

Für meinen Mann Dirk und meinen Sohn Niklas
Finn, die für mich Inspiration und Motivation waren.



**Dissertation zur Erlangung des
akademischen Grades doctor rerum naturalium
(Dr. rer. Nat.)**

**Hypermethylierung von tumor-assoziierten
Genen in Tumoren des Kopf-
Hals-Bereiches mit besonderer Berücksichtigung
der epigenetischen
Regulation und Funktion von Erythropoietin**

vorgelegt dem Fachbereich Biologie und Chemie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

von Katrin Steinmann, Dipl. Biochem.
geboren am 28.05.1981 in Görlitz

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Dammann
2. Gutachter: Prof. Dr. Rainer Renkawitz

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung.....	1
<i>1.1 Plattenzellkarzinome des Hals-Kopf-Bereiches</i>	<i>1</i>
<i>1.2 Epigenetische Genregulation</i>	<i>3</i>
1.2.1 Promotorhypermethylierung zur Inaktivierung von Genen.....	3
1.2.2 Regulation der Genaktivität über Chromatinmodifikation	5
<i>1.3 Erythropoietin.....</i>	<i>6</i>
1.3.1 Funktionen von Erythropoietin	7
1.3.2 Erythropoietin in Tumoren.....	8
1.3.3 Regulation der Genexpression von Erythropoietin	9
<i>1.4 Zielsetzung.....</i>	<i>11</i>
2. Material und Methoden.....	13
2.1 <i>Material.....</i>	<i>13</i>
2.1.1 Chemikalien	13
2.1.2 Gebrauchswaren	15
2.1.3 Geräte.....	16
2.1.4 Lösungen und Puffer	17
2.1.5 Molekulargewichtsstandards.....	20
2.1.6 Medien	20
2.1.7 Enzyme	22
2.1.8 Sterilisation/ Autoklavierung von Lösungen und Geräten	22
2.1.9 Verwendete vorgefertigte Systeme.....	22
2.1.10 Antikörper	23
2.1.11 Primer.....	23
2.1.12 Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials.....	26
2.2 <i>Methoden.....</i>	<i>30</i>
2.2.1 Methylierungsanalysen.....	30
2.2.2 Herstellung der verwendeten Vektor-Konstrukte.....	33

2.2.3 Arbeiten mit humanen Zellen.....	39
2.2.4 Lokalisationsuntersuchungen durch Fluoreszenzmarkierung.....	43
2.2.5 Koloniebildungstest.....	44
2.2.6 Proliferationsuntersuchungen.....	44
2.2.7 Softagar-Test.....	45
2.2.8 Reverse Transkription.....	46
2.2.9 Real time quantitative PCR.....	47
2.2.10 Luciferase Assay.....	47
2.2.11 Chromatin Immunopräzipitation.....	50
3. Ergebnisse.....	52
3.1 <i>Untersuchung der Methylierung von tumor-assoziierten Genen in HNSCC.....</i>	52
3.1.1 Methylierungsstatus der tumorassoziierten Gene.....	52
3.1.2 Korrelationen zwischen Promotormethylierung und Alter, Rezidiv, Stadium, Differenzierung und TNM Klassifizierung.....	55
3.2 <i>Erythropoietin in HNSCC.....</i>	58
3.2.1 Regulation der Genaktivität und Expression von Erythropoietin in HNSCC und anderen primären Geweben und verschiedenen Krebszelllinien.....	58
3.2.2 Auswirkung der Reexpression von Erythropoietin in der HNSCC-Zelllinie Hep2.....	73
4. Diskussion.....	81
4.1 <i>Methylierungsstatus verschiedener Tumorsuppressorgene in HNSCC.....</i>	81
4.2 <i>Epigenetische Regulation und Funktion von Erythropoietin in HNSCC.....</i>	86
4.2.1 Regulation der Genaktivität von Erythropoietin durch DNA-Methylierung und Chromatinmodifikation.....	86
4.2.2 Reexpression von Erythropoietin in der HNSCC-Zelllinie Hep2 führt zu einer Inhibierung der Apoptose und einer Steigerung der Proliferationsrate.....	96
5. Ausblick.....	100
6. Zusammenfassung.....	102
7. Anhang.....	104
8. Referenzen.....	108

Abkürzungsverzeichnis

μ	micro
5-Aza-dC	5-Aza-2'-deoxycytidin
aa	<i>amino acid</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARNT	Arylhydrocarbon-Rezeptor-Nuklear-Translokator
BFU-E	bursting-forming unit erythroid
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	„copy“ („ <i>complementary</i> “) DNA
CFU-E	<i>colony-forming unit erythroid</i>
ChIP	Chromatin-Immunopräzipitation
COBRA	<i>combined bisulfite restriction analysis</i>
ddH ₂ O	bidestilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferasen
dNTP	2'Desoxynukleosid-5'-triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	<i>Electromobility shift assay</i>
EPO	Erythropoietin
et al.	et alterae
HBS	<i>HIF-1 binding site</i>
HDAC	Histondeacetylase
HIF	<i>Hypoxy inducible factor</i>
HNSCC	<i>Head and Neck Squamous Cell Carcinoma</i>
kB	Kilobasen

LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
MAP-K	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MBD2	Methylbindungs-Domäne Protein 2
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
NEB	New England Biolabs
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PI-3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
Rpm	<i>rotations per minute</i>
SAM	S-Adenosylmethionin
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris Borsäure Ethylendiamintetraacetat
TE	Tris Ethylendiamintetraacetat
TEMED	N,N,N,-Tetramethyl-ethylendiamin
UV	ultraviolett
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-indolyl- β -D-galactopyranoside
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die zweithäufigste Todesursache in Deutschland nach den Herz-Kreislauf-Erkrankungen ist Krebs (2008). Als Krebs definiert die Medizin bösartige Tumore, die sich in die zwei Klassen maligne epitheliale Tumore und maligne mesenchymale Tumore unterscheiden lassen. Die Ursache für die Entstehung von Krebs liegt unter anderem in einer Fehlregulation von Proliferation, DNA-Reparatur, Adhäsion und Apoptose in den betroffenen Zellen. Gründe hierfür können Schäden in der DNA sein, aber auch epigenetische Mechanismen wie eine Hypermethylierung von Promotoren liefern immer häufiger eine Erklärung (Jones & Baylin, 2002). Dabei wird die Transkription wichtiger Gene inaktiviert, die oftmals eine Rolle in der DNA-Reparatur, der Zellzykluskontrolle oder Apoptose spielen. Diese Gene werden auch Tumorsuppressoren genannt. Dagegen können aber auch Gene induziert werden, die zu einer Entartung der Zelle führen können, so genannte Onkogene.

1.1 Plattenzellkarzinome des Hals-Kopf-Bereiches

Mit über 500000 diagnostizierten Fällen jährlich sind Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches (Head and neck squamous cell carcinoma = HNSCC) eine der häufigsten malignen Erkrankungen in der Welt und machen damit 5 % aller neuen Krebsdiagnosen weltweit aus (Shaw et al., 2006a). HNSCC sind bösartige Tumore, die von den Epithelien der Haut und den Schleimhäuten ausgehen, sie können aber auch von Geweben gebildet werden, die zwar kein Plattenepithel dafür aber Epithelien mit der Fähigkeit zur Plattenzellmetaplasie besitzen. Sie sind sehr heterogen mit bestimmtem Aussehen und Verhalten. Meist haben sie ein warzenartiges Wachstum, das manchmal auch ulzerierend sein kann (Riede & Schaefer, 1999). Neben dem sehr

hohen sporadisches Auftreten zeigte eine Untersuchung eine Häufung der Erkrankungen in bestimmten Familien, was für eine autosomal dominante Vererbung sprechen könnte (Ankathil et al., 1996). Trotz erheblicher Verbesserungen in den letzten Jahren was Diagnostik und Behandlung betrifft und eines besseren Verständnisses der molekularen Mechanismen von HNSCC, ist die allgemeine Überlebensrate in den letzten 30 Jahren konstant bei zum Beispiel ca. 60% in den USA geblieben (Jemal et al., 2008). Dieser Mangel an Fortschritt lässt sich überwiegend mit dem häufigen Auftreten von Rezidiven und einer hohen Rate an Ausbildung von Metastasen erklären. Daneben spielt das Auftreten eines zweiten unabhängigen Tumors eine große Rolle. Dieser findet sich oft in der gleichen oder in benachbarten Regionen des ersten (Vokes et al., 1993).

Tumore sind multifaktorielle Krankheiten, die auch durch multiple exogene Faktoren beeinflusst werden. In vielen Studien wurde eine Assoziation zwischen Rauchen und dem Konsum von Alkohol und der Entwicklung von HNSCC festgestellt (Blot et al., 1988; Maier et al., 1992; Rothman & Keller, 1972). Aber HNSCC tritt auch bei Personen auf, die keiner dieser Noxen ausgesetzt waren. Grund für die Erkrankung könnten in diesem Fall vererbte Gendefekte sein. Eine der am häufigsten auftretenden somatischen Veränderungen in HNSCC wurde im Tumorsuppressor p16 gefunden (Okami et al., 1999; Reed et al., 1996; Shahnavaaz et al., 2001). Weitere Studien zeigen, dass 91% der untersuchten HNSCC mindestens eine Veränderung im p16/CDK-CyclinD/RB-Signalweg aufweisen (Okami et al., 1999). Dabei können verschiedene Mechanismen zu einer Gen-Inaktivierung führen. Eine in der letzten Zeit immer mehr in den Fokus der Untersuchungen der Tumorentwicklung und -progression gerückte Art der Inaktivierung von Genen ist die Hypermethylierung im Promotor (Worsham et al., 2006).

Patienten mit HNSCC leiden wie auch andere Krebspatienten oft unter Anämie und werden deshalb mit rekombinantem Erythropoietin behandelt. Dieses steht allerdings in dem Verdacht in Tumoren die Apoptose zu inhibieren und die Angiogenese sowie die Zellproliferation zu fördern. Auch zeigten zwei Arbeitsgruppen, dass die Behandlung mit rekombinantem Erythropoietin zu einer erhöhten Invasivität der HNSCC führt (Lai et al., 2005; Mohyeldin et al., 2005).

1.2 Epigenetische Genregulation

1.2.1 Promotorhypermethylierung zur Inaktivierung von Genen

Eine Hypermethylierung in der Promotorregion von Genen führt zu einer beständigen Inhibierung der Genaktivität. In Säugern wird typischerweise das Cytosin im CpG-Kontext methyliert. Diese CpG-Dinukleotide kommen in ungefähr 50 % aller Gene in einem Bereich von 0,5 – 2 kb um den Transkriptionsstart, einschließlich des basalen Promotors, gehäuft vor und werden deshalb CpG-Inseln genannt (Gardiner-Garden & Frommer, 1987). Bei der Methylierung wird eine Methylgruppe an das C-Atom in Position 5 des Cytosins gebunden. Für die Katalyse dieses Vorgangs sind spezielle Enzyme notwendig, die DNA-Methyltransferasen (DNMT) genannt wurden. Die DNMT1 ist hierbei für die Aufrechterhaltung des Methylierungsstatus in somatischen Zellen während der Zellproliferation verantwortlich (Bestor, 2000; Hermann et al., 2004b) (Abb. 1.1). Dabei muss das Methylierungsmuster des Elternstrangs auf den Tochterstrang übertragen werden. DNMT3A und DNMT3B sorgen für *de novo*-Methylierungen, das bedeutet, sie können unmethylierte DNA neu methylieren (Bestor, 2000; Kelly & Trasler, 2004). Über die DNMT2 ist nur wenig bekannt und sie zeigt auch nur eine schwache Aktivität (Hermann et al., 2004a; Li, 2002). Über eine aktive Demethylierung der DNA ist kaum etwas bekannt, eine Methylierung kann aber über zwei Replikationsschritte, bei denen der Tochterstrang nicht methyliert wird, reversibel gemacht werden (Abb. 1.1). Ein weiterer wichtiger Faktor bei der DNA-Methylierung ist die Verfügbarkeit des Methylgruppen-Donors S-Adenosylmethionin (SAM) (Loenen, 2006). SAM wird aus der Aminosäure Methionin synthetisiert und während der Methylierungsreaktion zu S-Adenosyl-homocystein umgesetzt.

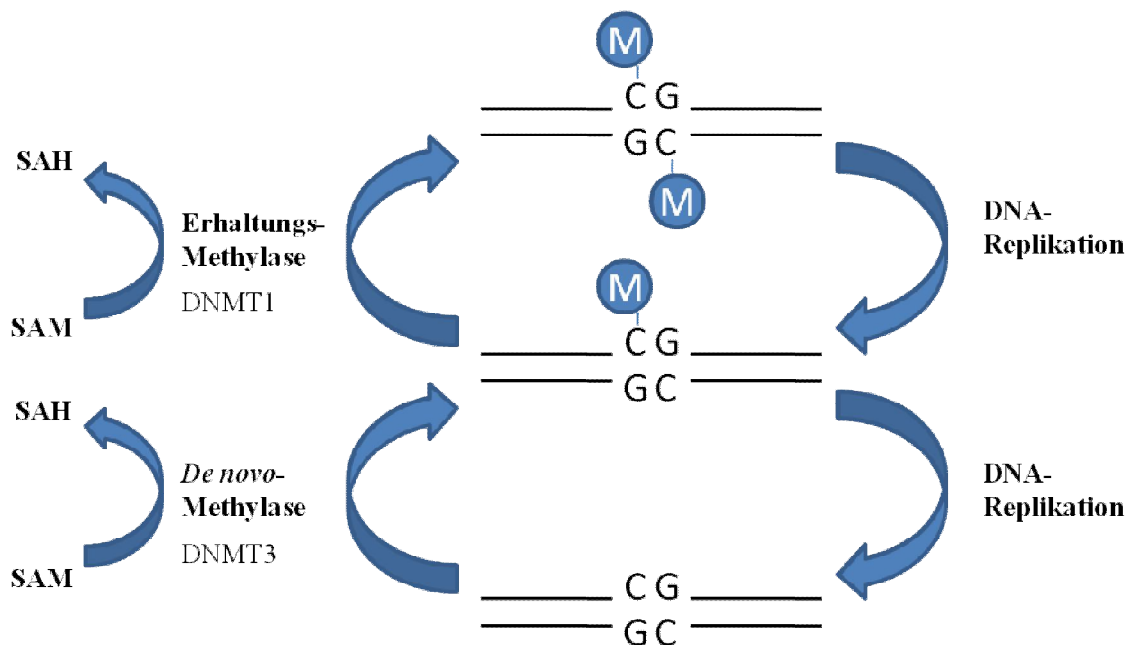


Abb.1.1 Erhaltung und Änderung des Methylierungsstatus der CpGs in der DNA (Schulz, 2005)

Die Repression der Transkription kann durch die DNA-Methylierung auf zwei Arten blockiert werden. Zum einen wird durch die Methylgruppen die Erkennung der DNA durch Transkriptionsaktivatoren verhindert, zum anderen führt die Methylierung zur Bindung verschiedener methylierungsspezifischer Proteine wie MeCP2, MBD2 und MBD3. Diese blockieren die Transkription und können zusätzlich Chromatin-remodeling-Komplexe und Histon-Deacetylasen rekrutieren. Ein Beispiel hierfür ist der Mi-2/NuRD-Komplex. Dieser besteht aus 7 Untereinheiten, wobei eine Untereinheit, das Methylbindungs-Domäne Protein 2 (MBD2), an methylierte DNA bindet. Im Zuge der Anlagerung des Komplexes an die methylierten CpGs kommt es zur Deacetylierung des Chromatins durch zwei weitere Untereinheiten des Komplexes, die Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2 (Bowen et al., 2004). Sowohl die fehlerhafte Hypermethylierung der Promotoren verschiedener Gene als auch eine genomweite Hypomethylierung können zur Entstehung von Tumoren führen. Bei einer fehlerhaften Hypermethylierung sind Promotoren von Genen betroffen, die in normalem Gewebe unmethyliert sind, wie die von Tumorsuppressorgenen. Eine Hypomethylierung führt unter anderem zu einer gesteigerten Expression von Onkogenen und ist verbunden mit einer erhöhten Instabilität der Chromosomen. Da die Hypermethylierung der Promotoren bestimmter Tumorsuppressoren in einzelnen Tumoren besonders gehäuft auftritt und leicht zu detektieren ist, kann sie in einzelnen Fällen als Tumormarker

verwendet werden (Ahrendt et al., 1999; Belinsky et al., 1998; Esteller et al., 1999; Sanchez-Cespedes et al., 2000; Wong et al., 1999).

Ein Beispiel dafür, dass Hypermethylierung der Promotoren von Genen zur Entstehung von Tumoren führen kann, sind die Proteine des Hippo-Signalwegs. Für die Proteine dieses Signalwegs aus *Drosophila* wurden humane Homologe gefunden und Studien zeigen, dass der humane Hippo-Signalweg in die Tumorgenese involviert ist. Sowohl Mitglieder der RASSF-Familie als auch MST1 und MST2 besitzen eine SARAH-Domäne und können über diese Domäne interagieren. Dabei steht SARAH für die Proteine Salvador, das *Drosophila*-Homolog zu WW45, RASSF1 und Hippo, das *Drosophila*-Homolog zu MST, in welchen die Domäne als erstes gefunden wurde. Zum einen wurde gezeigt, dass eine Überexpression von RASSF1A die Aktivierung der proapoptotischen Kinase MST1 verhindert, auf der anderen Seite zeigte sich, dass RASSF1A notwendig ist für die vollständige Aktivierung von MST1 in der FAS-induzierten Apoptose. RASSF1A ist Teil des humanen Hippo-Komplexes, der außerdem aus MST2, WW45 und LATS1 besteht. Defekte im Signalweg dieses Komplexes führen unter anderem zu Fehlern in der Cytokinese und in der Induzierung der Apoptose (Richter et al., 2009) und für die Inaktivierung dieser Gene zeichnet sich oftmals eine Hypermethylierung des Promotors verantwortlich.

1.2.2 Regulation der Genaktivität über Chromatinmodifikation

In eukaryotischen Zellen ist die DNA mittels Histon-Proteinen zu Chromatin und somit zu Strukturen höherer Ordnung verpackt. Dabei sind jeweils 145 – 147 Basenpaare linksgängig um ein *Core* gewickelt, welches aus je zwei Histonen H2A, H2B, H3 und H4 besteht. Dieses sogenannte Nukleosom wird durch das *Linker*-Histon H1 abgeschlossen (Luger et al., 1997). Die *Core*-Histone bestehen aus einer globulären Domäne, von der nur der Aminoterminus als flexible Kette an der Oberfläche des Nukleosoms für post-translationale Modifikationen zugänglich ist. Zu diesen Modifikationen zählen die Acetylierung spezifischer Lysinseitenketten, die Methylierung von Lysin- oder Argininresten und die Phosphorylierung von Serinresten. Daneben können Histone noch ubiquitiniert, sumoyliert oder Poly-ADP-ribosyliert werden (Wu & Grunstein, 2000). All diese Histon-Modifikationen haben einen starken Einfluss auf die Transkription der verpackten DNA. So führt zum Beispiel eine

Acetylierung durch Histon-Acetyl-Transferasen am H3 sowie eine Phosphorylierung am H3S10 durch Histon-Kinasen und eine Methylierung am H3K4 durch Histon-Methyl-Transferasen zu einer Aktivierung der Transkription durch Lockerung der Haftung der DNA an das Nucleosom und damit zur Bildung von Euchromatin (Grant & Berger, 1999; Roth et al., 2001). Dabei wird die DNA zugänglich für verschiedene eine Bromo-Domäne beinhaltenden Transkriptionsfaktoren. Dagegen führt eine Deacetylierung am H3 durch Histon-Deacetylasen und die Methylierung von H3K9 oder H3K27 zu einer festeren Bindung der DNA an das Nucleosom und zur Ausbildung von Heterochromatin, welches typisch ist für inaktive DNA (Sims III et al., 2003).

1.3 Erythropoietin

Humanes Erythropoietin konnte das erste Mal 1977 von Miyake und Kollegen aus 2500 l Urin von aplastisch-anämischen Patienten isoliert werden (Miyake et al., 1977). Aber schon 1906 stellten Carnot und Deflandre auf Grund ihrer Beobachtungen die These auf, dass es einen hormonellen Faktor geben müsse, der die Erythropoiese reguliert, und nannten ihn Hämopoietin (Carnot & Deflandre, 1906). 1948 bekam das Hormon dann den spezifischeren Namen Erythropoietin (Bonsdorff & Lallavisto, 1948). Erythropoietin ist ein 30,4 kDa großes Glycoprotein, das primär in den peritubulären Fibroblasten im Bereich des Nierenkortex und des äußeren Nierenmarks der adulten Niere und der fötalen Leber unter Sauerstoffmangel exprimiert wird (Bachmann et al., 1993; Dame et al., 1998; Maxwell et al., 1993a). Unter sehr starker Hypoxie konnte auch eine Expression in der adulten Leber in den Hepatocyten und den perisinusoidalen Ito-Zellen nachgewiesen werden (Eckardt, 1996; Maxwell et al., 1994). Weitere Expressionen konnten im weiblichen Genitaltrakt, in der Plazenta, in Testis und im neuralen Gewebe ebenfalls eine Expression zeigen (Conrad et al., 1996; Magnanti et al., 2001; Masuda et al., 1994; Yasuda et al., 1998).

Im Menschen ist das Gen für Erythropoietin auf dem langen Arm von Chromosom 7 (q11 – q22) lokalisiert (Law et al., 1986; Powell et al., 1986; Watkins et al., 1986). Es besteht aus 5 Exons und 4 Introns und kodiert für ein 193 aa langes Prohormon. Vor der Sekretion wird eine 27 aa lange Leader-Sequenz abgeschnitten (Lin et al., 1985; Recny et al., 1987). Außerdem fehlt dem zirkulierenden Protein das C-terminale Arginin.

1.3.1 Funktionen von Erythropoietin

Die Hauptaufgabe von Erythropoietin ist die Regulierung der täglichen Produktion von 2×10^{11} roten Blutzellen im Knochenmark. Dies geschieht durch die Verhinderung der Apoptose der erythrogenen Vorläuferzellen sowie der Regulation der Zellproliferation und Differenzierung der BFU-E (*bursting-forming unit erythroid*) und der CFU-E (*colony-forming unit erythroid*) während der Erythrocyten-Entwicklung (Fisher, 2003). Die Funktion von Erythropoietin wird über einen Membran-ständigen Rezeptor vermittelt (Chang et al., 1974; Krantz & Goldwasser, 1984). Dieser Rezeptor ist ein Mitglied der Typ1-Cytosin-Rezeptor-Familie (D'Andrea & Zon, 1990; Youssoufian et al., 1993). Ein Molekül Erythropoietin wird durch zwei homodimerisierte Rezeptormoleküle gebunden, wodurch zwei Signalwege aktiviert werden (Philo et al., 1996; Yoshimura & Misawa, 1998). Zum einen kommt es durch die Bindung zur Aktivierung der cytoplasmatischen, Nicht-Rezeptorprotein-Kinase JAK2 und dem *Downstream*-Signalprotein STAT5, zum anderen wird durch die Bindung die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3K) und damit die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (MAP-K) aktiviert (Barber et al., 2001; Constantinescu et al., 2001; Klingmuller, 1997; Remy et al., 1999; Tauchi et al., 1995; Witthuhn et al., 1993; Yoshimura & Misawa, 1998). Der Erythropoietin-Rezeptor wird auf der Oberfläche von Erythrocyten-Vorläuferzellen im Knochenmark expremiert, konnte aber auch in verschiedenen nicht-hämopoetischen Geweben wie vaskulären Endothelialzellen, Skelett-Myoblasten, Cardiomyoblasten, Neuronen, retinalen Photozellen, Leberzellen, Plazenta, Niere und Makrophagen nachgewiesen werden (Ammarguella et al., 1996; Anagnostou et al., 1994; Grimm et al., 2002; Haroon et al., 2003; Nagai et al., 2001; Ogilvie et al., 2000; Ohneda et al., 1993; Parsa et al., 2004; Westenfelder et al., 1999). Dieser Nachweis zeigt, dass Erythropoietin noch weitere Funktion außerhalb der Erythrocyten-Entwicklung haben muss. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Erythropoietin die Proliferation und Migration von Endothelialzellen steigert und Neovascularisierung induziert (Anagnostou et al., 1990; Carlini et al., 1995; Ribatti et al., 1999). *In vivo* bewirkt Erythropoietin in der glatten Muskulatur die Mobilisierung von Ca^{2+} , Aktivierung der Phospholipase C und eine Kontraktion (Gogusev et al., 1994; Morakkabati et al., 1996; Neusser et al., 1993). Ein weiterer Effekt in nicht-hämatopoetischem Gewebe ist die Inhibierung von Apoptose durch die Aktivierung des MAPK- und PI-3K/Akt-Signalwegs (Eefting et al., 2004; Wojchowski et al., 1999).

Außerdem konnten für Erythropoietin kardioprotektive Effekte gezeigt werden (Calvillo et al., 2003; Lipsic et al., 2004; Parsa et al., 2004).

1.3.2 Erythropoietin in Tumoren

Die Expression von Erythropoietin und seines Rezeptors konnte in verschiedenen Krebszelllinien und primären Tumoren schon gezeigt werden (Hardee et al., 2006). Dadurch bietet sich die Möglichkeit einer parakrinen oder autokrinen Wachstumsstimulation ausgelöst durch Erythropoietin. Es zeigte sich aber auch, dass es verschiedene Aspekte der Tumorbiologie modulieren kann wie Zellproliferation, Apoptoseverhalten und Sensitivität gegenüber Chemostrahlentherapie. Rekombinantes Erythropoietin wird oft bei der Behandlung von Tumorpatienten eingesetzt, da sich gezeigt hat, dass sich dadurch das Allgemeinbefinden verbessert (Demetri et al., 1998; Glaspy et al., 1997). Tumorpatienten leiden oftmals unter einer Anämie. Die Gabe von rekombinantem Erythropoietin konnte die Sauerstoffversorgung verbessern. Einige Studien zeigten jedoch auch negative Nebenwirkungen von rekombinantem Erythropoietin. So führte eine exogene Zugabe zu einer erhöhten Proliferation verschiedener Tumorzellen, zu einer erhöhten Invasivität von HNSCC und zu einem gesteigerten Wachstum sowie Angiogenese von Tumoren im weiblichen Genitaltrakt (Acs et al., 2001; Lai et al., 2005; Mohyeldin et al., 2005; Westenfelder & Baranowski, 2000; Yasuda et al., 2001). Auch zeigten einige Tumorzellen eine gesteigerte Expression antiapoptotischer Genen, eine erhöhte Sekretion proangiogenetischer Cytokine, die die Endothelial-Proliferation und die Chemotaxis fördern, und eine erhöhte Resistenz gegenüber Cisplatin und Strahlentherapie (Acs et al., 2003; Batra et al., 2003; Belenkov et al., 2004). Aber es konnten auch positive Wirkungen von rekombinantem Erythropoietin gefunden werden. Zum Beispiel wurde in einem präklinischen Myeloma-Modell durch die Zugabe von rekombinantem Erythropoietin eine antitumorale Immunantwort stimuliert (Mittelman et al., 2001). In humanen Nierentumoren zeigte eine Studie eine erhöhte Apoptoserate als Reaktion auf Daunorubicin und Vinblastin nach Behandlung mit rekombinantem Erythropoietin (Carvalho et al., 2005).

1.3.3 Regulation der Genexpression von Erythropoietin

Die beständige Produktion von Erythropoietin ist notwendig für die Aufrechterhaltung der täglichen Erneuerung der roten Blutzellen. Die Expression wird durch Hypoxie stimuliert. Da es drei nichtkodierende Regionen im Gen von Erythropoietin gibt, die zwischen Mensch und Maus hoch konserviert sind, wurde angenommen, dass ebendiese Regionen eine entscheidende Rolle in der Regulation der Transkription des Gens spielen. Diese Regionen waren der Promotor, das erste Intron und eine 120 bp lange Region 3' von der Polyadenylierungsstelle (Galson et al., 1993). Durch Untersuchungen in transgenen Mäusen wurden Bereiche gefunden, die für eine spezifische Expression in Leber und Niere verantwortlich sind (Kochling et al., 1998; Semenza et al., 1989). Im Promotor ist außerdem eine Sequenz zu finden, die bewirkt, dass die Expression in den meisten Geweben außer der Leber reprimiert wird (Semenza et al., 1990). Zwischen 2.2 und 7 kb 3' vom Gen ist ein spezifisches Negativregulierendes Leberelement lokalisiert (Madan et al., 1995).

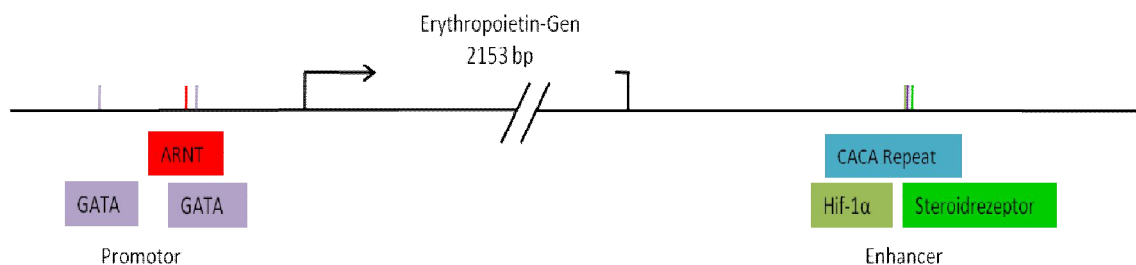


Abb.1.2 Erythropoietingen mit Promotor und Enhancer. Im Promotor sind die Interaktionssequenzen für GATA-Proteine (lila) und ARNT (rot) und im Enhancer die Interaktionssequenz für Hif-1 α (grau), der CACA-Repeat (blau) und die Bindestelle für den Steroidrezeptor (grün) lokalisiert.

Durch die Entdeckung von zwei Hepatoma-Zelllinien HepB3 und HepG2 wurde es möglich, putative Hypoxie-aktivierte regulatorische DNA-Sequenzen zu untersuchen (Goldberg et al., 1987; Nielsen et al., 1987). Es konnte ein Hypoxie-induzierbarer Enhancer 120 bp 3' von der EPO-Adenylierungsstelle gefunden werden (Beck et al., 1991; Pugh et al., 1991; Semenza et al., 1991a) (Abb. 1.2). In diesem Enhancer waren drei Sequenzen lokalisiert, die sich als wichtig für die Reaktion auf Hypoxie zeigten. Als erstes wurde am 5'-Ende die HIF-1 binding site (HBS) identifiziert (Abb.1.2). Über EMSA-Untersuchungen konnten zwei Komplexe gefunden werden, die in diesem

Bereich binden. Einer dieser Komplexe, HIF-1, wurde spezifisch nur unter Hypoxie gebunden (Semenza & Wang, 1992), für den anderen Komplex, der aus ATF-1 und CREB-1 besteht, konnte noch keine Funktion in der Hypoxie-abhängigen Expression gefunden werden. 7 Basenpaare 3' vom HBS folgt ein *CACA-Repeat*, der ebenfalls essenziell für die Hypoxie-induzierte Expression von Erythropoietin zu sein scheint (Huang & Bunn, 1995). Es konnte allerdings noch kein Protein gefunden werden, das an diesen *Repeat* bindet. Am 3'-Ende des minimalen Enhancers befindet sich ein durch zwei Basenpaare getrennter direkter *Repeat* von zwei Steroid-Rezeptor-Halbseiten, die bekannt dafür sind, den Kernrezeptor für Hormone zu binden (Blanchard et al., 1992). Allerdings hat keiner der bekannten Liganden einen Einfluss auf die Erythropoietin-Expression. Es konnte aber die spezifische Bindung des hepatocytären Kernfaktors 4 α (HNF4 α) nachgewiesen werden. Möglicherweise hat HNF4 α eine wichtige Rolle für die gewebsspezifische Expression (Galson et al., 1995b). Der Promotor von Erythropoietin selbst ist nur schwach induzierbar. Zusammen mit dem Enhancer kann er unter Hypoxie die Expression jedoch 50 – 100fach *in vitro* und bis zu 1000fach *in vitro* steigern (Blanchard et al., 1992; Jelkmann, 1992). Dies könnte über ARNT, das zusammen mit HIF-1 α , welches im Enhancer bindet, ein Heterodimer, den HIF-1-Komplex, formt, geschehen. Im Promotor existiert eine Interaktionssequenz für ARNT (Abb. 1.2). In einem weiteren postulierten Modell wird eine Bindung zwischen dem HNF4 α mit dem HIF-1-Komplex beschrieben. An diesen Komplex bindet unter Hypoxie CBP/p300 (Blanchard et al., 1992; Ebert & Bunn, 1999). P300 ist ein wichtiger Co-Aktivatoren von HIF-1 (Arany et al., 1996b). Zusätzlich konnten im Promotor zwei Interaktionsstellen für GATA-Proteine gefunden werden (Abb. 1.2). Eine Überexpression von GATA2 und GATA3 in HepB3 führte zu einer Repression der Erythropoietin-Expression (Imagawa et al., 1997). Dagegen wurde nach einer Überexpression von GATA4 eine Expressionssteigerung gefunden (Dame et al., 2004).

In zwei Veröffentlichungen wurde ein Zusammenhang zwischen Methylierungen im Promotor und Enhancer und einer Repression der Erythropoietin-Expression gezeigt (Wenger et al., 1998; Yin & Blanchard, 2000). Im Promotor sind viele CpGs zu finden, deren Methylierung die Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindert, zum Beispiel durch die Bindung von Methyl-CpG-bindenden Proteinen. Im Enhancer beinhaltet die Erkennungssequenz für HIF-1 ein CpG, dessen Methylierung eine Interaktion mit dem Komplex unterbindet (Wenger et al., 1998).

1.4 Zielsetzung

In Plattenepithelkarzinoma des Kopf und Halsbereiches (*Head and neck squamous cell carcinoma*=HNSCC) wurde häufig eine anormale Promotorhypermethylierung gefunden. Unter anderem wurde eine Methylierung der Promotoren der Tumorsuppressor-Gene p16, RASSF1A, MGMT, DAPK und CDH beschrieben (Calmon et al., 2007b; Maeda et al., 2007; Nayak et al., 2007; Ruesga et al., 2007; Zhang et al., 2006a; Zhang et al., 2006c). Im ersten Teil dieser Arbeit war es das Ziel zu untersuchen, inwieweit die Promotorhypermethylierung tumor-assoziiertes Gene mit klinischen Daten wie Alter oder Tumorstadium korreliert. Dafür wurde die Methylierung des Promotors verschiedener tumorassoziierter Gene mittels *Combined Bisulfite Restriction Analysis* oder *Methylation Specific PCR* analysiert, die in der Signaltransduktion (RASSFs), in Differenzierung (RAR β), in Zelladhäsion (CDH1), in Zellzyklus-Kontrolle (p16 und LATs) und Apoptose (DAPK1 und MSTs) involviert sind, und anschließend mit den klinisch-pathologischen Daten korreliert. Besonders von Interesse waren dabei die Proteine des Hippo-Signalwegs (RASSF, MSTs und LATs), da dieser in der Entstehung von Krebs immer mehr Bedeutung erlangt. Möglicherweise können die Ergebnisse dieser Arbeit zur Entwicklung neuer Biomarker für HNSCC führen.

Häufig werden HNSCC-Patienten mit rekombinantem Erythropoietin behandelt um das allgemeine Befinden zu verbessern (Demetri et al., 1998; Glaspy et al., 1997). Es zeigte sich jedoch auch, dass die Behandlung zu einer klinischen Verschlechterung führte (Henke et al., 2003). Aus diesem Grund war ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Untersuchung der Regulation und Funktion von Erythropoietin in HNSCC. Über die Regulation der Expression von Erythropoietin ist schon einiges bekannt. In dieser Arbeit sollte die epigenetische Regulierung von Erythropoietin analysiert werden, die erst in der letzten Zeit in den Fokus der Untersuchungen gerückt ist. Es sind keine Untersuchungen über den Methylierungsstatus in verschiedenen Geweben und Tumoren bekannt. Deshalb sollte auch der Methylierungsstatus sowohl des Promotors als auch des Enhancers von Erythropoietin in HNSCC und auch anderen primären Tumoren bzw. Tumorzelllinien analysiert werden. Mittels Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin und Luciferase-Assay sollte außerdem die Auswirkung der Methylierung untersucht werden. Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, ob eine Methylierung des

Promoters in Zusammenhang mit einer Modifizierung des Chromatins in diesem Bereich steht oder ob Hypoxie zu einer Veränderung des Chromatins führt.

Es war auch von Interesse für diese Arbeit, wie sich eine Reexpression von Erythropoietin in einer HNSCC-Zelllinie auswirkt, in der die Expression dieses Proteins reprimiert ist. Durch Zellzahlbestimmungen, einen Kolonie-Bildungs-Assay und einen Soft-Agar-Test sollten die transfizierten Zellen auf Veränderungen in Wachstum und Proliferation untersucht werden. Aus den Ergebnissen sind neue Aspekte in der Regulation und Funktion von Erythropoietin zu erwarten.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Agar	Difco
Agarose	SeaKern
Ampicillin	Sigma
Amylose Resin	NEB
Bactopepton	BD
Bactotrypton	Difco
Bactoyeastextract w/o aa	Difco
Borsäure	Roth
Bovin Serum Albumin	Serva
Bradford Reagenz	BioRad
Bromphenolblau	Sigma
Deoxycholic acid (Sodium Salt)	Sigma
Calciumchlorid	Merck
Chloroform	Merck
Complete Proteinaseinhibitormix	Roche
DAPI	Sigma
DEPC-Wasser	Roth
Eisessig	Merck

Ethanol	Merck/Roth
Ethidiumbromid	Merck
Ethylenediamin Tetraacetic Acid (EDTA)	Roth
Fetal Calf Serum (FCS)	PAA-Laboratories
Formaldehyd	Roth
Formamid	Serva
Geneticin (G418)	PAA-Laboratories
D-Glucose	Merck
Glycerol	Roth
Glycine HCl	Roth
Glycogen	Roche
Hydrochinon	Merck
N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethansulfonsäure (HEPES)	Roth
Iodonitrotetrazoliumchlorid (INT)	Fluka
Isopropanol	Roth
Isopropylthio- β -D-Galactosid (IPTG)	
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumhydrogensulfat	Merck
Kanamycin	Sigma
Lipofectamin 2000	Invitrogen
Magnesiumchlorid	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Roth
Natriumacetat	Merck
Natriumbisulfit	Roth

Natriumchlorid	Merck
Natriumhydrogencarbonat	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth
Nonidet P40 (NP 40)	Fluka
Orange G	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Gibco
Phenol	Merck
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Salzsäure	Merck
Tris HCl	USB
Triton X-100	Roth
Tween 20	Roth
X-Gal	Sigma
(S-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Galactosid)	
<i>2.1.2 Gebrauchswaren</i>	
Gewebekulturschalen	Sarstedt
Glaswaren	Schott
Handschuhe (Latex, Nitril)	Safeskin
Küvetten	Sarstedt
Parafilm®	American National Can™
Petrischalen	Sarstedt
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plastikwaren	Sarstedt, Greiner, Falcon

Skalpell	Sarstedt
Sterilfilter	Sarstedt

2.1.3 Geräte

Absaugpumpe	HLC
Autoklav	Schütt
Bilddokumentationssystem/Transilluminator	Herolab
Bilddokumentationsgerät DeVision G	Decon Science Tec GmbH
Blockthermostat	Kleinfeld Labortechnik
Elektrophoresesysteme	BioRad
Heizblock	Eppendorf
	Biometra
Inkubatoren	Heraeus
Kryostat	Heraeus
Mikroliterpipetten	Eppendorf
	Gilson
Mikroskop Leica DM IRB	Visitron Systems
pH-Meter, Typ CG810	HANNA instruments
Schüttelinkubator Innova 4000/4300	New Brunswick Scientific
Spannungsgeräte	Schütt
	BioRad
Sterilbank	Zapf
	Thermo Scientific
Thermocycler	Eppendorf
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge (Biofuge pico)	Hereaus
Ultraschallhomogenisator SONOPLUS	Merck
UV-Spektrometer	Amersham Pharmacia
Vortexer	Heidolph
	VWR International
Waagen:	
Feinwaage	Vicon

Grobe Waage	Vicon
Zentrifugen:	
Megafuge 1.0R	Hereaus
Unicen FR	Herolab
EBA 12 R	Hettich
3K20	Sigma
PICO 17	Heraeus
FRESCO 17	Heraeus

2.1.4 Lösungen und Puffer

Alle Lösungen und Puffer wurden mit Wasser aus dem *Milli-Q-Water-System* von Millipore hergestellt.

dNTP's	Ausgangskonzentration je 50 mM Endkonzentration 2,5 mM dATP 50 µl dCTP 50 µl dGTP 50 µl dTTP 50 µl Gesamtvolumen 800 µl
EDTA * 2 Na	0,5 M EDTA 0,2 M EDTA pH 8,0 mit NaOH einstellen
Hydrochinon-Lösung	0,1 M
NaAcetat	3 M NaAcetat pH 5,0 mit 100% iger Essigsäure einstellen

PBS (10x)	140 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,8 mM K ₂ HPO ₄ pH 7,3 autoklavieren
Proteinase K Puffer	50 mM Tris / HCl pH 7,6 25 mM EDTA * Na ₂ 0,5 % NP40 0,5 % SDS
RIPA-Puffer	1 x PBS 1 % NP40 0,5 % Sodiumdeoxycholate 0,1 % SDS
TBE-Puffer (10x, 1l)	121,1 g Tris-HCl 51,4 g Borsäure 3,7 g EDTA pH 8,5
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 7,4 – 7,6 autoklavieren
Tris-HCl	1 M Tris-HCl 2 M Tris-HCl pH 7,6 mit HCl einstellen 1,5 M Tris-HCl pH 8,8

2.1.4.1 Puffer für ChIP

SDS-Lysis-Puffer	1 % SDS 10 mM EDTA 50 mM Tris-HCl (pH 8.1)
<i>Dilution-Puffer</i>	0,01 % SDS 1,1 % Triton X-100 1,2 mM EDTA 16,7 mM Tris-HCl (pH 8,1) 167 mM NaCl
<i>Low-Salt-Puffer</i>	0,1 % SDS 1 % Triton X-100 2 mM EDTA 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) 150 mM NaCl
<i>High-Salt-Puffer</i>	0,1 % SDS 1 % Triton X-100 2 mM EDTA 20 mM Tris-HCl (pH 8.1) 500 mM NaCl
LiCl-Puffer	0,25 M LiCl 1 % NP40 1 % Deoxycholate 1 mM EDTA 10 mM Tris-HCl (pH 8.1)
Elution-Puffer	1 % SDS 0,1 M NaHCO ₃

2.1.4.2 Antibiotika-Lösungen (in H₂O)

Ampicillin	50 mg/ml
Kanamycin	10 mg/ml

2.1.4.3 Ladepuffer

DNA-Ladepuffer I	45 % Sucrose
	20 mM Tris-HCl (pH 7,6)
	50 mM EDTA
	0,25 % Bromphenolblau
	0,25 % Xylen Cyanol

DNA Ladepuffer II	45 % Saccharose
	20 mM Tris-HCl (pH 7,6)
	50 mM EDTA
	0,5 % Orange G

2.1.5 Molekulargewichtsstandards2.1.5.1 DNA Längenstandards

Gene Ruler ^{RT} 100 bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas
Gene Ruler ^{RT} 1kb DNA Ladder Plus	MBI Fermentas

2.1.6 Medien2.1.6.1 Für Bakterien

LB-Medium (1 l)	10 g Bactotrypton
	5 g Hefeextrakt
	5 g NaCl
	1 g D-Glucose
	(15 g Agar für Platten)

Nach dem Autoklavieren und dem Abkühlen auf unter 60°C wird dem Medium das zur Selektion benötigte Antibiotikum zugefügt.

Ampicillin mit einer Endkonzentration von 60 µg/ml

Kanamycin mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml

NYZ ⁺ -Medium (1 l)	10 g NZ Amin (Caseinhydrolysat)
	5 g Hefeextrakt
	5 g NaCl
	4 g Glucose
	pH 7,5 (mit NaOH)

Nach dem Autoklavieren sind folgende Lösungen steril hinzuzufügen:

12,5 ml 1 M MgCl₂

12,5 ml 1 M MgSO₄

SOB-Medium (1 l)	20 g Baktotrypton
	5 g Baktohefeextrakt
	0,5 g NaCl
	10 ml 250 mM KCl

Nach dem Autoklavieren ist folgende Lösung steril hinzu zufügen:

5 ml 2 M MgCl₂

SOC-Medium	SOB-Medium
	20 mM Glucose

2.1.6.2 Für Humane Zellen

DMEM	Biochrom AG
RPMI	Biochrom AG

Den Medien werden vor Verwendung 10 % FCS und 1 % APS steril zugefügt um ein optimales Wachstum und den Schutz vor Bakterienbefall zu gewährleisten.

2.1.7 Enzyme

<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)</i>	MBI Fermentas
Fast Start Taq Polymerase (5 U/ μ l)	Roche
M-MLV Reverse Transkriptase (200 U/ μ l)	Promega
Pfu Polymerase	Invitak
Proteinase K	Promega
Restriktionsendonucleasen (10000/20000 U/ μ l)	New England Biolabs
RNaseA (1 mg/ml)	Roche
RNasin (40 U/ μ l)	Promega
Sss I Methylase (4 U/ μ l)	New England BioLabs
T4 DNA Ligase (3U/ μ l)	MBI Fermentas
Taq Polymerase (5U/ μ l)	Invitak
Trypsin 0,5% / EDTA 0,2% (in 10-fach PBS)	Biochrom AG

2.1.8 Sterilisation/ Autoklavierung von Lösungen und Geräten

Alle Lösungen und Geräte, die hitzestabil sind, wurden bei 120°C und 10⁵ Pascal für 15 bis 20 Minuten mit heißem Dampf autoklaviert.

Lösungen, die hitzeempfindliche Chemikalien enthalten, wurden steril filtriert. Die Porengröße des Filters beträgt 0,22 μ m.

2.1.9 Verwendete vorgefertigte Systeme

Dual-Luciferase® Reporter Assay	Promega
Gel Extractions Kit	Qiagen
NucleoSpin® Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel
pGEM T-Easy Vector System	Promega
QuickChange® XL Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Wizard DNA Clean-UP System	Promega

2.1.10 Antikörper

Anti-H3 (ab1791)	Abcam
Anti-AcH3 (06-599)	Upstate
Anti-tMK9H3 (ab8898)	Abcam
Salmon sperm DNA/Protein A Agarose	Upstate

2.1.11 Primer

2.1.11.1 Primer für MSP

Tabelle 2.1: Primer für MSP

Gen	Sequenz	Produktlänge
RASSF1A	M: GTGTTAACGCGTTGCGTATC AACCCCGCGAACTAAAAACGA	94 bp
	U: TTTGGTTGGAGTGTGTTAATGTG CAAACCCACAACTAAAAACAA	108 bp
p16 ^{INK4A}	M: TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC GACCCCGAACCGCGACCGTAA	150 bp
	U: TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT CAACCCCAAACCACAACCATAA	151 bp
MGMT	M: TTTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC GCACTCTTCCGAAAACGAAACG	81 bp
	U: TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA	93bp
DAPK1	M: GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC CCCTCCCAAACGCCGA	98 bp
	U: GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT CAAATCCCTCCCAAACACCAA	106 bp
RAR β	M: TCGAGAACGCGAGCGATTTCG GACCAATCCAACCGAAACGA	146 bp
	U: TTGAGAATGTGAGTGATTGTA AACCAATCCAACCAAAAACAA	146 bp
MLH1	M: ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCGC CCTCATCGTAACTACCCGCG	115 bp
	U: TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT CACAACCAATCAACAACACA	124 bp

Material und Methoden

CDH1	M: TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT TAACTAAAAATTCACCTACCGAC	204 bp
	U: TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT CACAACCAATCAACAACACA	210 bp
GSTP1	M: TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC GCCCAATACTAAATCACGACG	91 bp
	U: GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT CCACCCAATACTAAATCACAACA	97 bp
RASSF5	M: CGTCGTTTGGTACGGATTTTATTTTTTTTCGGTTC GACAACCTTAACAACGACGACTTTAACGACTACG	202 bp
	U: ATTTATATTTGTGTAGATGTTGTTTGGTAT ACTTTAACAACAACAACCTTTAACAACACTACA	215 bp
MST1	M: GCGGGGCGGGTTTAGGAGGTTCC CCAATAACCCCTCACCGACGCG	120 bp
	U: TTTGTGGGGTGGGTTTAGGAGGTTTGT AACCAATAACCCCTCACCAACACAACAA	125 bp
MST2	M: CGGGAGGGAGATTCGTCGCG AAACCGAAACACCGACCGACCG	99 bp
	U: TTTTAAGTGGGAGGGAGATTTGTTGTGG AAAAACCAAACACCAACCAACCAAACC	108 bp
LATS1	M: GAACGATTAGAGTTGCGGGCGAC TGAATGATTAGAGTTGTGGGTGATGT	126 bp
	U: AACATTTCCCGACGTCGCTTACG AACATTTCCCAACATCACTTACACA	128 bp
LATS2	M: TTCGTTCCGATTGGTATGCGGTC CCATCTTCCCGAAACGCTCACG	137 bp
	U: GGTGTTTTGTTTGGATTGGTATGTGGTT CATCTTCCCAAAACACTCACACCACA	141 bp

M: methylierungsspezifischer Primer; U: unmethylierungsspezifischer Primer

2.1.11.2 Primer für COBRA

Tabelle 2.2: Primer für COBRA

Gen	Sequenz	Produkt länge	Restriktion senzym
RASSF2	F: GGTGTAGGGTTGGGGAGGGTTTGGAT	220 bp	BstU1
	R1: AACAAAACCCCTCAATCTCCCTATAAAACCA		
	R2: CCAACGACCTCAAACACCAACTCC		

Material und Methoden

RASSF4	F: GTAGCGGTTTTTGTGGGAAGTTTAGGAGTT R: AGTTGAATAATGGTTTGGGGATATTTGGT	174 bp	BstU1
EPO upstream Promotor	F1: GTTTTTGGGTTTTTAGATTTAGTTATTTTG F2: GGGATGTTTTTTAGGGGAGGTGTT R: AATCRCCAAAATAAAAACCACCC	230 bp	HpyCH4IV BstU1
EPO ARNT	F: ATTTYGGGTGGTTTTTATTTTTGG R: ACCRAAATAACCCAAAACCTCTAC	133 bp	BSTU1
EPO Enhancer	F1: TGATTTTTGGTTTTTTGTTTTTTGGGAAT R1: GGGTGGAGGGGGTTGGGTTTTA R2: CAACCTTACCCTAAACAAAATTAACAACCTAC	165 bp	HpyCH4IV TaqI

F: Forward Primer; R: Reverse Primer

2.1.11.3 Primer für Klonierung

Tabelle 2.3: Primer für Klonierung

Primer	Sequenz	Produktlänge
EPO-LuPro	F: GAAGATCTGCGGAACTCAGCAACCCAGGCATCT mit BglIII-Schnittstelle R: CCCAAGCTTCGGGAGGACAGCGCGGTGCGGC mit HindIII-Schnittstelle	426 bp
EPO-LuEnh	F: GGATCCTGTCCCACTCCTGGCAGCAGTG mit BamHI-Schnittstelle R: GGCTCCATTCAAGGCCTCACCGGATCC mit BamHI-Schnittstelle	185 bp
EPO-cDNA	F: AGATCTTGATGGGGGTGCACGAATGTCCTG R: TGGTGGATATGCCAGGTCGACACAC	614 bp

F: Forward Primer; R: Reverse Primer

2.1.11.4 Primer für RealTime-PCR

Tabelle 2.5: Primer für RealTime-PCR

Gen	Sequenz	Produktlänge
EPO	F: TGGGAGCCCAGAAGGAAGCCA R: TGGTCATCTGTCCCCTGTCTCTGC	170 bp
EPOR	F: TCCCGAGCCCAGAGAGCGAGTT R: CCCCAGCAGCGCTCTGAGAG	163 bp

Material und Methoden

Hif1 α	F: TCGGACAGCCTCACCAAACAGAGC R: CATCCATTGATTGCCCCAGCAGTC	374 bp
CA IX	F: GGGTGTCTATCTGGACTGTGTT R: CTTCTGTGCTGCCTTCTCATC	309 bp
GAPDH	F: TGGAGAAGGCTGGGGCTCAT R: GACCTTGCCAGGGGTGCTA	176 bp

F: Forward Primer; R: Reverse Primer

2.1.11.4 Primer für ChIP

Tabelle 2.4:Primer für ChIP

Fragment	Sequenz	Produktlänge
Promotor ChIP1	F: AGCAGCCCCCATGACCCACAC R: CGGGGGTCGGGGCTGTTATCT	149 bp
Enhancer ChIP2	F: CTGTCCCACTCCTGGCAGCAGTG R: GCGGTGAGGCCTTGAATGGAGAC	177 bp

F: Forward Primer; R: Reverse Primer

*2.1.12 Art und Herkunft des verwendeten Probenmaterials*2.1.12.1 Bakterienstämme

<i>E. coli</i>	DH5 α XL10-Gold®Ultracompetent Cells (Stratagene)
----------------	--

2.1.12.2 Humane Zelllinien

A549	Nicht-Kleinzell- Lungenkrebszelllinie
HCC15	Lungenkrebszelllinie
SK-HES	Lungenkrebszelllinie
DV50	Lungenkrebszelllinie
CRL 5886	Kleinzell-Lungenkrebszelllinie
H358	Bronchialkarzinom-Zelllinie
T47D	Brustkrebszelllinie

ZR75-1	Brustkrebszelllinie
AD293	Brustkrebszelllinie
MDA 231	Brustkrebszelllinie
RPMI 2650	HNSCC-Zelllinie
Hep2	HNSCC-Zelllinie
HNSCC-14C	HNSCC-Zelllinie
MZ1257	Nierenkarzinom-Zelllinie
MZ1774	Nierenkarzinom-Zelllinie
MZ1790	Nierenkarzinom-Zelllinie
MZ1846	Nierenkarzinom-Zelllinie
MZ1851	Nierenkarzinom-Zelllinie
MZ1973	Nierenkarzinom-Zelllinie
MZ2175	Nierenkarzinom-Zelllinie
MZ2789	Nierenkarzinom-Zelllinie
MZ2861	Nierenkarzinom-Zelllinie
MZ2865	Nierenkarzinom-Zelllinie
MZ2877	Nierenkarzinom-Zelllinie
MZ2885	Nierenkarzinom-Zelllinie
MZ2905	Nierenkarzinom-Zelllinie
MZ2931	Nierenkarzinom-Zelllinie
HUP-T3	Pankreaskrebszelllinie
PATU-S	Pankreaskrebszelllinie
FTC -ZL238	Humane follikuläre Schilddrüsenkrebszelllinie
HeLa S3	Gebärmutterhalskrebszelllinie
Hep B3	Leberkrebszelllinie
HF53	Humane Fibroblasten-Zelllinie
HT29	Kolonkarzinom-Zelllinie

2.1.12.3 cDNA aus Gewebe

Human MTC™ Panel I Clontech

2.1.12.4 VektorenFluoreszenzvektoren, *enhanced*

pECFP-C2 (Clontech)

Cyan-Fluoreszenzvektor

Expressionsvektoren

pCMV-FLAG (Stratagene)

Expressionsvektor für FLAG-Fusionsproteine in tierischen Zellen

Klonierungsvektoren

pGEM-T (Promega)

linearisierter Vektoren mit einem T-Überhang zur Klonierung von PCR-Fragmenten mit einem A-Überhang

pT-Adv (Clontech)

Vektoren für Luciferase (Promega)

pRL-Null

Vektor mit Reportergen für *Renilla* Luziferase

pGL3.1

Vektor mit Reportergen für Firefly Luziferase

2.1.12.5 Patientenproben von Plattenzellkarzinoma im Kopf-Hals-Bereich

Die Proben wurden von Patienten der HNO-Klinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg chirurgisch entnommen und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurden 54 Plattenzellkarzinoma aus dem Kopf-Hals-Bereich und 23 korrespondierende Normalgewebe aus der Wangenschleimhaut verschiedener Patienten verwendet. Ein positives Votum der örtlichen Ethik-Kommission lag vor. Die Tumorproben wurden nach der aktuellen TNM-Klassifikation eingeteilt (Wittekind et al., 2002).

Tabelle 2.6: Demographische Daten der Patienten mit HNSCC

	n	%
Anzahl der Patienten	54	
Durchschnittliches Alter (Jahre)	57 (41-77)	
Lokalisation des HNSCC		
Larynx	20	37,0
Hypopharynx	8	14,8
Oropharynx	18	33,3
Zunge	8	14,8
Tumorstadium		
I	4	7,4
II	0	0
III	12	22,2
IV	38	70,4
TNM-Klassifizierung		
T1	9	16,7
T2	8	14,8
T3	23	42,6
T4	14	25,9
Regionale Lymphknoten		
N0	12	22,2
N1	7	12,9
N2	28	51,9
N3	7	12,9
Differenzierung		
gut differenziert	7	12,9
schlecht differenziert	32	59,3
undifferenziert	15	27,8

2.2 Methoden

2.2.1 Methylierungsanalysen

2.2.1.1 Isolierung von genomischer DNA aus Gewebe

Um die genomische DNA aus Gewebeproben zu isolieren, wurden die Gewebeproben, die bis dahin bei -80°C gelagert wurden, auf einem Trockeneisblock mit einem Skalpell zerkleinert. Anschließend wurde die Probe in $400\ \mu\text{l}$ Proteinase K Puffer aufgenommen und mit $15\ \mu\text{l}$ Proteinase K ($20\ \text{mg/ml}$ in TE-Puffer) über Nacht bei 56°C verdaut. Die Aufreinigung erfolgte wie unter 2.2.2.8 beschrieben.

2.2.1.2 Bisulfit-Behandlung der DNA

Um die Promotormethylierung von Genen zu untersuchen, wurde die DNA im ersten Schritt mit Natrium-Bisulfit behandelt. Dabei werden die Cytosine zu Urazilen deaminiert (Abb. 2.1) und in einer nachfolgenden PCR durch Thyminen ersetzt. 5-Methyl-cytosine sind vor dieser Behandlung geschützt und bleiben in der nachfolgenden PCR als Cytosine erhalten.

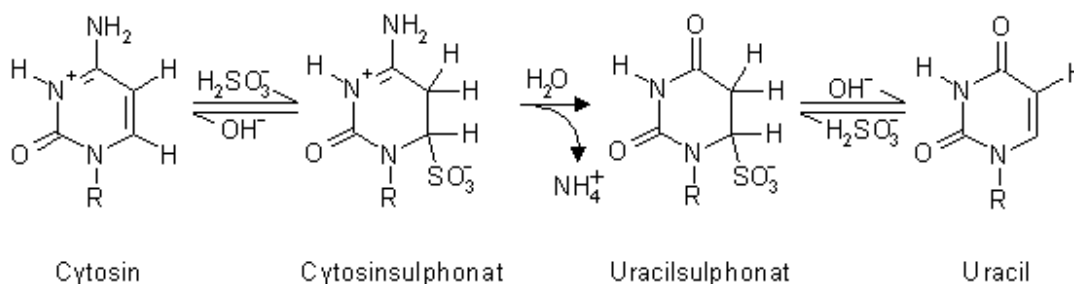


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Umwandlung des Cytosins zum Uracil während der Natrium-Bisulfit Behandlung. Nach der Sulphonierung des Cytosins zum Cytosinsulfat erfolgte dessen Deaminierung zum Uracilsulphonat, von dem im Anschluss die Sulphonsäuregruppe hydrolytisch abgespalten wurde (Darstellung entnommen aus Diplomarbeit S. Kirsch, 2005, AG Dammann).

Zur Behandlung der DNA-Proben mit Natrium-Bisulfit wurden $2\ \mu\text{g}$ DNA in $18\ \mu\text{l}$ TE-Puffer mit $2\ \mu\text{l}$ $3\ \text{M}$ NaOH (Endkonzentration $0,3\ \text{M}$) versetzt und für $15\ \text{min}$ bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden $208\ \mu\text{l}$ $3,6\ \text{M}$ Natrium-Bisulfit-Lösung ($\text{pH}\ 5,5$) und

12 µl 0,1 M Hydroquinone-Lösung zugegeben. Es folgte eine Inkubation für ca. 16 h bei 55°C. Die Aufreinigung erfolgte mit dem Wizard DNA Clean-Up System von Promega. Dabei wurden die Proben mit 1 ml DNA Clean-Up *Resin* gemischt, wobei die DNA an das *Resin* bindet, und auf die Säulen gegeben. Nach dem Absaugen der restlichen Lösung durch Vakuum wurde die gebundene DNA zweimal mit je 1 ml 80 % Isopropanol gewaschen. Im Anschluss wurde die Probe nochmals 2 min bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert, um den Flüssigkeitsrest zu beseitigen. Die Elution der aufgereinigten DNA erfolgte durch eine einminütige Inkubation mit 50 µl auf ca 60°C vorgewärmten destilliertem Wasser und einer Zentrifugation von 30 sec bei maximaler Geschwindigkeit. Danach wurden die DNA nochmals mit 5 µl 3 M NaOH für 10 min bei 37°C inkubiert. Das führte zu einer Abspaltung der Sulphonsäuregruppe vom 5'-C-Atom des Uracil. Anschließend folgte die Fällung der DNA durch die Zugabe von 1 µg Glycogen, 7,5 µl Ammoniumacetat und 275 µl 96 % EtOH. Die Proben wurden 10 min bei -20°C belassen und dann bei 13000 rpm für 10 min abzentrifugiert. Das DNA Pellet wurde nochmals mit 70 % EtOH gewaschen und nach der Trocknung in 30 µl H₂O aufgenommen.

Zum Nachweis der methylierten Cytosine und der zu Thyminen umgewandelten Cytidine wurden unterschiedliche Methoden wie Bisulfit-Sequenzierung, Combined Bisulfit Restriction Analysis und Methylation Specific PCR verwendet.

2.2.1.3 Combined Bisulfit Restriction Analysis (COBRA)

Bei der *Combined Bisulfit Restriction Analysis* wird die mit Natrium-Bisulfit behandelte DNA mit Primern, die spezifisch an den zu untersuchenden Promotorbereich binden, amplifiziert und anschließend mit Restriktionsenzymen geschnitten, die ein CpG in ihrer Erkennungssequenz (Palindrom) besitzen. War das Cytosin in der Sequenz nicht methyliert, wurde es während der Bisulfit-Behandlung und der anschließenden PCR durch ein Thymin ersetzt, die Erkennungssequenz ist verändert und das Enzym kann nicht mehr schneiden. War das Cytosin dagegen methyliert, blieb es während der Behandlung erhalten und die Sequenz wurde während der anschließenden Restriktion geschnitten.

Für die Restriktion wurden ca. 50 ng des PCR-Produktes (je nach Stärke der Bande des PCR-Produkts im Kontrollgel) mit 20 U des entsprechenden Restriktionsenzymes in einem 10 µl Ansatz für 2 h bei der für das Enzym vorgeschriebenen

Inkubationstemperatur verdaut. Anschließend wurde der gesamte Ansatz auf einem Agarosegel aufgetragen. Zur Kontrolle wurden ebenfalls 50 ng des unverdauten PCR-Produktes aufgetragen.

2.2.1.4 Methylation Specific PCR (MSP)

Bei der *Methylation Specific PCR* wurden mit der mit Natrium-Bisulfit behandelten DNA zwei unterschiedliche PCRs durchgeführt. Bei der ersten PCR wurde die DNA mit Primern amplifiziert, die spezifisch an den methylierten Promotorbereich des untersuchten Gens binden. Für die zweite PCR wurden Primer verwendet, die spezifisch für den unmethylierten Promotor sind. Die PCR-Produkte wurden anschließend auf einem Agarosegel sichtbar gemacht.

2.2.1.5 Bisulfit-Sequenzierung

Für die Bisulfit-Sequenzierung wurde der zu untersuchende Promotorbereich der mit Natrium-Bisulfit behandelten DNA mittels PCR amplifiziert und über in den pGEM-T-Easy Vektor der Firma Promega kloniert. Das entstandene Plasmid wurde in *E. coli* vervielfältigt und der Miniprep zur Sequenzierung zu SeqLab (Göttingen) geschickt.

2.2.1.6 In vitro DNA Methylierung

Für die Methylierungsuntersuchungen war es notwendig, eine Positivkontrolle herzustellen. Dafür wurde HeLaS3-DNA verwendet, die *in vitro* methyliert wurde. Dabei wurde das Enzym Sss I Methylase verwendet, das die Methylierung von CpGs in Dinukleotiden am 5'-Kohlenstoffatom katalysiert.

Für die Reaktion wurden 5 µg DNA in dem entsprechenden Puffer mit 4 µl Sss I Methylase (4 U/µl) und 1 µl S-Adenosylmethionin (200 x) in einem Gesamtvolumen von 20 µl über Nacht bei 37°C inkubiert. Da das S-Adenosylmethionin sehr instabil ist, wurde am nächsten Tag nochmals 1 µl S-Adenosylmethionin hinzu pipettiert und der Ansatz für eine weitere Stunde inkubiert. Im Anschluss folgte die Aufreinigung der methylierten DNA durch eine Gelextraktion (siehe 2.2.2.11). Die Elution erfolgte in 50 µl Ampuwa.

2.2.2 Herstellung der verwendeten Konstrukte

Tabelle 2.7: Herstellung der Konstrukte

Konstrukt	Herstellung	Verwendung
pRL-EPOPro (Promotor)	<ul style="list-style-type: none"> - PCR mit Primern EPO-LuProF/EPO-LuProR zur Amplifikation des Promotorbereichs von EPO mit ARNT-Interaktionssequenz aus der Zelllinie HepB3 mit Schnittstellen 5' BglIII und 3' HindIII - Ligation des Promotor-Fragments mit pGEM-T und nach Klonierung Blau/Weiß-Selektion - Restriktion des Promotor-Fragments mit BglIII und HindIII - Linearisierung des Luciferase-Vektors pRL-Null mit BglIII und HindIII - Ligation des Promotor-Fragments mit dem linearisierten Vektor pRL-Null 	Luciferase-Assay
pRL-EPOEnh (Enhancer)	<ul style="list-style-type: none"> - PCR mit Primern EPO-LuEnhF/EPO-LuEnhR zur Amplifikation des Enhancerbereichs von EPO mit Hif1α-Interaktionssequenz aus der Zelllinie HepB3 mit Schnittstellen 5' BamHI und 3' BamHI - Ligation des Promotor-Fragments mit pT-Adv und nach Klonierung Blau/Weiß-Selektion - Restriktion des Enhancer-Fragments mit BamHI - Linearisierung des Luciferase-Vektors pRL-Null mit BamHI - Dephosphorylierung des linearisierten Vektors - Ligation des Enhancer-Fragments mit dem linearisierten Vektor pRL-Null 	Luciferase-Assay

pRL-EPOProEnh (Promotor und Enhancer)	<ul style="list-style-type: none"> - PCR mit Primern EPO-LuEnhF/EPO-LuEnhR zur Amplifikation des Enhancerbereichs von EPO mit Hif1α-Interaktionssequenz aus der Zelllinie HepB3 mit Schnittstellen 5' BamHI und 3' BamHI - Ligation des Promotor-Fragments mit pT-Adv und nach Klonierung Blau/Weiß-Selektion - Restriktion des Enhancer-Fragments mit BamHI - Linearisierung des Luciferase-Vektors pRL-EPOPro mit BamHI - Dephosphorylierung des linearisierten Vektors - Ligation des Enhancer-Fragments mit dem linearisierten Vektor pRL-EPOPro 	Luciferase-Assay
pCMV-Flag-EPO	<ul style="list-style-type: none"> - PCR mit Primern EPO-cDNAF/EPO-cDNAR zur Amplifikation der cDNA von EPO aus der cDNA von Nierengewebe - Ligation der cDNA mit pT-Adv und nach Klonierung Blau/Weiß-Selektion - Restriktion cDNA mit EcoRI - Linearisierung des Vektors pCMV-Flag mit EcoRI (Schnittstelle wurde von A. Richter (AG Prof. Dammann) durch Mutagenese in den Vektor eingefügt) - Dephosphorylierung des linearisierten Vektors - Ligation der cDNA mit dem linearisierten Vektor pCMV-Flag 	Reexpressionsuntersuchungen
pECFP-EPO	<ul style="list-style-type: none"> - PCR mit Primern EPO-cDNAF/EPO-cDNAR zur Amplifikation der cDNA von EPO aus der cDNA von Nierengewebe - Ligation der cDNA mit pT-Adv und nach Klonierung Blau/Weiß-Selektion 	Lokalisationsuntersuchungen

- Restriktion cDNA mit EcoRI
 - Linearisierung des Vektors pECFP mit EcoRI
 - Dephosphorylierung des linearisierten Vektors
 - Ligation der cDNA mit dem linearisierten Vektor pECFP
-

2.2.2.1 Restriktion

Für die Restriktion wurden in einem 50 µl-Ansatz 8- 10 µg Vektor mit 100 U des/der jeweiligen Enzym(e) 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die genauen Restriktionsbedingungen wurden dem Katalog von New England Biolabs entnommen. Die Vollständigkeit der Restriktion wurde über ein einprozentiges Agarosegel kontrolliert.

Die Aufreinigung des gewünschten Fragments oder linearisierten Vektors erfolgte durch die Auftragung des gesamten Ansatzes auf ein präparatives Gel und eine darauf folgende Gelextraktion oder eine Phenol/Chloroform/Isopropanol-Extraktion und eine anschließende Natriumacetat-Fällung.

2.2.2.2 Polymerase Kettenreaktion

Eine Polymerase Kettenreaktion (PCR) dient der Amplifizierung eines bestimmten DNA-Fragments. In dieser Arbeit wurde die PCR unter anderem eingesetzt, um Fragmente zu amplifizieren, die anschließend in Vektoren eingefügt werden sollten. Über die eingesetzten Primer können Schnittstellen in das PCR-Produkt eingeführt werden, über die dann in einer folgenden Restriktion ein Fragment mit definierten Enden erhalten werden kann. Desweiteren wurden PCRs für die Methylierungsuntersuchungen (COBRA und MSP, siehe 2.2.1.3 und 2.2.1.4), den Nachweis der Vektoren in stabilen Klonen und für den Nachweis der Expression verschiedener Gene verwendet (RealTime-PCR, siehe 2.2.9).

Für die PCR wurden 100-200 ng genom. DNA/Bisulfit-DNA/cDNA oder 0,5 pg Plasmid-DNA, 1 pmol der jeweiligen Primer, der entsprechende Puffer für die eingesetzte Polymerase, 2 µl 2,5 mM dNTPs und 0,5 µl Polymerase in 25 µl Gesamtvolumen eingesetzt. Je nach Anforderungen der PCR war noch eine Zugabe von 0,75 µl – 1,5 µl 50 mM MgCl₂ oder 0,5 µl – 1,0 µl Formamid vonnöten. Für die

Amplifikation wurde die Template-DNA zunächst bei 95°C denaturiert. Anschließend folgte ein Zyklus, der aus einer kurzen Denaturierungsphase bei 95°C, dem Annealing der Primer bei der für sie optimalen Temperatur und der Elongation bei 72°C (1000 bp/min) bestand. Dieser Zyklus wurde 25 – 35mal wiederholt.

In einigen Fällen war ein Hotstart notwendig, um Nebenprodukte zu eliminieren. Dabei wird dem Ansatz H₂O und Polymerase erst nach dem Denaturierungsschritt zupipettiert. Außerdem war es bei einigen PCRs für die Methylierungsuntersuchungen erforderlich, diese semi-nested durchzuführen. Dabei folgt auf die erste PCR eine zweite, bei der ein Primer erhalten bleibt, während der zweite durch einen weiter innen liegenden Primer ersetzt wird. Das führte zu einer erhöhten Ausbeute des gewünschten PCR-Produktes und zu einer Beseitigung unerwünschter Nebenprodukte.

2.2.2.3 Dephosphorylierung

Mit der Dephosphorylierung des linearisierten Vektors sollte verhindert werden, dass sich dieser in der anschließenden Ligation religiert ohne das Insert aufgenommen zu haben.

Für die Behandlung mit der CIAP wurde der Vektor durch eine NaAc-Fällung aufgereinigt. Für die Dephosphorylierung wurde die gefällte DNA in 90 µl H₂O gelöst, 10 µl 10 x CIAP-Puffer zugegeben und mit 1,5 U CIAP-Enzym 15 bis 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz kurz auf Eis abgekühlt. Die Aufreinigung der dephosphorylierten DNA erfolgte durch eine Phenol/Chloroform/Isopropanol-Extraktion, eine nachfolgende Chloroform-Extraktion und eine Natriumacetat-Fällung. Das DNA-Pellet wurde in 50 µl H₂O aufgenommen und die Konzentration über ein 1%iges Agarosegel abgeschätzt.

2.2.2.4 Ligation

Bei der Ligation wird das Insert mit dem linearisierten Vektor verbunden. In einem 10 µl-Ansatz wurden ungefähr 25 ng linearisierter Vektor und die fünffache Menge an Insert mit 1 µl Ligase inkubiert. Der eingesetzte 10 x Ligasepuffer enthält das für die Reaktion notwendige ATP. Die Inkubation erfolgte für 4 Stunden bis über Nacht bei Raumtemperatur.

2.2.2.5 Transformation

Um das gewünschte Plasmid zu vervielfältigen oder für die Expression des auf dem Plasmid liegenden Gens musste das Plasmid in Bakterienzellen, vorzugsweise *E. coli*, transformiert werden. Für eine spätere Selektion kodierten alle verwendeten Plasmide für eine Antibiotikaresistenz. Die Transformation wurde durch Hitzeschock durchgeführt. 5-10 µl des Ligationsansatz wurden vorsichtig unter 250 µl chemokompetente Zellen gemischt und der Ansatz 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 70 Sekunden. Anschließend wurden die Zellen auf Eis kurz heruntergekühlt und 800 µl vorgewärmtes NZY⁺-Medium zugegeben. Nach einer Inkubation für eine Stunde bei 37°C wurde der gesamte Ansatz auf einer LB-Platte mit dem entsprechenden selektierenden Antibiotika-Zusatz ausplattiert. Die Platten wurden dann ebenfalls bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert.

Mittels einer Blau/Weiß-Selektion konnte während der Transformation der Erfolg der Klonierung der pGEM-T Easy-Konstrukte kontrolliert werden. Bei Verwendung des pGEM-T Easy-Vektors wird durch die Klonierung das LacZ'-Gen zerstört, welches für das N-terminale α -Fragment der β -Galactosidase kodiert. Werden die transfizierten Bakterien anschließend auf einem Medium ausplattiert, auf welchem zuvor 100 µl 2 % X-Gal und 10 µl 0,5 M IPTG ausgestrichen wurden, bleiben die resultierenden Kolonien weiß. Schließt sich der Vektor ohne die cDNA aufgenommen zu haben, kann die Galactosidase komplettiert werden und die Kolonien färben sich blau.

2.2.2.6 Isolation des Plasmids (Mini- bzw. Maxiprep)

Die Isolierung des Plasmids erfolgte mit dem Miniprep-Kit oder dem Maxiprep-Kit von Macherey-Nagel. Die Vorgehensweise ist der Vorschrift für das jeweilige Kit zu entnehmen. Die Qualität und die Quantität der isolierten Plasmide wurde über ein 1%iges Agarosegel und eine photometrische DNA-Bestimmung kontrolliert.

2.2.2.7 Sequenzierung

Die Sequenzierungen wurden bei SeqLab (Göttingen) durchgeführt.

2.2.2.8 Phenol/Chloroform/Isopropanol- Extraktion von DNA

Diese Extraktion ist eine Möglichkeit, eine DNA-Lösung von Proteinen wie beispielsweise Enzymen zu reinigen. Dazu wurde zu der Lösung die doppelte Menge an Phenol/Chloroform/Isopropanol zugegeben und gut gemischt. Die Mischung wurde dann 3 Minuten abzentrifugiert und die obere Phase in ein neues Gefäß überführt. Zu dieser Lösung wurde nochmals 1 Volumen Chloroform zugegeben, wiederum gut gemischt, abzentrifugiert und die obere Phase in ein neues Gefäß überführt.

2.2.2.9 Alkohol-Fällung von DNA

Die Alkohol-Fällung wird dazu genutzt, DNA aufzureinigen oder zu konzentrieren. Dafür gibt es verschiedene Möglichkeiten. Eine Variante ist, ein Salz, zum Beispiel Natriumacetat oder Ammoniumacetat, in einer Endkonzentration von 0,3 M und das zweieinhalbfache Volumen an 96%igem Ethanol zu der Lösung zuzugeben. Eine andere Möglichkeit ist die Zugabe von 0,6 bis 1 Volumen Isopropanol. Beide Mischungen sollten eine Weile auf Eis inkubiert und dann bei 4°C abzentrifugiert werden. Das Pellet wurde danach mit 70%igen Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem entsprechenden Volumen H₂O aufgenommen.

2.2.2.10 Gelelektrophorese von DNA/RNA

Bei der Gelelektrophorese werden die RNA- oder DNA-Moleküle in dem Agarosegel anhand ihrer unterschiedlichen Größe aufgetrennt. Für Fragmente von 500-5000 bp wurden 1%ige Gele, für kleine Fragment(<500 bp) 2%ige Gele verwendet. Als Elektrophoresepuffer diente 1 x TBE. Die Banden der DNA/RNA wurden durch Zugabe von Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 1µl/ml in das Gel oder einer sich der Auftrennung anschließende Lagerung des Gels in einer Ethidiumbromid-Lösung angefärbt. Dabei interkaliert das Ethidiumbromid zwischen den Banden der DNA/RNA und es bilden sich DNA/RNA-Ethidiumbromid-Komplexe, die als eine rot/orange Fluoreszenz im UV-Licht bei 254-300 nm detektiert werden können.

2.2.2.11 Gelextraktion

Die Aufreinigung der DNA aus dem Gel erfolgte mit Hilfe des Gel Extraktions Kits von Qiagen. Die Extraktion erfolgte nach Vorschrift und die gebundene DNA wurde mit 50 µl H₂O eluiert.

2.2.3 Arbeiten mit humanen Zellen

2.2.3.1 Zellkultur

Die verwendeten Zelllinien wurden mit dem jeweiligen Medium im Zellinkubator bei 37°C, 5% CO₂ und 98% relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Für Hypoxie wurde gewartet, bis die Zellen eine Zelldichte von ca. 60% erreicht hatten, um sie anschließend für 24 h bei 37°C, 5% CO₂, 1% O₂ und 95% relativer Luftfeuchtigkeit zu inkubieren. Für Langzeithypoxie wurden die Zellen die entsprechende Zeit unter diesen Bedingungen inkubiert und nur zum Mediumswechsel heraus genommen. Zur Verdünnung der Zellen oder der Aufteilung auf mehrere Schalen wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und 1 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben. Dies führte zu einer Zerstörung der Zell-Zellkontakte und damit zu einer Lösung vom Schalenboden. Nach ungefähr 3 – 5 min bei 37°C ließen sich die Zellen durch leichtes Klopfen der Schale lösen und wurden in einer entsprechenden Menge PBS aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend auf die Platten verteilt und mit Medium versetzt oder verworfen.

2.2.3.2 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte mit der Formel:

$$\text{Zellen/ml} = \text{Mittelwert der Zellzahlen der Kleinquadrate} \times 10^4$$

War die Zelldichte zu hoch, wurde die Zellsuspension verdünnt. Der Verdünnungsfaktor musste anschließend bei der Berechnung der Zellzahl berücksichtigt werden.

2.2.3.3 DNA-Isolation

Für die Isolation der DNA aus den Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen und abtrypsiniert. Die in PBS aufgenommenen Zellen wurden anschließend bei 2500 rpm 3 min pelletiert und in 400 µl Proteinase K Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 15 µl Proteinase K (20 mg/ml in TE-Puffer) erfolgte der Verdau mindestens 3 h bei 56°C. Im Anschluss wurde die DNA mittels Phenol, Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und Chloroform extrahiert (siehe 2.2.2.9). Danach

wurde die DNA durch Zugabe von 1/10 V/V NaAc und 2,5 V/V 96% EtOH gefällt und bei 13000 rpm für 10 min pelletiert. Nach dem Waschen der DNA mit 70 % EtOH wurde die getrocknete DNA in einer entsprechenden Menge H₂O (50 – 100 µl) aufgenommen.

2.2.3.4 RNA-Isolation

Für die RNA-Isolation wurden die Zellen mit gekühltem PBS gewaschen, anschließend in 1 ml Trizol aufgenommen und bei -80°C weggefroren. Nach dem Auftauen auf Eis erfolgte die Zugabe von 200 µl Chloroform. Anschließend wurde die Probe durch vortexen gut gemischt und zur Phasentrennung 10 min auf Eis belassen. Es folgte ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei 13000 rpm und 4°C und die obere wässrige Phase mit der RNA wurde in ein neues Tube überführt. In der unteren, organischen Phase befanden sich die Proteine und die Zwischenphase wurde von der DNA gebildet. Die Fällung der RNA erfolgte durch Zugabe von 1 V/V Isopropanol und der anschließenden Zentrifugation von 10 min bei 10000 rpm und 4°C. Das RNA-Pellet wurde mit 70 % EtOH (mit DEPC-H₂O) und nach der Trocknung in der entsprechenden Menge DEPC-H₂O (20 – 50 µl) aufgenommen.

2.2.3.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationen der Nukleinsäuren wurden mittels eines Photospektrometers bestimmt. Dabei entspricht gemäß dem Lambert-Beert'schem-Gesetz eine OD von 1 bei 260 nm einer Konzentration von 40 ng/µl für einzelsträngige und 50 ng/µl für doppelsträngige Nukleinsäuren. Des Weiteren wurde die Absorption bei 280 nm bestimmt. Mittels des Quotienten der Absorptionkoeffizienten von 260 nm und 280 nm kann die Verunreinigung an Proteinen in der Nukleinsäurelösung bestimmt werden. Der Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Für die Messung wurden die Nukleinsäuren 1:50 bzw. 1:100 mit destilliertem Wasser verdünnt und gegen destilliertes Wasser gemessen.

2.2.3.6 5-Aza-2'-deoxycytidin (5-Aza-dC) – Behandlung

5-Aza-dC ist ein Reagenz zur Hemmung von Methyltransferasen. Dadurch wird nach der Zellteilung eine *denovo*-Methylierung verhindert (Jones et al., 1983). Die Zellen sollten zu Beginn eine Zelldichte von 30 bis 40 % haben. Das Reagenz wurde in einer

Endkonzentration von 10 μM zugesetzt. Die Behandlung erfolgte an drei aufeinanderfolgenden Tagen im Abstand von 24 h.

2.2.3.7 Transfektion

In dieser Arbeit sollte die Lokalisierung von Erythropoietin in menschlichen Zellen und der Effekt der Reexpression in Zellen, die EPO nicht oder kaum exprimieren, untersucht werden. Des Weiteren war ein Ziel dieser Arbeit, die Expression eines Reportergens, das unter der Kontrolle des Promotors oder Enhancers von Erythropoietin steht, in humanen Zelllinien zu untersuchen. Dafür war es notwendig, die verwendeten Zellen mit den aufgereinigten Vektoren zu transfizieren. Für die Transfektion eukaryotischer Zellen stehen verschiedene Methoden zur Auswahl. In dieser Arbeit wurde zum einen die Methode der Endocytose (Nanofectin) und der Fusion mit der Zelle (HEKfectin) verwendet.

Für die Zelllinien Hep2 und RPMI zeigte sich die Transfektion mit dem Transfektionsreagenz Nanofectin der Firma PAA am effektivsten, wohingegen für die Transfektion der Zelllinien HepB3 und HeLaS3 das Transfektionsreagenz HEKfectin der Firma BIO-RAD verwendet wurde.

Transfektion mit Nanofectin

Bei der Transfektion mit Nanofectin wurde die DNA an positiv geladene Nanopartikel gebunden und dieser Komplex von der Zelle anschließend durch Endocytose aufgenommen.

Für die Transfektion wurden sowohl die DNA als auch das Nanofektin in einer in Tabelle 2.7 angegebenen Menge 150 mM NaCl aufgenommen, beide Lösungen anschließend gut gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das Transfektionsgemisch vorsichtig direkt in das Medium auf den Zellen getropft und durch leichtes Schwenken der Kulturschalen vermischt.

Tabelle 2.7: Mengenangaben für die Nanofectin-Transfektion

96-Well	0,1 ml Medium	250 ng DNA in 10 µl NaCl	0,8 µl Nanofectin in 10 µl NaCl
6-Well	2,0 ml Medium	3 µg DNA in 100 µl NaCl	9,6 µl Nanofectin in 100 µl NaCl

Transfektion mit HEKfectin

Bei der Transfektion mit HEKfectin wurde die negativ geladene Vektor-DNA durch kationische Lipide gebunden, der schwach positiv geladene Komplex fusionierte anschließend mit der Zellmembran und wurde durch Endocytose in die Zelle aufgenommen.

Für die Transfektion wurden sowohl die DNA als auch das HEKfectin in einer in Tabelle 2.8 angegebenen Menge serumfreiem Medium aufgenommen. Anschließend wurden beide Ansätze gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Transfektionsansatz direkt in das Medium auf die Zellen getropft und durch leichtes Schwenken der Kulturschalen vermischt.

Tabelle 2.8: Mengenangaben für die HEKfectin-Transfektion

96-Well	0,1 ml Medium	100 ng DNA in 10 µl Serum-freiem Medium	0,2 µl HEKfectin in 10 µl Serum-freiem Medium
6-Well	2,0 ml Medium	1 µg DNA in 125 µl Serum-freiem Medium	5,0 µl HEKfectin in 125 µl Serum-freiem Medium

Die transfizierten Zellen wurden im Anschluss bei 37°C, 5 % CO₂ und 98 % Luftfeuchte für Normoxie bzw. 1 % O₂ und 95 % Luftfeuchte für Hypoxie inkubiert.

Stabile Transfektion

Für eine stabile Transfektion wurden Zellen in einer 6-Well-Platte transfiziert. Ca. 24 h nach der Transfektion wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und neues Medium auf die Zellen gegeben. Das neue Medium wurde mit 1,25 mg/ml G418

versetzt. G418 (Geneticin) ist ein Aminoglycosid-Antibiotikum, welches durch die Komplexbildung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat zu einer Hemmung der Phospholipase C führt. Die transfizierten Zellen erhielten durch die eingesetzten Vektoren eine Neomycin-Resistenz und konnten dadurch positiv selektiert werden. Nach ca. 3 Wochen hatten sich aus den transfizierten resistenten Zellen Kolonien gebildet, die mittels steriler Filterstückchen in jeweils ein neues Well pro Kolonie einer 6-Well-Platte überführt wurde. Die Selektion über G418 wurde beibehalten. Nachdem die Zellen hochgewachsen waren, wurden sie auf eine 6 cm-Platte umgesetzt. Nachdem die 6 cm-Platte voll gewachsen war, wurden die Zellen auf zwei 10 cm-Platten aufgeteilt. Eine dieser Platten wurde im Anschluss bei -80°C eingefroren und die zweite 10 cm-Platte wiederum auf zwei 10 cm-Zellkulturschalen gesplittet. Von diesen zwei Schalen wurde eine Schale für die Isolation der RNA (siehe 2.2.3.4) und damit für eine Expressionskontrolle und die andere Schale für weitere Experimente verwendet. Die Selektion durch G418 wurde während all dieser Schritte beibehalten.

Für die Kontrolle der Expression wurde die aus den Zellen isolierte RNA in cDNA umgeschrieben und anschließend die Expression des pCMV-Flag-EPO-Vektors mittels PCR mit spezifischen Primern kontrolliert

2.2.4 Lokalisationsuntersuchungen durch Fluoreszenzmarkierung

Um die Lokalisation von Erythropoietin in der HNSCC-Zelllinie Hep2 darzustellen, wurden die Zellen transient mit dem Fluoreszenzkonstrukt pECFP-EPO transfiziert. In diesem Konstrukt wurde die cDNA von Erythropoietin mit der DNA für das *Enhanced Cyan Fluorescence Protein* verknüpft (siehe 2.2.2). Zusätzlich wurde der Zellkern mit DAPI angefärbt, um eine Unterscheidung zwischen Zellkern- und Zellplasma-Lokalisation treffen zu können.

Für die Transfektion wurden die Schalen einer 6-Well-Platte mit Deckgläschen bestückt und die Zellen darauf kultiviert. Einen Tag später erfolgte die Transfektion mit dem Fluoreszenz-Konstrukt. Anschließend wurden die Zellen bei 37°C, 5% CO₂ und 98% relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Nach 24 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit 3,7 % Formaldehyd für 20 min bei Raumtemperatur auf das Deckgläschen fixiert. Danach wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, bevor die Zellwand durch eine 15-minütige Inkubation mit

0,2 % TritonX 100 bei Raumtemperatur permeabilisiert wurde. Im Anschluss wurde wiederum dreimal mit PBS gewaschen. Um den Zellkern anzufärben, wurden nun 0,2 mg/ml DAPI in PBS auf die Zellen gegeben. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen erneut dreimal mit PBS gewaschen. Die Deckgläschen wurden an der Luft getrocknet um anschließend mit einem Tropfen Mowiol auf einem Objektträger eingebettet zu werden.

Für die Auswertung wurden die Zellen unterm Fluoreszenzmikroskop betrachtet. Dabei wurde das pECFP-EPO-Konstrukt mit Licht der Wellenlänge von 434 nm und der mit DAPI gefärbte Zellkern mit Licht der Wellenlänge von 585 nm sichtbar gemacht.

2.2.5 Koloniebildungstest

Mit diesem Test wurde untersucht, inwieweit transient transfizierte Zellen in der Lage sind, unter Selektionsdruck Kolonien auszubilden. Dafür wurde in den Schalen zweier 6-Well-Platten die gleiche Anzahl von Zellen ausgesät. Nach der Transfektion von je drei Wells mit dem cDNA-Vektorkonstrukt pCMV-Flag-EPO bzw. dem leeren Vektor pCMV-Flag wurde dem Medium zur Selektion G418 in einer Endkonzentration von 1,25 mg/ml zugesetzt und je eine Platte in Hypoxie und Normoxie inkubiert. Das Medium wurde alle 2 – 3 Tage gewechselt und wiederum mit G418 versetzt. Nach ungefähr 2 – 3 Wochen hatten sich Kolonien gebildet. Daraufhin wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Kolonien ca. 10 min an der Luft getrocknet und danach mit GIEMSA-Lösung (1:10 in PBS verdünnt) für 5 min gefärbt. Im Anschluss wurden nochmals zweimal mit PBS gewaschen und die gebildeten Kolonien ausgezählt. Es wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.2.6 Proliferationsuntersuchungen

Mit den Proliferationsuntersuchungen sollte die Auswirkung der Reexpression von Erythropoietin in zwei nicht bzw. wenig exprimierenden Head and Neck Krebszelllinien (Hep2 und RPMI) auf die Zellteilung unter Hypoxie und Normoxie analysiert werden. Dafür wurden die Zelllinien stabil mit dem cDNA-Vektorkonstrukt pCMV-Flag-EPO bzw. dem leeren Vektor pCMV-Flag transfiziert (siehe 2.2.2). Es wurden jeweils 50000

Zellen der stabilen Klone pro Well einer 6-Well-Platte ausgesät und die Platten in Hypoxie oder Normoxie inkubiert. An den folgenden vier Tagen wurde die Zellzahl je eines Wells im Abstand von 24 h bestimmt. Pro Zählung wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt.

2.2.7 Softagar-Test

Mit dieser Methode kann untersucht werden, inwieweit die Zellen in der Lage sind, ohne Anheftung zu wachsen.

Für diesen Versuch wurden 6-Well-Platten verwendet. Als erstes wurde die untere Schicht Agar gegossen. Dafür wurde 1 % Agar geschmolzen und anschließend auf 40°C abgekühlt. Außerdem wurden zweifaches Medium und Zusätze ebenfalls auf 40°C erwärmt. Anschließend wurden gleiche Teile von Agar und Medium miteinander gemischt und die untere Schicht in den Wells gegossen. Die Platten wurden bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert (maximal 7 Tage). Für die obere Schicht wurde 0,7 % Agar geschmolzen und wie auch das zweifache Medium + Zusätze auf 40°C gebracht. Des Weiteren wurden die Zellen von der Zellkulturschale abtrypsiniert und gezählt. Die Zellen wurden auf 200000 Zellen/ml eingestellt. Für jedes Well wurden 5000 Zellen eingesetzt. Diese wurden mit gleichen Teilen Agar und Zweifach-Medium gemischt und anschließend die obere Schicht gegossen. Die genaue Zusammensetzung der Agarschichten ist der Tabelle 2.9 zu entnehmen. Auf die obere Schicht wurde im Anschluss 0,5 ml Medium gegeben. Die 6-Well-Platten wurden bei 37°C bei Hypoxie oder Normoxie für 3 – 4 Wochen inkubiert. Im Abstand von 3 Tagen wurden die 0,5 ml Medium abgesaugt und durch neues Medium ersetzt. Nachdem die Kolonien mit 400 µl INT (5 mg/ml) über Nacht bei 37°C angefärbt worden sind, konnten die Kolonien unterm Lichtmikroskop vermessen werden. Für die Vermessung wurde das Programm Motic Images Plus 2.0 verwendet.

Alle verwendeten Medien waren mit G418 zur Aufrechterhaltung der Selektion versetzt und sowohl Medien als auch die verwendete Agarose wurden vor Gebrauch autoklaviert.

Tabelle 2.9: Zusammensetzung der Agarschichten

	Untere Schicht	Obere Schicht
Agar (1%)	3 ml	-
Agar (0,7 %)	-	3 ml
Medium (2fach)	2,34	2,34
FCS	0,6 ml	0,6 ml
PS	0,06 ml	0,06 ml
gesamt	6,0 ml (1,5 ml/Well)	6,0 ml (1,5 ml/Well)

Der Versuch wurde mit Klonen von Hep2 und RPMI, zwei Head and Neck Krebszelllinien, durchgeführt, die stabil mit den Vektoren pCMV-Flag-EPO oder pCMV-Flag transfiziert sind. Hep2-Klone wurden 3 Wochen und RPMI-Klone 4 Wochen inkubiert. Es sollte das Wachstum der Klone mit EPO und ohne EPO unter Normoxie bzw. Hypoxie untersucht werden.

2.2.8 Reverse Transkription

Bei der *Reversen* Transkription wurde die aus den Zellen isolierte RNA mittels *Reverse* Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden 1 µg RNA mit dem entsprechenden Puffer, 8µl dNTPs (2,5 mM) und 1 µl Oligo-dT-Primer (20 pmol/µl) in einem Gesamtvolumen von 19 µl auf Eis zusammenpipettiert. Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 62°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben wieder auf Eis gestellt und 0,5 µl *Reverse* Transkriptase (200U/µl) und 0,5 µl *RNasin* (40 U/µl) zupipettiert. Danach wurde die *Reverse* Transkription für 1 h bei 42°C inkubiert. Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte im Anschluss für 5 min bei 90°C.

Die cDNA wurde anschließend in einfachen PCRs für den Nachweis der Expression von Genen oder in *Real time* quantitativen PCRs zur Untersuchung der Expressionsstärke von Genen verwendet.

2.2.9 *Real time quantitative PCR*

Die *Real time* quantitative PCR ist wie die herkömmliche PCR eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, bietet aber zusätzlich die Möglichkeit zur Quantifizierung der Produkte. Für die Messung der Zunahme an Produkt wurde dem Ansatz der Reaktion (siehe Polymerase-Kettenreaktion) der Cyanin-Farbstoff SYBRGreen zugefügt. Dieser Fluoreszenzfarbstoff bindet doppelsträngige DNA und absorbiert in diesem Komplex blaues Licht bei einer Wellenlänge von $\lambda_{\max} = 494$ nm. Die Messung des emittierten Lichts erfolgt jeweils am Ende der Elongationsphase jedes Zyklus bei einer Wellenlänge $\lambda_{\max} = 521$ nm. Die Spezifität der PCR-Produkte wurde im Anschluss durch eine Schmelzkurve und ein Agarosegel überprüft. Während der Schmelzkurve wurde die Temperatur langsam von 50°C auf 95°C erhöht. Bei der Temperatur, bei der das PCR-Produkt denaturiert, wird der Fluoreszenzfarbstoff freigesetzt und es kann eine Fluoreszenzabnahme gemessen werden.

2.2.10 *Luciferase Assay*

Mittels dieses Assays kann die Aktivität von Promotoren und Enhancern unter unterschiedlichen Bedingungen untersucht werden. Dazu wurden Vektoren kloniert, in denen der Promotor oder Enhancer vor bzw. hinter das Reportergen Luciferase eingefügt wurde. Anschließend wurden Zellen mit diesen Vektoren transfiziert und nach 24 h das Genprodukt des Reportergens über die Umsetzung des Substrates gemessen. Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay System von Promega verwendet. Dafür wurden drei unterschiedliche Vektoren kloniert (siehe Abb. 2.2)

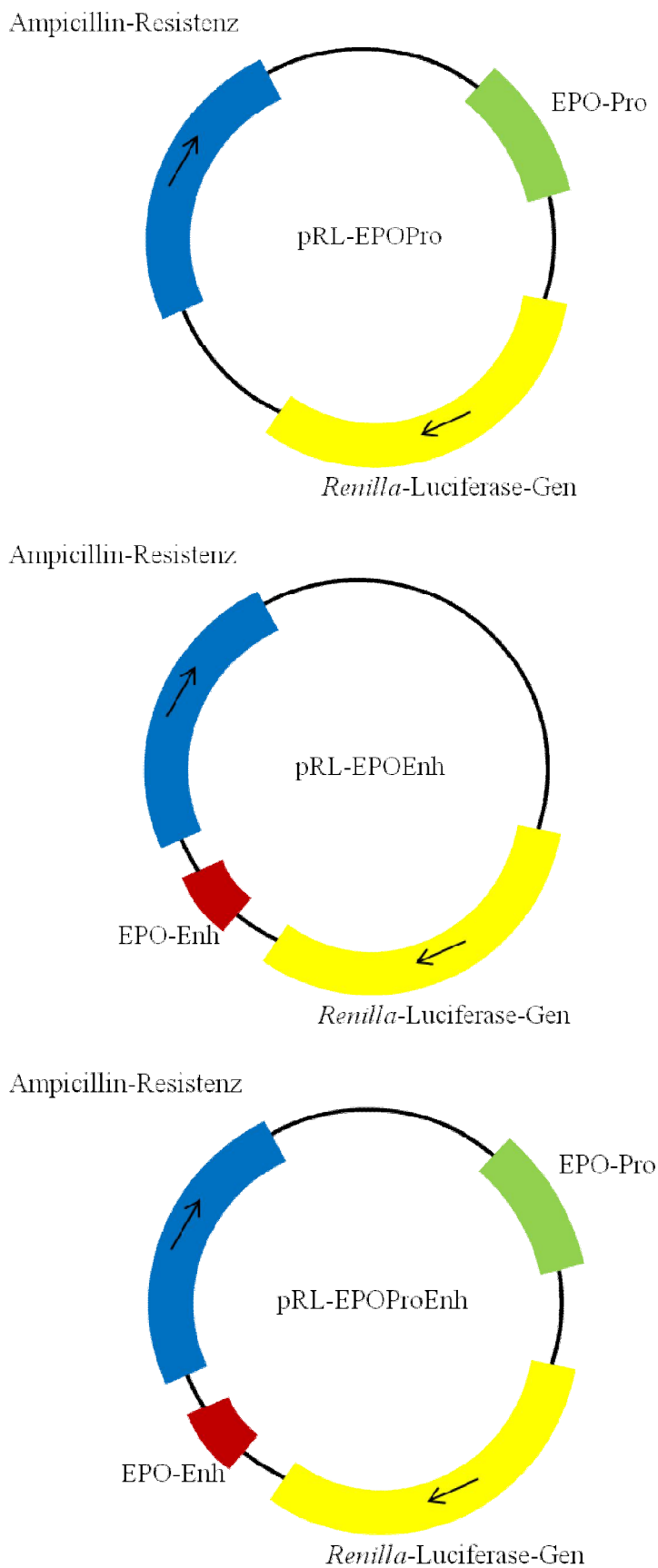


Abb. 2.2: Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte für den Luciferase-Assay. EPOPro-EPO-Promotor; EPOEnh-EPO-Enhancer

Der pRL-Vektor beinhaltet das Gen für die *Renilla*-Luciferase. Dieses Enzym katalysiert die Mono-Oxygenierung von Coelenterazin unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff. Bei dieser Reaktion wird neben CO₂ auch Licht freigesetzt, welches mittels eines Luminometers gemessen werden kann (Abb. 2.3). Um Unterschiede in der Transfektionseffizienz, der Gesundheit der Zellen und der Zellregulation zwischen den einzelnen Experimenten zu normalisieren, wurde bei jeder Transfektion der Vektor pGL3.1 mit transfiziert. In diesen Vektor wurde das Gen für die *Firefly* Luciferase kloniert. Das Genprodukt katalysiert die ATP-abhängige Mono-Oxygenierung von Käfer-Luciferin in der Anwesenheit von Mg²⁺ zu Oxyluciferin (Abb. 2.3). Auch bei dieser Reaktion wird Licht freigesetzt, welches gemessen werden konnte. Zur Normalisierung wurde der Quotient aus dem Wert der *Renilla* und dem Wert der *Firefly* gebildet.

Für diesen Versuch wurden die Zellen in einer 96er Platte jeweils mit den drei oben genannten Konstrukten und dem leeren Vektor pRL-Null transfiziert und mit dem Vektor pGL3.1 cotransfiziert, wobei die Vektoren in einem Mengenverhältnis von 50:50 eingesetzt wurden. Die Transfektionen wurden je fünfmal auf zwei verschiedenen Platten durchgeführt. Eine Platte wurde danach bei Hypoxie und eine Platte bei Normoxie für 24 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 20 µl Lysispuffer (1:5 verdünnt) für 20 min bei Raumtemperatur. Für die Messungen wurden je 10 µl in die Wells einer weißen 96er Platten überführt.

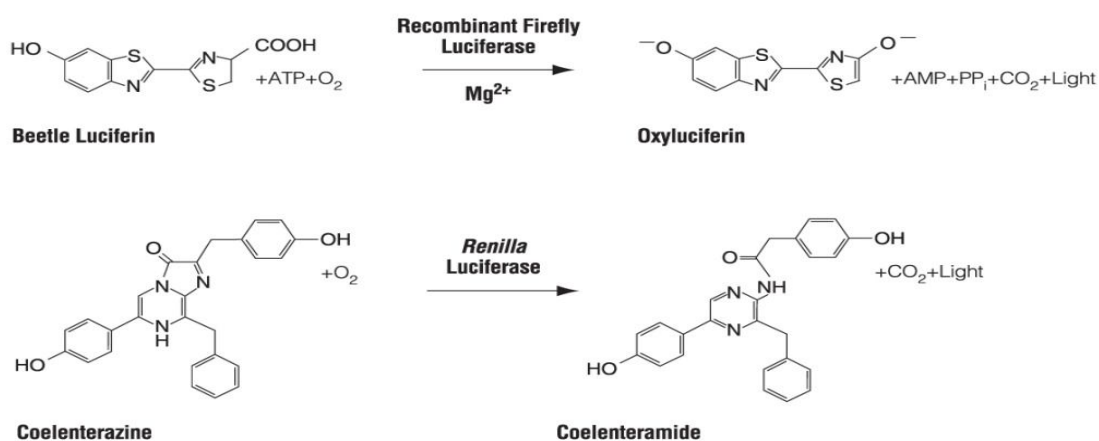


Abb. 2.3: Biolumineszenzreaktionen, die durch *Firefly* und *Renilla* Luciferase katalysiert werden (Technical Manual-Dual-Luciferase® Reporter Assay System, Promega)

Als erstes wurde die *Firefly* Luciferase gemessen. Dafür wurde zu jedem Well 10 µl LARII zupipettiert, gemischt und im Luminometer das entstehende Licht gemessen. Durch Zugabe von 10 µl STOP & GLOW wurde die erste Reaktion abgestoppt und die Messung für die *Renilla* Luciferase gestartet, wobei ebenfalls das entstehende Licht im Luminometer gemessen wurde.

Für jeden Ansatz wurde eine fünffach-Bestimmung durchgeführt, von der bei der Auswertung jeweils zwei Werte gestrichen wurden.

2.2.11 Chromatin Immunopräzipitation

Ziel der Chromatin Immunopräzipitation (ChIP) ist die Untersuchung der Interaktion von Proteinen, die die Expression beeinflussen, mit der DNA. Dazu wird das an die DNA gebundene Protein über entsprechende Antikörper präzipitiert und die Menge der gebundenen DNA über *Real time* quantitativen PCR analysiert.

Die an die DNA gebundenen Proteine wurden durch die Zugabe von Formaldehyd in einer Endkonzentration von 1% ins Medium für 10 min bei 37°C fixiert. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit eiskaltem PBS folgte das Ablösen der Zellen mittels eines Zellschabers und das Pelletieren für 4 min bei 2000 rpm und 4°C. Anschließend wurde das Zellpellet in 400 µl SDS Lysis Puffer resuspendiert und zur Zelllyse 10 min auf Eis inkubiert. Um die DNA in 200 – 1000 bp große Fragmente zu fragmentieren erfolgte eine Sonifikation für 5-10 Sekunden. Die Zelltrümmer wurden durch einen Zentrifugationsschritt von 10 min bei 13000 rpm und 4°C pelletiert und der Überstand 10fach mit *Dilution* Puffer verdünnt. Bei diesem Schritt wurde der Überstand von zwei Zellschalen vereint.

Um den Hintergrund zu reduzieren, erfolgte eine einstündige Inkubation der Probe mit 200 µl *Salmon Sperm DNA/Protein A/G Agarose Slurry* bei 4°C unter Schwenken. Nach der Abzentrifugation der Agarose für 1 min bei 1000 rpm und 4°C wurden je 1000 µl des Überstands mit je 2 µg Antikörper (AcH3, tMK9H3, MBD2 und H3) versetzt bzw. ohne Antikörper als Negativkontrolle verwendet. 1/100 des Ansatzes wurde als Inputkontrolle weggefroren. Die Proben mit den Antikörpern und die Negativkontrolle wurden unter Schütteln bei 4°C über Nacht inkubiert, anschließend mit 40 µl *Salmon Sperm DNA/Protein A/G Agarose Slurry* versetzt und nochmals für 3 h inkubiert. Es folgten fünf Waschschriffe der an die Agarose gebundenen Protein-DNA-Komplexe (1

x *Low Salt* Puffer, 1 x *High Salt* Puffer, 1 x LiCl Puffer, 2 x TE Puffer) mit Zentrifugationsschritten von 1 min bei 1000 rpm und 4°C. Die pelletierte Agarose und die weggefrorene Inputkontrolle wurden anschließend in 500 µl frisch hergestelltem Elutionspuffer aufgenommen und für 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach der Abzentrifugation der Agarose (1 min, 1000 rpm) schloss sich eine Inkubation der Proben mit 20 µl 5 M NaCl bei 65°C zur Lösung des *Cross linking* an. Es folgte ein einstündiger Proteinase K Verdau (10µl 0,5 M EDTA, 20 µl 1M Tris-HCl (pH 6,5) und 2µl 10mg/ml Proteinase K) bei 45°C, gefolgt von einer Phenol/Chloroform- und Chloroform-Extraktion und der Fällung der DNA mit 1 µl 20mg/ml Glycogen, 1/10 V NaAc und 500 µl Isopropanol bei -20°C für 2 h. Nach dem Waschen der DNA mit 70% EtOH wurde das DNA-Pellet in 100 µl H₂O aufgenommen. Die Quantifizierung der präzipitierten DNA erfolgte durch *Real Time* PCR mit Primern für Erythropoietin. Alle bis zur Elution verwendeten Puffer wurden mit Proteinase-Inhibitoren versetzt und eiskalt verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Untersuchung der Methylierung von tumor-assoziierten Genen in HNSCC

3.1.1 Methylierungsstatus der tumorassoziierten Gene

Ein in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus der Wissenschaft gerückter Mechanismus der Geninaktivierung in Tumoren ist die Promotorhypermethylierung. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Methylierungsstatus der Promotoren von 15 tumorassoziierten Genen (RASSF1A, p16, MGMT, DAPK, RAR β , MLH1, CDH1, GSTP1, RASSF2, RASSF4, RASSF5, MST1, MST2, LATS1 und LATS2) mittels *Combined Bisulfit Restriction Analysis* oder *Methylation Specific PCR* (MSP) in 3 HNSCC-Krebszelllinien (Hep2, RPMI2650 und HNSCC14B), 54 *Head and Neck Squamous cell carcinoma* (HNSCC) und 23 zugehörigen Normalgeweben analysiert. Abb. 3.1 zeigt repräsentative Beispiele für die Ergebnisse der MSP, die in Tabelle 3.1 zusammengefasst sind.

In den primären Tumoren wurde eine totale Häufigkeit der Promotormethylierung von 42% gefunden und diese Methylierungsfrequenz war verglichen mit den Normalgewebeproben (23%) signifikant höher ($p=0,04$).

Für RASSF1A wurde eine Methylierung des Promotors in 66% der untersuchten Zelllinien (RPMI2650 und HNSCC14B) gefunden. In den primären Tumoren war die Promotermethylierung mit 18% erheblich niedriger und in den Normalgeweben wurde keine Methylierung gefunden (siehe Abb. 3.1 und 3.2 und Tab. 3.1). p16 zeigte eine Promotormethylierung von 60% in den Tumorproben, die damit zweimal so hoch war wie im Normalgewebe. In den analysierten Zelllinien konnte keine Methylierung von p16 gefunden werden (siehe Abb. 3.1 und 3.2 und Tab. 3.1). MGMT war dagegen in allen Zelllinien methyliert. In den primären Tumoren war MGMT zu 53% und in den

Normalgeweben zu 29% methyliert (siehe Abb. 3.2 und Tab. 3.1). Der Promotor der *Death associated Kinase* (DAPK) wurde zu 67% in den Tumorproben und halb so oft in den Normalgewebeproben methyliert gefunden. Zwei der drei Zelllinien (RPMI2650 und HNSCC14B) hatten ebenfalls einen methylierten Promotor (siehe Abb. 3.2 und Tab. 3.1).

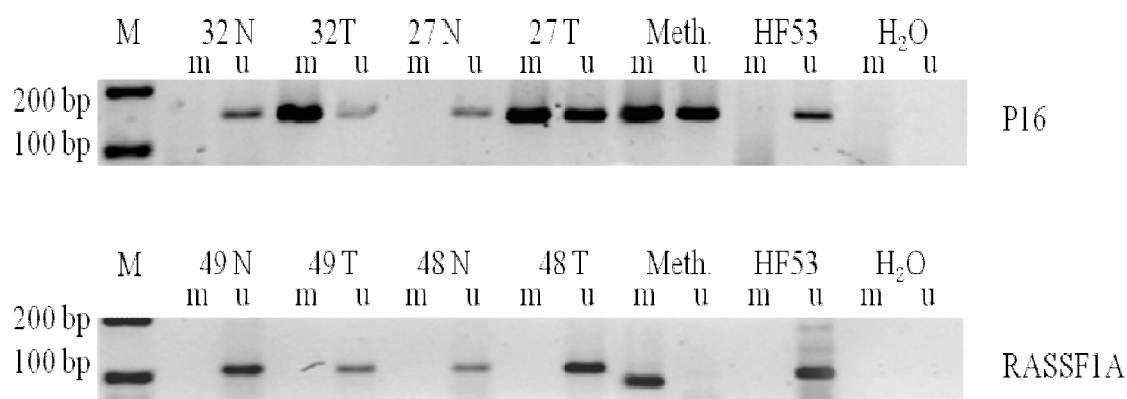


Abb. 3.1: Methylierungsanalyse der in primären HNSCC und Normalgewebe. Repräsentative Ergebnisse der Methylierungsspezifischen PCR (MSP) von den Promotoren von RASSF1A und P16 in Tumor- und Normalgewebe. Bisulfit-behandelte DNA wurde mittels Primern spezifisch für methylierte DNA (m) und spezifisch für unmethylierte DNA (u) amplifiziert. Als Kontrollen wurden *in vitro* methylierte DNA (meth.), unmethylierte DNA (HF53) und H₂O verwendet. Die PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen TBE-Agarosegel mit einem 100bp-Marker (M) aufgetrennt. Als methyliert wurden die Proben 32T, 27T und die Positivkontrollen Meth. eingestuft.

Der Promotor von RAR β ist in dreiviertel der primären Tumore und fast der Hälfte der Normalgewebe methyliert (siehe Abb. 3.2 und Tab. 3.1). In den Zelllinien war die Methylierungsfrequenz 66% (Methylierungen in Hep2 und HNSCC14B). MLH1 zeigte eine Promotormethylierung in den Tumorproben von 69%, in dem Normalgewebe von 45% und in den Zelllinien von 66% (Methylierungen in RPMI2650 und HNSCC14B) (siehe Abb. 3.2 und Tab. 3.1). Fast die Hälfte der Tumorproben war im Promotor von CDH1 methyliert, aber nur 8% des Normalgewebes (siehe Abb. 3.2 und Tab. 3.1). In den analysierten Zelllinien konnte keine Methylierung des CDH1-Promotors gefunden werden. RASSF2 war in 11% des Normalgewebes methyliert und in fast viermal mehr Tumorproben. Nur die Zelllinie HNSCC14B zeigte einen methylierten RASSF2-Promotor (siehe Abb. 3.2 und Tab. 3.1).

Der Promotor von RASSF4 zeigte kaum Methylierung, nur 4% der Tumorproben waren methyliert. Normalgewebe und Zelllinien waren komplett unmethyliert (siehe Tab. 3.1). Für RASSF5 wurde in allen Zelllinien eine Promotormethylierung gefunden und in mehr als der Hälfte der primären Tumoren, aber nur in 17% der Normalgewebeproben (siehe Abb. 3.2 und Tab. 3.1).

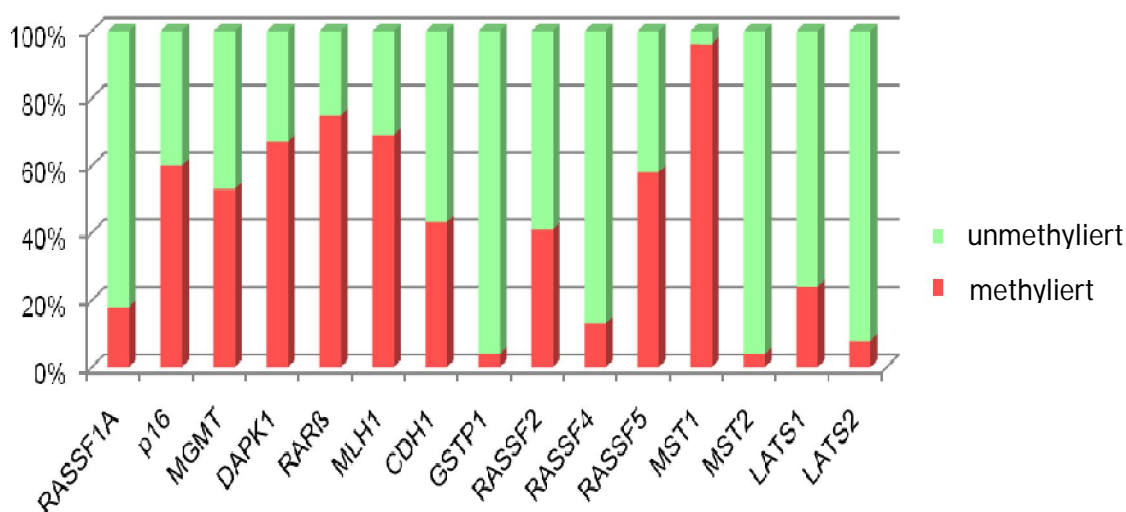


Abb. 3.2: Graphische Darstellung der Prozepte von methylierten (rot) und unmethylierten (grün) Promotoren der 15 Kandidatengene in den 54 HNSCC-Tumorproben.

Sowohl in den Tumorproben als auch im Normalgewebe war fast ein Viertel des Promotors von LATS1 methyliert. Keine Methylierung wurde in den Zelllinien gefunden (siehe Abb. 3.2 und Tab. 3.1). Für LATS2 betrug die Promotormethylierung in den primären Tumoren und in den Proben des Normalgewebes weniger als 10%, wohingegen 66% der analysierten Zelllinien (Methylierung in Hep2 und HNSCC14B) methyliert (siehe Abb. und 3.2 und Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Häufigkeit der Promotormethylierung der Kandidatengene in primären Tumoren

	Methylierung in Tumoren (54)	Methylierung in Normalgewebe (23)	Methylierung in HNSCC-Zelllinien (3)	Methylierung in Patienten mit Rezidiv (30)	Methylierung in Patienten ohne Rezidiv (20)
RASSF1A	18%	0%	66%	17%	24%
p16	60%	24%	0%	64%	60%
MGMT	53%	29%	100%	48%	59%
DAPK	67%	33%	66%	59%	72%
RARβ	75%	47%	66%	81%	81%
MLH1	69%	45%	66%	68%	71%
CDH1	43%	8%	0%	45%	40%
GSTP1	4%	5%	0%	7%	0%
RASSF2	41%	11%	33%	41%	45%
RASSF4	13%	0%	0%	23%*	0%*
RASSF5	58%	17%	100%	57%	55%
MST1	96%	42%	100%	96%	94%
MST2	4%	55%	0%	7%	0%
LATS1	24%	23%	0%	17%	25%
LATS2	8%	9%	66%	3%	15%

*p<0,05; 0%; 1-10%; 11-50%; 51-90%; 91-100%

3.1.2 Korrelationen zwischen Promotormethylierung und Alter, Rezidiv, Stadium, Differenzierung und TNM Klassifizierung

Nach der Analyse der Methylierungsfrequenz der tumorassoziierten Gene RASSF1A, p16, MGMT, DAPK, RARβ, MLH1, CDH1, GSTP1, RASSF2, RASSF4, RASSF5, MST1, MST2, LATS1 und LATS2 wurden diese Daten mit verschiedenen klinisch-pathologischen Parametern wie Alter, Entstehung von Rezidiven, Stadium, Differenzierung, TNM-Klassifizierung und Lymphknoten-Status korreliert (Tab. 3.2 und 3.3). Für alle analysierten Gene konnte kein signifikanter Anstieg der Methylierung in Kombination mit fortschreitendem Alter gefunden werden (Tab. 3.2).

Tabelle 3.2: Durchschnittliches Alter der HNSCC-Patienten

	durchschnittl. Alter	
	methyliert	unmethyliert
RASSF1A	51 ± 8	57 ± 10
P16	58 ± 11	54 ± 7
MGMT	59 ± 10	55 ± 9
DAPK1	58 ± 8	58 ± 12
RARβ	58 ± 9	55 ± 8
MLH1	58 ± 10	58 ± 10
CDH1	59 ± 8	55 ± 10
GSTP1	64 ± 18	57 ± 9
RASSF2	56 ± 12	58 ± 8
RASSF4	53 ± 10	58 ± 10
RASSF5	58 ± 10	56 ± 9
MST1	58 ± 10	71 ± 9
MST2	73 ± 4	57 ± 9
LATS1	62 ± 9	56 ± 10
LATS2	55,5 ± 2	57 ± 10

Bei Patienten mit einem Rezidiv wurden 42% aller Gene im Promotor methyliert gefunden. Patienten, die einen methylierten RASSF4-Promotor aufwiesen, bekamen häufiger ein Rezidiv als welche ohne eine Promotormethylierung im RASSF4-Gen ($p=0,033$). Alle anderen Gene zeigten keine signifikante Tendenz einen methylierten Promotor bei Patienten mit oder ohne Rezidiv zu haben (42% gegen 43%).

Bei Patienten mit HNSCC im Stadium IV war die Gesamtmethylierungsrate höher (44%) verglichen mit Patienten mit HNSCC im Stadium III (36%). Speziell für die Gene RASSF1A, DAPK1, MLH1, CDH1, RASSF4 und LATS1 erhöhte sich die Methylierung (Tab. 3.3).

In undifferenzierten HNSCC konnte eine häufigere Promotormethylierung der untersuchten Gene (45%) gefunden werden als in gut differenzierten HNSCC-Tumoren (29%). Für die Gene p16, MGMT, RASSF5, MST1, LATS1 und LATS2 war die Methylierung des Promotors in undifferenzierten Tumoren öfter zu detektieren als in schlecht differenzierten HNSCC, wobei diese Tendenz für das Gen P16 signifikant war (43% zu 83%; $p=0,037$).

Tab. 3.3: Korrelation der Promotermethylierung mit den klinisch-pathologischen Daten

	Stadium				Differenzierung			TNM Klassifizierung				Lymphknoten			
	I	II	III	IV	G1	G2	G3	T1	T2	T3	T4	N0	N1	N2	N3
RASSF1A	33 %	-	10%	21%	0%	21%	8%	25%	25%	14%	8%	10%	14%	16%	33%
p16	66 %	-	50%	57%	50%	43%	83%	63%	75%	48%	54%	50%	43%	64%	57%
MGMT	33 %	-	60%	53%	25%	56%	58%	33%	57%	39%	56%	78%	33%	46%	80%
DAPK1	33 %	-	40%	74%	100 %	62%	69%	86%	63%	67%	58%	38%	57%	80%	57%
RAR β	100 %	-	60%	75%	50%	78%	67%	89%	83%	74%	75%	71%	83%	78%	67%
MLH1	33 %	-	50%	75%	67%	61%	85%	50%	75%	77%	69%	70%	43%	81%	57%
CDH1	0%	-	36%	51%	0%	53%	36%	33%	50%	50%	38%	18%	57%	56%	29%
GSTP1	0%	-	0%	6%	0%	3%	7%	0%	13%	6%	0%	0%	0%	8%	0%
RASSF2	33 %	-	50%	38%	25%	45%	31%	33%	25%	33%	64%	50%	43%	32%	50%
RASSF4	0%	-	0%	17%	25%	8%	23%	17%	0%	10%	23%	0%	0%	12%	50%
RASSF5	67 %	-	55%	57%	24%	60%	67%	44%	38%	50%	91%	55%	57%	54%	60%
MST1	67 %	-	100 %	94%	67%	96%	100 %	86%	86%	100 %	100 %	88%	100 %	100 %	100 %
MST2	0%	-	10%	3%	0%	4%	7%	0%	13%	5%	0%	10%	0%	4%	0%
LATS1	0%	-	9%	26%	0%	20%	23%	0%	13%	39%	9%	9%	14%	33%	14%
LATS2	0%	-	9%	6%	0%	6%	14%	0%	0%	9%	15%	9%	0%	8%	14%
MI (n=15) \pm SD	31 % \pm 31	-	36% \pm 28	44% \pm 28	29% \pm 30	41% \pm 28	45% \pm 31	37% \pm 31	41% \pm 30	41% \pm 28	44% \pm 32	37% \pm 30	36% \pm 30	45% \pm 30	45% \pm 28

I-IV Stadium; 1-3 Differenzierung; T1-T4, N0-N3 TNM-Klassifizierung; m: methyliert; u: unmethyliert
MI-Mittelwert; SD-Standardabweichung

Für die Korrelation der Methylierungsdaten mit der TNM-Klassifizierung der HNSCC-Tumorproben zeigte sich in T4 eine höhere Gesamtmethylierung der untersuchten Gene (44%) als in Stadium T1 (37%). Dabei war die Methylierung der Gene RASSF2, RASSF5 und LATS2 in Stadium T4 häufiger als in den niedrigeren Stadien. Für das Gen RASSF5 war diese Tendenz signifikant ($p < 0,05$). Auch für die Lymphknoten konnte ein Zusammenhang zwischen der Promotormethylierung der analysierten Gene und deren Befall gefunden werden. So war die Gesamtmethylierungsrate in HNSCC bei einem zusätzlichen Befall der Lymphknoten (N2 und N3) höher (45%) verglichen mit der Methylierung in Patienten ohne einen Befall der Lymphknoten (N0; 37%; Tab. 3.3). Insbesondere für die Gene RASSF1A und RASSF4 konnte für N3 öfter eine Methylierung des Promotors gefunden werden als bei N0 (Tab. 3.3).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass eine höhere Methylierungsfrequenz der in dieser Arbeit untersuchten tumorassoziierten Gene mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium korreliert.

3.2 Erythropoietin in HNSCC

3.2.1 Regulation der Genaktivität und Expression von Erythropoietin in HNSCC und anderen primären Geweben und verschiedenen Krebszelllinien

Die Expression von Erythropoietin wurde neben der Niere und der fötalen Leber auch schon in einigen anderen Geweben, unter anderem auch Tumoren, gezeigt. Zwei Arbeitsgruppen zeigten aber (Wenger et al., 1998; Yin & Blanchard, 2000), dass diese Expression durch Methylierungen im Promotor- und Enhancerbereich in der Zelllinie HeLaS3 unterdrückt werden kann. In dieser Arbeit wurden der Methylierungsstatus und die Expression von Erythropoietin in HNSCC und einigen anderen primären Tumoren und Krebszelllinien untersucht.

1993 beschrieb die Arbeitsgruppe um Galson im Erythropoietin-Gen nichtkodierende Regionen, die in Mensch und Maus hochkonserviert vorliegen (Galson et al., 1993). Darunter waren der Promotor und eine 120 bp lange Region 3' von der Polyadenylierungsstelle. Der Enhancer mit einer HIF-1 *binding site* wurde schon in vorhergehenden Arbeiten genauer beschrieben (Beck et al., 1991; Pugh et al., 1991;

Semenza et al., 1991b). Die Interaktion mit HIF-1 α ist notwendig für die Hypoxie-induzierte Expression von Erythropoietin. Dabei kommt es zur Bildung des HIF-1-Komplexes unter Beteiligung von ARNT (wird auch als HIF-1 β bezeichnet), für welches der Promotor eine Interaktionssequenz aufweist (Bunn et al., 1998; Ebert & Bunn, 1999; Fandrey et al., 1994; Maxwell et al., 1993b; Pugh et al., 1991; Semenza, 1998).

3.2.1.1 Expression von Erythropoietin in Normalgewebe

Die Untersuchung der Expression von Erythropoietin in verschiedenen Geweben sollte die in der Literatur beschriebenen Expressionsraten überprüfen und für diese Arbeit einen Überblick über Erythropoietin-exprimierende Gewebe liefern.

Dazu wurde die relative Expression in verschiedenen humanen Normalgeweben zu einer Kontrolle mittels *Real Time* PCR analysiert (Abb. 3.3 A). Dabei zeigte Gewebe aus der Niere die höchste Expression von Erythropoietin. Auch im Gewebe der Leber war eine hohe Expression von Erythropoietin zu finden. Diese entsprach jedoch nur ca. der Hälfte der Expression in der Niere. Eine mäßige Expression wurde bei dem Plazentagewebe mit 10% im Vergleich zum Nierengewebe beobachtet. Alle anderen analysierten Gewebe zeigten weniger als 5% der Expression der Niere, was als Hintergrundsignal eingestuft wurde (Abb. 3.3 und Anhang Tab. 7.3). Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne cDNA, die keine nachweisbare Expression zeigte (nicht gezeigt). Die Expressionsdaten wurden durch die Bestimmung der Expression des *Housekeeping*-Gen GAPDH normalisiert.

In dieser Arbeit konnte in allen untersuchten Geweben eine Expression detektiert werden, wobei die Expressionsraten in den Geweben aus Plazenta, Leber und Niere höher waren als in den anderen.

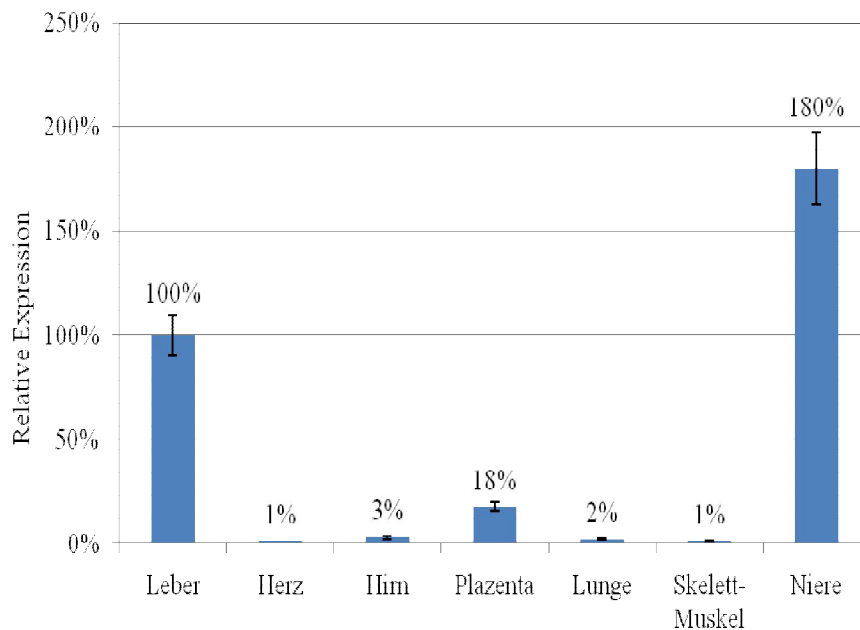
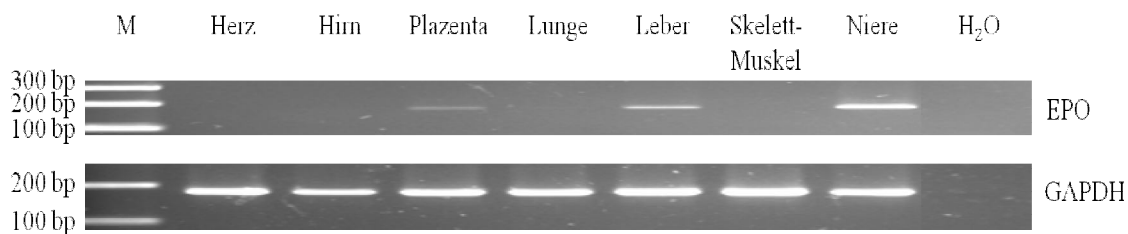
A**B**

Abb. 3.3: Relative Expression von Erythropoietin in sieben verschiedenen Normalgeweben **A**. Ergebnisse der Expressionsanalysen durch *RealTime*-PCR in Bezug auf die cDNA aus Leber (100%). **B**. Ergebnisse der elektrophoretischen Auftrennung von 5 μ l des PCR-Produkts der Erythropoietin-PCR (Produkt bei 170bp) und der GAPDH-PCR (Produkt bei 176 bp) auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100pb-Marker (M). In der jeweils letzten *Lane* des Gels wurde eine H₂O-Kontrolle mitgeföhrt. Expressionsignale unter 5% wurden als Hintergrund eingestuft.

3.2.1.2 Methylierung des Erythropoietin-Promotors in primären Tumoren und verschiedenen Zelllinien

Die Expression von Erythropoietin wurde neben dem Gewebe von Niere und Leber auch in einer Vielzahl anderer Gewebe nachgewiesen, unter anderem auch in Tumorgewebe.

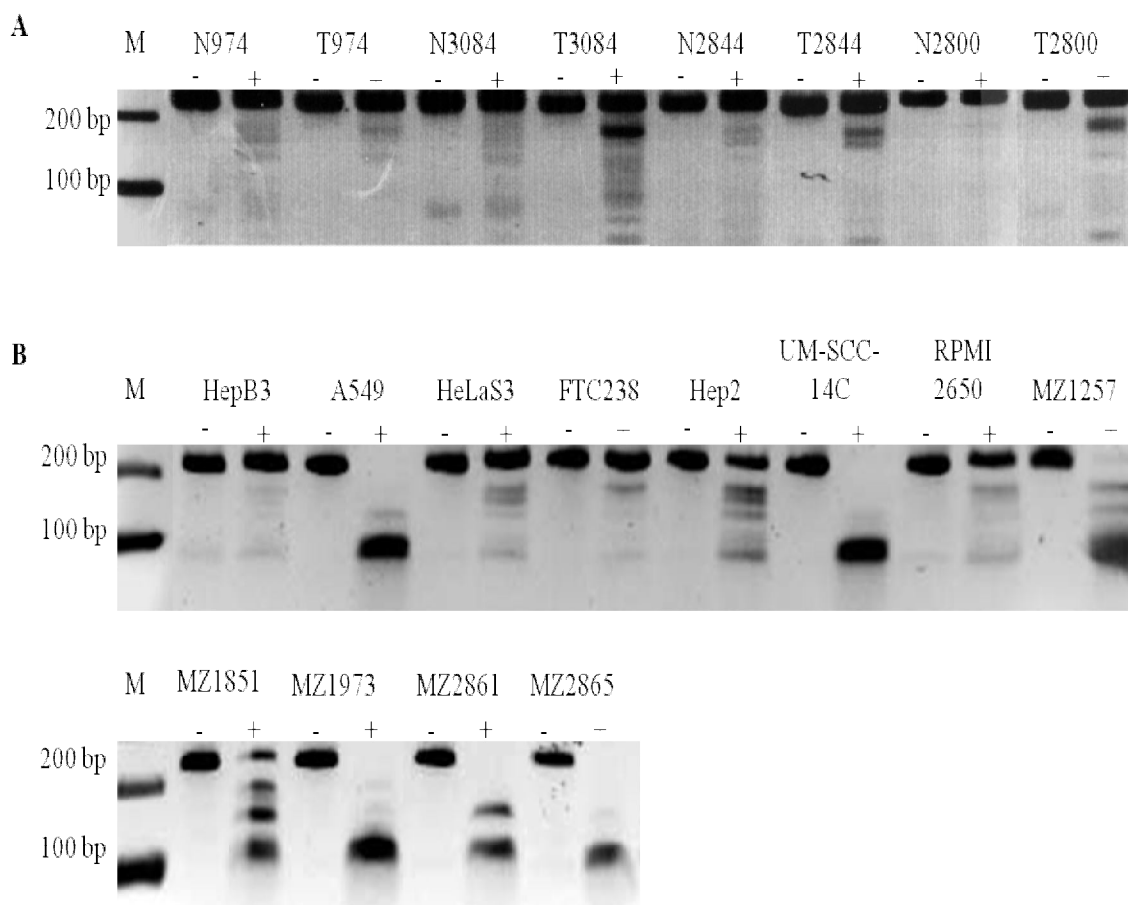


Abb. 3.4: Ergebnisse der COBRA-Analyse von **A** Normalgewebe (N) und Tumorproben (T) aus der Leber und **B** verschiedenen Krebszelllinien. Die unverdauten (-) und die verdauten (+) PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als methyliert wurden Proben eingestuft, die zusätzliche Banden in der + - Lane aufwiesen (alle ausser N2800).

Da gezeigt wurde, dass Methylierungen im Promotor zu einer Repression der Expression von Erythropoietin in der Cervix-Karzinom-Zelllinie HeLa führt, wurde in dieser Arbeit neben den tumorassoziierten Genen auch die Methylierung von Erythropoietin in den HNSCC Proben und dem zugehörigen Normalgewebe mittels COBRA untersucht. Eigene vorhergehende Untersuchungen zeigten einen hohen Methylierungsgrad des EPO-Promotors in verschiedenen Krebszelllinien und primären Tumoren.

Zum Beispiel wurde ein methylierter Promotor in sechs Lungenkrebszelllinien, 4 Brustkrebszelllinien, 3 HNSCC-Zelllinien, 14 Nierenkrebszelllinien und diverser anderer Zelllinien mittels COBRA-Analyse gefunden (Tab.3.4). Abbildung 3.4 zeigt Beispiele für die Ergebnisse der COBRA-Analyse von Normalgewebe- und Tumorproben aus der Leber und verschiedenen Krebszelllinien. Sie zeigt, dass der Methylierungsgrad sowohl in den Geweben als auch in den Zelllinien sehr hoch ist.

Tabelle 3.4: Zelllinien mit Methylierungen im Promotor von Erythropoietin

Zelllinien mit Methylierungen im Promotor von Erythropoietin

6 Lungentumorzelllinien (A549, HCC15, SK-HES, DV50, CRL5886, H358)

4 Brusttumorzelllinien (ZR75-1, T47D, MDA231, AD293)

14 Nierentumorzelllinien

Schilddrüsenkarzinom-Zelllinie FTC-ZL238

Cervixkarzinom-Zelllinie HeLaS3

3 HNSCC-Zelllinien (Hep2, HNSCC-14C, RPMI2650)

Kolonkarzinom-Zelllinie HT29

Auch verschiedene untersuchte primäre Tumore zeigten eine Methylierung des Promotorbereichs. Für 14 von 34 untersuchten Lungentumorproben, 6 von 13 Brusttumoren, 5 von 9 Pankreastumorproben, 5 von 15 Cervixtumorproben und alle 11 untersuchten Lebertumorproben zeigte in der COBRA-Analyse Methylierungen im EPO-Promotor (Abb. 3.4 und Tab. 3.5). In den zugehörigen Normalgewebsproben konnten seltener Methylierungen gefunden werden.

Tabelle 3.5 : Anzahl der methylierten Proben in Tumor- und Normalgewebe

Primäres Gewebe	Tumor	Normalgewebe
Lunge	14/34 (41%)	0/6 (0%)
Brust	6/13 (46%)	1/13 (8%)
Pankreas	5/9 (55%)	-
Cervix	5/15 (33%)	-
Leber	11/11 (100%)	3/4 (75%)

Für vier verschiedene Zelllinien, HepB3, Hep2, HeLaS3 und MZ2865, wurden zusätzlich eine Bisulfit-Sequenzierung für zwei Bereiche des Promotors, wobei der zweite Bereich die Interaktionssequenz für ARNT beinhaltet, und den Enhancer, in dem sich die Interaktionssequenz für Hif1 α befindet, durchgeführt (Abb. 3.5). Dafür wurde die genomische DNA mit Natrium-Bisulfit behandelt und anschließend sequenziert (Abb. 3.5). Dabei zeigte sich, dass bei den Zelllinien HeLaS3 und MZ2865 sowohl die sequenzierten Promotorbereiche als auch der Enhancerbereich fast vollständig methyliert waren. Für MZ2865 waren bei zwei von drei Klone im gesamten analysierten Promotorbereich 23 von 24 Cytosine im CpG-Kontext methyliert, im dritten Klon war der komplette Promotor methyliert. Im analysierten Enhancerbereich waren zwei der drei untersuchten Klone vollständig methyliert, während der dritte Klon auch nur ein unmethyliertes Cytosin aufwies. Für die Zelllinie HeLaS3 waren im Promotor durchschnittlich 75% und im Enhancer durchschnittlich 60% der analysierten Cytosine methyliert. In der Zelllinie Hep2 waren durchschnittlich 7 der 24 analysierten CpGs im Promotor methyliert und kein Klon zeigte eine Methylierung in der Hif1 α -Bindesequenz im Enhancer. Für die Zelllinie HepB3 fand sich kein methyliertes CpG im Promotorbereich und in zwei von drei Klonen keine Methylierung im Enhancer, wobei die zwei methylierten Cytosine des dritten Klons nicht in die Hif1 α -Interaktionssequenz fielen.

Es konnte gezeigt werden, dass der analysierte Promotorbereich von Erythropoietin in einer Vielzahl von primären Tumoren und Krebszelllinien methyliert vorliegt, während normale Gewebe seltener in diesem Bereich Methylierungen zeigten.

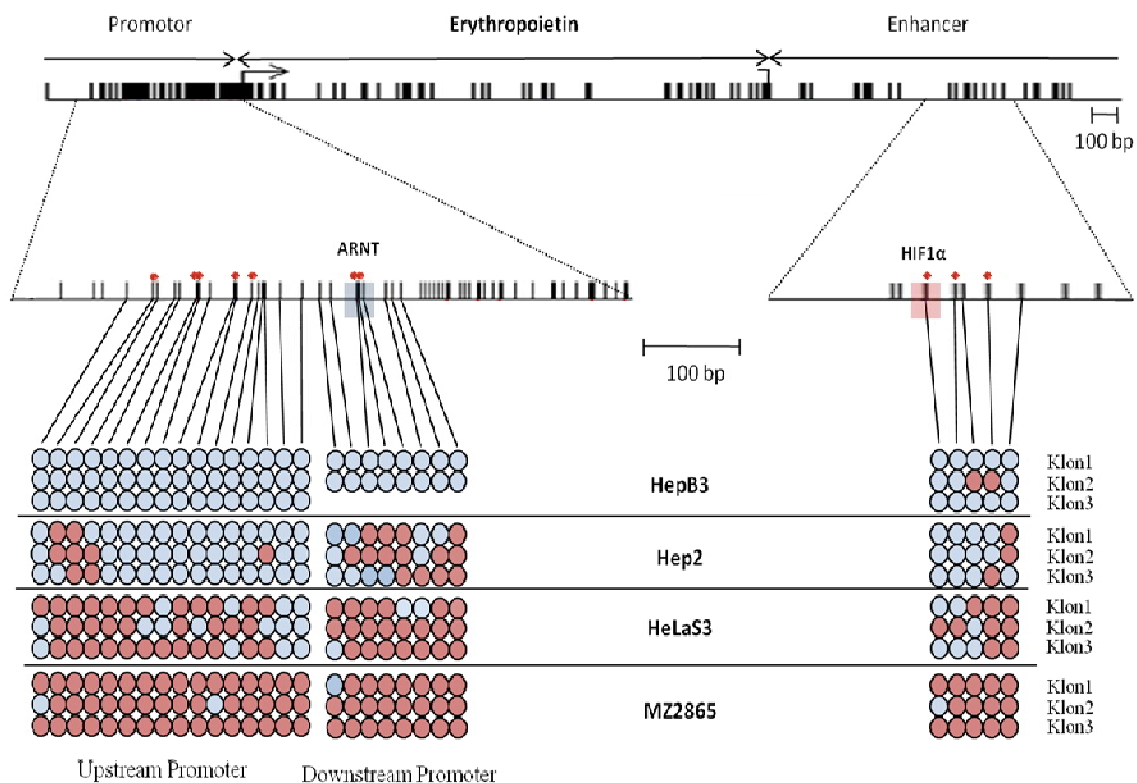


Abb. 3.5: Methylierungsmuster der zwei analysierten Promotorbereiche und des Enhancers von Erythropoietin in den Zelllinien HeLaS3, HepB3, Hep2 und MZ2865. Im oberen Teil der Grafik ist das Gen von Erythropoietin dargestellt. Der Pfeil und der Haken markieren das 5'- und 3'-Ende des Transkripts. Die schwarzen Striche zeigen die CpGs. Darunter sind die mit COBRA analysierten Bereiche vergrößert dargestellt und die Interaktionsstellen für Arnt (blau) und Hif1 α (rot) hervorgehoben. Im unteren Teil ist das Ergebnis der Bisulfidsequenzierung von 3 Klonen der untersuchten Zelllinien grafisch dargestellt, dabei symbolisieren die Kreise die analysierten CpGs. Rote Kreise markieren hierbei CpGs mit einem methylierten Cytosin, blaue Kreise markieren CpGs mit einem unmethylierten Cytosin. Rote Punkte markieren die mittels COBRA untersuchten CpGs.

3.2.1.3 Methylierung des Erythropoietin-Promotors in HNSCC

In den HNSCC- und den zugehörigen Normalgewebeproben wurden die zwei Promotorregionen (Promotor1 und Arnt) und der Enhancer mittels COBRA analysiert. Für den *Upstream* Promoter – Teil und den Enhancer wurden zwei unterschiedliche Restriktionsenzyme in dieser Untersuchung verwendet, um mehr CpGs untersuchen zu können. Abbildung 3.6 zeigt als Beispiel die Ergebnisse der COBRA von Tumorproben und den dazugehörigen Normalgeweben aus zwei Patienten jeweils nebeneinander aufgetragen auf einem 2% igen Agarosegel nach der elektrophoretischen Auftrennung. Es zeigte sich, dass die untersuchte Enhancerregion sowohl in den Tumorproben als auch im Normalgewebe stark methyliert ist (Abb. 3.6 und Tab. 3.6). Für den *Upstream*-Promotorbereich fand sich in den Tumorproben eine Methylierung von 76%. Bei dem Normalgewebe waren mehr als die Hälfte der untersuchten Proben in diesem

Promotorabschnitt methyliert.

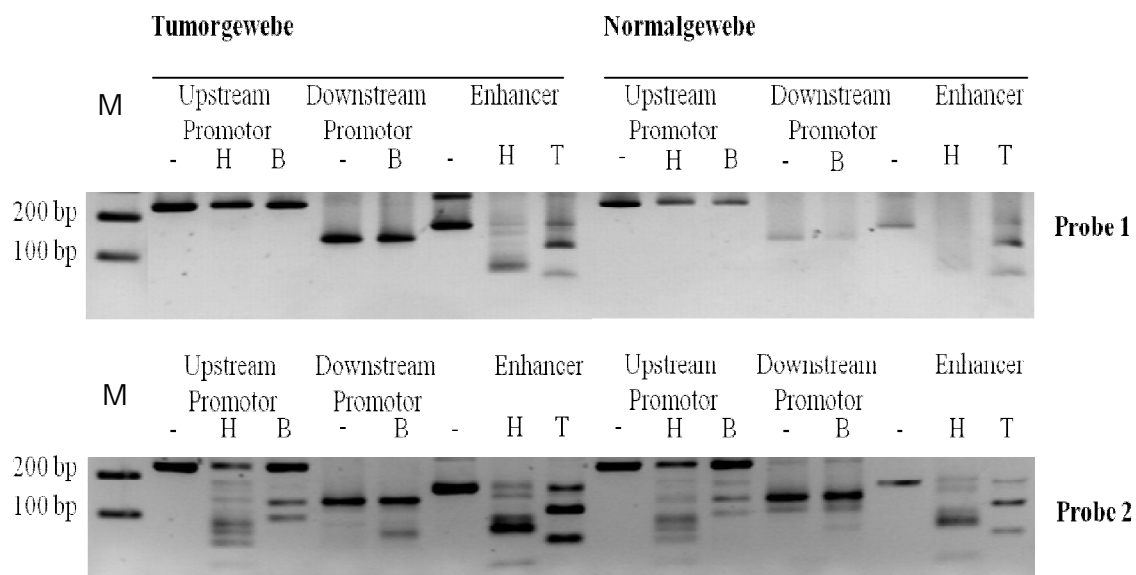


Abb. 3.6: *Combined Bisulfite Restriction Analysis* von zwei Promotorsegmenten (*upstream* Promotor und *downstream* Promotor mit Arnt-Interaktionssequenz) und des Enhancers von Erythropoietin in primären HNSCC und Normalgewebe. Die unverdauten (-) und die verdauten (H – HpyCH4IV, B – BstU1, T – Taq1) PCR-Produkte wurden auf einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch zusammen mit einem 100 bp-Marker (M) aufgetrennt. Probe 1 und Probe 2 sind jeweils die Gewebe von zwei unterschiedlichen Patienten.

Der *Downstream*-Promotorbereich mit der ARNT-Interaktionssequenz war in nur 50% der untersuchten HNSCC-Proben und nur 11% des Normalgewebes methyliert (siehe Tabelle 3.6).

Die Methylierungsanalysen in HNSCC zeigen in allen Proben der Tumore aber auch der Normalgewebe Methylierungen im Enhancer. In beiden analysierten Promotorregionen waren die Tumorproben häufiger methyliert als die Normalgewebeproben.

Tab. 3.6: Häufigkeit der Methylierung der zwei analysierten Promotorsegmente und des Enhancers von Erythropoietin in den untersuchten 54 HNSCC- und 23 Normalgewebeproben in Prozent

	Tumor	Normal
<i>Upstream Promotor</i>	13/17 (76%)	11/19 (58%)
<i>Downstream Promotor</i>	7/14 (50%)	2/18 (11%)
Enhancer	17/17 (100%)	18/18 (100%)

3.2.1.4 Expression von Erythropoietin in den analysierten Zelllinien

Als nächstes wurde überprüft, inwieweit die Methylierung des Erythropoietin-Promotors mit der Expression des Gens korreliert. Dazu wurde von verschiedenen Krebszelllinien, die eine Methylierung zeigten, die relative Expressionsrate in Bezug auf die Expression der Zelllinie HepB3 durch *Real Time* PCR-Analysen bestimmt (Abb. 3.7). Die Expressionsdaten wurden durch die Bestimmung der Expression des *Housekeeping*-Gen GAPDH normalisiert.

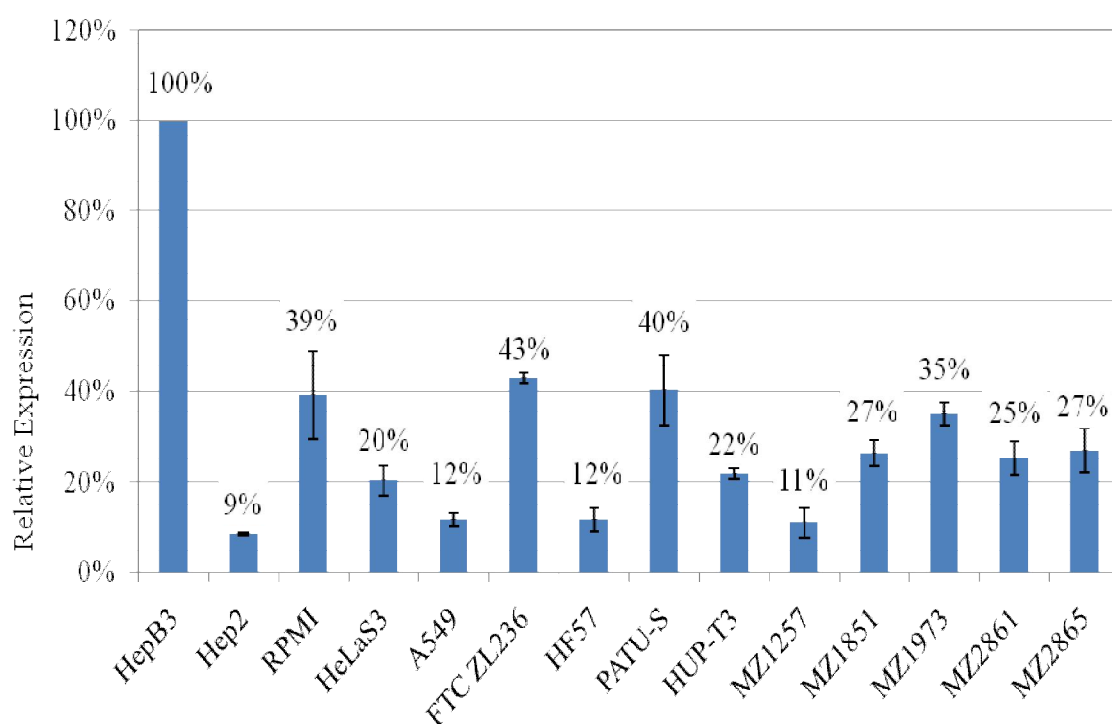


Abb. 3.7: Relative Expression von Erythropoietin in 14 verschiedenen Tumor-Zelllinien.. Die Expression wurde mittels *Real Time*-PCR relativ in Bezug auf Zelllinie HepB3, die im Promotor und Enhancer von Erythropoietin keine Methylierung zeigt, untersucht.

Es zeigte sich bei allen analysierten Zelllinien eine Expression unter 50% im Vergleich zu HepB3. Mit ca. 40% war die Expression der Zelllinien RPMI, FTC ZL236 und Pancreas I am höchsten. Die niedrigste Expression wurde bei der Zelllinie Hep2 mit unter 10% im Vergleich zu HepB3 gefunden (Abb. 3.7 und Anhang Tab. 7.2). Bei den fünf untersuchten Nierenkrebszelllinien lag die durchschnittliche Expression bei 25%. Die Ergebnisse zeigen eine Verringerung der Expression in Zelllinien mit einer Hypermethylierung des Promotors des Erythropoietingens.

3.2.1.5 Expression von Hif1 α

Für die nachfolgenden Versuche wurde überprüft, ob alle verwendeten Zelllinien (HeLaS3, Hep2, RPMI und HepB3) Hif1 α exprimieren, da dieses für eine Induktion der Expression von Erythropoietin notwendig ist. Dafür wurden gleiche Mengen der mRNA der verwendeten Zelllinien in cDNA umgeschrieben und diese anschließend mit spezifischen Primern für Hif1 α amplifiziert. Die Abb. 3.8 zeigt das 2%ige Agarosegel, auf dem je 5 μ l des PCR-Produkts aufgetrennt wurden. Es zeigte sich, dass alle vier Zelllinien Hif1 α exprimieren.



Abb. 3.8: Expressionanalysen von Hif1 α in den Zelllinien HeLaS3, Hep2, RPMI und HepB3 mittels genspezifischer PCR. Es wurden jeweils 5 μ l des PCR-Ansatzes und der H₂O-Kontrolle auf einem 2%igen Agarosegel zusammen mit einem 100 bp-Marker (M) elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.1.6 Inhibierung der Methylierung durch 5'-Aza-2-desoxycytidin

Durch die Zugabe von 5'-Aza-2-desoxycytidin kommt es zu einer Hemmung der DNA Methyltransferasen, wodurch es nach der Zellteilung zu keiner *de novo* Methylierung kommt (Jones et al., 1983). Dadurch sollte in dem nachfolgenden Experiment untersucht werden, inwieweit eine Inhibierung der DNA-Methylierung zu einer Reexpression von Erythropoietin in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration führt. Dazu wurden die Zellen an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit 5'-Aza-2-desoxycytidin behandelt und am dritten Tag entweder bei Hypoxie inkubiert oder bei Normoxie belassen. Nach der Isolation der mRNA und deren Umschreibung in cDNA wurde die Expression mittels *Real Time*-PCR bestimmt, wobei die Expressionsraten relativ zur Expression ohne Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin unter Normoxie (100%) ermittelt wurden. Als Kontrolle wurde zusätzlich die Expression des Gens CA IX analysiert. Der Promotor dieses Gens ist unmethyliert und dieses Gen wird wie Erythropoietin durch Hif1 α Hypoxie-abhängig induziert (Wykoff et al., 2000). Die Expressionsdaten wurden durch die Bestimmung der Expression des *Housekeeping*-Gens GAPDH normalisiert. In Abb. 3.9 sind die Ergebnisse dargestellt.

Die Zelllinie HepB3 zeigte sowohl mit als auch ohne die Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin eine stark erhöhte Induzierung der Expression von Erythropoietin nach der Inkubation unter Hypoxie, wobei die Expression sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie nach der Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin geringer ist als ohne Behandlung. Das Kontrollgen CA IX zeigt das gleiche Expressionsprofil.

Für die Zelllinie HeLaS3, die im Promotor- und im Enhancerbereich stark methyliert ist, stieg die Expression unter Normoxie nach der Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin auf das Doppelte im Vergleich zur Expression ohne die Behandlung. Durch die Inkubation unter Hypoxie war dann noch eine Steigerung der Expression auf das 2,5 fache zu ermitteln. CA IX zeigte nur eine gesteigerte Induzierung der Expression durch Hypoxie ohne die Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin. Nach der Behandlung zeigte sich keine Expressionssteigerung durch Hypoxie.

Bei der Zelllinie Hep2, die sowohl im Promotor als auch im Enhancer Methylierungen aufwies, konnte ohne die Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin nur eine geringe Expressionssteigerung durch Inkubation unter Hypoxie gefunden werden. Nach der Behandlung ist eine Expressionssteigerung um den Faktor 2 unter Normoxie im Vergleich zu den unbehandelten Zellen zu verzeichnen. Diese wurde durch die Inkubation unter Hypoxie nochmals um das Vierfache gesteigert. Die Kontrolle CA IX zeigte sowohl mit als auch ohne die Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin eine starke Induzierung der Expression durch Hypoxie.

Die Zelllinie MZ1851 zeigte erst nach der Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin eine Expressionssteigerung um mehr als das Dreifache durch die Inkubation unter Hypoxie. Für das Kontrollgen CA IX konnte sowohl mit als auch ohne eine Behandlung eine Steigerung der Expression unter Hypoxie gefunden werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse eine Reexpression von Erythropoietin, ausgelöst durch die Verhinderung einer de novo-Methylierung nach Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin.

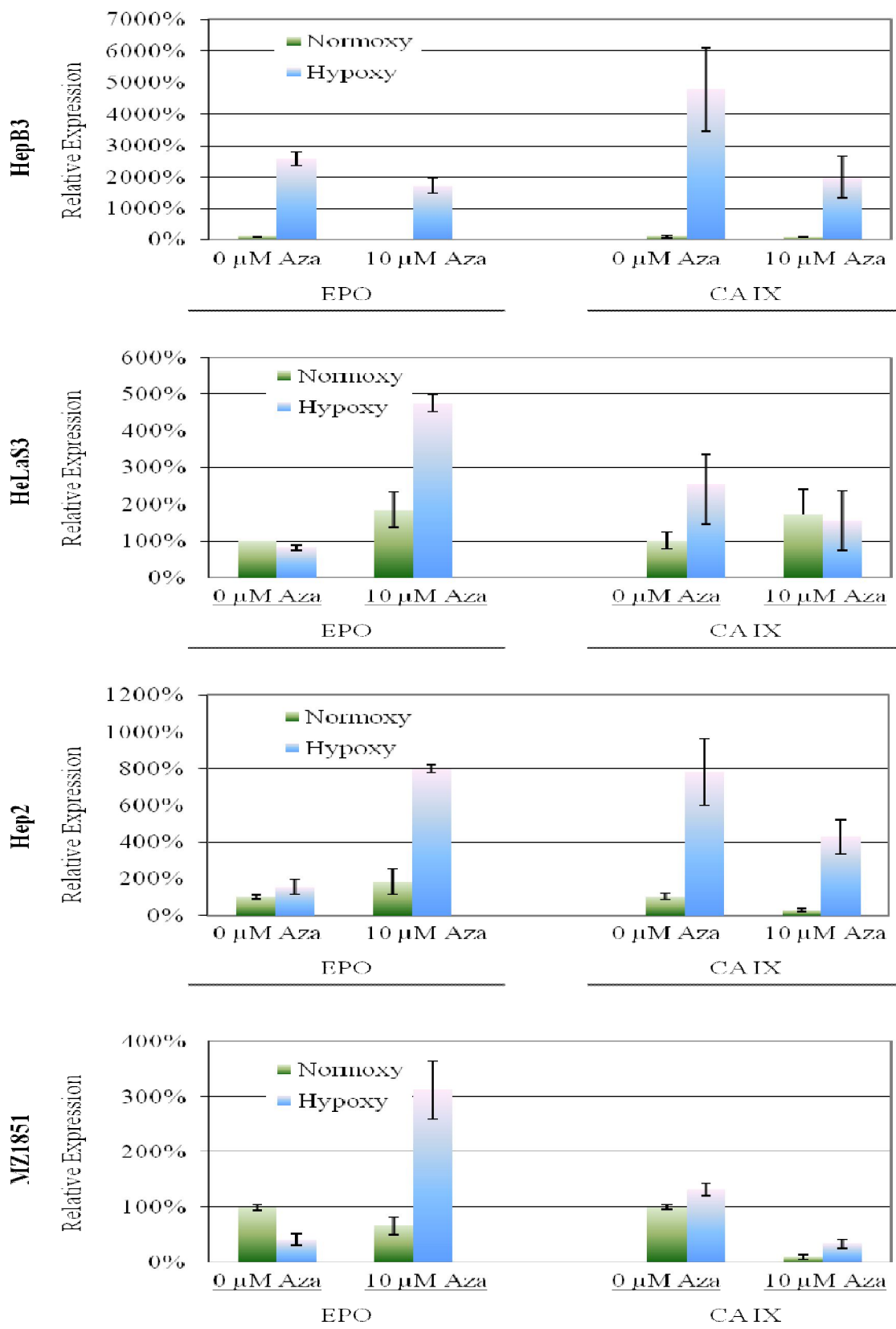


Abb. 3.9: Erythropoietin-Expression mit und ohne eine Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin unter Normoxie (grüner Balken) und Hypoxie (blauer Balken) in den Zelllinien HepB3, Hep2, HeLaS3 und MZ1851 durchgeführt. Die Expression wurde für jede Zelllinie relativ zur Expression ohne die Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin unter Normoxie (100%) durch RealTime-PCR-Analysen (mind. 3fach-Bestimmung) bestimmt. Die Expressionsdaten wurden gegen die Expression von GAPDH normalisiert.

3.2.1.7 Auswirkungen der Methylierungen von Promotor und Enhancer

Mit dem Luziferase-Assay sollte untersucht werden, welchen Einfluss eine Methylierung des Promotors bzw. des Enhancers auf die Expression des Reportergens und die Induktion dessen Expression durch Hypoxie hat. Dazu wurden Konstrukte des pRL-Null-Vektors mit der Sequenz des Erythropoietinpromotors, die auch die Arnt-Interaktionssequenz beinhaltet, mit der Enhancersequenz, inklusive der Interaktionssequenz für Hif1 α und mit beiden Sequenzen zusammen kloniert. Mit diesen Konstrukten wurden die Zelllinien HepB3, Hep2 und HeLaS3 transfiziert und anschließend für 24h bei Normoxie oder Hypoxie inkubiert, bevor die Expression des Reportergens mittels Luminometer ausgewertet wurde. Zur Normalisierung der Werte wurde zusätzlich ein Kontrollvektor mittransfiziert. Der Versuch wurde zweimal durchgeführt und beide Versuche zeigen sehr ähnliche Ergebnisse. Die Ergebnisse eines Versuchs sind beispielhaft in Abb. 3.10 dargestellt. Sie zeigen, dass die Klonierung des Promotors in allen drei Zelllinien nur eine geringe Expressionssteigerung des Reportergens im Vergleich zum leeren Vektor zur Folge hatte. Die Steigerung der Expression war bei der Zelllinie Hep2 am größten. Auch durch Hypoxie hatte auf die Konstrukte mit dem Promotor allein auf die Expression wenig Einfluss. Durch die Transfektion der Zellen mit dem Enhancer-Konstrukt wurde die Expression des Reportergens unter Normoxie-Bedingungen sowohl bei HepB3 als auch bei HeLaS3 um mehr als das 10fache gesteigert.

Bei der Zelllinie Hep2 zeigte die Transfektion des Enhancer-Konstrukts eine geringere Expressionssteigerung. In allen drei Zelllinien wurde durch Hypoxie eine sehr starke Erhöhung der Expression induziert. Durch die Klonierung von Promotor und Enhancer zusammen kam es in allen drei Zelllinien zu einem Anstieg der Expression unter Normoxie, die aber im Fall von HepB3 und HeLaS3 geringer war, als durch den Enhancer allein und höher als durch den Promotor allein. Für Hep2 war die Expression höher als mit der Enhancer-Sequenz allein und entsprach damit ungefähr der Expression der Konstrukte mit der Promotorsequenz. Durch Hypoxie wurde wie auch mit den Konstrukten mit der Enhancer-Sequenz allein eine starke Expressionssteigerung induziert, die bei allen drei Zelllinien im Vergleich zum Enhancer-Konstrukt nur geringfügig kleiner ist.

Es zeigte sich bei allen drei Zelllinien, dass eine *in vitro* Methylierung der Konstrukte zu einer starken Verminderung der Expression führte, die teilweise noch geringer war als die des leeren Vektors.

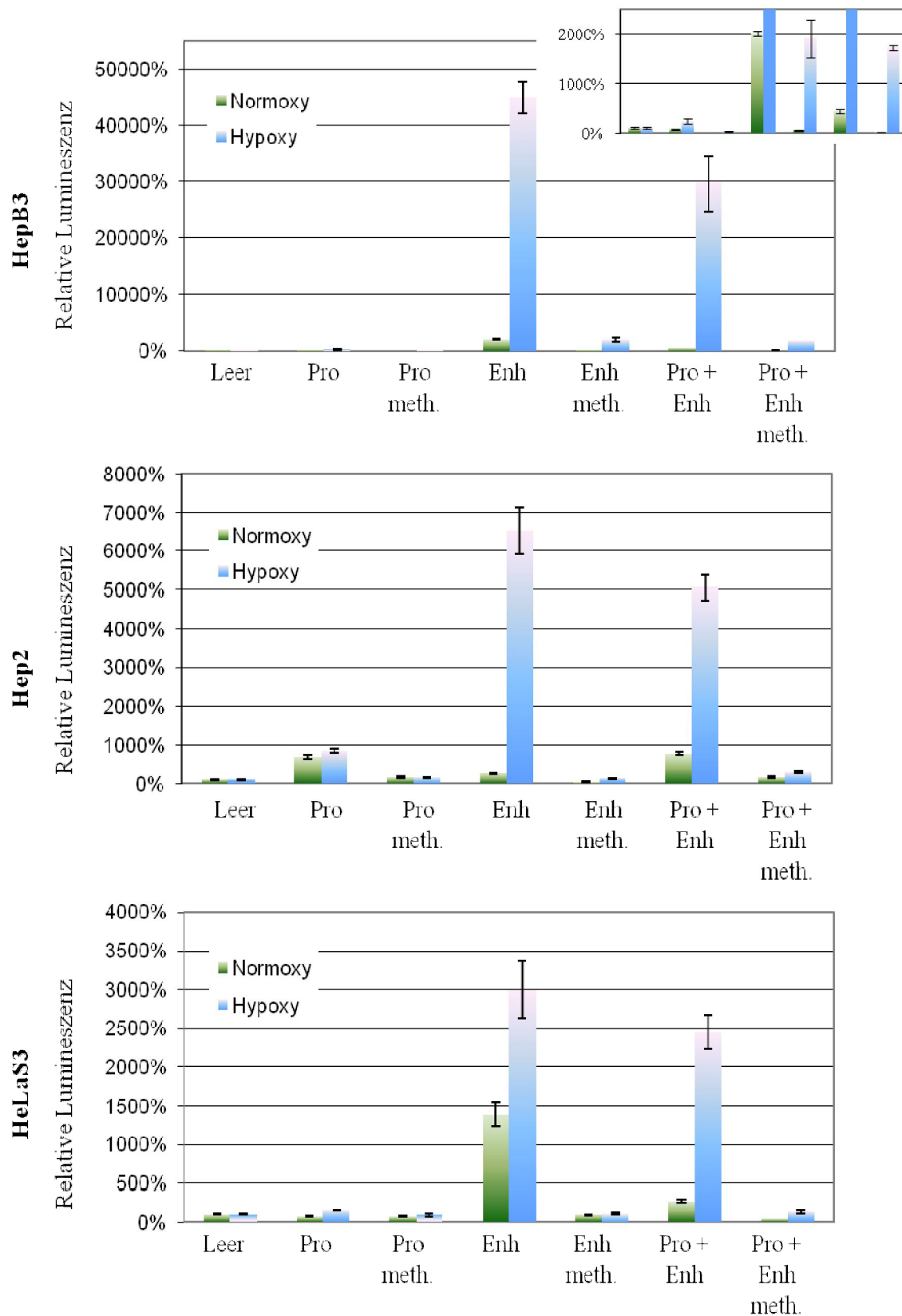


Abb. 3.10: Darstellung der Ergebnisse des Luziferase Assays. Es wurde die Expression des Reportergens unter Einfluss des Promoters (Pro) und des Enhancers (Enh) von Erythropoietin unter Hypoxy (blauer Balken) und Normoxie (grüner Balken) in Bezug auf den leeren Vektor in den Zelllinien HepB3, Hep2 und HeLaS3 analysiert. Ebenfalls wurde die Expression in den *in vitro* methylierten Konstrukten (meth.) analysiert. Das Inlet im Diagramm der Zelllinie HepB3 zeigt eine vergrößerte Darstellung des unteren Diagrammbereichs.

3.2.1.8 Regulation der Genexpression von Erythropoietin über die Modifikation des Chromatins

Bis heute konnte noch nicht endgültig geklärt werden, inwieweit die Methylierung der DNA mit der Modifikation des Chromatins zusammenhängt. Ziel der Chromatin Immunopräzipitation war es, zu untersuchen, ob es bei der Genregulation von Erythropoietin einen Zusammenhang zwischen der Methylierung des Promotors und des Enhancers und der Induzierung einer Modifizierung des Chromatins durch Inkubation unter Hypoxie in diesen Bereichen gibt. Hierfür wurden Antikörper gegen Acetyliertes Histon 3, ein Marker für Euchromatin, und Antikörper gegen Trimethyliertes Lysin 9 Histon 3, ein Marker für Heterochromatin, verwendet. Die Menge der präzipitierten DNA wurde mittels *Real Time*-PCR bestimmt, gegen die mit Antikörpern gegen Histon 3 präzipitierte DNA normalisiert und der Negativwert abgezogen. Der Versuch wurde dreimal in der Zelllinie Hep2 durchgeführt, welche sowohl im Promotor als auch im Enhancer Methylierungen aufweist, und in Abb. 3.11 sind die Ergebnisse eines Versuches exemplarisch dargestellt. Für eine bessere Veranschaulichung der Ergebnisse wurden die Normoxie-Werte auf 100% gesetzt und die Hypoxie-Werte entsprechend berechnet.

Die Ergebnisse zeigen sowohl für den Promotor als auch für den Enhancer eine Zunahme der Acetylierung von Histon 3 und eine Reduktion der Trimethylierung induziert durch die Inkubation unter Hypoxie. Für beide untersuchten Bereiche war die Trimethylierung des Histons 3 am Lysin 9 unter Hypoxie weniger als 50% im Vergleich zur Normoxie.

Die Ergebnisse zeigen eine Modifikation des Chromatins in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration.

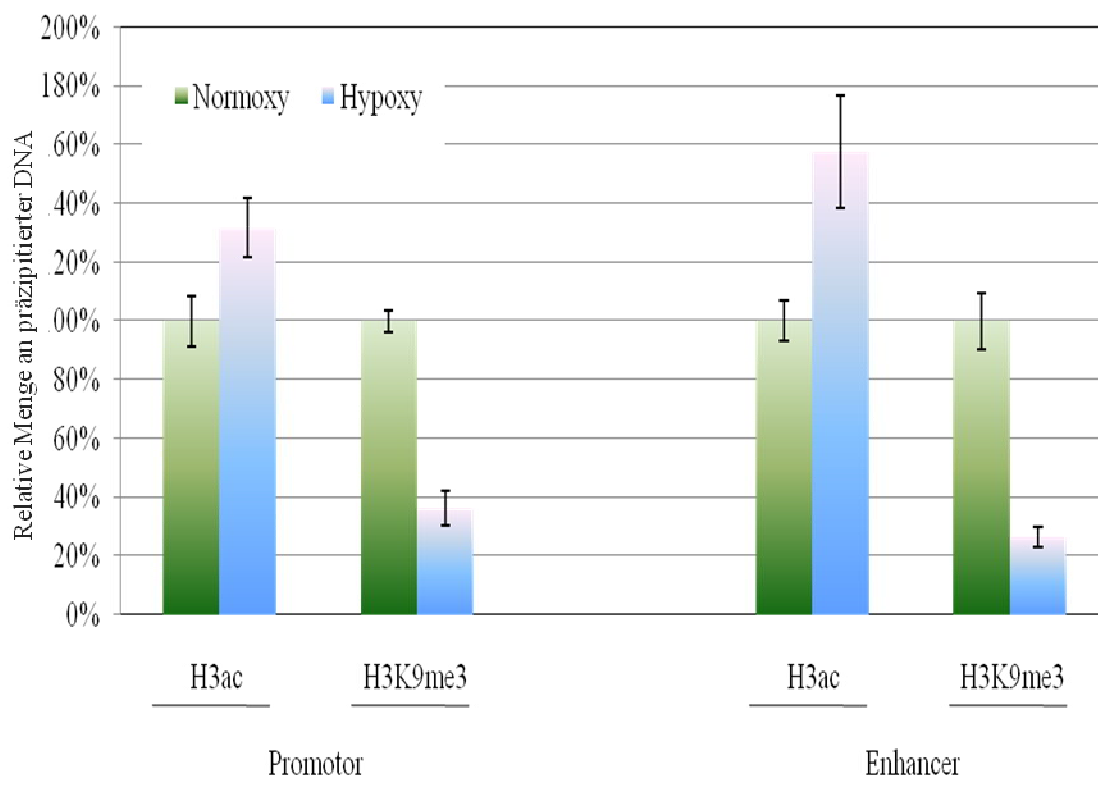


Abb. 3.11: Modifikation des Chromatins unter Normoxie bzw. Hypoxie. Die Chromatin Immunpräzipitationsanalyse wurde mit Antikörpern gegen acetyliertes Histon (AcH3) und trimethyliertes Lysin 9 Histon 3 (tMK9H3) in der Zelllinie Hep2 nach Inkubation unter Normoxie (grüner Balken) oder Hypoxy (blauer Balken) durchgeführt und durch eine Präzipitation mit Antikörpern gegen Histon 3 normalisiert. Die präzipitierte DNA wurde durch *Real Time*-Analysen in Bezug auf die jeweiligen DNA-Mengen unter Normoxie bestimmt.

3.2.2 Auswirkung der Reexpression von Erythropoietin in der HNSCC-Zelllinie Hep2

In verschiedenen Publikationen wurde gezeigt, dass Erythropoietin neben seiner Funktion in der Regulation der Bildung von Erythrozyten auch in nicht-hämopoetischen Geweben Einfluss auf die Zellproliferation und das Apoptose-Verhalten der Zellen hat (Anagnostou et al., 1990; Eefting et al., 2004; Ribatti et al., 1999; Wojchowski et al., 1999). In den nachfolgenden Experimenten sollte untersucht werden, wie sich die Reexpression von Erythropoietin auf eine Krebszelle auswirkt. Die Untersuchungen wurden mit der HNSCC-Zelllinie Hep2 durchgeführt, da diese sowohl im Promotor als auch im Enhancer Methylierungen hatte und eine sehr geringe Expression von Erythropoietin zeigte.

3.2.2.1 Expression des Erythropoietin-Rezeptors

In einer Voruntersuchung wurde überprüft, ob vier verschiedene Zelllinien, unter anderem auch die in den folgenden Untersuchungen verwendete Zelllinie Hep2, den Rezeptor für Erythropoietin exprimieren. Dies ist notwendig, damit das Protein eine Funktion erfüllen kann.

Für den Nachweis der Expression wurde die mRNA der Zelllinien in cDNA umgeschrieben und anschließend eine *Real Time*-PCR mit spezifischen Primern für den EPO-Rezeptor durchgeführt. Die cDNA-Mengen wurden durch eine *Real Time*-PCR für das *Housekeeping*-Gen GAPDH abgeglichen.

Es zeigte sich, wie in Abb. 3.12 graphisch dargestellt, dass alle vier Zelllinien den Rezeptor exprimieren, wobei Hep2 und RPMI die höchste Expression und HeLaS3 die niedrigste Expression aufwies.

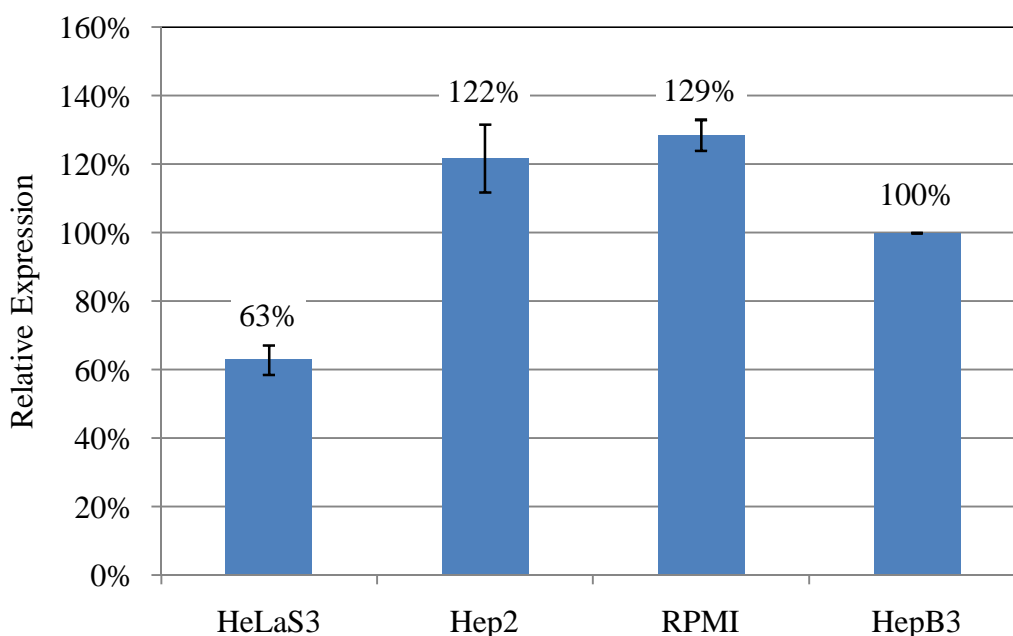


Abb. 3.12: Expressionanalysen des Erythropoietin-Rezeptors in den Zelllinien HeLaS3, Hep2, RPMI und HepB3. Die gesamte mRNA der Zellen wurde mittels OligodT-Primern in cDNA umgeschrieben und die relative Expression von Erythropoietin in Bezug auf die Expression in HepB3 (100 %) durch RealTime-PCR (3fach-Bestimmung) bestimmt. Die Expressionsdaten wurden gegen die Expression von GAPDH normalisiert.

3.2.2.2 Lokalisation des reexprimierten Erythropoietin in der Zelllinie Hep2

Des Weiteren wurde eine Untersuchung der Lokalisation des reexprimierten Erythropoietin durchgeführt. Dafür wurden die Zellen transient mit dem Fluoreszenzkonstrukt pEGFP-Erythropoietin transfiziert. Um den Zellkern sichtbar zu machen, wurden die Zellen anschließend mit DAPI gefärbt. Aufnahmen einer Zelle sind in Abb. 3.13 dargestellt.

Man sieht in den Aufnahmen, dass Erythropoietin nur im Cytoplasma und nicht im Zellkern zu finden war. Im Cytoplasma war das Protein in der gesamten Zelle verteilt, akkumulierte sich an einigen Punkten, die aber keinem bestimmten Kompartiment zuzuordnen waren.

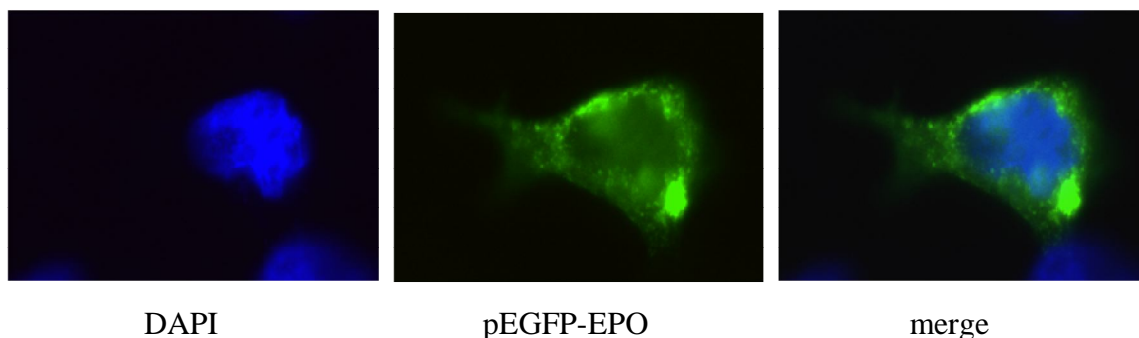


Abb. 3.13: Lokalisation von pEGFP-EPO in Hep2-Zellen. Zusätzlich wurde eine Kernfärbung mit DAPI vorgenommen. Die Aufnahmen erfolgten mit einer 630fachen Vergrößerung.

3.2.2.3 Einfluss von Erythropoietin auf die Kolonie-Bildung der transfizierten Hep2-Zellen

Im folgenden Versuch sollte untersucht werden, wie sich die Reexpression von Erythropoietin auf das Vermögen der transfizierten Zellen auswirkt, unter Normoxie oder Hypoxie Kolonien zu bilden. Dazu wurden die Hep2-Zellen mit dem Vektorkonstrukt pCMV-Flag-EPO transfiziert und die transfizierten Zellen durch Zugabe von G418 selektiert. Die Zellen wurden anschließend unter Hypoxie oder Normoxie inkubiert, bis sich Kolonien ausgebildet haben. Diese Kolonien wurden angefärbt und ausgezählt. Der Versuch wurde in drei unabhängigen Experimenten wiederholt. Die Mittelwerte der drei Versuche sind inklusive der Standardabweichungen und der Ergebnisse der Signifikanztests in Abb. 3.14 graphisch dargestellt und im Anhang Tabelle 7.4 aufgelistet.

Es zeigte sich, dass nach der Transfektion mit pCMV-Flag-EPO unter Normoxie fast dreimal so viele Kolonien zu verzeichnen waren wie nach der Transfektion mit dem leeren Vektor pCMV-Flag. Damit war der Wert für die Erythropoietin-exprimierenden Zellen signifikant höher (T-Test $p=0,0315$). Auch unter Hypoxie bildeten sich nach der Transfektion mit pCMV-Flag-EPO doppelt so viele Kolonien aus wie nach der Transfektion mit pCMV-Flag. Hierbei war ebenfalls die Anzahl der Kolonien der Erythropoietin-exprimierenden Zellen signifikant höher (T-Test $p=0,0316$).

Die Ergebnisse zeigen eine höhere Kolonienzahl von Hep2-Zellen nach der Transfektion des Konstrukts mit der EPO-cDNA.

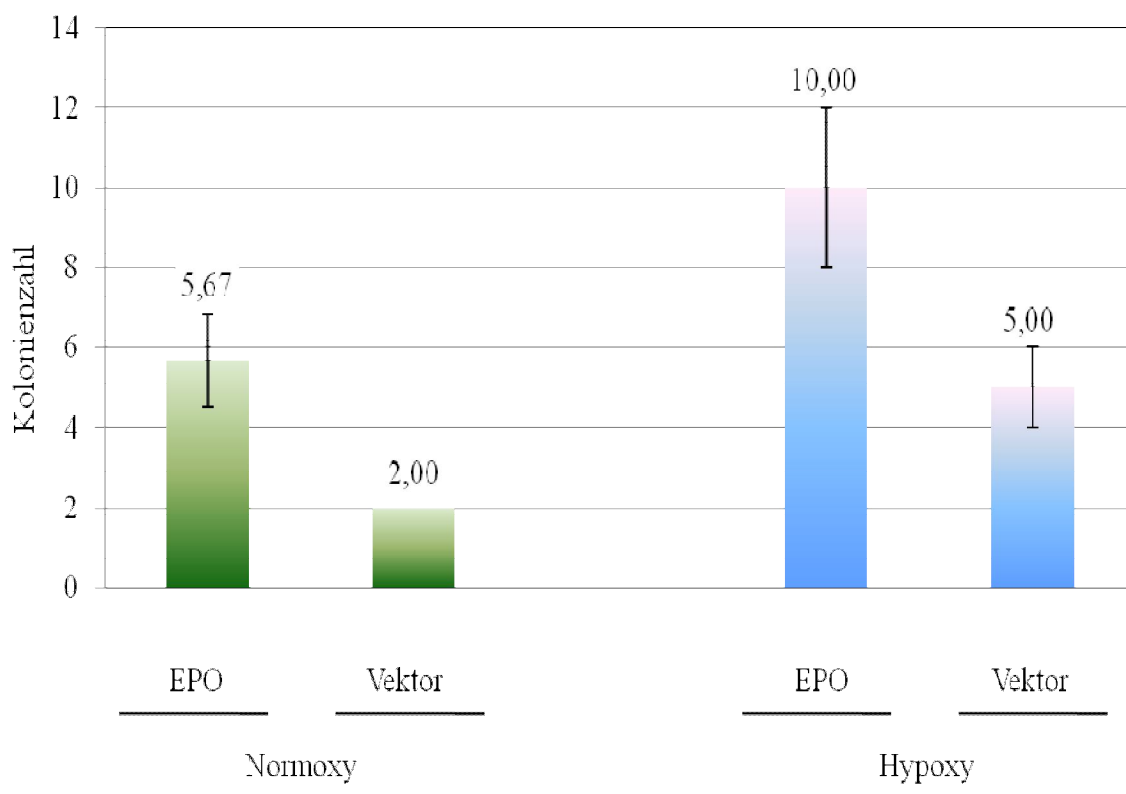


Abb. 3.14: Graphische Darstellung der Kolonienzahl. Die Hep2-Zellen wurden mit pCMV-Flag-EPO oder pCMV-Flag transfiziert und transfizierte Klone durch eine Behandlung mit G418 unter Hypoxy bzw. Normoxie selektiert. Die entstandenen Kolonien wurden anschließend gefärbt und ausgezählt.

3.2.2.4 Stabile Transfektion von Hep2-Zellen mit pCMV-Flag-EPO und pCMV-Flag

Für die zwei anschließenden Untersuchungen wurden die Hep2-Zellen stabil mit den Konstrukten pCMV-Flag-EPO und pCMV-Flag transfiziert. Zur Selektion der exprimierenden Zellen wurde dem Medium G418 zugesetzt und dieses auch während

der Versuche beibehalten. Zur Kontrolle der Expression wurde die mRNA aus den Klonen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Nachdem durch die Amplifikation des *Houskeeping*-Gens GAPDH überprüft worden war, dass in allen Proben die RNA-Isolation und anschließende cDNA-Synthese erfolgreich war (Ergebnisse nicht gezeigt), wurde die cDNA mit den entsprechenden Primern, von denen einer im pCMV-Flag-Vektor und einer im EPO-Gen liegt, amplifiziert. 5 µl des PCR-Produkts wurden auf einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel ist in Abb. 3.15 dargestellt.

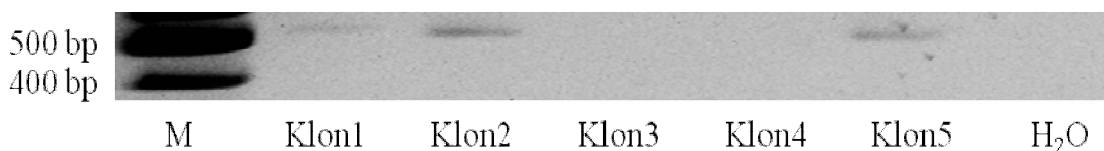


Abb. 3.15: Analyse der Erythropoietin-Expression in stabil mit pCMV-Flag-EPO transfizierten Hep2-Klonen durch eine semiquantitative PCR. Es wurden jeweils 5 µl des PCR-Produktes einschließlich einer H₂O-Kontrolle und eines 100 bp-Marker (M) auf einem 2%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt.

Es war ersichtlich, dass nur die Klone 1; 2 und 5 Erythropoietin exprimieren. Mit diesen Klonen wurden die folgenden Experimente durchgeführt.

3.2.2.5 Einfluss der Reexpression von Erythropoietin auf die Zellteilung der transfizierten Hep2-Zellen

Durch die Bestimmung der Zellzahl sollte untersucht werden, wie sich die Reexpression von Erythropoietin auf Proliferationsverhalten einer Zellpopulation unter Normoxie und unter Hypoxie auswirkt. Dazu wurden 50000 Zellen der drei stabil mit pCMV-Flag-EPO (Klon 1; 2 und 5) und der drei stabil mit pCMV-Flag (Kontrolle) transfizierten Hep2-Klone ausgesät und nach 24h gezählt, um einen genauen Anfangswert zu erhalten. Für Normoxie wurden die Zellen nochmals nach 48h (da nach 72h schon ein Plateau erreicht war) ausgezählt und der Zuwachs in Prozent berechnet. Für Hypoxie wurden die Zellen nochmals nach 72h ausgezählt und ebenfalls der Zuwachs in Prozent berechnet. Diese Zählungen wurden für jeden Klon in drei unabhängigen Ansätzen durchgeführt und aus diesen drei Ansätzen die Mittelwerte für den Zellzuwachs

gebildet. Die Mittelwerte aus den drei verwendeten Klonen sind in Abb. 3.16 graphisch dargestellt und inklusive der Standardabweichungen und der Ergebnisse der Signifikanztests im Anhang Tabelle 7.5 aufgelistet.

Unter Normoxie haben sich die pCMV-Flag-transfizierten Zellen in 48h verdoppelt, während sich die Zellen der Erythropoietin-exprimierenden Klone verdreifacht haben. Damit war der Zuwachs der mit pCMV-Flag-EPO-transfizierten Klone signifikant höher als der der Zellen, die kein Erythropoietin exprimieren (T-Test 0,018).

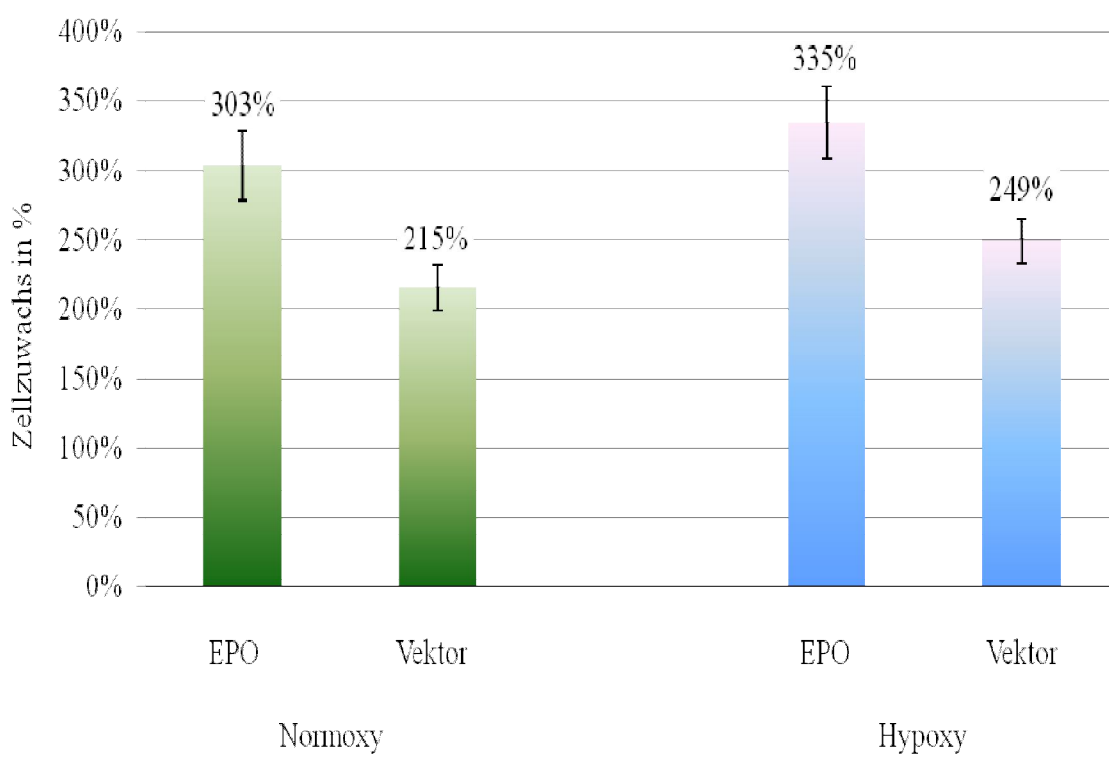


Abb. 3.16 : Zellzuwachs der Hep2-Klone mit einer stabilen pCMV-Flag-EPO- und pCMV-Flag-Expression. Der Zuwachs an Zellen wurde unter Normoxie (nach 48h) und unter Hypoxy (nach 72h) ermittelt und in Prozent angegeben.

3.2.2.6 Einfluss der Reexpression von Erythropoietin auf das Wachstum von Kolonien im Softagar

Ziel der Bestimmung der Koloniengröße war es, zu untersuchen, welchen Einfluss die Reexpression von Erythropoietin auf die Zellproliferstion einer Einzelzelle unter Hypoxie oder Normoxie hat. Dazu wurden die vereinzelt Zellen der stabil mit pCMV-Flag und pCMV-Flag-EPO transfizierten Hep2-Klone (für pCMV-Flag-Epo Klon1; 2

und 5) in Softagar eingebettet und unter Hypoxie oder Normoxie inkubiert. Nach vier Wochen wurden die Kolonien angefärbt, fotografiert und vermessen. Es wurden je 50 Kolonien der drei verwendeten Erythropoietin-exprimierenden Klone 1; 2 und 5 unterm Mikroskop fotografiert, mit Hilfe des Computerprogramms *Motic Images Plus 2.0* vermessen und der Mittelwert berechnet. Als Kontrolle wurden 3 Klone verwendet, die stabil mit pCMV-Flag transfiziert wurden. Tabelle 7.6 im Anhang zeigt die Mittelwerte der Klone mit Standardabweichung und berechneter Signifikanz. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.17 graphisch dargestellt.

Es zeigte sich schon visuell, dass unter Normoxie die Kolonien im Allgemeinen größer sind als unter Hypoxie. Unter Normoxie waren die Kolonien der Erythropoietin-exprimierenden um ungefähr 60% größer als die Kolonien der nicht-exprimierenden Zellen. Dieser Größenunterschied war mit $p=0,009$ signifikant (T-Test). Auch unter Hypoxie waren die Kolonien der Erythropoietin-exprimierenden Zellen größer als die Kolonien der nicht-exprimierenden Zellen. Der Größenunterschied betrug ca. 20% und war mit $p=0,0003$ ebenfalls signifikant (T-Test).

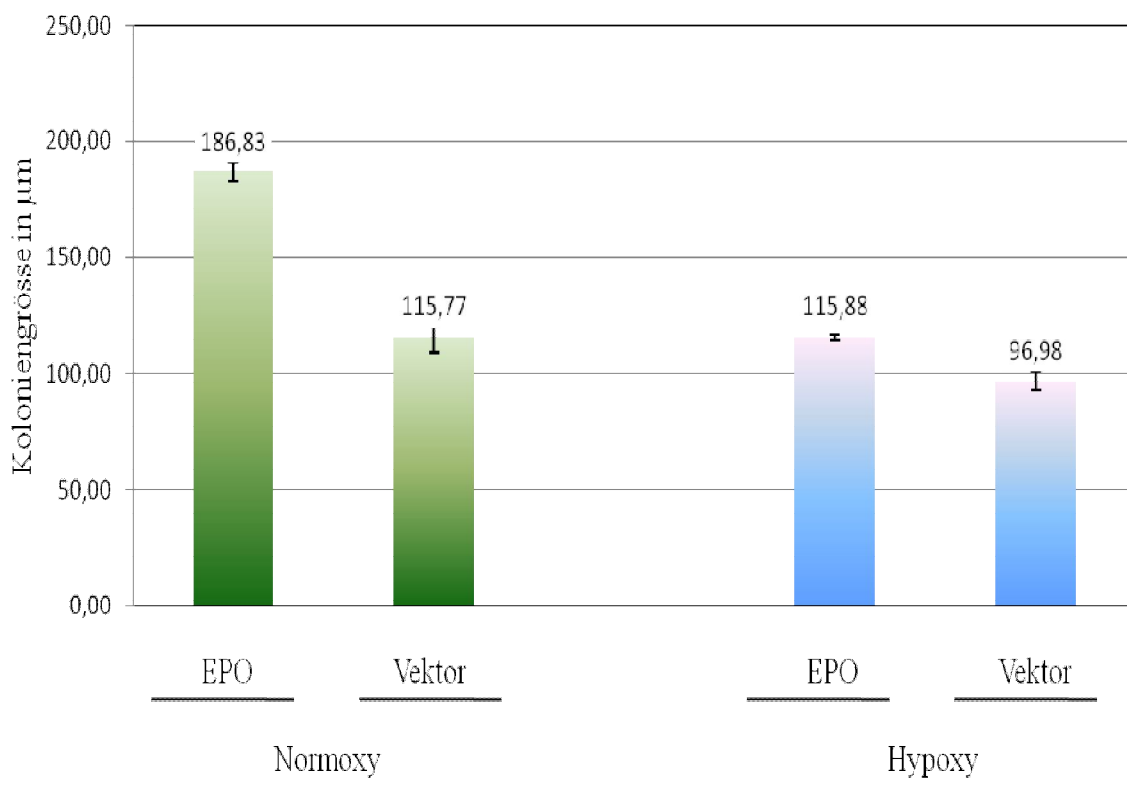


Abb. 3.17: Mittelwerte der Koloniengrößen der drei Hep2-Klone mit einer stabilen pCMV-Flag-EPO- bzw. pCMV-Flag-Expression unter Normoxie und unter Hypoxie im Softagar-Assay.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Rexpression von Erythropoietin in der HNSCC-Zelllinie Hep2 zur Ausbildung größerer Kolonien im Softagar führt.

4. Diskussion

4.1 Methylierungsstatus verschiedener Tumorsuppressorgene in HNSCC

Jedes Jahr werden weltweit über 500000 Fälle von HNSCC diagnostiziert. Er ist damit einer der häufigsten Tumorerkrankungen (Shaw et al., 2006a). Je früher der Tumor erkannt wird, desto höher sind die Überlebens- und Heilungschancen für den Betroffenen. Deshalb ist es notwendig, neue Biomarker für eine möglichst frühzeitige Diagnose zu finden. Promotorhypermethylierung verschiedener tumor-assoziiierter Gene in Körperflüssigkeiten kann zum Beispiel ein frühzeitiges Anzeichen für die Entstehung von Tumoren sein. Zur Diagnostik wird dafür DNA aus dem Serum von Patienten isoliert und die Promotormethylierung mittels methylierungsspezifischer PCR (MSP) analysiert. Diese Methode wird schon bei Patienten mit Lungenkrebs für die Untersuchung des Methylierungsstatus der Gene p16, DAPK1 und MGMT verwendet (Esteller et al., 1999). Promotorhypermethylierung wurde schon häufig in HNSCC gefunden und viele Studien zeigten auch schon einen Zusammenhang zwischen der Promotorhypermethylierung von verschiedenen Tumorsuppressorgenen und der Entstehung von Krebs (Worsham et al., 2006). In dieser Arbeit wurde der Methylierungsstatus der Promotoren von 15 Tumorsuppressoren, die in Apoptose, Zellzyklus-Kontrolle, Zell-Zell-Adhäsion und DNA-Reparatur involviert sind, in HNSCC und zugehörigem Normalgewebe analysiert und mit den klinischen Daten korreliert.

Unter anderem wurde die Promotormethylierung verschiedener Mitglieder der RASSFs (RASSF1A, RASSF2, RASSF4 und RASSF5) und einiger Downstream Effektoren (MST1, MST2, LATS1 und LAT2) untersucht. In einigen vorhergehenden Arbeiten dieser Arbeitsgruppe zeigte sich, dass RASSF1A in verschiedenen primären Tumoren einschließlich Lungentumoren häufig methyliert ist (40-80%) (Dammann et al., 2000;

Dammann et al., 2005; Dammann et al., 2001). In HNSCC konnte in dieser Arbeit aber nur eine geringe Methylierungsfrequenz von 18% detektiert werden, was annehmen lässt, dass in diesen Tumoren die Promotorhypermethylierung nur selten eine Rolle in der Inaktivierung dieses Gens spielt. Auch andere Arbeitsgruppen fanden nur eine geringe Methylierungsrate in HNSCC (Hasegawa et al., 2002; Hogg et al., 2002; Hoque et al., 2004). Die Arbeitsgruppe Hogg et al. konnte aber häufig einen LOH von 3p21.3 (66%) nachweisen, was ebenfalls zu einem Verlust der RASSF1A-Expression führt (Hogg et al., 2002). Diese Inaktivierung von RASSF1A durch zwei verschiedene Ereignisse (Methylierung und LOH) deuten an, dass der Verlust der RASSF1A-Expression ein wichtiger Schritt in der Tumorgenese von HNSCC darstellt. Interessanterweise wurde eine Methylierung von RASSF1A nur in den Tumorproben und nicht im Normalgewebe nachgewiesen. Außerdem korrelierte die Methylierung des RASSF1A-Promotors mit einem häufigeren Befall der Lymphknoten. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine Inaktivierung von RASSF1A in HNSCC in Verbindung mit einer häufigeren Metastasierung des Tumors steht. Auch für RASSF4 konnte eine geringe Methylierungsrate von 14% in den HNSCC-Proben gefunden werden. Diese Ergebnisse decken sich mit denen, die eine andere Arbeitsgruppe für Nasopharyngeal Karzinoma erhalten haben (Chow et al., 2004). Auffällig war jedoch, dass keine Probe des Normalgewebes Methylierungen im RASSF4-Promotor zeigte und ein methylierter Promotor nur in Patienten zu finden war, die während des Beobachtungszeitraums ein Rezidiv bekamen. Ein weiterer interessanter Fakt ist, dass ein methylierter Promotor mit einem höheren Tumorstadium (ausschließlich Stadium IV) und wie auch bei RASSF1A mit einem häufigeren und stärkeren Befall der Lymphknoten korreliert. Diese Ergebnisse implizieren, dass die Methylierung des Promotors von RASSF4 weniger eine Folge der Exposition mit Noxen wie Tabak oder Alkohol ist, sondern erst während der späteren Karzinogenese stattfindet und zu einer erhöhten Aggressivität des Tumors führt. Für RASSF2 und RASSF5 (NORE1) konnte zum ersten Mal eine häufige Methylierung des Promotors in HNSCC (41% bzw. 58%) gezeigt werden. Zhang et al. haben für Nasopharyngeal Karzinoma eine Methylierungsfrequenz von 51% für RASSF2 gezeigt und korrelierten diese mit der Entstehung von Lymphknotenmetastasen (Zhang et al., 2007). In den Untersuchungen dieser Arbeit konnte aber kein Zusammenhang der Promotormethylierung von RASSF2 mit einem häufigeren Befall der Lymphknoten gefunden werden. Die proapoptotische Kinase MST1 ist in fast allen untersuchten Fällen im Promotor methyliert. Es ist

dementsprechend anzunehmen, dass die Inhibierung der Expression von MST1 durch zum Beispiel eine Methylierung des Promotors ein häufiges Ereignis in der Karzinogenese von HNSCC ist. Dagegen fand sich für MST2 kaum eine Methylierung in den untersuchten HNSCC-Proben. Eine Studie in Colorectal-Tumoren zeigte, dass ein Verlust der cytoplasmatischen MST1 assoziiert ist mit einem höheren T- und/oder N-Stadium, einem höheren Tumor-Grad und einer schlechteren Prognose (Minoo et al., 2007). Auch in dieser Arbeit fand sich ein Zusammenhang der Promotormethylierung von MST1, einer schlechteren Differenzierung und einem höheren T- und/oder N-Stadium. Für LATS1 und LATS2 konnte nur eine geringe Methylierungsrate in den HNSCC-Proben gefunden werden. In anderen Tumoren wie Sarkoma, Brustkrebs und Astrozytoma wurde dagegen schon eine Hypermethylierung für diese Gene beschrieben (Jiang et al., 2006; Seidel et al., 2007; Takahashi et al., 2005). Die *Large Tumor Suppressoren* LATS1 und LATS2 sind MST- und RASSF-bindende Proteine, die in die Regulation der Apoptose und des Mitose-Austritts involviert sind (Guo et al., 2007; Matallanas et al., 2007). Es zeigte sich aber, dass eine Methylierung des Promotors sowohl von LATS1 als auch von LATS2 mit einer schlechteren Differenzierung assoziiert ist.

Für die Tumorsuppressorgene RAR β und DAPK wurden ungefähr zwei Drittel der Tumorproben methyliert gefunden. Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Untersuchungen überein. Es ist also anzunehmen, dass die Inaktivierung dieser Gene eine wichtige Rolle in der Tumorgenese von HNSCC spielt. Auch für die Gene P16, MGMT, MLH1 und CDH1 wurde in dieser Arbeit eine starke Methylierung in den HNSCC-Proben gefunden. Diese Hypermethylierungen wurden auch in anderen Studien gezeigt (Calmon et al., 2007a; Hasegawa et al., 2002; Hoque et al., 2004; Ishida et al., 2005; Maruya et al., 2004; Sanchez-Cespedes et al., 2000; Viswanathan et al., 2003; Zhang et al., 2006b). Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass im Laufe der Entstehung von HNSCC eine Vielzahl tumor-assoziiertes Gene durch Promotormethylierung inaktiviert wird. Mit fortschreitendem Tumorstadium und einer schlechteren Differenzierung des Tumors war ein Anstieg der gesamten Methylierungsrate zu beobachten. Besonders für die Gene DAPK1, CDH1 und MLH1 korreliert die Methylierung des Promotors mit einem schlechteren Tumorstadium und für die Gene P16 und MGMT konnte ein Zusammenhang zwischen der Methylierung des Promotors und einer schlechteren Differenzierung des Tumors gefunden werden (siehe Tab. 3.3). Zuo et al. haben gezeigt, dass die Hypermethylierung von MGMT mit

einer schlechteren Prognose und einem erhöhten Risiko für ein erneutes Auftreten von Tumoren korreliert (Zuo et al., 2004). Patienten mit Methylierungen im Promotor von DAPK1 wiesen oftmals auch einen positiven Befund für die Lymphknoten auf. Andere Studien zeigten, dass eine Methylierung von DAPK1 signifikant mit einem Befall der Lymphknoten und der Entwicklung von Metastasen zusammenhängt (Calmon et al., 2007a; Sanchez-Céspedes et al., 2000). Diese Daten implizieren, dass eine Inaktivierung der tumor-assoziierten Gene DAPK1, CDH1, MLH1, P16 und MGMT zu einer erhöhten Aggressivität von HNSCC führt, was wiederum eine schlechtere Prognose für die Patienten bedeuten könnte.

Einige Autoren zeigten auch in präkanzerogenen Läsionen und Noxen (z. B. Tabak oder Alkohol) ausgesetzten Normalgeweben eine Methylierung von RAR β . Für andere Gene wie p16 und DAPK1 wurde bei starken Rauchern ebenfalls eine anormale Methylierung im Normalgewebe gefunden (Zochbauer-Müller et al., 2003). Auch die Untersuchungen dieser Arbeit zeigten eine hohe Methylierungsrate für RAR β in den Proben des Normalgewebes. Andere Gene wie DAPK, P16, MLH1, MGMT und MST1 waren ebenfalls in den Normalgewebeproben häufig methyliert. Diese Daten implizieren, dass die Promotormethylierung dieser Gene sowohl in Normalgewebe als auch in Tumorgewebe von Patienten mit HNSCC ein Resultat der Exposition mit Tabak, Alkohol oder anderer Noxen ist. Diese Noxen wurden schon in anderen Arbeiten in Zusammenhang mit der Entstehung von HNSCC gebracht (Blot et al., 1988; Maier et al., 1992; Rothman & Keller, 1972; Takeshima et al., 2008). Interessanterweise konnte für die Gene RASSF1A und RASSF4 in dieser Arbeit keine Methylierung in dem untersuchten Normalgewebe gefunden werden.

Obwohl gezeigt werden konnte, dass eine Reihe von den in dieser Arbeit untersuchten Genen häufig in HNSCC methyliert vorliegen, können diese Gene nicht als prognostische Marker für HNSCC dienen, da auch in nicht-tumorösem Gewebe eine hohe Methylierungsrate gefunden wurde. Für RASSF1A und RASSF4 war zwar nur eine geringe Methylierungsfrequenz in HNSCC zu finden, jedoch war die Methylierung des Promotors dieser zwei Gene immer mit der Entstehung von HNSCC verbunden. In dem untersuchten Normalgewebe war keine Methylierung dieser Gene zu finden. Möglicherweise wäre es deshalb in Erwägung zu ziehen, diese Gene als Biomarker für

HNSCC zu verwenden. Für RASSF1A könnte dafür auch noch die Inaktivierung durch LOH berücksichtigt werden.

Vieles deutet darauf hin, dass möglicherweise die Exposition mit Noxen ein Grund für die Hypermethylierung der Promotoren der untersuchten Gene ist, was daraufhin zu einer Entstehung von Tumoren führen kann. So konnte in verschiedenen Publikationen gezeigt werden, dass insbesondere für die Gene RAR β und p15 ein Zusammenhang zwischen einer Promotormethylierung und Rauchen besteht (Chang et al., 2004; Zochbauer-Muller et al., 2003). Vielleicht könnten die Ergebnisse dazu verwendet werden, Personen mit einem erhöhten Risiko für HNSCC wie Raucher auf eine Methylierung der entsprechenden Gene hin zu untersuchen und dadurch Aussagen über ihr Risiko für eine Erkrankung an HNSCC zu treffen. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, sollten jedoch der Methylierungsstatus dieser Gene in Gewebe von gesunden Probanden untersucht werden, die diesen Noxen entweder ausgesetzt waren oder nicht.

4.2 Epigenetische Regulation und Funktion von Erythropoietin in HNSCC

Eine Vielzahl von Studien hat gezeigt, dass Erythropoietin neben seiner Beteiligung bei der Regulation der Bildung der roten Blutkörperchen auch Funktionen in nicht-hämatopoetischen Geweben ausübt. Dazu gehören unter anderem eine Steigerung der Proliferation und der Schutz vor Apoptose (Anagnostou et al., 1990; Eefting et al., 2004; Ribatti et al., 1999; Wojchowski et al., 1999). Obwohl diese Funktionen auch in verschiedenen Tumortypen nachgewiesen wurden, werden Krebspatienten häufig mit rekombinantem Erythropoietin behandelt, um das Allgemeinbefinden zu verbessern (Demetri et al., 1998; Glaspy et al., 1997). Auch Patienten mit HNSCC werden oft mit diesem Medikament behandelt. Eine Studie zeigte jedoch, dass diese Behandlung zu einer klinischen Verschlechterung führt (Henke et al., 2003). Zwei weitere Studien konnten eine erhöhte Invasivität von HNSCC durch den Einsatz von rekombinantem Erythropoietin nachweisen (Lai et al., 2005; Mohyeldin et al., 2005). Neben der Untersuchung des Methylierungsstatus des Promotors verschiedener Tumorsuppressorgene in HNSCC war es deshalb das Ziel dieser Arbeit, die epigenetische Regulation von Erythropoietin in HNSCC zu analysieren und zu untersuchen, wie sich eine Reexpression von Erythropoietin in einer HNSCC-Zelllinie auf das Proliferationsverhalten derselben auswirkt.

4.2.1 Regulation der Genaktivität von Erythropoietin durch DNA-Methylierung und Chromatinmodifikation

4.2.1.1 Expression von Erythropoietin in verschiedenen Geweben

Bevor die Regulation von Erythropoietin in Tumoren untersucht wurde, sollte die Expression in den Geweben von Leber, Herz, Gehirn, Plazenta, Lunge, Skelett-Muskel und Niere untersucht werden. Die stärkste Expression von Erythropoietin zeigten dabei die Gewebe von Leber und Niere. Auch im Gewebe aus Plazenta war eine geringe Expression zu detektieren. In allen anderen analysierten Geweben war die Expression von Erythropoietin im Vergleich zur Expression in Lebergewebe unter 5% und wurde als Hintergrundsignal eingestuft. In der Literatur wurden die adulte Niere und die fötale Leber als Hauptorte der Erythropoietin-Expression beschrieben (Bachmann et al., 1993; Dame et al., 1998; Maxwell et al., 1993a). Aber auch in anderen Organen wie dem

weiblichen Genitaltrakt, der Plazenta, dem Testis und im Neuralen Gewebe wurde eine Expression von Erythropoietin gezeigt (Conrad et al., 1996; Magnanti et al., 2001; Masuda et al., 1994; Yasuda et al., 1998).

Entgegen den Ergebnissen von Eckardt et al. und Maxwell et al., die eine Expression in der adulten Leber nur unter starker Hypoxie nachweisen konnten, zeigte sich in den Untersuchungen dieser Arbeit auch im Gewebe der adulten Leber ohne Hypoxie-Behandlung eine Expression, die mehr als halb so stark war wie die des analysierten Nierengewebes (Eckardt, 1996; Maxwell et al., 1993a). Auch konnte im Gegensatz zu den Angaben in der Literatur kaum eine nennenswerte Expression von Erythropoietin in neuronalem Gewebe gefunden werden. Für die Expressionsstudien dieser Arbeit wurde die vorgefertigte cDNA der Firma Clontech verwendet. Möglicherweise führte eine andere Vorgehensweise bei der Herstellung der cDNA zu diesen Abweichungen in den Expressionsdaten. So wurden für die Analyse der Expression in neuronalem Gewebe neuronale Zellen aus Ratten-Embryonen kultiviert und die Expression unter Hypoxie bestimmt. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass unter physiologischer Sauerstoffkonzentration in humanem Hirn-Gewebe keine nennenswerte Erythropoietin-Expression zu detektieren war. Wie schon erwähnt, konnte im Vergleich zum Nierengewebe eine schwache Expression von Erythropoietin auch im Gewebe von Plazenta nachgewiesen werden konnte. Conrad et al. zeigten, dass diese Expression hauptsächlich in den Cytotrophoplasten stattfindet (Conrad et al., 1996).

4.2.1.2 Hypermethylierung des Erythropoietingens in HNSCC und anderen Tumoren

Die Expression von Erythropoietin konnte nur in wenigen Geweben nachgewiesen werden. Bei einer Vielzahl von Genen führt eine Hypermethylierung des Promotors zu einer Verminderung der Expression. In dieser Arbeit wurden HNSCC-Proben und verschiedene primäre Tumore und Krebszelllinien aber auch Proben von gesundem Gewebe von HNSCC-Patienten auf eine Methylierung der Erythropoietin-Gens hin untersucht. Es zeigte sich, dass der Promotor in einer Vielzahl von Krebszelllinien und auch in den Proben verschiedener primärer Tumore methyliert vorliegt. Interessanterweise wiesen die Proben der Normalgewebe, die aus denselben Organen stammten wie die Tumorproben, im Gegensatz zu diesen häufig keine Methylierungen im Erythropoietin-Promotor auf. Für die Proben von Patienten mit HNSCC wurden zwei Sequenzabschnitte des Promotors, wobei einer der Abschnitte die Interaktionssequenz für ARNT beinhaltete, und der Enhancer mit der

Interaktionssequenz für HIF1 α auf Methylierungen hin untersucht. Im Enhancer war sowohl in den Tumorproben als auch in den Normalgewebeproben eine Methylierung zu finden, aber auch hier war in den Proben des Normalgewebes die Methylierung in beiden untersuchten Bereichen des Promotors deutlich schwächer als in den Tumorproben. DNA-Methyltransferasen werden in Krebszellen häufig überexprimiert. Insbesondere die Expression der DNMT1, die für die Aufrechterhaltung des Methylierungsstatus der DNA während der Zellteilung verantwortlich ist, ist in Krebszellen erhöht (Schulz, 2005). So ließe sich eventuell erklären, dass DNA-Bereiche, die nur schwach methyliert waren, durch eine Überexpression der DNMT1 während der Zellteilung verstärkt methyliert werden.

Für die Hypoxie-induzierte Hochregulation der Erythropoietin-Expression ist die Bindung des HIF1-Komplexes notwendig (Bunn et al., 1998; Ebert & Bunn, 1999; Fandrey et al., 1994; Maxwell et al., 1993b; Pugh et al., 1991; Semenza, 1998). Dieser Komplex ist ein Heterodimer aus den Untereinheiten HIF1 α und ARNT (Arylhydrocarbon-Rezeptor-Nuklear-Translokator=HIF1 β), die beide zur der PAS (Per, ARNT, Sim) Familie der basalen Helix-Loop-Helix-Transkriptionsfaktoren gehören (Iyer et al., 1998; Semenza et al., 1997; Wang et al., 1995). Während ARNT konstitutiv exprimiert wird, erfolgt die Regulation der Expression von HIF1 α durch den Sauerstoff-Level (Bruick, 2003; Iyer et al., 1998; Jiang et al., 1996; Pugh et al., 1997). Sowohl die Interaktionssequenz für HIF1 α als auch die für ARNT beinhalten ein CpG. Sollten die Cytosine in diesem Kontext methyliert vorliegen, könnte dies Einfluss auf die Bindung der Proteine und damit auf die Induzierung der Expression durch Hypoxie haben.

Zwei Arbeitsgruppen zeigten Methylierungen der Cytosine im CpG-Kontext sowohl im Promotor als auch im Enhancer in der Cervix-Karzinom-Zelllinie HeLa (Wenger et al., 1998; Yin & Blanchard, 2000). Außerdem konnten beide Arbeitsgruppen zeigen, dass Methylierungen im Promotor und im Enhancer eine Interaktion des Promotors mit ARNT und des Enhancers mit HIF1 α verhindern. Neben HeLa zeigten in dieser Arbeit auch die HNSCC-Zelllinie Hep2 und die Nierenkarzinom-Zelllinie MZ2865 methylierte Cytosine in der ARNT-Interaktionssequenz. Während in der Zelllinie MZ2865 auch das Cytosin in der HIF1 α -Interaktionssequenz methyliert war, konnte für Hep2 keine Methylierung gefunden werden und für HeLa zeigte nur ein von drei Klonen eine Methylierung dieses Cytosins. Da aber sowohl eine Interaktion von ARNT als auch eine Interaktion von HIF1 α mit der DNA notwendig sind um den HIF1-Komplex zu bilden,

ist zu erwarten, dass eine Hypoxie-induzierte Expression nur stark eingeschränkt oder gar nicht möglich ist.

4.2.1.3 Die Methylierung des Promotors korreliert mit einer verminderten Expression

Bei der Expression von Erythropoietin kann zwischen einer basalen Expression unter Normoxie und einer induzierten Expression unter Hypoxie unterschieden werden. Es ist wahrscheinlich, dass die basale Expression nur durch den Promotor gesteuert wird, während die Hypoxie-induzierte Expression ein Ergebnis des Zusammenspiels zwischen Promotor und Enhancer ist. Wie schon erwähnt, ist dafür die Ausbildung des HIF1-Komplexes notwendig. Obwohl die Expression von Erythropoietin in einer Vielzahl von Tumoren beschrieben wurde, zeigten eine Vielzahl der in dieser Arbeit untersuchten primären Tumore und Krebszelllinien einen methylierten Promotorbereich.

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob es eine Korrelation zwischen der Methylierung des Promotors und der basalen Expression in einigen der hier analysierten Krebszelllinien gibt. Dazu wurde die Expressionsrate von Erythropoietin in 13 verschiedenen Krebszelllinien, unter anderem die zwei HNSCC-Zelllinien Hep2 und RPMI und 5 Nierenkrebszelllinien (MZ1257, 1851, 1973, 2861 und 2865), im Vergleich zur Hepatoma-Zelllinie HepB3 unter Normoxie bestimmt. Eigene Untersuchungen zeigten, dass HepB3 keine Methylierungen im Promotor aufwies. Es war bekannt, dass sie Erythropoietin exprimiert (Goldberg et al., 1987; Nielsen et al., 1987). Alle anderen analysierten Zelllinien zeigten mehr oder weniger starke Methylierungen im Promotor und Enhancer des Erythropoietin-Gens und hatten in dieser Arbeit eine deutlich verminderte Erythropoietin-Expression im Vergleich zu HepB3. Yin und Blanchard zeigten in ihrer Arbeit einen Zusammenhang zwischen der Methylierung des Erythropoietin-Promotors und einer Repression der Expression in der Zelllinie HeLa (Yin & Blanchard, 2000). Auch für andere Gene wurde eine verminderte bis völlig unterdrückte Expression auf eine Hypermethylierung des Promotors zurückgeführt. So ist zum Beispiel der Promotor von RASSF1A häufig in Tumoren methyliert, was zu einer Stilllegung des Gens führt (Agathangelou et al., 2005; Dammann et al., 2005). Für Erythropoietin waren die Methylierungen im analysierten Promotorbereich jedoch nicht mit einer vollständigen Stilllegung der Gens verbunden, sondern bewirkten nur eine verringerte Expression. Es lassen sich auch von dem Grad der Methylierung keine Rückschlüsse auf die Stärke der Repression der Expression

ziehen. So ist anhand der Bisulfit-Sequenzierung erkennbar, dass sowohl in HeLaS3 als auch in der Nierenkrebszelllinie MZ2865 im analysierten Promotorbereich erheblich mehr Cytosine methyliert vorliegen als in der HNSCC-Zelllinie Hep2, trotzdem ist die Expression mit 20 – 27% in HeLaS3 und MZ2865 2,5 – 3,5mal so hoch wie die Expression in Hep2. Für diese Arbeit wurden zwei Bereiche des Promotors ausgewählt, die im CpG-reichen Bereich des Promotors lagen und wichtige Sequenzbereiche zur Interaktion mit die Expression regulierenden Proteinen wie GATA und ARNT beinhaltete, wohingegen der in der Literatur beschriebene minimale Promotor ca. 400bp umfasst (Semenza et al., 1989). Es ist also möglich, dass andere für die Expression von Erythropoietin ebenfalls wichtige Bereiche des Promotors unmethyliert in den untersuchten Zelllinien vorliegen.

Um nachzuweisen, dass die Methylierung des Promotors der Grund für die reduzierte basale Expression von Erythropoietin ist, wurden die Zelllinien HepB3, Hep2, HeLaS3 und MZ1851 an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit 5'-Aza-2-desoxycytidin behandelt und anschließend für 24 Stunden unter Normoxie inkubiert. 5'-Aza-2-desoxycytosin führt zu einer Hemmung der Methyltransferase, die während der Zellteilung für die *DeNovo*-Methylierung des neu synthetisierten DNA-Strangs verantwortlich sind (Jones et al., 1983). Wie zu erwarten war, zeigt die Zelllinie HepB3 sowohl ohne als auch mit der Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin eine basale Expression, die jedoch nach der Behandlung geringer war. Für Hep2 und HeLaS3 konnte die basale Expression durch die Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin gesteigert werden. Wie bei der Zelllinie HepB3 nahm auch bei der Zelllinie MZ1851 die Expression nach der Inkubation mit 5'-Aza-2-desoxycytidin ab. Die Ergebnisse zeigen, dass in den Zelllinien Hep2 und HeLaS3 die Methylierung des Promotors ein Grund für die verminderte Expression von Erythropoietin ist. Möglicherweise war die Toxizität von 5'-Aza-2-desoxycytidin für die Abnahme der Expression in den Zelllinien HepB3 und MZ1851 verantwortlich.

Auch mittels des Luciferase-Assays sollte gezeigt werden, welchen Einfluss die Methylierung des Promotors und/oder des Enhancers in den untersuchten Zelllinien. Dabei wurden Konstrukte verwendet, die den EPO-Promotor vor dem Reporter gen, den EPO-Enhancer hinter dem Reporter gen oder sowohl den Promotor als auch den Enhancer von Erythropoietin enthielten. Die drei Zelllinien HepB3, Hep2 und HeLaS3 wurden mit diesen unmethylierten und mit den *in vitro* methylierten Konstrukten

transfiziert und anschließend für 24 Stunden unter Normoxie inkubiert, bevor die Expression des Reportergens durch die Umsetzung eines Substrats und die Messung des dabei entstandenen Lichtsignals bestimmt wurde.

In den Zelllinien HepB3 und HeLaS3 zeigte der Promotor allein keine Steigerung der Expression des Reportergens gegenüber dem leeren Kontrollvektor. Die Konstrukte mit dem Enhancer allein zeigten dagegen eine wesentlich höhere Expression, die durch die Co-Klonierung des Promotors wiederum stark reduziert wurde. In der Zelllinie Hep2 war das Gegenteil der Fall. Hier war sowohl mit dem Konstrukt mit dem Promotor allein als auch zusammen mit dem Enhancer eine Expressionssteigerung des Reportergens zu verzeichnen, während der Enhancer allein nur eine sehr geringe Steigerung der Expression bewirkte. Bei allen drei Zelllinien führte eine Methylierung der Konstrukte zu einer starken Inhibierung der Expression des Reportergens.

Auch Yin und Blanchard zeigten in ihrer Arbeit in der Zelllinie HepB3 nur eine geringe Expressionssteigerung durch den Promotor, die durch eine Methylierung entsprechend auch nur minimal reduziert wurde, während im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit Yin und Blanchard bei ihren Experimenten mit Promotor und Enhancer zusammen eine starke Zunahme der Expression des Reportergens detektieren konnten (Yin & Blanchard, 2000). Aber auch hier wurde die Expression durch die Methylierung des Promotors stark inhibiert. Dass der Promotor in zwei Fällen dieser Arbeit die Expression eher inhibiert und nur in einem Fall die Expression steigert, könnte mit Unterschieden in der Expression von Mitgliedern der GATA-Proteinfamilie erklärt werden. In der verwendeten Promotorsequenz ist eine Interaktionssequenz für GATA-Proteine vorhanden. Imagawa et al. zeigten, dass eine Überexpression von GATA2 und GATA3 zu einer Repression der Erythropoietin-Expression führt, während GATA4 mit einer Steigerung der Expression in Verbindung gebracht wurde (Dame et al., 2004; Imagawa et al., 1997). Wenger et al. setzten für ihre Untersuchungen des Einflusses der Methylierung der HIF1 α -Bindestelle (HBS) auf die Expression einen dreifachen Repeat des HBS ein. Diese 3 Kopien des HBS führten in den Zelllinien HeLaS3 und HepB3 nur zu einem geringen Anstieg der Expression, was in einem starken Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit stand (Wenger et al., 1998). Dieser Unterschied in den Ergebnissen lässt sich möglicherweise durch das Vorhandensein von anderen regulatorischen Sequenzen wie der *CACA-Repeat* und der *Repeat* von zwei Steroid-Rezeptor-Halbseiten im Enhancer erklären, die Einfluss auf die basale Expression von Erythropoietin unter Normoxie haben könnten. Aber auch in den Arbeiten von Wenger

et al. führte eine Methylierung zu einer Reduktion der Expression. Dass es trotz fehlendem Promotor bei der Verwendung des Konstrukts mit dem Enhancer allein zu einer Expression gekommen ist, lässt sich möglicherweise auf eine kryptische Promotorsequenz im pRL-Null-Vektor zurückführen. Andererseits könnten auch Trans-Effekte mit dem ebenfalls transfizierten pGL3.1-Vektor sein (Farr & Roman, 1992).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass für die basale Expression von Erythropoietin nicht nur der Promotor verantwortlich ist. Der Enhancer scheint bei einigen Zelllinien auch unter Normoxie einen induzierenden Einfluss auf die Expression zu besitzen. Welche Bereiche des Enhancers dafür verantwortlich sind, muss noch näher untersucht werden. Unter Berücksichtigung der Arbeit von Wenger et al. kann aber schon jetzt ein Einfluss von HIF1 α ausgeschlossen werden (Wenger et al., 1998).

Die Expression von Erythropoietin kann durch Hypoxie stark induziert werden. Verantwortlich hierfür zeichnete sich der Hypoxie-induzierbare Enhancer. Eine weitere Fragestellung dieser Arbeit war, wie sich die Methylierung auf die Induzierbarkeit der Expression von Erythropoietin durch Hypoxie auswirkt.

Wie zu erwarten, kam es mit und auch ohne die Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin bei der Zelllinie HepB3 durch die Inkubation unter Hypoxie zu einem starken Anstieg der Expression im Vergleich zur Expression unter Normoxie. Die drei anderen Zelllinien zeigten nur nach der Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin eine Induzierbarkeit der Expression durch Hypoxie. Ohne die Behandlung kam es bei den Zelllinien HeLaS3 und MZ1851 sogar zu einer verminderten Expression nach der Inkubation unter Hypoxie. Zur Kontrolle wurde ebenfalls die Expression des Gens CA XI mit und ohne Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin analysiert. CA XI ist wie auch Erythropoietin ein Hypoxie-induziertes Gen. Da dessen Expression in den analysierten Zelllinien sowohl nach der Behandlung mit 5'-Aza-2-desoxycytidin als auch ohne diese durch Hypoxie induziert werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass der Signalweg, der zur Aktivierung der Hypoxie-induzierbaren Gene führt, intakt ist. Es konnte also gezeigt werden, dass die Verhinderung der DNA-Methylierung eine Induzierung der Expression von Erythropoietin durch Hypoxie ermöglicht.

Auch im Luziferase-Assay zeigte eine Methylierung der verwendeten Konstrukte mit dem Promotor, dem Enhancer und mit Promotor und Enhancer zusammen eine sehr starke Reduzierung der Expression unter Hypoxie. In allen drei Zelllinien zeigte sich mit dem Promotor allein nur eine schwache Induktion der Expression des Reportergens

durch Hypoxie. Dagegen kommt es durch die Klonierung des Enhancers sowohl allein als auch in Kombination mit dem Promotor zu einer sehr starken Induktion der Reporter-gen-Expression nach der Inkubation unter Hypoxie. Diese Steigerung der Expression war bei der Zelllinie HepB3 am stärksten und bei HeLaS3 am schwächsten. Diese Unterschiede liegen wahrscheinlich darin begründet, dass die Zellen die Transfektion und die anschließende Inkubation bei Hypoxie unterschiedlich gut vertrugen und dadurch unterschiedlich stark gestresst waren, was einen erheblichen Einfluss auf die Expression des Reportergens gehabt haben könnte. Bestärkt wird diese Annahme durch lichtmikroskopische Beobachtungen, die zeigten, dass sich viele der transfizierten HeLaS3-Zellen von der Platte gelöst hatten, während sowohl die HepB3- als auch die Hep2-Zellen die Transfektion und die anschließende Hypoxie augenscheinlich besser vertrugen hatten. Trotzdem bestätigen diese Ergebnisse bisherige Arbeiten, die ebenfalls einen schwach induzierbaren Promotor beschreiben, dessen Aktivität erst durch das Zusammenspiel mit dem Enhancer extrem gesteigert wird (Blanchard et al., 1992; Jelkmann, 1992). In der Arbeit von Wenger et al. reichte schon die Klonierung des HBS aus dem Enhancer von Erythropoitin für eine Induktion der Expression des Reportergens unter Hypoxie, wobei der Effekt durch die Verwendung eines Dreifach-Repeats der HBS wahrscheinlich noch extrem gesteigert wurde. Trotzdem zeigte sich in dieser Arbeit durch die Klonierung des Erythropoietin-Enhancers in der Zelllinie HepB3 eine drei- bis viermal stärkere Steigerung der Expression. Dies deutet darauf hin, dass andere Sequenzen im Enhancer den Hypoxie-induzierten Effekt auf die Expression verstärken. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass auch der *CACA-Repeat 7* Basenpaare downstream von der HBS notwendig für eine Hypoxie-induzierte Expression von Erythropoietin sein könnte (Huang & Bunn, 1995). Auch in der Arbeit von Wenger et al. führte eine Methylierung des verwendeten Konstrukts zu einer Verhinderung der Induzierung. Dabei zeigte diese Arbeitsgruppe, dass eine Methylierung der HBS eine Interaktion mit HIF1 α verhindert. Obwohl es sowohl bei Verwendung der Konstrukte mit Enhancer allein und mit Enhancer und Promotor zu einer starken Induktion der Expression ausgelöst durch Hypoxie kam, war die Expression bei allen drei Zelllinien unter Hypoxie schwächer bei Verwendung der Konstrukte mit Enhancer und Promotor als bei Verwendung der Konstrukte mit dem Enhancer allein. Wie schon bei der basalen Expression erwähnt, könnte ein Grund hierfür die unterschiedliche Expression von GATA-Proteinen sein, für die es im Promotor von Erythropoietin eine Interaktionssequenz gibt und von denen gezeigt

wurde, dass sie die Expression sowohl steigern als auch reprimieren können (Dame et al., 2004; Imagawa et al., 1997). Es wäre vorstellbar, dass Hypoxie zu einem Anstieg der Expression von Erythropoietin führt, der durch eine gesteigerte Expression von GATA2 und GATA3 kontrolliert wird. Die Ergebnisse des Luziferase-Assay zeigen auch, dass in allen drei Zelllinien der Signalweg funktionstüchtig vorhanden ist, der durch Hypoxie ausgelöst wird und zur Aktivierung der Expression von Erythropoietin und verschiedener anderer Hypoxie-induzierbarer Gene führt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen Zelllinien neben der basalen Expression auch die Hypoxie-induzierte Expression von Erythropoietin durch Hypermethylierung reduziert wird. Außerdem deuten die Ergebnisse an, dass es Faktoren geben muss, durch die der Promotor einen regulierenden Einfluss auf die Aktivität des Hypoxie-induzierbaren Enhancer ausüben kann. Dies könnten die schon erwähnten GATA-Proteine sein.

4.2.1.4 Modifikation des Chromatins durch Hypoxie

In vielen Fällen wird ein Zusammenhang zwischen einer Methylierung des Promotors verschiedener Gene und einer Modifikation des Chromatins, die zur Bildung von Heterochromatin führt, diskutiert. Auch in dieser Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die Promotormethylierung des Erythropoietin-Gens mit der Modifikation des Chromatins zusammenhängt oder ob diese eher durch die Änderung des Sauerstoffpartialdrucks beeinflusst wird. Um zu analysieren, in welchem Zustand das Chromatin unter Normoxie und unter Hypoxie vorliegt, wurde es nach Markern für Euchromatin (acetyliertes Histon 3) und Heterochromatin (trimethyliertes Histon 3) untersucht. Dabei war es von besonderem Interesse, ob das Sauerstoffangebot auch in einer Zelllinie mit Hypermethylierungen im Promotor und Enhancer Einfluss auf die Chromatin-Modifikation besitzt. Für die Untersuchungen wurde die Zelllinie Hep2 verwendet, die sowohl im Promotor als auch im Enhancer methylierte Cytosine aufweist. Da in einer Studie gezeigt wurde, dass sich die Menge des präzipitierten Histon 3 von Normoxie zu Hypoxie unterscheidet, wurden für diese Analyse zusätzlich Antikörper gegen Histon 3 verwendet um die Ergebnisse zu normalisieren (Johnson et al., 2008). Die Ergebnisse zeigten einen Anstieg des acetylierten Histon 3 sowohl im Promotor- als auch im Enhancerbereich von Erythropoietin bei Sauerstoffmangel. Dementsprechend konnte nach einer Inkubation unter Hypoxie erheblich weniger trimethyliertes Lysin 9 Histon 3 im Promotor- und auch im Enhancer präzipitiert

werden. Damit liegt die Vermutung nahe, dass bei einer Zelllinie mit einem methylierten Promotor und Enhancer unter Normoxie auch das Chromatin inaktiv vorliegt. Trotz der Methylierung kommt es aber unter Hypoxie zu einer Demethylierung des Histon 3 verbunden mit dessen Acetylierung, was dazu führt, dass das Chromatin aufgelockert und damit zugänglich für Transkriptionsfaktoren wird. Die Expressionsdaten von Hep2 unter Normoxie bzw. Hypoxie zeigen aber, dass es unter Hypoxie trotz der Änderung des Chromatins von Hetero- zu Euchromatin nicht zu einem Anstieg der Expression von Erythropoietin kommt.

Es ist bekannt, dass sowohl HIF1 als auch der Hepatozyten-Nuklear-Faktor 4 (HNF4), der an den zwei Steroid-Rezeptor-Halbseiten (DR-2) im Enhancer bindet, mit Ko-Aktivator-Komplex CBP/p300 interagieren können (Arany et al., 1996a; Galson et al., 1995a; Sang et al., 2002). Neben seiner Funktion als Transkriptions-Ko-Aktivator hat dieser Komplex auch Histon-Acetyl-Transferase-Aktivität (Knippers, 2006). Somit kann die Bindung des CBP/p300-Komplex zur Acetylierung des Chromatins und damit zur Bildung von Euchromatin führen. Wie in dieser Arbeit gezeigt, ist die Interaktionssequenz für HIF1 α in der für diese Untersuchung verwendete HNSCC-Zelllinie Hep2 frei von Methylierungen. Möglicherweise führt die Bindung von HIF1 α unter Hypoxie zur Ausbildung des HIF1-Komplexes unter Einbeziehung von ARNT. Dadurch kann der CBP/p300-Komplex binden und es kommt zur Acetylierung des Chromatins. Durch die Methylierungen im Promotorbereich von Hep2 wird jedoch eine Interaktion des HIF1-Komplex mit dem Promotor über ARNT unterbunden, wodurch die an den CBP/p300-Komplex gebundenen Transkriptionsfaktoren nicht in die Nähe des Promotors gebracht werden, was trotz der Ausbildung einer aktiven Chromatin-Struktur die Transkription inhibiert.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Hypermethylierung des Erythropoietin-Gens sowohl im Promotor als auch im Enhancer eine wichtige Rolle in der Regulation der Genaktivität spielt. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass es bei der Induktion der Expression von Erythropoietin durch Hypoxie zur Acetylierung des Chromatins kommt. Die Ergebnisse dieser und anderer Arbeiten deuten aber auch an, dass dafür die Interaktion des HIF1-Komplexes mit dem Enhancer notwendig ist, die jedoch nur stattfinden kann, wenn die Interaktionssequenz für HIF1 α unmethyliert vorliegt.

4.2.2 Reexpression von Erythropoietin in der HNSCC-Zelllinie Hep2 führt zu einer Inhibierung der Apoptose und einer Steigerung der Proliferationsrate

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl der Promotor als auch der Enhancer von Erythropoietin in primären HNSCC-Tumoren und zwei HNSCC-Zelllinien (RPMI und Hep2) hypermethyliert vorliegt und diese Methylierung mit einer Reduzierung der Expression des Proteins zusammenhängt. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Auswirkungen die Reexpression von Erythropoietin in der HNSCC-Zelllinie Hep2 hat.

4.2.2.1 Expression des Erythropoietin-Rezeptors in verschiedenen Krebszelllinien

Seine Funktion übt Erythropoietin über einen Membran-ständigen Rezeptor aus. Es konnte gezeigt werden, dass in den Krebszelllinien HeLaS3, RPMI, HepB3 und auch Hep2 unter Hypoxie exprimiert wird. Durch die Bindung eines Erythropoietin-Moleküls können zwei Rezeptormoleküle dimerisieren, wodurch verschiedene Signalwege aktiviert werden. So kann es durch die Bindung zum Beispiel zur Aktivierung der cytoplasmatischen, Nicht-Rezeptorprotein-Kinase JAK2 und dem Downstream-Signalprotein STAT5 kommen. Andererseits kann die Bindung von Erythropoietin an den Rezeptor auch die Phosphatidylinositol-3-Kinase und damit die Mitogen-aktivierte Protein-Kinase aktivieren.

Die Expression des Rezeptors in der HNSCC-Zelllinie Hep2 war die Voraussetzung für die Untersuchung der Auswirkungen der Reexpression von Erythropoietin.

4.2.2.2 Lokalisation von Erythropoietin im Cytoplasma

Vor den Untersuchungen der Auswirkungen der Reexpression von Erythropoietin wurde die Lokalisation des reexprimierten Proteins mittels Fluoreszenzmarkierung analysiert. Es zeigte sich eine Verteilung des Fluoreszenz-markierten Proteins über den gesamten Zellkörper, wobei der Zellkern aber von Fluoreszenz frei blieb. Da Erythropoietin nach der Translation posttranslationell modifiziert wird, bevor es aus der Zelle sekretiert, um seine Funktion als autokrines oder parokrines Hormon über die Bindung seines Rezeptors auszuüben, entspricht eine vorübergehende Lokalisation im Cytoplasma den Erwartungen.

Es muss bei der Betrachtung der Ergebnisse allerdings berücksichtigt werden, dass Erythropoietin als Fusionsprotein mit dem grün-fluoreszierenden Protein überexprimiert

wurde. Die Expression als Fusionsprotein könnte die native Struktur des Proteins beeinflussen, was Auswirkungen auf die Lokalisation haben könnte. Zudem führt eine Überexpression häufig zu Akkumulationen des Proteins in verschiedenen Kompartimenten der Zelle.

4.2.2.3 Steigerung der Zellproliferation in der HNSCC-Zelllinie Hep2 durch Erythropoietin

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die HNSCC-Zelllinie Hep2 den Erythropoietin-Rezeptor exprimiert und die Expression in dieser Zelllinie durch eine Hypermethylierung im Promotor und Enhancer stark reprimiert ist. Durch diese Voraussetzungen ist diese Zelllinie gut geeignet, um zu untersuchen, wie sich die Reexpression von Erythropoietin auf die Proliferation von HNSCC-Zellen auswirkt. Dies war deshalb von Interesse, da gezeigt wurde, dass die Behandlung von HNSCC-Patienten mit rekombinantem Erythropoietin zu klinischen Verschlechterungen führte. Durch den Kolonie-Bildungstest sollte zunächst untersucht werden, welche Auswirkungen die Reexpression von Erythropoietin auf die Fähigkeit der Hep2-Zellen hat, nach Transfektion unter Selektionsdruck Kolonien zu bilden. Nach Transfektion mit dem Konstrukt mit der Erythropoietin-cDNA bildeten sich unter Hypoxie doppelt so viele Kolonien wie nach Transfektion mit der Kontrolle. Unter Normoxie waren es sogar fast dreimal so viele. Damit war die Kolonienzahl nach der Transfektion mit Erythropoietin sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie signifikant höher als nach der Transfektion der Kontrolle. Daraus lässt sich schließen, dass die Expression von Erythropoietin das Überleben und das Proliferationsverhalten der Hep2-Zellen unter Stress (Transfektion, Selektion mit G418 und Hypoxie) verbessert.

Weiterhin sollte in dieser Arbeit die Auswirkung der Reexpression von Erythropoietin auf das Proliferationsverhalten einer Zellpopulation und einer Einzelzelle untersucht werden. Dafür wurden die Hep2-Zellen stabil mit pCMV-Flag-EPO und als Kontrolle mit dem leeren Vektor pCMV-Flag transfiziert.

Um das Proliferationsverhalten einer Zellpopulation zu analysieren, wurden Wachstumskurven erstellt. Unter Normoxie zeigte sich, dass die Zellproliferation der EPO-exprimierenden Klone signifikant höher war als die der Kontroll-Klone. Auch unter Hypoxie war der Zuwachs an Zellen wesentlich erhöht durch die Reexpression von Erythropoietin.

Für die Untersuchung des Proliferationsverhaltens einer Einzelzelle unter dem Einfluss von Erythropoietin wurden die Zellen der stabilen Klone vereinzelt in Softagar eingebettet und nach vier Wochen die Größe der gewachsenen Kolonien ermittelt. Sowohl unter Normoxie als auch nach der Inkubation unter Hypoxie zeigte sich, dass die Kolonien der Klone, die Erythropoietin exprimieren, signifikant grösser waren als die der Kontroll-Klone. Es ist verständlich, dass die Kolonien unter Hypoxie im Allgemeinen kleiner sind als unter Normoxie, da die Zellen unter Hypoxie wesentlich mehr gestresst sind, was zu einem verlangsamten Zellzyklus führt.

Sowohl Kolonie-Bildungstest und die Zellzahlbestimmungen als auch die Untersuchungen im Softagar zeigen, dass eine Reexpression von Erythropoietin sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie zu einer gesteigerten Proliferationsrate führt.

In der Literatur sind verschiedene Signalwege bekannt, die durch die Bindung von Erythropoietin an seinen Rezeptor aktiviert werden können. Zwei Arbeitsgruppen zeigten, dass der Einsatz von rekombinantem Erythropoietin zu einer erhöhten Invasivität in HNSCC führt. Sie konnten dabei nachweisen, dass die Invasivität ein Ergebnis der Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs ist (Lai et al., 2005; Mohyeldin et al., 2005). Durch die Bindung von Erythropoietin an seinen Rezeptor und dessen anschließende Dimerisierung wird die rezeptorassoziierte Januskinase (JAK) aktiviert, was zu einer gegenseitigen Phosphorylierung der JAKs und damit zu einer erhöhten Kinaseaktivität führt. Durch diese Phosphorylierung können Proteine mit einer Src-homology Domäne binden. Diese Domäne ist zum Beispiel in den Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STATs) vorhanden. Diese werden phosphoryliert und können durch diese Phosphorylierung dimerisieren. Das aktive Dimer kann anschließend die Transkription bestimmter Gene aktivieren. Die Familie der STAT-Proteine umfasst sieben Mitglieder (STAT1-STAT4, STAT5a und STAT5b und STAT6), die in die Regulation der Proliferation, Apoptose und Angiogenese involviert sind. Es konnte gezeigt werden, dass STATs in Tumoren häufig dauerhaft aktiviert sind. Auch die erhöhte Proliferationsrate und die Inhibierung der Apoptose könnten ein Ergebnis der Aktivierung dieses Signalwegs sein. Eine andere Arbeitsgruppe zeigte in einer murinen Zelllinie, dass physiologische Konzentrationen von Erythropoietin zu einer schnellen Phosphorylierung verbunden mit der Aktivierung von Raf-1 führen (Carroll et al., 1991). Raf ist Teil der MAP-Kinase-Kaskade, deren Aktivierung wiederum zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren führt. Carroll et al. beschrieben ebenfalls, dass Raf-1 eine wichtige Rolle bei der Erythropoietin-induzierten

Proliferation spielt. Möglicherweise findet dieser Signalweg so auch im Menschen statt und kann somit in Krebszellen zu einer erhöhten Proliferation durch Erythropoietin führen.

Eine Steigerung der Proliferation der Zellen kann in Tumoren dazu führen, dass der Tumor schneller wächst. Dies wiederum könnte in einer erhöhten Aggressivität des Tumors resultieren verbunden mit einer verstärkten Invasivität und Metastasierung.

Es ist bekannt, dass die Gabe von rekombinantem Erythropoietin zu einer klinischen Verschlechterung bei HNSCC-Patienten führt und rekombinantes Erythropoietin die Invasivität von HNSCC erhöht (Henke et al., 2003; Lai et al., 2005; Mohyeldin et al., 2005). Dies im Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, in der gezeigt wurde, dass die Reexpression von Erythropoietin in einer HNSCC-Zelllinie die Zellproliferation signifikant erhöht, sollte dazu führen, dass die Behandlung von HNSCC-Patienten mit rekombinantem Erythropoietin nochmals überdacht und die Nachteile gegen den Nutzen für den Patienten abgewogen werden.

5. Ausblick

Krebs ist die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (2008). Aus diesem Grund wird es immer wichtiger, diese Erkrankungen frühzeitig zu diagnostizieren. Da verschiedene Tumor-assoziierte Gene in bestimmten Tumorarten häufig methyliert auftreten, sind sie immer mehr als Tumormarker von Interesse. In dieser Arbeit wurden verschiedene Tumor-assoziierte Gene auf ihre Methylierung in Plattenepithelkarzinoma des Kopf-Hals-Bereiches (Head and neck squamous cell carcinoma = HNSCC) untersucht. Häufig methyliert waren die Gene p16, MGMT, DAPK, RAR β , MLH1, CDH1, RASSF5 und MST1 in den Tumorproben, aber auch in den Normalgeweben zeigten diese Gene eine häufigere Methylierung. Das macht sie als Biomarker ungeeignet. Die Normalgewebeproben wurden aus der gesunden Wangenschleimhaut entnommen, die Noxen ausgesetzt waren, die mit der Entstehung von HNSCC in Zusammenhang gebracht werden. Aus diesem Grund wäre es vorstellbar, Normalgewebe von Risikopersonen zu entnehmen und auf die Methylierung dieser Gene hin zu untersuchen. Um die Annahme zu bestätigen, dass die Methylierung dieser Gene auf der Exposition mit Noxen beruht und eine Vorstufe der Entstehung von HNSCC ist, sollte der Methylierungsstatus dieser Gene in Gewebe von gesunden Probanden untersucht werden, die diesen Noxen entweder ausgesetzt waren oder nicht. Natürlich sollte es auch ein Ziel für die Zukunft sein, weitere Biomarker zu finden, da eine frühzeitige Diagnose die Heilungschancen stark erhöht.

Für die Genregulation von Erythropoietin konnte gezeigt werden, dass die Hypermethylierung des Promotors und des Enhancers die basale Expression stark reduziert und eine Induzierung der Expression durch Hypoxie unterbindet. Auch kam es in dieser Arbeit durch Hypoxie zu einer Reduzierung der Trimethylierung des Chromatins und dessen Acetylierung. Vermutlich beruht die Modifikation des Chromatins auf eine Interaktion des CBP/p300-Komplex mit dem HIF1-Komplex, der an die HIF1 α -Interaktionsstelle gebunden ist. In weiterführenden Untersuchungen sollte

analysiert werden, ob eine Methylierung in diesem Bereich die Modifikation des Chromatins unterbindet oder diese davon unbeeinflusst trotzdem stattfindet. Des Weiteren wäre es von Interesse, inwieweit eine Modifikation des Chromatins notwendig ist für die Induzierung der Genaktivität durch Hypoxie und ob wirklich der CBP/p300-Komplex und seine Interaktion mit dem HIF1-Komplex zu dieser Modifikation führt. Dafür könnten Expressionsstudien und Untersuchungen der Chromatin-Modifikation unter Hypoxie mit siRNA durchgeführt werden, bei denen Teile des CBP/p300-Komplex ausgeknockt werden. Da dies aber möglicherweise toxisch für die Zellen sein könnte, wäre auch der Einsatz eines Inhibitors denkbar, der die Interaktion des CBP/p300-Komplexes mit dem HIF1-Komplex verhindert.

Häufig werden HNSCC-Patienten und auch Krebspatienten allgemein mit rekombinantem Erythropoietin behandelt, um das Allgemeinbefinden zu verbessern. Jedoch konnten diese und auch andere Arbeiten zeigen, dass Erythropoietin sich negativ auf das Krankheitsbild auswirkt. So zeigte sich zum Beispiel, dass Erythropoietin die Zellproliferation in HNSCC und auch die Invasivität erhöht. Bevor Krebspatienten weiterhin mit rekombinantem Erythropoietin behandelt werden, sollte für jede einzelne Tumorart untersucht werden, wie sich Erythropoietin auf das Tumorwachstum auswirkt und anschließend die Risiken gegenüber dem Nutzen für den Patienten genau abgewogen werden. Möglicherweise könnte aber die Zellproliferations-steigernde Wirkung von Erythropoietin in nichthämatopoetischen Geweben in anderen medizinischen Bereichen zum Beispiel für die bessere Wundheilung nach Operationen ausgenutzt werden. Eine weitere Überlegung könnte in Richtung neuer Inhibitoren gehen, die lokal eingesetzt werden, um die Erythropoietin-Rezeptoren im Tumor zu blockieren, um so die Auswirkung des rekombinanten Erythropoietin auf das Tumorwachstum zu verhindern.

6. Zusammenfassung

Jährlich erkranken über 500000 Menschen an Plattenepithelkarzinomen im Kopf-Hals-Bereich (head and neck squamous cell carcinoma = HNSCC) (Shaw et al., 2006b). Ein Ziel dieser Arbeit war es, den Methylierungsstatus von 15 Tumor-assoziierten Genen in 54 HNSCC- und 23 Normalgewebeproben zu untersuchen und mit den klinisch-pathologischen Daten zu korrelieren. Es zeigte sich, dass die Gesamtmethylierungsfrequenz dieser Gene in den Tumorproben (42%) signifikant höher war als in den Normalgewebeproben (23%; $p < 0,05\%$). Von den untersuchten Genen zeigten besonders p16 (60%), MGMT (53%), DAPK (67%), RAR β (75%), MLH1 (69%), CDH1 (43%), RASSF5 und MST1 (96%) eine häufige Methylierung in den HNSCC-Proben. Methylierungen von RASSF1A (18%), GSTP1 (4%), RASSF4 (13%), MST2 (4%), LATS1 (24%) und LATS2 (8%) waren eher seltener in den Tumorproben zu finden. Bei der Korrelation der Methylierungsdaten mit den klinisch-pathologischen Daten war eine erhöhte Methylierungsfrequenz in Zusammenhang mit fortgeschrittenerem Tumorstadium und schlechterer Differenzierung der HNSCC-Proben zu beobachten. Zum Beispiel fand sich eine signifikant höhere Methylierung von p16 in schlecht differenzierten HNSCC ($p = 0,037$) und RASSF5 war wesentlich häufiger methyliert in Tumoren eines fortgeschritteneren Stadiums ($p < 0,05$). Eine Methylierung von RASSF4 war nur in Patienten zu finden, die an einem Rezidiv erkrankten ($p = 0,033$). Die Methylierung der Tumor-assoziierten Gene war in den untersuchten HNSCC-Zelllinien ähnlich häufig wie in den primären Tumorproben. Da die Gene, die eine hohe Methylierungsrate in den HNSCC-Proben aufwiesen, auch in einer Vielzahl der Normalgewebeproben methyliert waren, sind sie als Biomarker für HNSCC eher ungeeignet. Jedoch zeigt diese Methylierung ihre Relevanz in der Entstehung von HNSCC und könnte zur Abschätzung des Risikos einer Erkrankung an HNSCC dienen. Nur RASSF1A und RASSF4 waren in den Normalgewebeproben unmethyliert.

Häufig werden HNSCC-Patienten mit rekombinantem Erythropoietin behandelt um das Allgemeinbefinden zu verbessern (Demetri et al., 1998; Glaspy et al., 1997). Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war deshalb, zu untersuchen, welchen Einfluss epigenetische Regulationsmechanismen auf die Genaktivität von Erythropoietin haben und wie sich die Reexpression von Erythropoietin auf das Proliferationsverhalten von HNSCC auswirkt. In dieser Arbeit zeigte sich, dass Erythropoietin sowohl in der Niere als auch in der Leber stark exprimiert wurde. Auch in der Plazenta ließ sich eine geringe Expression nachweisen. In den analysierten Krebszelllinien war die Expression im Vergleich zu der Zelllinie HepB3, die bekannt dafür war, Erythropoietin zu exprimieren, nur sehr gering und Methylierungsanalysen zeigten, dass sowohl Promotor als auch Enhancer dieser Zelllinien aber auch vieler primärer Tumore, insbesondere HNSCC-Tumore, Methylierungen aufwiesen. Aber auch die Normalgewebeproben der HNSCC-Patienten zeigten Methylierungen.

In weitergehende Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass die Hypermethylierung des Erythropoietin-Gens sowohl im Promotor als auch im Enhancer eine wichtige Rolle in der Regulation der Genaktivität spielt. Des Weiteren zeigte sich in dieser Arbeit, dass es bei der Induktion der Expression von Erythropoietin durch Hypoxie zur Acetylierung des Chromatins im Promotor- und auch im Enhancer-Bereich kommt. Wahrscheinlich ist für diese Modifikation des Chromatins eine Interaktion des HIF1-Komplexes mit dem Enhancer notwendig, die jedoch durch die Methylierung der HIF1 α -Interaktionssequenz im Erythropoietin-Enhancer unterbunden werden kann.

Reexpressionsanalysen in der HNSCC-Zelllinie Hep2 zeigten einen Proliferationssteigernden Effekt von Erythropoietin auf die Zellen sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie. Eine Proliferationssteigerung in Krebszellen kann zu einem schnelleren Tumorwachstum führen, was den Tumor aggressiver machen und in einer erhöhten Invasivität und Metastasierung des Tumors resultieren kann. Aus diesem Grund sollte die Behandlung von HNSCC-Patienten mit rekombinantem Erythropoietin unter Abwägung der Vor- und Nachteile für den Patienten nochmals überdacht werden.

7. Anhang

Tab. 7.1: Korrelation der Promotormethylierung mit den klinisch-pathologischen Daten

		Alter	I	II	III	IV	1	2	3	T1	T2	T3	T4	N0	N1	N2	N3
RASSF	m	51 ± 8	1	0	1	6	0	6	1	2	2	3	1	1	1	4	2
1A	u	57 ± 10	2	0	9	29	4	23	11	6	6	18	11	9	6	21	4
P16	m	58 ± 11	2	0	5	20	2	13	10	5	6	10	7	5	3	16	4
	u	54 ± 7	1	0	5	15	2	17	2	3	2	11	6	5	4	9	3
MGMT	m	59 ± 10	1	0	6	17	1	15	7	3	4	12	5	7	2	11	4
	u	55 ± 9	2	0	4	15	3	12	5	6	3	9	4	2	4	13	1
DAPK	m	58 ± 8	1	0	4	25	2	18	9	6	5	14	7	3	4	20	4
	u	58 ± 12	2	0	6	9	0	11	4	1	3	7	5	5	3	5	3
RARB	m	58 ± 9	3	0	3	24	4	18	8	8	5	14	6	5	5	18	4
	u	55 ± 8	0	0	2	8	4	5	4	1	1	5	2	2	1	5	2
MLH1	m	58 ± 10	1	0	5	27	2	19	11	4	6	17	9	7	3	21	4
	u	58 ± 10	2	0	5	9	1	12	2	4	2	5	4	3	4	5	3
CDH	m	59 ± 8	0	0	4	18	0	16	5	3	4	10	5	2	4	14	2
	u	55 ± 10	3	0	7	17	3	14	9	6	4	10	8	9	3	11	5
GSTP1	m	64 ± 18	0	0	0	2	0	1	1	8	1	1	0	0	0	2	0
	u	57 ± 9	3	0	9	34	4	28	13	0	7	21	12	11	5	24	7
RASSF	m	56 ± 12	1	0	5	13	1	13	4	3	2	7	7	5	3	8	3
2	u	58 ± 8	2	0	5	21	3	16	9	6	6	14	4	5	4	17	3
RASSF	m	53 ± 10	0	0	0	6	1	2	3	1	6	2	3	0	0	3	3
4	u	58 ± 10	2	0	7	29	3	23	10	5	0	19	10	9	4	23	3
NOR1	m	58 ± 10	2	0	6	20	1	18	8	4	3	11	10	6	4	14	3
	u	56 ± 9	1	0	5	15	3	12	4	5	5	11	1	5	3	12	2
MST1	m	58 ± 10	2	0	8	31	2	26	13	6	6	20	12	7	6	24	6
	u	71 ± 9	1	0	0	2	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0
MST2	m	73 ± 4	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0
	u	57 ± 9	3	0	9	32	4	26	13	9	7	20	10	9	6	23	7
LATS1	m	62 ± 9	0	0	1	9	0	6	3	0	1	9	1	1	1	8	1
	u	56 ± 10	3	0	10	25	4	24	10	8	7	14	10	10	6	16	6

Anhang

LATS2	m	55,5 ± 2	0	0	1	2	0	2	2	0	0	2	2	1	0	2	1
	u	57 ± 10	3	0	10	34	4	30	12	9	8	20	11	10	7	24	6

I-IV Stadium; 1-3 Differenzierung; T1-T4, N0-N3 TNM-Klassifizierung; m methyliert; u unmethyliert

Tab. 7.2: Relative Expression von Erythropoietin in 13 verschiedenen Zelllinien in Bezug auf Zelllinie HepB3

Zelllinie	Expression in Bezug auf HepB3	Standartabweichung
HepB3	100,00%	0,00%
Hep2	8,55%	0,36%
RPMI	39,14%	9,60%
HeLaS3	20,46%	3,26%
A549	11,68%	1,41%
FTC ZL236	42,86%	1,21%
HF57	11,66%	2,67%
Pancreas I	40,23%	7,85%
Pancreas VIII	21,95%	1,15%
MZ1257	10,94%	3,17%
MZ1851	26,52%	2,86%
MZ1973	34,87%	2,55%
MZ2861	25,19%	3,73%
MZ2865	27,08%	4,86%

Tab. 7.3 : Relative Expression von Erythropoietin in sieben verschiedenen Normalgeweben in Bezug auf eine Kontroll-cDNA.

Gewebe	Expression in Bezug auf Leber-cDNA	Standartabweichung
Herz	0,91%	0,12%
Gehirn	3,10%	0,81%
Plazenta	17,89%	1,82%
Lunge	2,25%	0,56%
Leber	100,00%	9,29%
Skelettmuskel	1,12%	0,50%
Niere	180,00%	17,37%

Tab. 7.4: Mittelwerte und Standardabweichungen der der Kolonienzahl.

		Mittelwert	Standart- abweichung
Normoxie	pCMV-Flag-EPO	5,67	1,15
	pCMV-Flag	2,00	0,00
	Signifikanztest	0,0315	
Hypoxy	pCMV-Flag-EPO	10,00	2,00
	pCMV-Flag	5,00	1,00
	Signifikanztest	0,0316	

Tab. 7.5: Mittelwerte und Standardabweichungen der Zunahme an Zellen

		Mittelwert	Standart- abweichung
Normoxie	pCMV-Flag-EPO	303%	25%
	pCMV-Flag	215%	17%
	Signifikanztest	0,01839557	
Hypoxy	pCMV-Flag-EPO	335%	26%
	pCMV-Flag	249%	17%
	Signifikanztest	0,07787999	

Tab. 7.6 : Mittelwerte und Standardabweichungen der Koloniegrößen.

		Mittelwert	Standart- abweichung
Normoxie	pCMV-Flag-EPO	186,83 μm	3,95
	pCMV-Flag	115,77 μm	6,55
	Signifikanztest	0,0092397	
Hypoxy	pCMV-Flag-EPO	115,88 μm	1,51
	pCMV-Flag	96,98 μm	4,19
	Signifikanztest	0,00030698	

8. Referenzen

(2008). Statistisches Bundesamt.

Acs, G., Acs, P., Beckwith, S.M., Pitts, R.L., Clements, E., Wong, K. & Verma, A. (2001). *Cancer Res*, **61**, 3561-5.

Acs, G., Zhang, P.J., McGrath, C.M., Acs, P., McBroom, J., Mohyeldin, A., Liu, S., Lu, H. & Verma, A. (2003). *Am J Pathol*, **162**, 1789-806.

Agathangelou, A., Cooper, W. & Latif, F. (2005). *Cancer Res*, **65**, 3497-508.

Ahrendt, S.A., Chow, J.T., Xu, L.H., Yang, S.C., Eisenberger, C.F., Esteller, M., Herman, J.G., Wu, L., Decker, P. A., J., J. & Sidransky, D. (1999). *J Natl Cancer Inst*, **91**, 332-339.

Ammarguella, F., Gogusev, J. & Drueke, T.B. (1996). *Nephrol Dial Transplant*, **11**, 687-92.

Anagnostou, A., Lee, E., Kessimian, N., Levinson, R. & Steiner, M. (1990). *Proc Natl Acad Sci USA*, **87**, 5978-82.

Anagnostou, A., Liu, Z., Steiner, M., Chin, K., Lee, E.S., Kessimian, N. & Noguchi, C.T. (1994). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3974-8.

Ankathil, R., Mathew, A., Joseph, F. & Nair, M. (1996). *Eur J Cancer B Oral Oncol*, **32B**, 63-7.

Arany, Z., Huang, L., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M., Bunn, H. & Livingston, D. (1996a). *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**, 12969-12973.

Arany, Z., Huang, L., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, c., Goldberg, M., Bunn, H. & Livingston, D. (1996b). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 12969-12973.

Bachmann, S., Hir, M.L. & Eckardt, k.-U. (1993). *J. Histochem. and Cytochem.*, **1**.

Barber, D.L., Beattie, B.K., Mason, J.M., Nguyen, M.H., Yoakim, M., Neel, B.G., D'Andrea, A.D. & Frank, D.A. (2001). *Blood*, **97**, 2230-7.

Batra, S., Perelman, N., Luck, L.R., Shimada, H. & Malik, P. (2003). *Lab Invest*, **83**, 1477-87.

- Beck, I., Ramirez, S., Weinmann, R. & Caro, J. (1991). *J Biol Chem*, **266**, 15563-6.
- Belenkov, A.I., Shenouda, G., Rizhevskaya, E., Cournoyer, D., Belzile, J.P., Souhami, L., Devic, S. & Chow, T.Y. (2004). *Mol Cancer Ther*, **3**, 1525-32.
- Belinsky, S.A., Nikula, K.J., Palmisano, W.A., Michels, R., Saccomanno, G., Gabrielson, E., Baylin, S.B. & Herman, J.G. (1998). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 11891-11896.
- Bestor, T.H. (2000). *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 2395-2402.
- Blanchard, K.L., Acquaviva, A.M., Galson, D.L. & Bunn, H.F. (1992). *Mol Cell Biol*, **12**, 5373-85.
- Blot, W., McLaughlin, J., Winn, D. & al., e. (1988). *Cancer Res*, **48(11)**, 3282-7.
- Bonsdorff, E. & Lallavisto, E. (1948). *Acta Physiol. Scand*, **16**, 150-160.
- Bowen, N.J., Fujita, N., Kajita, M. & Wade, P.A. (2004). *Biochim Biophys Acta*, **1677**, 52-7.
- Bruick, R. (2003). *Genes Devel*, **17**, 2614-2623.
- Bunn, H.F., Gu, J., Huang, L.E., Park, J.W. & Zhu, H. (1998). *J Exp Biol*, **201**, 1197-201.
- Calmon, M., Colombo, J., Carvalho, F. & al., e. (2007a). *Cancer Genet Cytogenet*, **173**, 31-7.
- Calmon, M., Colombo, J., Carvalho, F., Souza, F., Filho, J., Fukuyama, E., Camargo, A., Caballero, O., Tajara, E., Cordeiro, J. & Rahal, P. (2007b). *Cancer Gen Cyto*, **173**, 31-37.
- Calvillo, L., Latini, R., Kajstura, J., Leri, A., Anversa, P., Ghezzi, P., Salio, M., Cerami, A. & Brines, M. (2003). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4802-6.
- Carlini, R., Reyes, A. & Rothstein, M. (1995). *Kidney Int*, **47**, 740-5.
- Carnot, P. & Deflandre, C. (1906). *C.R.Acad. Sci. (Paris)*, **143**, 384-86.
- Carroll, M.P., Spivak, J.L., McMahon, M., Weich, N., Rapp, U.R. & May, W.S. (1991). *J Biol Chem*, **266**, 14964-9.
- Carvalho, G., Lefaucheur, C., Cherbonnier, C., Metivier, D., Chapel, A., Pallardy, M., Bourgeade, M.F., Charpentier, B., Hirsch, F. & Kroemer, G. (2005). *Oncogene*, **24**, 737-45.
- Chang, H., Ling, G., Wei, W. & Yuen, A. (2004). *American Cancer Society*.

- Chang, S., Sikkema, D. & Goldwasser, E. (1974). *Biochem Biophys Res Commun*, **57**, 87-96.
- Chow, L., Lo, K., Kwong, J., Wong, A. & Huang, D. (2004). *Oncol Rep*, **12**, 781-7.
- Conrad, K.P., Benyo, D.F., Westerhausen-Larsen, A. & Miles, T.M. (1996). *Faseb J*, **10**, 760-8.
- Constantinescu, S., Huang, L., Nam, H. & Lodish, H. (2001). *Mol Cell*, **7**, 377-85.
- D`Andrea, A. & Zon, L. (1990). *J Clin Invest*, **86**, 681-7.
- Dame, C., Fahnenstich, H., Freitag, P., Hofmann, D., Abdul-Nour, T., Bartmann, P. & Fandrey, J. (1998). *Blood*, **92**, 3218-25.
- Dame, C., Sola, M.C., Lim, K.C., Leach, K.M., Fandrey, J., Ma, Y., Knopfle, G., Engel, J.D. & Bungert, J. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 2955-61.
- Dammann, R., Li, C., Yoon, J., Chin, P., Bates, S. & Pfeifer, G. (2000). *Nat Genet*, **25**, 315-9.
- Dammann, R., Schagdarsurengin, U., Seidel, C. & al., e. (2005). *Histol Histopathol*, **20**, 645-63.
- Dammann, R., Takahashi, T. & Pfeifer, G. (2001). *Oncogene*, **20**, 3563-7.
- Demetri, G., Kris, M., Wade, J., Degos, L. & Cella, D. (1998). *J Clin Oncol*, **16**, 3412-25.
- Ebert, B.L. & Bunn, H.F. (1999). *Blood*, **94**, 1864-77.
- Eckardt, K.-U. (1996). *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, **1**, 28-34.
- Eefting, F., Rensing, B., Wigman, J., Pannekoek, W., Liu, W., Cramer, M., Lips, D. & Doevendans, P. (2004). *Cardiovasc Res*, **61**, 414-26.
- Esteller, M., Sanchez-Cespedes, M., Rosell, R., Sidransky, D., Baylin, S.B. & Herman, J.G. (1999). *Cancer Res*, **59**, 67-70.
- Fandrey, J., Frede, S. & Jelkmann, W. (1994). *Biochem J*, **303 (Pt 2)**, 507-10.
- Farr, A. & Roman, A. (1992). *Nucl. Acids Res.*, **20**, 920.
- Fisher, J.W. (2003). *Exp Biol Med (Maywood)*, **228**, 1-14.
- Galson, D., Tan, C., Ratcliffe, P. & Bunn, H. (1993). *Blood*, **82**, 3321-3326.
- Galson, D., Tsuchiya, T., Tendler, D., Huang, L., Ren, Y., Ogura, T. & Bunn, H. (1995a). *Mol Cell Biol*, **15**, 2135-44.

- Galson, D.L., Tsuchiya, T., Tendler, D.S., Huang, L.E., Ren, Y., Ogura, T. & Bunn, H.F. (1995b). *Mol Cell Biol*, **15**, 2135-44.
- Gardiner-Garden, M. & Frommer, M. (1987). *J Mol Biol*, **196**, 261-82.
- Glaspy, J., Bukowski, R., Steinberg, D. & al., e. (1997). *J Clin Oncol*, **15**, 1218-34.
- Gogusev, J., Zhu, D.L., Herembert, T., Ammarguellat, F., Marche, P. & Druke, T. (1994). *Biochem Biophys Res Commun*, **199**, 977-83.
- Goldberg, M.A., Glass, G.A., Cunningham, J.M. & Bunn, H.F. (1987). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**, 7972-6.
- Grant, P. & Berger, S. (1999). *Semin Cell Dev Biol*, **10**, 169-177.
- Grimm, C., Wenzel, A., Groszer, M., Mayser, H., Seeliger, M., Samardzija, M., Bauer, C., Gassmann, M. & Reme, C.E. (2002). *Nat Med*, **8**, 718-24.
- Guo, C., Tommasi, S., Liu, L., Yee, J., Dammann, R. & Pfeifer, G. (2007). *Curr Biol*, **17**, 700-5.
- Hardee, M.E., Arcasoy, M.O., Blackwell, K.L., Kirkpatrick, J.P. & Dewhirst, M.W. (2006). *Clin Cancer Res*, **12**, 332-9.
- Haroon, Z.A., Amin, K., Jiang, X. & Arcasoy, M.O. (2003). *Am J Pathol*, **163**, 993-1000.
- Hasegawa, M., Nelson, H., Peters, E., Ringstrom, E., Posner, M. & Kelsey, K. (2002). *Oncogene*, **41**, 4231-6.
- Henke, M., Laszig, R., Rube, C., Schafer, U., Haase, K.D., Schilcher, B., Mose, S., Beer, K.T., Burger, U., Dougherty, C. & Frommhold, H. (2003). *Lancet*, **362**, 1255-60.
- Hermann, A., Gowher, H. & Jeltch, A. (2004a). *Cell. Mol. Life Sci.*, **61**, 2571-2587.
- Hermann, A., Goyal, R. & Jeltsch, A. (2004b). *J. Biol. Chem.*, **279**, 48350-48359.
- Hogg, R.P., Honorio, S., Martinez, A., Agathangelou, A., Dallol, A., Fullwood, P., Weichselbaum, R., Kuo, M.J., Maher, E.R. & Latif, F. (2002). *Eur J Cancer*, **38**, 1585-92.
- Hogga, R.P., Honorioa, S., Martineza, A., Agathangeloua, A., A. Dallola, Fullwooda, P., Weichselbaumb, R., Kuoc, M.J., Mahera, E.R. & Latif, F. (2002). *European Journal of Cancer*, **38**, 1585-1592.
- Hoque, M.O., Begum, S., Topaloglu, O., Jeronimo, C., Mambo, E., Westra, W.H., Califano, J.A. & Sidransky, D. (2004). *Cancer Res*, **64**, 5511-7.
- Huang, L.E. & Bunn, H.F. (1995). *Curr Opin Hematol*, **2**, 125-31.

- Imagawa, S., Yamamoto, M. & Miura, Y. (1997). *Blood*, **89**, 1430-9.
- Ishida, E., Nakamura, M., Ikuta, M. & al., e. (2005). *Oral Oncol*, **41**, 614-22.
- Iyer, N., Leung, S. & Semenza, G. (1998). *Genomics*, **52**, 159-165.
- Jelkmann, W. (1992). *Physiol Rev*, **72**, 449-89.
- Jemal, A., Siegel, R., Ward, E. & al., e. (2008). *CA Cancer J Clin*, **58(2)**, 71-96.
- Jiang, B., Rue, E., Wang, G., Roe, R. & Semenza, G. (1996). *J Biol Chem*, **271**, 17771-17778.
- Jiang, Z., Li, X., Hu, J. & al., e. (2006). *Neurosci Res*, **56**, 450-8.
- Johnson, A.B., Denko, N. & Barton, M.C. (2008). *Mutation Research*, **640**, 174-179.
- Jones, P. & Baylin, S. (2002). *Nat Rev Genet*, **3(6)**, 415-28.
- Jones, P., Taylor, S. & Wilson, V. (1983). *Recent Results Cancer Res.*, **84**, 202-11.
- Kato, K., Hara, A., Kuno, T., Mori, H., Yamashita, T., Toida, M. & Shibata, T. (2006). *J Cancer Res Clin Oncol*, **132**, 735-743.
- Kelly, T.L.J. & Trasler, J.M. (2004). *Clin. Genet.*, **65**, 247-260.
- Klingmuller, U. (1997). *Eur J Biochem*, **249**, 637-47.
- Knippers, R. *Molekulare Genetik*, 9 edn. Georg Thieme Verlag.
- Kochling, J., Curtin, P.T. & Madan, A. (1998). *Br J Haematol*, **103**, 960-8.
- Krantz, S. & Goldwasser, E. (1984). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**, 7574-8.
- Lai, S.Y., Childs, E.E., Xi, S., Coppelli, F.M., Gooding, W.E., Wells, A., Ferris, R.L. & Grandis, J.R. (2005). *Oncogene*, **24**, 4442-9.
- Law, M., Cai, G., Lin, F., Wei, Q., Huang, S., Hartz, J., Morse, H., Lin, C., Jones, C. & Kao, F. (1986). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 6920-4.
- Li, E. (2002). *Nat. Rev. Genet.*, **3**, 662-673.
- Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Chen, K.K., Fox, G.M., Martin, F., Stabinsky, Z. & et al. (1985). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**, 7580-4.
- Lipsic, E., van der Meer, P., Henning, R.H., Suurmeijer, A.J., Boddeus, K.M., van Veldhuisen, D.J., van Gilst, W.H. & Schoemaker, R.G. (2004). *J Cardiovasc Pharmacol*, **44**, 473-9.

- Loenen, W.A. (2006). *Biochem Soc Trans*, **34**, 330-3.
- Luger, K., Mäder, A., Richmond, R., Sargent, D. & Richmond, T. (1997). *Nature*, **389**, 251-260.
- Madan, A., Lin, C., Hatch, S.L., 2nd & Curtin, P.T. (1995). *Blood*, **85**, 2735-41.
- Maeda, G., Chiba, T., Aoba, T. & Imai, K. (2007). *Odontology*, **95**, 24-9.
- Magnanti, M., Gandini, O., Giuliani, L., Gazzaniga, P., Marti, H.H., Gradilone, A., Frati, L., Agliano, A.M. & Gassmann, M. (2001). *Blood*, **98**, 2872-4.
- Maier, H., Dietz, A., Gewelke, U., Heller, W. & Weidauer, H. (1992). *Clin Investig*, **70(3-4)**, 320-7.
- Maruya, S. & al., e. (2004). *Clin Cancer Res*, **10**, 3825-3830.
- Maruya, S., Issa, J., Weber, R. & al., e. (2004). *Clin Cancer Res*, **10**, 3825-30.
- Masuda, S., Okano, M., Yamagishi, K., Nagao, M., Ueda, M. & Sasaki, R. (1994). *J Biol Chem*, **269**, 19488-93.
- Matallanas, D., Romano, D., Yee, K. & al., e. (2007). *Mol Cell*, **27**, 962-75.
- Maxwell, P.H., Ferguson, D.J., Osmond, M.K., Pugh, C.W., Heryet, A., Doe, B.G., Johnson, M.H. & Ratcliffe, P.J. (1994). *Blood*, **84**, 1823-30.
- Maxwell, P.H., Osmond, M.K., Pugh, C.W., Heryet, A., Nicholls, L.G., Tan, C.C., Doe, B.G., Ferguson, D.J., Johnson, M.H. & Ratcliffe, P.J. (1993a). *Kidney Int*, **44**, 1149-62.
- Maxwell, P.H., Pugh, C.W. & Ratcliffe, P.J. (1993b). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 2423-7.
- Minoo, P., Zlobec, I., Baker, K., Tornillo, L., Terracciano, L., Jass, J. & Lugli, A. (2007). *Modern Pathology*, **20**, 331-338.
- Mittelman, M., Neumann, D., Peled, A., Kanter, P. & Haran-Ghera, N. (2001). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 5181-6.
- Miyake, T., Kung, C. & Goldwasser, E. (1977). *J. Biol. Chem.*, **252**, 5558-5564.
- Mohyeldin, A., Lu, H., Dalgard, C., Lai, S.Y., Cohen, N., Acs, G. & Verma, A. (2005). *Neoplasia*, **7**, 537-43.
- Morakkabati, N., Gollnick, F., Meyer, R., Fandrey, J. & Jelkmann, W. (1996). *Exp Hematol*, **24**, 392-7.
- Nagai, A., Nakagawa, E., Choi, H.B., Hatori, K., Kobayashi, S. & Kim, S.U. (2001). *J Neuropathol Exp Neurol*, **60**, 386-92.

- Nayak, C., Carvalho, A., Jeronimo, C., Henrique, R., Kim, M., Hoque, M., Chang, S., Jiang, W., Koch, W., Westra, W., Sidransky, D. & Califano, J. (2007). *Laryngoscope*, **117**, 1376-1380.
- Neusser, M., Tepel, M. & Zidek, W. (1993). *Cardiovasc Res*, **27**, 1233-6.
- Nielsen, O.J., Schuster, S.J., Kaufman, R., Erslev, A.J. & Caro, J. (1987). *Blood*, **70**, 1904-9.
- Ogilvie, M., Yu, X., Nicolas-Metral, V., Pulido, S.M., Liu, C., Ruegg, U.T. & Noguchi, C.T. (2000). *J Biol Chem*, **275**, 39754-61.
- Ohneda, O., Yanai, N. & Obinata, M. (1993). *Exp Cell Res*, **208**, 327-31.
- Okami, K., Reed, A., Cairns, P., Koch, W., Westra, W., Wehage, S. & al., e. (1999). *Oncogene*, **18**, 3541-5.
- Parsa, C.J., Kim, J., Riel, R.U., Pascal, L.S., Thompson, R.B., Petrofski, J.A., Matsumoto, A., Stampler, J.S. & Koch, W.J. (2004). *J Biol Chem*, **279**, 20655-62.
- Philo, J., Aoki, K., Arakawa, T., Narhi, L. & Wen, J. (1996). *Biochemistry*, **35**, 1681-91.
- Powell, J.S., Berkner, K.L., Lebo, R.V. & Adamson, J.W. (1986). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **83**, 6465-9.
- Pugh, C., O'Rourke, J., Nagao, M., Gleadle, J. & Ratcliffe, P. (1997). *J Biol Chem*, **272**, 11205-11214.
- Pugh, C.W., Tan, C.C., Jones, R.W. & Ratcliffe, P.J. (1991). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10553-7.
- Recny, M., Scoble, H. & Kim, Y. (1987). *J Biol Chem*, **262**, 17156-63.
- Reed, A., Califano, J., Cairns, P., Westra, W., Jones, R., Koch, W. & al., e. (1996). *Cancer Res*, **56**, 3630-3.
- Remy, I., Wilson, I. & Michnick, S. (1999). *Science*, **283**, 990-3.
- Ribatti, D., Presta, M., Vacca, A., Ria, R., Giuliani, R., Dell'Era, P., B, N., Roncali, L. & Dammacco, F. (1999). *Blood*, **93**, 2627-36.
- Richter, A.M., Pfeifer, G.P. & Dammann, R.H. (2009). *Biochimica et Biophysica Acta* doi:10.1016/j.bbcan.2009.03.004.
- Riede, U.-N. & Schaefer, H.-E. *Allgemeine und spezielle Pathologie*. Thieme: Stuttgart.
- Roth, S., Denu, J. & Allis, C. (2001). *Annu Rev Biochem*, **70**, 81-120.
- Rothman, K. & Keller, A. (1972). *J Chronic Dis*, **25(12)**, 711-6.

- Ruesga, M.T., Acha-Sagredo, A., Rodriguez, M.J., Aguirregaviria, J.I., Videgain, J., Rodriguez, C., de Pancorbo Mde, L. & Aguirre, J.M. (2007). *Cancer Lett*, **250**, 140-5.
- Sanchez-Céspedes, M., Esteller, M., Wu, L. & al., e. (2000). *Cancer Res*, **60**, 892-5.
- Sang, N., Fang, J., Srinivas, V., Leshchinsky, I. & Caro, J. (2002). *Mol Cell Biol*, **22**, 2984-2992.
- Schulz, W.A. *Molecular Biology of Human Cancer*. Springer Verlag.
- Seidel, C., Schagdarsurengin, U., Blumke, K. & al., e. (2007). *Mol Carcinog*, **46**, 865-71.
- Semenza, G. (1998). *Curr Opin Genet Dev*, **8**, 588-594.
- Semenza, G., Agani, F., Booth, G., Forsythe, J., Iyer, N., Jiang, B., Leung, S., Roe, R., Wiener, C. & Yu, A. (1997). *Kidney Intmj*, **51**, 553-555.
- Semenza, G.L., Dureza, R.C., Traystman, M.D., Gearhart, J.D. & Antonarakis, S.E. (1990). *Mol Cell Biol*, **10**, 930-8.
- Semenza, G.L., Koury, S.T., Nejfelt, M.K., Gearhart, J.D. & Antonarakis, S.E. (1991a). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 8725-9.
- Semenza, G.L., Nejfelt, M.K., Chi, S.M. & Antonarakis, S.E. (1991b). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 5680-4.
- Semenza, G.L., Traystman, M.D., Gearhart, J.D. & Antonarakis, S.E. (1989). *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**, 2301-5.
- Semenza, G.L. & Wang, G.L. (1992). *Mol Cell Biol*, **12**, 5447-54.
- Shahnavaz, S., Bradley, G., Regezi, J., Thakker, N., Gao, L., Hogg, D. & al., e. (2001). *Cancer Res*, **61**, 2371-5.
- Shaw, R., Liloglou, T., Rogers, S., Brown, J., Vaughan, E., Lowe, D., Field, J. & Risk, J. (2006a). *Br J Cancer*, **94**(4), 561-568.
- Shaw, R.J., Akufo-Tetteh, E.K., Risk, J.M., Field, J.K. & Liloglou, T. (2006b). *Nucleic Acids Res*, **34**, e78.
- Sims III, R., Nishioka, K. & Reinberg, D. (2003). *Trends Genet.*, **19**, 629-639.
- Takahashi, Y., Miyoshi, Y., Takahata, C. & al., e. (2005). *Clin Cancer Res*, **11**, 1380-5.
- Takeshima, M., Saitoh, M., Kusano, K., Nagayasu, H., Kurashige, Y., Malsantha, M., Arakawa, T., Takuma, T., Chiba, I., Kaku, T., Shibata, T. & Abiko, Y. (2008). *J Oral Pathol Med*.
- Tauchi, T., Feng, G., Shen, R., Hoatlin, M., Jr., G.B., Kabat, D., Lu, L. & Broxmeyer, H. (1995). *J Biol Chem*, **270**, 5631-5.

- Viswanathan, M., Tsuchida, N. & Shanmugam, G. (2003). *Int J Cancer*, **105**, 41-6.
- Vokes, E., Weichselbaum, R., Lippman, S. & Hong, W. (1993). *N Engl J Med*, **328**, 184-194.
- Wang, G., Jiang, B., Rue, E. & Semenza, G. (1995). *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**, 5510-5514.
- Watkins, P., Eddy, R., Hoffman, N., Stanislovitis, P., Beck, A., Galli, J., Vellucci, V., Gusella, J. & Shows, T. (1986). *Cytogenet Cell Genet*, **42**, 214-8.
- Wenger, R.H., Kvietikova, I., Rolfs, A., Camenisch, G. & Gassmann, M. (1998). *Eur J Biochem*, **253**, 771-7.
- Westenfelder, C. & Baranowski, R.L. (2000). *Kidney Int*, **58**, 647-57.
- Westenfelder, C., Biddle, D.L. & Baranowski, R.L. (1999). *Kidney Int*, **55**, 808-20.
- Wittekind, C., Meyer, H.-J. & Bootz, F. *UICC: TNM Klassifikation maligner Tumoren, 6th edition*. Springer: Berlin, Heidelberg, New York.
- Witthuhn, B., Quelle, F., Silvennoinen, O., Yi, T., Tang, B., Miura, O. & Ihle, J. (1993). *Cell*, **74**, 227-36.
- Wojchowski, D.M., Gregory, R.C., Miller, C.P., Pandit, A.K. & Pircher, T.J. (1999). *Exp Cell Res*, **253**, 143-56.
- Wong, I.H., Lo, Y.M., Zhang, J., Liew, C.T., Ng, M.H., Wong, N., Lai, P.B., Lau, W.Y., Hjelm, N.M. & Johnson, P.J. (1999). *Cancer Res*, **59**, 71-73.
- Worsham, M., Chen, K., Meduri, V., Nygren, A., Errami, A., Schouten, J. & Benninger, M. (2006). *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, **132**, 668-677.
- Wu, J. & Grunstein, M. (2000). *Trends Biochem Sci*, **26**, 619-623.
- Wykoff, C., Beasley, N., Watson, P. & al., e. (2000). *Cancer Res*, **60**, 7075-83.
- Yasuda, Y., Masuda, S., Chikuma, M., Inoue, K., Nagao, M. & Sasaki, R. (1998). *J Biol Chem*, **273**, 25381-7.
- Yasuda, Y., Musha, T., Tanaka, H., Fujita, Y., Fujita, H., Utsumi, H., Matsuo, T., Masuda, S., Nagao, M., Sasaki, R. & Nakamura, Y. (2001). *Br J Cancer*, **84**, 836-43.
- Yin, H. & Blanchard, K.L. (2000). *Blood*, **95**, 111-9.
- Yoshimura, A. & Misawa, H. (1998). *Curr Opin Hematol*, **5**, 171-6.
- Youssoufian, H., Longmore, G., Neumann, D., Yoshimura, A. & Lodish, H. (1993). *Blood*, **81**, 2223-36.

- Zhang, S., Guo, C., Kong, W. & Liu, Z. (2006a). *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, **26**, 101-4.
- Zhang, S., Guo, C., Kong, W. & Liu, Z. (2006b). *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, **26**, 101-4.
- Zhang, Z., Sun, D., Van, D., Tang, A., Hu, L. & Huang, G. (2006c). *Int J Cancer*, **120**, 32-38.
- Zhang, Z., Sun, D., Van do, N., Tang, A., Hu, L. & Huang, G. (2007). *Int J Cancer*, **120**, 32-8.
- Zochbauer-Muller, S., Lam, S., Toyooka, S., Virmani, A., Toyooka, K., Seidl, S., Minna, J. & Gazdar, A. (2003). *Int J Cancer*, **107**, 612-616.
- Zuo, C., Ai, L., Ratliff, P., Suen, J.Y., Hanna, E., Brent, T.P. & Fan, C.Y. (2004). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, **13**, 967-75.

Danksagung

Als erstes möchte ich natürlich Herrn Prof. Dr. Reinhard Dammann danken, der mir, nachdem ich schon meine Diplomarbeit in seiner Arbeitsgruppe angefertigt habe, die Möglichkeit gab, auch meine Dissertation unter seiner Leitung anzufertigen. Ich danke ihm insbesondere für seine Betreuung und Hilfestellungen während dieser Zeit, die mir aber auch die Freiheiten ließen, eigene Ideen einzubringen und zu verwirklichen. Auch für die Korrektur und Kritiken meiner schriftlichen Arbeit bin ich sehr dankbar.

Als nächstes gilt mein Dank Antje Richter, Cornelia Lange und Christian Gerecke, die mich besonders während meiner Schwangerschaft bei vielen Arbeiten im Labor tatkräftig unterstützt haben, häufig eine Antwort für knifflige Probleme hatten und mit denen die Zusammenarbeit sehr viel Spaß gemacht hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei Christel Trümpler, unserer MTA in Halle/Saale, für ihre Hilfe bei der Methylierungsanalyse der HNSCC-Proben bedanken.

Und dem Rest meiner Arbeitsgruppe danke ich für die tolle Zusammenarbeit, viele neue Anregungen und eine schöne Zeit.

Auch bedanken möchte ich mich bei Diana Busch, für die Rechtschreib- und Grammatikkorrektur meiner Arbeit.

Und ein besonderer Dank gilt natürlich meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer bestärkt und unterstützt haben.

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Katrin Steinmann

Für meinen Mann Dirk und meinen Sohn Niklas
Finn, die für mich Inspiration und Motivation waren.