wurden nach 5'-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung vermehrt exprimiert, während die Expression des **Ribosomal Protein large P0 (RPLP0)** vollständig in QGP-1 Zellen supprimiert wurde. EEF2 bewirkt die Translokation von Peptidyl-t-RNA von der ribosomalen A-Stelle zur P-Stelle und wird durch EEF2-Kinase vermittelte Phosphorylierung inaktiviert (Moldave, 1985; Nygard und Nilsson, 1990). Das Beladen der t-RNA mit Aminosäuren wird durch MARS vermittelt (Ko et al., 2000; Deniziak und Barciszewski, 2001). Währenddessen ist RPL3 Mitglied des YPH1 (Yeast Pescadillo Homolog 1) - Komplexes der Ribosomen-Biogenese und RPL3 knockout führt zu vermehrtem Auftreten von anomalen Mitosen mit hyperploiden Zellen (Killian et al, 2004). POLR2G ist eine regulatorische Untereinheit der RNA-Polymerase, während RPLP0 zur 60 S-Untereinheit des Ribosoms gehört und im Komplex mit RPLP1 sowie RPLP2 mit Elongationsfaktoren interagiert. Ein weiteres Gen, dessen Protein der Interaktion zwischen Ribosom und RNA dient und dessen Expression durch 5'-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung verringert wurde ist das **Poly-rC-Bindungs-Protein 1 (PCBP1)**. PCBP1 dient als RNA-Chaperon, welches die RNA-Faltung im Umfeld des Ribosoms verändert (Pickering et al, 2004). Interessant ist, dass PCBP1 mit dem "internal ribosome entry segment" (IRES) des Proto-Oncogen *c-Myc* interagiert und die *c-Myc* Translation stimuliert (Evans et al, 2003). Die Kontrolle der Translation ist für den *c-Myc* Proteingehalt einer Zelle wichtig und eine veränderte *c-Myc* Expression kann Folge einer

Expression kann Folge einer abberanten translationalen Regulation sein, wie in Myelomazellen gezeigt (Paulin et al, 1996). Viele Studien weisen darauf hin, dass die Ribosomenbiogenese in Tumorzellen dereguliert ist und lassen vermuten, dass die Veränderungen onkogen wirken können (Ruggero und Pandolfi, 2003, Killian et al, 2004). So sind ribosomale Proteine häufig in Primärtumoren überexprimiert. Während die Tumorsuppressorproteine wie RB und TP53 die RNA Polymerase I, die rRNA transkribiert herunterregulieren, erhöht N-Myc die Transkription von Genen der Ribosomenbiogenese. Interessanterweise konnte auch gezeigt werden, dass p14<sup>ARF</sup> ribosomales RNA Processing inhibiert und die Degradation von B23, einem Protein der Ribosomenbiogenese und Zellproliferation vermittelt (Itahana et al, 2003). Das in dieser Arbeit nach Demethylierung beobachtete Expressionsprofil in den QGP-1 Zellen weist daher erstmals auf einen Link zwischen Methylierungsstatus und Ribosomenbiogenese hin. Das Expressionsprofil nach demethylierender Behandlung weist zudem daraufhin, dass das eher in Tumorzellen zu erwartende Genexpressionsprofil der Ribosomenbiogenese in den QGP-1 Zellen reversibel ist.

Eukaryote Zellen besitzen ein Qualitätskontrollsystem, um miss- oder ungefaltete Proteine zu reparieren oder zu degradieren. Dies beruht zum einen auf der Förderung der korrekten Proteinfaltung durch molekulare Chaperone und zum anderen auf der Degradation der Proteine durch das Ubiquitin-Proteasome System. Die Behandlung mit 5'-Aza-2'-Deoxycytidin führte in QGP-1-Zellen zu einer geringeren Transkription von zwei Genen des Ubiquitin-Proteasome Systems, **Ubiquitin-Aktivierungs-Enzym E1 (UBE1)** sowie **F-Box-7 (Fbx7)**. Das UBE1 Protein bindet unter ATP-Verbrauch an Ubiquitin, um dann an die weiteren Enzyme UBE2 und UBE3 zu binden (Hatakeyama et al, 2003). F-Box-Proteine sind Bestandteil des SCF (Skp1, Cdc53/Cullin1, F-Box-Protein) Ubiquitin Ligase Komplexes, und möglicherweise verantwortlich für Substraterkennung und Rekrutment von SCF-vermittelter Proteolyse (Hsu et al, 2004). Fbx7 ist für die Proteolyse des in Hepatomazellen überexprimierten HURP (Hepatoma Upregulated Protein), einem

Zellzyklusregulator notwendig. HURP Überexpression ist auch assoziiert mit Kolon- und Mammakarzinomen (Tsou et al, 2003). Zur Klärung der Rolle von Fbx7 als negativer Regulator von HURP in der Onkogenese bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen. Desweiteren war auch die Transkription der ***β3-Untereinheit des Proteasom (PSMB3)*** nach 5'-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung im Vergleich zu den nativen QGP-1 Tumorzellen reduziert. In QGP-1 Zellen führte die Demethylierung mit 5'-Aza2'-Deoxycytidin zur verminderten Transkription von Genen, die für die intrazelluläre Proteinhomöostase relevante regulatorische Faktoren kodieren.

QGP-1 Zellen zeigten nach Behandlung mit 1  $\mu\text{M}$  5'-Aza-2'-Deoxycytidin verstärkt solche Gene transkribiert, deren Proteine in Stoffwechselfvorgängen eine Rolle spielen. Die ***Malatdehydrogenase (MDH2)*** katalysiert die Oxidation von Malat in Oxalacetat im Zitronensäurezyklus und ist ein Schlüsselenzym des aeroben Metabolismus. Erhöhte Malatdehydrogenaseaktivität wurde bei undifferenzierten Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich im Vergleich zu differenzierten Formen als Ausdruck eines unterschiedlichen aeroben oxidativen Metabolismus beschrieben (Ross et al, 2000). Tumorzellen weisen in der Regel eine hohe Metabolismusrate auf, jedoch gehören die nativen QGP-1 Zellen nicht zu den schnell proliferierenden Tumorzellen. Darüberhinaus führte 5'-Aza-2'-Deoxycytidin zur Inhibition der Proliferation von QGP-1 Zellen und verbunden mit einem für Seneszenz bzw. Zelldifferenzierung charakteristischen Phänotyp (Lubomierski et al, 2001). Da von den normalen Geweben insbesondere neuronale Gewebe mit einer hohen Mitochondriendichte hohe Konzentrationen an MDH2 Aktivität zeigen, wäre die Zunahme der *MDH2* Genexpression in den 5'-Aza-2'-Deoxycytidin behandelten Zellen im Vergleich zu den Unbehandelten erklärbar. Eine methylierungsabhängige Regulation der MDH2 war bisher nicht bekannt und konnte in der Arbeit erstmals gezeigt werden.

Neben ihrer vitalen Rolle in Membranstruktur und -funktion regulieren ungesättigte Fettsäuren die Gentranskription von Proteinen im Lipidstoffwechsel (Clarke et al, 1997). In der Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass die **Desaturase 3 (FADS3)**, die gesättigte Fettsäuren zu ungesättigten Fettsäuren umwandelt methylierungsabhängig exprimiert wird, wobei Demethylierung zu einer Erhöhung des bereits in unbehandelten Zellen exprimierten *FADS3* führte (Marquardt et al, 2000). Eine Verbindung zu malignen Erkrankungen wurde für *FADS3* bisher nicht berichtet.

Ein interessantes Stoffwechsel-Protein, dessen Expression nach der Behandlung mit 5-Aza-2'-Deoxycytidin schwächer wurde ist **GAPDH**, das im Kohlenhydratmetabolismus die reversible oxidative Phosphorylierung von Glycerinaldehyde-3-phosphat mit anorganische Phosphat in Anwesenheit von NAD katalysiert aber auch u.a. Funktionen bei der DNA-Reparatur, Apoptose und oxidativen Stress hat (Kontou et al, 2004). Tumorzellen haben in der Regel hohe GAPDH Expressionslevel (Kontou et al, 2004). Sehr interessant sind neuere Untersuchungen die gezeigt haben, dass GAPDH bei der Erhaltung und/oder Protektion von telomerischer DNA eine Rolle spielt. Dabei führte die partielle GAPDH Inhibition durch small interfering RNA (siRNA) zur rapiden Kürzung der Telomere, während nukleäre GAPDH Überexpression Protektion der telomerischen DNA zeigte (Sundararaj et al, 2004). Es ist postuliert worden, dass progressive Kürzung der Telomerlänge in somatischen Zellen zur zellulären Seneszenz führt, während der Erhalt der Telomere bei einer kritischen Länge mit der Immortalisierung von Keimzellen und Tumorzellen assoziiert ist (Blackburn, 2000; 2005). Über erhöhte Telomeraseaktivität wurde in wenigen malignen neuroendokrinen Pankreastumoren berichtet (Lam et al, 2000). Obwohl mehrere Proteine in der Regulation der Telomerenlänge eine Rolle spielen könnte die reduzierte GAPDH Expression in QGP-1 Zellen nach Demethylierungsbehandlung eine Kürzung der Telomeren und damit einhergehend zelluläre Seneszenz zur Folge haben.

Der "*nuclear pore complex*", dessen Bestandteil **Nucleoporin 210 (NUP 210)** nach Behandlung mit 5'-Aza-2'-Deoxycytidin in QGP-1 Zellen supprimiert wird, ist ein Komplex in der Kernmembran, der den Austausch von Molekülen zwischen Nucleus und Zytoplasma reguliert (Cohen et al., 2003). Eine Verbindung zur Onkogenese und der Expression von Nucleoporin 210 wurde bislang nicht beschrieben, sodass die Zuordnung zu einem bestimmten Schritt im Prozess der Onkogenese derzeit nicht möglich ist.

Ein weiteres im Endoplasmatischen Reticulum lokalisierte Protein, dessen Gen nach 5'-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung verringert exprimiert wird, ist **Reticulon 2 (RTN2)**, ein Mitglied der Nogo-Familie. Sicher ist die Assoziation zur neuroendokrinen Sekretion und Membranaustausch (Oertle et al., 2003). Dagegen wurde eine Funktion insbesondere im Hinblick auf maligne Erkrankungen bis dato nicht beschrieben.

#### **4.4. Bedeutung der in QGP-1 Zellen methylierungsabhängig exprimierten Gene in der Apoptoseregulation**

Die Umgehung des programmierten Zelltodes ist ein wichtiger Mechanismus der Tumorentstehung (Hanahan und Weinberg, 2000). Neben genetischen Veränderungen können auch epigenetische Mechanismen zur Verhinderung von Apoptose führen und maligne Zelltransformation einleiten. In der vorliegenden Arbeit konnten sieben an verschiedenen Stellen der Apoptosekaskade methylierungsabhängig unterschiedlich regulierte Gene in QGP-1 Zellen identifiziert werden.

Überraschend zeigte **Keratin 18 (KRT18)**, ein primär in Epithelzellen exprimiertes Intermediärfilament eine methylierungsabhängige Regulation in QGP-1 Zellen. Zytokeratine (CK) sind Mitglieder der Familie der Intermediärfilamente. CKs 8, 18, und 19 werden von fast allen Karzinomen exprimiert und ins Serum freigesetzt (Kramer et al, 2004).

Expression von Keratin 18 ist bereits in verschiedenen Tumoren, insbesondere Mamma-, Prostata-, Bronchial-, Kolon- und Ovarialkarzinomen beschrieben worden. Da Keratin 18 normalerweise nicht im zirkulierenden Blut exprimiert wird eignet es sich als Biomarker, wobei der Nachweis löslicher Keratin 18-Spaltprodukte auch für die Messung des Therapieerfolges bei Chemotherapie eingesetzt wurde (Linder et al, 2004). Jedoch muss zwischen der Tumornekroseform und dem apoptose-spezifischen caspase-geschnittenen Keratin 18 Fragment unterschieden werden, wobei letzteres nur einen Bruchteil der Gesamtmenge stellt (Kramer et al, 2004). Die verstärkte Expression von Keratin 18 nach 5'-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung in QGP-1 Zellen führt nach dem derzeitigen Kenntnisstand nicht zur Beeinflussung der direkten Apoptose-Signalkaskaden. Um so interessanter wäre die weitere Klärung und Validierung des Markers Keratin 18 nach 5'-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung in neuroendokrinen Pankreastumoren. Proliferierende Zellen haben einen Pool löslichen CK8 und 18, und G2-M Arrest induziert eine Zunahme des Pools (Chou et al, 1993). Humane neuroendokrine Pankreastumorzellen BON-1 zeigten unter 1  $\mu$ M 5'-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung eine signifikante Zunahme der G2-M Zellfraktion (Robbel, 2005). Sollte dies auch für QGP-1 Zellen zutreffen, könnte dies eine kompensatorische Zunahme der Keratin-18 Genexpression erklären. Für Keratin-18 ist keine Funktion in der Apoptosekaskade bekannt, es wurde dennoch hier aufgrund der caspase-spezifischen Spaltung während der Apoptose diskutiert.

**MAGE-D1 (NRAGE)** ist Mitglied der MAGE Genfamilie und ein Bindungspartner für den p75 Neurotrophinrezeptor, den Apoptoseinhibitor XIAP und die Dlx/MSX Homoeodomain Proteine. MAGE-D1 blockiert den Zellzyklus und bewirkt über die zytosolische Akkumulation von Cytochrom C und die Aktivierung von Caspase-3, -9 und -7 eine Apoptoseinduktion (Salehi et al, 2002; Barker et al, 2002). Obwohl für andere MAGE-Antigene eine Reexpression nach 5'-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung, insbesondere beim Pankreaskarzinom beschrieben wurde (Bert et al, 2002) kommt es in QGP-1 Zellen zu einer verminderten MAGE-D1

Transkription. Es ist daher denkbar, dass durch MAGE-D1 Herunterregulation in QGP-1 Zellen die proapoptotische Wirkung reduziert wird.

Mit dem ***Death-associated protein 6 (Daxx6)*** wurde ein Genfragment mit verschiedenen Funktionen in der Apoptose isoliert. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals die methylierungsabhängige Expression von Daxx6 in neuroendokrinen Pankreastumorzellen gezeigt, wobei 5'-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung in QGP-1 Zellen zu einer Heraufregulation der Daxx6 Genexpression führte. Daxx ist in Prostata Tumorzellen heraufreguliert, dagegen im Mantelzelllymphom herunterreguliert (Chen und Chen, 2003). Daxx kann pro-apoptotische als auch anti-apoptotische Wirkung haben (Zhao et al, 2004). So bindet Daxx6 die zytosolische Domäne von Fas und übermittelt ein FADD-unabhängiges Apoptosesignal durch Aktivierung der Jun-N-terminalen Kinase (JNK) (Yang et al, 1997). Weiterhin bindet Daxx6 direkt an die "Apoptosis-signal-regulating kinase 1" (Ask1) und aktiviert über diese JNK (Ko et al, 2001). Ebenso konnte eine Bindung an den TGF- $\beta$  Rezeptor nachgewiesen werden, was ebenfalls pro-apoptotisch wirkt und JNK aktiviert. Im Gegensatz dazu zeigte die Inhibition der Daxx6 Transkription mittels small-interfering RNA (siRNA) in HeLa Tumorzellen und als auch Daxx6 Knockout-Mäuse eine erhöhte Apoptoserate (Chen et al, 2003; (Michaelson et al, 1999). Zudem ist Daxx6 ein negativer Regulator von p53. Das heißt, dass Daxx6 möglicherweise zelluläre Prozesse durch Modulation der Transkription spezifischer Gene unter unterschiedlichen Bedingungen reguliert. Die Funktion von Daxx6 in den QGP-1 Zellen ist unbekannt.

Ein weiteres Gen, das nach Demethylierung durch 5'-Aza-2'-Deoxycytidin in QGP-1 Zellen heraufreguliert wurde konnte als ***p53-Effektor-Protein (PERP)*** der Apoptoseregulation zugeordnet werden. PERP ist ein Mitglied der PMP-22/gas3-Transmembran-Proteine und ein pro-apoptotisches Targetgen von p53, das in apoptotischen Zellen, nicht aber in Zellen die Zellzyklusarrest eingehen stark exprimiert wird (Attardi et al, 2000). Die Aktivierung durch p53 erfolgt über 3 Bindungselemente in der PERP-Promotorregion des ersten Introns (Reczek et al, 2003). Neben der

vermehrten Transkription des pro-apoptotischen Faktors PERP führte die Demethylierung zur Suppression der ***Inositol1,3,4-Triphosphatase5/6 Kinase (ITPK1)*** Genexpression in QGP-1 Zellen und somit möglicherweise zu einer weiteren Steigerung der Apoptoserate. So zeigte die Überexpression von ITPK1 in HeLa-Tumorzellen eine Inhibition der TNF-R1 vermittelten Apoptose insbesondere über Interaktion mit der TNF-R1 assoziierten Death Domain (TRADD), dagegen der siRNA-Knockout der ITPK1 eine Zunahme der TNF-vermittelten Apoptose (Sun et al, 2003).

Interessant ist die Beobachtung, dass QGP-1 Zellen ***Galectin-9 (Gal-9)*** exprimierten, was jedoch durch 5'-Aza-2'-Deoxycytidin fast vollständig supprimiert wurde. Gal-9 wurde initial in Morbus Hodgkin Tumorzellen identifiziert (Tureci et al, 1997) und ist in vielen Geweben u.a. in Leber, Dünndarm, Niere oder Lunge, kaum im Gehirn, und überhaupt nicht in Fibroblasten oder Endothelzellen exprimiert (Wada et al, 1997; Hirashima et al, 2004). Die Gal-9 Expression kann jedoch durch bestimmte Zytokine wie IL-1 $\beta$  oder Interferon- $\gamma$  stimuliert werden, was darauf hinweist, dass die Funktion von Gal-9 unter physiologischen Bedingungen eine andere ist als unter pathologischen Bedingungen (Yoshida et al, 2001; Imaizumi et al, 2002). Gal-9 hat diverse Funktionen in verschiedenen Zelltypen. Gal-9 induziert Zellaggregationen von Melanoma- und Mammakarzinomzellen, wirkt als Adhäsionsfaktor zwischen eosinophilen Granulozyten und behandelten Endothelzellen oder Fibroblasten, und induziert Apoptose u.a. in Masthymozyten, eosinophilen Granulozyten und anderen Immunzellen über den Calcium-Calpain-Caspase1 Signalweg (Kashio et al, 2003; Hirashima et al, 2004). Im Gegensatz zu anderen Galectins, die Tumorinvasion fördern und Tumorzellen vor der Apoptose schützen ist die Gal-9 Expression in Mammakarzinomzellen ein eher günstiger Prognosefaktor mit negativer Korrelation zur Fernmetastasierung (Hirashima et al, 2004). Dagegen wird die Gal-9 mRNA mit zunehmendem Differenzierungsgrad in Monozyten herunterreguliert. Aufgrund der unterschiedlichen zellspezifischen Funktionen bleibt die Bedeutung der methylierungsabhängigen Gal-9

Expression in den neuroendokrinen Pankreastumorzellen QGP-1 unklar. Die vorliegende Arbeit konnte aber erstmals die methylierungsabhängige Regulation von Gal-9 zeigen.

Obwohl **Calpain (CAPNS1)** durch cDNA-RDA isoliert wurde, zeigte die Überprüfung mittels semiquantitativer RT-PCR keine wesentliche methylierungsabhängige Unterschiede. Dagegen führte 5'-Aza-2'-Deoxycytidin in QGP-1 Zellen zu einer deutlichen Suppression der **humanen Transaldolase (TA 1)**. CAPNS1 ist eine Protease, die durch eine erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration aktiviert wird. Dieses führt über die Spaltung und dadurch resultierende Aktivierung der proapoptischen Proteine Bax und Bid zur mitochondrialen Membrandepolarisation und Cytochrom-C-Freisetzung, die wiederum zur Apoptose führt (Altnauer et al, 2004; Chakrabarti et al, 2005). Die Transaldolase ist dagegen ein Schrittmacherenzym des Pentosephosphatzyklus (PPP), der sich aus einem nonoxidativen und einem oxidativen Arm zusammensetzt und zwei Aufgaben hat: Bereitstellung von Ribose-5-Phosphat zur Nukleotidsynthese sowie die Generierung von NADPH als Reduktionsmittel bei biosynthetischen Reaktionen, insbesondere zur Reduktion von oxidiertem Glutathion-S-Transferase, die wiederum im reduzierten Zustand Zellschäden durch reaktive Sauerstoffteilchen verhindert (Grossman et al, 2004). Die enzymatische Aktivität der Transaldolase ist gewebe- und entwicklungspezifisch reguliert, und seine Expression könnte eine kritische Determinante der gewebespezifischen Sensitivität gegenüber oxidativem Stress und anderen Apoptose- sowie Differenzierungssignalen sein. Überexpression der Transaldolase führt zu niedrigem Gehalt an NADPH und GSH und macht die Zelle empfindlich für Apoptosesignale wie  $H_2O_2$ , NO (Nitric Oxide),  $TNF\alpha$  oder anti-FAS-Antikörper. Reduzierte Transaldolase Expression führt zu erhöhtem GSH mit Inhibition der Apoptose (Banki et al, 1999; Grossman et al, 2004). Die Transaldolase Suppression in den neuroendokrinen QGP-1 Zellen könnte daher zu einer niedrigeren Empfindlichkeit der QGP-1 Zellen gegenüber Apoptosesignalen führen.

#### 4.5. Funktionelle Bedeutung methylierungsabhängig regulierter metastasierungs-assoziiierter Gene in QGP-1 Zellen

Die Fähigkeit, Tochterabsiedlungen zu bilden, ist ein wesentliches Charakteristikum maligner Tumore und lebendbedrohlich. Daher ist es von besonderem Interesse, Gene zu identifizieren, die im Zusammenhang mit Metastasierung stehen, um diese als Marker zu nutzen, die der Vorhersage der Metastasierungswahrscheinlichkeit eines Tumors, zum anderen für stattgefundene Metastasierung dienen oder gar - bei Reexpression - eine Metastasierung verhindern. In der vorliegenden Arbeit wurden 4 Genfragmente identifiziert, die für Proteine kodieren, die auf verschiedene Art und Weise in den Prozess der Metastasierung involviert sind.

Mit **Cofilin 1** wurde in dieser Arbeit ein Genfragment identifiziert, dessen Protein ein Hauptregulator der Aktindynamik am führenden Ende sich bewegender Zellen ist. Cofilin 1 bildet neue Enden zur Polymerisation und depolymerisiert ältere Aktin-Filamente. Auf molekularer Ebene wird Cofilin 1 durch Phosphorylierung, pH-Wert sowie durch Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphat-Bindung reguliert (Desmarais et al, 2005). Diese Phosphorylierung ist vermittelt durch die Rho-GTPase, die über die p21-aktivierte Kinase (Pak-1) und Rho-Kinase (Rock) die LIM-Kinase (Limk) aktiviert, die dann Cofilin 1 via Phosphorylierung an der 3. Serin-Aminosäure inaktiviert (Gohla et al, 2002). Cofilin 1 scheint auch durch Interaktion mit 14-3-3 $\xi$  und cyclase-assoziierte Proteine reguliert. Interessant ist, dass Cofilin 1 Expression bisher nur in wenigen Tumorentitäten beschrieben wurde. Bei Zelllinien eines hepatozellulären Karzinoms zeigte sich eine verminderte Cofilin 1 Expression bei den hochgradig metastasierenden im Vergleich zu den niedriggradig metastasierenden (Ding et al, 2004). Darüber hinaus wurde bei Zelllinien, die aus Oberflächenepithelien des Ovars von Frauen entstammen, die ein Ovarial- oder Mammakarzinom in der Familienanamnese haben gegenüber solchen ohne eine solche Familienanamnese eine signifikant

niedrigere Cofilin 1 Expression festgestellt (Smith-Beckerman et al, 2005). Im Gegensatz zu der bei QGP-1 Zellen auf RNA-Ebene in dieser Arbeit erstmals nachgewiesenen Neuexpression von Cofilin 1 nach 5'-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung zeigte die duktale Pankreaskarzinomzelllinie PaCa44 nach 5'-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung eine supprimierte Cofilin 1 Proteinexpression (Cecconi et al, 2003). Auch wurde über eine stark reduzierte Cofilin 1 mRNA Expression in 5'-Aza-2'-Deoxycytidin behandelten humanen Magen und Kolonkarzinomzellen berichtet (Kanai et al, 2001). Dies ist im Gegensatz zu der Beobachtung in den neuroendokrinen QGP-1 Zellen, wo die unbehandelten Zellen keine Cofilin 1 Expression aufweisen und erst durch Demethylierung Cofilin 1 exprimieren. In Analogie zu den Beobachtungen in QGP-1 Zelle zeigte eine Proteomanalyse bei stark metastasierenden hepatozellulären Karzinomzellen im Vergleich zu der gleichen Zelllinie mit einem niedrigen Metastasierungspotential eine Herunterregulation von Cofilin 1. Daher ist eine zell- bzw. tumorzellspezifische Regulation der methylierungsabhängigen Cofilin 1 Expression anzunehmen.

Ein weiteres Genfragment, welches in den QGP-1-Zellen nach 5'-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung neu exprimiert wurde ist **Phosphatidylinositol 3-Kinase Enhancer-A (PIKE-A)**. PIKE-A ist ein erst kürzlich identifiziertes Protein mit GTPase-Aktivität, dessen Gen interessanterweise in einigen Tumoren mit *CDK4* coamplifiziert wird. PIKE-A ist ein physiologischer Regulator von Akt und ein onkogener Effektor von Zellinvasion. Akt/PKB ist ein wichtiger Regulator diverser zellulärer Prozesse und trägt zur Tumorprogression bei. Seine Aktivierung ist nach dem derzeitigen Kenntnisstand im Wesentlichen von Phosphatidylinositol (PI) 3-Kinase Signalling und PIKE-A abhängig. Überexpression von PIKE-A führte in Glioblastoma-Zellen zur gesteigerten Zellinvasion (Ahn et al, 2004). Die Überexpression von PIKE-A aber nicht des ursprünglichen PIKE-S oder der Splice-Varianten PIKE-L in Tumoren könnte Unterschiede in der Promotorregulation in den Tumoren widerspiegeln. Dabei ist ein möglicher Mechanismus die selektive Methylierung der CpG Inseln in der Promotorregion von PIK-L und PIKE-

S, aber nicht PIKE-A. Welche Funktion PIKE-A in QGP-1 Zellen ausübt ist derzeit unklar. Die fehlende Expression in unbehandelten QGP-1 Zellen spricht aber dafür, dass PIKE-A möglicherweise in diesem Zelltyp keine so essentielle Rolle in der Metastasierung spielt.

Ein weiteres interessantes Gen, das in QGP-1 Zellen als methylierungsabhängig identifiziert wurde ist **Matriptase (MT-SP1, ST14, TADG-15)**, die eine tumorassoziiert differentiell exprimierte Typ II Transmembran Serinprotease (TTSP) kodiert (Hooper et al, 2001). Die meisten der TTPs sind involviert in Tumorwachstum, Proliferation und Metastasierung. Matriptase spaltet und aktiviert Hepatocyte growth factor/scattering factor und Urokinase Plasminogen Activator (uPA), die eine kritische Rolle in der in Tumorinvasion und Metastasierung spielen (Lee et al, 2004; Takeuchi et al, 2000; Suzuki et al, 2004). Eine erhöhte Matriptase Expression im Vergleich zu normalen Zellen wurde für Zervix-, Kolon-, Mamma- und Ovarialkarzinome sowie Mesotheliome beschrieben (Santin et al, 2003; Hoang et al, 2004; Tanimoto et al, 2004). Darüberhinaus führte die Inhibition von Matriptase durch Antisense Transfektion bei Ovarialkarzinomzellen zu einer geringeren Invasion der extrazellulären Matrix (Suzuki et al, 2004). Matriptase Expression ist beim Ovarialkarzinom mit frühen Tumorstadien assoziiert und wird während der Tumorprogression wieder herunterreguliert (Tanimoto et al, 2004). In der vorliegenden Arbeit weist die Matriptase Expression in den unbehandelten QGP-1 Zellen auf ein erhöhtes Metastasierungspotential der Zellen hin, wobei Demethylierung zur Suppression der Matriptase Expression in QGP-1 Zellen führte und damit möglicherweise auch zu einer Reduktion des Metastasierungs- oder Tumorinvasionspotential der Zellen. Für Matriptase wurde darüber hinaus erstmals eine methylierungsabhängige Regulation gezeigt.

Zytokeratine repräsentieren bedeutende Strukturkomponenten des epithelialen Zytoskeletts und spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellmigration und Invasion (Ding et al, 2003). **Keratin-19 (KRT19)** wurde in unbehandelten QGP-1 Zellen deutlich exprimiert, dagegen nach

5'-Aza-2'-Deoxycytidin Behandlung supprimiert. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals eine methylierungsabhängige Regulation von Keratin-19 gezeigt, wobei die Suppression für einen sekundären Regulationsmechanismus spricht. Welche Faktoren die Herunterregulation bedingen ist unklar. Keratin-19 ist auf metastasierenden Zellen verstärkt exprimiert, was für das hepatozelluläre Karzinom sowie für Plattenepithelkarzinome des Kopf-Halsbereiches gezeigt worden ist (Ding et al, 2004). In hepatozellulären Karzinomzellen korreliert die Keratin-19 Expression mit dem Metastasierungsgrad (Ding et al, 2004). Darüberhinaus erlaubt das Serum Keratin-19 Fragment Cyfra-21-1 in Nacktmäusen als sensitiver Marker zu prädiktiven Aussagen zur Metastasierung (Kurokat et al, 2002; Hoffmann-Fazel et al, 2003).

In der Literatur wurde jeweils nur eines der beiden Gene, Cofilin-1 und Keratin-19 hinsichtlich ihrer Expression in verschiedenen Zelllinien oder Primärtumoren untersucht. Auf der Suche nach Metastasierungsmarkern in neuroendokrinen Pankreastumoren sollte in Zukunft besser eine Kombination aus Genen, wie beispielsweise Matriptase und Cofilin, weiter untersucht werden. Interessant ist, dass Cofilin 1 und Keratin-19 Expression bisher nur in wenigen Tumorentitäten beschrieben wurde. Bei Zelllinien eines hepatozellulären Karzinoms zeigte sich anhand von Proteomanalysen eine verminderte Cofilin 1 Expression verbunden mit erhöhter Keratin-19 Expression bei einer hochgradig metastasierenden im Vergleich zu einer niedriggradig metastasierenden Sublinie (Ding et al, 2004). Dieses Expressionsprofil entspricht auch dem mRNA Profil der QGP-1 Zellen nach Demethylierungsbehandlung.

#### **4.6. Methylierungsabhängige Expression von Immunsystem-assoziierten Genen in QGP-1 Zellen**

Die Suppression der körpereigenen Immunmechanismen durch Tumorzellen bzw. das Umgehen der immunologischen Tumorabwehr durch veränderte Antigenstrukturen der Tumorzellen ist ein wichtiger

Mechanismus der Tumorentstehung. Die demethylierende Behandlung der neuroendokrinen Pankreastumorzellen QGP-1 führte zu einer Zunahme von 6 und einer Abnahme von 2 dem Immunsystem zugehörigen Transkripten. Diese methylierungsabhängig differentiell exprimierten Gene lassen sich nach Lokalisation und Funktion in verschiedene Untergruppen einteilen. So kodieren sie für Antigene wie ECAP, SART1 oder MAGE D1, für den MHC-Komplex sowie für zytoplasmatisch gelegene Proteine wie Nucleobindin, FK506 BP2, CGI-06, Cyclophilin B und ITPA.

Eine methylierungsabhängige Genregulation war bisher nur für Gene der MAGE-Familie und den HLA-Komplex bekannt (Bert et al, 2002). Vorausgegangene Untersuchungen haben Hinweise dafür gegeben, dass DNA Hypermethylierung in Tumorzellen zur Ausschaltung der HLA Klasse I Gene führt, um der Immunantwort zu entkommen (Serrano et al, 2001). So konnte in der Melanoma Zelllinie MSR3-mel der Transkriptionsverlust von *HLA-A* und *HLA-B* durch Behandlung mit 5'-Aza-2'-Deoxycytidin revertiert werden und führte zur Erkennung durch MAGE-spezifische zytotoxische T-Lymphozyten (CTLs) (Serrano et al, 2001). Auch das in der vorliegenden Arbeit festgestellte Expressionsprofil der QGP-1 Zellen zeigte eine verstärkte Transkription von ***HLA-A-Genen*** nach 5'-Aza2'-Deoxycytidin- Behandlung. Demethylierung führte in QGP-1 Zellen zur Reexpression von ***SART1***, einem in Karzinomen exprimiertes Antigen, das HLA-A24-beschränkt tumorspezifische CTLs induzieren kann (Kumamaru et al, 2004). Weiterhin wurde durch Demethylierung ***Cyclophilin B (Cyp-B)*** heraufreguliert. Das *Cyp-B* Gen kodiert ein antigenes Epitope, das auf Tumorseite durch HLA-A24- oder HLA-A2-beschränkte tumorspezifische CTLs erkannt wird (Gomi et al, 1999; Tamura et al, 2001). Somit ist es möglich, durch Behandlung mit 5'-Aza-2'-Deoxycytidin die Expression dreier Gene in QGP-1 Zellen zu verstärken, die durch Induktion von T-Lymphozyten zur Immunabwehr des Tumors führen können.

Demgegenüber steht die Herunterregulation des Enzyms ***Inosin Triphosphat Pyrophosphatase (ITPA)*** in mit 5'-Aza2'-Deoxycytidin behandelten QGP-1 Zellen. Der ITPA mRNA Gehalt ist in verschiedenen

Tumorzellen höher als im normalen Gewebe (Shichijo et al, 2003). Peptide von ITPA können CTLs bei Patienten mit einem HLA-B46<sup>+</sup>-Allel die an einem Kolonkarzinom erkrankt sind induzieren (Shichijo et al, 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte nach Behandlung mit 5'-Aza-2'-Deoxycytidin eine verstärkte Expression der Gene für **Esophageal Cancer-Associated Protein (ECAP)**, **Nucleobindin1 (BUCB1, Calnuc)**, dessen Protein für die Calcium-Einlagerung in den Golgi-Apparat zuständig ist und **Phosphatidyl Inositol Glycan (CGI-06)**, einem Membrananker nachgewiesen werden. Das weist darauf hin, dass diese Gene durch Methylierung in ihrer Transkription inhibiert wurden. Eine Korrelation zwischen erhöhter Nucleobindin1 Expression und Invasivität sowie Lymphknoten-Metastasierung wurde bei Magenkarzinomen beschrieben (Wang et al, 1994). Zudem wurde gezeigt, dass die Nucleobindin1 Expression in Lymphozyten deren Aktivierungs- oder Proliferationszustand widerspiegelt, insbesondere bei Non-Hodgkin-Lymphomen (Kubota et al, 1998).

#### 4.7. Schlussfolgerungen und Ausblicke

Maligne Erkrankungen, unter anderen auch des neuroendokrinen Pankreas sind nicht nur polygenetisch, sondern auch polyepigenetisch verursachte Erkrankungen. Wie gezeigt sind die epigenetischen Veränderungen ein Feld intensiver Forschung, sind diese doch an der Regulation einer Vielzahl physiologischer und pathologischer Vorgänge im menschlichen Körper beteiligt (Jones und Baylin, 2002).

Von den Genen, die in QGP-1 Zellen anhand der cDNA-RDA exprimiert wurden konnten 26 Gene als methylierungsabhängig heraufreguliert und 22 Gene als herunterreguliert identifiziert werden. Die meisten der identifizierten Gene spielen nach dem derzeitigen Kenntnisstand eine bisher unbekannte Rolle in der Genese von Tumoren. Nur für einzelne

Gene ist ein Zusammenhang mit anderen Tumorentitäten berichtet worden, nicht aber mit neuroendokrinen Pankreastumoren. In Zukunft wird es daher zunächst von Interesse sein, welches Expressionsmuster die identifizierten Kandidatengene in Primärtumoren aufweisen und bei Bestätigung einer tumorassoziierten differentiellen Expression ihre funktionelle Bedeutung.

Interessant ist in der Arbeit die Klonierung der methylierungsabhängig differentiell exprimierten Genfragmente, deren Funktion bisher völlig unbekannt ist. Bei der Sequenz YAN 0650 sowie CGI-69 konnte lediglich die mitochondriale Herkunft identifiziert werden. Eine Verbindung zu malignen Erkrankungen wurde nur für die Sequenz YF13H12 berichtet. Bei einer seriellen Analyse zur Genexpression (SAGE) wurde bei 52,2% von 46 Tumorproben von Magenkarzinomen eine mehr als 2-fache YF13H12 Expression im Vergleich zu nichterkrankten Geweben beobachtet (Oue et al, 2004). Die YF13H12 Funktion bleibt jedoch unbekannt. Auch war bei keinem der bisher funktionell unbekannten Gene eine methylierungsabhängige Expressionsregulation bekannt. Die Identifikation dieser Genfragmente erlaubt zukünftig deren vollständige strukturelle und funktionelle Charakterisierung insbesondere im Hinblick auf ihre putative Rolle in der Pathogenese neuroendokriner Pankreastumore.

Durch die Untersuchung der Zelllinie QGP-1 zur Identifizierung tumorspezifischer methylierungsabhängig differentieller Expression wurde zunächst die Notwendigkeit der Mikrodissektion der Pankreastumorgewebe umgangen und mit der Zelllinie steht ein adäquates Modellsystem für weitere funktionelle Untersuchungen zur Verfügung. Der Einsatz der demethylierenden Substanz 5'-Aza-2'-Deoxycytidin ist aber hinsichtlich der Untersuchung der Expression nur initial im Zellkulturmodell sinnvoll und die methylierungsabhängige Regulation muss anschließend anhand von Primärtumoren, neuroendokrinen Pankreastumoren, geprüft werden.

Mit dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von Zellen eines neuroendokrinen Pankreaskarzinom mit dem demethylierenden Agens 5'-Aza-2'-Deoxycytidin nicht nur zur Re-Expression einer Vielzahl von Genen führte, sondern auch zur Reduktion der Expression bis hin zu vollständigen Suppression, ein Fakt, welcher in der Literatur bisher wenig Beachtung fand. Die Heraufregulation von Genen nach 5-Aza-2'-Deoxycytidin führt über die Demethylierung der CpG Inseln zur Aufhebung der Suppression der Transkription des jeweiligen Gens. Wird jedoch ein Gen nach Demethylierung herunterreguliert, kann dies nur indirekt über andere methylierungsabhängige Proteinfaktoren und ihre Signalwege geschehen. Es wird in Zukunft von Interesse sein, diese zu identifizieren.

Die Zukunft der Epigenetik-Forschung bietet weitere interessante Ausblicke. Ein besonderes Merkmal der epigenetischen Veränderungen ist, dass sie nicht abrupt wie bei den genetischen Alterationen, sondern in einem graduellen Prozess auftreten. Diese graduellen Veränderungen der DNA Methylierung können dann schrittweise zur abberanten Genexpression führen. So wirkt die Akkumulierung von methylierten CpG Inseln in Genpromotoren eher wie ein Rheostat als ein Schalter (Egger et al, 2004). Dies wird zunehmend an Bedeutung für die Diagnostik und für präventive Therapiestrategien gewinnen. Es ist zu erwarten, dass es zur weiteren Verbesserung der diagnostischen Methoden kommen wird, wie beispielsweise durch die Identifizierung von Methylierungsmustern mit Hilfe eines Methylierungs-Fingerabdruckes einer bestimmten Tumorentität, der möglicherweise mit wichtigen klinischen Informationen assoziiert ist (Ushijima 2005). Auch wird die Therapie von Tumoren mit demethylierenden Agentien weiter Fortschritte machen. Inhibitoren der DNA Methylierung können schnell die Gene reaktivieren, die epigenetisch stillgelegt sind. Die Kombination von weniger toxischen demethylierenden Substanzen, wie das Antiarrhythmikum Procainamid oder das oral applizierbare Zebularin mit Histondeacetylaseinhibitoren wird Eingang in klinische Studien finden. Als Bestätigung der Wirksamkeit von Demethylantien kann die kürzliche Freigabe von 5-Azacytidin durch die

amerikanische Food and Drug Administration (FDA) zur Behandlung des Myelodysplastischen Syndroms gewertet werden (Esteller 2005).

## 5. Zusammenfassung

Hypermethylierung ist ein alternativer Mechanismus der frühen Gen-Inaktivierung in Tumorzellen. Voruntersuchungen hatten gezeigt, dass 5-Aza-2'-Deoxycytidin (5-Aza-CdR) neben morphologischen Veränderungen das Wachstum neuroendokriner Pankreastumorzellen QGP-1 inhibiert. Es daher wurde angenommen, dass der demethylierungs-assoziierte Phänotyp neben der nachgewiesenen Restoration der *p16/CDKN2A* Expression eine Konsequenz der Reexpression mehrerer durch abberante Methylierung supprimierte Gene ist. Um die Bedeutung der DNA Methylierung zu validieren hatte die vorliegende Arbeit zum Ziel, methylierungs-spezifische Transkripte in QGP-1 Zellen zu isolieren. Differentiell exprimierte Gene wurden durch die cDNA-Representational Difference Analysis (cDNA-RDA) isoliert, sequenziert und die methylierungasabhängige Expression durch semi-quantitative RT-PCR bestätigt. Es konnten 48 methylierungsabhängig differentiell exprimierte Genfragmente in QGP-1 Zellen bestätigt werden. Davon waren nach 5-Aza-2'-Deoxycytidin-Behandlung 26 Genfragmente verstärkt bzw. neu exprimiert, und 22 weitere Genfragmente signifikant schwächer exprimiert oder supprimiert. Die Sequenzanalyse der isolierten cDNA Fragmente zeigte Homologie zu 41 bekannten Genen. Sieben der cDNA Fragmente zeigten Homologie zu Genen mit bisher unbekannter Funktion. Bei einigen der klonierten Genen besteht ein Zusammenhang mit der Onkogenese anderer Tumorentitäten, sodass diese auch in neuroendokrinen Pankreastumorzellen eine pathogenetische Rolle spielen könnten. Interessant ist die 5-Aza-2'-Deoxycytidin induzierte Neuexpression von Cofilin-1, das über Depolymerisation von Aktin-Filamenten die Bewegungsfähigkeit der Zellen und somit das Metastasierungspotential reduziert, sowie die Repression von Matriptase, einer Serinprotease, die durch Matrixdegradation Metastasierung und invasives Wachstum fördert. Die vorliegende Arbeit weist darauf hin, dass DNA Methylierung ein Mechanismus in der Genese neuroendokriner Pankreastumorzellen ist, sodass es möglich wäre, zukünftig den Methylierungsstatus diagnostisch im Sinne eines Methylierungsfingerprint einzusetzen.

## 6. Literaturverzeichnis

Ahn JY, Rong R, Kroll TG, Van Meir EG, Snyder SH, Ye K. PIKE (phosphatidylinositol 3-kinase enhancer)-A GTPase stimulates Akt activity and mediates cellular invasion. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Apr 16;279(16):16441-51.

Ahuja N, Issa J P. Aging, methylation and cancer. *Histology and Histopathology*, 2000, 15, 835-842

Ahuja N, Li Q, Mohan A L, Baylin S B, Issa J P. Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer. *Cancer Research*, Dec. 1998, 58, 5489-5494

Alberts BM, Barry J, Bedinger P, Formosa T, Jongeneel CV, Kreuzer KN. Studies on DNA replication in the bacteriophage T4 in vitro system. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1983;47 Pt 2:655-68.

Altzner F, Conus S, Cavalli A, Folkers G, Simon HU. Calpain-1 regulates Bax and subsequent Smac-dependent caspase-3 activation in neutrophil apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Feb 13;279(7):5947-57.

An P, Lei H, Zhang J, Song S, He L, Jin G, Liu X, Wu J, Meng L, Liu M, Shou C. Suppression of tumor growth and metastasis by a VEGFR-1 antagonizing peptide identified from a phage display library. *International Journal of Cancer*. 2004 Aug 20;111(2):165-73.

Arnold CN, Sosnowski A, Blum HE. Analysis of molecular pathways in neuroendocrine cancers of the gastroenteropancreatic system. *Annals of the New York Academy of Science*. 2004 Apr;1014:218-9.

Attardi LD, Reczek EE, Cosmas C, Demicco EG, McCurrach ME, Lowe SW, Jacks T. PERP, an apoptosis-associated target of p53, is a novel member of the PMP-22/gas3 family. *Genes and Development*. 2000 Mar 15;14(6):704-18. Erratum in: *Genes and Development* 2000 Jul 15;14(14):1835.

Bakhshi A, Jensen JP, Goldman P, Wright JJ, McBride OW, Epstein AL, Korsmeyer SJ. Cloning the chromosomal breakpoint of t(14;18) human lymphomas: clustering around JH on chromosome 14 and near a transcriptional unit on 18. *Cell*. 1985 Jul;41(3):899-906.

Banki K, Hutter E, Gonchoroff NJ, Perl A. Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling. *Journal of Immunology*. 1999 Feb 1;162(3):1466-79.

Barrett MT, Sanchez CA, Galipeau PC, Neshat K, Emond M, Reid BJ. Allelic loss of 9p21 and mutation of the CDKN2/p16 gene develop as early lesions during neoplastic progression in Barrett's esophagus. *Oncogene*. 1996 Nov 7;13(9):1867-73.

Barker PA, Salehi A. The MAGE proteins: emerging roles in cell cycle progression, apoptosis, and neurogenetic disease. *Journal of Neuroscience Research*. 2002 Mar 15;67(6):705-12.

Baylin SB, Hoppener JW, de Bustros A, Steenbergh PH, Lips CJ, Nelkin BD. DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas. *Cancer Research*. 1986 Jun;46(6):2917-22.

Bender C M, Pao M M, Jones P A. Inhibition of DNA methylation by 5-Aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines. *Cancer Research*, Jan. 1998, 58, 95-101

Bert T, Lubomierski N, Gangsaug S, Munch K, Printz H, Prasnikar N, Robbel C, Simon B. Expression spectrum and methylation-dependent regulation of melanoma antigen-encoding gene family members in pancreatic cancer cells. *Pancreatology*. 2002;2(2):146-54

Blackburn EH. Telomere states and cell fates. *Nature*. 2000 Nov 2;408(6808):53-6.

Blackburn EH. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Letters*. 2005 Feb 7;579(4):859-62.

Boeuf S, Klingenspor M, Van Hal NL, Schneider T, Keijer J, Klaus S. Differential gene expression in white and brown preadipocytes. *Physiological Genomics*. 2001 Oct 10;7(1):15-25.

Boon T, van der Bruggen P. Human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*. 1996 Mar 1;183(3):725-9

Borang S, Andersson T, Thelin A, Odeberg J, Lundeberg J. Vascular gene expression in atherosclerotic plaque-prone regions analyzed by representational difference analysis. *Pathobiology*. 2004;71(2):107-14.

Bovenzi V, Momparler RL. Antineoplastic action of 5-aza-2'-deoxycytidine and histone deacetylase inhibitor and their effect on the expression of retinoic acid receptor beta and estrogen receptor alpha genes in breast carcinoma cells. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*. 2001 Jul;48(1):71-6.

Brem R, Oraszlan-Szovik K, Foser S, Bohrmann B, Certa U. Inhibition of proliferation by 1-8U in interferon-alpha-responsive and non-responsive cell lines. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2003 Jun;60(6):1235-48

Bryan TM, Cech TR. Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Current Opinions in Cell Biology*. 1999 Jun;11(3):318-24.

Bull HA, Brickell PM, Dowd PM. Src-related protein tyrosine kinases are physically associated with the surface antigen CD36 in human dermal microvascular endothelial cells. *FEBS Lett*. 1994 Aug 29;351(1):41-4.

Capella C, Heitz PU, Hofler H, Solcia E, Klöppel G. Revised classification of neuroendocrine tumors of the lung, pancreas and gut. *Digestion*. 1994;55 Suppl 3:11-23.

Cecconi D, Astner H, Donadelli M, Palmieri M, Missiaglia E, Hamdan M, Scarpa A, Righetti PG. Proteomic analysis of pancreatic ductal carcinoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine. *Electrophoresis*. 2003 Dec;24(24):4291-303.

Chakrabarti G, McClane BA. The importance of calcium influx, calpain and calmodulin for the activation of CaCo-2 cell death pathways by *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Cell Microbiology*. 2005 Jan;7(1):129-46.

Chaussade L, Eymin B, Brambilla E, Gazzeri S. Expression of p15 and p15.5 product in neuroendocrine lung tumours: relationship with p15(INK4b) methylation status. *Oncogene*, Oct. 2001, 20(45), 6587-6596

Chen LY, Chen JD. Daxx silencing sensitizes cells to multiple apoptotic pathways. *Molecular and Cellular Biology*. 2003 Oct;23(20):7108-21.

Christofori G, Semb H. The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends in Biochemical Sciences*. 1999 Feb;24(2):73-6

Chou CF, Omary MB. Mitotic arrest-associated enhancement of O-linked glycosylation and phosphorylation of human keratins 8 and 18. *Journal of Biological Chemistry*. 1993 Feb 25;268(6):4465-72.

Clarke SD, Baillie R, Jump DB, Nakamura MT. Fatty acid regulation of gene expression. Its role in fuel partitioning and insulin resistance. *Annals of the New York Academy of Science*. 1997 Sep 20;827:178-87.

Cohen M, Feinstein N, Wilson KL, Gruenbaum Y. Nuclear pore protein gp210 is essential for viability in HeLa cells and *Caenorhabditis elegans*. *Molecular Biology of Cell*. 2003 Oct;14(10):4230-7

Cordon-Cardo C, Prives C. At the crossroads of inflammation and tumorigenesis. *Journal of Experimental Medicine*. 1999 Nov 15;190(10):1367-70.

Counter CM, Avilion AA, LeFeuvre CE, Stewart NG, Greider CW, Harley CB, Bacchetti S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J*. 1992 May;11(5):1921-9.

Cress WD, Seto E. Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *Journal of Cell Physiology*. 2000 Jul;184(1):1-16.

Cui H, Niemitz EL, Ravenel JD, Onyango P, Brandenburg SA, Lobanenkov VV, Feinberg AP. Loss of imprinting of insulin-like growth factor-II in Wilms' tumor commonly involves altered methylation but not mutations of CTCF or its binding site. *Cancer Research*. 2001 Jul 1;61(13):4947-50.

Dameron KM, Volpert OV, Tainsky MA, Bouck N. The p53 tumor suppressor gene inhibits angiogenesis by stimulating the production of thrombospondin. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 1994;59:483-9.

Dang D, Yang Y, Li X, Atakilil A, Regezi J, Eisele D, Ellis D, Ramos DM. Matrix metalloproteinases and TGFbeta1 modulate oral tumor cell matrix. *Biochemical and Biophysical Research Communication*. 2004 Apr 9;316(3):937-42.

Datto MB, Hu PP, Kowalik TF, Yingling J, Wang XF. The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Molecular and Cellular Biology*. 1997 Apr;17(4):2030-7

Debray M P, Geoffroy O, Laissy J P, Lebtahi R, Silbermann-Hoffmann O, Henry-Feugeas M C, et al. Imaging appearances of metastases from neuroendocrine tumours of the pancreas. *The British Journal of Radiology*, Nov. 2001, 74, 1065-1070

de Capoa A, Musolino A, Della Rosa S, Caiafa P, Mariani L, Del Nonno F, Vocaturo A, Donnorso RP, Niveleau A, Grappelli C. DNA demethylation is directly related to tumour progression: evidence in normal, pre-malignant and malignant cells from uterine cervix samples. *Oncology Reports*. 2003 May-Jun;10(3):545-9.

Deniziak MA, Barciszewski J .Methionyl-tRNA synthetase. *Acta Biochimica Polonica*. 2001;48(2):337-50.

DesMarais V, Ghosh M, Eddy R, Condeelis J. Cofilin takes the lead. *Journal of Cell Science*. 2005 Jan 1;118(Pt 1):19-26.

Diatchenko L, Lau YF, Campbell AP, Chenchik A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. National Academy of Science USA*. 1996 Jun 11;93(12):6025-30.

Dighe AS, Richards E, Old LJ, Schreiber RD. Enhanced in vivo growth and resistance to rejection of tumor cells expressing dominant negative IFN gamma receptors. *Immunity*. 1994 Sep;1(6):447-56.

Ding SJ, Li Y, Shao XX, Zhou H, Zeng R, Tang ZY, Xia QC. Proteome analysis of hepatocellular carcinoma cell strains, MHCC97-H and MHCC97-L, with different metastasis potentials. *Proteomics*. 2004 Apr;4(4):982-94.

Ding SJ, Li Y, Tan YX, Jiang MR, Tian B, Liu YK, Shao XX, Ye SL, Wu JR, Zeng R, Wang HY, Tang ZY, Xia QC. From proteomic analysis to clinical significance: overexpression of cytokeratin 19 correlates with hepatocellular carcinoma metastasis. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2004 Jan;3(1):73-81.

Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The immunobiology of cancer immunosurveillance and immunoediting. *Immunity*. 2004 Aug;21(2):137-48

Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science*. 1989 Feb 17;243(4893):934-7.

Eads C A, Lord R V, Wickramasinghe K, Long T I, Kurumboor S K, Bernstein L, Peters J H et al. Epigenetic pattern in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer Research*, April 2001, 61, 3410-3418

Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004 May 27;429(6990):457-63.

Ei-Osta A, Wolffe AP. DNA methylation and histone deacetylation in the control of gene expression: basic biochemistry to human development and disease. *Gene Expression*. 2000;9(1-2):63-75.

Esteller M. DNA methylation and cancer therapy: new developments and expectations. *Current Opinion in Oncology*. 2005 Jan;17(1):55-60.

Esteller M, Hamilton S R, Burger P C, Baylin S B, Herman J G. Inactivation of the DNA repair gene O-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Research*, Feb. 1999, 59, 793-797

Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Research*. 1999 Jan 1;59(1):67-70. Erratum in: *Cancer Res* 1999 Aug 1;59(15):3853.

Evans JR, Mitchell SA, Spriggs KA, Ostrowski J, Bomsztyk K, Ostarek D, Willis AE. Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo. *Oncogene*. 2003 Sep 11;22(39):8012-20.

Evers BM, Ishizuka J, Townsend CM Jr, Rajaraman S, Thompson JC. Expression of neurotensin messenger RNA in a human pancreatic carcinoid tumor. *Annals of the New York Academy of Science*. 1992;668:342-4.

Fan T, Yan Q, Huang J, Austin S, Cho E, Ferris D, Muegge K. Lsh-deficient murine embryonal fibroblasts show reduced proliferation with signs of abnormal mitosis. *Cancer Research*. 2003 Aug 1;63(15):4677-83.

Fedi, P., Tronick, S.R., and Aaronson, S.A. (1997). Growth Factors. In *Cancer Medicine*, J.F. Holland, R.C. Bast, D.I. Morton, E. Frei, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum, eds. (Baltimore, MD: Williams and Wilkins), pp. 41-64

Feinberg AP, Tycko B. The history of cancer epigenetics. *Nature Reviews Cancer*. 2004 Feb;4(2):143-53.

Fink SP, Mikkola D, Willson JK, Markowitz S. TGF-beta-induced nuclear localization of Smad2 and Smad3 in Smad4 null cancer cell lines. *Oncogene*. 2003 Mar 6;22(9):1317-23.

Flori AR, Lower R, Schmitz-Drager BJ, Schulz WA. DNA methylation and expression of LINE-1 and HERV-K provirus sequences in urothelial and renal cell carcinomas. *British Journal of Cancer*. 1999 Jul;80(9):1312-21.

Fynan TM, Reiss M. Resistance to inhibition of cell growth by transforming growth factor-beta and its role in oncogenesis. *Critical Reviews in Oncology*. 1993;4(5):493-540

Gama-Sosa MA, Slagel VA, Trewyn RW, Oxenhandler R, Kuo KC, Gehrke CW, Ehrlich M. The 5-methylcytosine content of DNA from human tumors. *Nucleic Acids Research*. 1983 Oct 11;11(19):6883-94.

Gao Y, Yang W, Pan M, Scully E, Girardi M, Augenlicht LH, Craft J, Yin Z. Gamma delta T cells provide an early source of interferon gamma in tumor immunity. *Journal of Experimental Medicine*. 2003 Aug 4;198(3):433-42.

Gasparini G, Longo R, Torino F, Morabito A. Therapy of breast cancer with molecular targeting agents. *Annals of Oncology* 2005 May;16 Suppl 4:iv28-iv36.

Gohla A, Bokoch GM. 14-3-3 regulates actin dynamics by stabilizing phosphorylated cofilin. *Current Biology*. 2002 Oct 1;12(19):1704-10.

Gomi S, Nakao M, Niiya F, Imamura Y, Kawano K, Nishizaka S, Hayashi A, Sobao Y, Oizumi K, Itoh K. A cyclophilin B gene encodes antigenic epitopes recognized by HLA-A24-restricted and tumor-specific CTLs. *Journal of Immunology*. 1999 Nov 1;163(9):4994-5004.

Gonzales-Zulueta M, Bender C M, Yang A S, Nguyen T D, Beart R W, van Tornout J M et al. Methylation of the 5´CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed human tissues correlates with gene silencing. *Cancer Research*, Oct. 1995, 55, 4531-4535

Granger MP, Wright WE, Shay JW. Telomerase in cancer and aging. *Critical Reviews Oncology Hematology*. 2002 Jan;41(1):29-40

Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell*. 2005 Jun 3;121(5):671-4.

Gresser I, Belardelli F. Endogenous type I interferons as a defense against tumors. *Cytokine Growth Factor Review*. 2002 Apr;13(2):111-8

Griffith TS, Wiley SR, Kubin MZ, Sedger LM, Maliszewski CR, Fanger NA. Monocyte-mediated tumoricidal activity via the tumor necrosis factor-related cytokine, TRAIL. *Journal of Experimental Medicine*. 1999 Apr 19;189(8):1343-54.

Grignani F, De Matteis S, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Cioce M, Fanelli M, Ruthardt M, Ferrara FF, Zamir I, Seiser C, Grignani F, Lazar MA, Minucci S, Pelicci PG. Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):815-8.

Grossman CE, Niland B, Stancato C, Verhoeven NM, Van Der Knaap MS, Jakobs C, Brown LM, Vajda S, Banki K, Perl A. Deletion of Ser-171 causes inactivation, proteasome-mediated degradation and complete deficiency of human transaldolase. *Biochemical Journal*. 2004 Sep 1;382(Pt 2):725-31.

Gupta K, Zhang J. Angiogenesis: a curse or cure? *Postgraduate Medical Journal*. 2005 Apr;81(954):236-42.

Hagihara A, Miyamoto K, Furuta J, Hiraoka N, Wakazono K, Seki S, Fukushima S, Tsao MS, Sugimura T, Ushijima T. Identification of 27 5' CpG islands aberrantly methylated and 13 genes silenced in human pancreatic cancers. *Oncogene*. 2004 Nov 11;23(53):8705-10.

Hake SB, Xiao A, Allis CD. Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. *British Journal of Cancer*. 2004 Feb 23;90(4):761-9.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70

Hansen RS, Wijmenga C, Luo P, Stanek AM, Canfield TK, Weemaes CM, Gartler SM. The DNMT3B DNA methyltransferase gene is mutated in the ICF immunodeficiency syndrome. *Proc. National Academy of Science USA*. 1999 Dec 7;96(25):14412-7.

Hao Z, Duncan GS, Chang CC, Elia A, Fang M, Wakeham A, Okada H, Calzascia T, Jang Y, You-Ten A, Yeh WC, Ohashi P, Wang X, Mak TW. Specific ablation of the apoptotic functions of cytochrome C reveals a differential requirement for cytochrome C and Apaf-1 in apoptosis. *Cell*. 2005 May 20;121(4):579-91.

Hatakeyama S, Nakayama KI. Ubiquitylation as a quality control system for intracellular proteins. *Journal of Biochemistry (Tokyo)*. 2003 Jul;134(1):1-8.

Hens J, Nuydens R, Geerts H, Senden NH, Van de Ven WJ, Roebroek AJ, van de Velde HJ, Ramaekers FC, Broers JL. Neuronal differentiation is accompanied by NSP-C expression. *Cell and Tissue Research*. 1998 May;292(2):229-37.

Herbst H, Sauter M, Mueller-Lantzsch N. Expression of human endogenous retrovirus K elements in germ cell and trophoblastic tumors. *American Journal of Pathology*. 1996 Nov;149(5):1727-35.

Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc. National Academy of Science USA*. 1998 Jun 9;95(12):6870-5.

Hirashima M, Kashio Y, Nishi N, Yamauchi A, Imaizumi TA, Kageshita T, Saita N, Nakamura T. Galectin-9 in physiological and pathological conditions. *Glycoconjugate Journal*. 2004;19(7-9):593-600.

Hoang CD, D'Cunha J, Kratzke MG, Casmey CE, Frizelle SP, Maddaus MA, Kratzke RA. Gene expression profiling identifies matriptase overexpression in malignant mesothelioma. *Chest*. 2004 May;125(5):1843-52.

Hoffmann-Fazel A, Hoffmann M, Gottschlich S, Maass JD, Rudert H, Maune S. Cyfra 21-1 in diagnosis of distant metastases of head and neck carcinoma. *Anticancer Research*. 2003 Mar-Apr;23(2A):917-20.

Hooper JD, Clements JA, Quigley JP, Antalis TM. Type II transmembrane serine proteases. Insights into an emerging class of cell surface proteolytic enzymes. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Jan 12;276(2):857-60.

Hoque MO, Begum S, Topaloglu O, Jeronimo C, Mambo E, Westra WH, Califano JA, Sidransky D. Quantitative detection of promoter hypermethylation of multiple genes in the tumor, urine, and serum DNA of patients with renal cancer. *Cancer Research*. 2004 Aug 1;64(15):5511-7.

Horan M P, Cooper D N, Upadhyaya M. Hypermethylation of the neurofibromatosis type 1 (NF1) gene promoter is not a common event in the inactivation of the NF1 gene in NF1-specific tumours. *Human Genetics*, 2000, 107, 33-39

House MG, Herman JG, Guo MZ, Hooker CM, Schulick RD, Cameron JL, Hruban RH, Maitra A, Yeo CJ. Prognostic value of hMLH1 methylation and microsatellite instability in pancreatic endocrine neoplasms. *Surgery*. 2003 Dec;134(6):902-8; discussion 909

Hsu JM, Lee YC, Yu CT, Huang CY. Fbx7 functions in the SCF complex regulating Cdk1-cyclin B-phosphorylated hepatoma up-regulated protein (HURP) proteolysis by a proline-rich region. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Jul 30;279(31):32592-602.

Hubank M, Schatz D G. cDNA representational difference analysis: a sensitive and flexible method for identification of differentially expressed genes. *Methods in Enzymology*, 1999, Vol.303, 325-349

Hubank M, Schatz D G. Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucleic Acids Research*, 1994, Vol. 22, No. 25, 5640-5648

Imaizumi T, Kumagai M, Sasaki N, Kurotaki H, Mori F, Seki M, Nishi N, Fujimoto K, Tanji K, Shibata T, Tamo W, Matsumiya T, Yoshida H, Cui XF, Takanashi S, Hanada K, Okumura K, Yagihashi S, Wakabayashi K, Nakamura T, Hirashima M, Satoh K. Interferon-gamma stimulates the expression of galectin-9 in cultured human endothelial cells. *Journal of Leukocyte Biology*. 2002 Sep;72(3):486-91.

Issa JP, Garcia-Manero G, Giles FJ, Mannari R, Thomas D, Faderl S, Bayar E, Lyons J, Rosenfeld CS, Cortes J, Kantarjian HM. Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies. *Blood*. 2004 Mar 1;103(5):1635-40.

Itahana K, Bhat KP, Jin A, Itahana Y, Hawke D, Kobayashi R, Zhang Y. Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Molecular Cell*. 2003 Nov;12(5):1151-64.

Jager R, Herzer U, Schenkel J, Weiher H. Overexpression of Bcl-2 inhibits alveolar cell apoptosis during involution and accelerates c-myc-induced tumorigenesis of the mammary gland in transgenic mice. *Oncogene*. 1997 Oct 9;15(15):1787-95.

Johnsen M, Lund LR, Romer J, Almholt K, Dano K. Cancer invasion and tissue remodeling: common themes in proteolytic matrix degradation. *Current Opinion in Cell Biology*. 1998 Oct;10(5):667-71.

Jones P A. Death and methylation. *Nature*, Jan. 2001, Vol. 409, 141-144

Jones P A, Baylin S B. The Fundamental Role of Epigenetic Events in Cancer. *Nature Reviews Genetics* 2002, 3, 415-428

Jones PA, Taylor SM. Cellular differentiation, cytidine analogs and DNA methylation. *Cell*. 1980 May;20(1):85-93.

Joseph B, Ekedahl J, Sirzen F, Lewensohn R, Zhivotovsky B. Differences in expression of pro-caspases in small cell and non-small cell lung carcinoma. *Biochemistry Biophysics Research Communication*. 1999 Aug 27;262(2):381-7

Kaku M, Nishiyama T, Yagawa K, Abe M. Establishment of a carcinoembryonic antigen-producing cell line from human pancreatic carcinoma. *Gann*. 1980 Oct;71(5):596-601.

Kanai Y, Ushijima s, Saito Y, Nakanishi Y, Sakamoto M, Hirohashi S. mRNA expression of genes altered by 5-azacytidine treatment in cancer cell lines is associated with clinicopathological parameters of human cancers. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*

Kaneda A, Takai D, Kaminishi M, Okochi E, Ushijima T. Methylation-sensitive representational difference analysis and its application to cancer research. *Annals of the New York Academy of Science*. 2003 Mar;983:131-41.

Kashio Y, Nakamura K, Abedin MJ, Seki M, Nishi N, Yoshida N, Nakamura T, Hirashima M. Galectin-9 induces apoptosis through the calcium-calpain-caspase-1 pathway. *Journal of Immunology*. 2003 Apr 1;170(7):3631-6.

Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Takeda K, Akiba H, Tsutsui H, Okamura H, Nakanishi K, Okumura K, Yagita H. Expression and function of TNF-related apoptosis-inducing ligand on murine activated NK cells. *Journal of Immunology*. 1999 Aug 15;163(4):1906-13

Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, Eto H, Okumura K, Yagita H. Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs. *Journal of Experimental Medicine*. 1999 May 3;189(9):1451-60.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*. 1972 Aug;26(4):239-57

Khong HT, Restifo NP. Natural selection of tumor variants in the generation of "tumor escape" phenotypes. *Nature Immunology*. 2002 Nov;3(11):999-1005

Killian A, Le Meur N, Sesboue R, Bourguignon J, Bougeard G, Gautherot J, Bastard C, Frebourg T, Flaman JM. Inactivation of the RRB1-Pescadillo pathway involved in ribosome biogenesis induces chromosomal instability. *Oncogene*. 2004 Nov 11;23(53):8597-602.

Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillett N, Phillips HS, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*. 1993 Apr 29;362(6423):841-4.

Klöppel G, Perren A, Heitz PU. The gastroenteropancreatic neuroendocrine cell system and its tumors: the WHO classification. *Annals of the New York Academy of Science*. 2004 Apr;1014:13-27.

Klöppel G, Heitz PU, Capella C, Solcia E. Pathology and nomenclature of human gastrointestinal neuroendocrine (carcinoid) tumors and related lesions. *World Journal of Surgery*. 1996 Feb;20(2):132-41

Kontou M, Will RD, Adelfalk C, Wittig R, Poustka A, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M. Thioredoxin, a regulator of gene expression. *Oncogene*. 2004 Mar 18;23(12):2146-52.

Ko YG, Kang YS, Park H, Seol W, Kim J, Kim T, Park HS, Choi EJ, Kim S. Apoptosis signal-regulating kinase 1 controls the proapoptotic function of death-associated protein (Daxx) in the cytoplasm. *Journal of Biological Chemistry*. 2001 Oct 19;276(42):39103-6.

Ko YG, Kang YS, Kim EK, Park SG, Kim S. Nucleolar localization of human methionyl-tRNA synthetase and its role in ribosomal RNA synthesis. *Journal of Cellular Biology*. 2000 May 1;149(3):567-74.

Kramer G, Erdal H, Mertens HJ, Nap M, Mauermann J, Steiner G, Marberger M, Biven K, Shoshan MC, Linder S. Differentiation between cell death modes using measurements of different soluble forms of extracellular cytokeratin 18. *Cancer Research*. 2004 Mar 1;64(5):1751-6.

Ku NO, Liao J, Omary MB. Apoptosis generates stable fragments of human type I keratins. *Journal of Biological Chemistry*. 1997 Dec 26;272(52):33197-203.

Kubota T, Miyauchi M, Miura K, Hirokawa G, Awaya A, Miyasaka N, Kurosawa Y, Kanai Y, Maruyama K. Upregulation of nucleobindin expression in human-activated lymphocytes and non-Hodgkin's lymphoma. *Pathology International*. 1998 Jan;48(1):22-8.

Kumamaru W, Nakamura S, Kadena T, Yamada A, Kawamura E, Sasaki M, Ohyama Y, Toyoshima T, Hayashida JN, Itoh K, Shirasuna K. T-cell receptor Vbeta gene usage by T cells reactive with the tumor-rejection antigen SART-1 in oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Cancer*. 2004 Feb 20;108(5):686-95.

Kuropkat C, Lippert BM, Werner JA. Follow-up with serum Cyfra 21-1 in patients with squamous cell carcinomas of the head and neck. *Oncology*. 2002;63(3):280-5.

Kurtev V, Margueron R, Kroboth K, Ogris E, Cavailles V, Seiser C. Transcriptional regulation by the repressor of estrogen receptor activity via recruitment of histone deacetylases. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Jun 4;279(23):24834-43

Lachner M, Jenuwein T. The many faces of histone lysine methylation. *Current Opinion in Cell Biology*. 2002 Jun;14(3):286-98.

Laird P W. Oncogenic mechanisms mediated by DNA methylation. *Molecular Medicine Today*, May 1997, 31-37

Laird P W. Cancer epigenetics. *Human Molecular Genetics*. 2005 Apr 15;14 Spec No 1:R65-76.

Laird P W, Jackson-Grusby L, Fazeli A, Dickinson S L, Jung W E, Li E et al. Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation. *Cell*, Apr.1995, Vol. 81, 197-205

Laird P W, Jaenisch R. The role of DNA methylation in cancer genetics and epigenetics. *Annual Reviews of Genetics*, 1996, 30, 441-464

Lam KY, Lo CY, Fan ST, Luk JM. Telomerase activity in pancreatic endocrine tumours: a potential marker for malignancy. *Molecular Pathology*. 2000 Jun;53(3):133-6.

Lee MS, Kiyomiya KI, Benaud C, Dickson RB, Lin CY. Simultaneous activation and HAI-1-mediated inhibition of matrix metalloproteinase induced at activation foci in human mammary epithelial cells. *American Journal Physiology- Cell Physiology*. 2004 Dec 8;

Lee SY, Park JH, Kim S, Park EJ, Yun Y, Kwon J. A proteomics approach for the identification of nucleophosmin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 as chromatin-binding proteins in response to DNA double-strand breaks. *Biochemical Journal*. 2005 May 15;388(Pt 1):7-15.

Leers MP, Bjorklund V, Bjorklund B, Jornvall H, Nap M. An immunohistochemical study of the clearance of apoptotic cellular fragments. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2002 Aug;59(8):1358-65.

Li CC, Xu B, Hirokawa M, Qian Z, Yoshimoto K, Horiguchi H, Tashiro T, Sano T. Alterations of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin expression in neuroendocrine tumors of the gastrointestinal tract. *Virchows Archives*. 2002 Feb;440(2):145-54.

Li E, Beard C, Jaenisch R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. *Nature*. 1993 Nov 25;366(6453):362-5.

Li H, Minarovits J. Host cell-dependent expression of latent Epstein-Barr virus genomes: regulation by DNA methylation. *Advances in Cancer Research*. 2003;89:133-56

Li H, Sanchez-Torres J, Del Carpio A, Salas V, Villalobo A. The ErbB2/Neu/HER2 receptor is a new calmodulin-binding protein. *Biochemical Journal*. 2004 Jul 1;381(Pt 1):257-66.

Liang P, Pardee AB. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*. 1992 Aug 14;257(5072):967-71.

Lin X, Asgari K, Putzi MJ, Gage WR, Yu X, Cornblatt BS, Kumar A, Piantadosi S, DeWeese TL, De Marzo AM, Nelson WG. Reversal of GSTP1 CpG island hypermethylation and reactivation of pi-class glutathione S-transferase (GSTP1) expression in human prostate cancer cells by treatment with procainamide. *Cancer Research*. 2001 Dec 15;61(24):8611-6.

Linder K, Arner P, Flores-Morales A, Tollet-Egnell P, Norstedt G. Differentially expressed genes in visceral or subcutaneous adipose tissue of obese men and women. *Journal of Lipid Research*. 2004 Jan;45(1):148-54.

Linder S, Havelka AM, Ueno T, Shoshan MC. Determining tumor apoptosis and necrosis in patient serum using cytokeratin 18 as a biomarker. *Cancer Letters*. 2004 Oct 8;214(1):1-9.

Lisitsyn N A, Lisitsyn N, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* Feb. 1993, Vol. 259, 946-951

Lisitsyn N A. Representational difference analysis: finding the differences between genomes. *Trends in Genetics*, Aug. 1995, Vol.11 No.8 303-307

Liyanage UK, Moore TT, Joo HG, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, Drebin JA, Strasberg SM, Eberlein TJ, Goedegebuure PS, Linehan DC. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *Journal of Immunology*. 2002 Sep 1;169(5):2756-61.

Loeb LA, Loeb KR, Anderson JP. Multiple mutations and cancer. *Proc. National Academy of Science USA*. 2003 Feb 4;100(3):776-81

Lorincz M C, Schubeler D, Goeke SC, Walters M, Groudine M, Martin D I. Dynamic analysis of proviral induction and De novo methylation: implications for a histone deacetylase-independent, methylation density-dependent mechanism of transcriptional repression. *Molecular Cell Biology*, Feb. 2000, 20(3), 842-850

Lu X. p53: a heavily dictated dictator of life and death. *Current Opinion in Genetics Development*. 2005 Feb;15(1):27-33.

Lubomierski N, Kersting M, Bert T, Muench K, Wulbrand U, Schuermann M, Bartsch D, Simon B. Tumor suppressor genes in the 9p21 gene cluster are selective targets of inactivation in neuroendocrine gastroenteropancreatic tumors. *Cancer Research*. 2001 Aug 1;61(15):5905-10

Malaguarnera L. Implications of apoptosis regulators in tumorigenesis. *Cancer Metastasis Reviews* 2004 Aug-Dec;23(3-4):367-87

Marincola FM, Jaffee EM, Hicklin DJ, Ferrone S. Escape of human solid tumors from T-cell recognition: molecular mechanisms and functional significance. *Advances in Immunology*. 2000;74:181-273

Mariot P, Vanoverberghe K, Lalevee N, Rossier MF, Prevarskaya N. Overexpression of an alpha 1H (Cav3.2) T-type calcium channel during neuroendocrine differentiation of human prostate cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Mar 29;277(13):10824-33.

Marks PA, Miller T, Richon VM. Histone deacetylases. *Current Opinion in Pharmacology*. 2003 Aug;3(4):344-51.

Marquardt A, Stohr H, White K, Weber BH. cDNA cloning, genomic structure, and chromosomal localization of three members of the human fatty acid desaturase family. *Genomics*. 2000 Jun 1;66(2):175-83.

Martín A, Odajima J, Hunt S, Dubus P, Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cdk2 is dispensable for cell cycle inhibition and tumor suppression mediated by p27(Kip1) and p21(Cip1). *Cancer Cell*. 2005 Jun;7(6):591-8.

McBurney M W. Gene silencing in the development of cancer. *Experimental Cell Research* 1999, 248, 25-29

Mathieu-Daude F, Trenkle T, Welsh J, Jung B, Vogt T, McClelland M. Identification of differentially expressed genes using RNA fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Methods in Enzymology*. 1999;303:309-24.

Medema RH, de Vries-Smits AM, van der Zon GC, Maassen JA, Bos JL. Ras activation by insulin and epidermal growth factor through enhanced exchange of guanine nucleotides on p21ras. *Molecular and Cellular Biology*. 1993 Jan;13(1):155-62.

Meeker AK, De Marzo AM. Recent advances in telomere biology: implications for human cancer. *Current Opinions in Oncology*. 2004 Jan;16(1):32-8.

Michaelson JS, Bader D, Kuo F, Kozak C, Leder P. Loss of Daxx, a promiscuously interacting protein, results in extensive apoptosis in early mouse development. *Genes and Development*. 1999 Aug 1;13(15):1918-23.

Miller LK. An exegesis of IAPs: salvation and surprises from BIR motifs. *Trends in Cell Biology*. 1999 Aug;9(8):323-8

Momparler R L, Bovenzi V. DNA methylation and cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 2000, 183, 145-154

Moldave K. Eukaryotic protein synthesis. *Annual Reviews in Biochemistry*. 1985;54:1109-49.

Nacht M, Dracheva T, Gao Y, Fujii T, Chen T, Player A et al. Molecular characteristics of non-small cell lung cancer. *Proc. National Academy of Science USA*, Dec. 2001, Vol. 98, No. 26, 15203-15208

Ng HH, Bird A. Histone deacetylases: silencers for hire. *Trends in Biochemical Science*. 2000 Mar;25(3):121-6.

Nguyen C T, Gonzales F A, Jones P A. Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation MeCP2 binding and acetylation. *Nucleic Acids Research*, 2001, Vol.29, No.22, 4598-4606

Nguyen CT, Weisenberger DJ, Velicescu M, Gonzales FA, Lin JC, Liang G, Jones PA. Histone H3-lysine 9 methylation is associated with aberrant gene silencing in cancer cells and is rapidly reversed by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Cancer Research*. 2002 Nov 15;62(22):6456-61.

Nygaard O, Nilsson L .Kinetic determination of the effects of ADP-ribosylation on the interaction of eukaryotic elongation factor 2 with ribosomes. *Journal of Biological Chemistry*. 1990 Apr 15;265(11):6030-4.

Oertle T, Klinger M, Stuermer CA, Schwab ME. A reticular rhapsody: phylogenic evolution and nomenclature of the RTN/Nogo gene family. *FASEB J*. 2003 Jul;17(10):1238-47

Old LJ. Cancer vaccines 2003: opening address. *Cancer Immunology*. 2003 Dec 12;3 Suppl 2:1.

Olie RA, Zangemeister-Wittke U. Targeting tumor cell resistance to apoptosis induction with antisense oligonucleotides: progress and therapeutic potential. *Drug Resist Updat*. 2001 Feb;4(1):9-15. Erratum in: *Drug Resist Updat* 2001 Apr;4(2):139.

O' Neill M J, Sinclair A H. Isolation of rare transcripts by representational difference analysis .*Nucleic Acids Research*, 1997, Vol.25, No. 13, 2681-2682

Ortega S, Malumbres M, Barbacid M. Cyclin D-dependent kinases, INK4 inhibitors and cancer. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002 Mar 14;1602(1):73-87.

Osmanagic-Myers S, Wiche G. Plectin-RACK1 (receptor for activated C kinase 1) scaffolding: a novel mechanism to regulate protein kinase C activity. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Apr 30;279(18):18701-10.

Oue N, Hamai Y, Mitani Y, Matsumura S, Oshimo Y, Aung PP, Kuraoka K, Nakayama H, Yasui W .Gene expression profile of gastric carcinoma: identification of genes and tags potentially involved in invasion, metastasis, and carcinogenesis by serial analysis of gene expression. *Cancer Research*. 2004 Apr 1;64(7):2397-405.

Palanca-Wessels MC, Klingelhutz A, Reid BJ, Norwood TH, Opheim KE, Paulson TG, Feng Z, Rabinovitch PS. Extended lifespan of Barrett's esophagus epithelium transduced with the human telomerase catalytic subunit: a useful in vitro model. *Carcinogenesis*. 2003 Jul;24(7):1183-90

Pastorian K, Hawel L 3rd, Byus CV. Optimization of cDNA representational difference analysis for the identification of differentially expressed mRNAs. *Analytical Biochemistry*. 2000 Jul 15;283(1):89-98.

Paulin FE, West MJ, Sullivan NF, Whitney RL, Lyne L, Willis AE. Aberrant translational control of the c-myc gene in multiple myeloma. *Oncogene*. 1996 Aug 1;13(3):505-13.

Pickering BM, Mitchell SA, Spriggs KA, Stoneley M, Willis AE. Bag-1 internal ribosome entry segment activity is promoted by structural changes mediated by poly(rC) binding protein 1 and recruitment of polypyrimidine tract binding protein 1. *Molecular and Cellular Biology*. 2004 Jun;24(12):5595-605.

Post PL, Tyska MJ, O'Connell CB, Johung K, Hayward A, Mooseker MS. Myosin-IXb is a single-headed and processive motor. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Apr 5;277(14):11679-83.

Qu GZ, Grundy PE, Narayan A, Ehrlich M. Frequent hypomethylation in Wilms tumors of pericentromeric DNA in chromosomes 1 and 16. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 1999 Feb;109(1):34-9.

Qiu X, Valentijn J A, Jamieson J D. Carboxyl-methylation of Rab3D in the rat pancreatic acinar tumor cell line AR42J. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 285, 708-714

Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature*. 1993 Apr 22;362(6422):747-9.

Ramchandani S, Bhattacharya S K, Cervoni N, Szyf M. DNA methylation is a reversible biological signal. Proc. National Academy of Science USA, May 1999, Vol. 96, 6107-6112

Reczek EE, Flores ER, Tsay AS, Attardi LD, Jacks T. Multiple response elements and differential p53 binding control Perp expression during apoptosis. Molecular Cancer Research. 2003 Dec;1(14):1048-57.

Robbel C., Bert T., Steigerwald, A., Reckzeh, B., Simon, B. Antiproliferative effect of paclitaxel by G2/M cell cycle arrest and induction of apoptosis in neuroendocrine pancreatic tumor cells. Molecular and Cellular Endocrinology (Manuskript in Vorbereitung)

Roberts CW, Orkin SH. The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. Nature Reviews Cancer. 2004 Feb;4(2):133-42.

Rosenberg SA. A new era for cancer immunotherapy based on the genes that encode cancer antigens. Immunity. 1999 Mar;10(3):281-7

Ross CD, Gomaa MA, Gillies E, Juengel R, Medina JE. Tumor grade, microvessel density, and activities of malate dehydrogenase, lactate dehydrogenase, and hexokinase in squamous cell carcinoma. Otolaryngology Head Neck Surgery. 2000 Feb;122(2):195-200.

Rosty C, Ueki T, Argani P, Jansen M, Yeo C J, Cameron J et al. Overexpression of S100A4 in pancreatic ductal adenocarcinomas is associated with poor differentiation and DNA hypomethylation. American Journal of Pathology, January 2002, Vol. 160. No.1, 45-50

Roth SY, Denu JM, Allis CD. Histone acetyltransferases. Annual Reviews in Biochemistry. 2001;70:81-120.

Rubinstein N, Alvarez M, Zwirner NW, Toscano MA, Ilarregui JM, Bravo A, Mordoh J, Fainboim L, Podhajcer OL, Rabinovich GA. Targeted inhibition of galectin-1 gene expression in tumor cells results in heightened T cell-mediated rejection; A potential mechanism of tumor-immune privilege. *Cancer Cell*. 2004 Mar;5(3):241-51.

Ruggero D, Pandolfi PP. Does the ribosome translate cancer? *Nature Reviews of Cancer*. 2003 Mar;3(3):179-92.

Salehi AH, Xanthoudakis S, Barker PA. NRAGE, a p75 neurotrophin receptor-interacting protein, induces caspase activation and cell death through a JNK-dependent mitochondrial pathway. *Journal of Biological Chemistry*. 2002 Dec 13;277(50):48043-50.

Santin AD, Zhan F, Bellone S, Palmieri M, Cane S, Bignotti E, Anfossi S, Gokden M, Dunn D, Roman JJ, O'Brien TJ, Tian E, Cannon MJ, Shaughnessy J Jr, Pecorelli S. Gene expression profiles in primary ovarian serous papillary tumors and normal ovarian epithelium: identification of candidate molecular markers for ovarian cancer diagnosis and therapy. *International Journal of Cancer*. 2004 Oct 20;112(1):14-25.

Sawada M, Sun W, Hayes P, Leskov K, Boothman DA, Matsuyama S. Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nature Cell Biology*. 2003 Apr;5(4):320-9. Erratum in: *Nature Cell Biology*. 2004 Apr;6(4):373-4.

Schuller HM, Correa E, Orloff M, Reznik GK. Successful chemotherapy of experimental neuroendocrine lung tumors in hamsters with an antagonist of Ca<sup>2+</sup>/calmodulin. *Cancer Research*. 1990 Mar 1;50(5):1645-9. Erratum in: *Cancer Res* 1992 Mar 15;52(6):1649.

Schutte M, Hruban RH, Geradts J, Maynard R, Hilgers W, Rabindran SK, Moskaluk CA, Hahn SA, Schwarte-Waldhoff I, Schmiegel W, Baylin SB, Kern SE, Herman JG. Abrogation of the Rb/p16 tumor-suppressive pathway in virtually all pancreatic carcinomas. *Cancer Research*. 1997 Aug 1;57(15):3126-30.

Seliger B, Maeurer MJ, Ferrone S. Antigen-processing machinery breakdown and tumor growth. *Immunology Today*. 2000 Sep;21(9):455-64.

Serrano A, Tanzarella S, Lionello I, Mendez R, Traversari C, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Rexpression of HLA class I antigens and restoration of antigen-specific CTL response in melanoma cells following 5-aza-2'-deoxycytidine treatment. *International Journal of Cancer*. 2001 Oct 15;94(2):243-51.

Shay JW, Bacchetti S. A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer*. 1997 Apr;33(5):787-91

Shay JW, Wright WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis*. 2004 Oct 7

Shichijo S, Azuma K, Komatsu N, Kawamoto N, Takedatsu H, Shomura H, Sawamizu H, Maeda Y, Ito M, Itoh K. Identification of two novel tumor-associated antigens recognized by HLA-B46-restricted cytotoxic T lymphocytes. *International Journal of Molecular Medicine*. 2003 Dec;12(6):895-902.

Shim JS, Lee J, Park HJ, Park SJ, Kwon HJ. A new curcumin derivative, HBC, interferes with the cell cycle progression of colon cancer cells via antagonization of the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin function. *Chemistry and Biology*. 2004 Oct;11(10):1455-63.

Simon B, Lubomierski N. Implication of the INK4a/ARF locus in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumorigenesis. *Annals of the New York Academy of Science*. 2004 Apr;1014:284-99.

Simon B. Therapie neuroendokriner gastroenteropankreatischer (GEP) Tumoren. In: *Therapie gastrointestinaler Erkrankungen*, Caspary, W. F.; Mössner, J.; Stein, J.; [Ed.], Springer 2005, Kap. 12, S. 102-111

Simpson D J, Bicknell J E, McNicol A M, Clayton R N, Farrell W E. Hypermethylation of the p16/CDK2A/MTS 1 gene and loss of protein expression is associated with nonfunctional pituitary adenomas but not somatotrophinomas. *Genes, Chromosomes & Cancer*, 1999, 24, 328-336

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987 Jan 9;235(4785):177-82.

Smith S S. Stalling of DNA methyltransferase in chromosome stability and chromosome remodelling. *International Journal of Molecular Medicine*, 1998, 1, 147-156

Smith-Beckerman DM, Fung KW, Williams KE, Auersperg N, Godwin AK, Burlingame AL. Proteome Changes in Ovarian Epithelial Cells Derived from Women with BRCA1 Mutations and Family Histories of Cancer. *Molecular & Cellular Proteomics*. 2005 Feb;4(2):156-68.

Smogorzewska A, de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annual Review of Biochemistry* 2004;73:177-208.

Steenman MJ, Rainier S, Dobry CJ, Grundy P, Horon IL, Feinberg AP. Loss of imprinting of IGF2 is linked to reduced expression and abnormal methylation of H19 in Wilms' tumour. *Nature Genetics*. 1994 Jul;7(3):433-9. Erratum in: *Nature Genetics* 1994 Oct;8(2):203.

Street SE, Cretney E, Smyth MJ. Perforin and interferon-gamma activities independently control tumor initiation, growth, and metastasis. *Blood*. 2001 Jan 1;97(1):192-7.

Street SE, Trapani JA, MacGregor D, Smyth MJ. Suppression of lymphoma and epithelial malignancies effected by interferon gamma. *Journal of Experimental Medicine*. 2002 Jul 1;196(1):129-34.

Sun Y, Mochizuki Y, Majerus PW. Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase inhibits tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Journal of Biological Chemistry*. 2003 Oct 31;278(44):43645-53.

Sundararaj KP, Wood RE, Ponnusamy S, Salas AM, Szulc Z, Bielawska A, Obeid LM, Hannun YA, Ogretmen B. Rapid shortening of telomere length in response to ceramide involves the inhibition of telomere binding activity of nuclear glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Feb 13;279(7):6152-62

Sundstrom BE, Stigbrand TI. Cytokeratins and tissue polypeptide antigen. *International Journal of Biological Markers*. 1994 Apr-Jun;9(2):102-8.

Suter CM, Martin DI, Ward RL. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nature Genetics*. 2004 May;36(5):497-501.

Suzuki M, Kobayashi H, Kanayama N, Saga Y, Suzuki M, Lin CY, Dickson RB, Terao T. Inhibition of tumor invasion by genomic down-regulation of matriptase through suppression of activation of receptor-bound pro-urokinase. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Apr 9;279(15):14899-908.

Takahira T, Oda Y, Tamiya S, Yamamoto H, Kawaguchi K, Kobayashi C, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M. Alterations of the p16INK4a/p14ARF pathway in clear cell sarcoma. *Cancer Science*. 2004 Aug;95(8):651-5.

Tamura M, Nishizaka S, Maeda Y, Ito M, Harashima N, Harada M, Shichijo S, Itoh K. Identification of cyclophilin B-derived peptides capable of inducing histocompatibility leukocyte antigen-A2-restricted and tumor-specific cytotoxic T lymphocytes. *Japanese Journal of Cancer Research*. 2001 Jul;92(7):762-7.

Tanimoto H, Shigemasa K, Tian X, Gu L, Beard JB, Sawasaki T, O'Brien TJ. Transmembrane serine protease TADG-15 (ST14/Matriptase/MT-SP1): expression and prognostic value in ovarian cancer. *British Journal of Cancer*. 2005 Jan 31;92(2):278-83.

Terabe M, Matsui S, Noben-Trauth N, Chen H, Watson C, Donaldson DD, Carbone DP, Paul WE, Berzofsky JA. NKT cell-mediated repression of tumor immunosurveillance by IL-13 and the IL-4R-STAT6 pathway. *Nature Immunology*. 2000 Dec;1(6):515-20.

Terabe M, Berzofsky JA. Immunoregulatory T cells in tumor immunity. *Current Opinions in Immunology*. 2004 Apr;16(2):157-62

Thierry F, Benotmane MA, Demeret C, Mori M, Teissier S, Desaintes C. A genomic approach reveals a novel mitotic pathway in papillomavirus carcinogenesis. *Cancer Research*. 2004 Feb 1;64(3):895-903.

Tonini T, Rossi F, Claudio PP. Molecular basis of angiogenesis and cancer. *Oncogene*. 2003 Sep 29;22(42):6549-56

Tornaletti S, Pfeifer GP. Complete and tissue-independent methylation of CpG sites in the p53 gene: implications for mutations in human cancers. *Oncogene*. 1995 Apr 20;10(8):1493-9.

Toyota M, Ho C, Ahuja N, Jair K W, Li Q, Ohe-Toyota M et al. Identification of differentially methylated Sequences in colorectal cancer by methylated CpG island amplification. *Cancer Research*, May 1999, 59, 2307-2312

Tsou AP, Yang CW, Huang CY, Yu RC, Lee YC, Chang CW, Chen BR, Chung YF, Fann MJ, Chi CW, Chiu JH, Chou CK. Identification of a novel cell cycle regulated gene, HURP, overexpressed in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 2003 Jan 16;22(2):298-307

Tureci O, Schmitt H, Fadle N, Pfreundschuh M, Sahin U. Molecular definition of a novel human galectin which is immunogenic in patients with Hodgkin's disease. *Journal of Biological Chemistry*. 1997 Mar 7;272(10):6416-22.

Ueki T, Toyota M, Sohn T, Yeo C J, Issa J P, Hruban R H et al. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Research*, Apr. 2000, 60, 1835-1839

Ueki T, Minoru T, Skinner H, Walter K M, Yeo C J, Issa J P et al. Identification and characterization of differentially methylated CpG islands in pancreatic carcinoma. *Cancer Research*, Dec. 2001, 61, 8540-8546

Ushijima T, Morimura K, Hosoya Y, Okonogi H, Tatematsu M, Sugimura T, Nagao M. Establishment of methylation-sensitive-representational difference analysis and isolation of hypo- and hypermethylated genomic fragments in mouse liver tumors. *Proc. of the National Academy of Science U S A*. 1997 Mar 18;94(6):2284-9.

Ushijima T. Innovation: Detection and interpretation of altered methylation patterns in cancer cells. *Nature Reviews Cancer*. 2005 Mar;5(3):223-31

Varner JA, Cheresh DA. Integrins and cancer. *Current Opinions in Cell Biol*. 1996 Oct;8(5):724-3

Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD. Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc. of the National Academy of Science U S A*. 1998 Jul 21;95(15):8698-702.

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000 Nov 16;408(6810):307-10

Vousden KH. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2002 Mar 14;1602(1):47

Wajed AS, Laird PW, DeMeesters T R. DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Annals of Surgery*, Jul. 2001, Vol.234, No.1, 10-20

Wada J, Ota K, Kumar A, Wallner EI, Kanwar YS. Developmental regulation, expression, and apoptotic potential of galectin-9, a beta-galactoside binding lectin. *Journal of Clinical Investigation*. 1997 May 15;99(10):2452-61.

Wang HY, Lee DA, Peng G, Guo Z, Li Y, Kiniwa Y, Shevach EM, Wang RF. Tumor-specific human CD4+ regulatory T cells and their ligands: implications for immunotherapy. *Immunity*. 2004 Jan;20(1):107-18.

Wang SN, Miyauchi M, Koshikawa N, Maruyama K, Kubota T, Miura K, Kurosawa Y, Awaya A, Kanai Y. Antigen expression associated with lymph node metastasis in gastric adenocarcinomas. *Pathology International*. 1994 Dec;44(12):844-9.

Wege H, Le HT, Chui MS, Liu L, Wu J, Giri R, Malhi H, Sappal BS, Kumaran V, Gupta S, Zern MA. Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential. *Gastroenterology*. 2003 Feb;124(2):432-44.

Wild A, Ramaswamy A, Langer P, Celik I, Fendrich V, Chaloupka B, Simon B, Bartsch DK. Frequent methylation-associated silencing of the tissue inhibitor of metalloproteinase-3 gene in pancreatic endocrine tumors. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2003 Mar;88(3):1367-73.

Wilson V L, Jones P A. DNA methylation decreases in aging but not in immortal cells. *Science*, Jun. 1983, Vol. 220, 1055-1057

Winter RN, Kramer A, Borkowski A, Kyprianou N. Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. *Cancer Research*. 2001 Feb 1;61(3):1227-32.

Whitelock JM, Murdoch AD, Iozzo RV, Underwood PA. The degradation of human endothelial cell-derived perlecan and release of bound basic fibroblast growth factor by stromelysin, collagenase, plasmin, and heparanases. *Journal of Biological Chemistry*. 1996 Apr 26;271(17):10079-86.

Wolffe A P, Jones P L, Wade P A. DNA demethylation. *Proc. National Academy of Science USA*, May 1999, Vol. 96, 5894-5896

Wong JM, Kusdra L, Collins K. Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nature Cell Biology*. 2002 Sep;4(9):731-6.

Woo EY, Chu CS, Goletz TJ, Schlienger K, Yeh H, Coukos G, Rubin SC, Kaiser LR, June CH. Regulatory CD4(+)CD25(+) T cells in tumors from patients with early-stage non-small cell lung cancer and late-stage ovarian cancer. *Cancer Research*. 2001 Jun 15;61(12):4766-72.

Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Molecular Cellular Biology*. 1989 Jul;9(7):3088-92.

Yamada T, Ohwada S, Saitoh F, Adachi M, Morishita Y, Hozumi M. Induction of Le y antigen by 5-Aza-2'-deoxycytidine in association with differentiation and apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Anticancer Research*, 1996, 16, 735-740

Yamada Y, Toyota M, Hirokawa Y, Suzuki H, Takagi A, Matsuzaki T, Sugimura Y, Yatani R, Shiraishi T, Watanabe M. Identification of differentially methylated CpG islands in prostate cancer. *International Journal of Cancer*. 2004 Dec 10;112(5):840-5.

Yang X, Khosravi-Far R, Chang HY, Baltimore D. Daxx, a novel Fas-binding protein that activates JNK and apoptosis. *Cell*. 1997 Jun 27;89(7):1067-76.

Yasui W, Oue N, Ono S, Mitani Y, Ito R, Nakayama H. Histone acetylation and gastrointestinal carcinogenesis. *Annals of the New York Academy of Science*. 2003 Mar;983:220-31.

Yoshida H, Imaizumi T, Kumagai M, Kimura K, Satoh C, Hanada N, Fujimoto K, Nishi N, Tanji K, Matsumiya T, Mori F, Cui XF, Tamo W, Shibata T, Takanashi S, Okumura K, Nakamura T, Wakabayashi K, Hirashima M, Sato Y, Satoh K. Interleukin-1beta stimulates galectin-9 expression in human astrocytes. *Neuroreport*. 2001 Dec 4;12(17):3755-8.

Yu J, Zhang L. Apoptosis in human cancer cells. *Current Opinions in Oncology*. 2004 Jan;16(1):19-24

Yuan J, Luo RZ, Fujii S, Wang L, Hu W, Andreeff M, Pan Y, Kadota M, Oshimura M, Sahin AA, Issa JP, Bast RC Jr, Yu Y. Aberrant methylation and silencing of ARHI, an imprinted tumor suppressor gene in which the function is lost in breast cancers. *Cancer Research*. 2003 Jul 15;63(14):4174-80.

Zhao LY, Liu J, Sidhu GS, Niu Y, Liu Y, Wang R, Liao D. Negative regulation of p53 functions by Daxx and the involvement of MDM2. *Journal of Biological Chemistry*. 2004 Nov 26;279(48):50566-79.

---

Zhou L, Cheng X, Connolly BA, Dickman MJ, Hurd PJ, Hornby DP. Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *Journal of Molecular Biology*. 2002 Aug 23;321(4):591-9.

## 7. Anhang

### 7.1. Verwendete Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AIF	apoptosis inducing factor
APAF	apoptotic protease activating factor
ARF	alternative reading frame
ATF	activating transcription factor
ATP	Adenosin Triphosphat
Bax	BCL2-associated X protein
bp	Basenpaare
BCL-2	B-cell lymphoma/leukemia-2 protein
bFGF	basischer FGF
BSA	bovines Serumalbumin
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CASP	Caspase
Caspase	cysteine-dependent aspartate specific
CDC	cell division cycle protein
CDK	cyclin-dependent kinase
CDKN	cyclin-dependent kinase inhibitor
cDNA	komplementäre DNA
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propanesulfonate
chron.	chronisch
CKI	cyclin-dependent kinase inhibitor
Da	Dalton
DAC	5-Aza-2'-Deoxycytidin (Decitabine)
dATP	Desoxyadenosin-Triphosphat
dCTP	Desoxycytosin-Triphosphat
dGTP	Desoxyguanosin-Triphosphat

---

d.h.	das heißt
DI	DNA-Index
DISC	death inducing signalling complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase I	Desoxyribonuklease I
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DP-1	s. TFDP-1
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-Triphosphat
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamin-Tetraessigsäure
EGF	Epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglycol-Tetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
etc.	ecetera
EtOH	Ethanol
evtl.	eventuell
f	forward
FADD	Fas-associated death domain
Fas	= tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6 (TNFRSF6)
FasL	Fas-Ligand
FAST	Fas-activated serine/threonine kinase
FCS	fötales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
FLICE	Fas-associated death domain-like Interleukin-1 $\beta$ converting enzyme (= caspase 8)
FLIP	FLICE Inhibitor Protein
5-FU	5-Fluorouracil
G0/1/2-Phase	„gap 0/1/2“ bzw. „growth phase 0/1/2“ des Zellzyklus

---

GADD	growth arrest and DNA-damage-inducible protein
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GEP-Tumoren	gastroenteropankreatische Tumoren
ggf.	gegebenenfalls
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HPV	humanpathogene Papillomviren
IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
IGF-1	Insulin-like growth factor I
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin-G
I $\kappa$ B	Inhibitor $\kappa$ B
IL	Interleukin
JNK	c-Jun N-terminal kinase
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
KDa	Kilodalton
LICE	= caspase 3
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MDM2	mouse double minute 2
MEN	Multiple endokrine Neoplasie
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MHC	major histocompatibility complex
min	Minute
mg	milligramm
$\mu$ g	mikrogramm
$\mu$ l	mikroliter
$\mu$ M	mikro molar
MMLV	molony murine leukemia virus
MORT	mediator of receptor-induced toxicity
M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus

---

mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
MW	Molekulargewicht
MYC	v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)
NaCl	Natriumchlorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NET	neuroendokriner Tumor
NF $\kappa$ B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 1
NGF	Nerve growth factor
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nano molar
NSE	neuronenspezifische Enolase
NW	Nebenwirkung
OD	optische Dichte
p	piko
p.A.	pro analysi
PARP	poly (ADP-ribose) polymerase
PBS	Phosphat-buffered Saline
PCI	Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
P53	tumor protein p53
PIG	p53-induced-gene
pRb	retinoblastoma protein
%	Prozent
P/S	Penicillin/Streptomycin
r	reverse
RAF	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog

---

RAS	rat sarcoma (Onkogen)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
s.	siehe
S-Phase	Synthesephase des Zellzyklus
SSC (Lösung)	saline-sodium citrate
SSTR	Somatostatin-Rezeptor
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N',Tetramethylethylendiamin
TGF	tumor growth factor
TNF	tumor necrosis factor
tRNA	transport RNA
Tris-Cl	Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan/HCl
Triton X-100	Octylphenolpoly(ethylenglycolether) x
TSR	Template Suppression Reagent
u.	und
U	Unit = Einheit enzymatischer Aktivität
u.a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v.a.	vor allem
VEGF	vascular endothelial groth factor
vs.	versus
w/v	weight by volume
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
z. Zt.	zur Zeit

## 7.2. Curriculum vitae

### Persönliche Daten

---

Name: Nils Habbe  
Adresse: Am Kupfergraben 1, 35037 Marburg  
Geburtstag: 24.11.1976  
Geburtsort: Herten  
Familienstand: ledig  
Eltern: Annette Habbe, Sekretärin/ Paul Habbe, StD

### Schulbildung

---

1983 – 1987 Ludgerusgrundschule Herten  
1987 – 1996 Städt. Gymnasium Herten, Abitur

---

01.08.1996 – 30.09.1997 13 monatiger Zivildienst beim DRK Herten  
Ausbildung zum Rettungssanitäter

### WS 1997/98-SS 2004 Studium der Humanmedizin

---

09.09.1999 Ärztliche Vorprüfung  
12.04.2001 1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

#### *Famulaturen:*

01.08.2000 – 31.08.2000 Abteilung für Anästhesiologie, Herten  
04.09.2000 – 06.10.2000 Praxis für Allgemeinmedizin, Gemünden  
23.07.2001 – 24.08.2001 Universitätsklinik für Plastische Chirurgie, Wien  
29.07.2002 – 30.08.2002 Klinik für Plastische u. Handchirurgie, Gelsenkirchen  
  
16.04.2003 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

*Praktisches Jahr:*

22.04.2003 – 10.08.2003	Zentrum für Innere Medizin, Marburg
11.08.2003 – 30.11.2003	Zentrum für Chirurgie, Marburg
01.12.2004 – 21.03.2004	Klinik für Hals-, Nasen-, Ohrenheilkunde, Marburg
24.05.2004	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

**Berufliche Tätigkeit**

---

07/2004 – 10/2004	Arzt im Praktikum in der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Philipps-Universität Marburg, Direktor: Prof. Dr. med. M. Rothmund
Seit 10/2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Klinik für Visceral-, Thorax- und Gefäßchirurgie der Philipps-Universität Marburg, Direktor: Prof. Dr. med. M. Rothmund

**Wissenschaftliche Ausbildung**

---

Promotion bei Frau Prof. Dr. med. B. Simon,  
Zentrum für Innere Medizin, Klinik für  
Gastroenterologie und Stoffwechsel, Philipps-  
Universität Marburg  
Direktor: Prof. Dr. med. R. Arnold

### **7.3. Publikationen**

#### **Originalarbeiten:**

**Habbe N**, Bert T, Aurbek N, Bartsch DK, Simon B Cloning of methylation dependent genes in neuroendocrine pancreatic tumor cells by cDNA Representational Difference Analysis (cDNA-RDA)

**Pancreatology** (Manuskript in Vorbereitung).

#### **Abstracts:**

**Habbe N**, Bert T, Simon B Identification of differentially expressed genes in neuroendocrine tumors by cDNA Representational Difference Analysis (cDNA-RDA)

**17. Congress of the European Association of Cancer Research, Innsbruck 2004**

#### **7.4. Akademische Lehrer**

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren in Marburg:

Arnold, Aumüller, Barth, Basler, Baum, Beato, Beyer, Daut, Engenhardt-Cabillic, Fischer, Geus, Görg, Gotzen, Gressner, Grimm, Hasilik, Herzum, Kern, Köhler, Kretschmer, Jungclas, Lange, Koolmann, Maisch, Moll, Moosdorf, Mueller, Neubauer, Oertel, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Schäfer, Schneider, Seitz, Simon, Slenczka, Steiniger, Vogelmeier, Voigt, von Wichert, Weihe, Werner, Westermann.

## **7.5. Erklärung**

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

**Klonierung methylierungsabhängiger Gene in Neuroendokrinen  
Pankreastumorzellen durch cDNA Representational Difference  
Analysis (cDNA-RDA)**

am Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität Marburg, Klinik für Gastroenterologie und Stoffwechsel, unter Leitung von Frau Prof. Dr. med. B. Simon ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher weder an einem in- und ausländischem medizinischem Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende Arbeit oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Marburg, 24. August 2005

## **7.6. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Babette Simon für die thematische Anregung der vorliegenden Arbeit und für die ausgezeichnete Betreuung während deren Durchführung. Sie stand stets und in vielfacher Hinsicht als Ansprechpartnerin zur Verfügung und unterstützte mich beim Erstellen der Arbeit und darüber hinaus mehr, als zu verlangen war.

Herrn Prof. Dr. med. Rudolf Arnold danke ich für die freundliche Aufnahme in die Abteilung Gastroenterologie und das Überlassen des Laborplatzes.

Frau Karin Münch sowie Dr. Tillmann Bert möchte ich herzlich für die geduldige und fachlich kompetente Einweisung in die molekularbiologischen Techniken und die Betreuung während der Durchführung der Experimente danken.

Ein weiterer Dank gilt der AG von Prof. Bartsch wegen der großzügigen Unterstützung bei der Sequenzierung der Klone, ohne die diese Arbeit nicht zu bewältigen gewesen wäre.

Nicht zuletzt bin ich meinen Eltern zu größtem Dank verpflichtet. Sie haben mich im gesamten Studium selbstlos unterstützt, immer im Vertrauen, dass die gewährte akademische Freiheit Früchte tragen wird. Ohne diese Freiheit und dieses Vertrauen wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.