

**Die Expression des Transkriptionsfaktors Engrailed-2 in Kolonkarzinomzelllinien:  
Spielt Engrailed-2 eine Rolle bei der Pathogenese?**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Hohen Medizinischen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität  
Bonn

Niklas Schäfer  
aus Siegburg

2010

Angefertigt mit Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Stephan Baader
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Ulrich Herrlinger

Tag der Mündlichen Prüfung: 23 September 2010

Aus dem Anatomischen Institut, Anatomie und Zellbiologie der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn  
Direktor: Prof. Dr. med. Karl Schilling

*Diese Arbeit ist meinen Eltern Angelika Liebold-Schäfer und Norman Schäfer gewidmet.*



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....</b>	<b>7</b>
<b>2 EINLEITUNG.....</b>	<b>9</b>
<b>2.1 Der Transkriptionsfaktor Engrailed-2.....</b>	<b>10</b>
2.1.1 Neuronale Expression und Funktion von Engrailed-2 .....	11
2.1.2 Nicht-Neuronale Expression und Funktion von Engrailed-2 .....	16
<b>2.2 Pathogenese des Kolonkarzinoms .....</b>	<b>17</b>
<b>2.3 Zielsetzung .....</b>	<b>19</b>
<b>3 MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>20</b>
<b>3.1 Geräte.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 Chemikalien .....</b>	<b>21</b>
3.2.1 Chemikalien und Enzyme .....	21
3.2.2 Antikörper für Immunhistochemie und Immunzytochemie .....	21
3.2.3 Verwendete Substanzen, Lösungen, Puffer.....	21
<b>3.3 Zellkultur .....</b>	<b>22</b>
3.3.1 Zelllinien .....	22
3.3.2 Kultivierung, Konservierung und Fixierung der Zelllinien.....	22
3.3.3 Transiente Transfektion.....	25
<b>3.4 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>25</b>
3.4.1 Isolierung von RNA aus Gewebe .....	25
3.4.2 Isolierung von RNA aus Zellkulturen.....	26
3.4.3 Reverse Transkription zur Synthese von cDNA.....	26
3.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion.....	27
3.4.5 Analyse von PCR-Produkten durch Agarose-Gelelektrophorese.....	30
3.4.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	31
3.4.7 Restriktion von Vektor-DNA .....	31
3.4.8 Ligation von DNA .....	31
3.4.9 Herstellung von elektrokompetenten Zellen .....	31
3.4.10 Transformation elektrokompetenter Zellen mit Plasmid-DNA.....	32
3.4.11 Präparation von Plasmid-DNA .....	32
<b>3.5 Immunhistochemische Färbung.....</b>	<b>33</b>
3.5.1 Präparation und Fixierung von Gewebeproben.....	33
3.5.2 Immunhistochemie an Paraffinschnitten.....	33
<b>3.6 Immunzytochemische Färbung von Zellkulturen .....</b>	<b>35</b>
<b>3.7 Proliferationsmessung .....</b>	<b>35</b>
<b>4 ERGEBNISSE .....</b>	<b>37</b>

<b>4.1 Expression von Engrailed-2 in kolorektalen Tumorzelllinien.....</b>	<b>37</b>
4.1.1 Nachweis der Engrailed-2 Expression durch RT-PCR .....	39
4.1.2 Expressionsnachweis durch ICC .....	41
<b>4.2 Expression von Engrailed-2 in Darmgewebe .....</b>	<b>43</b>
4.2.1 Expressionsnachweis durch RT-PCR .....	44
4.2.2 Expressionsnachweis von Engrailed-2 in tumorösem Darmgewebe durch immunhistochemische Färbung.....	45
<b>4.3 Überexpression von Engrailed-2 in Zelllinien .....</b>	<b>48</b>
4.3.1 Erstellen eines Vektors zur Überexpression von Engrailed-2 in Zelllinien .....	48
4.3.2 Einfluss von Engrailed-2 auf die Proliferation von Kolonkarzinomzellen.....	50
4.3.3 Einfluss von Engrailed-2 auf die Differenzierung von Kolonkarzinomzellen..	54
<b>5 DISKUSSION .....</b>	<b>61</b>
<b>6 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>64</b>
<b>7 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>65</b>
<b>8 DANKSAGUNG .....</b>	<b>73</b>

# 1 Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serum-Albumin
cDNA	komplementäre DNA
CMV	Cytomegalievirus
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eko	engrailed knock out
EtOH	Ethanol
g	Erdbeschleunigung
GAD/GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
HCl	Salzsäure
KCl	Kaliumchlorid
KV	KiloVolt
LB	Luria Broth (Bakterienmedium)
mA	Milliampere
µg	Mikrogramm
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
µm	Mikrometer
mM	Millimolar
mRNA	messenger-RNA
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer

P11	Tag 11 postnatal
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PFA	Paraformaldehyd
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SNP	single nucleotide polymorphism
SSC	Natrium-Citrat-Puffer
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TET	Tris-EDTA-Tween 20 Puffer
U	Unit
wt	Wildtyp
w/v	weight per volume



## 2 Einleitung

Transkriptionsfaktoren sind Regulatoren der Proteinbiosynthese, die die Grundlagenwissenschaft seit den 60er Jahren beschäftigen (Burgess et al., 1969). Während anfangs transkriptionelle Prozesse ausschließlich in bakteriellen Systemen untersucht wurden, kennt man heute eine Vielzahl von Transkriptionsfaktoren in pro- und eukaryoten Organismen. Basale Transkriptionsfaktoren sowie gen-, zell- und gewebespezifische Faktoren binden in einer Vielzahl an eine definierte Promotorregion eines Gens und regulieren kooperativ oder additiv seine Expression. Als derartige Regulatoren bestimmen Transkriptionsfaktoren nicht nur, ob, wann und was eine Zelle zu machen hat, sie definieren auch den genauen zeitlichen und lokalen Ablauf von Differenzierungsprozessen in Organen und Organismen. Entsprechend können Mutationen in Transkriptionsfaktorgenen zu fehlgesteuerten biologischen Prozessen führen, wie z.B. zu Tumorwachstum oder Wachstumsretardierung.

Einer der ersten Transkriptionsfaktoren, der in Eukaryoten identifiziert wurde, war Engrailed (En). Engrailed wurde erstmals in genetischen Screeningverfahren von *Drosophila*-Mutanten gefunden. Nach Deletion des Engrailed-Gens zeigten die Fruchtfliegen eine veränderte anteroposteriore Ausrichtung der Flügelanlage (Lawrence und Morata, 1976). Heute wissen wir, dass Engrailed-Proteine eine Vielzahl weiterer Funktionen in Vertebraten und Invertebraten übernehmen. Sie steuern das Überleben von Zellen (Simon et al., 2004; Wurst et al., 1990), sie definieren das Zellschicksal von Vorläuferzellen (Condrón et al., 1994), sie regulieren die zelluläre Differenzierung (Jankowski et al., 2004; Marie et al., 2002) und sind an der Ausprägung zentralnervöser neuronaler Netzwerke beteiligt (Millen et al., 1995; Sgaier et al., 2007; Retaux und Harris, 1996; Vogel et al., 1996). Basierend auf dem Einfluss von Engrailed-2 auf die Etablierung zentralnervöser Netzwerke mag es deshalb nicht verwunderlich erscheinen, dass Engrailed-2-Mutationen mit dem Auftreten einer Wahrnehmungs- und Informationsverarbeitungsstörung des Gehirns, der autistischen Erkrankung, assoziiert worden sind (Gharani et al., 2004; Bartlett et al., 2005). In Anbetracht der bisher fehlenden Informationen über Funktionen von

Engrailed-2 hinsichtlich der Proliferation von Zellen, ist die 2005 aufgestellte Hypothese überraschend, dass Engrailed-2 auch an der Pathogenese des Mammakarzinoms beteiligt sein soll (Martin et al., 2005). Ein solcher Einfluss auf die Tumorphagenese und potentielle zelluläre Mechanismen waren deshalb zentrale Fragestellungen dieser Arbeit. Einführend sollen hierfür der Transkriptionsfaktor Engrailed-2 und seine Homologe sowie deren Funktionen dargestellt werden.

## 2.1 Der Transkriptionsfaktor Engrailed-2

Engrailed-Proteine gehören zur Klasse der Homeobox-Proteine, welche sich in allen eukaryoten Organismen finden und als transkriptions-regulatorische Elemente in Zellentwicklung und Zelldifferenzierung eingreifen.

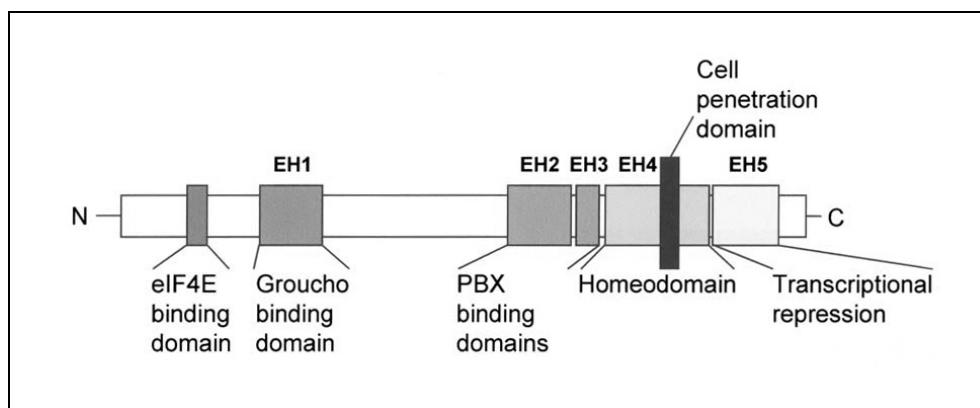


Abb. 1: Bindungsstellen des Engrailed-Proteins (Morgan, 2006)

Charakteristisch für Homeobox-Proteine ist die sogenannte Homeobox, die eine 60 Aminosäuren lange, konservierte DNA-Bindungsdomäne darstellt. Man geht davon aus, dass Engrailed über diese Homeobox im Zusammenspiel mit unterschiedlichen, entwicklungs- und zelltyp-spezifischen Kofaktoren aktivierend oder repressiv auf die Transkription von Zielgenen wirkt (Peltenburg und Murre 1996; Peltenburg und Murre 1997). Entsprechend konnte gezeigt werden, dass die Expression des Fibroblastenwachstumsfaktors 8 (FGF8) über spezifische Bindungsstellen von Engrailed-1 und -2 in Kombination mit Pbx-1 aktiviert wird. Durch die Aktivierung wird die frühe Hirn- und Extremitätenentwicklung gesteuert (Gemel et al., 1999). In Interaktion mit HNF3 $\beta$ /Foxa2 (Hepatocyte nuclear factor 3 $\beta$ ) kann Engrailed negativ regulierend auf das Mikrotubulus assoziierte Protein 1B (MAP1B) wirken. MAP1B ist Bestandteil des Zytoskeletts und unterstützt das Wachstum und die Regeneration

neuronaler Fortsätze (Foucher et al., 2003; Montesinos et al., 2001). Jüngere Arbeiten von Holst et al. (2008) zeigen eine repressive Regulation von Parvalbumin, Tetraspanin-5, Cholecystokinin sowie des Metastasen Suppressorgens 1 in transgenen Mausmutanten mit einer prolongierten Engrailed-2-Expression. Inwiefern diese Gene direkte Zielgene des Transkriptionsfaktors Engrailed-2 sind, muss noch geklärt werden. Basierend auf diesen Untersuchungen wurde allerdings klar, dass auch hier nur die kooperative Interaktion mit anderen Faktoren das heterogene zeitliche und örtliche zelltyp-spezifische Expressionsmuster der potentiellen Zielgene erklären kann.

Mechanistisch werden Engrailed-Proteine mit der klassischen Transkriptionskontrolle von Genen assoziiert. Im Jahre 2005 wurde für einen Transkriptionsfaktor erstmals beschrieben, dass Engrailed-2 auch auf die translatorische Effizienz einer Zelle Einfluss nimmt, und zwar über eine Domäne, die die Bindung an den eukaryoten Initiationsfaktor 4E (eIF4E) vermittelt (Brunet et al., 2005; Nedelec et al., 2004). Zudem konnte innerhalb der Homeodomäne eine Signalsequenz identifiziert werden, die den Export von Engrailed-2 aus dem Kern und sogar die Sekretion aus der Zelle ermöglicht (Joliot et al., 1998; Maizel et al., 1999). Brunet et al. (2005) konnten zudem zeigen, dass Engrailed über bisher unbekannte Mechanismen in neuronale Zellen aufgenommen wird und damit Fortsatzwachstum in diesen Zellen steuern kann. Die fundamentale Bedeutung der Engrailed-Proteine wird dadurch unterstrichen, dass viele der aufgezeigten Domänstrukturen über Phosphorylierungsprozesse reguliert werden. Der Sekretionsschritt kann z.B. inhibitorisch über eine Phosphorylierung durch Protein Kinase CK2 reguliert werden (Maizel et al., 2002). Die Phosphorylierung der Engrailed-Homeodomäne durch die Protein Kinase A (PKA) setzt die DNA-Bindung herab (Hjerrild et al., 2004). Engrailed-Proteine sind also nicht nur eng regulierte klassische Transkriptionsfaktoren, sondern beeinflussen auch die translatorische Effizienz einer Zelle und können sogar als sezerniertes Protein im Sinne eines Botenstoffes fungieren.

### **2.1.1 Neuronale Expression und Funktion von Engrailed-2**

Das murine Homolog zu dem bereits bekannten Gen *engrailed* in *Drosophila* wurde 1985 entdeckt und als Engrailed-1 (En-1) bezeichnet. Die Sequenz von Engrailed-1

ist zu 75% identisch mit dem *Drosophila*-Homolog. Die Gensequenz ist auf Chromosom 1 lokalisiert (Joyner et al., 1985). Engrailed-2 (En-2) ist ein weiteres Homolog, das auf Chromosom 5 identifiziert worden ist, und eine weitgehende Sequenzhomologie zu *engrailed* aufweist. Beide Gene werden im Zeitraum von Embryonaltag 9.5 bis 17.5 vornehmlich in der posterioren Hirnanlage exprimiert (Joyner und Martin, 1987). Aus diesen Abschnitten entwickeln sich unter anderem das Kleinhirn, der Pons und die Colliculi des Tectums. Die stärkste Expression von Engrailed-2 ist dabei in Zellen der Wachstumszonen nachweisbar und nimmt ab, sobald die Zellen aus diesen Keimzentren herauswandern. Allerdings findet eine Expression von Engrailed-2 auch im adulten Stadium in Zellen des Pons und in der Körnerschicht des Kleinhirns statt (Davis und Joyner, 1988; Davis et al., 1988).

Das humane Homolog Engrailed-1 befindet sich auf Chromosom 2, das humane Homolog Engrailed-2 am Ende des langen Armes von Chromosom 7q36. Dabei wurde für die Homeodomäne des humanen Engrailed-2 eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von 85% mit dem murinen Engrailed-1 und sogar von 100% mit dem murinen Engrailed-2 ermittelt (Logan et al., 1989; Poole et al., 1989).

Aufgrund der prominenten Expression von Engrailed-2 entlang der Wachstumszonen kann man erste Hinweise auf potentielle Effekte dieses Faktors auf die Herstellung definierter Zellzahlen und die Zellmigration, bis hin zur Definition des Zellschicksals ableiten. Die Kenntnis der nicht-ubiquitären, sondern auf bestimmte Strukturen begrenzte Expression erlaubt die These, dass Engrailed-2 eine entscheidende Rolle bei der Neurogenese und dem Erhalt genau dieser Strukturen, nämlich des Kleinhirns, des Pons und Teilen des Mittelhirns zukommt. Tatsächlich konnte anhand von Mausmutanten mit einer Engrailed-1- und Engrailed-2-Deletion gezeigt werden, dass Nullmutationen in diesen Genen zum Niedergang mesenzephaler dopaminergener Neurone führt. Beide Homologe, Engrailed-1 und -2, steuern dabei das Überleben der Zelle und erhalten den dopaminergen Phänotyp (Simon et al., 2004). Da in charakteristischer Weise dopaminerge Neurone bei dem beim Menschen häufigen Parkinson-Syndrom zugrunde gehen, sehen einige Autoren Engrailed-Mausmutanten als genetisches und experimentelles Modell der Parkinson-Krankheit an (Sgado et al., 2006; Sgado et al., 2008). Tatsächlich konnte eine Engrailed-2-Punktmutation mit früh beginnendem Parkinson-Syndrom (young-onset Parkinson's disease – YOPD) assoziiert werden (Rissling et al., 2009). Eine weitere

Studie zeigte eine Assoziation zwischen einem Engrailed-1-Polymorphismus und sporadischem Parkinson-Syndrom auf (Haubenberger et al., 2009). Mit der Aufklärung des Engrailed-Signalweges könnte sich folglich ein neuer Weg bei der Therapie dieser Erkrankung eröffnen.

Bereits frühe Expressionsstudien an Mäusen konnten nachweisen, dass in den embryonalen mesenzephalen Strukturen, aus denen die Colliculi des Tectums hervorgehen, die Transkriptionsfaktoren Engrailed-1 und -2 in rostrokaudalen Gradienten exprimiert werden (Davis et al., 1988). Studien an Hühnerembryonen zeigten in der Folge, dass diese Gradienten im Tectum ursächlich für die regelrechte Verteilung von temporalen und nasalen retinalen Axonen sind (Friedman und O'Leary, 1996; Itasaki et al., 1991; Itasaki und Nakamura, 1996). Nach retroviraler Überexpression von Engrailed wurde eine Veränderung des rostrokaudalen Gradienten von Ephrinen nachgewiesen, welche axonale Wegfindung steuern. Die Expression von Liganden des Eph-Rezeptors im kaudalen Tectum korreliert nicht nur mit der Expression von Engrailed, sie ist auch induzierbar (Logan et al., 1996; Shigetani et al., 1997). Experimente an *Xenopus laevis* weisen allerdings auch auf eine direkte Beteiligung von Engrailed-2 an der Zuordnung der nasalen Axone zu kaudalen, und der temporalen Axone zu rostralen Anteilen des Tectums hin. So konnte gezeigt werden, dass Engrailed-2 in die aussprossenden Axone retinaler Neurone aufgenommen wird und durch die Initiierung translatorischer Prozesse die Wachstumsrichtung lenkt (Brunet et al., 2005). Ob diese derzeit diskutierten Regulationsmechanismen separat wirken, oder sogar interaktiv axonales Wachstum steuern können, muss noch geklärt werden.

Die vermutete fundamentale Bedeutung der Engrailed-Proteine für die neurale Entwicklung zeigte sich eindrucksvoll an Mausmutanten mit deletiertem Engrailed-1-Gen. Diesen Mäusen fehlte die zerebelläre Anlage und Großteile des Mittelhirns. Insofern sind diese Nullmutanten nicht lebensfähig und sterben perinatal (Wurst et al., 1994). Demgegenüber zeigen Mäuse mit einer Nullmutation des Engrailed-2-Gens einen relativ unauffälligen Phänotyp. Die augenfälligsten Erscheinungen sind eine Hypoplasie des Kleinhirns und eine gestörte Faltung desselben. Dazu kommt es in posterioren Kleinhirnläppchen zu einer Reduktion der afferenten Moosfasern, die aus mesenzephalen, pontinen und spinalen Kerngebieten die Informationen auf

zerebelläre Körnerzellen übertragen (Joyner et al., 1991; Vogel et al., 1996). Der Phänotyp von Mäusen mit N-terminaler Deletion von Engrailed-2, was funktionell einem Knock-Out entspricht, ist nahezu identisch, was dafür spricht, dass die Homeobox für die Kleinhirnentwicklung die essentielle Domäne darstellt (Millen et al., 1994). Der als dezent zu bezeichnende Phänotyp der Engrailed-2-Nullmutationsmutanten wird mit einer funktionellen Redundanz des Engrailed-1- und -2-Gens erklärt. Dass die Engrailed-Homologe sich sogar spezies-übergreifend funktionell zumindest teilweise ersetzen können, zeigte eindrucksvoll ein Mausversuch, in dem die kodierende Sequenz von Engrailed-1 durch die aus *Drosophila* ersetzt wurde (Hanks et al., 1998). Der massive Phänotyp der Engrailed-1-Mutanten konnte bereits einige Jahre zuvor durch die Überexpression von Engrailed-2 aufgehoben werden (Hanks et al., 1995). Obwohl bei Kleinhirnanomalien motorische, ataktische Defizite zu erwarten wären, fielen die Engrailed-2-Mausmutanten jedoch in Verhaltenstests im Vergleich zum Wildtyp nur durch ein verzögertes Erlernen neuer Bewegungsabläufe auf, was auf eine nur milde Affektion des motorischen Systems hindeutet (Gerlai et al., 1996).

Weitere Aussagen über die zerebelläre Funktion von Engrailed-2 ergeben sich aus Analysen an der Überexpressionsmutante L7En-2. Diese Mausmutante exprimiert Engrailed-2 zeitlebens unter Kontrolle eines für Purkinje-Zellen spezifischen Genpromotors, während im Wildtyp die Expression in den Purkinje-Zellen perinatal abnimmt (Baader et al., 1998). Die Folge ist ein deutlicher Verlust an Purkinje-Zellen und eine daraus resultierende Hypoplasie des Kleinhirns. Parallel zur gestörten Faltung und Läppchenbildung ist auch die Dicke der Körnerzellschicht affiziert. Diese wird normalerweise durch Moosfasern aus spinalen, pontinen und zerebralen Kerngebieten innerviert, die in sagittal orientierten Fasertrakten in den Kleinhirnkortex einwachsen. Dieses hoch-konservierte Verteilungsmuster der Moosfaserterminale ist in Engrailed-2-überexprimierenden Tieren aufgehoben (Baader et al., 1999). Somit liegen die Funktionen von Engrailed-2 zum großen Anteil in der Organisation des Kleinhirns und betreffen dabei verschiedene zerebelläre Zellpopulationen sowie die regelrechte Integration in motorische Schaltkreise durch die Affektion des afferenten Schenkels.

Neben dem Zellüberleben und der axonalen Wegfindung scheint Engrailed-2 auch die zelluläre Differenzierung zu steuern. Die Reifung und Integration der zerebellären Purkinje-Zellen in ein neuronales Netzwerk beginnt perinatal und wird anhand der Einzelzellschichtbildung und des typischen Dendritenbaumwachstums sichtbar. Während Engrailed-2 vor diesem Reifungsprozess in Purkinje-Zellen exprimiert wird, wird die Expression perinatal unterdrückt. Im Zusammenhang mit den Daten aus den Nullmutanten führte dies zu der Hypothese, dass Engrailed-2 wichtig für das Überleben und die Migration der Purkinje-Zellen ist, evtl. durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren aus den Körnerzellen, die Reifung der Purkinje-Zellen aber negativ beeinflusst. Tatsächlich zeigen L7En-2-Mutanten, in denen Engrailed-2 prolongiert exprimiert wird, einen verzögerten Reifungsprozess und ein vermehrtes Absterben der Purkinje-Zellen (Jankowski et al, 2004). Zusätzlich zeigen Purkinje-Zellen der L7En-2-Maus Auftreibungen und Dornfortsatz-ähnliche Protrusionen am proximalen Axonsegment, die an dendritische Strukturen erinnern (Ch. Liebig, Dissertation, Univ. Bonn, 2007). Dies suggeriert einen Einfluss auf die Ausprägung der zellulären Polarisierung. Wir spekulieren, dass Engrailed-2 den axonalen Transport steuert, was durch eine Array-Analyse der L7EN-2 Mäuse unterstützt werden konnte (Holst et al., 2008). Bei einer Überexpression von Engrailed-2 zu einem Zeitpunkt, in dem das dendritische Wachstum überwiegt, würde folglich Zellmaterial, das für den Dendriten bestimmt ist, in das Axon transportiert werden. Die Folge wären die bei der L7En-2-Maus beobachteten dendritischen Strukturen am proximalen Axonsegment.

Es gibt nur wenig Aussagen über die Expression von Engrailed an menschlichem neuronalen Gewebe. Trotzdem wurde auch an menschlichem fetalen Gewebe eine Expression von Engrailed-1 und -2 in Hirnstamm und Kleinhirn nachgewiesen, mit stärkster Ausprägung in zerebellären Körnerzellen und pontinen Kerngebieten wie dem Nucleus olivaris inferior und Nucleus arcuatus (Zec et al., 1997). So scheinen sich die Ergebnisse an menschlichen Geweben mit denen der Maus weitgehend zu decken. Zusätzliche Bedeutung für die Entwicklung des Zentralnervensystems erlangte Engrailed-2 durch verschiedene Assoziationsstudien, in denen Engrailed-2 als Kandidatengen für Autismus definiert wurde (Bartlett et al., 2005; Benayed et al., 2005; Brune et al., 2008; Gharani et al., 2004; Petit et al., 1995; Wang et al., 2008). Neuere Daten erhärten den Verdacht, dass zwei bestimmte SNP des Engrailed-2-

Gens mit Autismus assoziiert sind (Benayed et al., 2009). Als Unterstützung für eine ursächliche oder funktionelle Beteiligung von Engrailed-2 an der Entstehung von Autismus mögen auch die morphologischen Korrelate der Engrailed-2 Mausmutanten gelten, nämlich der Verlust von Purkinje-Zellen und eine daraus resultierende Hypoplasie des Kleinhirns, sowie Veränderungen des Sozialverhaltens von Engrailed-2 Knock-Out-Mäusen, wie sie auch an autistischen Individuen beobachtet werden (Cheh et al., 2006; Kuemerle et al., 2007).

### 2.1.2 Nicht-Neuronale Expression und Funktion von Engrailed-2

Bereits die ersten Studien an *Drosophila* machten klar, dass Engrailed-Proteine nicht nur für das Zentralnervensystem wichtig sind, sondern auch die Entwicklung nicht-neuronaler Zellen beeinflusst. In *Drosophila* wurde *engrailed* als Segment-Polaritätsgen identifiziert, da Fliegen mit einer *engrailed*-Mutation eine gestörte Flügelentwicklung und deformierte benachbarte Segmente aufwiesen (Brasted, 1941). Spezies-übergreifend wird Engrailed-2 in den Muskelzellen des ersten Kiemenbogens in Maus, Huhn, *Xenopus* und Zebrafisch exprimiert und ist bis in das adulte Stadium in der Kiefermuskulatur nachweisbar. Dort wird Engrailed als Regulator des Fasertyps verstanden (Degenhardt und Sassoon, 2001). In der Maus wird Engrailed-1 auch in den Anlagen der vorderen Extremitäten und den Somiten exprimiert. Dass diese nicht-neuronale Expression für eine regelrechte Entwicklung ebenso essentiell ist, zeigt der Phänotyp der Engrailed-1-Knock-Out-Maus in Entwicklungsverzögerungen von Extremitäten, Sternum und Rippen (Wurst et al., 1994).

Für diese Arbeit von zentraler Bedeutung ist die initiale Beobachtung, dass *engrailed* in *Drosophila* auch an der Darmentwicklung beteiligt ist. Hier wirkt es vor allem im Zusammenspiel mit der Expression der Segmentpolaritätsgene *wingless* (*wg*), *hedgehog* (*hh*) und *decapentaplegic* (*dpp*) (Takashima und Murakami, 2001) und über die Regulation des Delta-Notch Signalweges (Iwaki und Lengyel, 2002; Takashima et al., 2002). Ob Engrailed-1 bzw. -2 in der Darmentwicklung bei Vertebraten eine Rolle spielen ist bisher nicht bekannt. Ein erster Hinweis darauf könnten Ergebnisse von Rudnick et al. (1994) sein, die postulieren, dass neben anderen Homeobox-Genen in den Beta-Zellen des Pankreas eine Engrailed-2-



Splicevariante exprimiert werde. Microarray-Daten der Genomic Novartis Foundation (GNF) haben eine relative Überexpression von Engrailed-2 in der kolorektalen Adenokarzinom-Zelllinie SW-480 festgestellt (Su et al., 2004). Experimentelle Ansätze für Untersuchungen einer Rolle von Engrailed bei der Darmentwicklung und der Tumorphathologie von Erkrankungen des Verdauungstraktes sind bisher nicht bekannt. Der Nachweis einer Expression in Mammakarzinom-Zelllinien und eine proliferative Fähigkeit, vor allem im Zusammenspiel mit dem Bindungspartner Pbx in Zellkultur (Martin et al., 2005), lassen solche Untersuchungen allerdings sinnvoll erscheinen.

Die Expression von Engrailed-2 ist also augenscheinlich nicht auf das Zentralnervensystem beschränkt, sondern findet in verschiedenen Geweben unterschiedlichen Ursprungs statt. Gerade im Zusammenspiel mit gewebeabhängigen Kofaktoren entfaltet sich daraus ein enormes Wirkungsspektrum.

## ***2.2 Pathogenese des Kolonkarzinoms***

Das Kolonkarzinom gehört in Deutschland zu den häufigsten malignen Erkrankungen nach dem Bronchialkarzinom bei Männern und dem Mammakarzinom bei Frauen. Jährlich sind über 70.000 Neuerkrankungen zu verzeichnen (Schmiegel et al., 2008). Die Hauptrisikofaktoren sind die Ernährungsgewohnheiten in Industrieländern, die zum überwiegenden Teil auf fleisch- und fettreicher Kost basieren, auf Ballaststoffe verzichten und häufig zu Übergewicht führen. Dazu kommen übermäßiger Nikotin- und Alkoholkonsum. In circa jedem zehnten Fall liegt eine familiäre Häufung bei genetischer Disposition vor, darunter auch die familiäre adenomatöse Polypose (FAP) und das hereditäre nichtpolypöse Kolonkarzinom-Syndrom (HNPCC-Syndrom).

Als Entstehungsursache hat sich die Adenom-Karzinom-Sequenz-Theorie etabliert. Das bedeutet, dass dem eigentlichen Karzinom Dysplasien des Kolonepithels vorangehen, die sich in 90% der Fälle als Adenom darstellen. Auf dieser Theorie fußt die primäre Prävention des Kolonkarzinoms. Ab dem 50. Lebensjahr sollte eine Koloskopie stattfinden und gegebenenfalls bereits existierende Adenome entfernt werden.

Molekularbiologisch weit erforscht ist das Tumorprogressionsmodell von Vogelstein et al. (1988). Dieses Modell besagt, dass etwa zehn Jahre vergehen, bis aus

gesunder Kolonschleimhaut ein Karzinom entsteht. In diesem Zeitraum werden durch Mutationen Onkogene aktiviert und Tumorsuppressorgene inaktiviert. Überschreitet diese Häufung von Mutationen eine kritische Grenze, liegt eine maligne Transformation vor (Herold, 2007; Vogelstein et al., 1988).

Sowohl bei sporadischem als auch erblichem Kolonkarzinom gibt es charakteristische genetische Mutationen, die eine Kaskade von weiteren Mutationen in Gang setzt. So liegen bei sporadischem Kolonkarzinom und der FAP in der Regel Mutationen im adenomatous polyposis coli-Gen (APC) vor, dagegen sind beim HNPCC-Syndrom in erster Linie DNA-Reparaturgene betroffen. Mutationen im APC-Gen führen zu Chromosomeninstabilität und beeinflussen neben dem Wnt/ $\beta$ -catenin Signalweg das Onkogen K-ras, deleted in colorectal cancer (DCC) und das Tumorsuppressorgen p53. Mutationen in DNA-Reparaturgenen, wie z. B. PMS1 und 2, MLH1 und MSH2, haben dagegen eine Mikrosatelliteninstabilität zur Folge und beeinflussen im weiteren Verlauf die TGF- $\beta$ -Kaskade über Mutationen im TGF- $\beta$ -2-Rezeptorgen und führen zu Mutationen der Gene Tcf-4, PTEN und IGF2R. Als sozusagen gemeinsame Endstrecke finden sich gehäuft Mutationen in Genen für CyclinD1, CEA, E-Cadherin und CD-44 (Grady und Markowitz, 2002; Narayan und Roy, 2003). Da die Rolle von Homeobox-Proteinen in dieser Arbeit untersucht wird, sollen im Folgenden vor allem Untersuchungen zu Cdx-1 und -2 vorgestellt werden.

In der frühen Embryogenese des Darmrohres übernehmen Cdx-1 und Cdx-2 als Transkriptionsfaktoren regulatorische Funktionen in der Organisation des Darmepithels bezüglich des Aufbaus und der Aufrechterhaltung des intestinalen Phänotyps. Expressionsstudien an Operationspräparaten und Kolonkarzinom-Zelllinien zeigen für Cdx-1 und Cdx-2 kein einheitliches Muster, lassen aber überwiegend eine verstärkte Expression im Vergleich zu gesundem Gewebe vermuten (Dang et al., 2006; Kaimaktchiev et al., 2004; Werling et al., 2003; Witek et al., 2005). Unterschiede bestehen einerseits in quantitativen Expressionsunterschieden und andererseits in Abhängigkeit des qualitativen Tumorstadiums. Dabei nimmt die Expression parallel zum Verlust der Differenzierung des Gewebes ab (Hinoi et al., 2001). Die Rolle der beiden Transkriptionsfaktoren Cdx-1 und Cdx-2 bei der Entstehung von Kolonkarzinomen ist bislang nicht geklärt. Allerdings zeigen die bisherigen Arbeiten, dass neben den bekannten Genen wie Wnt/ $\beta$ -catenin/APC und DNA-Reparaturgenen, die bekanntermaßen zu der Entstehung des Kolonkarzinoms führen, gerade im Hinblick auf Subtypen oder

Entwicklungsstadien des Kolonkarzinoms eine Beteiligung dieser Homeobox-Transkriptionsfaktoren diskutiert werden muss.

### **2.3 Zielsetzung**

Die Literaturrecherche zu Engrailed-2 ergab zwei interessante Ergebnisse: Erstens die These, dass Engrailed-2 als Onkogen in Mammakarzinomzelllinien fungieren könnte (Martin et al., 2005) und zweitens, dass in einer Kolonkarzinomzelllinie Engrailed-2 exprimiert wird (Su et al., 2004). Dies sind wichtige Erkenntnisse, da es in Säugetieren kaum Daten über eine extraneurale Existenz Engrailed-2-positiver Gewebe gibt. Wir wollten untersuchen, ob Engrailed-2 in weiteren Kolonkarzinomzelllinien exprimiert wird und dort ebenfalls einen Einfluss auf die Proliferation hat, wie es für die Mammakarzinomzelllinien beschrieben wurde. Darüber hinaus interessierte uns der Zusammenhang von Expression und Differenzierungsgrad der Zellen und ob die bekannten Wechselwirkungen von Nervenzellen, nämlich zerebellären Purkinje-Zellen, auf Kolonepithelzellen übertragen werden können. Das Ziel war zu untersuchen, ob Engrailed-2 eine Rolle bei der Pathogenese des Kolonkarzinoms spielt.

### 3 Material und Methoden

#### Rechtliche Grundlagen

Die Untersuchungen an menschlichem Gewebe wurden auf der Grundlage der revidierten Deklaration von Helsinki des Weltärztebundes (1983) und den entsprechenden gesetzlichen Grundlagen durchgeführt. Tiertötungsexperimente und tierexperimentelle Versuche an Mäusen wurden nach dem aktuell geltenden Tierschutzgesetz in Übereinstimmung mit den lokalen Vorgaben des Universitätsklinikums sowie der Stadt Bonn durchgeführt.

#### 3.1 Geräte

Gerät	Modell	Hersteller/Vertrieb
Digital-Kamera	DT5	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg
Digital-Kamera	MicroMax 1300-Y	Roper Scientific, Photometrics, Tucson, AZ, USA
Elektrophoresekammer	Electrophoresis Multiphor II System	Amersham, GE Healthcare Life Sciences
Geldokumentation	Geldoc 2000	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Inkubator Zellkultur	Hera Cell	Hereaus, Thermo Fisher Scientific
PCR-Thermocycler	GeneAmp PCR System 2400	PerkinElmer LAS GmbH, Jügesheim
PCR-Thermocycler	PTC-200 MJ Research Gradient Cycler	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf
PCR-Thermocycler	Mastercycler egradient S	Eppendorf AG, Hamburg
PH Meter	350 pH/Temp/mV Meter	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Fotometer	Life Science UV/Vis Spectrofotometer DU 530	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Fotometer	µQuant Mikroplatten Spektrofotometer	BioTek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall
Rotationsmikrotom	HM 355 S	MICROM International GmbH, Walldorf
Waagen	Labstyle 303, AG204 Delta Range, PG503-S Delta Range	Mettler-Toledo GmbH, Gießen
Zentrifugen	Biofuge primo R, Biofuge primo, Biofuge pico, Multifuge 3 S-R	Hereaus, Thermo Fisher Scientific

**Tab. 1: Geräte**

Auswahl der im Rahmen der Arbeit verwendeten Geräte aus dem Labor für Anatomie und Zellbiologie.

## 3.2 Chemikalien

### 3.2.1 Chemikalien und Enzyme

Angaben in den jeweiligen Abschnitten und Kapiteln.

### 3.2.2 Antikörper für Immunhistochemie und Immunzytochemie

<b>Primäre Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>Klonalität</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti-En2 (sc-8111)	Ziege	polyklonal	Santa Cruz
Anti-Engrailed/Invected (4D9)	Maus	-	Developmental Studies Hybridoma Bank, Iowa
Anti-E-Cadherin	Maus	monoklonal	BD Biosciences
Anti- $\beta$ -Spectrin II	Maus	monoklonal	BD Biosciences
Anti-Tgn38	Maus	monoklonal	BD Biosciences
Anti-Golgi 58K Protein (G58K)	Maus	monoklonal	Sigma
Anti-Tubulin (pan-specific)	Schaf	polyklonal	Cytoskeleton
<b>Sekundäre Antikörper</b>	<b>Spezies</b>	<b>-</b>	<b>Bezugsquelle</b>
Anti-Ziege, biotinyliert	Kaninchen	-	Vector Laboratories
Anti-Ziege, Alexa 546	Esel	-	Invitrogen, Molecular Probes
Anti-Maus, Alexa 488	Ziege	-	Molecular Probes
Anti-Maus, Alexa 546	Ziege	-	Molecular Probes
Anti-Schaf, Alexa 546	Esel	-	Molecular Probes

**Tab. 2: Antikörper**

Übersicht der im Rahmen der Arbeit verwendeten Antikörper zum Proteinnachweis in Zellkulturen und Gewebeschnitten.

### 3.2.3 Verwendete Substanzen, Lösungen, Puffer

Angaben in den jeweiligen Abschnitten und Kapiteln.

### 3.3 Zellkultur

#### 3.3.1 Zelllinien

Zelllinie	Organismus	Ursprung	Erkrankung	ATCC-Nummer
Colo-320	Mensch	Kolon	Kolorektales Adenokarzinom	CCL-220
SW-480	Mensch	Kolon	Kolorektales Adenokarzinom	CCL-228
SW-403	Mensch	Kolon	Kolorektales Adenokarzinom	CCL-230
SW-948	Mensch	Kolon	Kolorektales Adenokarzinom	CCL-237
HT-29	Mensch	Kolon	Kolorektales Adenokarzinom	HTB-38
Colo-205	Mensch	Aszites	Kolorektales Adenokarzinom	CCL-222
Colo-201	Mensch	Aszites	Kolorektales Adenokarzinom	CCL-224
LoVo	Mensch	supraklavikuläre Lymphknotenmetastase	Kolorektales Adenokarzinom	CCL-229
Daoy	Mensch	Kleinhirn	Desmoplastisches Medulloblastom	HTB-186
P-19	Maus	Embryo	Teratokarzinom	CRL-1825

**Tab. 3: Zelllinien**

Übersicht der im Rahmen der Arbeit verwendeten Zelllinien mit Verweis auf Ursprung und kommerzielle Erwerbsmöglichkeiten.

#### 3.3.2 Kultivierung, Konservierung und Fixierung der Zelllinien

Die Zelllinien wurden in 8 ml DMEM Medium in 10 cm Zellkulturschalen im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Splitten der Zellen erfolgte, wenn die Zellen nahezu konfluent gewachsen waren. Hierzu wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 1ml 1xTrypsin/EDTA (Invitrogen) verdünnt in PBS von der Kulturschale abgelöst (1-5 Minuten bei Raumtemperatur oder 37 °C). Die in Trypsin-Lösung resuspendierten Zellen wurden mit 4 ml DMEM Medium und 4 ml PBS versetzt und bei 200 g für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml DMEM

Medium resuspendiert, und 100 µl Zellsuspension in neue Zellkulturschalen ausgesät.

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen eingefroren. Die Zellen einer konfluenten Zellkulturschale wurden trypsiniert und nach einer Zentrifugation in 1000 µl DMEM Medium resuspendiert. Von der Zellsuspension wurden 700 µl in ein Cryo-Röhrchen (Nunc, 377267) überführt und mit 100 µl DMSO (Sigma, D-2651) sowie 200 µl Fetale Calf Serum (FCS) gemischt. Über Nacht wurden die Zellen bei -80 °C in einem mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter (Nalgene) eingefroren. Danach wurde das Cryo-Röhrchen in die Gasphase eines Stickstoffbehälters überführt.

Zum Auftauen wurden die Zellen kurz in einem 37 °C-Wasserbad erwärmt und dann in 5 ml DMEM Medium resuspendiert. Nach einer Zentrifugation für 5 Minuten bei 200 g wurde das Zellpellet in 1 ml DMEM Medium resuspendiert und in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät.

Zum Fixieren der Zellen wurde das Medium abgenommen, kurz mit PBS gewaschen und anfänglich mit 4 % PFA (4 g Paraformaldehyd in 1x PBS, pH 7.4) für 15 Minuten fixiert. Anschließend wurden die Zellen 4 bis 5 mal mit PBS gewaschen und entweder direkt weiterverwendet oder bei 4 °C im Kühlschrank gelagert.

Nachdem wir Engrailed-2 immunzytochemisch in PCR-positiven Zelllinien nicht nachweisen konnten, haben wir u. a. auch die Fixierung variiert.

Bei der Fixierung durch Aldehyde dienen in erste Linie die Aminogruppen der Aminosäuren Arginin und Lysin als Angriffspunkte der Proteinvernetzung. Somit kann es passieren, dass arginin- und lysinreiche Proteine mitunter so stark maskiert sind, dass der immunzytochemische Nachweis erschwert ist. In der Tat ist dies für Engrailed-2 der Fall. Die Homeobox, in deren Nähe das Antikörper-Epitop liegt, weist mehrere benachbarte Lysin- (K) und Argininreste (R) auf, wie es in Abb. 2 gezeigt ist.

Humane Peptidsequenz Engrailed-2
MEENDP <span style="background-color: #90EE90;">K</span> PG <span style="background-color: #90EE90;">E</span> AAAAVEGQ <span style="background-color: #90EE90;">R</span> QPESSPGGGSGGGGSSPGEADTGR <span style="background-color: #90EE90;">RRR</span> ALML PAVLQAPGNHQHPH <span style="background-color: #90EE90;">R</span> ITNFFIDNIL <span style="background-color: #90EE90;">R</span> PEFG <span style="background-color: #90EE90;">RRK</span> DAGTCCAGAGGG <span style="background-color: #90EE90;">R</span> GGGA GGEGGASGAEGGGGAGGSEQLLGSGS <span style="background-color: #90EE90;">R</span> E <span style="background-color: #90EE90;">P</span> RQNP <span style="background-color: #90EE90;">P</span> CAPGAGGPLPAAGSDS PGDGEGGS <span style="background-color: #90EE90;">K</span> TLSLHGGAKK <span style="background-color: #90EE90;">G</span> GDPGGPLDGL <span style="background-color: #90EE90;">K</span> ARGLGGDLSVSSDSDSS QAGANLGAQPMLWPAWVYCT <span style="background-color: #90EE90;">R</span> YS <span style="background-color: #90EE90;">D</span> R <span style="background-color: #90EE90;">P</span> SSG <span style="background-color: #90EE90;">P</span> <span style="background-color: #90EE90;">R</span> S <span style="background-color: #90EE90;">R</span> K <span style="background-color: #90EE90;">P</span> <span style="background-color: #90EE90;">K</span> <span style="background-color: #90EE90;">K</span> <span style="background-color: #90EE90;">K</span> NP <span style="background-color: #90EE90;">N</span> <span style="background-color: #90EE90;">K</span> ED <span style="background-color: #90EE90;">K</span> R <span style="background-color: #90EE90;">P</span> R <span style="background-color: #90EE90;">T</span> A <span style="background-color: #FFFF00;">FTAEQLQRLKAEFQTNRYLTEQRRQSLAQELSLNESQIKIWFQNKRAKIK</span> <span style="background-color: #FFFF00;">KATGNKNTLAVHLMAQGLYNHSTTAKEGKSDSE</span>
Murine Peptidsequenz Engrailed-2
MEEK <span style="background-color: #90EE90;">D</span> S <span style="background-color: #90EE90;">K</span> PSETAAEAQ <span style="background-color: #90EE90;">R</span> QPEPSSGGGSGGGSSPSDSDTGR <span style="background-color: #90EE90;">RRR</span> ALMLPEVL QAPGNHQHPH <span style="background-color: #90EE90;">R</span> ITNFFIDNIL <span style="background-color: #90EE90;">R</span> PEFG <span style="background-color: #90EE90;">RRK</span> DAGTCCAGAGGAR <span style="background-color: #90EE90;">R</span> GGEGGAGT TEGGGGGAGGAEQLLGAR <span style="background-color: #90EE90;">E</span> S <span style="background-color: #90EE90;">R</span> PNPACAPSAGGTL <span style="background-color: #90EE90;">S</span> AAAGDPAVDGEGGS <span style="background-color: #90EE90;">K</span> TLSLHGGAKK <span style="background-color: #90EE90;">P</span> GDPGGSLDGVL <span style="background-color: #90EE90;">K</span> ARGLGGDLSVSSDSDSSQASATLGAQ PMLWPAWVYCT <span style="background-color: #90EE90;">R</span> YS <span style="background-color: #90EE90;">D</span> R <span style="background-color: #90EE90;">P</span> SSG <span style="background-color: #90EE90;">P</span> <span style="background-color: #90EE90;">R</span> S <span style="background-color: #90EE90;">R</span> K <span style="background-color: #90EE90;">P</span> <span style="background-color: #90EE90;">K</span> <span style="background-color: #90EE90;">K</span> <span style="background-color: #90EE90;">K</span> NP <span style="background-color: #90EE90;">N</span> <span style="background-color: #90EE90;">K</span> ED <span style="background-color: #90EE90;">K</span> R <span style="background-color: #90EE90;">P</span> R <span style="background-color: #90EE90;">T</span> AFTAEQLQRL <span style="background-color: #FFFF00;">KAEFQTNRYLTEQRRQSLAQELSLNESQIKIWFQNKRAKIKKATGNKNTL</span> AVHLMAQGLYNHSTTAKEGKSDSE

### Abb. 2: Arginin- und Lysinreste

Laut Herstellerangaben liegt das Epitop des Antikörpers sc8111 (goat anti-En2, Santa Cruz) am C-terminalen Ende der Homeobox. Sowohl die humane als auch die murine Peptidsequenz von Engrailed-2 weisen mehrere benachbarte Arginin- und Lysinreste im gesamten Verlauf der Sequenz auf. Die Homeobox ist unterstrichen und gelb hinterlegt; Argininreste (R) und Lysinreste (K) sind grün hinterlegt.

Es handelt sich bei Engrailed-2 um einen Transkriptionsfaktor, der unter Umständen sehr schnell abgebaut werden kann. Aus diesem Grund haben wir auf den Waschschrift vor der Fixierung verzichtet, obwohl dadurch das Hintergrundsignal angestiegen ist. Außerdem haben wir als Fixationsmittel nur noch 2 % PFA oder eiskaltes 100 % Methanol verwendet und die Dauer der Fixierung auf 10 Minuten herabgesetzt. Danach wurde ebenfalls mehrmals mit PBS gewaschen.

Bei der Fixierung durch Alkohole oder Aceton lösen sich die Lipide der Zellmembran heraus, während die Proteine präzipitieren. Obwohl darunter die Morphologie der Zelle leidet, werden keine intermolekularen Brücken geschlagen, welche das Antigen für den Antikörper nicht detektierbar machen. Ebenso erübrigt sich bei dieser Art der



Fixierung der Schritt der Permeabilisierung während des immunzytochemischen Protokolls.

### **3.3.3 Transiente Transfektion**

Als Transfektionsreagentien wurden TransPEI von Eurogentec und FuGENE® HD Transfection Reagent verwendet. Da die Transfektionsraten vergleichbar waren, haben wir schließlich mit FuGENE® HD Transfection Reagent gearbeitet. Das Herstellerprotokoll wurde befolgt. Als optimale Ratio wurde ein Verhältnis von 6:2 Reagenz zu Plasmid ermittelt. Die Inkubationszeit zur Bildung des Transfektionskomplexes betrug 15 Minuten.

## **3.4 Molekularbiologische Methoden**

### **3.4.1 Isolierung von RNA aus Gewebe**

Die Aktivität von endogenen RNAsen vermindert die Ausbeute von Gesamt-RNA deutlich. Deswegen wurden die RNA-Präparation zügig durchgeführt, und das Gewebe nach einem kurzen Waschschrift mit PBS sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Das für RNA-Arbeiten genutzte Wasser wurde mit 0.1 % DEPC (Diethylpyrocarbonat) versetzt, gut geschüttelt und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Danach wurde das DEPC durch 50-minütiges Autoklavieren bei 121 °C inaktiviert. Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde 1 ml Trizol®-Reagenz zu 50-100 mg Gewebe gegeben. Das Gewebe wurde in einem autoklavierten Glas-Homogenisator homogenisiert und mit einer bei 100 °C gebackenen Pasteurpipette in ein Eppendorf-Cup überführt. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde in einem ersten Zentrifugationsschritt bei 12.000 x g und 4 °C für 10 Minuten überschüssiges Zellmaterial entfernt. Dies ist für die Qualität der RNA entscheidend. Der Überstand wurde anschließend mit 200 µl Chloroform pro 1 ml Trizol gemischt und bei RT für 5 Minuten inkubiert. Der zweite Zentrifugationsschritt bei 12.000 x g und 4 °C für 15 Minuten bewirkt eine Trennung von in Wasser löslichen RNA-Nukleinsäuren, von schwer löslicher hochmolekularer chromosomaler DNA, und von

in Phenol löslichen Proteinbestandteilen. Die klare, wässrige Phase wurde zur Fällung der RNA weiterverwendet.

Die Fällung der RNA aus der wässrigen Phase begann mit der Zugabe von 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml Trizol. Nach Inkubation bei RT für 10 Minuten erfolgte die dritte Zentrifugation bei 12.000 x g und 4 °C für 10 Minuten. Das Pellet wurde in 1,5 ml 75 % Ethanol/DEPC-Wasser gewaschen und bei 7.500 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde 5-10 Minuten luftgetrocknet und in ca. 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O bei 55 °C für 10 Minuten resuspendiert. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch ermittelt.

### **3.4.2 Isolierung von RNA aus Zellkulturen**

Hier sind zwei Alternativen verwendet worden, die sich im Ergebnis nicht wesentlich unterschieden haben, aber in der Auswertung berücksichtigt werden müssen.

1. Eine konfluente Zellkulturplatte (10 cm<sup>2</sup>) wurde einmal mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA (1:10 in PBS) trypsiniert. Die Zellsuspension wurde mit PBS verdünnt und bei 200 x g und RT für 4-5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde nochmals mit PBS gewaschen und bei 200 x g und RT für weitere 4-5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 2-3 ml PBS resuspendiert und je 1 ml Zellsuspension in ein Eppendorf-Cup überführt. Das Eppendorf-Cup wurde bei 1000 g 60 Sekunden zentrifugiert und das Pellet entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert, oder direkt in 1 ml Trizol resuspendiert.
2. Eine konfluente Zellkulturschale (10 cm<sup>2</sup>) wurde zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Daraufhin wurde 1 ml Trizol in die Schale gegeben und 2 Minuten bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgeschabt (Sarstedt®) und in ein Eppendorf-Cup überführt.

Anschließend wurde die Gesamt-RNA wie oben beschrieben isoliert.

### **3.4.3 Reverse Transkription zur Synthese von cDNA**

Es wurden 1-5 µg isolierte Gesamt-RNA eingesetzt und zusammen mit 1 µl Hexanukleotide (50-250 ng) und 1 µl 10 mM dNTP Mix und Aqua bidest DEPC auf

ein Volumen von 13 µl gebracht. Nach fünfminütiger Inkubation bei 65 °C erfolgte die sofortige Abkühlung auf Eis. Vor der Zugabe des RT-Mix (4 µl 5x Buffer, 2 µl 0.1 M DTT) wurde das Cup kurz zentrifugiert. Nun durchlief der Ansatz ein Thermocycler-Programm mit einer Unterbrechung und der Zugabe der reversen Transkriptase (1 µl bzw. 200 U Super Script II): 10 Minuten 25 °C, 2 Minuten 42 °C, Zugabe des Enzyms, 50 Min 42 °C, 15 Minuten 70 °C, Abkühlen auf 4 °C.

### 3.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion ist eine bahnbrechende Entdeckung Mitte der 1980er Jahre gewesen und heutzutage eine Standardmethode in nahezu allen molekularbiologischen Laboren. Sie dient dazu, definierte Sequenzen genomischer sowie komplementärer DNA in exponentieller Weise zu amplifizieren. Mit Hilfe von spezifischen Primern, den Oligonukleotiden, kann eine Sequenz begrenzt werden, sodass sich schließlich nur das dazwischenliegende Fragment in mehreren Folgeschritten amplifizieren lässt. Dafür verwendet man eine hitzestabile DNA-Polymerase, meistens die *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*). Der Reaktionsablauf beginnt in einem ersten Denaturierungsschritt mit der Auftrennung des DNA-Doppelstranges bei einer Temperatur von 94 °C. Im zweiten Schritt, der Anlagerungsphase (*annealing*), binden die Oligonukleotidprimer bei einer Temperatur von 55-65 °C spezifisch am 5'-Ende des aufgetrennten *sense*- und *antisense*-Stranges und bilden somit den Startpunkt für den dritten Schritt. Dieser wird als Elongation bezeichnet. Die DNA-Polymerase bildet nun bei ihrer Optimaltemperatur von in der Regel 72 °C durch im Reaktionsansatz im Überschuss enthaltene Desoxyribonukleotide zwei neue DNA-Doppelstränge. Dieser Zyklus von drei Schritten wird 25-35 mal in einem Thermocycler wiederholt. Somit kann die ursprüngliche Template-DNA in exponentieller Weise vervielfältigt werden. Obwohl es Standardprotokolle gibt, muss für jedes zu amplifizierende DNA-Fragment ein optimales Protokoll etabliert werden, indem man dem Reaktionsansatz zum Beispiel Substanzen wie Magnesium-Chlorid (MgCl<sub>2</sub>) oder Dimethylsulfoxid (DMSO) zumischt und eine optimale *annealing*-Temperatur sowie Zykluslänge empirisch ermittelt.

Reagentien Mix1 (15µl)	Volumen	Endkonzentration
10x PCR Puffer (ohne MgCl <sub>2</sub> ) mit KCl	1,5 µl	1x
25mM MgCl <sub>2</sub>	1,6 µl	2 mM
DMSO	1,2 µl	6 % v/v
En-2 insert F (20pmol/µl)	0,5 µl	0,5 µM
En-2 insert R (20pmol/µl)	0,5 µl	0,5 µM
cDNA		
Aqua bidest	ad 15 µl	
Reagentien Mix2 (5µl)		
10x PCR Puffer (ohne MgCl <sub>2</sub> ) mit KCl	0,5 µl	1x
10mM dNTP	0,4 µl	0,2 mM
Taq 5U/µl MBI Fermentas	0,1 µl	0,5 U
Aqua bidest	4,0 µl	
<b>Gesamtansatz</b>	20 µl	

Tab. 4: PCR-Protokoll zum Nachweis von Engrailed-2 (Fragment und gesamte kodierende Sequenz)

En2inh_F	5'-AGA CGC TCT CGC TGC ACG GTG-3'
En2inh_R	5'-TCT GGA ACT CGG CCT TGA GCC-3'
Fragmentlänge in 2% Agarosegel	≈ 318 bp

Tab. 5: Primersequenzen zum Nachweis des Engrailed-2-Fragments

En2_FLh_F	5'-CCAGTGTGGGATCCACTGTGAACAGCATGGAGGAG-3'
En2_FLh_R	5'-GCCTCCTAGGCCCGCCCTACTCGCTGTCCGACTTGC-3'
Fragmentlänge in 2% Agarosegel	≈ 1046 bp

Tab. 6: Primersequenzen zum Nachweis der gesamten kodierenden Sequenz von Engrailed-2

Schritt	Temperatur	Zeit [Min]	
1	94°C	10:00	
2	80°C	2:00	Zugabe Mix 2
3	94°C	0:30	
4	63°C	0:30	
5	72°C	0:30	
6			zu 3 (32mal)
7	72°C	10:00	
8	4°C	∞	

Tab. 7: PCR-Bedingungen zum Nachweis des Engrailed-2-Fragments

Schritt	Temperatur	Zeit [Min]	
1	94°C	10:00	
2	80°C	2:00	Zugabe Mix 2
3	94°C	0:30	
4	60°C	0:30	
5	72°C	1:00	
6			zu 3 (32mal)
7	72°C	10:00	
8	4°C	∞	

Tab. 8: PCR-Bedingungen zum Nachweis der gesamten kodierenden Sequenz von Engrailed-2

Reagentien Mix1 (15µl)	Volumen	Endkonzentration
10x PCR Puffer mit (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1,5 µl	1x
25mM MgCl	1,2 µl	1,5 mM
DMSO	1,2 µl	6% v/v
En-1_insert_F (20pmol/µl)	0,5 µl	0,5 µM
En-1_insert_R (20pmol/µl)	0,5 µl	0,5 µM
cDNA		
Aqua bidest	ad 15 µl	
Reagentien Mix2 (5µl)		
10x PCR Puffer mit (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,5 µl	1x
10mM dNTP	0,4 µl	0,2 mM
Taq 5U/µl MBI Fermentas	0,1 µl	0,5 U
Aqua bidest	4,0 µl	
<b>Gesamtansatz</b>	20 µl	

Tab. 9: PCR-Protokoll zum Nachweis von Engrailed-1

En-1_insert_F	5'-CCT AAA AGT CAG CGC GAC TCG G-3'
En-1_insert_R	5'-CGG TTT GCC TGG AAC TCC GCC-3'
Fragmentlänge in 1% Agarosegel	≈ 983bp

Tab. 10: Primersequenzen zum Nachweis eines Engrailed-1-Fragments

Schritt	Temperatur	Zeit [Min]	
1	94°C	5:00	
2	80°C	2:00	Zugabe Mix 2
3	94°C	0:30	
4	60°C	0:30	
5	72°C	1:00	
6			zu 3 (32mal)
7	72°C	10:00	
8	4°C	∞	

**Tab. 11: PCR-Bedingungen zum Nachweis von Engrailed-1**

Zum Nachweis der Expression von Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GAPDH) wurden entweder die Bedingungen für Engrailed-2 benutzt oder es wurde eine Duplex-PCR zusammen mit den Engrailed-2-Primern durchgeführt. Dabei wurden die GAPDH-Primer jeweils in einer Konzentration von 1 pmol/µl dem Ansatz zugeführt. Das entspricht einer Endkonzentration von 50 nM.

GAPDH mouse_F	5'- TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG GC -3'
GAPDH mouse_R	5'- CAT GTA GGC CAT GAG GTC CAC CAC -3'
GAPDH human_F	5'- TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GTC -3'
GAPDH human_R	5'- CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC -3'
Fragmentlänge in 1% Agarosegel	≈ 900 bp

**Tab. 12: Primersequenzen zum Nachweis der GAPDH Gen-Fragmente**

### 3.4.5 Analyse von PCR-Produkten durch Agarose-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese wurde eingesetzt, um DNA-Fragmente für analytische oder präparative Zwecke im elektrischen Feld aufzutrennen. In Abhängigkeit von der Fragmentgröße wurden Agarosegel mit verschiedenen Konzentrationen (0,5 – 2 % (w/v)) in 1x TBE Puffer hergestellt. Nach dem Aufkochen wurde die flüssige Agaroselösung mit 0.5 µg/ml (w/v) Ethidiumbromid versetzt, wodurch später die Nukleinsäuren durch Bestrahlung mit UV-Licht sichtbar gemacht wurden. Die DNA Proben wurden mit DNA-Ladepuffer gemischt und zur Auftrennung in die Ladetaschen des Gels aufgetragen. Die Trennung erfolgte bei einer konstanten elektrischen Spannung von 5 Volt/cm (Elektrodenabstand).

### **3.4.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Für präparative Anwendungen wurden die entsprechenden DNA-Fragmente aus einem Agarosegel unter UV-Licht ausgeschnitten und mithilfe des „PCR clean-up Gel extraction Kit“ (Machery & Nagel, 740609.50) nach Angaben des Herstellers isoliert.

### **3.4.7 Restriktion von Vektor-DNA**

Die Reaktionsbedingungen und Puffer wurden nach den Angaben der Hersteller angewendet. Für einen analytischen Ansatz wurden 2 µl 10x Puffer und 10 U Restriktionsendonukleasen mit 1 µg DNA in 20 µl H<sub>2</sub>O gemischt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Für einen präparativen Ansatz wurden 10 µg DNA in einem Reaktionsansatz von 200 µl über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **3.4.8 Ligation von DNA**

Die Ligation von DNA-Fragmenten in ein Vektor-Plasmid wurde mit einer T4-DNA Ligase (NEB) nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Eingesetzt wurden 50 ng Vektor-DNA in einem molaren Verhältnis von 3:1 zur zu klonierenden Fragment-DNA. Im Reaktionsmix (20 µl) sind zusätzlich 2 µl T4 DNA Ligase Puffer (NEB) und 1 µl T4 DNA Ligase (NEB, M0202S) sowie H<sub>2</sub>O enthalten. Die Ligation wurde bei 16 °C über Nacht durchgeführt. Von dem Ligationsansatz wurden 5 µl zur Transformation von E. coli Bakterien eingesetzt.

### **3.4.9 Herstellung von elektrokompetenten Zellen**

Zur Herstellung elektrokompetenter Bakterienzellen wurden am Tag vor der Nutzung 5 bzw. 10 ml LB Medium mit einer Glycerinkultur (hier: DH5alpha) angeimpft. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37 °C und leichtem Schütteln bei 250 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurden 100 bzw. 500 ml LB Medium mit 1 ml der frischen Bakteriensuspension angeimpft (1:20), und diese Bakteriensuspension bei 37 °C und 250 rpm bis zu einer optischen Dichte zwischen 0.5 und 1.0 bei 600 nm kultiviert. Dieser Vorgang dauerte etwa 3 Stunden. Dann wurde die Bakteriensuspension in

vorgekühlten 50 ml-Röhrchen für 15 Minuten bei 4000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 bzw. 500 ml 4 °C kaltem autoklaviertem Aqua bidest resuspendiert.

Die Suspensions- und Zentrifugationsschritte wiederholten sich dreimal, bis schließlich das Pellet in 0.2 bzw. 1 ml Aqua bidest und 10 % Glycerin resuspendiert wurde. Die Suspension wurde dann in 40-100 µl Portionen aliquotiert, die Aliquote in flüssigem Stickstoff schockgefroren, und bei –80 °C gelagert.

#### **3.4.10 Transformation elektrokompenter Zellen mit Plasmid-DNA**

Zur Transformation der elektrokompenten Zellen mit Plasmid-DNA wurden 40 µl angetauter elektrokompenter Bakterienzellen mit 0,2-1 µl Ligationsprodukt (1-5 ng Plasmid) vermischt und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten gegeben. In einem Elektroporator (Biorad Electroporator) wurde die DNA bei 1,22 KV Ladespannung für 5-6 Millisekunden in die Bakterien eingebracht. Die Bakterien wurden dann in Falcon-Küvetten transferiert und mit 1 ml LB Medium ohne Ampicillin vermischt. Die Falcon-Küvetten wurden 30-45 Minuten bei 37 °C mit einer Frequenz von 200 rpm geschüttelt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension für 5 Minuten bei 4000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Bakterien-Pellet mit LB Medium plus Ampicillin (50 µg/ml) resuspendiert. 50 µl wurden auf LB Agar Platten ausgestrichen und über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C kultiviert.

#### **3.4.11 Präparation von Plasmid-DNA**

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus E. coli Bakterien erfolgte mithilfe des „Nucloespin Plasmid QuickPure Kit“ (Machery & Nagel, 740615.250) bzw. dem „NucleoBond PC500 Kit“ (Machery & Nagel, 740574.50) nach Herstellerangaben.



## **3.5 Immunhistochemische Färbung**

### **3.5.1 Präparation und Fixierung von Gewebeproben**

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Mäuse wurden nach den aktuell geltenden Richtlinien des Tierschutzgesetzes gehalten. Für immunhistochemische Färbungen wurden postnatale Tiere unterschiedlichen Alters perfusionsfixiert. Dazu wurde das Blut der Mäuse nach Anästhesie mit Avertin nach Standardprotokollen mit entweder 10 % Formalin oder der Bouin'schen Lösung (71,4 % Pikrinsäure, 9,25 % Formalin, 4,7 % Eisessig) perfusionsfixiert (Jankowski et al., 2004). Bei einer Maus (FVB/N, männlich, adult, Wildtyp) wurden Groß- und Kleinhirn, Mittelhirn, Hirnstamm, Leber, Magen, Dünndarm, Dickdarm mit Rektum und Nieren explantiert. Den zwei anderen Mäusen (FVB/N, weiblich, adult, L7En2; FVB/N, weiblich, adult, Wildtyp) wurde das Kleinhirn entnommen. Die explantierten Organe wurden 8 Stunden bei RT nachfixiert und anschließend maschinell in Paraffin eingebettet (Tissue-Tek® VIPTM 5 Jr., Sakura, Zoeterwoude, Niederlande).

Das Institut für Pathologie der Universität Bonn hat mir freundlicherweise 10 Formalin-fixierte und in Paraffin gebettete Gewebeproben von zufällig gewählten Patienten mit kolorektalem Adenokarzinom zur Verfügung gestellt. Von den Paraffinblöcken wurden 10 µm dünne Schnitte mit einem Mikrotom angefertigt und auf Glasobjektträger (Histobond, Marienfeld) gezogen. Die Schnitte wurden 7-14 Tage im Brutschrank bei 37 °C getrocknet.

### **3.5.2 Immunhistochemie an Paraffinschnitten**

Das klassische immunhistochemische Protokoll mit DAB-Färbung sieht neun Schritte vor: Entparaffinieren mit Xylol und Überführen in eine wässrige Phase, Antigen-Demaskierung durch Erhitzen in Pufferlösung, Blockieren der endogenen Peroxidase-Aktivität, Permeabilisieren des Gewebes mit einem Detergens, Blockieren von unspezifischen Bindungsstellen mit Serum, Inkubation mit dem Primärantikörper, Inkubation mit einem biotinylierten Sekundärantikörper, Inkubation

mit Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex, DAB-Reaktion zur Sichtbarmachung des Antikörperkomplexes. Anschließend werden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe dehydratisiert und mit Xylol in eine organische Phase überführt.

Ausgehend von einem Standardprotokoll haben wir ein Protokoll für den Antikörper goat anti-En2 (sc-8111) entwickelt, mit dem wir den bestmöglichen immunhistochemischen Nachweis von Engrailed-2 erbringen konnten.

1	Entparaffinieren und Rehydrieren der Paraffin-Schnitte mit Xylol (3x 10min), 100% Ethanol (EtOH) (3x 5min), 90% EtOH (1x 5min), 70% EtOH (1x 5min), 50% EtOH (1x 5min).	
2	Überführen der Schnitte in PBS	
3	Destabilisieren der Proteinbrücken und Freilegen des Antikörper-Epitops durch Erhitzen der Schnitte in Tris-EDTA-Tween20-Puffer für 40min auf >100°C.	<u>10x Tris-EDTA-Tween20:</u> 10mM Tris-Base, 1mM EDTA, 0,05% Tween20
4	Abkühlen lassen bei Raumtemperatur (RT) und anschließend 2x 5min Waschen in PBS.	
5	Blockieren der endogenen Peroxidaseaktivität durch Inkubation mit 1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> und 10% Methanol in PBS für 10-15min bei Raumtemperatur.	<u>pro Glasküvette:</u> 52ml PBS, 2ml 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 6ml 100% Methanol
6	Waschen in PBS für 2x 5min.	
7	Permeabilisieren des Gewebes mit Detergens 0,5% TritonX100 in PBS für 20-30min bei RT.	<u>pro Glasküvette:</u> 54ml PBS, 6ml 5% TritonX100
8	Waschen in PBS für 3x 5min.	
9	Vorsichtiges Abtrocknen des Objektträgers und Einkreisen des Gewebes mit Fettstift. Weitere Arbeitsschritte in Inkubationskammer.	
10	Blockieren der unspezifischen hydrophoben Bindungsstellen mit 2% Rinderserum (BSA) in PBS für 30-45min bei RT.	200-400µl pro Objektträger
11	Inkubation mit Erstantikörper goat anti-En2 (sc8111) in der Verdünnung 1:400 in 2% BSA über Nacht bei 4°C.	
12	Entfernen der Antikörperlösung und Waschen mit PBS 4x 5min.	
13	Inkubation mit biotinyliertem Zweitantikörper donkey anti-goat 1:200 in 2% BSA für 60min bei RT.	

14	Vorbereiten der Avidin-Biotin-Peroxidase-Complex-Lösung (ABC-Lsg.) 30-40min vor Applikation.	1:100 in PBS
15	Entfernen der Antikörperlösung und Waschen mit PBS 4x 5min.	
16	Inkubation mit ABC-Lösung für 60min bei RT, anschließend Waschen mit PBS 3x 5min.	
17	Sichtbarmachung des Antikörper-Peroxidase-Komplexes mit 0,05% DAB-Reagenz. Stoppen der Reaktion nach ca. 5min, abhängig vom Hintergrundsignal.	1:10 0,5% DAB in PBS, 1:1000 30% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> Inaktivieren: Hydrochlorit
18	Waschen der Schnitte in PBS für 2x 5min, dann weitere Waschschrte in Aqua bidest.	
19	Dehydrieren der Schnitte durch aufsteigende Alkoholreihe: 1x 2min 70% EtOH, 1x 5min 90% EtOH, 2x 5min 100% EtOH, 2x 10min Xylol.	

**Tab. 13: Immunhistochemisches Protokoll zum Nachweis von Engrailed-2 mit dem Antikörper sc-8111**

### **3.6 Immunzytochemische Färbung von Zellkulturen**

Im Gegensatz zur Immunhistochemie wurde bei der Immunzytochemie mit Fluoreszenz-markierten Zweitantikörpern gearbeitet. In diesem Fall schließt sich der Inkubation mit dem Primärantikörper ein 60 minütiger Inkubationsschritt mit dem fluoreszierenden Sekundärantikörper an. Nach gründlichem Waschen der Zellen mit PBS und einer Kernfärbung mit Hoechst, wurden die Böden der Kulturschalen ausgesägt und auf speziellen Objektträgern mit Kaisers Gelatine eingedeckelt. Die Präparate wurden mit einem Axioskop 2 mot (Zeiss, Göttingen) analysiert und die Färbungen photographisch mit der MicroMax-Kamera dokumentiert.

### **3.7 Proliferationsmessung**

Zur Messung der Proliferation wurden Kulturen der Zelllinien HT-29, SW-403 und P19 mit En-2 Konstrukten transfiziert und nach 24 bzw. 48 Stunden mit Methanol fixiert und mittels DAB immunzytochemisch gefärbt. Jeweils 10 Aufnahmen wurden pro Bedingung mit einem 20x-Objektiv am aufrechten Axioskop 2 mot mit XC50-Kamera (Olympus) aufgenommen. Die Gesichtsfelder haben sich dabei nicht

überschnitten. Die Auswertung erfolgte mit dem Bildbearbeitungsprogramm ImageJ vom National Institute of Health ([rsbweb.nih.gov/ij/download.html](http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html)). Zunächst wurde das RGB-Bild in die einzelnen Kanäle zerlegt. Für die Analyse wurde der Grünkanal aufgrund des besten Schwarz-Weiß-Kontrasts verwendet. Nun wurde mittels eines Threshold-Wertes das Bild in eine Schwarz-Weiß-Graphik umgewandelt, wobei Fluoreszenzen über dem Threshold weiß und Hintergrundpixel schwarz gemalt wurden. Die Anzahl der weißen Bildpunkte wurde in Pixel gemessen. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 11 aufgeführt. Dabei gibt Area 1 den Wert für die transfizierten und Area 2 den Wert für die nicht-transfizierten Zellen an.

<b>Zelllinie</b>	<b>Threshold-Werte</b>	
	<b>Area 1</b>	<b>Area 2</b>
HT-29 nach 24 und 48 h	100 bis 200	200 bis 242
SW-403 nach 24 und 48 h	100 bis 165	165 bis 225
P19 nach 24 h	100 bis 200	200 bis 236
P19 nach 48 h	100 bis 180	180 bis 215-228

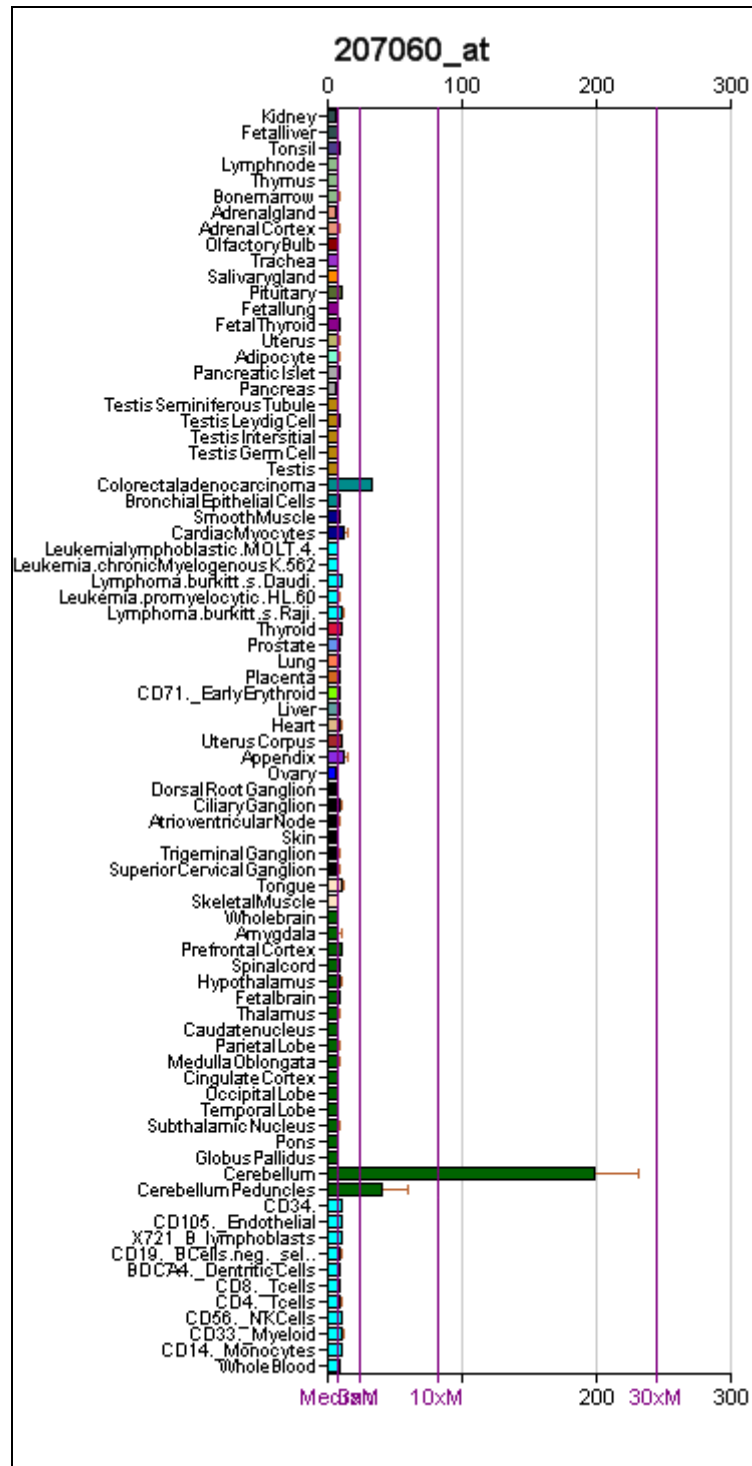
**Tab.14: Einstellung der Threshold-Werte im Programm ImageJ zur Messung der Fläche beider Populationen**

Die errechneten Pixelwerte wurden in eine Microsoft Excel-Tabelle geladen. Die Mittelwerte der Flächen und des Verhältnisses beider Flächen wurden in einem Kreis- bzw. Säulendiagramm zur besseren Veranschaulichung dargestellt. Als statistisches Verfahren zum Vergleich der normalverteilten Pixelwerte wurde der T-Test verwendet. Trotz der geringen Probenzahl ließen sich bereits Tendenzen ablesen, die eine detaillierte Untersuchung erübrigten.

## **4 Ergebnisse**

### ***4.1 Expression von Engrailed-2 in kolorektalen Tumorzelllinien***

Engrailed-2 ist ein Transkriptionsfaktor, dessen Expression und funktionelle Charakterisierung im Zentralnervensystem zum Teil gut experimentell untersucht ist. Im Jahr 2004 publizierte das „Genomics Institute of the Novartis Research Foundation“ (GNF) erstmals eine Engrailed-2 Expression außerhalb des ZNS in einer kolorektalen Adenokarzinomzelllinie (Abb. 3) (Su et al., 2004). Kurze Zeit darauf konnte gezeigt werden, dass Engrailed-2 in Mammakarzinomzellen und in entsprechendem humanem Gewebe exprimiert wird, und als Pathogenesefaktor für die Entstehung dieser Tumorentität postuliert wurde (Martin et al., 2005). Da die Expressionsanalyse an kolorektalen Adenokarzinomzelllinien mittels Microarray-Verfahren durchgeführt wurde, sollte zunächst mit molekularbiologischen Methoden geprüft werden, ob und in welcher Regelmäßigkeit kolorektale Karzinom-Zelllinien Engrailed-2 exprimierten. Die hier verwendeten Zelllinien wurden freundlicherweise von Frau Diplom-Biologin Annabelle Vogt aus der Medizinischen Klinik I des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung gestellt.

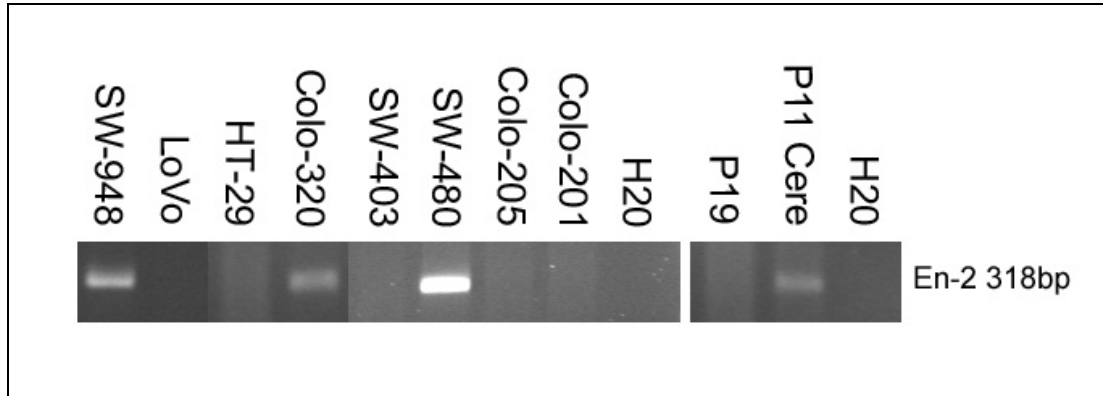


**Abb. 3: Microarray-Daten der GNF**

Der Nachweis von Engrailed-2 gelang in Gewebe und Gesamt-RNA des Kleinhirns sowie in geringerer Konzentration in der Kolonkarzinomzelllinie SW-480. Die übrigen untersuchten Gewebe und RNA-Extrakte waren En-2-negativ (Daten wurden von <http://biogps.gnf.org> entnommen).

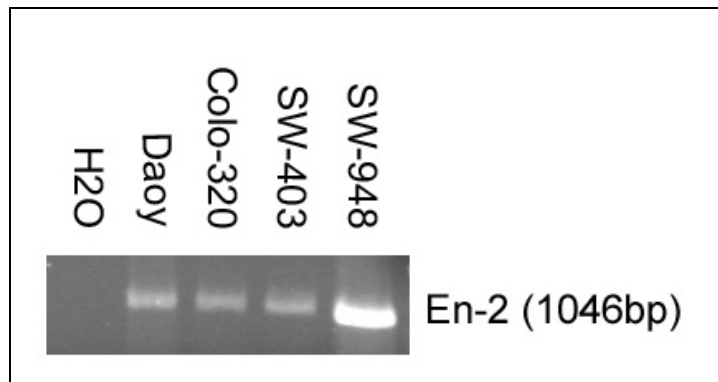
#### 4.1.1 Nachweis der Engrailed-2 Expression durch RT-PCR

Zum Nachweis der Engrailed-2-Expression wurde aus acht verschiedenen kolorektalen Adenokarzinom-Zelllinien die Gesamt-RNA gewonnen und daraus cDNA hergestellt. In allen Syntheseansätzen wurde dieselbe Menge an RNA zur reversen Transkription verwendet. Der Erfolg der cDNA Synthese wurde durch die Amplifikation des „House-keeping“-Gens GAPDH kontrolliert. Die für die Polymerase-Ketten-Reaktion verwendeten Oligonukleotid-Primer lagen innerhalb der exonischen Sequenz und sind exonübergreifend konzipiert, sodass eine mögliche Amplifikation genomischer DNA ausgeschlossen werden konnte. Als Positivkontrolle zum Nachweis von Engrailed-2 wurde zum einen zerebelläres Gewebe, zum anderen die aus dem Kleinhirn abstammende Medulloblastomzelllinie Daoy verwendet (freundlicherweise von Prof. Th. Pietsch, Neuropathologie des Universitätsklinikums Bonn zur Verfügung gestellt). In allen positiven Proben konnte ein DNA-Fragment von 318 bp amplifiziert werden, was der theoretisch ermittelten Größe des Engrailed-2-Fragments entsprach. Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, konnte von der cDNA der kolorektalen Karzinomzelllinien SW-480, SW-948 und Colo-320 das En-2-Fragment amplifiziert werden. Um das PCR-Produkt zu verifizieren und darüber hinaus festzustellen, ob Splice-Varianten in diesen Zelllinien vorlagen, wurde die RT-PCR mit Primern wiederholt, welche die gesamte kodierende Sequenz einschlossen. Diese Experimente zeigten, dass die vollständige mRNA in diesen Zelllinien exprimiert wurde (Abb. 5). Das Amplifikationsprodukt von Medulloblastomzellen wurde zudem sequenziert, wodurch das Vollängenprodukt eindeutig als Engrailed-2-Sequenz identifiziert werden konnte.



**Abb. 4: Kolonkarzinomzelllinien exprimieren Engrailed-2.**

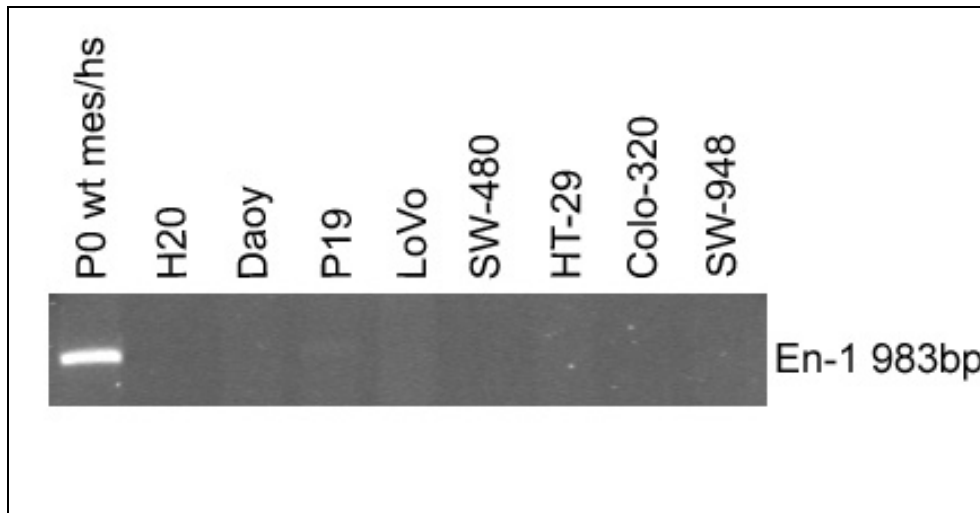
Ein 318 bp langes Genfragemnt von Engrailed-2 wurde mittels RT-PCR aus verschiedenen kolorektalen Tumorzelllinien (linkes Panel), sowie der Teratokarzinomzelllinie P19 und einer Kleinhirnprobe von 11 Tage alten Tieren (P11 Cere) isoliert.



**Abb. 5: Kolonkarzinomzelllinien exprimieren Engrailed-2.**

Analog dem in Abb.4 dargestellten Nachweis des 318 bp-langen En-2-Genfragments konnte in den En-2-positiven kolorektalen Tumorzelllinien sowie der Medulloblastomzelllinie Daoy das Vollängenprodukt von En-2 nachgewiesen werden. Weitere Banden waren nicht sichtbar.





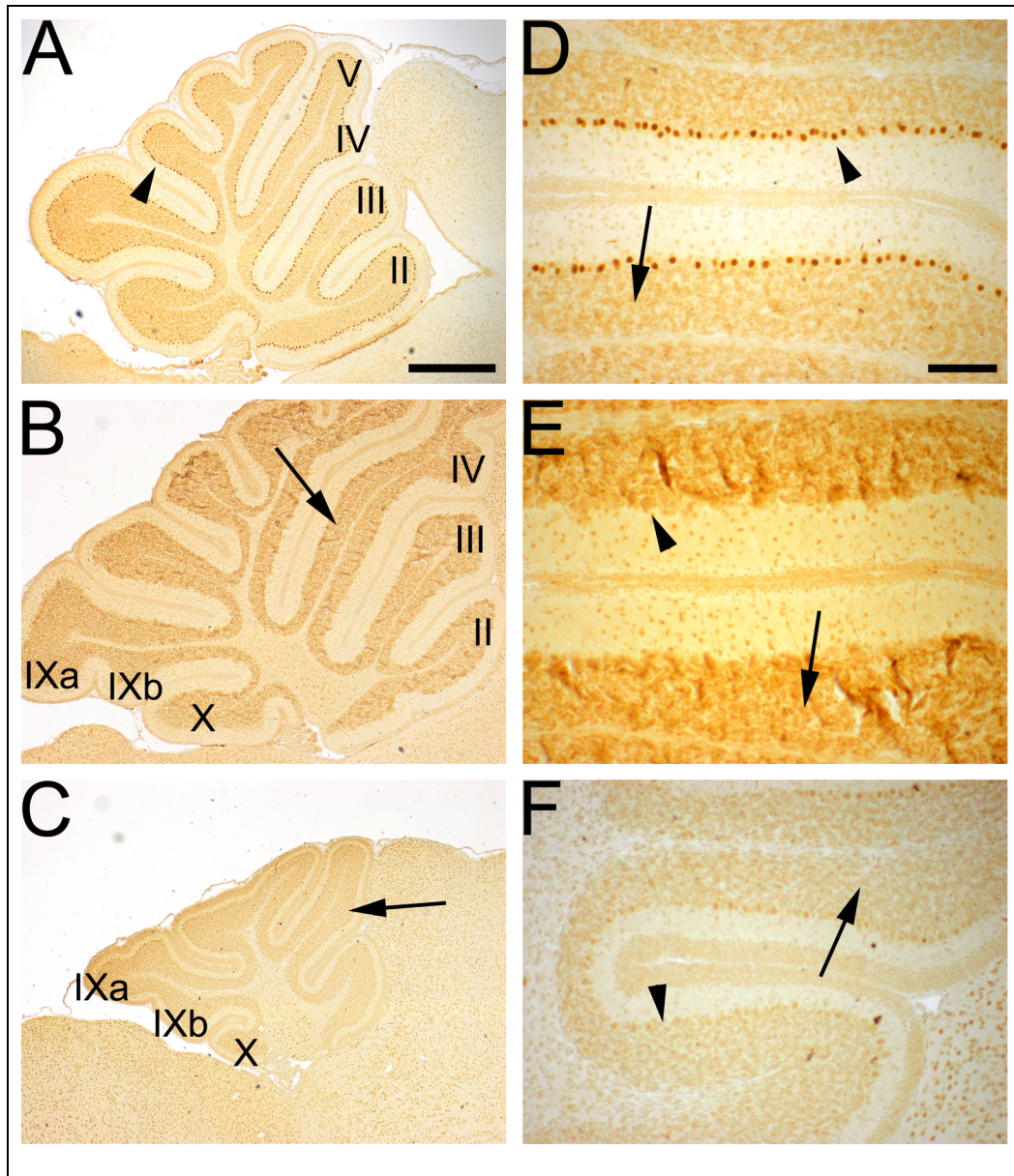
**Abb. 6: Kolonkarzinom-Zelllinien exprimieren kein Engrailed-1**

CDNA aus Mesenzephalon und Hirnstamm einer Wildtyp-Maus an P0 diente als Positivkontrolle. Allein aus cDNA von P19-Zellen konnte eine schwach gefärbte Bande von etwa 1kb Länge amplifiziert werden. Die untersuchten Kolonkarzinom-Zelllinien waren Engrailed-1-negativ.

Diese Ergebnisse bestätigen zum einen eine in den Microarray-Analysen postulierte Expression von Engrailed-2 in SW-480 Zelllinien. Sie zeigen aber darüber hinaus, dass definierte Zelllinien intestinalen Ursprungs Engrailed-2, jedoch nicht Engrailed-1, auf RNA-Ebene exprimieren.

#### 4.1.2 Expressionsnachweis durch ICC

Um die Ergebnisse der Polymerase-Ketten-Reaktion zu verifizieren und darüber hinaus Engrailed-2 auf Proteinebene nachweisen zu können, sollte das Engrailed-2-Protein immunzytochemisch nachgewiesen werden. Der Antikörper Anti-En2 (sc-8111) ist gegen ein C-terminales Epitop gerichtet, das Sequenzen der Homeobox enthält. Entsprechend musste mit der Kreuzreaktivität mit anderen Homeoboxproteinen gerechnet werden. Laut Herstellerangaben erkennt der verwendete polyklonale Antikörper murines und humanes Engrailed-2, aber auch das Homolog Engrailed-1. Zur Etablierung des Antikörpers wurden Kleinhirnschnitte von Wildtyp-Mäusen verwendet, aber auch Schnitte von L7En-2-Mäusen eingesetzt, die zeitlebens Engrailed-2 in den Purkinje-Zellen überexprimierten. Zusätzlich wurde eine Maus verwendet, in der Teile des Engrailed-2-Gens inklusive des Startkodons deletiert worden waren (Abb. 7).



**Abb. 7: Immunhistochemischer Nachweis von Engrailed-2 an Kleinhirnschnitten von Wildtyp und transgenen Mäusen.**

(A) Kleinhirn der Überexpressionsmutante L7En-2 zum Postnataltag 11 (P11). (B) Kleinhirn der Wildtypmaus zum Zeitpunkt P11. (C) Kleinhirn der Engrailed-Knock-Out-Maus zum Zeitpunkt P9. Einige Lobuli sind mit römischen Ziffern gekennzeichnet. Die Purkinje-Zellen sind mit einer Pfeilspitze markiert. Der Balken entspricht 500  $\mu\text{m}$ . **D bis E** stellen Ausschnittvergrößerungen der Lobuli III und IV der jeweiligen Genotypen dar. Die innere Körnerzellschicht ist mit einem Pfeil markiert. Der Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .

Bereits in den Übersichtsaufnahmen von Zerebella aus Überexpressionsmutanten und Wildtypmäusen fiel eine deutliche Färbung der inneren Körnerzellschicht auf (Pfeil in Abb. 7). Diese Färbung repräsentiert eine Expression von Engrailed-2 in Körnerzellen, die während der gesamten Reifung dieser Neurone, vermehrt in postmitotischen Stadien beschrieben ist. Engrailed-2-Knock-Out-Mäuse zeigten allerdings ebenfalls ein Signal in der inneren Körnerzellschicht, wenn auch tendenziell etwas geringer ausgeprägt. Im Unterschied zu den Wildtyp- und Knock-

Out-Mäusen war in der L7En-2 Maus ein prominentes Signal in der Purkinjenzellschicht, bei genauerer Betrachtung in den Zellkernen dieser Neurone, zu sehen. Entsprechend den oben gemachten Vorhersagen über die Spezifität des Antikörpers, konnte also festgestellt werden, dass der verwendete Antikörper, und dies ist der beste von bisher fünf untersuchten, kommerziell erhältlichen Antikörpern, überexprimiertes Engrailed-2 nachweisen konnte. Allerdings scheint der Antikörper unter den verwendeten Bedingungen nicht für Engrailed-2 spezifisch zu sein, weswegen auch in der Knock-Out-Maus ein Immunsignal nachweisbar war. Mit den derzeit erhältlichen Antikörpern lässt sich folglich nur eine Überexpression von Engrailed-2 eindeutig darstellen.

Da immunhistochemische Ergebnisse von Gewebeproben, und insbesondere von Paraffin-eingebetteten Gewebeproben, und immunzytochemische Resultate von Zellkulturen erfahrungsgemäß stark differieren, wurde im Folgenden derselbe Antikörper an PCR-positiv und -negativ getesteten kolorektalen Tumorzelllinien getestet. Die Färbungen an den Engrailed-2-positiven Zellen ergaben ein über das Zytoplasma und den Kern gleichmäßig verteiltes Signal mit einer Konturierung der Zellkernmembran. Ein vergleichbares Signal, sowohl in Lokalisation als auch in Intensität konnte allerdings auch in den Engrailed-2-negativen Zellen und in Zellen gefunden werden, die ohne Primärantikörper gefärbt worden waren. Wurden kolorektale Zelllinien mit Engrailed-2 transfiziert, konnte in einzelnen Zellen ein deutliches nukleäres Immunsignal nachgewiesen werden (Abb. 13). Dieses Signal ist auf die Engrailed-2-Überexpression zurückzuführen, da eine Engrailed-1-Expression in den Kolonkarzinom-Zelllinien durch RT-PCR ausgeschlossen werden konnte (siehe Abb. 6). Es konnte also auch in Zelllinien eindeutig eine Überexpression von Engrailed-2 nachgewiesen werden.

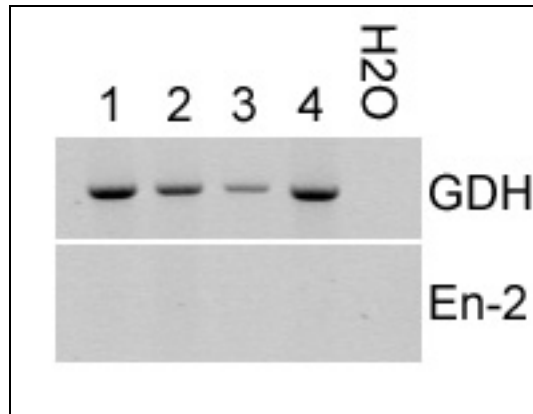
## **4.2 Expression von Engrailed-2 in Darmgewebe**

Die PCR-Daten zeigten, dass Engrailed-2 in einigen, aber nicht in allen kolorektalen Zelllinien exprimiert wurde. Die Frage ist nun, ob diese, wenn auch selektive Expression, eine Eigenart des Tumorgewebes oder generell des nativen Darmgewebes darstellt. In *Drosophila* spielt *engrailed* eine wichtige Rolle bei der

Kompartimentierung des hinteren Darmabschnitts, und wird insofern im Darmgewebe exprimiert. Ob auch bei Vertebraten Engrailed-Proteine für die regelrechte Darmentwicklung essentiell sind, ist nicht bekannt. An Mäusen wurde in Extrakten fetaler, innerer Organe kein Engrailed-2-Transkript nachgewiesen (Joyner und Martin, 1987). Ganzkörperfärbungen an Mäuseembryonen konnten ebenfalls keine Transkripte von Engrailed-2 außerhalb des Zentralnervensystems identifizieren (Davis und Joyner, 1988; Davis et al., 1988).

#### **4.2.1 Expressionsnachweis durch RT-PCR**

Da endogenes Engrailed-2 mit den bisher erhältlichen Antikörpern nicht nachweisbar war, wurde die Frage der Expression von Engrailed im nativen Darmgewebe mit der PCR-Methode untersucht. Dazu wurde einer gesunden, adulten Wildtyp-Maus das Darmpaket explantiert und aus verschiedenen Abschnitten cDNA gewonnen. Aus der cDNA wurde dann mit den bereits etablierten Primerpaaren versucht, Engrailed-2-Fragmente zu amplifizieren. Auch hier dienten Primer für die GAPDH-Sequenz als Positivkontrolle. In der RT-PCR konnten keine Engrailed-2-Fragmente amplifiziert werden, während GAPDH-Primer deutliche Amplifikationsprodukte lieferten. Wir konnten also experimentell mit hoher Sensitivität nachweisen, dass physiologischerweise im adulten Intestinum der Maus Engrailed-2 nicht exprimiert wird. Ob dies auch für menschliches Gewebe zutrifft, kann an diesem Punkt allerdings nur vermutet werden. Zum Zeitpunkt der Arbeit bestand für uns keine Möglichkeit menschliches Darmgewebe für unsere Untersuchungszwecke zu erhalten.

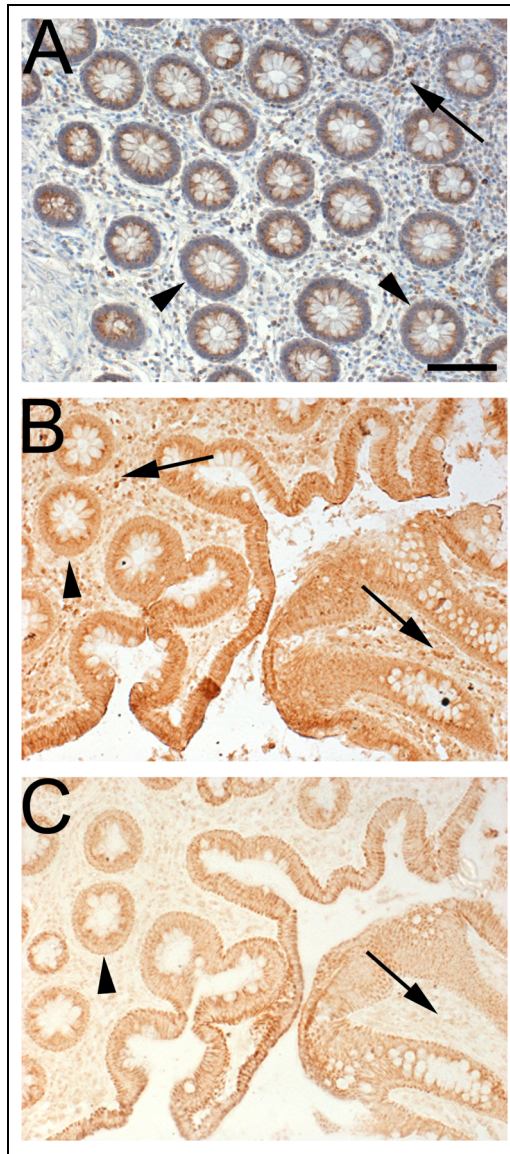


**Abbildung 8: Engrailed-2 Expression im Darmgewebe einer adulten Maus.**

Wie in Abb. 4 für kolorektale Karzinomzellen gezeigt, wurden Engrailed-2-spezifische Primer genutzt, um Engrailed-2 mittels RT-PCR aus verschiedenen Darmabschnitten der Maus zu amplifizieren. In keinem Abschnitt konnte das En-2-Fragment nachgewiesen werden, während die GAPDH-Sequenz in allen Proben deutlich zu sehen war. En-2 wird folglich nicht im Darmgewebe exprimiert.

#### **4.2.2 Expressionsnachweis von Engrailed-2 in tumorösem Darmgewebe durch immunhistochemische Färbung**

Bisher konnte gezeigt werden, dass normales Darmgewebe kein Engrailed-2 exprimiert, bestimmte Zelllinien aus kolorektalen Entitäten aber positiv für Engrailed-2 waren. Wenn Engrailed-2 also in hohen Mengen, einer Überexpression gleichkommend, in tumorösem Darmgewebe exprimiert wird, dann sollte das Engrailed-2-Protein mit dem oben etablierten Protokoll nachweisbar sein. Für die Untersuchungen wurden uns freundlicherweise einzelne Schnittproben aus der Chirurgie des Universitätsklinikums Bonn (Prof. Dr. Kalff, Chirurgische Klinik) zur Verfügung gestellt. Mit dem oben etablierten Antikörper sc-8111 konnten deutlich interstitielle Strukturen angefärbt werden, die sowohl fibroblastenähnliche Charakteristika als auch Charakteristika freier Bindegewebszellen aufwiesen. Diese Zellen waren in der Negativkontrolle nicht darstellbar. Das Immunsignal war sowohl zytoplasmatisch als auch nukleär in den Zellen verteilt. Des Weiteren konnte mit der Immunhistochemie gezeigt werden, dass Engrailed-2 nicht in den Epithelzellen des Darms exprimiert wird. In Zusammenhang mit dem Befund, dass Engrailed-2 auf PCR-Ebene nicht im Darmgewebe der Maus nachgewiesen werden konnte, musste angenommen werden, dass das positive Signal im Interstitium nicht auf eine Engrailed-2 Expression zurückzuführen ist.

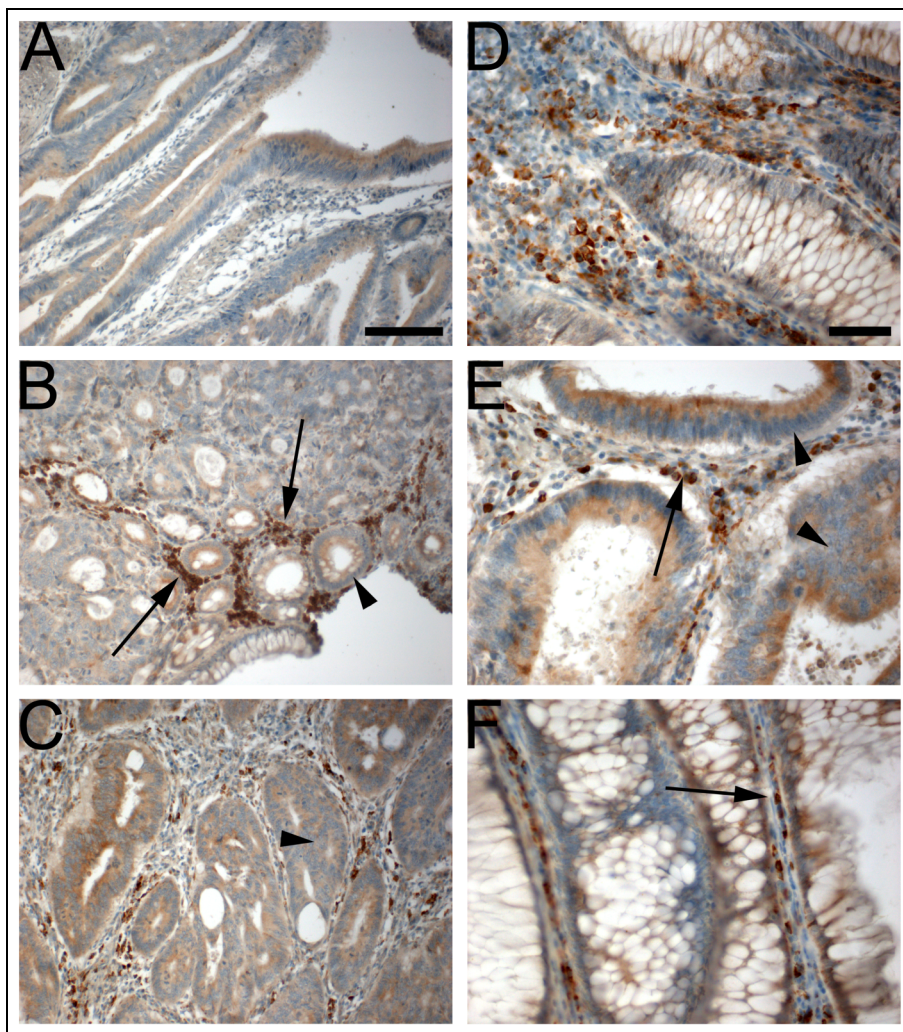


**Abb. 9: Immunhistochemische Färbung von Darmgewebe mit dem Antikörper sc-8111.**

**A bis C** Übersichtsaufnahmen von gesundem Darmgewebe **A** Anschnitt von Darmkrypten, Kerngegenfärbung mit Hämalaun **B** vereinzelt interstitielle Anfärbungen (Pfeil) **C** Folgeschnitt ohne Primärantikörper und ohne interstitielle Anfärbungen (Pfeil). Kerne des Darmepithels sind nicht angefärbt (Pfeilspitze). Der Balken entspricht 100  $\mu$ m.

Um einen direkten Vergleich der Engrailed-2-Expression in nativem Darmgewebe von gesundem und tumorösem Gewebematerial zu erhalten, wurden im Folgenden Gewebeproben von Kolontumoren untersucht (freundlicherweise von Herrn PD Dr. Friedrichs, Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Bonn überlassen und nach Färbung kontrolliert). Da für den Nachweis von Engrailed-2 in menschlichen Hirnschnitten ein monoklonaler Antikörper beschrieben war (Lavezzi et al., 2005), wurden diese Gewebeschnitte mit dem 4D9- genannten Antikörper aus der Maus gefärbt. Dieser Antikörper wurde ursprünglich für den Nachweis von

*engrailed/invected*, einem Engrailed-Homolog aus *Drosophila*, hergestellt. Ein Nachweis von Engrailed-2 im Mausgewebe ist damit nicht möglich (eigene Beobachtungen). Ähnlich dem bereits oben beschriebenen Muster konnte mit dem 4D9-Antikörper an menschlichem Darmgewebe spezifische Zellen der Lamina submucosa charakterisiert werden. Ähnlich dem gesunden Darmgewebe konnte auch hier eine zytoplasmatische und nukleäre Anfärbung erzielt werden. Die positiv gefärbten Zellen waren aber weder im Tumorgewebe noch in der Nähe der Invasionsfront lokalisiert. Ausgeschlossen werden kann auch mit diesem Antikörper ein Nachweis von Engrailed-2 im Darmepithel.



**Abb. 10: Immunhistochemische Färbung von menschlichem Darmgewebe mit dem Antikörper 4D9 und Hämalaun-Kerngegenfärbung.**

Die Abbildungen stammen aus mit dem 4D9-Antikörper immungefärbten Kolonkarzinompräparaten. **A bis C** sind Übersichtsaufnahmen (Balken entspricht 500  $\mu\text{m}$ ). **D bis F** stellen Detailvergrößerungen dar (Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ ). **A** Färbung ohne Primärantikörper, keine interstitiellen Anfärbungen **B bis F** Färbung mit Primärantikörper (Konzentration 1:20). Man erkennt diffus verteilt bis cluster-artig lokalisierte Anfärbungen von Zellen im Interstitium der Lamina submucosa (beispielhaft mit Pfeil in B, E und F gekennzeichnet). Dagegen ist das Darmepithel nicht angefärbt (Pfeilspitze).

Mit zwei verschiedenen Antikörpern, die gegen ein Homeobox-Epitop der Engrailed-Proteine gerichtet sind, konnten folglich in menschlichem Darmgewebe Zellen angefärbt werden, die sich im Bindegewebe der Lamina submukosa befanden, nicht aber in Tumorgewebe. Das Darmepithel, den Ursprungszellen des Kolonkarzinoms, konnte mit keinem der verwendeten Antikörper als Engrailed-2-positiv identifiziert werden.

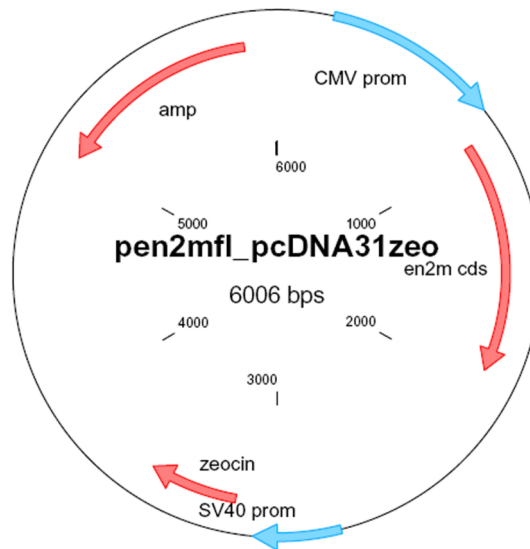
### **4.3 Überexpression von Engrailed-2 in Zelllinien**

Da wir mit dem sc-8111-Antikörper vermehrt exprimiertes Engrailed-2 nachweisen konnten, sollte nun untersucht werden, ob Engrailed-2 einen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung von Kolonzellen hat. Dazu wurde die Mausequenz von Engrailed in einen Expressionsvektor kloniert. Mit diesem Vektor wurden verschiedene Kolonkarzinomzelllinien transfiziert und der Effekt auf das Proliferationsverhalten und die Zelldifferenzierung untersucht.

#### **4.3.1 Erstellen eines Vektors zur Überexpression von Engrailed-2 in Zelllinien**

Von muriner cDNA (Zerebellum adult) wurde die gesamte kodierende Sequenz des Engrailed-2-Gens (NM\_001427; CCDS5940) mittels RT-PCR amplifiziert. Das aufgereinigte PCR-Produkt wurde über eine AspE1-Schnittstelle in den pGHL-TA-Vektor kloniert (pGHL-TA-en2fl). Das Ligationsprodukt wurde über Elektroporation in DH5 $\alpha$ -Bakterienstämme transformiert. Die Engrailed-2-positiven Klone wurden durch PCR ermittelt und als Glycerinkultur angelegt. Zur Expression von Engrailed-2 in Zellkulturen wurde das murine Engrailed-2-Fragment aus pGHL-TA-en2fl über eine BamHI-Schnittstelle in den Expressionsvektor pcDNA3.1zeo kloniert, wodurch Engrailed-2 unter Kontrolle des CMV-Promoters in transfizierten Zelllinien exprimiert werden konnte (pen2mfl\_pcDNA31zeo).





**Abb. 11: Sequenzkarte des Expressions-Vektors pen2mfl\_pcDNA31zeo**  
Die Expression von Engrailed-2 (en2m cds) steht unter Kontrolle des CMV-Promotors.

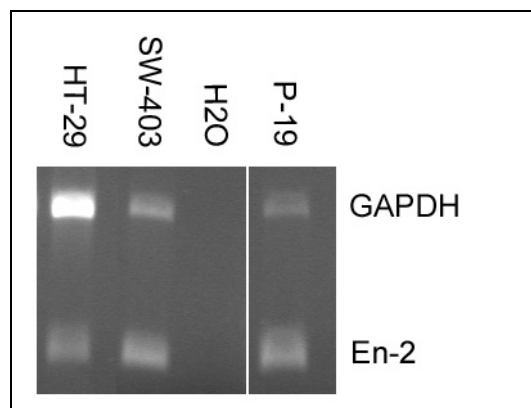
Die Charakterisierung des Endproduktes erfolgte über Restriktionsverdau mit BamHI, KpnI sowie ClaI. Die anschließende Sequenzierung des klonierten Fragments ergab den korrekten Einbau von Engrailed-2 in den Expressionsvektor, mit einer stummen Mutation (c.429C>A; p.Val143Val) in der Aminosäuresequenz. Aus einem der positiven Klone wurde eine Glycerinkultur angelegt.

Werden Zelllinien mit Vektoren transfiziert, kann man entweder über ein Selektivmedium stabile Zelllinien heranzüchten oder mit transient transfizierten Zelllinien arbeiten. Stabile Zelllinien stellen im Optimalfall eine reine Kultur von Transgen-exprimierenden Zellen dar. Es ist allerdings möglich, dass das Transgen mit der Zeit wieder aus den Zellen ausgeschleust wird, während das Resistenzgen weiterhin in der Zelle verbleibt. Außerdem kann das Transgen zum Absterben der Zelle und somit der ganzen Zellkultur führen. Dagegen stellen transient transfizierte Zelllinien eine inhomogene Kultur mit niedrigen bis hohen Transfektionsraten dar. Vorteil der transienten Transfektion ist allerdings, dass sich transfizierte und nicht-transfizierte Zellen im selben Ansatz befinden und man unterschiedliche Kultur- bzw. Versuchsbedingungen bei der Auswertung ausschließen kann. Deswegen wurden für die hiesigen Arbeiten transiente Transfektionen verwendet. Immunzytochemisch konnte gezeigt werden, dass Engrailed-2 in etwa 10 % der Zellen nach Transfektion überexprimiert wurde.

### 4.3.2 Einfluss von Engrailed-2 auf die Proliferation von Kolonkarzinomzellen

Da nach den Daten von Martin et al. (2005) die Überexpression von Engrailed-2 in Mammakarzinomzelllinien eine Proliferationssteigerung bewirkte, sollte als erstes getestet werden, ob Engrailed-2 denselben Effekt in Kolonkarzinomzelllinien bewirken konnte.

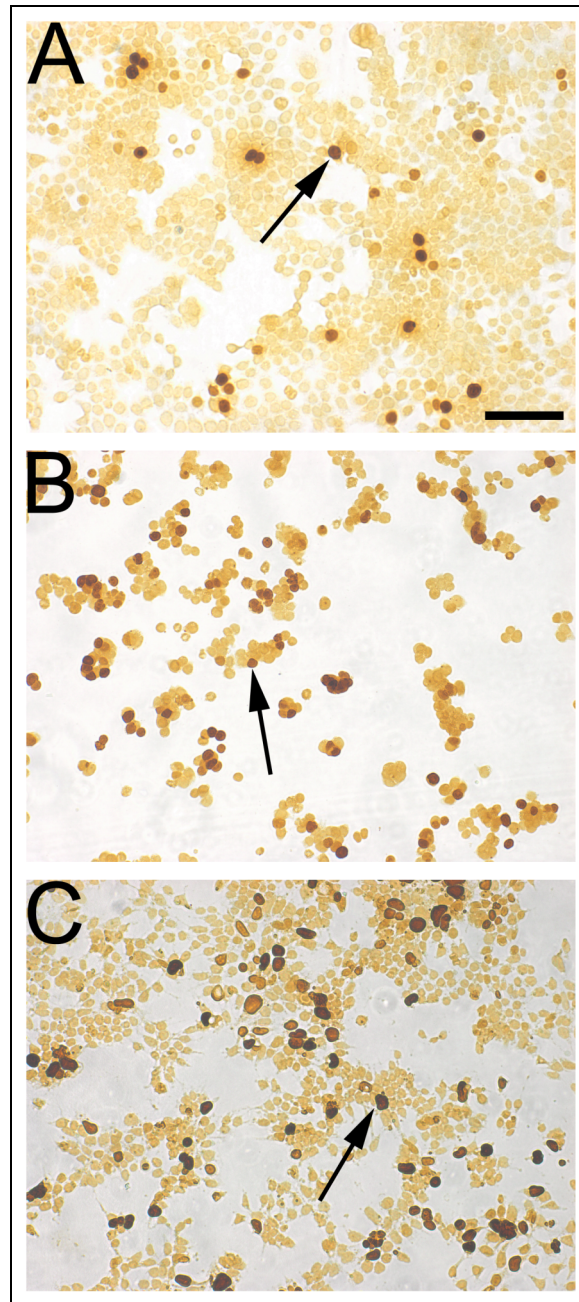
Für die transiente Transfektion wurden Zelllinien herangezogen, die endogen kein Engrailed-2 exprimierten (HT-29, SW-403, P19). Für den Nachweis der Überexpression wurde die Gesamt-RNA aus Zellkulturen 24 und 48 Stunden post transfectionem isoliert und mittels RT-PCR die Engrailed-2-Sequenz amplifiziert (Abb. 12). In allen transfizierten Zelllinien konnte das 318 bp lange Engrailed-2-spezifische Genfragment amplifiziert werden, während nicht-transfizierte Kulturen diese Bande nicht zeigten (siehe Abb. 4).



**Abb. 12: PCR der transfizierten Kulturen**

In den zwei kolorektalen Karzinomzelllinien HT-29 und SW-403, sowie in der Teratokarzinomzelllinie P19, konnte nach der Transfektion das En-2-typische Fragment von 318bp nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurde eine Duplex-PCR mit GAPDH-Primern gemacht.

Zum weiteren Nachweis einer Überexpression von Engrailed-2, wurden transfizierte Zellen 24 bzw. 48 Stunden post transfectionem immunzytochemisch analysiert. Die Zellkulturen wurden mit 2 % PFA für 10 Minuten fixiert und die Engrailed-2-exprimierenden Zellen mittels einer DAB-Immunfärbung dargestellt. Die Transfektionsraten sind für die verschiedenen Zelllinien unterschiedlich, jedoch ist den Zellen die nukleäre Lokalisation des Transgens gemeinsam (Abb. 13).



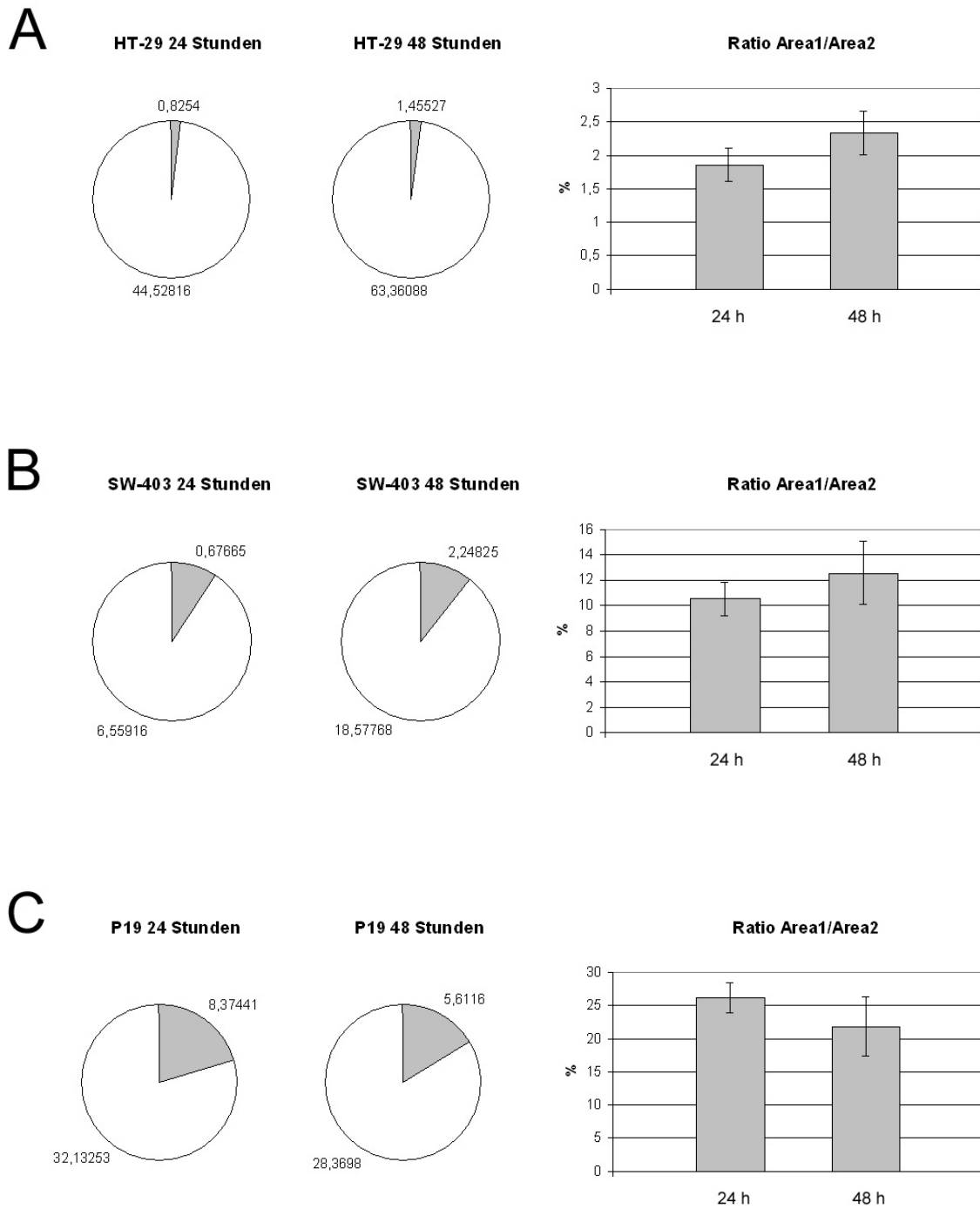
**Abb. 13: Immunzytochemische Färbung von Engrailed-2 in transient transfizierten Kolonkarzinomzelllinien.**

Zellkulturen der Kolonkarzinomzelllinien HT-29 (A) und SW-403 (B), sowie der Teratokarzinomzelllinie P19 (C) wurden immunzytochemisch mit dem sc8111 Antikörper gegen Engrailed-2 gefärbt. Überexprimierende Zellen zeigten ein nukleäres braunes DAB-Präzipitat. Auffällig ist in allen Kulturen die gleichmäßige Verteilung der transfizierten Zellen. Cluster von immunpositiven Zellen konnten nicht gefunden werden. Der Zellkern einer transfizierten Zelle ist beispielhaft in jedem Bild mit einem Pfeil markiert. Der Messbalken entspricht 100 µm.

Soweit mikroskopisch beurteilbar, unterscheiden sich transfizierte und nicht-transfizierte Zellen morphologisch nicht voneinander. Dabei wurde auf Zellgröße, Zellform und Bildung von Fortsätzen geachtet. Ebenfalls gleich war die Eingliederung

in Zellverbände, was auf eine regelrechte Fähigkeit zur Bildung von Zell-Zellverbindungen schließen lässt.

Auffällig war bereits bei der groben Übersicht, dass Engrailed-2-positive Zellen meist vereinzelt und nicht cluster-artig in der Kultur verteilt waren. Um diese visuelle Auswertung zu objektivieren, wurden Bild-Aufnahmen der Kulturen gemacht und die Engrailed-2-positiven und -negativen Zellen ausgezählt. Die Relation beider Zahlen ist ein Maß dafür, ob Engrailed-2-positive Zellen im Vergleich zu den -negativen schneller wachsen. Die Ergebnisse sind in Abb. 14 graphisch dargestellt. Es zeigte sich, dass ganz generell die Zellzahl zwischen 24 und 48 Stunden in Kultur zunahm, was mit einer Verdopplungsrate dieser Zellen innerhalb von drei Tagen konform wäre. Wurde die Zunahme des Wachstums von transfizierten und nicht-transfizierten Kolonzellen verglichen, zeigte sich kein Unterschied. Bestenfalls sind Tendenzen eines leicht verstärkten Wachstumsverhaltens der transfizierten im Vergleich zu den nicht-transfizierten Zellen abzulesen. Ein Eindruck, der im Vergleich zu den gegenläufigen Ergebnissen der P19-Zellen verstärkt wird. Die geringen Unterschiede würden trotz des Nachweises einer statistischen Signifikanz eine echte biologische Bedeutung in Frage stellen, weswegen auf eine detailliertere Untersuchung verzichtet wurde.



**Abb. 14: Messung der Proliferation von transfizierten und nicht-transfizierten Zellen nach 24 und 48 Stunden**

In den Kreisdiagrammen sind die Mittelwerte aus den absolut gezählten transfizierten und nicht-transfizierten Zellen pro Bildausschnitt nach 24 und 48 Stunden dargestellt. Das Säulendiagramm zeigt das Verhältnis dieser beiden Zellzahlen nach 24 und 48 Stunden an. Wie aus den Daten zu sehen ist, ließen sich keine relevanten Unterschiede in der Wachstumsrate von En-2-positiven und -negativen Zellen nachweisen. Aufgrund der geringen Stichprobenzahl wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

### 4.3.3 Einfluss von Engrailed-2 auf die Differenzierung von Kolonkarzinomzellen

Neben dem Proliferationsverhalten wurde untersucht, ob Engrailed-2 die Reifung der Kolonkarzinomzellen beeinflusst. Dazu wurden die Verteilung von Organellen und die Ausbildung von Zell-Zellkontakten, wie sie typisch für reife Epithelzellen ist, analysiert.

E-Cadherin gehört zur Superfamilie der Cadherine, welche calciumabhängig homophile Zellkontakte bilden. E-Cadherin ist der Hauptvertreter der Cadherine in Epithelzellen und typisch für ausdifferenzierte Epithelzellen. Als integraler Bestandteil der Zellmembran bildet es die Interzellulärkontakte vom Typ Punctum adhärens sowie Zonula adhärens aus. Über Plaqueproteine wie Vinculin, Alpha-Actinin und Catenine steht E-Cadherin mit dem Aktin-Myosin-Zytoskelett in Verbindung (Drenckhahn, 1994). Daneben ist E-Cadherin über eine intrazelluläre Verbindung zu  $\beta$ -Catenin auch in Signaltransduktionswege eingeschaltet und reguliert Teilungs- und Bindungsprozesse. Mutationen in diesen Signalketten (wnt/ $\beta$ -Catenin/APC) sind in Tumorgewebe häufig zu finden (Cowin et al., 2005). Ein Verlust der E-Cadherin-vermittelten Zelladhäsion durch Mutationen führt zu invasivem Wachstum, bei dem Zellen aus ihren Verbänden gelöst werden (Foty und Steinberg, 2004; Guarino, 2007). E-Cadherin wird folglich häufig als Marker für reife und funktionelle Epithelzellen verwendet.

Als weiteren Reifefaktor untersuchten wir die Expression und Verteilung des Zytoskelett-assoziierten Proteins  $\beta$ -Spectrin II in Engrailed-2-transfizierten Kolonkarzinomzellen. Spektrine sind für die Stabilisierung der Plasmamembran verantwortlich. Das Spektrinfilament ist ein Tetramer bestehend aus zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Spektrinmolekülen. Über Aktinfilamente bildet sich ein Spektrinnetzwerk, welches durch Ankyrin, Protein 4.1 oder die Natrium-Kalium-ATPase an der Zellmembran fixiert wird (Drenckhahn, 1994). Unter der Annahme, dass in unreiferen Zellen die Ausbildung eines festen Zellstützgerüsts weniger ausgeprägt ist als in differenzierten Zellen, sollte Spektrin in den Tumorzelllinien diffuser verteilt sein. So ist z.B. in Hirn- und Nervenscheidentumoren durch einen Ausfall des Tumorsuppressorgens NF2-Protein (oder Merlin/Schwannomin) aufgrund einer

direkten Interaktion mit  $\beta$ -Spectrin II eine frühzeitige Störung der Zytoskelettförmung zu beobachten (Scoles et al., 1998).

Die Arbeiten von Holst et al. (2008) und Liebig (Dissertation, Univ. Bonn, 2007) haben gezeigt, dass die Überexpression von Engrailed-2 in zerebellären Purkinje-Zellen zu Veränderungen in der Verteilung von Zellorganellen führt. Es wurde postuliert, dass Engrailed-2 den dendritischen und axonalen Transport von Proteinen und Organellen steuert und damit Einfluss auf die Differenzierung genommen wird. Sowohl der Golgi-Apparat als auch das endoplasmatische Retikulum und Mitochondrien sind in charakteristischer Weise im Zytoplasma angeordnet. Tgn38 ist ein Marker, der spezifisch in dem Abschnitt des Golgi-Apparates vorkommt, der für die Vesikelbildung verantwortlich ist, nämlich dem Trans-Golgi-Netzwerk (Luzio et al., 1990; Reaves et al., 1992). Dagegen ist G58K an der Verankerung des Golgi-Apparates am Mikrotubulus-System beteiligt (Bloom und Brashear, 1989). Veränderungen im Vesikeltransport sollten folglich über die Verteilung dieser Markerproteine sichtbar gemacht werden können.

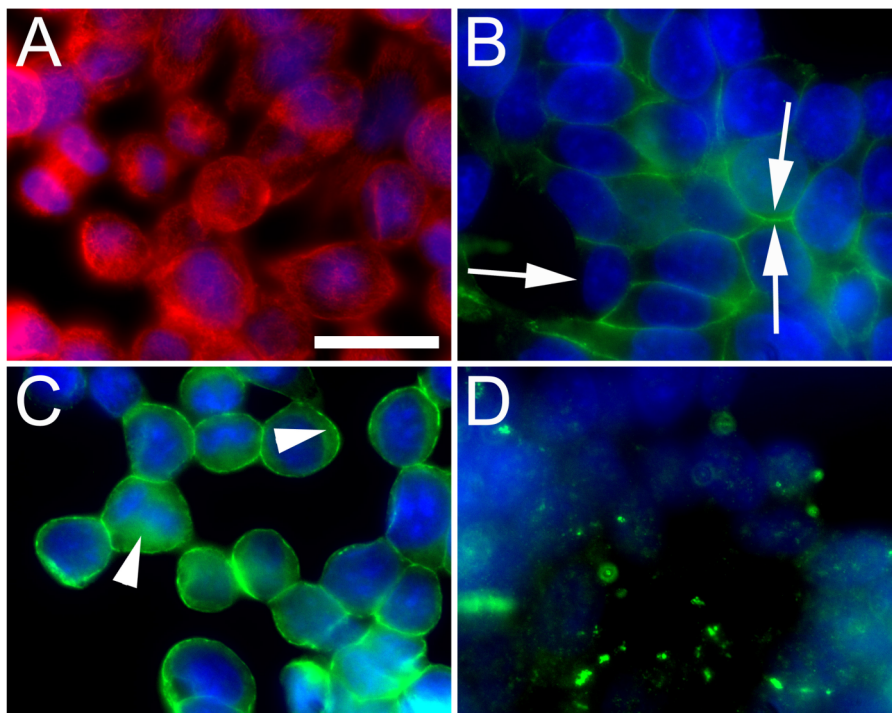
Zur Analyse der Verteilung von Markerproteinen in Engrailed-2-überexprimierenden Kolonkarzinomzellen wurden Immunfluoreszenz-Doppelfärbungen vorgenommen, wobei die jeweiligen Markerproteine (E-Cadherin,  $\beta$ -Spectrin II, Tgn38 und G58K) zusammen mit Engrailed-2 gefärbt wurden.

Die Immunfluoreszenzfärbungen sind in den Abbildungen 15 bis 18 dargestellt, jeweils für die Engrailed-2-positiven Zelllinien Colo-320 und SW-480 und die Engrailed-2-negativen HT-29- und LoVo-Zellen. Bei den SW-480-Zellen war E-Cadherin als scharf abgrenzbare Linie zwischen zwei benachbarten Zellen zu lokalisieren. Zellmembranen, die keine Nachbarzellen hatten, waren Cadherin-negativ. Ein äquivalentes Verteilungsmuster konnte auch in HT-29- und LoVo-Zellen dargestellt werden, die kein endogenes Engrailed-2 exprimieren (Abb. 15 B, 17 A und 18 A). Die Färbung des Tubulins, das in der gesamten Zelle verbreitet ist, zeigte die Ausdehnung der Zellen und bestätigt die Lokalisation des E-Cadherin an der Zellmembran (Abb. 15 A). Zudem zeigte die Tubulinfärbung, dass auch das Tubuluszytoskelett in Engrailed-2-exprimierenden Kolonkarzinomzellen normal ausgebildet war. Beta-Spektrin II war wie E-Cadherin Zellmembran-assoziiert lokalisiert. Im Unterschied zu E-Cadherin war  $\beta$ -Spektrin II aber in einem breiteren

Band und nicht auf Zell-Zellkontakte beschränkt nachweisbar. Dieses Färbemuster war wiederum bei Engrailed-2-exprimierenden (Abb. 15 C, 16 C) und Engrailed-2-negativen Kolonzellen (Abb. 17 C, 18 C) vergleichbar. Der Golgi-Apparat ließ sich mit den Tgn38- und G58K-Antikörpern als punktuelle perinukleäre Färbung mit teilweise polarisierter Verteilung darstellen. Man beachte, dass die Aufnahmen mit einem Epifluoreszenzmikroskop aufgenommen worden sind, und insofern perinukleäre Färbung über dem Nukleus als nukleäre Färbung erscheint. Die Verteilung des Golgi-Apparates war in den vier Zelllinien vergleichbar (Abb. 15 D - 18 D).

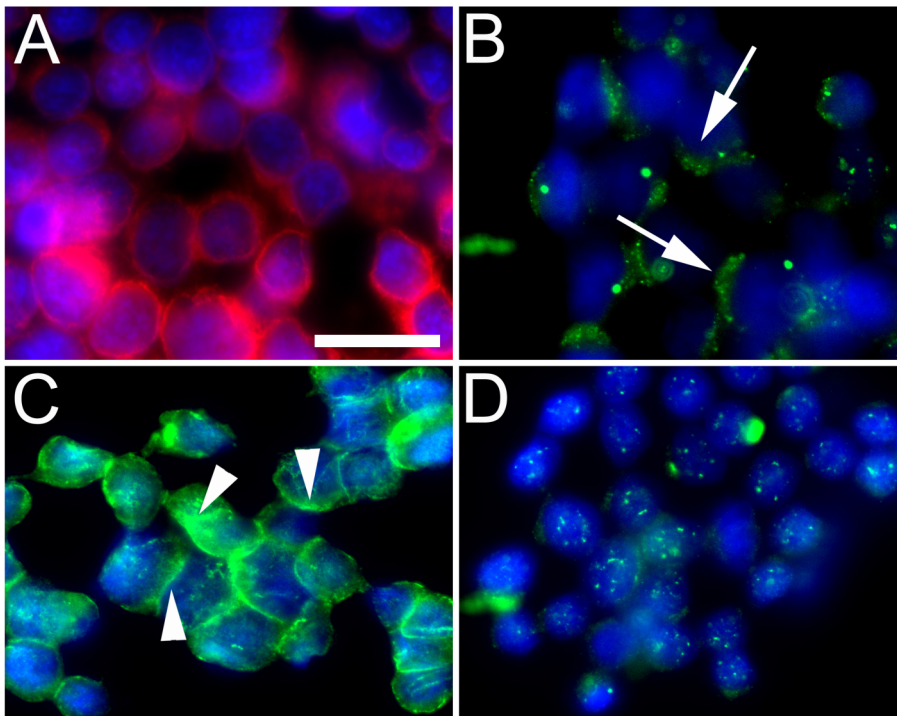
Neben dem Vergleich Engrailed-2-positiver und -negativer Zelllinien wurde Engrailed-2 in den genuin Engrailed-2-negativen Zelllinien überexprimiert und immunzytochemisch die zytoskeletale Beschaffenheit der Zellen und die Verteilung der Organellen analysiert. Die Zelllinien HT-29 und LoVo wurden ausgewählt, da sie unbehandelt in Verbänden wachsen und große, zytoplasmareiche Zellkörper aufweisen. Die transfizierten Zellen sind durch das deutliche, ausschließlich nukleäre Signal nach Färbung mit Anti-En2 (sc-81111) klar von nicht-transfizierten Zellen visuell zu unterscheiden. Die in Abb. 17 und 18 dargestellten Bildausschnitte zeigen, dass E-Cadherin in den Zellwänden aneinandergrenzender Zellen gut darstellbar ist, während frei liegende Membranen kein Signal aufweisen (Abb. 17 B und 18 B). Transfizierte und nicht-transfizierte Zellen wachsen nebeneinander und weisen keine Unterschiede in Verteilungsmuster und Signalintensität auf. Beta-Spectrin II ist in allen, transfizierten und nicht-transfizierten Zellen darstellbar und zeigt ein lockeres, homogenes netzartiges Muster, welches zytoplasmatisch gleichmäßig verteilt ist (Abb. 17 C und 18 C). Die perinukleäre und mitunter polarisierte Lokalisation des Golgi-Apparates ist in transfizierten Zellen ebenfalls nicht gestört (Abb. 17 D und 18 D). Zusammengefasst ist als Ergebnis festzuhalten, dass die Engrailed-2-Überexpression in den beiden Zelllinien HT-29 und LoVo keinen mikroskopisch detektierbaren Einfluss auf die Differenzierung hat.





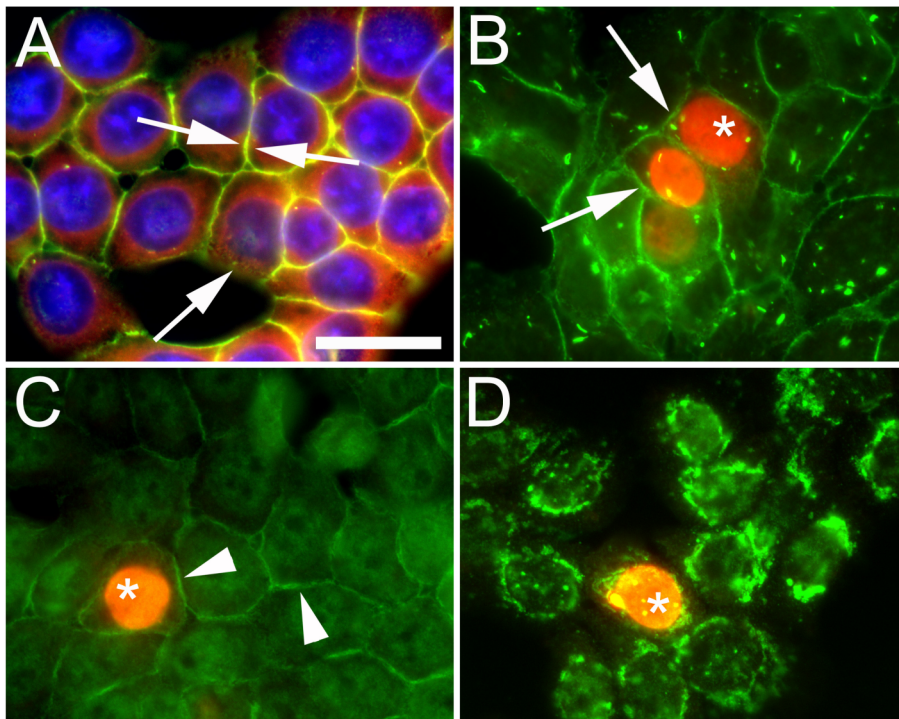
**Abb. 15: Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinie SW-480**

**A** Durch die Anfärbung von Pantubulin (rot) wird das Zytoskelett der Zelle dargestellt **B** Zwischen benachbarten Zellen erkennt man ein dünnes Band, welches E-Cadherin (grün) darstellt (Pfeile). Die freiliegende Seite einer Zelle bildet keine Zell-Zell-Kontakte und stellt sich somit auch nicht in der E-Cadherin-Färbung dar (einzelner Pfeil) **C** Im Gegensatz zu E-Cadherin ist  $\beta$ -Spectrin II (grün) aufgrund der Interaktion mit dem Aktinzytoskelett (Pfeilspitzen) auch an freiliegenden Zellmembranen detektierbar **D** Die Abschnitte des Golgi-Apparates können nur schwach mit dem Tgn38-Antikörper (grün) sichtbar gemacht werden. **A bis D** Kernfärbung mit Hoechst-Farbstoff (blau), der Balken entspricht 50 $\mu$ m.



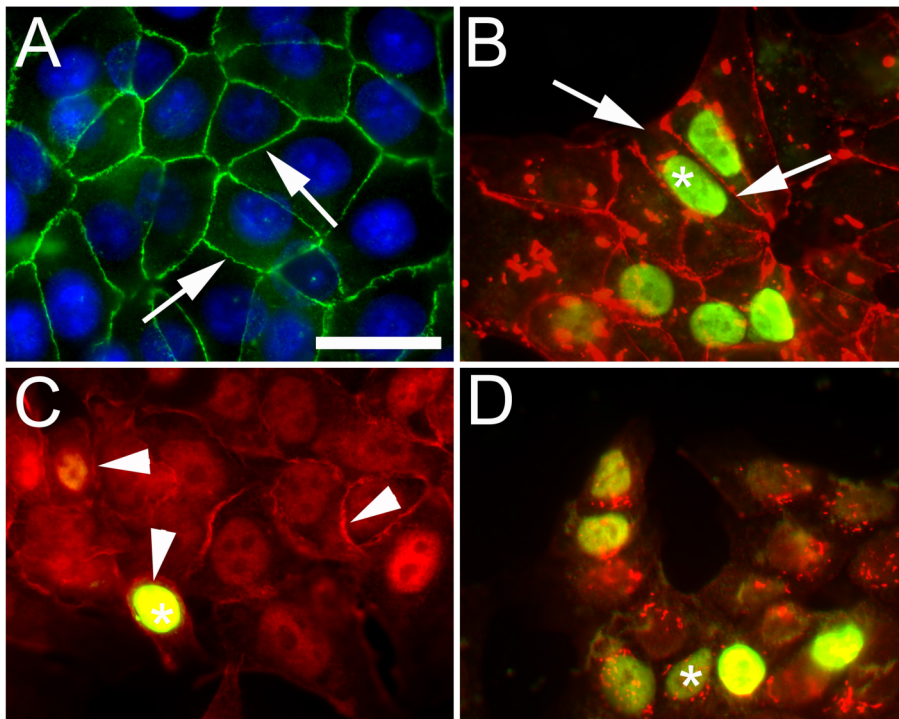
**Abb. 16: Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinie Colo-320**

**A** Darstellung des Zytoskeletts mittels Anfärbung von Pantubulin (rot) **B** Die typische Darstellung der Zell-Zellkontakte mit der Anfärbung von E-Cadherin (grün) gelingt bei den eher einzeln liegenden Colo-320-Zellen nicht. Man erkennt eine polarisierte Verteilung (Pfeile), die in Anbetracht der runden Zellform und der dadurch eingeschränkten Möglichkeit zur Ausbildung von Zellkontakten zu erwarten ist **C** Durch die Assoziation zum Zytoskelett gelingt eine gleichmäßige Darstellung von  $\beta$ -Spectrin II (grün, Pfeilspitzen) **D** Die Abschnitte des Golgi-Apparates (Tgn38, grün) sind perinukleär lokalisiert **A bis D** Kernfärbung mit Hoechst-Farbstoff (blau), der Balken entspricht 50 $\mu$ m.



**Abb. 17: Immunfluoreszenzdoppelfärbung der Zelllinie HT-29**

**A** native Kultur, benachbarte Zellmembranen können durch E-Cadherin (grün) dargestellt werden, freiliegende Membranen dagegen nicht (Pfeile). Das Tubulinzytoskelett ist gleichmäßig verteilt (Pantubulin, rot). Die Zellkerne erscheinen durch eine Hoechst-Kernfärbung blau **B bis D** transfizierte Kulturen mit Darstellung von nukleärem Engrailed-2 (rot), transfizierte Zellen sind mit einem Sternchen markiert. **B** regelrechte Darstellung der Zell-Zellkontakte mittels E-Cadherin (Pfeile, grün) **C** des Zytoskeletts mittels  $\beta$ -Spectrin II (Pfeilspitzen, grün) und **D** des Golgi-Apparates durch Tgn38 (grün). Der Balken entspricht 50 $\mu$ m.



**Abb. 18: Immunfluoreszenzdoppelfärbung der Zelllinie LoVo**

**A** native Kultur, Darstellung von benachbarten Zellmembranen durch E-Cadherin (Pfeile, grün), Zellkerne erscheinen infolge der Hoechst-Kernfärbung blau **B bis D** transfizierte Kulturen mit Darstellung von nukleärem Engrailed-2 (grün). Transfizierte Zellen sind beispielhaft mit einem Sternchen markiert. Regelrechte Darstellung der Zellmembranen (benachbart und freiliegend) in **B** mittels E-Cadherin (Pfeile, rot) sowie des Zytoskeletts in **C** mittels  $\beta$ -Spectrin II (Pfeilspitzen, rot) und des Golgi-Apparates in **D** mittels Anfärbung von G58K (rot). Der Balken entspricht 50 $\mu$ m.

## 5 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Kolonkarzinomzelllinien Engrailed-2 exprimiert wird, natives Darmgewebe aus Maus und Mensch aber kein Engrailed-2 exprimiert. Entgegen den Zelllinienbefunden konnte in keinem der zwölf untersuchten Kolonkarzinomgewebe epithelial Engrailed-2 nachgewiesen werden. Zudem zeigten Tumorzellen, die vermehrt Engrailed-2 exprimierten, kein erhöhtes Proliferationsverhalten oder veränderte Reifungscharakteristika. Diese Befunde zeigen, dass Engrailed-2 das Wachstum von Kolonkarzinomen nicht beeinflusst. Tumorzellen der Mamma dagegen sind als responsiv gegenüber einer Engrailed-2-Überexpression beschrieben (Martin et al., 2005). Tumorzellen reagieren also sehr unterschiedlich auf die Engrailed-2-Expression. Womit diese Heterogenität der Engrailed-2-Wirkung zusammenhängen könnte, soll im Folgenden diskutiert werden.

### Die Kofaktoren-Hypothese

Engrailed-2 ist ein Homeobox-Transkriptionsfaktor, der an definierte DNA-Abschnitte bindet und dort Transkription initiiert (Gehring und Hiromi, 1986). Die Bindungsaffinität von Engrailed an seine DNA-Bindungsregion ist allerdings sehr schwach, so dass bereits früh vermutet wurde, dass Engrailed-2 Kofaktoren benötigt, um transkriptionell aktiv sein zu können. Die Proliferation von Mammakarzinomzelllinien konnte durch Engrailed-2 gesteigert werden. Wurde allerdings der Faktor Pbx1 zusätzlich exprimiert, war die Proliferationsrate noch deutlich erhöht (Martin et al., 2005). Ähnliches könnte für den Fibroblastenwachstumsfaktor 8 (FGF8) gelten. Aus dem ZNS ist bekannt, dass Engrailed-2 zusammen mit FGF-8 die Entwicklung des Mittelhirns steuert (Gemel et al., 1999). Genau dieser Wachstumsfaktor wird auch in Mammakarzinomzelllinien (Wu et al., 1997; Zammit et al., 2002), und in Prostatakarzinomzellen (Dorkin et al., 1999) exprimiert, so dass hier Engrailed-2 und FGF-8 interagieren könnten. Neben den rein transkriptionellen Domänen besitzt Engrailed-2 eine weitere Proteindomäne, die es ihm ermöglicht, mit dem eukaryoten Initiationsfaktor 4E (eIF4E) zu interagieren. Damit könnte Engrailed-2 auf translationelle Prozesse Einfluss nehmen, wie es bereits im Zentralnervensystem beobachtet wurde (Brunet et al., 2005). Außerdem werden weitere potentielle Wirkmechanismen für Engrailed-Proteine

diskutiert. So soll Engrailed-2 über einen noch nicht bekannten Mechanismus Einfluss auf die Degradierung von  $\beta$ -Catenin nehmen, und damit zur Entstehung von Mammakarzinomen beitragen (Bachar-Dahan et al., 2006). Engrailed-Proteine verfügen demnach über eine Vielfalt von Interaktionsmöglichkeiten und können somit auf vielfältige Weise auf einzelne biologische Prozesse Einfluss nehmen. Ein transkriptioneller, direkter Einfluss auf das Tumorstadium in Kolonzellen kann mit dieser Arbeit ausgeschlossen werden.

### Die Sekretionshypothese

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Engrailed-2 in Kolonkarzinomzelllinien exprimiert und damit ausschließlich die klassische Funktion des Transkriptionsfaktors untersucht. Engrailed-2 ist allerdings der erste Transkriptionsfaktor, von dem, mittlerweile allgemein akzeptiert, eine extrinsische Wirkung bekannt ist. Engrailed-2 wird von tektalen Neuronen des Mittelhirns exprimiert und sezerniert, und wirkt als repulsiver, diffusibler Faktor auf retinale Axone (Joliot et al., 1998; Maizel et al., 1999; Maizel et al., 2002; Wizenmann et al., 2009), und steuert so die Bildung retinotektaler Projektionsbahnen. Arbeiten an dissoziierten Zellkulturen aus dem Kleinhirn haben gezeigt, dass Gliazellen Engrailed-2 aus dem Medium internalisieren können, Neurone hingegen nicht (eigene Beobachtungen). Engrailed-2 synthetisieren, sezernieren und internalisieren zu können, scheinen also spezifische Eigenschaften bestimmter Zelltypen darzustellen. Es wäre also durchaus vorstellbar, dass auch Tumorzellen auf sezerniertes Engrailed-2 selektiv und zelltyp-spezifisch reagieren.

### Die Instabilitätshypothese

Betrachtet man die Microarray-Daten des "Genomics Institute of the Novartis Research Foundation", erkennt man, dass in den SW-480-Zellen ein nur geringes Expressionsniveau im Vergleich zur zerebellären Expression nachweisbar war (Su et al., 2004). Zelllinien sind ohne Zweifel ein essentielles experimentelles Werkzeug, weisen aber aufgrund der langen Kulturzeit hohe genetische Instabilitäten auf. Es ist also vorstellbar, dass in nativem Tumorgewebe kein Engrailed-2 exprimiert wird und die Expression in Zelllinien Folge der genetischen Instabilität ist. Auch wenn Karzinomzelllinien Klone einer Ursprungszelle darstellen sollen, ist eine Kultur aus Karzinomzelllinien ein heterogenes Zellgemisch, wie allein die lichtmikroskopisch sichtbare morphologische Variabilität der Zellen zeigt. Die Indizien, die im Rahmen

dieser Arbeit gesammelt werden konnten, sprechen dafür, dass die an Zelllinien erhobenen Befunde nicht auf Patientengewebe übertragbar sind.

## 6 Zusammenfassung

Engrailed-2 ist ein Transkriptionsfaktor, der im Zentralnervensystem eine zentrale Rolle für das Überleben von mesenzephalen Neuronen und die Differenzierung von zerebellären Neuronen spielt. In Mammakarzinomen konnte zudem eine onkogene Wirkung von Engrailed-2 beschrieben werden. Da Engrailed-2 gemäß einer Microarray-Studie auch in Kolonkarzinomzellen exprimiert werden soll, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob Engrailed-2 auch bei der Pathogenese des kolorektalen Adenokarzinoms beteiligt ist. Mittels RT-PCR wurden acht verschiedene humane Kolonkarzinomzelllinien auf die Expression von Engrailed-2 untersucht und drei von acht Zelllinien als positiv identifiziert. Natives Gewebe aus dem Darm von adulten Mäusen zeigte dagegen kein Engrailed-2-spezifisches Amplifikationsprodukt. Immunhistochemisch konnten wir sowohl in normalem Darmgewebe als auch in Tumorgewebe immunpositive Signale nachweisen. Die positiven Zellen waren aber keine epithelialen Zellen, sondern Bindegewebszellen aus dem interstitiellen Raum. Eine Überexpression von Engrailed-2 in Engrailed-2-negativen Kolonkarzinomzellen wirkte weder wachstumsfördernd, noch war ein Einfluss auf die Differenzierung der Kolonkarzinomzellen zu beobachten. Damit muss geschlossen werden, dass Engrailed-2 zumindest keine gravierende Rolle bei der Pathogenese des Kolonkarzinoms spielt. Offensichtlich benötigt Engrailed-2 zelltyp-spezifische Kofaktoren, um sein Wirkungsspektrum entfalten zu können. Alternativ müsste ein bisher noch nicht bekannter Mechanismus postuliert werden, mit dem Engrailed-2 seinen wachstumsfördernden Einfluss auf Mammakarzinomzellen ausübt.



## 7 Literaturverzeichnis

- (1) Baader SL, Sanlioglu S, Berrebi AS, Parker-Thornburg J, Oberdick J. Ectopic overexpression of engrailed-2 in cerebellar Purkinje cells causes restricted cell loss and retarded external germinal layer development at lobule junctions. *J Neurosci* 1998; 18: 1763-1773
- (2) Baader SL, Vogel MW, Sanlioglu S, Zhang X, Oberdick J. Selective disruption of "late onset" sagittal banding patterns by ectopic expression of engrailed-2 in cerebellar Purkinje cells. *J Neurosci* 1999; 19: 5370-5379
- (3) Bachar-Dahan L, Goltzmann J, Yaniv A, Gazit A. Engrailed-1 negatively regulates beta-catenin transcriptional activity by destabilizing beta-catenin via a glycogen synthase kinase-3beta-independent pathway. *Mol Biol Cell* 2006; 17: 2572-2580
- (4) Bartlett CW, Gharani N, Millonig JH, Brzustowicz LM. Three autism candidate genes: a synthesis of human genetic analysis with other disciplines. *Int J Dev Neurosci* 2005; 23: 221-234
- (5) Benayed R, Choi J, Matteson PG, Gharani N, Kamdar S, Brzustowicz LM, Millonig JH. Autism-associated haplotype affects the regulation of the homeobox gene, ENGRAILED 2. *Biol Psychiatry* 2009; 66: 911-917
- (6) Benayed R, Gharani N, Rossman I, Mancuso V, Lazar G, Kamdar S, Bruse SE, Tischfield S, Smith BJ, Zimmermann RA, Diccio-Bloom E, Brzustowicz LM, Millonig JH. Support for the homeobox transcription factor gene ENGRAILED 2 as an autism spectrum disorder susceptibility locus. *Am J Hum Genet* 2005; 77: 851-868
- (7) Bloom GS, Brashear TA. A novel 58-kDa protein associates with the Golgi apparatus and microtubules. *J Biol Chem* 1989; 264: 16083-16092
- (8) Bonhomme C, Duluc I, Martin E, Chawengsaksophak K, Chenard MP, Kedinger M, Beck F, Freund JN, Domon-Dell C. The Cdx2 homeobox gene has a tumour suppressor function in the distal colon in addition to a homeotic role during gut development. *Gut* 2003; 10: 1465-1471
- (9) Brasted A. An Analysis of the Expression of the Mutant "Engrailed" in *Drosophila Melanogaster*. *Genetics* 1941; 26: 347-373
- (10) Brune CW, Korvatska E, Allen-Brady K, Cook EH Jr, Dawson G, Devlin B, Estes A, Hennelly M, Hyman SL, McMahon WM, Munson J, Rodier PM, Schellenberg GD, Stodgell CJ, Coon H. Heterogeneous association between engrailed-2 and autism in the CPEA network. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; 147: 187-193

- (11) Brunet I, Weinl C, Piper M, Trembleau A, Volovitch M, Harris W, Prochiantz A, Holt C. The transcription factor Engrailed-2 guides retinal axons. *Nature* 2005; 438: 94-98
- (12) Burgess RR, Travers AA, Dunn JJ, Bautz EK. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* 1969; 221: 43-46
- (13) Cheh MA, Millonig JH, Roselli LM, Ming X, Jacobsen E, Kamdar S, Wagner GC. En2 knockout mice display neurobehavioral and neurochemical alterations relevant to autism spectrum disorder. *Brain Res* 2006; 1116: 166-176
- (14) Condrón BG, Patel NH, Zinn K. Engrailed controls glial/neuronal cell fate decisions at the midline of the central nervous system. *Neuron* 1994; 13: 541-554
- (15) Cowin P, Rowlands TM, Hatsell SJ. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17: 499-508
- (16) Dang LH, Chen F, Ying C, Chun SY, Knock SA, Appelman HD, Dang DT. CDX2 has tumorigenic potential in the human colon cancer cell lines LOVO and SW48. *Oncogene* 2006; 25: 2264-2272
- (17) Davis CA, Joyner AL. Expression patterns of the homeo box-containing genes En-1 and En-2 and the proto-oncogene int-1 diverge during mouse development. *Genes Dev* 1988; 2: 1736-1744
- (18) Davis CA, Noble-Topham SE, Rossant J, Joyner AL. Expression of the homeo box-containing gene En-2 delineates a specific region of the developing mouse brain. *Genes Dev* 1988; 2: 361-371
- (19) Degenhardt K, Sassoon DA. A role for Engrailed-2 in determination of skeletal muscle physiologic properties. *Dev Biol* 2001; 231: 175-189
- (20) Dorkin TJ, Robinson MC, Marsh C, Bjartell A, Neal DE, Leung HY. FGF8 over-expression in prostate cancer is associated with decreased patient survival and persists in androgen independent disease. *Oncogene* 1999; 18: 2755-2761
- (21) Drenckhahn D. Zellenlehre. In: Drenckhahn D, Zenker W, HRSG. Benninghoff Anatomie. München: Urban & Schwarzenberg, 1994: 9-93
- (22) Foty RA, Steinberg MS. Cadherin-mediated cell-cell adhesion and tissue segregation in relation to malignancy. *Int J Dev Biol* 2004; 48: 397-409
- (23) Foucher I, Montesinos ML, Volovitch M, Prochiantz A, Trembleau A. Joint regulation of the MAP1B promoter by HNF3beta/Foxa2 and Engrailed is the result of a highly conserved mechanism for direct interaction of

- homeoproteins and Fox transcription factors. *Development* 2003; 130: 1867-1876
- (24) Friedman GC, O'Leary DD. Retroviral misexpression of engrailed genes in the chick optic tectum perturbs the topographic targeting of retinal axons. *J Neurosci* 1996; 16: 5498-5509
- (25) Gehring WJ, Hiromi Y. Homeotic genes and the homeobox. *Annu Rev Genet* 1986; 20: 147-173
- (26) Gemel J, Jacobsen C, MacArthur CA. Fibroblast growth factor-8 expression is regulated by intronic engrailed and Pbx1-binding sites. *J Biol Chem* 1999; 274: 6020-6026
- (27) Gerlai R, Millen KJ, Herrup K, Fabien K, Joyner AL, Roder J. Impaired motor learning performance in cerebellar En-2 mutant mice. *Behav Neurosci* 1996; 110: 126-133
- (28) Gharani N, Benayed R, Mancuso V, Brzustowicz LM, Millonig JH. Association of the homeobox transcription factor, ENGRAILED 2, 3, with autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry* 2004; 9: 474-484
- (29) Grady WM, Markowitz SD. Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2002; 3: 101-128
- (30) Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol* 2007; 39: 2153-160
- (31) Guo RJ, Suh ER, Lynch JP. The role of Cdx proteins in intestinal development and cancer. *Cancer Biol Ther* 2004; 3: 593-601
- (32) Hanks M, Wurst W, Anson-Cartwright L, Auerbach AB, Joyner AL. Rescue of the En-1 mutant phenotype by replacement of En-1 with En-2. *Science* 1995; 269: 679-682
- (33) Hanks MC, Loomis CA, Harris E, Tong CX, Anson-Cartwright L, Auerbach A, Joyner AL. *Drosophila* engrailed can substitute for mouse Engrailed1 function in mid-hindbrain, but not limb development. *Development* 1998; 125: 4521-4530
- (34) Haubenberger D, Reinthaler E, Mueller JC, Pirker W, Katzenschlager R, Froehlich R, Bruecke T, Auff E, Zimprich A. Association of transcription factor polymorphisms PITX3 and EN1 with Parkinson's disease. *Neurobiol Aging* 2009; Epub ahead of Print
- (35) Herold G. Kolorektales Karzinom. In: Herold G, HRSG. *Innere Medizin*. Köln: 2007: 441-447

- (36) Hinoi T, Tani M, Lucas PC, Caca K, Dunn RL, Macri E, Loda M, Appelman HD, Cho KR, Fearon ER. Loss of CDX2 expression and microsatellite instability are prominent features of large cell minimally differentiated carcinomas of the colon. *Am J Pathol* 2001; 159: 2239-2248
- (37) Hjerrild M, Stensballe A, Jensen ON, Gammeltoft S, Rasmussen TE. Protein kinase A phosphorylates serine 267 in the homeodomain of engrailed-2 leading to decreased DNA binding. *FEBS Lett* 2004; 568: 55-59
- (38) Holst MI, Maercker C, Pintea B, Masseroli M, Liebig C, Jankowski J, Miething A, Martini J, Schwaller B, Oberdick J, Schilling K, Baader SL. Engrailed-2 regulates genes related to vesicle formation and transport in cerebellar Purkinje cells. *Mol Cell Neurosci* 2008; 38: 495-504
- (39) Itasaki N, Ichijo H, Hama C, Matsuno T, Nakamura H. Establishment of rostrocaudal polarity in tectal primordium: engrailed expression and subsequent tectal polarity. *Development* 1991; 113: 1133-1144
- (40) Itasaki N, Nakamura H. A role for gradient en expression in positional specification on the optic tectum. *Neuron* 1996; 16: 55-62
- (41) Iwaki DD, Lengyel JA. A Delta-Notch signaling border regulated by Engrailed/Invected repression specifies boundary cells in the Drosophila hindgut. *Mech Dev* 2002; 114: 71-84
- (42) Jankowski J, Holst MI, Liebig C, Oberdick J, Baader SL. Engrailed-2 negatively regulates the onset of perinatal Purkinje cell differentiation. *J Comp Neurol* 2004; 472: 87-99
- (43) Joliot A, Maizel A, Rosenberg D, Trembleau A, Dupas S, Volovitch M, Prochiantz A. Identification of a signal sequence necessary for the unconventional secretion of Engrailed homeoprotein. *Curr Biol* 1998; 8: 856-863
- (44) Joyner AL, Herrup K, Auerbach BA, Davis CA, Rossant J. Subtle cerebellar phenotype in mice homozygous for a targeted deletion of the En-2 homeobox. *Science* 1991; 251: 1239-1243
- (45) Joyner AL, Kornberg T, Coleman KG, Cox DR, Martin GR. Expression during embryogenesis of a mouse gene with sequence homology to the Drosophila engrailed gene. *Cell* 1985; 43: 29-37
- (46) Joyner AL, Martin GR. En-1 and En-2, two mouse genes with sequence homology to the Drosophila engrailed gene: expression during embryogenesis. *Genes Dev* 1987; 1: 29-38
- (47) Kaimaktchiev V, Terracciano L, Tornillo L, Spichtin H, Stoios D, Bundi M, Korcheva V, Mirlacher M, Loda M, Sauter G, Corless CL. The homeobox

intestinal differentiation factor CDX2 is selectively expressed in gastrointestinal adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2004; 17: 1392-1399

- (48) Kuemerle B, Gulden F, Cherosky N, Williams E, Herrup K. The mouse *Engrailed* genes: a window into autism. *Behav Brain Res* 2007; 176: 121-132
- (49) Lavezzi AM, Ottaviani G, Mauri M, Terni L, Matturri L. Involvement of the *EN-2* gene in normal and abnormal development of the human arcuate nucleus. *Int J Exp Pathol* 2005; 86: 25-31
- (50) Lawrence PA, Morata G. Compartments in the wing of *Drosophila*: a study of the *engrailed* gene. *Dev Biol* 1976; 50: 321-337
- (51) Logan C, Willard HF, Rommens JM, Joyner AL. Chromosomal localization of the human homeo box-containing genes, *EN1* and *EN2*. *Genomics* 1989; 4: 206-209
- (52) Logan C, Wizenmann A, Drescher U, Monschau B, Bonhoeffer F, Lumsden A. Rostral optic tectum acquires caudal characteristics following ectopic *engrailed* expression. *Curr Biol* 1996; 6: 1006-1014
- (53) Luzio JP, Brake B, Banting G, Howell KE, Braghetta P, Stanley KK. Identification, sequencing and expression of an integral membrane protein of the trans-Golgi network (*TGN38*). *Biochem J* 1990; 270: 97-102
- (54) Maizel A, Bensaude O, Prochiantz A, Joliot A. A short region of its homeodomain is necessary for *engrailed* nuclear export and secretion. *Development* 1999; 126: 3183-190
- (55) Maizel A, Tassetto M, Filhol O, Cochet C, Prochiantz A, Joliot A. *Engrailed* homeoprotein secretion is a regulated process. *Development* 2002; 129: 3545-3553
- (56) Mallo GV, Rechreche H, Frigerio JM, Rocha D, Zweibaum A, Lacasa M, Jordan BR, Dusetti NJ, Dagorn JC, Iovanna JL. Molecular cloning, sequencing and expression of the mRNA encoding human *Cdx1* and *Cdx2* homeobox. Down-regulation of *Cdx1* and *Cdx2* mRNA expression during colorectal carcinogenesis. *Int J Cancer* 1997; 74: 35-44
- (57) Marie B, Cruz-Orengo L, Blagburn JM. Persistent *engrailed* expression is required to determine sensory axon trajectory, branching, and target choice. *J Neurosci* 2002; 22: 832-841
- (58) Martin NL, Saba-EI-Leil MK, Sadekova S, Meloche S, Sauvageau G. *EN2* is a candidate oncogene in human breast cancer. *Oncogene* 2005; 24: 6890-6901

- (59) Millen KJ, Hui CC, Joyner AL. A role for En-2 and other murine homologues of *Drosophila* segment polarity genes in regulating positional information in the developing cerebellum. *Development* 1995; 121: 3935-3945
- (60) Millen KJ, Wurst W, Herrup K, Joyner AL. Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse *Engrailed-2* mutants. *Development* 1994; 120: 695-706
- (61) Montesinos ML, Foucher I, Conradt M, Mainguy G, Robel L, Prochiantz A, Volovitch M. The neuronal microtubule-associated protein 1B is under homeoprotein transcriptional control. *J Neurosci* 2001; 21: 3350-3359
- (62) Morgan R. *Engrailed*: Complexity and economy of a multi-functional transcription factor. *FEBS Lett* 2006; 580: 2531-2533
- (63) Narayan S, Roy D. Role of APC and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Mol Cancer* 2003; 2: 41-55
- (64) Nedelec S, Foucher I, Brunet I, Bouillot C, Prochiantz A, Trembleau A. *Emx2* homeodomain transcription factor interacts with eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) in the axons of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 10815-10820
- (65) Peltenburg LT, Murre C. *Engrailed* and Hox homeodomain proteins contain a related Pbx interaction motif that recognizes a common structure present in Pbx. *EMBO J* 1996; 15: 3385-3393
- (66) Peltenburg LT, Murre C. Specific residues in the Pbx homeodomain differentially modulate the DNA-binding activity of Hox and *Engrailed* proteins. *Development* 1997; 124: 1089-1098
- (67) Petit E, Herault J, Martineau J, Perrot A, Barthelemy C, Hameury L, Sauvage D, Lelord G, Muh JP. Association study with two markers of a human homeogene in infantile autism. *J Med Genet* 1995; 32: 269-274
- (68) Poole SJ, Law ML, Kao FT, Lau YF. Isolation and chromosomal localization of the human *En-2* gene. *Genomics* 1989; 4: 225-231
- (69) Reaves B, Wilde A, Banting G. Identification, molecular characterization and immunolocalization of an isoform of the trans-Golgi-network (TGN)-specific integral membrane protein TGN38. *Biochem J* 1992; 283: 313-316
- (70) Retaux S, Harris WA. *Engrailed* and retinotectal topography. *Trends Neurosci* 1996; 1: 542-546
- (71) Rissling I, Strauch K, Hoff C, Oertel WH, Moller JC. Haplotype analysis of the *engrailed-2* gene in young-onset Parkinson's disease. *Neurodegener Dis* 2009; 6: 102-105

- (72) Rudnick A, Ling TY, Odagiri H, Rutter WJ, German MS. Pancreatic beta cells express a diverse set of homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 12203-12207
- (73) Schmiegel W, Reinacher-Schick A, Arnold D, Graeven U, Heinemann V, Porschen R, Riemann J, Rodel C, Sauer R, Wieser M, Schmitt W, Schmoll HJ, Seufferlein T, Kopp I, Pox C. Update S3-guideline "colorectal cancer" 2008. *Z Gastroenterol* 2008; 46: 799-840
- (74) Scoles DR, Huynh DP, Morcos PA, Coulsell ER, Robinson NG, Tamanoi F, Pulst SM. Neurofibromatosis 2 tumour suppressor schwannomin interacts with betaII-spectrin. *Nat Genet* 1998; 18: 354-359
- (75) Sgado P, Alberi L, Gherbassi D, Galasso SL, Ramakers GM, Alavian KN, Smidt MP, Dyck RH, Simon HH. Slow progressive degeneration of nigral dopaminergic neurons in postnatal Engrailed mutant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 15242-15247
- (76) Sgado P, Viaggi C, Fantacci C, Corsini GU. Characterization of the Engrailed mutant mice as experimental models for Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 2008; 2: 103-106
- (77) Sgaier SK, Lao Z, Villanueva MP, Berenshteyn F, Stephen D, Turnbull RK, Joyner AL. Genetic subdivision of the tectum and cerebellum into functionally related regions based on differential sensitivity to engrailed proteins. *Development* 2007; 134: 2325-2335
- (78) Shigetani Y, Funahashi JI, Nakamura H. En-2 regulates the expression of the ligands for Eph type tyrosine kinases in chick embryonic tectum. *Neurosci Res* 1997; 27: 211-217
- (79) Simon HH, Thuret S, Alberi L. Midbrain dopaminergic neurons: control of their cell fate by the engrailed transcription factors. *Cell Tissue Res* 2004; 318: 53-61
- (80) Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, Zhang J, Soden R, Hayakama M, Kreiman G, Cooke MP, Walker JR, Hogenesch JB. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 6062-6067
- (81) Takashima S, Murakami R. Regulation of pattern formation in the *Drosophila* hindgut by wg, hh, dpp, and en. *Mech Dev* 2001; 101: 79-90
- (82) Takashima S, Yoshimori H, Yamasaki N, Matsuno K, Murakami R. Cell-fate choice and boundary formation by combined action of Notch and engrailed in the *Drosophila* hindgut. *Dev Genes Evol* 2002; 212: 534-541

- (83) Vogel MW, Ji Z, Millen K, Joyner AL. The Engrailed-2 homeobox gene and patterning of spinocerebellar mossy fiber afferents. *Brain Res Dev Brain Res* 1996; 96: 210-218
- (84) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-532
- (85) Wang L, Jia M, Yue W, Tang F, Qu M, Ruan Y, Lu T, Zhang H, Yan H, Liu J, Guo Y, Zhang J, Yang X, Zhang D. Association of the ENGRAILED 2 (EN2) gene with autism in Chinese Han population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2008; 147: 434-438
- (86) Werling RW, Yaziji H, Bacchi CE, Gown AM. CDX2, a highly sensitive and specific marker of adenocarcinomas of intestinal origin: an immunohistochemical survey of 476 primary and metastatic carcinomas. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 303-310
- (87) Witek ME, Nielsen K, Walters R, Hyslop T, Palazzo J, Schulz S, Waldman SA. The putative tumor suppressor Cdx2 is overexpressed by human colorectal adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2005; 11: 8549-8556
- (88) Wizenmann A, Brunet I, Lam JS, Sonnier L, Beurdeley M, Zarbalis K, Weisenhorn-Vogt D, Weinl C, Dwivedy A, Joliot A, Wurst W, Holt C, Prochiantz A. Extracellular Engrailed participates in the topographic guidance of retinal axons in vivo. *Neuron* 2009; 64: 355-366
- (89) Wu J, Payson RA, Lang JC, Chiu IM. Activation of fibroblast growth factor 8 gene expression in human embryonal carcinoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 62: 1-10
- (90) Wurst W, Auerbach AB, Joyner AL. Multiple developmental defects in Engrailed-1 mutant mice: an early mid-hindbrain deletion and patterning defects in forelimbs and sternum. *Development* 1994; 120: 2065-2075
- (91) Zammit C, Coope R, Gomm JJ, Shousha S, Johnston CL, Coombes RC. Fibroblast growth factor 8 is expressed at higher levels in lactating human breast and in breast cancer. *Br J Cancer* 2002; 86: 1097-1103
- (92) Zec N, Rowitch DH, Bitgood MJ, Kinney HC. Expression of the homeobox-containing genes EN1 and EN2 in human fetal midgestational medulla and cerebellum. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 236-242



## 8 Danksagung

Ein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. rer. nat. Stephan Baader, der mich seit meinem zweiten Semester durch das Medizinstudium begleitet hat. Professor Baader hat mich jederzeit unterstützt und ohne seine ständige Gesprächs- und große Hilfsbereitschaft wäre diese Arbeit nicht abgeschlossen worden.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof. Dr. med. Schilling, Direktor des Instituts für Anatomie und allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie, die mir während meiner Arbeit tatkräftig und durch gute Ratschläge geholfen haben und dabei insbesondere Alice Ihmer, Sabine Molly, Helma Langmann und Alexander Glassmann. Herrn Prof. Dr. med. Schilling danke ich darüber hinaus sehr für die finanzielle Unterstützung während meiner Tätigkeit als Tutor im Histologiekurs.

Ohne die Unterstützung durch meine Eltern wäre das mehr als einjährige Arbeiten am Institut für Anatomie und Zellbiologie und damit das Erlernen einer wissenschaftlichen Methodik jedoch nicht möglich gewesen. Deswegen gilt ihnen mein größter Dank.