

Aus dem Department Biologie II, Anthropologie und Humangenetik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. B. Grothe

**Untersuchungen zur tumorspezifischen Geninaktivierung
über Methylierung
in gastrointestinalen Karzinomen**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt
von

Stefanie Hüfner
aus
München

2005

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatterin:	Frau Prof. Dr. J. Johnson
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Bornkamm
	Prof. Dr. J. Diebold
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Frau Prof. Dr. E.H. Weiß
Dekan:	Prof. Dr. med. D. Reinhardt
Tag der mündlichen Prüfung:	7. Juli 2005

Abkürzungen

1	Einleitung	1
1.1	Entstehung von Tumorerkrankungen	1
1.2	Methylierung von CpG-Inseln	1
1.3	Karzinogenese aufgrund einer gestörten Mismatch-Reparatur	2
1.3.1	Mismatch-Reparatur.....	2
1.3.2	Das hMLH1-Gen als Komponente des Mismatch-Reparatursystems	3
1.3.3	Mikrosatelliteninstabilität als mögliche Folge einer defekten Mismatch-Reparatur	3
1.4	Entstehung von Neoplasien infolge einer Störung der Apoptose	4
1.4.1	Die Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNF-R)-Familie und deren Liganden	4
1.4.2	Die Subfamilie der „Todesrezeptoren“	5
1.4.3	Das CD95/CD95-Ligand-System.....	5
1.5	KRAS-Mutationen	8
1.6	Klinische Bedeutung des Kolonkarzinoms und diagnostische Möglichkeiten im Rahmen molekulargenetischer Verfahren	8
1.6.1	Sporadische und hereditäre Formen des Kolonkarzinoms	9
1.6.2	HNPCC (hereditäres nicht-polypöses Colonicarcinom)	9
1.7	Zielsetzung	10
2	Material	11
2.1	Humane Zellen	11
2.1.1	Periphere mononukleäre Blutzellen.....	11
2.1.2	Humane Zelllinien	11
2.2	Proben von Kolonkarzinomen	11
2.2.1	Mikrosatelliteninstabile Kolonkarzinomproben	12
2.2.2	Ras-mutierte Kolonkarzinomproben	12
2.3	Oligonukleotide	12
2.3.1	Oligonukleotide zur Charakterisierung von <i>hMLH1</i>	12
2.3.2	Oligonukleotide zur Charakterisierung von <i>CD95</i>	13
2.4	Enzyme	13
2.4.1	Enzyme allgemein	13
2.4.2	Restriktionsenzyme	14
2.5	Chemikalien allgemein	14
2.6	Pufferlösungen und Medien	15
2.6.1	Lösungen und Medien für die Kultur von Zellen.....	15
2.6.2	Lösungen für Aufbereitung von Leukozytenkonzentraten und die DNA-Isolierung.....	16
2.6.3	Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	16
2.6.4	Substanzen für die Agarose-Gelelektrophorese	17
2.6.5	Substanzen für die PAA-Gelelektrophorese	18
2.6.6	Reagenzien zur Durchführung der Southernblot-Analyse.....	18
2.6.7	Puffer und Lösungen für die Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden	19
2.6.8	Allgemein verwendete Lösungen und Medien	20
2.7	Sonstige Materialien/Verbrauchsmaterial	20
2.8	Kit	21
2.9	Geräte	21

3	Methoden	22
3.1	Kultur von humanen Zellen.....	22
3.1.1	Allgemeines	22
3.1.2	Auftauen von tiefgefrorenen Zellen.....	22
3.1.3	Kultur von adhärennten Zellen	22
3.1.4	Ermittlung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer.....	23
3.1.5	Einfrieren von Zellsedimenten	24
3.1.6	Vitales Einfrieren von Zellen.....	24
3.2	DNA-Isolierung nach der Aussalzmethode.....	24
3.2.1	Vollblutproben	24
3.2.2	Leukozytenkonzentrate	25
3.3	Präparation von Nukleinsäuren	26
3.3.1	Reinigung durch Phenolextraktion.....	26
3.3.2	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch Messung der optischen Dichte (OD).....	27
3.3.3	Enzymatische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	28
3.4	Enzymatische Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche	29
3.4.1	Prinzip der Standard-Polymerase-Kettenreaktion.....	29
3.4.2	Denaturierungszeit und -temperatur	29
3.4.3	Wahl geeigneter Oligonukleotide und Bestimmung der Annealing-Temperatur	30
3.4.4	Extensionszeit und -temperatur	30
3.4.5	Standard-PCR-Ansatz.....	30
3.4.6	Standard-PCR-Programm	31
3.4.7	Optimierungsmöglichkeiten der PCR.....	31
3.4.8	Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden.....	32
3.4.9	PCR-Bedingungen für die verwendeten Oligonukleotide	32
3.4.9.1	Bestimmung des Methylierungsstatus des <i>hMLH1</i> -Promotors	32
	Oligonukleotide <i>hMLH1</i> -A und <i>hMLH1</i> -B.....	32
	Oligonukleotide <i>hMLH1</i> -uA und <i>hMLH1</i> -uB oder <i>hMLH1</i> -uA-cy5 und <i>hMLH1</i> -uB	33
	Oligonukleotide <i>hMLH1</i> -mA und <i>hMLH1</i> -mB oder <i>hMLH1</i> -mA-cy5 und <i>hMLH1</i> -mB	33
	Oligonukleotide <i>SNRPN</i> -Mf und <i>SNRPN</i> -Mr	33
3.4.9.2	Bestimmung des Methylierungsstatus des <i>CD95</i> -Promotors	34
	Herstellung der Digoxigenin-markierten Sonde unter Einsatz der Oligonukleotide <i>CD95/143461f</i> und <i>CD95/144471r</i>	34
	Oligonukleotide <i>CD95/143461f</i> und <i>CD95/144471r</i>	34
	Oligonukleotide <i>CD95/143461f</i> und <i>CD95/144961r</i>	34
	Oligonukleotide <i>CD95/144450f</i> und <i>CD95/144961r</i>	35
3.5	Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA.....	35
3.5.1	Prinzip der gelelektrophoretischen Auftrennung	35
3.5.2	Visualisierung der DNA-Fragmente durch Ethidiumbromid.....	36
3.5.3	Erhöhung der Sensitivität durch Verwendung von SYBR-Green	36
3.5.4	Verwendung von Polyacrylamidgelen.....	37
3.6	Southernblot-Analyse	38
3.6.1	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA	38
3.6.2	Southerntransfer	38
3.6.3	Nicht-radioaktive Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden	39
3.6.4	Immundetektion.....	39
3.6.5	Auswertung der Southernblot-Analyse	40
3.6.6	Rehybridisierung von Membranen.....	40

3.7	Methylierungstest für <i>hMLH1</i>	40
3.7.1	Denaturierung	40
3.7.2	Bisulfitreaktion	41
3.7.3	DNA-Reinigung	41
3.7.4	Desulfonierung	41
3.7.5	Amplifikation	41
3.8	Sequenzanalyse	42
4	Ergebnisse	43
4.1	Analyse des <i>hMLH1</i>-Promotors	43
4.1.1	Das humane <i>hMLH1</i> -Gen und dessen Promotor	43
4.1.2	Etablierung des Methylierungstests, der PCR-Bedingungen für die Oligonukleotide <i>hMLH1-uA/uB</i> und <i>hMLH1-mA/mB</i> und der Auftrennungsverfahren	46
4.1.2.1	Austesten der optimalen PCR-Bedingungen für die Oligonukleotide <i>hMLH1-uA/uB</i> und <i>hMLH1-mA/mB</i>	46
4.1.2.2	Austesten verschiedener gelelektrophoretischer Auftrennungsverfahren	48
4.1.3	Untersuchung der Tumorproben mittels der Oligonukleotidpaare <i>hMLH1-uA/uB</i> und <i>hMLH1-mA/mB</i>	49
4.1.4	Untersuchung der Tumorproben 94 und 152 hinsichtlich der Vollständigkeit der Bisulfitmodifikation	52
4.1.4.1	Austesten der Bedingungen und Herstellung von Kontrollen für die Oligonukleotide <i>SNRPN-Mf/Mr</i>	52
4.1.4.2	Überprüfung der erfolgreichen Bisulfitmodifikation der Tumorproben 94 und 152 mittels der Oligonukleotide <i>SNRPN-Mf/Mr</i>	53
4.1.5	Untersuchung der Tumorproben 94 und 152 hinsichtlich einer Deletion innerhalb des <i>hMLH1</i> -Promotors	54
4.2	Untersuchung der Methylierung des <i>CD95</i>-Gens	57
4.2.1	Das <i>CD95</i> -Gen	57
4.2.2	Herstellung der Digoxigenin-markierten <i>CD95</i> -Sonde	59
4.2.3	Auswahl von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen	60
4.2.3.1	Austesten der Restriktionsenzyme <i>Hind</i> III, <i>Pst</i> I und <i>Taq</i> I	60
4.2.3.2	Austesten des Restriktionsenzym <i>Taq</i> I in Kombination mit den Restriktionsnukleasen <i>BssH</i> II, <i>Mlu</i> I und <i>Sma</i> I	62
4.2.4	Restriktionsanalyse von Tumorproben mit den Nukleasen <i>Taq</i> I und <i>Sma</i> I und anschließender Southernblot	66
4.2.5	Analyse der Proben 147 und 148	71
4.2.5.1	Amplifikation der varianten <i>CD95</i> -Gensequenz mit dem Oligonukleotidpaar <i>CD95-143461f</i> und <i>CD95-144961r</i>	71
4.2.5.2	Restriktionsanalyse der Amplifikate der Tumorproben 147 und 148 mit den Enzymen <i>Taq</i> I und <i>Sma</i> I	72
4.2.5.3	Sequenzierung zur Bestätigung des Vorhandenseins eines Polymorphismus bei den Proben 147 und 148	76
5	Diskussion	80
5.1	Analyse des Methylierungsstatus des <i>hMLH1</i>-Promotors	80
5.2	Analyse des Methylierungsstatus des <i>CD95</i>-Promotors	85
5.3	Resumée	89
6	Zusammenfassung	90
7	Literatur	92
	Danksagung	97
	Eidesstattliche Erklärung	98
	Lebenslauf	99

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	American Type Culture Collection
bp	Basenpaare
BSA	Bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
CD	Cluster of Differentiation
CRD	Cystein-reiche Domäne
Cy5	Cytochrom 5
DIG	Digoxigenin
DIG-dNTP	Digoxigenin-markierte dNTP
DISC	Death inducing signaling complex
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	2'-Desoxy-Nukleosid-5'-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtOH	Ethanol
FADD	Fas-associated death domain protein
FCS	Fetal calf serum (Fötales Kälberserum)
G	Guanin
i.A.	im Allgemeinen
i.e.S.	im engeren Sinn
HNPCC	hereditäres nicht-polypöses Coloncarcinom
kb	Kilobasenpaare
kD	kiloDalton
M	Molar
MMR	Mismatch-Reparatur
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Kochsalzlösung)
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RMPI	Rothwell Park Memorial Institute (Zellkulturmedium)
rpm	Rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
SDS	Sodiumdodecylsulphat
SSC	Standard-Saline-Citrat-Puffer
T	Thymin
Taq	Hitzestabile Polymerase von Thermophilus aquaticus
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TC	Tissue culture
T _A	Anlagerungstemperatur
T _M	Melting temperature (Schmelztemperatur)
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TNF-R	Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor
TNFRSF6	Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6
TPE-Puffer	Tris-Phosphat-EDTA-Puffer
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween 20	Polyoxymethylensorbitan Monolaurat
U	Unit (Einheit für die Enzymaktivität)
ÜN	Über Nacht
Vol.	Volumen

1 Einleitung

1.1 Entstehung von Tumorerkrankungen

Der Erwerb genetischer Veränderungen stellt die Grundlage für die Entstehung von Tumorerkrankungen dar. Die Gesamtheit der in einem Tumor akkumulierten Mutationen setzt sich zusammen aus den im Rahmen der Karzinogenese erworbenen genetischen Veränderungen und denjenigen, die bereits zu Beginn der klonalen Expansion der Ursprungszelle enthalten waren. Einer theoretischen Überlegung von Tomlinson et al., 2002 zufolge akkumulieren nahezu alle Tumoren im Laufe ihrer Entwicklung eine enorme Anzahl an Mutationen, die sich in einer Größenordnung von 10^{12} oder mehr bewegen soll.

Eine Vielzahl der Mutationen wiederum kann für die Entstehung von Neoplasien verantwortlich gemacht werden. Diese Zellveränderungen lassen sich in sechs Gruppen unterteilen:

1. Resistenz einer Zelle gegen wachstumshemmende Signale
2. Aktivierung mitogener Signaltransduktionswege
3. Umgehen der Apoptose
4. Vermögen, sich unbegrenzt zu teilen

Zwei zusätzliche Entartungsschritte werden bei soliden Tumoren beobachtet:

5. Anschluß des Tumors an die Blutversorgung
6. Fähigkeit der Metastasenbildung

Neben Chromosomeninstabilitäten sind für diese genetischen Veränderungen typischerweise Basenmutationen, Deletionen oder Insertionen verantwortlich, die die Aktivierung von Onkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen nach sich ziehen. Zu Verlust von Genfunktionen kann es aber auch im Rahmen von epigenetischen Vorgängen, wie z.B. der Methylierung von DNA (Lehmann et al., 2002) kommen.

1.2 Methylierung von CpG-Inseln

Stromaufwärts von etwa der Hälfte der menschlichen Gene finden sich CG-reiche Abschnitte von bis zu 1000 bp Länge. Diese werden als CpG-Inseln bezeichnet und charakterisieren Promotoren von Haushaltsgenen, die keine DNA-Methylierung aufweisen. Die Besonderheit besteht darin, daß an anderer Stelle im Genom die Häufigkeit des Dinukleotids CpG gegen-

über der statistischen Erwartung um 80 – 90 % zurückbleibt. Hierbei handelt es sich um die Folge eines Selektionsprozesses. In der Abfolge CpG sind die Cytosinbausteine nämlich häufig an der 5'-Position methyliert. In diesem Fall besteht die Möglichkeit der Überführung von Cytosin in Thymin durch Desaminierung, was unvermeidlich eine Mutation nach sich zieht. Da dieser Basenaustausch vom DNA-Reparatursystem nicht als geschädigte Base erkannt wird, sind CpG-Folgen ein bevorzugter Ort für Mutationen.

Bei gesunden menschlichen Zellen sind die CpG-Dinukleotide an anderer Stelle im Genom meistens methyliert, wohingegen diejenigen vor aktiven Genen wegen der fehlenden Methylierung besser gegen das Auftreten von Mutationen geschützt sind. Tragen die Cytosinbasen der CpG-Nukleotide in Stromaufwärtsbereichen von Genen allerdings eine Methylgruppe, so ist dies zumeist mit der transkriptionellen Inaktivierung der entsprechenden Gene verbunden (Knippers, 2001).

1.3 Karzinogenese aufgrund einer gestörten Mismatch-Reparatur

1.3.1 Mismatch-Reparatur

Erkenntnisse über die postreplikative Korrektur von falsch eingebauten Nukleotiden erlangte man, als eine Analyse der *E.coli*-Gene *mutS*, *mutL* und *mutH* zeigte, daß aus dem Ausfall dieser Gene eine hundert- bis tausendfache Erhöhung der Mutationsrate im Vergleich mit Wildtyp-Bakterien resultiert. Für die Beseitigung solcher Falschpaarungen im Bereich der komplementären Stränge innerhalb einer DNA steht der Zelle ein Mismatch-Reparatursystem (MMR) zur Verfügung. Bei fehlender Komplementarität zweier Nukleotide kann es die fälschlicherweise neu eingebaute(n) Base(n) von der (den) ursprünglich vorhandenen unterscheiden. Ermöglicht wird dies durch die am synthetisierten Strang erst etwas später einsetzende Methylierung, sodaß die Abwesenheit von Methylgruppen die Erkennung des neuen Stranges ermöglicht und als Signal für die Mismatch-Reparatur dient.

Bei Bakterien führt die Anlagerung der Proteine MutS, MutL und MutH an das inkorrekte Basenpaar im neu synthetisierten Strang nach mehreren Zwischenschritten zur Entfernung desselben und zum Verschließen der entstandenen Lücke durch Neusynthese. Dieses System ist in der Lage, verschiedene Falschpaarungen, aber auch kleine Insertionen oder Deletionen von bis zu zwei Basenpaaren zu beseitigen (Knippers, 2001).

1.3.2 Das hMLH1-Gen als Komponente des Mismatch-Reparatursystems

Aufbauend auf den Erkenntnissen des MMR-Systems der Bakterien und Hefen gelang die Identifizierung des humanen Homologs des mutS-Gens (*hMSH2*) und des mutL-Gens (*hMLH1*) (Fishel et al., 1993; Bronner et al., 1994; Papadopoulos et al., 1994). Inzwischen wurden mehrere mutS- und mutL-homologe Gene und Proteine identifiziert, die unterschiedliche Fehlpaarungen in der DNA reparieren (Jiricny und Marra, 2003). Die Erkennung fehlerhaft eingebauter Nukleotide oder kleiner extrahelikaler DNA-Sequenzen führt zur Anlagerung MutS-verwandter Proteine, deren Konformation durch die anschließende Interaktion mit einem heterodimeren Komplex von MutL-ähnlichen Proteinen (u.a. hMLH1) verändert wird (Wheeler et al., 2000). Die Gesamtheit dieser Vorgänge bewirkt eine äußerst effektive Beseitigung vorhandener Falschpaarungen von Basen oder nicht gepaarter Nukleotidabfolgen.

Bei einer Inaktivierung des hMLH1-Gens wird somit die gesamte Mismatch-Reparatur in ihrer Funktion beeinträchtigt mit der möglichen Folge der Aktivierung von Onkogenen oder Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen. Neben somatischen Mutationen führen vor allem epigenetische Vorgänge zur verminderten oder fehlenden Expression von *hMLH1* (Peltomaki, 2003). Eine im proximalen *hMLH1*-Promotor gelegene Region, deren Methylierungsstatus mit dem Fehlen der *hMLH1*-Expression in kolorektalen Zelllinien korreliert ist, wurde von Deng et al., 1999 identifiziert. Miyakura et al., 2003 gelang es, den kompletten Verlust der *hMLH1*-Expression in 85 % der vollständig methylierten Kolonkarzinome nachzuweisen, die im Rahmen von Tumorresektionen gewonnen worden waren. Eine erhöhte Methylierungsfrequenz der CpG-Dinukleotide in *hMLH1* bei Epstein-Barr-Virus-negativen im Vergleich zu EBV-positiven Magenkarzinomen stellten Kang et al., 2002 fest.

1.3.3 Mikrosatelliteninstabilität als mögliche Folge einer defekten Mismatch-Reparatur

Im Genom existieren Bereiche, tandemrepetitive Sequenzen, an denen sich Kopien von ein bis sechs Basenpaaren häufig wiederholen und die Mikrosatelliten genannt werden. Die Lokalisation dieser Abschnitte weicht normalerweise kaum von der erwarteten statistischen Verteilung ab. Repetitive Sequenzen von ein oder zwei Nukleotiden sind hierbei häufiger als Tri- oder Tetranukleotid-Wiederholungen. Auffällig ist die Tatsache, daß die Anzahl der Wiederholungseinheiten eines gegebenen Mikrosatelliten für viele Loci einerseits zwar hoch polymorph ist, sich die Länge eines solchen Bereiches bei beiden Allelen eines Individuums also mit großer Wahrscheinlichkeit unterscheidet, andererseits die Mikrosatelliten selbst als

relativ stabil anzusehen sind. Ursächlich für den Mikrosatelliten-Polymorphismus sind Fehler bei der DNA-Replikation durch Verrutschungen im Bereich der Replikationsgabeln. Hieraus resultieren kleine Insertionen oder Deletionen, von denen im Verlauf der Evolution einige der Korrektur durch das MMR-System entgangen sind (Knippers, 2001). Bei manchen Tumorzellen liegt eine defekte MMR vor, weshalb im Verlauf mehrerer Zellzyklen verschieden lange Mikrosatelliten-Allele akkumulieren (Wheeler et al., 2000). Für die Entstehung neuer Allele in Tumor-DNA, die sich von den beiden parental Allelen normaler DNA unterscheiden, wurde der Begriff Mikrosatelliteninstabilität (MSI) geprägt. Da auch kurze repetitive Sequenzen in proteinkodierenden Abschnitten vorkommen, führt ihre Mutation in MSI-positiven Tumoren zu Verschiebungen im Leseraster und zu nicht funktionellen Genprodukten. In kolorektalen MSI-Tumoren akkumulieren solche Leserasterverschiebungen in Genen, die Zellwachstum, Apoptose und DNA-Reparatur kontrollieren (Kuismanen et al., 2002).

Markowitz et al., 2000 fanden als häufigste Ursache sporadischer mikrosatelliteninstabiler Kolonkarzinome die epigenetische Methylierung beider *hMLH1*-Allele mit konsekutiver Minderexpression des entsprechenden Proteins. Ein vollständiges Fehlen von *hMLH1*-mRNA wurde von Geisler et al., 2003 in einer Untersuchung von 21 Ovarialkarzinomen in 47,6 % der Tumoren festgestellt.

1.4 Entstehung von Neoplasien infolge einer Störung der Apoptose

Eines der Kennzeichen von Tumoren ist das ungehemmte Wachstum und die unregulierte Teilung der neoplastischen Zellen. Für die Homeostase innerhalb eines Zellverbandes ist die Apoptose von entscheidender Bedeutung. Induziert wird sie bei irreparablen Zellschäden (z.B. DNA-Schädigungen), kann aber auch durch Signale von außen eingeleitet werden. Hierfür ist u.a. die Interaktion von Tumor-Nekrose-Faktoren mit den entsprechenden Rezeptoren notwendig.

1.4.1 Die Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNF-R)-Familie und deren Liganden

Die Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren sind durch mehrere extrazelluläre Cystein-reiche Domänen (CRD) gekennzeichnet und gehören der Kategorie der Typ-I-Transmembranproteine an. Ihre Funktionen bestehen abhängig vom Zelltyp in der Induktion von Zell-

proliferation, -differenzierung, -aktivierung und Genexpression. Darüber hinaus sind sie an der Immunantwort und der Auslösung des apoptotischen Zelltodes beteiligt.

Die Liganden der TNF-Rezeptoren sind in der Mehrzahl Typ-II-Transmembranproteine und bilden die TNF-Familie. Ihre Gemeinsamkeit besteht in einer 150 Aminosäuren umfassenden extrazellulären Region, die für die Rezeptorbindung verantwortlich ist (Wallach et al., 1998). Die Abspaltung der Liganden erfolgt durch spezifische Metalloproteinasen (Black et al., 1997). Alle Mitglieder der TNF-Familie bilden Trimere aus drei i.A. identischen Untereinheiten aus. Die Bindung des Liganden bewirkt bei den Rezeptormolekülen ebenfalls eine Zusammenlagerung zu tri- oder multimeren Komplexen, die durch Disulfidbrücken zwischen den CRD stabilisiert werden. Durch die Oligomerisierung der Untereinheiten der Rezeptormoleküle wird die intrazelluläre Signaltransduktion aktiviert.

Daneben existieren auch lösliche Formen der TNF-Rezeptoren, die durch Abspaltung des extrazellulären Anteils der Rezeptoren entstehen oder auf alternatives Spleißen des Primärtranskripts zurückzuführen sind.

1.4.2 Die Subfamilie der „Todesrezeptoren“

Eine Subfamilie der TNF-Rezeptoren bilden die „Todesrezeptoren“, deren Gemeinsamkeit eine konservierte, 80 Aminosäuren umfassende zytoplasmatische Domäne darstellt, die „Todesdomäne“ (death domain) genannt wird (Tartaglia et al., 1993). Dieser Anteil ist für die intrazelluläre Weiterleitung des apoptotischen Signals verantwortlich. Sämtliche auf die Auslösung von Apoptose ausgerichteten Signalübertragungswege zielen auf die Aktivierung von mehreren Cysteinproteasen ab. Diese werden wegen ihrer Fähigkeit, Proteinketten hinter Asparaginsäureresten zu spalten, auch Caspasen genannt.

Eines der am besten charakterisierten Mitglieder der Familie der „Todesrezeptoren“ stellt der CD95-Rezeptor dar, auch Fas, Apo-1 und TNFRSF6 genannt.

1.4.3 Das CD95/CD95-Ligand-System

Zeitgleich zur Entdeckung des Zelloberflächenrezeptors Apo-1 (Trauth et al., 1989), der nach Stimulation in verschiedenen humanen Zelllinien innerhalb von wenigen Stunden Apoptose auslöst, isolierten Yonehara et al., 1989 ein Zelloberflächenmolekül mit gleichen Eigenschaften, das Fas genannt wurde. Die Klonierung und anschließende Sequenzierung

der Apo-1/Fas-cDNA belegte, daß es sich hierbei um identische Moleküle handelt (Oehm et al., 1992). Als Mitglied der TNFR wurde dieser Rezeptor TNFRSF6 (tumor necrosis factor receptor superfamily, member 6) genannt und erhielt im Rahmen der CD-Nomenklatur die Bezeichnung CD95. Der Fas-vermittelte Zelltod wurde außer bei der Apoptoseinduktion auch bei der Entstehung von Nekrosen beobachtet (Wajant, 2002).

Neben der Expression des Transmembranrezeptors an der Zelloberfläche existiert aufgrund alternativen Spleißens eine lösliche Form von CD95. Das Rezeptormolekül weist je nach Grad der Glykosylierung eine Größe von 45-52 kD auf, besitzt ein breites Expressionsspektrum und wird sowohl durch den natürlichen Liganden als auch durch agonistische Antikörper aktiviert. Bei dem Fas-Liganden (CD95L) handelt es sich um ein wichtiges membranständiges Molekül, das außer von aktivierten zytotoxischen T-Zellen auch von B- und NK-Zellen exprimiert wird (Reichmann, 2002; Rossi und Gaidano, 2003). Die darüber hinaus existierende lösliche Form des CD95L-Proteins bildet ebenso wie die transmembrane Variante Homotrimer, die jedoch im Vergleich mit der Transmembranform eine wesentlich geringere zytotoxische Wirkung entfalten.

Die Apoptoseauslösung durch CD95 wird entsprechend den Vorgängen bei anderen „Todesrezeptoren“ durch die Bindung des trimeren Liganden initiiert, in deren Folge es auch bei den Rezeptoren zu einer Trimerbildung und damit zur Ausbildung des DISC (death inducing signaling complex) kommt. Dieser in Abb. 1 dargestellte Vorgang geht mit einer Zusammenlagerung der 80 Aminosäuren umfassenden zytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren, den Todesdomänen einher, denen hierdurch eine Interaktion mit dem Adaptorproteinen FADD (Fas-associated death domain protein) ermöglicht wird. Über eine zweite Todesdomäne treten diese wiederum mit einer inaktiven Form des Proteins Caspase 8, der Procaspase 8, in Wechselwirkung. Die Bindung bewirkt die Aktivierung der Caspase 8 und stößt somit eine nachgeschaltete Kaskade mit autoproteolytischer Prozessierung von Caspasen an. Letztendlich gelangt eine caspaseaktivierte DNase in den Zellkern und spaltet DNA in Fragmente, die für apoptotische Zellen charakteristisch sind.

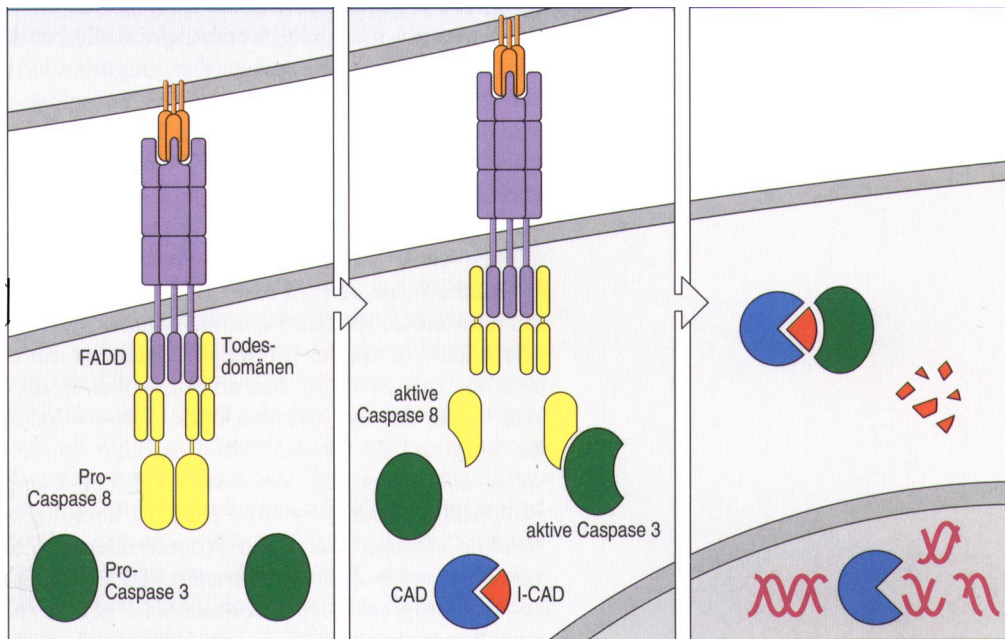


Abb. 1:
Apoptoseauslösung durch Interaktion des Fas-Liganden mit dem CD95-Rezeptor

Bei Bindung des Liganden FasL erfolgt die Trimerisierung von Fas und damit eine Zusammenlagerung der zyttoplasmatischen Todesdomänen, wodurch deren Interaktion mit den Adaptorproteinen FADD ermöglicht wird. Über eine zweite Todesdomäne wird die Aktivierung der Caspase 8 und die Auslösung einer nachgeschalteten Caspasekaskade initiiert. Schließlich erfolgt die Abspaltung des Hemmstoffes (I-CAD) von CAD, sodaß dieses freigesetzt wird, in den Zellkern gelangt und DNA in die für Apoptose charakteristische Fragmente von 200 bp spaltet (aus Janeway et al., 2002).

Die zentrale Rolle der Caspase 8 bei der Apoptoseauslösung wurde von Fulda et al., 2001 bei der Untersuchung verschiedener Tumorzellen bestätigt. Die aufgrund von Hypermethylierung des Caspase 8-Gens verminderte Expression konnte durch Behandlung mit einer demethylierenden Substanz – einem Inhibitor der Methyltransferase (5-Aza-2'-deoxycytidin) - normalisiert werden, sodaß die Sensitivität der Zellen für „Todesrezeptor“- und ebenfalls für medikamenteninduzierte Apoptose wiedererlangt werden konnte.

Zusätzlich zu der im Vordergrund stehenden Funktion der Initiierung des zur Apoptose führenden Signalweges wurde von Siegel et al., 2000 die Transduktion von proliferativen Signalen in T-Zellen beschrieben.

Im Rahmen der Karzinogenese hat der Verlust der CD95-Funktion einen dualen Effekt. Fas-defiziente Tumorzellen sind einerseits in Lage, der Elimination durch das Immunsystem zu entgehen. Desweiteren wird bei Abwesenheit eines funktionellen CD95-Rezeptors eine aberrante Hochregulation der Expression von CD95L beobachtet, die in Tumorzellen häufig anzutreffen ist (Müschen et al., 2002).

1.5 **KRAS-Mutationen**

Mutationen im Onkogen *Ras* sind in 30 % aller Tumoren nachweisbar und stellen frühe Ereignisse in der Karzinogenese dar (Peli et al., 1999). Bei der Entstehung von Karzinomen in gastrointestinalem Gewebe sind Veränderungen in diesem Gen noch häufiger nachweisbar. Berger et al., 2003 fanden in 59 % der fortgeschrittenen Kolonpolypen *KRAS*-Mutationen.

Bei der Untersuchung der *KRAS*-Mutationen innerhalb des Exons 1 von sechs mikrosatelliteninstabilen und elf mikrosatellitenstabilen kolorektalen Zelllinien ergab die Sequenzierung den Nachweis von Mutationen in allen Tumoren. Hierbei war in dreizehn Fällen das Kodon 12 und in vier Fällen das Kodon 13 betroffen (Gayet et al., 2001).

1.6 **Klinische Bedeutung des Kolonkarzinoms und diagnostische Möglichkeiten im Rahmen molekulargenetischer Verfahren**

Kolorektale Tumoren gehören in den westlichen Industrienationen neben Bronchial- und Mammakarzinomen zu den häufigsten Tumoren, wobei Inzidenz und Mortalität bei Frauen und Männern gleichermaßen ab dem 50. Lebensjahr ansteigen. Bei Personen, die von einer Region niedriger in ein Gebiet hoher Inzidenz kolorektaler Karzinome übersiedeln, wurde ebenfalls ein Anstieg der Neuerkrankungsrate festgestellt. Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung von Umwelteinflüssen auf die Krankheitsentstehung.

Darüber hinaus sind eine Reihe genetischer Faktoren für die Karzinogenese im Bereich des Gastrointestinaltrakts bekannt. Der erfolgreiche Nachweis Kolonkarzinom-spezifischer DNA-Mutationen in den Faeces (Ahlquist und Shuber, 2002; Traverso et al., 2002) gibt begründete Hoffnung auf die Entwicklung von Screening-Methoden auf molekularer Basis, die als Ergänzung der bisher angewendeten Testverfahren auf okkultes Blut im Stuhl und die endoskopische Untersuchung zur Früherkennung von Kolonkarzinomen dienen könnten. Im Falle eines bereits diagnostizierten kolorektalen Karzinoms werden für die Entscheidung gegen oder für eine adjuvante Therapie prognostische Faktoren benötigt, deren Aussagekraft über diejenige der TNM-Klassifikation hinausgehen (Markowitz et al., 2002). Positive prognostische Faktoren stellen beispielsweise das Auftreten einer Mikrosatelliteninstabilität und TGF- β -Rezeptor-Mutationen dar (Watanabe et al., 2001), wohingegen Allelverluste auf den Chromosomen 8p und 18q mit einer negativen Prognose korreliert sind (Zhou et al., 2002).

Unterteilt werden die Kolonkarzinome in sporadische und hereditäre Formen.

1.6.1 Sporadische und hereditäre Formen des Kolonkarzinoms

Bei 10 – 15 % der sporadischen Kolonkarzinome ist eine epigenetische Inaktivierung des hMLH-Gens nachweisbar (Boland und Goel, 2003). Markowitz et al., 2000 sowie Miyakura et al., 2003 zufolge spielt die biallelische extensive Methylierung des *hMLH1*-Promotors bei der Inaktivierung von *hMLH1* in sporadischen mikrosatelliteninstabilen kolorektalen Karzinomen eine signifikante Rolle. Der letztgenannten Arbeitsgruppe gelang es, einen Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Methylierung des hMLH1-Gens in sporadischen Kolonkarzinomen und mehreren weiteren Parametern aufzudecken. 23 % der unmethylierten Tumoren (11/48), aber 71 % der vollständig methylierten Tumoren (10/14) stammten von Frauen. Darüber hinaus ließ sich eine Korrelation mit dem Alter erkennen: so war das mittlere Alter der Erstdiagnose signifikant höher bei vollständiger Methylierung ($75,4 \pm 8,4$ Jahre) als im Falle partiell ($63,9 \pm 10,7$ Jahre) oder unmethylierter DNA ($61,0 \pm 12,0$ Jahre). Überdies wurde in dieser Untersuchung vollständige Methylierung häufiger bei proximaler Lokalisation, geringem Differenzierungsgrad und muzinösen Adenokarzinomen festgestellt.

1.6.2 HNPCC (hereditäres nicht-polypöses Colonicarcinom)

Bei den hereditären Kolonkarzinomen werden polypöse von nicht-polypösen Formen unterschieden. Während erstere zumeist auf Veränderungen im APC-Gen zurückzuführen sind, stellen die genetische Basis der hereditären nicht-polypösen Kolonkarzinome Mutationen von Komponenten des Mismatch-Reparatursystems dar (Kinzler und Vogelstein 1996). Bei etwa 90 % der HNPCC, die einen Anteil von 5-10 % an allen kolorektalen Tumoren ausmachen, ist eine Mikrosatelliteninstabilität feststellbar, die zumeist die Mehrzahl der Mikrosatelliten-Loci betrifft. Im Gegensatz dazu sind nur 10 – 15 % der sporadischen Kolonkarzinome mikrosatelliteninstabil (Wheeler et al., 2000). Die Häufigkeit von APC- und KRAS-Mutationen in HNPCC weicht von derjenigen in sporadischen Kolonkarzinomen kaum ab.

Als HNPCC-Suszeptibilitäts-Locus konnte neben Chromosom 2p16 auch 3p21 festgelegt werden. Über 90 % der klassischen HNPCC haben ihren Ursprung in Mutationen von *hMSH2* und *hMLH1*, die beide Bestandteile des MMR-Komplexes darstellen. Häufig besteht eine Kombination mit der Inaktivierung eines weiteren MMR-Allels, in deren Folge es zur Bildung von „hotspots“ für Mutationen innerhalb von hypopolymere Sequenzwieder-

holungen im Bereich der kodierenden Regionen von Tumorsuppressorgenen kommt (Markowitz et al., 2002).

Neben einer erhöhten Inzidenz für Magen- und Endometriumkarzinome besteht für Träger dieser autosomal dominanten Mutationen ein Risiko von 80 % zu Lebenszeit an einem Kolontumor zu erkranken, der am häufigsten im endoskopisch schlecht zugänglichen aszendierenden Bereich lokalisiert ist (Markowitz et al., 2002). Diese zumeist im jüngeren Lebensalter auftretende Tumorerkrankung wird häufig erst in fortgeschrittenem Stadium diagnostiziert, ist aber trotzdem durch eine im Vergleich zu sporadischen Kolonkarzinomen bessere Prognose gekennzeichnet.

1.7 Zielsetzung

In früheren Studien war die Inaktivierung des DNA-Reparaturgens *hMLH1* infolge einer aberranten DNA-Methylierung als Ursache der Mikrosatelliteninstabilität in sporadischen Kolonkarzinomen beschrieben worden (Kane et al., 1997; Hermann et al., 1998; Veigl et al., 1998). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten mikrosatelliteninstabile Karzinome des Gastrointestinaltrakts aus dem Kollektiv von Herrn Dr. Kopp, Klinikum Großhadern auf die Methylierung des *hMLH1*-Promotors untersucht werden.

Peli et al., 1999 fanden, daß die *Fas*-Expression in mehreren etablierten Säugetier-Epithelzelllinien durch onkogenes *Ras* (*H-Ras*) herunterreguliert wird, wodurch sich eine Resistenz der Zellen für CD95L-induzierte Apoptose entwickelt. In dieser Untersuchung gab es Hinweise darauf, daß *CD95* aufgrund von Methylierung des Promotors inaktiviert sein könnte. Resistenz gegen Fas-induzierte Apoptose wird bei menschlichen Tumoren häufig beobachtet. Daher wurde im zweiten Teil der Arbeit untersucht, ob der *CD95*-Promotor in Tumorproben mit *Ras*-Mutationen (*KRAS2*-Mutation in Kodon 12) methyliert ist.

2 Material

2.1 Humane Zellen

2.1.1 Periphere mononukleäre Blutzellen

Sämtliche Blutproben, aus denen DNA isoliert wurde, stammten von gesunden, nicht verwandten Spendern aus den Blutbanken in München und Ulm. Teilweise handelte es sich dabei um Vollblutproben. Desweiteren wurden aus der Blutbank Ulm Leukozytenkonzentrate bezogen, die bei der Herstellung von Blutkonserven als Abfallprodukt anfallen.

2.1.2 Humane Zelllinien

Zelllinie		Herkunft
DLD1	kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie	ATCC, CCL-221
HCT116	kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie	ATCC, CCL-247
Hela	Zervixadenokarzinom-Zelllinie	ATCC, CCL-2.1
K-562	chronisch myeloische Leukämie-Zelllinie HLA-Klasse-I negativ	ATCC, CCL-243
SW48	kolorektale Adenokarzinom-Zelllinie	ATCC, CCL-231
SW620	Lymphknotenmetastase der kolorektalen Adenokarzinom-Zelllinie SW480, Duke's Stadium Typ C	NCI, Bethesda USA

2.2 Proben von Kolonkarzinomen

Die Tumorproben stammen ausnahmslos von Herrn Dr. Kopp, Klinikum Großhadern.

2.2.1 Mikrosatelliteninstabile Kolonkarzinomproben

In einer früheren Arbeit, die in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Weiß durchgeführt wurde, erfolgte die Untersuchung der Kolonkarzinomproben auf Mikrosatelliteninstabilität. Für die Bestimmung des Methylierungsstatus des Promotors von *hMLH1* wurden hieraus neun mikrosatelliteninstabile Proben verwendet.

2.2.2 Ras-mutierte Kolonkarzinomproben

Von den im Labor vorhandenen Kolonkarzinomproben wurden für Kodon 12 mutierte *KRAS2*-positive Proben verwendet, um zu untersuchen, ob das Abschalten der *CD95*-Expression in Karzinomen auf Methylierung des Gens durch onkogenes *Ras* zurückzuführen ist.

2.3 Oligonukleotide

2.3.1 Oligonukleotide zur Charakterisierung von *hMLH1*

Name	Sequenz (5'→3')	T _m
hMLH1-A	GACAGCGATCTCTAACGCGC	65,0°C
hMLH1-B	GTGGGTTGCTGGGTCTCTTCG	65,0°C
hMLH1-uA	AGAGTGGATAGTGATTTTTAATGT	55,0°C
hMLH1-uB	ACTCTATAAATTACTAAATCTCTTCA	55,0°C
hMLH1-mA	GATAGCGATTTTTAACGC	52,0°C
hMLH1-mB	TCTATAAATTACTAAATCTCTTCG	52,0°C
hMLH1-uA-cy5	AGAGTGGATAGTGATTTTTAATGT	55,0°C
hMLH1-mA-cy5	GATAGCGATTTTTAACGC	52,0°C
SNRPN-Mf	TAAATAAGTACGTTTGCGCGGTC	62,0°C
SNRPN-Mr	AACCTTACCCGCTCCATCGCG	62,0°C

2.3.2 Oligonukleotide zur Charakterisierung von CD95

Name	Sequenz (5'→3')	T _m
CD95-143461f	TCCCTTTTCAGAGCCCTATGG	62,0°C
CD95-144450f	GCCTTGATGCGAAGTGCTGAC	62,0°C
CD95-144471r	GTCAGCACTTCGCATCAAGGC	62,0°C
CD95-144961r	TCAGGCAGCGACTTACAGTC	62,0°C

Sämtliche Oligonukleotide wurden von der Firma MWG synthetisiert.

Der errechnete T_m-Wert wurde als Ausgangspunkt zum Austesten der Anlagerungstemperatur (T_A) verwendet. Die jeweiligen, in der Arbeit verwendeten T_A sind in der letzten Spalte aufgeführt.

2.4 Enzyme

2.4.1 Enzyme allgemein

Enzym	Hersteller
Proteinase K	Roche Diagnostic, Mannheim
Taq-Polymerase	Agrobiogen, Hilgertshausen

2.4.2 Restriktionsenzyme

Die 10 x Reaktionspuffer zu den in der folgenden Tabelle aufgeführten Restriktionsenzymen stammen von der Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim.

Restriktionsenzym	10 x Reaktionspuffer	Temperatur-optimum	Schnittstelle
<i>Bss</i> H II	B	50°C	GCGCGC
<i>Hind</i> III	B	37°C	AAGCTT
<i>Mlu</i> I	H	37°C	ACGCGT
<i>Pst</i> I	H	37°C	CTGCAG
<i>Sma</i> I	A	25°C	CCCGGG
<i>Taq</i> I	B	65°C	TCGA

2.5 Chemikalien allgemein

Substanz	Hersteller
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Certified™ Molecular Biology Agarose	Bio-Rad Laboratories, Hercules California
Chloroform	Merck, Darmstadt
DMSO	Merck, Darmstadt
Hydrochinon	Merck, Darmstadt
Natrium-Bisulfit	Sigma, Deisenhofen

2.6 Pufferlösungen und Medien

Alle Lösungen für biochemische Analysen und für die Gewebekultur wurden, wenn nicht anders angegeben, mit Wasser, das über eine MilliQ-Apparatur gereinigt worden war, angesetzt und anschließend autoklaviert, oder aus autoklavierten Stammlösungen hergestellt. Für Lösungen, die in großen Volumina benötigt werden, wurde deionisiertes Wasser verwendet.

2.6.1 Lösungen und Medien für die Kultur von Zellen

Lösung / Medium	Zusammensetzung
Einfriermedium	10 % (v/v) DMSO 20 % (v/v) FCS 70 % (v/v) RPMI 1640
Mc Coy's	90 % Mc Coy's 10 % FCS 1 mM Na-Pyruvat 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin
RPMI 1640 Kulturmedium	90 % RPMI 1640 10 % FCS 1 mM Na-Pyruvat 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin
Trypsin-EDTA-Lösung	0,05 % Trypsin 0,02 % EDTA in PBS
Trypanblau	0,5 % in PBS

2.6.2 Lösungen für Aufbereitung von Leukozytenkonzentraten und die DNA-Isolierung

Lösung	Zusammensetzung
Erythrozyten-Lysepuffer	155 mM NH ₄ Cl 10 mM KHCO ₃ 1 mM EDTA
Kern-Lysepuffer	10 mM Tris/HCl pH 8,0 400 mM NaCl 1 mM EDTA
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	25 Teile Phenol 24 Teile Chloroform 1 Teil Isoamylalkohol

2.6.3 Lösungen für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Lösung	Zusammensetzung	Hersteller
Betain	5 M	Sigma, Deisenhofen
dNTP	je 2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP	Promega, Mannheim
MgCl ₂	25 mM	Promega, Mannheim
10 x PCR-Puffer	500 mM KCl 100 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C)	PeqLab, Erlangen

2.6.4 Substanzen für die Agarose-Gelelektrophorese

Lösung	Zusammensetzung
6 x Auftragspuffer	10 mM Tris/HCl, pH 8 2 mM EDTA 20 % (v/v) Ficoll 400 0,25 % (w/v) Orange G
10 x TBE	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA
10 x TPE (Loening-Puffer)	360 mM Tris 300 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 10 mM EDTA

Neben den genannten Lösungen wurden folgende Substanzen eingesetzt:

Substanz	Hersteller
Ethidiumbromid	Sigma, St. Louis, USA
100 bp-Leiter	PeqLab, Erlangen
1 kb-Molekulargewichtsstandard	Invitrogen, Karlsruhe
1 kb ⁺ -Molekulargewichtsstandard	Invitrogen, Karlsruhe

2.6.5 Substanzen für die PAA-Gelelektrophorese

Lösung	Hersteller
Acrylamid-Bisacrylamid (19:1)	ICN Biomedicals GmbH, Eschwege
ALFexpress™ Sizer™ 50	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
ALFexpress™ Sizer™ 200	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Bind-Silane	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Merck AG, Darmstadt
Urea	Roth, Karlsruhe

2.6.6 Reagenzien zur Durchführung der Southernblot-Analyse

Lösung	Zusammensetzung
Denaturierungslösung für Southernblot	0,5 N NaOH 1,5 M NaCl
Transferpuffer für Southernblot	0,4 NaOH

2.6.7 Puffer und Lösungen für die Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden

Lösung / Substanz	Zusammensetzung
Blocking-Reagenz (10x)	10 % (w/v) Blockingpulver in 0,1 M Maleinsäure-Puffer (pH 8) Aufbewahrung in Aliquots bei -20°C
Blockpuffer	0,5 % (v/v) Blocking-Reagenz in Waschpuffer
CDP*	24 mM
Hybridisierungs-Waschpuffer (pH 7,2)	20 mM Na_2HPO_4 , pH 7,2 1 mM EDTA 1 % (w/v) SDS
Konjugatpuffer	\square -DIG-AP conjugate 1: 15.000 in Blockpuffer
Maleinsäurepuffer (pH 8)	0,1 M Maleinsäure 0,15 M NaCl
Prähybridisierungslösung (pH 7,2)	0,25 M Na_2HPO_4 , pH 7,2 1 mM EDTA 20 % (w/v) SDS 0,5 % (w/v) Blocking-Reagenz
Substratpuffer IV	0,1 M Tris/HCl, pH 9,5 0,05 M MgCl_2 0,1 M NaCl
Substratlösung	1 % CDP* in Substratpuffer
Waschpuffer	0,1 M Maleinsäure 3 M NaCl 0,3 % Tween

2.6.8 Allgemein verwendete Lösungen und Medien

Lösung	Zusammensetzung
PBS	139,9 mM NaCl 2,7 mM KCl 10,1 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O 1,8 mM KH ₂ PO ₄ mit HCl auf pH 7,4 eingestellt
20 x SSC (pH 7,0)	3 M NaCl 300 mM Citrat
10 x TBE-Puffer	90 mM Tris 90 mM Borat 20 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl 0,2 mM EDTA, pH 8

2.7 Sonstige Materialien/Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Hybond N+	Amersham Pharmacia Biotech GmbH; Braunschweig
Kryoröhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Medical X-Ray Screen Film green sensitive	HS Medizintechnik, Gauting
Polaroidbilder	Fotohaus Gilching
TC-25, 75, 189	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen

2.8 Kit

Kit	Hersteller
NucleoTrap	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren

2.9 Geräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Sequenzierapparat	ALFexpress™ DNA-Sequencer	Amersham Pharmacia Biotech GmbH, Freiburg, Deutschland
Spektralphotometer	BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Thermocycler	GeneAmp9600 Omn-E Hybaid Techne Progene Mastercycler	Perkin Elmer, USA MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland Eppendorf AG, Hamburg
Transilluminator	UV-Transilluminator (Wellenlänge 312 nm)	Bachofer, Reutlingen, Deutschland
Zentrifugen	Biofuge fresco Megafuge 1.0 Megafuge 1.0R Suprafuge 20	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland

3 Methoden

3.1 Kultur von humanen Zellen

3.1.1 Allgemeines

Um Kontaminationen bei der Kultur von Zellen zu vermeiden, wurden sämtliche Arbeiten an der Sterilbank durchgeführt. Die Anzucht der Zellen erfolgte in Kulturflaschen mit einer Größe von 25, 75 oder 189 cm² bei 37° C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einer CO₂-Konzentration von 5 %. Das verwendete Kulturmedium war bei den meisten Zelllinien RPMI 1640-Medium mit 10 % FCS, 1 mM Natriumpyruvat, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin. Lediglich zur Anzucht der Zelllinie HCT116 wurde Mc Coy's-Medium mit den oben angegebenen Zusätzen verwendet. Durch den im Kulturmedium vorhandenen pH-Indikator Phenolrot wird ein erforderlicher Mediumswechsel angezeigt, da ein Farbumschlag ins gelbliche eine zunehmende Ansäuerung durch Stoffwechselprodukte bedeutet.

3.1.2 Auftauen von tiefgefrorenen Zellen

Zellen, die bei –80° C oder in flüssigem Stickstoff gelagert waren, wurden nach kurzem Antauen im Wasserbad bei 37° C unverzüglich in Medium resuspendiert, um das im Einfriermedium enthaltene zelltoxische DMSO zu verdünnen. Dieser Zusatzstoff wurde vollständig entfernt, indem die Zellen zweimal hintereinander nach jeweils 10-minütiger Zentrifugation bei 1100 rpm (Heraeus 1R) mit frischem Medium versetzt wurden.

3.1.3 Kultur von adhärennten Zellen

Adhärennt wachsende Zellen wurden vom Boden abgelöst und neu ausgesät, wenn sie in etwa zu 90 % konfluent waren. Hierzu wurden die Zellen nach dem Absaugen des Mediums mit PBS gewaschen, um Serumproteine und abgestorbene Zellen zu entfernen. Anschließend wurde soviel Trypsin-EDTA-Lösung zugegeben, daß die Zellen gerade damit bedeckt waren. Die Zellen konnten anschließend durch seitliches Klopfen an die Kulturflasche von deren Boden abgelöst werden. Bei manchen Zellen genügte Abklopfen allein, um sie zu suspendieren. Nach Zugabe von 1 ml der Trypsin-EDTA-Lösung bei der TC 25- bzw. 1-3 ml für die TC 75- und TC 189-Kulturflasche, wurde für 1-3 min bei 37° C im Brutschrank inkubiert.

Durch die Protease Trypsin erfolgt bei deren Temperaturoptimum der Abbau von Oberflächenmolekülen. Die für die Adhärenz notwendigen Kalzium- und Magnesiumionen werden durch EDTA gebunden und stehen somit nicht zur Verfügung. Die vollständige Ablösung der Zellen wurde unter dem Mikroskop überprüft. Zugabe von Medium beendet einerseits die Trypsinaktivität durch die darin enthaltenen Serumproteine, andererseits wird hierdurch das zytotoxische EDTA verdünnt. Die suspendierten Zellen wurden gezählt und anschließend erneut ausgesät oder eingefroren.

3.1.4 Ermittlung der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer

Bei der Neubauer-Zählkammer handelt es sich um einen speziellen Objektträger, dessen Oberfläche in vier Großquadrate unterteilt ist, von denen jedes abermals aus 16 kleinen Quadraten besteht. Abgedeckt wird die Zählkammer durch ein leicht angefeuchtetes Deckglas, wodurch im Inneren der Zählkammer ein Hohlraum mit einer Höhe von 0,1 mm entsteht. An den aufliegenden Rändern des Deckglases bilden sich typischerweise Newton-Ringe, die den exakten Sitz anzeigen. Sowohl die Kammer als auch das Deckglas waren zuvor mit 70 % Ethanol gereinigt worden. Um die Zellzahl in der Zählkammer bestimmen zu können, darf eine gewisse Zelldichte nicht überschritten werden. Aus diesem Grund wurden zu den nach dem Auftauen zweifach mit PBS gewaschenen Zellen nach der letzten Zentrifugation je 25 ml PBS gegeben. Es erfolgte eine weitere Verdünnung im Verhältnis 1:1 oder 1:3 durch Zugabe von Trypanblau. Dieser Stoff wird von lebenden Zellen nicht aufgenommen, wohingegen er tote Zellen stark blau anfärbt.

Die verdünnte Zellsuspension wird in den Zwischenraum pipettiert, wobei Kapillarkräfte die Suspension unter das Deckglas saugen. Die Anzahl der lebenden Zellen in allen vier Großquadraten wird ausgezählt. Zellen, die auf zwei zueinander senkrecht stehenden Randlinien zu liegen kommen, werden berücksichtigt, während diejenigen auf den beiden anderen begrenzenden Kanten in die Zählung nicht mit eingehen. Über einem Großquadrat (Fläche 1 mm^2 , Abstand Zählkammer-Deckglas $0,1 \text{ mm}$) befindet sich ein Volumen von $0,1 \mu\text{l}$. Zur Umrechnung auf die Zellzahl pro Milliliter muß daher der Faktor 10 000 berücksichtigt werden. Die Verdünnung mit Trypanblau muß natürlich ebenfalls in die Rechnung mit einbezogen werden. Nach folgender Formel wird also die Zellzahl ermittelt:

$$\text{Zellzahl/ml} = \text{Mittelwert der vier Großquadrate} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

3.1.5 Einfrieren von Zellsedimenten

Zellsuspensionen wurden bei 1100 rpm (Heraeus 1R) für 10 min abzentrifugiert und das in PBS resuspendierte Zellsediment in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation in der Mikroliterzentrifuge bei 2000 rpm für 5 min wurde der Überstand verworfen und das erhaltene Sediment bei einer Temperatur von -80°C eingefroren.

3.1.6 Vitales Einfrieren von Zellen

Sollten Zellen bei -80°C oder im Stickstoff-Tank gelagert werden, wurde Einfriermedium verwendet, das DMSO enthält. Eine mögliche Schädigung der Zellmembran durch die Bildung von Eiskristallen kann hierdurch verhindert werden. Wegen der Toxizität von DMSO muß der Vorgang der Einfrierens und Auftauens möglichst zügig erfolgen.

Nach dem Ablösen von adhärennten Zellen und der Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen bei 1100 rpm (Heraeus 1R) abzentrifugiert und das Zellsediment in Einfriermedium aufgenommen. Die Zielkonzentration lag hierbei zwischen 2×10^6 und 5×10^6 Zellen/ml für adhärennte Zellen. Ein Kryoröhrchen wurde mit jeweils 1 ml der Zellsuspension befüllt und umgehend bei -80°C eingefroren.

3.2 DNA-Isolierung nach der Aussalzmethode

3.2.1 Vollblutproben

In 5-10 ml Heparin- oder EDTA-Blut erfolgte die Zellseparation durch Zentrifugation bei 2000 rpm für 10 min (Heraeus 1R). Im Sediment befanden sich die Erythrozyten, den Überstand bildete das Blutplasma. Zwischen diesen beiden mengenmäßig überwiegenden Anteilen wurde die, bei Blut von gesunden Personen sehr dünne, weiß aussehende Interphase erkennbar. Hierin befinden sich die mononukleären Leukozyten. Vorsichtig wurde diese Schicht entnommen und möglichst ohne Verunreinigung in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die noch vorhandenen Erythrozyten wurden durch das Hinzufügen von einem Volumen hypotonischem Erythrozyten-Lysepuffer und anschließendes Mischen für einige Minuten aufgelöst. Die Zellsuspension färbte sich durch das freigesetzte Hämoglobin rötlich und wurde klar.

Die Reinigung der kernhaltigen Zellen erfolgte durch Zugabe von PBS, Mischen, anschließender Zentrifugation bei 2000 rpm (Heraeus 1R) und Dekantierung des Überstandes. Pro 5×10^7 Zellen wurden 3 ml Kern-Lysepuffer zugegeben und das Zellsediment resuspendiert. Die Auflösung der Kernmembran und Freisetzung der DNA wurde durch Hinzufügen von 100 μ l 20 % SDS und sorgfältiges Mischen erreicht. Das Spalten der Eiweißmoleküle durch die anschließend beigefügten 150 μ l Proteinase K in einer Konzentration von 4 mg/ml erforderte eine Inkubation von mindestens zwei Stunden bei 37° C. Durch Zugabe von 1 ml gesättigter 5 M NaCl und intensivem Mischen auf dem Vortexschüttler wurde ein Scheren der DNA erreicht und die Proteinabbauprodukte ausgefällt. Dies war an einer Verflüssigung der zuvor zähen Lösung erkennbar.

Eine mindestens 30-minütige Lagerung auf Eis verbesserte das Ausfallen der Proteinfragmente und eine saubere Abtrennung mittels der anschließenden Zentrifugation bei 3000 rpm (Heraeus 1R) für 15 min. Der die Nukleinsäuren enthaltende Überstand war nun eiweißarm und konnte in ein 15-ml-Polypropylenzentrifugenröhrchen mit Spitzboden überführt und zur weiteren Säuberung bei 3000 rpm nochmals zentrifugiert werden. Nach erneutem Transferieren des Überstandes erfolgte die Zugabe von 0,6 Volumen Isopropanol; bei langsamem Schwenken fiel die DNA fadenförmig aus. Diese wurde entweder abzentrifugiert oder mittels Pasteurpipette entnommen und zweimal in 70 %igem Ethanol gewaschen. Hierdurch konnten niedermolekulare Bestandteile entfernt werden. Nach sorgfältigem Ablaufen lassen der Alkoholreste, wurde die DNA in 300 μ l H₂O gelöst. Die Aufbewahrung der DNA in gelöster Form erfolgte bei -20° C .

3.2.2 Leukozytenkonzentrate

Um die Ausbeute an DNA von Normalpersonen zu vergrößern, damit für alle DNA-Analysen die selben DNA-Präparate verwendet werden können, erwies es sich als günstig, Leukozytenkonzentrate zu verwenden.

Bei der Aufbereitung von Spenderblut zur Herstellung von Blutkonserven und Erythrozytenkonzentraten ist zur Vermeidung von Unverträglichkeitsreaktionen beim Empfänger eine möglichst vollständige Entfernung der Leukozyten erwünscht. Die ausgesonderten weißen Blutzellen werden in elastischen Kunststoffbeuteln aufgefangen, die als „Buffy Coats“ (engl. buff lederfarben; coat Überzug; i.e.S. Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten zwischen Plasma und sedimentierten Erythrozyten) bezeichnet werden. Diese in Blutbanken als Abfallprodukt entstehenden Leukozytenkonzentrate eignen sich hervorragend zur Gewinnung von DNA.

Für diese Arbeit wurde Kontroll-DNA von Normalpersonen aus je zwei „Buffy Coats“ von weiblichen und männlichen gesunden, nicht verwandten Spendern der Blutbank Ulm isoliert. Allerdings war wegen der sehr hohen Zellzahl ein etwas aufwendigeres Vorgehen bei der Isolierung von DNA aus Leukozytenkonzentraten notwendig als bei Vollblutproben. Die Arbeitsschritte entsprachen denen der DNA-Isolierung bei Vollblutproben bis zur Zugabe von Kern-Lysepuffer und 20 % SDS. Aufgrund der hohen DNA-Konzentration erfolgte kein vollständiges Scheren durch kräftiges Mischen vor Hinzufügen von 5 M NaCl, was am Ausbleiben der Verflüssigung der vorher zähen Lösung erkennbar war. Auch eine vermehrte Zugabe von Salzlösung verbesserte das Ausfällen und die Sedimentation der Proteinspaltprodukte nicht. Die Zentrifugation bei 3000 rpm (Heraeus 1R) erbrachte keine Auftrennung der hochviskösen Suspension; es blieb eine homogene rot-braune Flüssigkeit erhalten. Die und Reinigung der DNA erfolgte daher mittels Phenolextraktion.

3.3 Präparation von Nukleinsäuren

3.3.1 Reinigung durch Phenolextraktion

Organische Verunreinigungen wäßriger Nukleinsäurelösungen lassen sich durch Extraktion mit einem Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) entfernen. Eine isovolämische Menge der organischen Lösung wurde zu der wäßrigen, die DNA enthaltende Lösung gegeben und vermischt. Hierbei ist ein Einatmen der Dämpfe strikt zu vermeiden, da die lipophile Substanz Chloroform toxisch für das zentrale Nervensystem ist. Auch Kontakt mit der Haut muß wegen der möglichen Denaturierung der Proteine und daraus resultierender Gewebeschädigung unbedingt ausgeschlossen werden.

Nach Zentrifugation bei 2500 rpm (Heraeus 1R) für 5 min verblieb die DNA im Überstand, wohingegen die durch Phenol denaturierten Proteine in der Interphase ausfielen. Um Verunreinigungen in der wäßrigen Phase zu eliminieren, wurde der klare gelbliche Überstand möglichst verschmutzungsfrei in ein neues Gefäß überführt, in das etwa die gleiche Menge Chloroform vorgelegt worden war. Nach kräftigem Schütteln wurden die Phasen durch erneute Zentrifugation getrennt. Bei hohen DNA-Konzentrationen resultierte ein äußerst zähflüssiger Überstand, der nur mühsam ohne Schlieren der darunter liegenden Schicht abgenommen werden konnte. Um diesen Vorgang im Falle eines hochviskösen Überstandes (vor allem bei DNA-Isolierung aus Buffy Coats und daraus resultierender immenser DNA-Menge) möglichst ohne Verunreinigung durchführen zu können, wurde die phenolgereinigte Lösung durch Zugabe von Kern-Lysepuffer verdünnt. Die im Überstand gelöste DNA wurde mittels 0,6 Vol. Isopropanol und gründlichem Mischen zum Ausfällen gebracht. Die DNA

wurde entweder durch Zentrifugation oder durch Herausziehen mit einem sterilen Glashäkchen separiert, zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen und nach dem Lufttrocknen in TE-Puffer gelöst. Das Lösungsvolumen wurde der Ausgangszellzahl angepaßt. Da auch Southernblot-Analysen mit der genomischen DNA durchgeführt werden sollten, wurde eine Konzentration von ca. 1 mg/ml angestrebt. Die hohen DNA-Konzentrationen machten für das Lösen der DNA ein Schwenken auf einem Laborrad über Nacht erforderlich.

3.3.2 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren durch Messung der optischen Dichte (OD)

Zur Ermittlung der DNA-Konzentration einer Lösung bedient man sich der Extinktionsmessung mittels eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von 260 nm, dem Absorptionsmaximum für Nukleinsäuren. Die Nukleinsäurekonzentration läßt sich mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes errechnen:

$$c = E_{260\text{nm}} / (\epsilon \times d)$$

- c = Nukleinsäurekonzentration
- $E_{260\text{nm}}$ = Extinktion bei 260 nm
- d = Schichtdicke der verwendeten Küvette (hier 1 cm)
- ϵ = Extinktionskoeffizient, für dsDNA: 50 $\mu\text{g/ml/cm}$

Einer optischen Dichte von 1 entsprechen somit bei einer Wellenlänge von 260 nm 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA.

Aufgrund der geringen Eigenabsorption von Quarz bei 260 nm wurden Küvetten aus diesem Material eingesetzt. Um eine genaue OD-Messung durchzuführen, ist es notwendig, einen Meßbereich von 0,02 bis 1,0 einzuhalten. Es wurden Verdünnungen mit Wasser oder TE (hier im Verhältnis 1:100 und 1:200) für die Messung verwendet. Zur Eichung des Photometers wurde das zur Verdünnung der DNA-Suspension verwendete Medium in die Küvette eingefüllt und die dabei resultierende Extinktion als Nullwert verwendet. Die beiden unterschiedlichen Verdünnungen jeder Probe wurden anschließend gegen den Leerwert gemessen. Aus diesen beiden Werten wurde der Mittelwert berechnet.

3.3.3 Enzymatische Spaltung von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Um DNA hydrolytisch an den Phosphodiesterbindungen in Fragmente spezifischer Länge spalten zu können, wendet man Enzyme an, die in Bakterien der Restriktion, also dem Abbau in die Zelle aufgenommener fremder DNA dienen und nennt sie deshalb Restriktionsnukleasen. Die Namen dieser Enzyme setzen sich normalerweise aus dem ersten Buchstaben des Gattungsnamens und anschließend den beiden ersten Buchstaben des Namens der Spezies des Spenderbakteriums zusammen.

Die Typ II-Restriktionsendonukleasen erkennen und spalten jeweils eine spezifische kurze Nukleotidfolge von meistens vier bis sechs Nukleotiden, häufig in Form von Palindromen. Es handelt sich hierbei um kurze Abschnitte, bei denen die Nukleotidfolge rotationssymmetrisch ist.

1 U einer Restriktionsnuklease ist in der Lage, 1 µg DNA in einer Stunde an spezifischer Stelle zu spalten. Die einzelnen Enzyme besitzen eine jeweils optimale Salzkonzentration und Temperatur zur Reaktion. Die Vollständigkeit der Spaltung kann durch Agarose-Gelelektrophorese unter Zusatz von Ethidiumbromid beurteilt werden.

Der Reaktionsansatz mit einem Volumen von 25-40 µl setzte sich zusammen aus 7,5 µg DNA und mindestens 10 U der Restriktionsendonuklease, dem jeweils vom Hersteller empfohlenen Reaktionspuffer, unter Zusatz von 1 % BSA und wurde für mindestens zwei Stunden bei Enzym-spezifischer Temperatur inkubiert. Sollte die DNA im Anschluß daran zusätzlich an anderer Stelle geschnitten werden, so wurde erneut die jeweilige Restriktionsnuklease in oben genannter Konzentration incl. des dazu passenden Reaktionspuffers hinzugefügt. Die Menge des zugegebenen Puffers hierbei wurde auf die Volumendifferenz zwischen erstem und zweitem Ansatz bezogen. Sowohl beim Einzelverdau als auch bei einer nachfolgenden zweiten Restriktion wurde das vorgesehene Endvolumen durch die Zugabe von H₂O erlangt. Die anschließende Inkubation erfolgte bei der für das zweite Enzym spezifischen Temperatur. Der Verdau wurde auf einem Ethidiumbromid-haltigen Agarosegel aufgetrennt. Das daraus resultierende Restriktionsmuster wurde unter UV-Licht sichtbar gemacht und mit einer Sofortbild-Kamera festgehalten.

3.4 Enzymatische Amplifikation spezifischer DNA-Bereiche

3.4.1 Prinzip der Standard-Polymerase-Kettenreaktion

Um einen definierten Bereich innerhalb einer DNA nachweisen zu können, muß davon eine genügend hohe Anzahl an Kopien vorliegen. Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ermöglicht die erforderliche Amplifikation von DNA-Abschnitten bekannter Sequenz in vitro. Festgelegt wird der zu amplifizierende DNA-Abschnitt durch zwei dessen 3'- bzw. 5'-Ende flankierende Oligonukleotide.

Die am häufigsten durchgeführte Polymerase-Kettenreaktion erfolgt unter Verwendung von Primern, die zu den beiden entgegengesetzten Strängen komplementär sind. Es ist allerdings auch möglich, Oligonukleotide mit Komplementarität nur zu einem Strang zu wählen, der in diesem Fall als einziger amplifiziert wird. Dies war für die Amplifikation bisulfid-modifizierter DNA nötig. Die 3'-Enden der Primer sind in beiden Fällen nach Hybridisierung einander zugewandt.

Als erstes wird eine Dissoziation der komplementären DNA-Stränge durch Erhitzen herbeigeführt, um die Anlagerung von jeweils einem Oligonukleotid an jeden der beiden Einzelstränge am Endbereich des zu untersuchenden Abschnittes zu ermöglichen. Dies erfordert wiederum eine spezifische Temperatur. Die angelagerten Oligonukleotide ermöglichen den Beginn der Neusynthese des jeweils komplementären Stranges. Mit Hilfe der Taq-Polymerase können bei deren Temperaturoptimum nun nacheinander die passenden Deoxynukleotide angebaut werden.

Ein solcher Zyklus führt also zur Verdopplung der zu untersuchenden DNA. Bei einer Standard-PCR werden 20 bis 40 Zyklen durchgeführt, sodaß dieser DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt und damit dem Nachweis zugänglich gemacht wird.

3.4.2 Denaturierungszeit und -temperatur

Bei lang andauerndem starken Erhitzen des Reaktionsansatzes vermindert sich auch die enzymatische Wirkung der Taq-Polymerase, die eigentlich als hitzestabil gilt. Deshalb wurde die Temperatur von 96° C und eine Denaturierungszeit von 10 min nicht überschritten.

3.4.3 Wahl geeigneter Oligonukleotide und Bestimmung der Annealing-Temperatur

Die Sequenzen, zu denen die Primer komplementär gewählt werden, sollten mindestens 16 Nukleotide lang sein, um eine spezifische Basenpaarung gewährleisten zu können. Desweiteren müssen sie sich durch eine hohe Variabilität der Basen auszeichnen. Repetitive und im Genom häufig vorkommende Sequenzen sind zu vermeiden. Vorteilhaft ist es, wenn sich beide Abschnitte in der Zahl der vorkommenden A und T bzw. C und G möglichst weitgehend entsprechen. Dies ist erforderlich für eine ähnliche Annealing-(Hybridisierungs-)temperatur, die sich folgendermaßen errechnet:

$$[m (A/T) \times 2^\circ \text{ C} + n (G/C) \times 4^\circ \text{ C}] - 5^\circ \text{ C} = \text{Annealingtemperatur}$$

m: Anzahl der Basen A und T im Oligonukleotid

n: Anzahl der Basen C und G im Oligonukleotid

3.4.4 Extensionszeit und -temperatur

Bei der zu wählenden Extensionstemperatur muß einerseits das Temperaturoptimum der Taq-Polymerase von 74° C, andererseits die hierbei bereits beginnende Denaturierung der DNA berücksichtigt werden. Eine Temperatur von 72° C hat sich als günstig erwiesen. Die Polymerisierungszeit muß auf die Länge des zu amplifizierenden Fragmentes abgestimmt werden, da die Synthese von 1000 Nukleotiden unter Standardbedingungen ungefähr eine Minute in Anspruch nimmt.

3.4.5 Standard-PCR-Ansatz

Das Endvolumen für jede zu amplifizierende Probe war in dieser Arbeit 20 µl. Die DNA wurde in einer Konzentration von 50-100 ng/µl und einem Volumen von 1-2 µl verwendet. Der Ansatz enthielt weiterhin 2 µl 10 x Reaktionspuffer ohne Zusatz von MgCl₂, 2 µl 2 mM dNTP, 1-4 mM MgCl₂ (entsprechend 0,8 / 1,6 / 2,4 / 3,2 µl von 25 mM MgCl₂), abhängig von den verwendeten Oligonukleotiden, 0,5 – 1,0 U Taq-Polymerase und 8 pmol jedes Primers (10,0 pmol/□l: 0,8 µl). Mit H₂O wurde der Ansatz auf 20 µl aufgefüllt. Lediglich bei einigen Polymerase-Kettenreaktionen wurde dem Ansatz wegen des hohen CG-Gehalts des zu amplifizierenden Bereiches 4 µl 5 M Betain zugefügt. Dies ist bei der Beschreibung der jeweiligen Versuchsbedingungen explizit erwähnt.

Diese Einzelkomponenten wurden bei mehreren Reaktionen, die sich nur durch die eingesetzte DNA unterschieden, im sog. „Mastermix“ vereinigt, bevor dieser auf die einzelnen Ansätze aufgeteilt wurde.

Wegen der Anfälligkeit für Kontaminationen wurden sämtliche Pipettierschritte mit Handschuhen durchgeführt. Um evtl. dennoch auftretende Verunreinigungen aufzudecken, wurde als Negativkontrolle eine Probe mitgeführt, in der statt DNA H₂O enthalten war. Außerdem kam als Positivkontrolle auch eine Probe zum Einsatz, die die zu untersuchende Komponente sicher enthielt.

Um eine vorzeitige Aktivierung der Reaktion und damit eine Dimerisierung der Primer zu verhindern, wurde der Ansatz während des Pipettierens auf Eis gestellt.

3.4.6 Standard-PCR-Programm

Nachstehend ist das Standard-PCR-Programm aufgeführt:

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
Anfangsdenaturierung	1	96° C	10 min
Denaturierung	30-40	95° C	30 s
Anlagerung der Primer		T _m	30 s
Elongation		72° C	30 - 180 s
Endextension	1	72° C	10 min

3.4.7 Optimierungsmöglichkeiten der PCR

Ist die zu amplifizierende Sequenz durch eine Reichhaltigkeit an C und G gekennzeichnet, so hat es sich bewährt, dem Standard-Ansatz Betain in einer Endkonzentration von 1 M bzw. 1x zuzusetzen. Um die Bindung der Oligonukleotide an die Einzelstränge spezifischer zu machen, wurde wenn nötig die Annealingtemperatur variiert. Weitere Ursachen für eine unspezifische Amplifikation sind eine nicht optimale MgCl₂-Konzentration, zu viele Zyklen sowie zu hohe Oligonukleotid- und dNTP-Konzentrationen.

3.4.8 Herstellung von Digoxigenin-markierten Sonden

Zum Nachweis eines spezifischen DNA-Fragmentes kann man Sonden einsetzen, bei denen einige Nukleotide durch Digoxigenin markiert sind. Die in dieser Arbeit eingesetzte Methode beruht auf einem Einbau von DIG-dUTP an jedem 20. bis 25. Nukleotid der mittels Polymerase-Kettenreaktion neu synthetisierten DNA. Die durch die Sondenhybridisierung markierte Bande kann später nach Behandlung mit geeigneten Antikörpern und CDP* auf dem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Zum Einsatz kam der Standard-PCR-Ansatz, bei dem 3/10 von dTTP durch DIG-dUTP ersetzt ist. Letztere werden bei der Elongation teilweise anstelle der unmarkierten dTTP eingebaut.

Da die Digoxigenin-Gruppierung der markierten Deoxynukleotide sehr viel Raum einnimmt, kann nur ein kleiner Prozentsatz der neu synthetisierten DNA diese Seitenkette tragen, um sich nicht gegenseitig bei der Antikörperbindung zu behindern. Zum Einbau der markierten Nukleotide durch die Taq-Polymerase ist eine längere Zeitspanne erforderlich, sodaß bei den Standard-PCR-Bedingungen eine Verlängerung der Extensionszeit auf 3 min notwendig war.

3.4.9 PCR-Bedingungen für die verwendeten Oligonukleotide

3.4.9.1 Bestimmung des Methylierungsstatus des *hMLH1*-Promotors

Oligonukleotide *hMLH1*-A und *hMLH1*-B

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
Anfangsdenaturierung	1	96° C	10 min
Denaturierung	40	95° C	30 s
Anlagerung der Primer		65° C	30 s
Elongation		72° C	30 s
Endextension	1	72° C	10 min

Oligonukleotide hMLH1-uA und hMLH1-uB oder hMLH1-uA-cy5 und hMLH1-uB

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
Anfangsdenaturierung	1	96° C	10 min
Denaturierung	40	95° C	30 s
Anlagerung der Primer		55° C	30 s
Elongation		72° C	30 s
Endextension	1	72° C	10 min

Oligonukleotide hMLH1-mA und hMLH1-mB oder hMLH1-mA-cy5 und hMLH1-mB

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
Anfangsdenaturierung	1	96° C	10 min
Denaturierung	40	95° C	30 s
Anlagerung der Primer		52° C	30 s
Elongation		72° C	30 s
Endextension	1	72° C	10 min

Oligonukleotide SNRPN-Mf und SNRPN-Mr

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
Anfangsdenaturierung	1	96° C	10 min
Denaturierung	40	95° C	30 s
Anlagerung der Primer		62° C	30 s
Elongation		72° C	30 s
Endextension	1	72° C	10 min

3.4.9.2 Bestimmung des Methylierungsstatus des CD95-Promotors

Herstellung der Digoxigenin-markierten Sonde unter Einsatz der Oligonukleotide CD95/143461f und CD95/144471r

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
Anfangsdenaturierung	1	96° C	10 min
Denaturierung	40	95° C	30 s
Anlagerung der Primer		62° C	30 s
Elongation		72° C	180 s
Endextension	1	72° C	10 min

Oligonukleotide CD95/143461f und CD95/144471r

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
Anfangsdenaturierung	1	96° C	10 min
Denaturierung	40	95° C	30 s
Anlagerung der Primer		62° C	30 s
Elongation		72° C	60 s
Endextension	1	72° C	10 min

Oligonukleotide CD95/143461f und CD95/144961r

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
Anfangsdenaturierung	1	96° C	10 min
Denaturierung	40	95° C	30 s
Anlagerung der Primer		62° C	30 s
Elongation		72° C	90 s
Endextension	1	72° C	10 min

Oligonukleotide CD95/144450f und CD95/144961r

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
Anfangsdenaturierung	1	96° C	10 min
Denaturierung	30-40	95° C	30 s
Anlagerung der Primer		62° C	30 s
Elongation		72° C	60 s
Endextension	1	72° C	10 min

3.5 Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA

3.5.1 Prinzip der gelelektrophoretischen Auftrennung

Dieses Verfahren dient der Auftrennung unterschiedlich langer DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Aufgrund der negativ geladenen Zucker-Phosphat-Kette im DNA-Molekül strebt dieses beim Anlegen eines elektrischen Feldes in Richtung Anode. Eine gelartige Matrix mit einem Agaroseanteil dient hierbei zur Ausbildung eines Siebes bei der Molekülwanderung. Durch dieses Poren bildende räumliche Gitter können sich kleine Fragmente schneller in Richtung Anode bewegen als große Bruchstücke. Die Agarosekonzentration im Gel bestimmt die Größe der entstehenden Poren. Hochprozentige Gele werden für die Auftrennung kurzer DNA-Fragmente eingesetzt, wohingegen zur Separation langer DNA-Stücke eine geringe Agarosekonzentration nötig ist. Die gängigen Agarosekonzentrationen liegen in etwa bei 0,7 bis 2,5 %.

Zur Visualisierung der unterschiedlichen Stücke dienen verschiedene, in die DNA interkalierende Substanzen, die unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 312 nm zur Fluoreszenz angeregt werden können. Durch Zuhilfenahme geeigneter Filter lassen sich die Banden mit einer Sofortbildkamera photographieren. Als Größenstandard wurde ein Gemisch exakt definierter DNA-Fragmente, die 1 kb⁺-Leiter, verwendet. Für kleine Fragmente fand ein 100 - bp-Marker Verwendung.

3.5.2 Visualisierung der DNA-Fragmente durch Ethidiumbromid

Die abgewogene Agarose wurde mit 1 x TBE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 50 ml für ein kleines oder 100 ml für ein mittelgroßes Gel aufgefüllt, im Mikrowellenherd aufgeköcht und die auf etwa 55° C abgekühlte Lösung anschließend in einen abgeklebten Gelträger mit Probenkamm gegossen.

Bei der Herstellung von Gelen für den Auftrag von Restriktionsfragmenten wurde bei sonst gleichem Vorgehen 1 x Loening-Puffer anstelle von TBE verwendet. Nach Erstarren des Gels wurde das Klebeband entfernt, der Gelschlitten in eine mit 1 x TBE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt, so daß das Gel gerade bedeckt war, und der Probenkamm vorsichtig entfernt. Die ggf. auf ein Volumen von 10 – 20 ml verdünnten Proben wurden mit einem 6 x Auftragspuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Je nach Größe des Gels, Fragmentlänge der DNA und der erforderlichen Bandenschärfe betrug die angelegte Spannung zwischen 30 und 100 V. Dem Laufpuffer, der auch zur Herstellung des Gels diente, wurde als organischer Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,4 µmol zugesetzt.

3.5.3 Erhöhung der Sensitivität durch Verwendung von SYBR-Green

Eine erhöhte Sensitivität beim Nachweis von amplifizierter DNA läßt sich durch Verwendung von SYBR-Green anstatt von Ethidiumbromid bei der Gelelektrophorese erreichen.

Als Laufpuffer und zur Herstellung des Gels wurde wiederum 1 x TBE, dieses Mal jedoch ohne Zusatz von Ethidiumbromid, verwendet. Vor der Zugabe von SYBR-Green in einer Konzentration von 1:20 000 wurde die aufgeköchte Agarosesuspension bis zum Zeitpunkt kurz vor Erstarren der Flüssigkeit abgekühlt. Für ein kleines Gel von 50 ml bedeutet dies vor dem Gießen des Gels eine Zugabe von 2,5 µl SYBR-Green, für ein mittleres Gel von 100 ml 5 µl. Der Laufpuffer hingegen enthielt kein SYBR-Green. Die Visualisierung der mit SYBR-Green angefärbten Gele erfolgt auch hier durch UV-Licht bei gleicher Wellenlänge auf dem Transilluminator. Allerdings ist bei diesem Vorgehen wegen der höheren Sensitivität eine deutlich geringere Menge des Größenstandards notwendig.

3.5.4 Verwendung von Polyacrylamidgelen

Eine weitere sensitive Möglichkeit zur Auftrennung von DNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge stellt die Polyacrylamidgel-Elektrophorese für fluoreszenzmarkierte Amplifikate dar. Hierfür wurden vorbereitend der Gelträger, dessen Deckplatte und die passenden sog. „spacer“ nach einer gründlichen Reinigung mit einem handelsüblichen Spülmittel mit 70 %igem Ethanol gesäubert, wobei der Eintrittsstelle des Lasers besondere Berücksichtigung zuteil wurde. Nach dem Auflegen der beiden „spacer“ an den seitlichen Rändern des Gelträgers erfolgte knapp unter dessen Oberkante der Auftrag von 30 µl Bind-Silanelösung über die gesamte Breite. Dieses Vorgehen verhindert beim fertigen Gel ein Verutschen der Stege zu einer der beiden benachbarten Taschen und ermöglicht somit einen exakten Probenauftrag. Nach dem Auflegen und Fixieren der Deckplatte wurde der Abstandhalter am Gelträger angebracht.

Der 50-ml-Ansatz für das Gel bestand aus 21 g Urea, 18 ml H₂O, 3 ml 10 x TBE und 10 ml Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) und wurde durch Erwärmen im Mikrowellenofen gelöst. Die Lösung wurde unter Zuhilfenahme einer Wasserstrahlpumpe entgast und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 175 µl APS (10 %) und 44 µl TEMED wurde die Lösung mittels einer Spritze luftblasenfrei in den Hohlraum zwischen Gelträger und Deckglas eingebracht und anschließend ein Gelkamm eingesetzt. Das Gel wurde zum Aushärten beiseite gestellt und währenddessen 2 Liter 0,6 x TBE-Laufpuffer vorbereitet. Der „Mastermix“ für das Auftragen bestand je Spur aus 3 µl Ladepuffer und 0,15 µl jedes der beiden gewählten Größenstandards. Die zur Verfügung stehenden Größenstandards hatten die Größen von 50, 150, 200 und 250 bp in einer Konzentration von 10 fmol/µl.

Um eine möglichst hohe Genauigkeit bei der Identifizierung der amplifizierten Fragmente zu gewährleisten, wurden jeweils zwei sich in ihrer Länge möglichst wenig unterscheidende Größenstandards gewählt, die im Idealfall das erwartete Fragment flankierten. Primerdimere, die in allen Spuren gleich schnell laufen und deren Länge bekannt ist, können hilfsweise ebenfalls als Größenstandard dienen. Nach dem Einsetzen des Gelträgers in die Apparatur und dem Anschließen der Kühlung erfolgte das Einfüllen von jeweils einem Liter Laufpuffer in die obere und untere Vorrichtung. Der Kamm wurde anschließend entfernt.

Bei der Entscheidung, wieviel DNA pro Spur aufgetragen werden sollte, wurde zum einen berücksichtigt, daß eine Überladung zu einer Ungenauigkeit von einem Basenpaar bei der Längenbestimmung führen kann. Zum anderen erhält man bei einer zu geringen DNA-Menge unter Umständen kein Signal. In dieser Arbeit wurden pro Spur 2 µl DNA eingesetzt,

die zuvor bei 95° C für 2 min denaturiert und sofort im Anschluß daran zur Verhinderung einer Renaturierung auf Eis gestellt worden waren. Die in jede Tasche pipettierte Probe bestand also aus 3 µl „Mastermix“ und 2 µl der jeweiligen DNA.

3.6 Southernblot-Analyse

Diese von E.M.Southern 1975 eingeführte Methode dient dem Nachweis und der Längenbestimmung spezifischer Restriktionsfragmente in einem Gemisch von DNA-Bruchstücken. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Fragmente ihrer Länge entsprechend wurde die DNA denaturiert und anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Mittels einer spezifischen Sonde ließ sich das gesuchte Fragment eindeutig identifizieren und seine Länge an Hand des ebenfalls aufgetrennten Größenstandards ermitteln.

3.6.1 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA

Die sowohl für die Herstellung des Gels, als auch als Laufpuffer verwendete Lösung bestand aus 1 x Loening-Puffer, dem je Liter 15 µl 10 %iges Ethidiumbromid zugesetzt worden waren. Die gelelektrophoretische Auftrennung fand unter Verwendung eines 0,7-1 %igen Agarosegels bei Anlage einer Spannung von 30 V innerhalb von 6-12 Stunden statt. Um nach der Immundetektion bei der Größenbestimmung der nachgewiesenen Fragmente auf einen Referenzwert zurückgreifen zu können, wurde das Gel vor dem Transfer mit einem parallel zu den Spuren aufgelegten Lineal auf dem Transilluminator photographiert.

3.6.2 Southerntransfer

Vor dem Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran mittels 0,4 N NaOH wurde das Gel in Denaturierungslösung 30 min lang leicht bewegt. Anschließend wurde es auf ein mit der Lösung in Verbindung stehendes Filterpapier gelegt, mit einer Nylonmembran in entsprechender Größe bedeckt und luftblasenfrei angedrückt. Ein Stapel trockenes Filterpapier befand sich darüber, dessen Kontakt zur Membran durch das Auflegen einer Glasplatte und eines sich darauf befindlichen Gewichts verbessert wurde. Das trockene Papier saugt die Lösung durch das Gel nach oben, wobei die DNA passiv mittransportiert, aber an der Unterseite der Nylonmembran zurückgehalten wird. Die Position der Geltaschen wurde auf dem Filter markiert, bevor dieser von dem Gel entfernt wurde.

Der erfolgreiche Transfer kann durch den Nachweis der EtBr-Färbung auf der Membran überprüft werden. Diese wurde zum Entfernen von Agaroseresten und zur Neutralisation kurz in 2 x SSC geschwenkt, an der Luft trocknen gelassen, bevor die Fixierung der DNA durch Inkubation bei 80° C im Trockenschrank für eine Stunde stattfand.

3.6.3 Nicht-radioaktive Hybridisierung mit Digoxigenin-markierten Sonden

Vorbereitend mußte die Prähybridisierungslösung mindestens 30 min bei 68° C im Wasserbad erwärmt werden. Die mit 2 x SSC angefeuchtete Membran wurde mit einer Menge von 10 ml warmer Lösung für eine Fläche von 100 cm² unter Ausschluß von Luftblasen in Folie eingeschweißt und mindestens eine Stunde bei gleicher Temperatur im Wasserbad prähybridisiert.

Zur Herstellung der Hybridisierungslösung wurden 25 ng DIG-markierte DNA unter Zusatz von 100 µl H₂O bei 100° C für 10 min denaturiert und anschließend die Rehybridisierung der Einzelstränge durch 5-minütige Lagerung auf Eis verhindert. Ebenfalls 10 ml/100 cm² Prähybridisierungslösung wurden mit der fertigen Sonde vermischt. Die die Membran umgebende Prähybridisierungslösung in der Folie wurde durch die vorbereitete Hybridisierungslösung ersetzt; bei 68° C im Wasserbad über Nacht erfolgte die spezifische Anlagerung der Sonde. Anschließend mußte die Membran dreimal jeweils 20 min mit vorgewärmtem Hyb-Waschpuffer bei 65° C gereinigt werden, wobei beim Erneuern des Puffers das Austrocknen des Filters vermieden wurde.

3.6.4 Immundetektion

Während die Membran 5 min in Waschpuffer geschwenkt und anschließend eine Stunde in Blockpuffer inkubiert wurde, erfolgte die Herstellung des Konjugatpuffers, indem das Konjugat □-DIG-AP in einem Verhältnis von 1:15 000 mit Blockpuffer versetzt wurde (hier 1 µl AK auf 15 ml). Die anschließende Inkubation des Filters in dieser Lösung erforderte eine halbe Stunde. Es folgte viermal eine jeweils 10-minütige Säuberung in Waschpuffer und ein anschließendes Equilibrieren der Membran für 5 min in Substatpuffer. Die Chemolumineszenz-Substratlösung bestand aus CDP*, das mit Substratpuffer auf eine Endkonzentration von 0,24 mM verdünnt worden war. Nach 5-minütiger Inkubation wurde die Membran entnommen und nach dem Ablaufenlassen der Flüssigkeit abermals in Folie eingeschweißt, um sie anschließend mit dem Röntgenfilm zu exponieren.

3.6.5 Auswertung der Southernblot-Analyse

Um überprüfen zu können, ob die auf dem Southernblot erkennbaren Banden den erwarteten Fragmenten entsprechen, werden die Banden des Längenstandards (Marker) auf dem Gel-Photo mit denen auf dem Röntgenfilm verglichen. Hierzu wird auf dem Gel-Photo der Abstand der Marker-Banden von der Auftragstasche an dem seitlich anliegenden Lineal abgelesen und auf dem Röntgenfilm in genau diesem Abstand zur markierten Geltasche die entsprechende Bande eingezeichnet. Auf diese Weise wird der Marker auf den Röntgenfilm übertragen und somit ist die Längenabschätzung der nachgewiesenen Fragmente möglich.

3.6.6 Rehybridisierung von Membranen

Sollte die Membran ein zweites Mal hybridisiert werden, so erfolgte die Entfernung der Sonde folgendermaßen: Die Membran wurde eine Minute in H₂O gelegt und anschließend zweimal 15 min in einer Lösung aus 0,2 M NaOH und 0,1 % SDS gewaschen. In 2 x SSC wurde sie abschließend 5 min inkubiert und im Falle einer späteren Hybridisierung auch hierin aufbewahrt.

3.7 Methylierungstest für *hMLH1*

Um eine evtl. vorhandene Methylierung der Cytosinbasen nachzuweisen, erfolgte eine Behandlung der Nukleinsäuren mit Bisulfit. Unmethylierte Cytosine einer DNA werden bei Einwirken von Bisulfit und der nachfolgenden Alkalibehandlung zu Uracil desaminiert und bei der anschließenden PCR durch Thymin ersetzt. Durch die Methylierung, hauptsächlich in der Konstellation CpG, sind die 5-Methyl-Cytosinbasen jedoch vor einer Umwandlung geschützt und verbleiben im amplifizierten Fragment als Cytosine. Der Methylierungstest wurde modifiziert nach Chan et al., 2002 und erforderte für einen bestimmten DNA-Abschnitt fünf Schritte. Im einzelnen sind dies die vorbereitende Denaturierung, die sich anschließende Bisulfitreaktion, DNA-Reinigung und Desulfonierung und zuletzt die Amplifikation.

3.7.1 Denaturierung

Zu 2 µg DNA, in 50 µl H₂O gelöst, wurden 3,5 µl frisch angesetzte 5 M NaOH gegeben. Während der anschließend folgenden 15-minütigen Inkubation bei 37° C trat die Denaturierung der DNA ein.

3.7.2 Bisulfitreaktion

Hinzugefügt wurden nachfolgend 310 μl 3,6 M Bisulfit und 3 μl 50 mM Hydrochinon. Das Lösen dieser Substanzen erfolgte durch Inkubation im Wasserbad bei 55° C und vorsichtigem Schwenken. Auf Vortexen wurde verzichtet, um die Deaktivierung dieser beiden Reaktionspartner in Verbindung mit Sauerstoff zu vermeiden. Das Übersichten der Probe mit einem Tropfen Mineralöl sollte einer Verdunstung während der folgenden 16-stündigen Inkubation bei 55° C im Dunkeln vorbeugen.

3.7.3 DNA-Reinigung

Zur Reinigung der DNA wurde der Kit NucleoTrap unter Einhaltung der Herstellerangaben eingesetzt.

3.7.4 Desulfonierung

Nach Zugabe von frisch angesetzter 5 M NaOH zur Endkonzentration von 0,3 M und 15-minütiger Inkubation bei 37° C wurde 6 M Ammoniumacetat pH 7 bis zu einer Endkonzentration von 3 M beigegeben. Zur Präzipitation waren 2-2,5 Vol. 96 %iger Ethanol notwendig. Eine Lagerung der Probe für etwa 30 min bei -80° C führte zu einer besseren Sedimentierung und damit erhöhten DNA-Ausbeute bei der anschließenden Zentrifugation für 15 min mit maximaler Umdrehungszahl (Heraeus 1R). Nach diesem Schritt ebenso wie nach der anschließenden Zugabe von 100 μl 70 %igem Ethanol und erneuter Zentrifugation erfolgte das Abnehmen des Überstandes. Das nun erhaltene Sediment wurde in 20-50 μl H₂O gelöst und die DNA-Suspension bis zur Amplifikation bei -20° C aufbewahrt.

3.7.5 Amplifikation

Die Amplifikation der bisulfitmodifizierten DNA erfolgte unter Einsatz von zwei für methylierte DNA und für fehlende Cytosinmethylierung spezifische Primerpaare als Einzelstrang-PCR.

3.8 Sequenzanalyse

Die Sequenzanalyse von DNA-Proben wurde von der Firma MWG durchgeführt. Es kamen die Oligonukleotide CD95-143461f, CD95-144450f, CD95-144471r und CD95-144961r zum Einsatz. Deren Sequenz kann dem Abschnitt 2.3.2 entnommen werden.

4 Ergebnisse

Das Auftreten von Änderungen im DNA-Methylierungsstatus ist eines der frühen Anzeichen für die Entstehung einer neoplastischen Transformation von Zellen. Trotz der allgemeinen Beobachtung einer Hypomethylierung werden verschiedene Gene durch Methylierung transkriptionell inaktiviert. Im Labor bereits vorhandene Kolon- und Magenkarzinomproben sollten im Rahmen dieser Arbeit auf bestehende Methylierungsdefekte in zwei Genen untersucht werden.

In früheren Untersuchungen waren einige Tumorproben als mikrosatelliteninstabil charakterisiert worden. Dies ist in sporadischen Tumoren häufig auf Inaktivierung einer Komponente, *hMLH1*, des DNA-Mismatch-Reparatursystems durch Genabschaltung zurückzuführen. Daher wurde der Promotor des *hMLH1*-Gens auf seinen Methylierungsstatus getestet.

Anhand von *KRAS2* mutierten Tumorproben wurde im zweiten Teil dieser Arbeit das Vorhandensein von Methylierungsvarianten eines proapoptotischen Gens, des *CD95/Fas*-Gens (*TNFRSF6/CD95/Apo-1*) überprüft.

4.1 Analyse des *hMLH1*-Promotors

Die in dieser Arbeit verwendeten Proben stammten aus dem Kollektiv von Herrn Dr. Kopp, Klinikum Großhadern und waren bereits in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Weiß auf Mikrosatelliteninstabilität für die Genorte *BAT26*, *BAT40*, *Mfd15*, *BATRII* und *BAX* untersucht worden. Der erste Teil der vorliegenden Arbeit hatte die Bestimmung des Methylierungsstatus von Cytosinbasen im *hMLH1*-Promotor bei den acht mikrosatelliteninstabilen Kolonkarzinomen und einem instabilen Magenkarzinom des oben angegebenen Kollektivs zum Ziel. Diese Proben wurden hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen der Mikrosatelliteninstabilität der Tumoren und einer möglichen Methylierung der Cytosinbasen im *hMLH1*-Promotor untersucht.

4.1.1 Das humane *hMLH1*-Gen und dessen Promotor

Das auf Chromosom 3 (3p21.3) gelegene *hMLH1*-Gen enthält insgesamt 21 Exons. Seine Gesamtlänge beträgt 58.159 bp.

Abb. 2 gibt einen Überblick über den proximalen Promotorbereich und das daran angrenzende Exon 1 (durch rote Farbe gekennzeichnet) des *hMLH1*-Gens. Zur Bestimmung des Methylierungsstatus des *hMLH1*-Promotors wurde in dieser Arbeit die Modifikation der genomischen DNA mittels Bisulfit und die anschließende Amplifikation des nichtkodierenden DNA-Stranges mit geeigneten Oligonukleotiden gewählt. Cytosinbasen werden bei Einwirken von Bisulfit und nachfolgender Alkalibehandlung zu Uracil desaminiert und bei der anschließenden PCR durch Thymin ersetzt, sofern sie unmethyliert sind. Bei vorhandener Methylierung findet dieser Austausch der Basen hingegen nicht statt, die Cytosine bleiben bestehen. Die Cytosine in der Konstellation CpG, die im *hMLH1*-Promotor methyliert sind, sind blau hervorgehoben.

Exemplarisch ist in Abb. 2 für den amplifizierten Bereich zusätzlich zur fortlaufenden, schwarz geschriebenen Sequenz diejenige nach erfolgter Bisulfitbehandlung dargestellt. Im Falle der vollständigen Methylierung der entsprechenden Cytosinbasen ist diese dunkelgrün (S (m)) markiert; die resultierende Sequenz nach Basenaustausch bei nicht vorhandener Methylierung ist hellgrün (S (u)) hervorgehoben. Die Bindungsstellen der im Verlauf der Arbeit eingesetzten Oligonukleotide sind in Abb. 2 unterstrichen, die Namen der Primer an der jeweiligen Stelle angegeben.

	hMLH1-A					
S	AGAG	<u>CGGACA</u>	<u>GCGATCTCTA</u>	<u>ACGCGCAAGC</u>	GCATATCCTT	CTAGGTAGCG GGCAGTAGCC
	hMLH1-mA					
S (m)	AGAG	<u>CGGATA</u>	<u>GCGATTTTTTA</u>	<u>ACGCGTAAGC</u>	GTATATTTTTT	TTAGGTAGCG GGTAGTAGTC
	hMLH1-uA					
S (u)	<u>AGAGTGGATA</u>	<u>GTGATTTTTTA</u>	<u>ATGTGTAAGT</u>	GTATATTTTTT	TTAGGTAGTG	GGTAGTAGTT
	hMLH1-B					
S	GCTTCAGGGA	GGGAC	<u>GGAAGA</u>	<u>GACCCAGCAA</u>	<u>CCCACAGAGT</u>	TGAGAAATTT GACTGGCATT
	hMLH1-mB					
S (m)	GTTTTAGGGA	GGGAC	<u>GGAAGA</u>	<u>GATTTAGTAA</u>	<u>TTTATAGAGT</u>	TGAGAAATTT GATTGGTATT
	hMLH1-uB					
S (u)	GTTTTAGGGA	GGGAT	<u>GGAAGA</u>	<u>GATTTAGTAA</u>	<u>TTTATAGAGT</u>	TGAGAAATTT GATTGGTATT
S	CAAGCTGTCC	AATCAATAGC	TGCCGCTGAA	GGGTGGGGCT	GGATGGCGTA	AGCTACAGCT C
S	GAAGGAAGAA	CGTGAGCACG	AGGCACTGAG	GTG	<u>ATTGGCT</u>	<u>GAAGGCACTT</u> <u>CCGTTGAGCA</u> A
S	<u>TCTAGACGTT</u>	<u>TCCTTGGCTC</u>	<u>TTCTGGCGCC</u>	<u>AAA</u>	<u>ATGTCGT</u>	<u>TCGTGGCAGG</u> <u>GGTATTCGG</u>
S	<u>CGGCTGGACG</u>	<u>AGACAGTGGT</u>	<u>GAACCGCATC</u>	<u>GCGGCGGGG</u>	<u>AAGTTATCCA</u>	<u>GCGCCAGCT</u>
S	<u>AATGCTATCA</u>	<u>AAGAGATGAT</u>	<u>TGAGAACTGG</u>	TACGGAGGGA	GTCGAGCCGG	GCTCACTTAA

Abb. 2:**Überblick über den Promotor und das Exon 1 des hMLH1-Gens**

Die Sequenz des Exons 1 ist in roter Farbe abgehoben. Hierin ist das Translations-Initiations-Kodon ATG unterstrichen. Grau gekennzeichnet sind die beiden Stellen mit bekanntem Polymorphismus, die mutierte Base ist angegeben. Die Cytosine in der Konstellation CpG, die je nach Methylierungsstatus bei der Bisulfitbehandlung entweder einer Basenumwandlung unterliegen oder bestehen bleiben, sind blau gekennzeichnet.

Für den amplifizierte Bereich ist jeweils die Sequenz nach Bisulfitmodifikation für das stillgelegte, methylierte Gen (m, dunkelgrün) und für das aktive, nicht-methylierte Gen (u, hellgrün) angegeben (Chan et al., 2002). Die Bindungsstellen der in dieser Arbeit eingesetzten Oligonukleotide sind unterstrichen und der Name des entsprechenden Primers ist jeweils angegeben: A, B für die Amplifikation der Promotorsequenz aus unbehandelter genomischer DNA, u bezeichnet die Primerbindungsstellen zur Amplifikation der unmethylierten und m der methylierten Sequenz nach Bisulfitmodifikation.

S steht für fortlaufende Sequenz.

4.1.2 Etablierung des Methylierungstests, der PCR-Bedingungen für die Oligonukleotide hMLH1-uA/uB und hMLH1-mA/mB und der Auftrennungsverfahren

Um die optimalen Bedingungen für die spätere Untersuchung der Methylierung am *hMLH1*-Promotor der Tumoren auszutesten, wurde zu Beginn der Arbeit DNA der Zelllinien DLD1, HCT116 und SW48 sowie DNA aus PBL (peripheren Blut-Lymphozyten) zweier Normalpersonen dem Methylierungstest für *hMLH1* zugeführt. DLD1, HCT116 und SW48 weisen Mikrosatelliteninstabilität auf (Vincent et al., 1997). Für die Zelllinie SW48 war die Methylierung des *hMLH1*-Promotors publiziert, während die defekte MMR in HCT116 auf eine hemizygoten Mutation in *hMLH1* zurückzuführen ist, die in einem instabilen hMLH1-Protein resultiert (Wheeler et al., 1999; Li et al., 2002). DLD1 ist mikrosatelliteninstabil wegen einer Mutation in GTBP (Papadopoulos et al., 1995). Die DNA aus PBL sollte keine Methylierung des *hMLH1*-Promotors aufweisen.

Bei der Überprüfung des Methylierungsstatus mittels Bisulfitbehandlung wurden die Primerpaare nach Chan et al., 2002 verwendet, da hier sowohl die methylierte als auch die nicht-methylierte *hMLH1*-Promotorsequenz nachgewiesen wird. Zur Kontrolle wurde die Region auch aus der unmodifizierten DNA amplifiziert, da Genverlust ebenfalls Mikrosatelliteninstabilität hervorruft. Die Bisulfitbehandlung erfolgte mit 2 µg genomischer DNA nach Standardbedingungen, die in der Literatur nicht variieren. Die modifizierte DNA wurde mit dem DNA-Reinigungskit von Macherey-Nagel gereinigt und in 20 µl eluiert.

4.1.2.1 Austesten der optimalen PCR-Bedingungen für die Oligonukleotide hMLH1-uA/uB und hMLH1-mA/mB

Je 2 µg DNA wurden der Bisulfitbehandlung unterzogen und aufgereinigt. Jeweils 1/10 dieser modifizierten DNA wurde sowohl mit den Oligonukleotiden für die methylierte (hMLH1-mA/mB) als auch mit denjenigen für die unmethylierte (hMLH1-uA/uB) Variante amplifiziert und der PCR-Ansatz auf einem Agarosegel analysiert. In der gesamten Arbeit wurden für die Polymerase-Kettenreaktionen Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 20 µl verwendet.

Da mit den von Chan et al., 2002 beschriebenen PCR-Bedingungen, die keinen separaten Elongationsschritt vorsehen, kein Amplifikat erzielt werden konnte, wurden sowohl für den Nachweis der unmethylierten als auch der methylierten bisulfitmodifizierten DNA mittels PCR unterschiedliche Bedingungen ausgetestet. Zum einen wurde ein Elongationsschritt eingeführt und zum anderen wurden MgCl₂-Konzentrationen von 1-4 mM angewandt. Die

Abwandlung der Standard-PCR-Bedingungen erstreckte sich von einer Anfangsdenaturierung von 5 bzw. 10 min über ein ausführliches Austesten der Anlagerungs-Temperaturen im Bereich von 51 bis 54° C (Oligonukleotide hMLH1-mA/mB) bzw. 51 bis 59° C (Oligonukleotide hMLH1-uA/uB) bis zur Erhöhung der Zyklusanzahl von 35 auf 40. Als weitere Modifikation wurde der Einfluß der Primerkonzentration untersucht; eine verminderte Oligonukleotid-Konzentration führte jedoch zu keiner Verbesserung des Ergebnisses.

Als optimal erwiesen sich schließlich folgende PCR-Bedingungen:

Primerpaar hMLH1-uA/uB mit bisulfitmodifizierter DNA:

Anfangsdenaturierung 96° C, 10 min; Denaturierung 95° C, 30 sec; Anlagerung 55° C, 30 sec, Elongation 72° C, 30 sec; Endextension 72° C, 10 min bei einer Zykluszahl von 40.

Primerpaar hMLH1-mA/mB mit bisulfitmodifizierter DNA:

Bei sonst identischen Bedingungen wurde hierfür eine Anlagerungstemperatur von 52° C gewählt.

Unter diesen Bedingungen (3.4.9.1) wurden die Proben einer Normalperson und der Zelllinie SW48 nach Bisulfitmodifikation mit den Oligonukleotidpaaren zum Nachweis der methylierten bzw. unmethylierten DNA amplifiziert (Abb. 3). Bei Verwendung der Primer hMLH1-uA und hMLH1-uB für den Nachweis des unmethylierten *hMLH1*-Promotors nach Bisulfitbehandlung wurde bei der DNA aus PBL einer Normalperson (N) ein Fragment festgestellt, das eine Länge von ca. 100 bp aufwies und mit der Größe des erwarteten Amplifikates von 100 bp übereinstimmte, jedoch kein Fragment für eine methylierte Promotorsequenz. Somit war diese DNA als Positiv- und Negativkontrolle für den Nachweis des unmethylierten Allels geeignet.

Bei der Zelllinie SW48 konnte hingegen lediglich in der „methylspezifischen“ PCR ein Amplifikat nachgewiesen werden, was mit früheren Ergebnissen der Arbeitsgruppe und der Literatur übereinstimmt. Das PCR-Fragment wies die erwartete Länge von 92 bp auf. Die Zelllinie SW48 fand im weiteren als Positivkontrolle zum Nachweis *hMLH1*-Promotor-methylierter DNA Anwendung. Mit den Oligonukleotiden für methylierte DNA brachte die Zelllinie SW48 eine deutliche Bande hervor und war somit als Positivkontrolle geeignet. Als größtenteils unmethyliert konnte, wie erwartet, die DNA der Normalperson identifiziert werden. Dagegen wurde für die DNA der Zelllinien DLD1 und HCT116 kein methyliertes *hMLH1*-PCR-Produkt gefunden (Daten nicht gezeigt). Wie oben aufgeführt, ist ihre Mikrosatelliteninstabilität nicht auf Methylierung von *hMLH1* zurückzuführen.

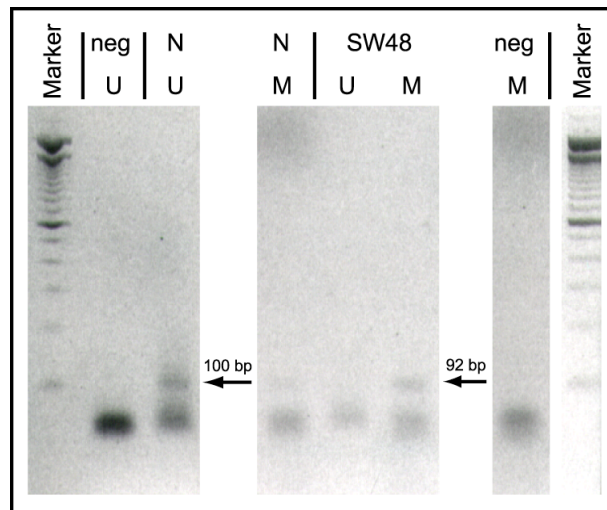


Abb. 3:
Amplifikation der bisulfitmodifizierten Kontroll-DNA mittels der Oligonukleotide hMLH1-uA/uB (U) und hMLH1-mA/mB (M)

Je 2 µg genomischer DNA aus Blut einer Kontrollperson und der mikrosatelliteninstabilen Zelllinie SW48 wurden der Bisulfitbehandlung unterzogen und je 1/10 der gereinigten modifizierten DNA in eine PCR mit dem Primerpaar hMLH1-uA/uB für den Nachweis des unmethylierten *hMLH1*-Promotors bzw. hMLH1-mA/mB zum Nachweis der methylierten Sequenz eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde eine PCR ohne Einsatz von DNA (neg) mitgeführt. Je 2/3 des jeweiligen Amplifikates wurde auf einem 2,5 %igen Agarose-Ethidiumbromid-Gel aufgetrennt. Als Längenstandard (Marker) dienten 200 ng der 100 bp-Leiter. Die Amplifikate der korrekten Länge sind mit einem Pfeil markiert und ihre Größe ist angegeben. In jedem Ansatz sind Primerdimere deutlich nachweisbar.

Jedoch waren die Amplifikate relativ schwach und in allen Reaktionen waren Primerdimere (untere Banden in Abb. 3) nachweisbar. Festzustellen war, daß die Amplifikationen mit den Oligonukleotiden hMLH1-uA/uB im Vergleich zu denen mit dem Primerpaar hMLH1-mA/mB weniger effizient waren, da deutlich schwächere Banden nachgewiesen werden konnten. Die Amplifikation ließ sich mit dem angegebenen Primerpaar hMLH1-uA/uB nicht verbessern.

4.1.2.2 Austesten verschiedener gelelektrophoretischer Auftrennungsvorfahren

Die resultierenden PCR-Produkte wurden anfangs auf Ethidiumbromid-haltigen 2,5 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Da jedoch die Amplifikate schwach waren, wurde zur Erhöhung der Sensitivität der DNA-Farbstoff SYBR-Green statt Ethidiumbromid verwendet. Die erhöhte Nachweisgrenze für DNA-Fragmente ging einher mit einer geringeren Auflösungsschärfe. Auch der Austausch der fluoreszierenden Substanz resultierte in keiner besseren Visualisierung der Amplifikate, weshalb im weiteren Verlauf ausschließlich Agarosegele unter Zusatz von Ethidiumbromid zur Anwendung kamen.

In der Absicht, die Produkte der Polymerase-Kettenreaktionen noch empfindlicher nachweisen zu können, wurde ebenfalls die Markierung der amplifizierten Fragmente mit einem Fluoreszenzfarbstoff (Cy5, siehe Abschnitt 2.3.1) und eine Auftrennung auf Polyacrylamid-Gelen getestet. Diese Methode erwies sich einerseits zwar als sensitiver, andererseits war die Ausbeute an amplifizierten Fragmenten bei Verwendung des Cy5-markierten Primers geringer. Insgesamt ergab sich hierdurch keine Verbesserung des Nachweises der methylierten bzw. unmethylierten Promotersequenz von *hMLH1*.

4.1.3 Untersuchung der Tumorproben mittels der Oligonukleotidpaare hMLH1-uA/uB und hMLH1-mA/mB

Die isolierte DNA jeder Tumorprobe wurde sowohl mit den Primern hMLH1-uA/uB als auch mit den Oligonukleotiden hMLH1-mA/mB amplifiziert. Es kamen jeweils die im Abschnitt 3.4.9.1 angegebenen PCR-Bedingungen zur Anwendung.

In Abb. 4 ist paarweise jeweils die gleiche Probe der einzelnen Tumoren nach Amplifikation mit den beiden verschiedenen Oligonukleotidpaaren angeordnet. M steht hierbei für die "methylspezifische" Amplifikation mit dem Primerpaar hMLH1-mA/mB, U für diejenige mit den Oligonukleotiden hMLH1-uA/uB zum Nachweis der nicht methylierten Sequenz. In sechs Tumoren mit den Nummern 50, 78, 84, 102, 108 und 130 konnte eindeutig ein methylierter *hMLH1*-Promotor nachgewiesen werden. Es resultierte kein Amplifikat für eine unmethylierte Promotorsequenz. In der linken der paarweise angeordneten Spuren wurde die entsprechende Probe nach Amplifikation mit dem Oligonukleotidpaar hMLH1-uA/uB aufgetragen. Im Gegensatz zur rechten Spur ist hier jeweils eine unscharfe Bande erkennbar, die sich deutlich unterhalb des 100 bp-Fragments des Markers befindet. Mehrere Gründe sprechen dafür, daß es sich hierbei um Oligonukleotiddimere und nicht um das spezifische Amplifikat unmethylierter DNA handelte. Zum einen wäre die spezifische Bande etwa auf Höhe des 100 bp-Fragments des Markers nachgewiesen und schärfer dargestellt worden. Auf den jeweils linken Spuren aller untersuchten Karzinome erscheint zum anderen dieselbe unscharfe Bande, unabhängig davon, ob die Probe mit dem Primerpaar hMLH1-mA/mB als methyliert identifiziert wurde oder nicht (siehe auch Abb. 3).

Da die PCR spezifisch für den Nachweis des methylierten Promotors des *hMLH1*-Gens war (siehe 4.1.3), konnte somit gefolgert werden, daß eine Methylierung dieses Promotors bei den genannten sechs Karzinomen des Gastrointestinaltraktes vorlag, die für die Mikrosatelliteninstabilität verantwortlich gemacht werden kann.

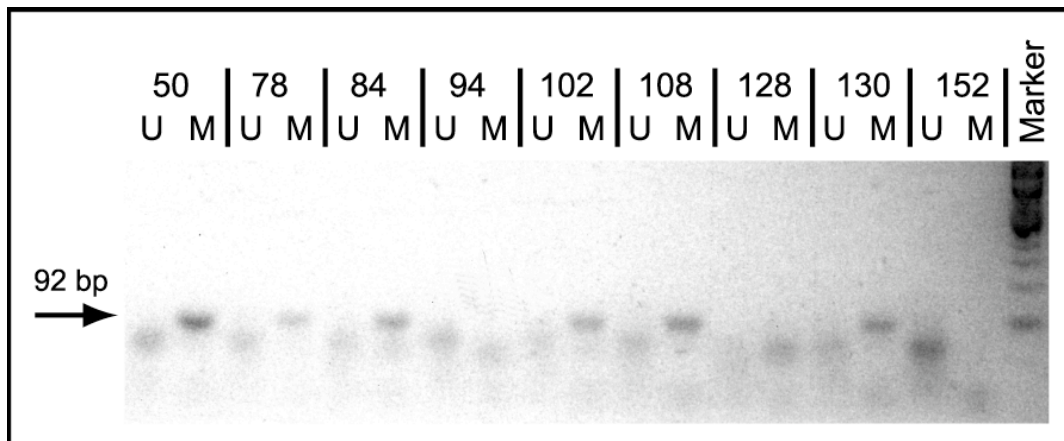


Abb. 4:
Untersuchung der bisulfitmodifizierten DNA aus mikrosatelliteninstabilen Karzinomproben in Bezug auf den Methylierungsstatus des *hMLH1*-Promotors

Modifikation und PCR siehe Abb. 3. Jeweils 1/5 beider Amplifikate der gleichen Tumorprobe wurden nebeneinander auf einem 2 %igen Agarose-SYBR-Green-Gel aufgetragen, links unter Verwendung der Oligonukleotide *hMLH1*-uA/uB (U) für den unmethylierten Promotor, rechts nach Amplifikation mit den Primern *hMLH1*-mA/mB (M) für die methylierte Sequenz. Das 92 bp-Amplifikat für den methylierten *hMLH1*-Promotor ist markiert. Rechts ist als Größenstandard (Marker) die 100 bp-DNA-Leiter aufgetragen.

In diesem Versuch wurden sechs der neun Karzinome des Gastrointestinaltraktes als methyliert identifiziert, wohingegen für die drei übrigen Proben unter diesen Bedingungen bei Einsatz beider Oligonukleotidpaare kein Amplifikat erzielt werden konnte. Möglicherweise war eine ungenügende Modifikation durch Bisulfit hierfür ursächlich. Die Umwandlung von unmethylierten Cytosinen zu Uracil wäre in diesem Fall nicht zustande gekommen, die Anlagerung der Oligonukleotide und somit die Amplifikation ausgeblieben.

Um dies auszuschließen, wurden die Proben mit ungeklärtem Methylierungsstatus erneut einer Behandlung mit Bisulfit unterzogen und die PCR mit diesen Proben wiederholt. Die Bedingungen für die Polymerase-Kettenreaktion wurden fast ausnahmslos beibehalten; lediglich für die Primer *hMLH1*-uA/uB wurde bei diesem Versuch eine um drei Grad höhere Annealing-Temperatur gewählt, da diese Bedingungen in den Vorversuchen mit der Kontroll-DNA ein starkes Amplifikat geliefert hatten.

Die Abb. 5 zeigt das Ergebnis nach Amplifikation der bisulfitbehandelten DNA der drei Tumorproben 94, 128 und 152. Die DNA der Normalperson diente als Kontrolle für einen unmethylierten *hMLH1*-Promotor und die Zelllinie SW48 als Positivkontrolle für die methylierte Sequenz. Jede Probe wurde wiederum zweimal nebeneinander aufgetragen, links nach Amplifikation mit den Primern *hMLH1*-uA/uB und rechts mit den Oligonukleotiden *hMLH1*-mA/mB. Während für die Tumorprobe 152 weiterhin in keiner der beiden Spuren ein

Amplifikat erkennbar war, ließ sich für die DNA des Kolonkarzinoms mit der Nummer 128 nach Amplifikation mit den Oligonukleotiden hMLH1-mA/mB eine deutliche Bande nachweisen, die sich auf Höhe des Fragmentes der Zelllinie SW48 befindet. Es konnte somit von einem spezifischen Amplifikat ausgegangen und für diese Tumorprobe ebenfalls eine Methylierung des *hMLH1*-Promotors nachgewiesen werden. Die sehr schwache Amplifikations-Bande in der mit U bezeichneten Spur der Probe 94 gab zu der Vermutung Anlaß, daß in dieser Tumorprobe ein unmethylierter *hMLH1*-Promotor vorliegt.

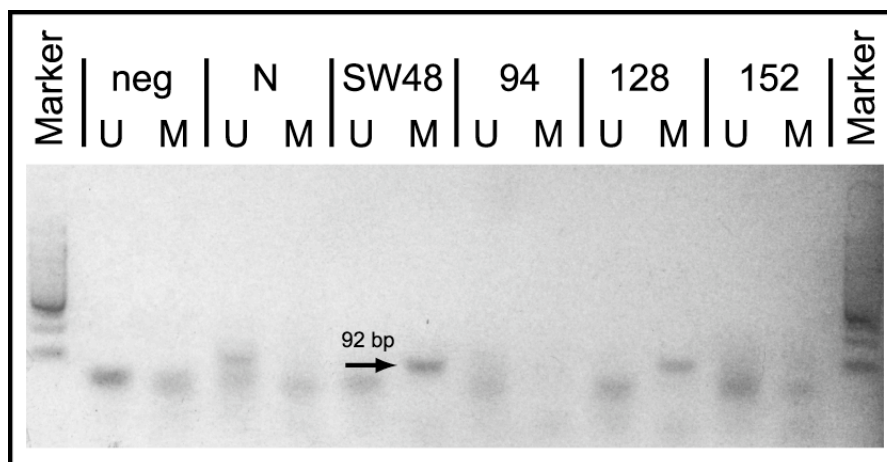


Abb. 5:

Amplifikation der bzgl. des Methylierungsstatus im *hMLH1*-Promotor ungeklärten Tumorproben mit den Oligonukleotiden hMLH1-uA/uB und hMLH1-mA/mB

Modifikation und PCR siehe Abb. 3. Der Auftrag von je 5 µl der beiden unterschiedlichen Amplifikate unter Verwendung der Primer hMLH1-uA/uB (U) und hMLH1-mA/mB (M) für die jeweils gleiche Probe auf einem 2,5 %igen Agarose-SYBR-Green-Gel erfolgte entsprechend der vorhergehenden Abbildungen nebeneinander.

Als Kontrolle wurde die PCR ohne DNA (neg) bzw. mit bisulfitbehandelter DNA aus Blut einer Normalperson (N) bzw. der Zelllinie SW48 durchgeführt. 4 µl der 100 bp-DNA-Leiter wurden als Größenstandard aufgetragen, die im SYBR-Green-haltigen Gel nicht scharf aufgetrennt wurde.

Da für die beiden Tumorproben mit den Nummern 94 und 152 der Methylierungsstatus des *hMLH1*-Promotors weiterhin ungeklärt war, wurde im folgenden die Bisulfitmodifikation überprüft.

4.1.4 Untersuchung der Tumorproben 94 und 152 hinsichtlich der Vollständigkeit der Bisulfitmodifikation

Es bestand die Möglichkeit, daß die Umwandlung von Cytosinen nach Uracil mittels Bisulfit bei der Kolonkarzinomprobe 152 und evtl. auch 94 unvollständig verlaufen war und die fehlende bzw. äußerst schlecht nachweisbare Amplifikation hierdurch erklärt werden könnte. Daher wurde ein anderer genomischer Abschnitt, der methyliert ist und für dessen Amplifikation nach Bisulfitmodifikation Primerpaare publiziert sind, als Kontrolle der Umwandlung von nicht methylierten Cytosinen zu Uracil untersucht. Es handelt sich um eine Sequenz aus Exon 1 von *SNRPN*, einem Gen aus der Prader-Willy-Syndrom-Genregion, das je nach elterlichem Ursprung unterschiedlich methyliert ist. Der „methylspezifische“ Nachweis des maternalen Allels (methyliert) erfolgte mittels der Oligonukleotide SNRPN-Mf/Mr. Dieses im Labor bereits eingesetzte Primerpaar schien für den Test auf erfolgreiche Modifikation durch Nachweis des maternalen Methylierungsmusters der *SNRPN*-Sequenz geeignet.

4.1.4.1 Austesten der Bedingungen und Herstellung von Kontrollen für die Oligonukleotide SNRPN-Mf/Mr

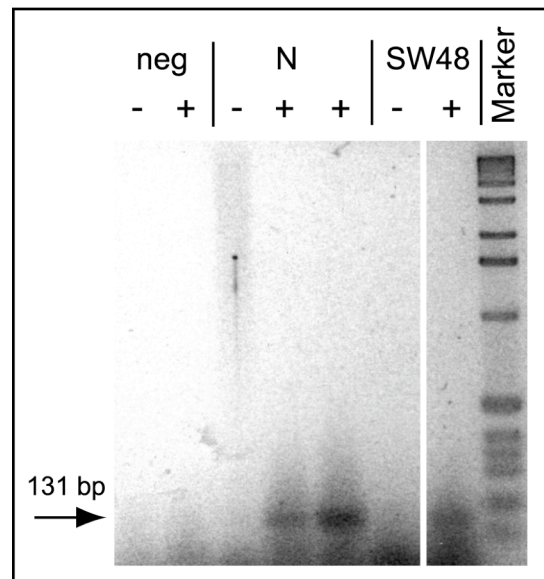
Zunächst wurden die bereits früher im Labor für diese Primer verwendeten Bedingungen (3.4.9.1) anhand der DNA-Proben der Normalperson und der Zelllinie SW48 überprüft. Es konnte keine Verbesserung des Resultats durch Variation individueller PCR-Parameter erreicht werden.

Sowohl von der Normalperson als auch von der Zelllinie SW48 wurde je eine unveränderte und eine bisulfitmodifizierte DNA-Probe mit den Oligonukleotiden SNRPN-Mf/Mr amplifiziert. Wie aus Abb. 6 ersichtlich, konnten in den unmodifizierten DNA-Proben (-) keine Amplifikate nachgewiesen werden, erkennbar waren lediglich Primerdimere. In allen drei Spuren, in denen die bisulfitbehandelte DNA (+) aufgetragen worden war, ließ sich hingegen eine zusätzliche oberhalb davon gelegene Bande der erwarteten Größe (131 bp) nachweisen. Daher sollte diese PCR auch zur Überprüfung der Bisulfitmodifikation der DNA aus Tumorproben geeignet sein.

Abb. 6:**Nachweis des maternalen Methylierungsmusters in *SNRPN***

Bisulfitbehandlung siehe Abb. 3. Je 5 µl des PCR-Ansatzes mit den Primern SNRPN-Mf/Mr und 200 ng der 1 kb-DNA-Leiter wurden auf ein 2,5 %iges Agarosegel aufgetragen. Als Negativkontrolle (neg) wurde die PCR ohne DNA durchgeführt. N bezieht sich auf die DNA aus Blut einer Normalperson, die in verschiedenen Versuchen der Bisulfitbehandlung unterzogen wurde (siehe Abb. 3 und 5).

In allen drei Spuren, in denen bisulfitmodifizierte DNA (+) aufgetragen worden war, läßt sich eine deutliche Bande mit 131 bp (Pfeil) erkennen, wohingegen die Amplifikation der unmodifizierten DNA (-) kein Fragment erbrachte.

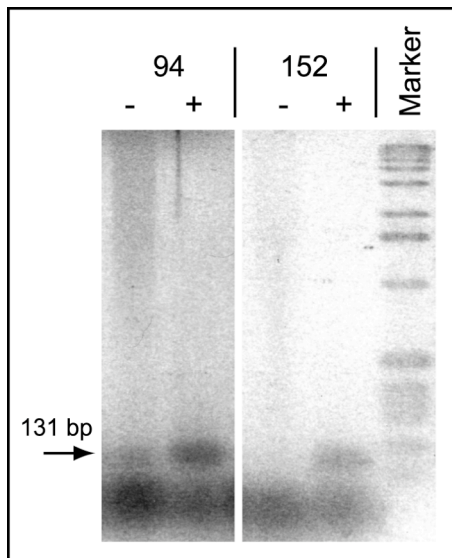


Die DNA der beiden Tumorproben mit ungeklärtem Methylierungsstatus konnte deshalb im weiteren mit diesem Primerpaar hinsichtlich der erfolgreichen Bisulfitbehandlung untersucht werden.

4.1.4.2 Überprüfung der erfolgreichen Bisulfitmodifikation der Tumorproben 94 und 152 mittels der Oligonukleotide SNRPN-Mf/Mr

Die DNA der beiden hinsichtlich ihres Methylierungsstatus ungeklärten Kolonkarzinomproben 94 und 152 wurde zum einen direkt in unveränderter Form, zum anderen nach Bisulfitbehandlung der PCR mit den Primern SNRPN-Mf/Mr unterzogen.

Abb. 7 zeigt die paarweise nebeneinander aufgetragenen Amplifikationen der gleichen Tumor-DNA, wobei jeweils links die PCR mit unbehandelter DNA (-) und rechts die PCR-Produkte der DNA nach der Behandlung mit Bisulfit (+) aufgetragen wurden. Für beide DNA-Proben konnte die maternale Methylierung der *SNRPN*-Sequenz nachgewiesen werden.

**Abb. 7:**

Nachweis der vollständigen Modifikation der DNA der Tumorproben 94 und 152 durch Bisulfit mittels einer Kontroll-PCR

Je 5 μ l der PCR mit den Oligonukleotiden SNRPN-Mf/Mr wurden auf einem 2,5 %igen Agarose-Ethidiumbromid-Gel aufgetrennt. Marker bezeichnet die Spur mit dem Längensstandard 1 kb-Leiter.

- : unbehandelte DNA

+ : bisulfitmodifizierte DNA

Der Nachweis von spezifischen Banden für die DNA der beiden Kolonkarzinome mit den Primern SNRPN-Mf/Mr impliziert, daß eine unvollständige Bisulfitmodifikation als Ursache für den fehlenden Nachweis methylierter bzw. unmethylierter DNA in den beiden Tumorproben ausgeschlossen werden kann.

Als weitere Möglichkeit für die erfolglose Untersuchung des Methylierungsstatus des *hMLH1*-Promotors wäre eine Deletion oder ein Polymorphismus im entsprechenden Bereich innerhalb der Promotorsequenz in Betracht zu ziehen.

4.1.5 Untersuchung der Tumorproben 94 und 152 hinsichtlich einer Deletion innerhalb des *hMLH1*-Promotors

Zum Ausschluß einer Deletion des entsprechenden Bereiches wurde eine PCR der unbehandelten DNA der Tumorproben 94 und 152 durchgeführt. Es wurden hierfür neue Oligonukleotide, *hMLH1*-A und *hMLH1*-B, ausgewählt, die grob den Bindungsstellen der Oligonukleotidpaare *hMLH1*-uA/uB und *hMLH1*-mA/mB entsprechen (siehe Abb. 2). Die Sequenz *hMLH1*-A enthält 7 Cytosine und *hMLH1*-B überprüft 9 Cytosinbasen. Läge bei einer DNA in dieser Region des *hMLH1*-Promotors eine Deletion oder ein Polymorphismus in den Primerbindungsstellen vor, so könnte die Anlagerung der Primer und somit die Amplifikation nicht erfolgen. Der Nachweis eines PCR-Produktes bliebe daher aus. Die erwartete Größe des resultierenden Amplifikates liegt bei 89 bp. Die PCR-Bedingungen für diese Oligonukleotide wurden zuvor ermittelt und sind im Abschnitt 3.4.9.1 aufgelistet.

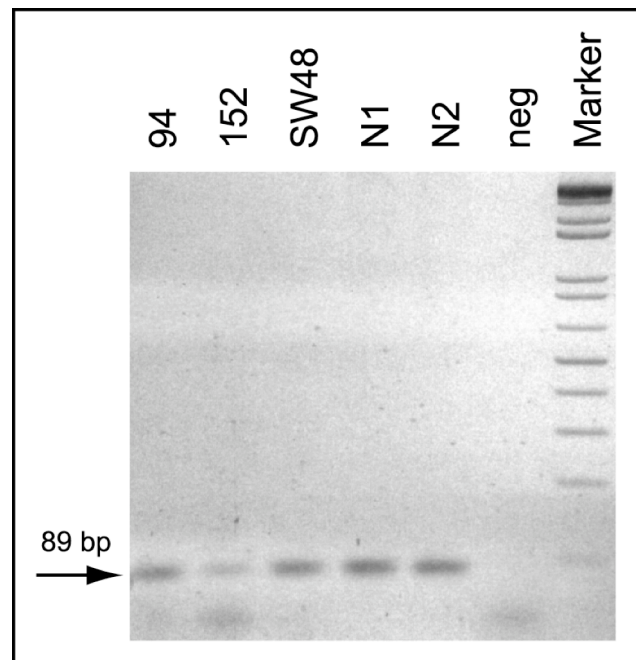
Abb. 8 zeigt, daß die DNA der beiden zu untersuchenden Tumorproben 94 und 152 die relevante *hMLH1*-Promotorsequenz kodiert. Knapp unterhalb des 100-bp-Fragmentes des Markers zeichnet sich eine deutliche Bande ab, die der erwarteten Länge von 89 bp entspricht.

Abb. 8:

Ausschluß der Deletion des untersuchten *hMLH1*-Promotorbereiches für die Kolonkarzinomproben 94 und 152

Nach der Amplifikation von 100 ng der unmodifizierten DNA mit den Oligonukleotiden *hMLH1*-A/B wurden je 5 µl des Amplifikates auf einem 2,5 %igen Agarose-Ethidiumbromid-Gel aufgetrennt.

Die DNA von zwei Normalpersonen (N1 und N2) und der Zelllinie SW48 wurde ebenfalls amplifiziert; neg ist die Kontroll-PCR ohne DNA. Die Laufföhe der Amplifikate mit der erwarteten Größe von 89 bp ist mit einem Pfeil markiert.



Das Vorhandensein spezifischer Amplifikate für alle in Abb. 8 dargestellten DNA-Proben impliziert, daß bei keiner von ihnen eine Deletion im untersuchten Bereich oder ein Polymorphismus in den Primerbindungsstellen vorlag.

Zusammenfassung der Untersuchung auf Methylierung des hMLH1-Promotors

Bei der Untersuchung der DNA aus neun mikrosatelliteninstabilen Karzinomen des Gastrointestinaltrakts (siehe Abschnitt 4.1) war bei sieben eine Methylierung der proximalen *hMLH1*-Promotorsequenz nachweisbar. Für die DNA der beiden übrigen Tumoren 94 und 152 ließ sich weder eine Methylierung noch die Nicht-Methylierung dieser Sequenz nachweisen, obwohl die Umwandlung der unmethylierten Cytosinbasen zu Uracil über den Nachweis des maternalen Methylierungsmusters des Exons 1 von *SNRPN* bestätigt wurde. Auch eine Deletion dieser Sequenz konnte mittels Überprüfung der unbehandelten DNA ausgeschlossen werden. Für sieben der Tumorproben kann die Mikrosatelliteninstabilität auf Inaktivierung des *hMLH1*-Gens über Methylierung des Promotors zurückgeführt werden. Für die beiden restlichen Proben kann keine eindeutige Aussage gemacht werden.

4.2 Untersuchung der Methylierung des CD95-Gens

In einem früheren Projekt der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Weiß waren Karzinome des Gastrointestinaltrakts, die ebenfalls aus dem Kollektiv von Herrn Dr. Kopp, Klinikum Großhadern stammten, auf *KRAS2*-Mutationen getestet worden. Der folgende Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit einem möglichen Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Mutation und der veränderten DNA-Methylierung im Bereich des Promotors und Exon 1 des CD95-Gens. Zur Aufklärung dessen wurde genomische DNA von 17 *KRAS2*^{mut} – positiven Tumoren des Gastrointestinaltrakts (15 Kolonkarzinome und 2 Magenkarzinome) aus dem oben genannten Kollektiv, für die ausreichend DNA für Southernblot-Analysen zur Verfügung stand, bezüglich ihres Methylierungsstatus mit Hilfe von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen untersucht.

4.2.1 Das CD95-Gen

Auf dem Chromosom 10 (10q24.1) lokalisiert, enthält das CD95-Gen (*TNFRSF6/Fas/Apo-1*) neun Exons und erstreckt sich über eine Länge von 25.253 bp.

In der folgenden Abbildung ist der untersuchte CG-reiche Sequenzabschnitt dieses Gens gezeigt, der den Promotor, das Exon 1 und den Anfang von Intron 1 beinhaltet. Intron 1 wurde miteinbezogen, da hier ebenfalls Enhancerelemente lokalisiert sind. Das Exon 1 ist rot hervorgehoben, wohingegen die angrenzenden Bereiche schwarz dargestellt sind. Die zum Zeitpunkt des Untersuchungsbeginns in der Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) angegebenen Polymorphismen sind hellgrau gekennzeichnet, wobei die alternative Base jeweils direkt unterhalb angegeben ist. Schwarz unterstrichen sind die Bindungsstellen der im folgenden verwendeten Oligonukleotide; die Namen der zugehörigen Primer sind ebenfalls aus der Abb. 9 ersichtlich.

In Kombination mit methylierungssensitiven Restriktionsendonukleasen wurde in dieser Arbeit mehrfach *Taq* I (TCGA) eingesetzt. Dessen beide Schnittstellen innerhalb des gezeigten Ausschnitts sind grau unterlegt. Die Zielsequenzen der übrigen relevanten Restriktionsenzyme *Bss*H II (GCGCGC), *Hind* III (AAGCTT), *Mlu* I (ACGCGT), *Pst* I (CTGCAG) und *Sma* I (CCCGGG) sind durch farbige Schrift hervorgehoben. *Bss*H II, *Mlu* I und *Sma* I schneiden DNA nicht, wenn die Cytosine in der Erkennungssequenz methyliert sind. Restriktionskarten sind zum besseren Vergleich im Zusammenhang mit den durchgeführten Versuchen den jeweils abgebildeten Southernblot-Analysen vorangestellt.

	CD95-143461f					
143461	<u>TCCCTTTTCA</u>	<u>GAGCCCTATG</u>	<u>GCGCAACATC</u>	TGTA <u>CTTTTT</u>	CATATGGTTA	ACTGTCCATT
143521	CCAGAAACGT	CTGTGAGCCT	CTCATGTTGC	AGCCACAACA	TGGACAGCCC	AGTCAAATGC
143581	CCC G CAAGTC	TTTCTCTGAG	TGACTCCAGC	AATTAGCCAA	GGTCCTGTGA	CCCAGGCAGG
143641	ACCTCTGCGC	TCTGAGCTCC	ATTCTCCTTC	AAGACCTCCC	CAACTTCCCA	GGTTGAACTA
143701	CAGCAGAAGC	CTTTAGAAAG	GGCAGGAGGC	CGGCTC <u>TCGA</u>	GGTCCTCACC	TGAAGTGAGC
143761	ATGCCAGCCA	<u>CTGCAGGAAC</u>	<u>GCCCCCGGGAC</u>	AGGAATGCCC	ATTTGTGCAA	CGAACCCCTGA
143821	CTCCTTCCTC	ACCCTGACTT	CTCCCCCTCC	CTACCC <u>GCGC</u>	<u>GCAGGCCAAG</u>	TTGCTGAATC
		G				
143881	AATGGAGCCC	TCCCCA <u>ACC</u>	<u>GGGCGTTCCC</u>	CAGCGAGGCT	TCCTTCCCAT	CCTCCTGACC
143941	ACCGGGGCTT	TTCGTGAGCT	CGTCTCTGAT	CTCGCGCAAG	AGTGACACAC	AGGTGTTCAA
144001	AGACGCTTCT	GGGGAGTGAG	GGAAGCGGTT	TACGAGTGAC	TTGGCTGGAG	CCTCAGGGGC
144061	GGGCACTGGC	ACGGAACACA	CCCTGAGGCC	AGCCCTGGCT	GCCAGGGCG	AGCTGCCTCT
144121	TCTCCCGCGG	GTTGGTGGAC	CCGCTCAGTA	CGGAGTTGGG	GAAGCTCTTT	CACTTCGGAG
					A	
144181	GATTGCTCAA	CAACCATGCT	GGGCATCTGG	ACCCTCCTAC	CTCTG GTGAG	CCCTCTCCTG
144241	<u>CCCCGGT</u> TGGA	GGCTTACCCC	GTCTTAGT <u>CC</u>	<u>CGGG</u> GATAGG	CAAAGTGGGG	CGGGCGGGG
144301	<u>ACGCGT</u> GCGG	GATTGCGGCG	GCAGCGGCGC	ACGCGGGCAC	CTGGGAGCGG	CGGGCTGCTG
144361	CGGGAGGCGT	TGGAGACTGG	CT <u>CCCCGGG</u> GG	CTGTTAGGAC	CTTCCCTCAG	<u>GCCCCGGG</u> TGC
				CD95-144450f		
				CD95-144471r		
144421	TCAGAACGCT	GGAGGACTTG	CTTTTCTTGG	<u>GCCTTGATGC</u>	<u>GAAGTGCTGA</u>	<u>CCCCGCTGGG</u>
144481	CAGGCGGGGC	AGCTCCGGCG	CTCCTCGGAG	ACCACTGCGC	TCCACGTTGA	GGTGGGCGTG
144541	GGGTGCGGAC	AGGAATTGAA	GCGGAAGTCT	GGG <u>AAGCTTT</u>	AGGGTCGCTG	GAGGGGGACC
144601	CCG <u>GTT</u> GGAG	AGAGGAGCGG	AACTCCTGGA	CAAGCCCTGA	CAAGCCAAGC	CAAAGGTCCG
	T					
144661	CTCCGGCGCG	GGTGGGTGAG	<u>TGCGCGC</u> CGC	CCC G CGGGG	CGGGGAGAGA	<u>GCCTGCAGCC</u>
144721	TTCAGAACAG	ATATTGCTCA	TTTTCTGGCA	GTTCTCAGAC	GTAGGAAATA	AGTCAGCACC
144781	GAAGCAGTGG	TTAAGCCGGA	GGGCTCGGAA	GAACGGCACC	TTTTCTTTCT	<u>CGAAAAAGTT</u>
144841	ATATGGGGGC	TGAATGAGCT	TCTGGAGGCT	TGTTTACCGT	TTTTTATTGT	CACACAGAAA
				CD95-144961r		
144901	AAGAACTGC	CTTGCTCCC	TTCCGGGAAT	TCTCTCTTTA	<u>AGACTGTAAG</u>	<u>TCGCTGCCCTG</u>
144961	<u>AGTGGTTTCA</u>	TTTTGTTTTG	TTTTTCTGCC	CTTCTCTTTC	TTCTTTTGCC	CTTCTTAGC

Abb. 9:

Überblick über die CG-reiche Sequenz des CD95-Gens im 5'-Bereich und die bekannten Polymorphismen

Das Exon 1 ist rot dargestellt, das Translations-Initiations-Kodon ATG rot unterstrichen. Grau sind die Stellen gekennzeichnet, an denen zum Zeitpunkt des Untersuchungsbeginns ein Polymorphismus bekannt war, wobei die alternative Base unterhalb davon angegeben ist. Schwarz unterstrichen sind die Bindungsstellen der verwendeten Oligonukleotide. Die Schnittstellen der Endonuklease *Taq* I sind grau unterlegt, wohingegen die Zielsequenzen der anderen Restriktionsenzyme durch farbige Schrift abgehoben sind. (*Bss*H II: GCGCGC; *Hind* III: AAGCTT; *Mlu* I: ACGCGT; *Pst* I: CTGCAG; *Sma* I: CCCGGG). Die Numerierung bezieht sich auf die Gensequenz mit Accession-Nummer AL157394.

4.2.2 Herstellung der Digoxigenin-markierten CD95-Sonde

Für die Hybridisierung der genomischen Restriktionen wurde eine Sonde etabliert, die 5'-flankierende, Exon 1- und Intron 1-Sequenzen mit den *Sma* I-Stellen umfaßt. Zur Herstellung der Digoxigenin-markierten CD95-Sonde aus 100 ng der DNA einer Normalperson wurden die Oligonukleotide CD95-143461f und CD95-144471r verwendet, die den Promotor und das Exon 1 flankieren (Abb. 9). Der erstgenannte Primer wurde in Anlehnung an die Arbeit von Santourlidis et al., 2001 gewählt.

Die Austestung der Standard-PCR-Bedingungen erbrachte gleich gute Resultate bei den verschiedenen $MgCl_2$ -Konzentrationen von 2, 3 und 4 mM und unter Zusatz von 20 % Betain. Daher wurden die Amplifikate dieser drei Ansätze vereinigt und für die Markierungs-PCR im Verhältnis 1:10 mit H_2O verdünnt. Ein μl hiervon wurde unter Einsatz der Oligonukleotide CD95-143461f und CD95-144471r amplifiziert, wobei DIG-markierte dNTP zur Anwendung kamen, wie in Abschnitt 3.4.8 beschrieben. Die Elongationszeit für die Markierungs-PCR betrug 180 sec. Zur Überprüfung des Erfolges der DIG-Markierung wurde das Amplifikat auf ein 0,7 %iges SYBR-Green-Gel aufgetragen. Als Referenz diente unmarkiertes PCR-Produkt einer Länge von 1010 bp (in Abb. 10 links erkennbar). Trotz gleicher Länge erschien das resultierende Amplifikat mit DIG-Markierung in der mittleren Spur wie erwartet weiter oberhalb, da DIG-markierte DNA wegen der Größe der zusätzlichen Seitengruppen langsamer aufgetrennt wird als unmarkierte DNA. Von der erfolgreichen Einlagerung DIG-markierter dUTP wurde somit ausgegangen.

Diese DIG-markierte CD95-Sonde wurde bei sämtlichen Hybridisierungen im Verlauf der vorliegenden Arbeit verwendet.



Abb. 10:

Überprüfen des Erfolges der DIG-Markierung

Aufgetragen wurde links DNA aus der Standard-PCR mit den Oligonukleotiden CD95-143461f und CD95-144471r und auf der mittleren Spur das DIG-markierte PCR-Produkt.

Jeweils 1 μl des Amplifikates wurde mit 14 μl H_2O und 3 μl Auftragspuffer versetzt und auf einem 0,7 %igen Agarose-SYBR-Gel aufgetrennt. Marker bezeichnet den Größenstandard 1 kb.

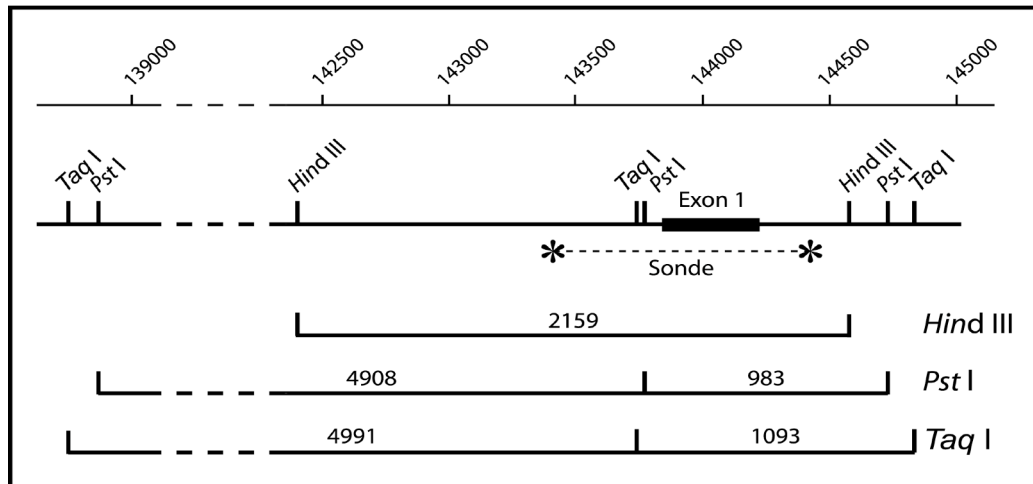
4.2.3 Auswahl von methylierungssensitiven Restriktionsenzymen

Sowohl für die Auswahl der geeigneten methylierungssensitiven Restriktionsenzyme als auch bei der späteren Untersuchung der Karzinome wurde die DNA einer Normalperson als Kontrolle verwendet. Darüber hinaus kam als Referenz die Zelllinie SW620 zum Einsatz, bei der in einer früheren Untersuchung der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Weiß eine sehr schwache *CD95*-Expression (< 10 % *CD95*-positive Zellen) nachgewiesen worden war (Gansneder, 2001). Als Strategie war eine Doppelrestriktion geplant. Im Anschluß an die Spaltung der DNA mit einem geeigneten nicht-methylierungssensitiven Restriktionsenzym wird das über Hybridisierung nachgewiesene Fragment bei Anwendung eines methylierungssensitiven Enzyms entweder weiter gespalten (keine Methylierung) oder nicht bzw. partiell (Methylierung).

4.2.3.1 Austesten der Restriktionsenzyme *Hind* III, *Pst* I und *Taq* I

Neben den DNA-Proben einer Normalperson und der Zelllinie SW620 wurde die DNA der Zelllinie HaCat dem Einzelverdau mit den Restriktionsenzymen *Hind* III, *Pst* I und *Taq* I in einem Gesamtvolumen von 40 µl unterworfen.

Die Abb. 11 b gibt die Restriktionsanalyse der drei DNA-Proben unter Anwendung der entsprechend Absatz 4.2.2 hergestellten Sonde mit den verschiedenen Enzymen wieder. Wie aus der Restriktionskarte in Abb. 11 a ersichtlich, resultiert der Einsatz von *Hind* III in Fragmenten einer Länge von 2159 bp, wohingegen die durch *Pst* I abgespaltenen DNA-Stücke 938 und 4908 bp lang sind. Die drei rechten Spuren beinhalten die mit *Taq* I verdauten Proben und lassen jeweils die mit einem Pfeil markierten 1093 und 4991 bp umfassenden Fragmente erkennen. Die aus der Analyse mittels *Pst* I und *Taq* I resultierenden verschiedenen Bandenstärken für sehr große und kleinere Spaltprodukte lassen sich aufgrund der unterschiedlich langen Überlappung der Sonde mit dem jeweiligen Fragment erklären.

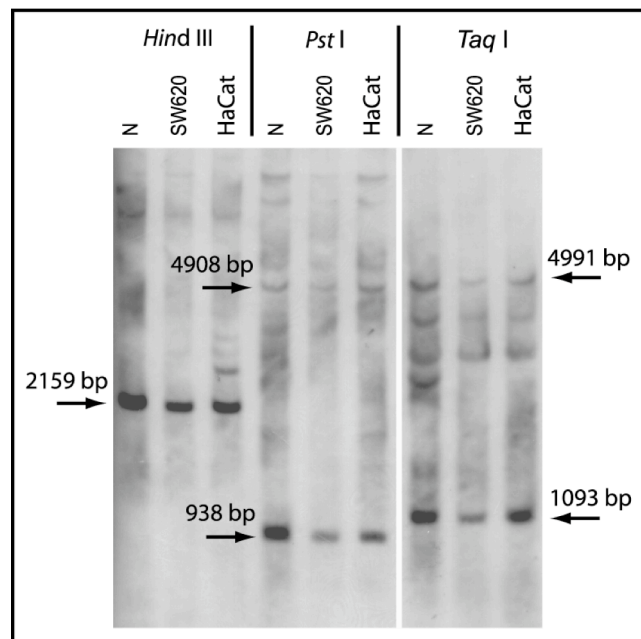
**Abb. 11 a:****Restriktionskarte für den Einzelverdau bei Einsatz der Enzyme *Hind III*, *Pst I* und *Taq I***

Die relevanten Restriktionsfragmente sind angegeben, ebenso wie der über PCR isolierte und markierte Sondenabschnitt. Die Numerierung bezieht sich auf die genomische Sequenz AL157394.

--- bezeichnet nicht maßstabgetreue Abschnitte.

Abb. 11 b:**Einzelverdau mit den Restriktionsenzymen *Hind III*, *Pst I* und *Taq I***

Jeweils 7,5 µg DNA einer Normalperson und der beiden Zelllinien SW620 und HaCat wurden anschließend an den Restriktionsverdau auf einem 0,7 %igen TPE-Gel aufgetrennt. Gekennzeichnet sind die resultierenden Fragmente, die mittels der verwendeten Sonde nachweisbar sind (siehe Abb. 11 a).



Die Sonde weist nach längerer Exposition auch zusätzliche Fragmente nach. Die stärksten Banden entsprechen den erwarteten Spaltprodukten (siehe Abb. 11 a). Von den drei hier verwendeten Restriktionsenzymen wurde im folgenden *Taq I* eingesetzt, da diese Restriktion bereits für Methylierungsstudien verwendet wurde und die Schnittstellen für die methylierungssensitiven Enzyme innerhalb dieses *Taq I*-Fragmentes liegen.

4.2.3.2 Austesten des Restriktionsenzym *Taq* I in Kombination mit den Restriktionsnukleasen *Bss*H II, *Mlu* I und *Sma* I

Anschließend wurden methylierungssensitive Restriktionsenzyme getestet, die in diesem *Taq* I-Fragment schneiden. Von den DNA-Proben der Normalperson und der Zelllinie SW620 wurden daher 30 µg DNA mit *Taq* I restringiert, die Vollständigkeit der Verdauung über Agarose-Gelelektrophorese anhand der Ethidiumbromidfärbung überprüft (siehe Abb. 12) und anschließend je 7,5 µg DNA mit *Bss*H II, *Mlu* I oder *Sma* I inkubiert. Das Vorhandensein von Spaltprodukten unterschiedlichster Länge in beiden Spuren, erkennbar an der sich über die ganze Spur erstreckende Fluoreszenz, läßt auf eine vollständige Spaltung der jeweiligen DNA durch das Enzym *Taq* I schließen.

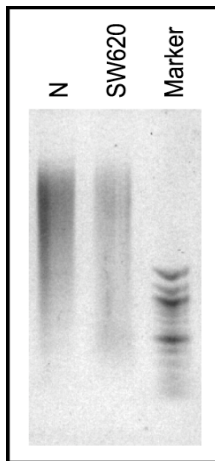


Abb. 12:
Überprüfung der Vollständigkeit des *Taq* I-Verdau bei den Kontroll-DNA-Proben einer Normalperson (N) und der Zelllinie SW620

Für den jeweils vierfachen Ansatz wurden 30 µg der entsprechenden DNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl unter Zusatz von 50 U des Enzyms *Taq* I, 100 µg/µl BSA und 10 µl des Restriktionspuffers B gespalten.

Je 450 ng jeder mit *Taq* I verdauten Probe wurden auf einem 0,7 %igen Agarose-Ethidiumbromid-Gel aufgetrennt.

Mit der laut Absatz 4.2.2 hergestellten Sonde sind im Anschluß an den *Taq* I-Verdau insgesamt zwei Fragmente nachweisbar, von denen nur das kleinere, stärker hybridisierende 1093 bp umfassende Spaltprodukt durch die drei nachfolgend eingesetzten Endonukleasen weiter geschnitten wird. Die anschließende Inkubation mit den methylierungssensitiven Restriktionsnukleasen erfolgte ÜN bei dem Temperaturoptimum des jeweils eingesetzten Enzyms.

Abb. 13 b und c zeigen die beiden DNA-Proben der Normalperson und der Zelllinie SW620 sowohl nach dem Einzelverdau mit *Taq* I, als auch nach den anschließend durchgeführten zweiten Spaltungen mit den drei verschiedenen Restriktionsenzymen *Bss*H II, *Mlu* I und *Sma* I aufgetrennt. In den untersuchten DNA-Präparaten sind diese Sequenzen nicht methyliert, da sie von den jeweiligen Restriktionsenzymen geschnitten werden.

Die jeweils links aufgebraute DNA-Probe der Normalperson weist auf dem Trenngel (Abb. 13 b) eine stärkere Fluoreszenz auf als die rechte Spur, die die DNA der Zelllinie SW620 enthält. Dies läßt auf eine größere Menge an gespaltener DNA der Normalperson schließen. Der Vergleich der Fluoreszenz-Intensität verschiedener Spuren auf dem Gel dient der späteren Interpretation der nachweisbaren Bandenstärke auf dem Blot. Die in Abb. 13 c erkennbaren deutlich schwächeren Banden gleicher Fragmentlänge für die Zelllinie SW620 im Vergleich mit denen der Normalperson läßt sich hierdurch erklären. Die geringere DNA-Konzentration der Isolate aus den gezüchteten Zelllinien im Vergleich zu der DNA aus Blut ist auf restliche RNA-Fragmente zurückzuführen, die bei der verwendeten DNA-Isolierungsmethode nicht vollständig entfernt wurden und die die Bestimmung der DNA-Konzentration über Absorptionsmessung verfälschen.

Vor dem Photographieren des Trenngels wurde ein Lineal parallel zum Spurverlauf so positioniert, daß die Zahl Null genau auf Höhe der Auftragstaschen zu liegen kam, um bei der späteren Größenbestimmung der nachgewiesenen Fragmente auf dem Röntgenfilm auf einen Referenzwert zurückgreifen zu können. In dieser Weise wurden die Agarosegele direkt vor Beginn des Blot-Aufbaus bei allen folgenden Versuchen photographiert. Nach der Denaturierung des Gels wurde der Southernblot und die anschließende Hybridisierung durchgeführt, wie in den Abschnitten 3.6.2 – 3.6.4 beschrieben. Die Größe der nach dem Blot-Vorgang sichtbaren Fragmente wurde abgeschätzt, nachdem die Banden des Längensstandards in der entsprechenden Entfernung von der Auftragstasche auf den Röntgenfilm übertragen worden waren.

Der Restriktionskarte in Abb. 13 a ist die genaue Lage der mit Hilfe der angewendeten Sonde nachweisbaren Fragmente zueinander zu entnehmen.

Die aus dem Verdau beider DNA-Proben ausschließlich mit *Taq I* hervorgehenden Spaltprodukte von 4991 bp und 1093 bp sind in den beiden linken Spuren der Abb. 13 c gekennzeichnet. Von spezifischen Banden kann wegen der eindeutig zuzuordnenden Länge daher sowohl bei der DNA der Normalperson als auch der Zelllinie SW620 ausgegangen werden. Für die zusätzlich zu den gekennzeichneten Banden nachweisbaren Fragmente konnte in der Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) kein Korrelat ausfindig gemacht werden. Als Partialverdau läßt sich dieses Phänomen allerdings nicht erklären, da diese Fragmente eine andere Länge aufweisen würden. Ein Blastvergleich der Sondensequenz zeigte keine homologen Sequenzen im humanen Genom auf, sodaß diese Kreuzhybridisierungen nicht erklärt werden können.

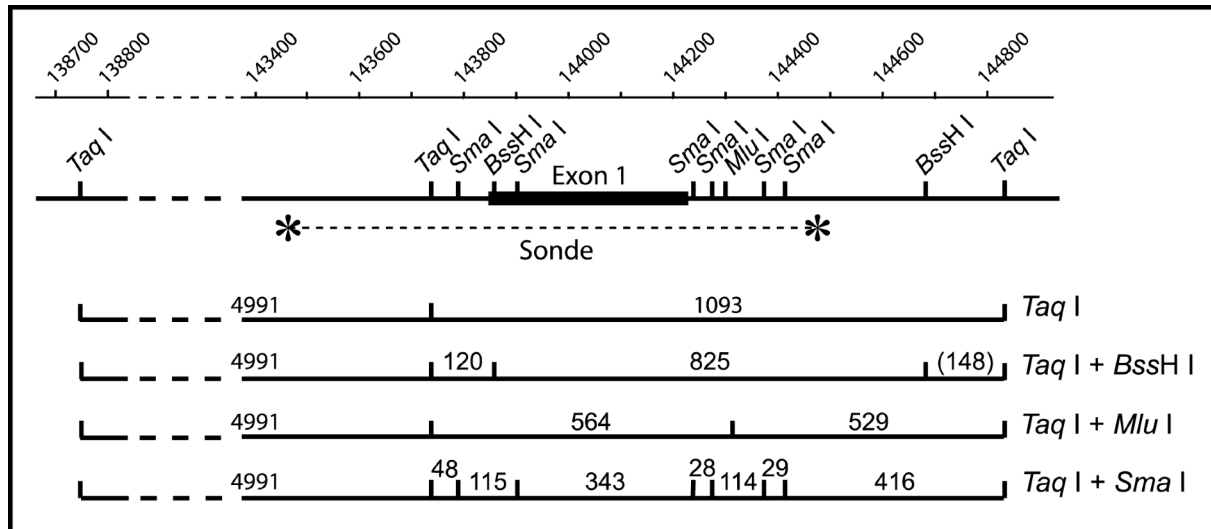


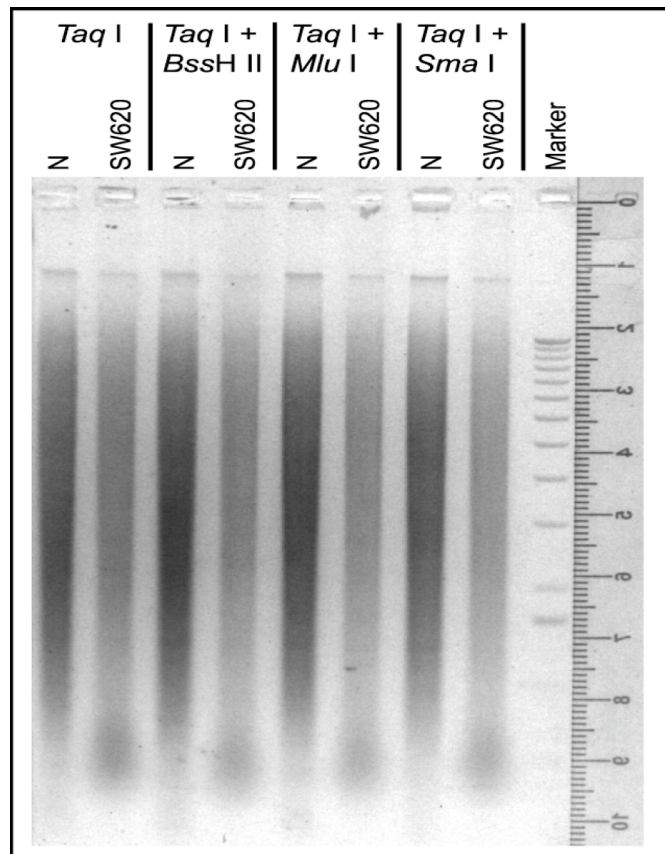
Abb. 13 a:
Restriktionskarte für den Einzelverdau mit *Taq* I und den Doppelverdau mit *Taq* I kombiniert mit *BssH* II, *Mlu* I und *Sma* I

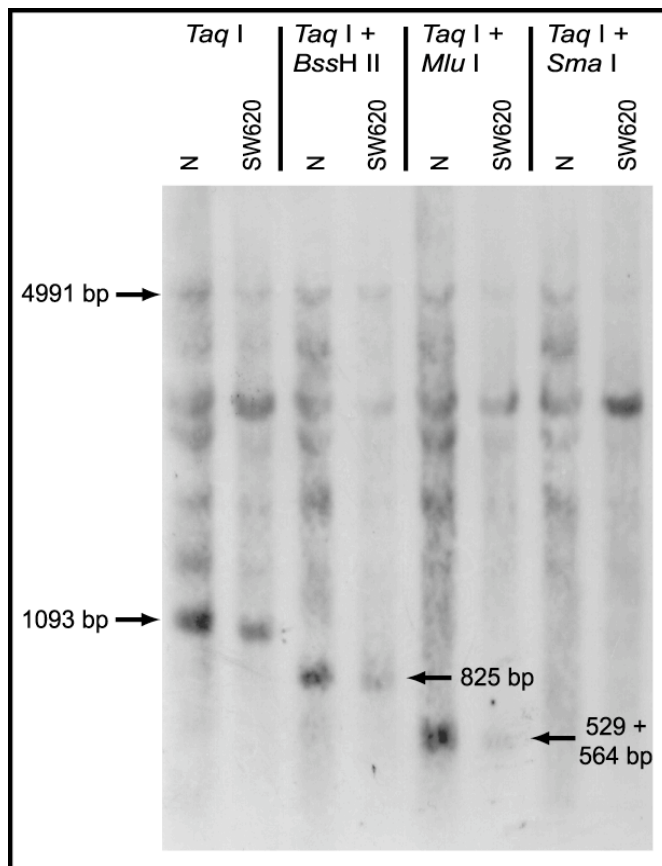
Erklärungen siehe Abb. 11 a.

Das in Klammern angegebene, aus dem Doppelverdau mit den beiden Enzymen *Taq* I und *BssH* II hervorgehende Spaltprodukt einer Länge von 148 bp wird von der Sonde nicht erfaßt.

Abb. 13 b:
Ethidiumbromidfärbung des Trenngels zum Vergleich der aufgetragenen DNA-Menge

Je 7,5 µg genomische DNA aus Blut einer Normalperson (N) und der Zelllinie SW620 wurden zuerst mit *Taq* I geschnitten und anschließend ohne weiteres Restriktionsenzym (links), mit *BssH* II, *Mlu* I oder *Sma* I inkubiert. Die Auftrennung erfolgte auf einem 0,7 %igen Agarosegel in TPE innerhalb von 8,5 h bei Anlage von 30 V.



**Abb. 13 c:****Hybridisierungsmuster des Southernblots aus Abb. 13 b mit der CD95-Sonde**

Die beiden linken Spuren beinhalten u.a. die spezifischen 4991 und 1093 bp langen *Taq* I-Fragmente (jeweils mit einem Pfeil versehen). Die markierten Spaltprodukte einer Länge von 825 bp nach dem Doppelverdau mit *Taq* I und *Bss*H II sind in der Spur 3 und 4 erkennbar, wohingegen das Fragment von 120 bp wegen seiner Kürze nicht nachweisbar ist.

Die in Spur 5 und 6 erkennbare Doppelbande nach der Restriktion mit *Taq* I und *Mlu* I enthält beinhaltet die sich in ihrer Länge relativ wenig unterscheidenden Fragmente von 564 und 529 bp.

Das aus dem Einzelverdau mit *Taq* I resultierende Restriktionsfragment einer Länge von 4991 bp enthält keine Schnittstellen der nachfolgend angewandten Enzyme und wurde daher nicht erneut geschnitten, weshalb sich die entsprechende Bande in allen Spuren nachweisen lässt. Die einer Fragmentlänge von 1093 bp entsprechende Bande ist hingegen nur in den beiden linken Spuren erkennbar, da sich innerhalb dieses Spaltproduktes Zielsequenzen aller drei nachfolgend eingesetzten Nukleasen befinden.

Bei dem ersten der in Kombination mit *Taq* I angewandten Restriktionsenzyme handelte es sich um *Bss*H II, dessen Schnittstelle GCGCGC im Bereich dieses *Taq* I-Fragments zweimal vorhanden ist. Abgesehen von einem mit der verwendeten Sonde nicht nachweisbaren Spaltprodukt von 148 bp Länge resultieren zwei Fragmente einer Länge von 825 und 120 bp. Das Kürzere dieser beiden war auf dem Blot nicht nachweisbar, wohingegen die auf der dritten und vierten Spur von links auffälligste Bande dem 825 bp langen DNA-Bereich entspricht.

Durch Spalten des 1093 bp großen *Taq* I-Fragments an dessen einziger *Mlu* I-Schnittstelle entstehen Restriktionsfragmente der Längen 564 und 529 bp. Diese beiden sich in ihrer Länge nur wenig unterscheidenden Fragmente wurden auf dem Gel nicht ausreichend separiert, sodaß anstatt zwei einzelner Banden ein besonders starkes Signal resultiert, das beide Fragmente beinhaltet. In Spur 5 und schwach auch in Spur 6 der Abb. 13 c im unteren Bereich ist diese Doppelbande zu erkennen.

Innerhalb des 1093 bp umfassenden *Taq* I-Fragmentes befinden sich sechs *Sma* I-Schnittstellen. Die Anwendung dieses Enzyms bewirkt folglich eine Spaltung in sieben Fragmente der Längen von 416, 343, 115, 114, 48, 29 und 28 bp. Das größte dieser Bruchstücke wird allerdings nur in einem minimalen Bereich von der Sonde überlagert und ist daher generell schwer nachzuweisen. In diesem Southernblot konnte weder dieses noch die übrigen Spaltprodukte visualisiert werden. Von einem vollständigen *Sma* I-Verdau kann allerdings trotz fehlenden Nachweises der Restriktionsfragmente ausgegangen werden, da das ursprüngliche 1093 bp lange Fragment ebenfalls nicht mehr erkennbar ist und somit gespalten worden sein muß.

Für die Charakterisierung der Tumorproben bezüglich ihrer Methylierung wurde im weiteren die Methode des Doppelverdaus mit den Restriktionsenzymen *Taq* I und *Sma* I gewählt, da hierdurch die meisten methylierungssensitiven Schnittstellen gleichzeitig untersucht werden konnten.

4.2.4 Restriktionsanalyse von Tumorproben mit den Nukleasen *Taq* I und *Sma* I und anschließender Southernblot

Von den 17 *KRAS2*^{mut} – positiven Tumoren des Gastrointestinaltrakts wurden anfänglich jene untersucht, von denen die größten DNA-Mengen zur Verfügung standen. Die Restriktionsanalyse mit den Enzymen *Taq* I und *Sma* I wurde außer mit den Karzinomproben auch mit der DNA einer Normalperson durchgeführt. Darüber hinaus wurde die DNA der Zelllinie SW620 sowohl der Spaltung ausschließlich mit *Taq* I als auch dem Doppelverdau mit *Taq* I und *Sma* I unterzogen.

Der Master-Mix für den zuerst durchgeführten *Taq* I-Verdau bestand aus 2,5 µl 10 x-Restriktionspuffer B und 15 U *Taq* I je Probe. Von jeder Tumorprobe wurden 7,5 µg DNA entnommen, mit bidestilliertem H₂O auf ein Volumen von 20,75 µl aufgefüllt und mit 4,25 µl des Master-Mix versetzt. Nach einer Inkubationsdauer von 8 h wurde die Vollständigkeit des Verdau der Proben mittels Auftrennung auf einem 0,7 %igen EtBr-Gel überprüft. Die

anschließende Spaltung durch das Enzym *Sma* I erfolgte bei Zimmertemperatur wie in Abschnitt 4.2.3.2 beschrieben. Nach der Inkubation über Nacht wurden die Proben auf ein 0,7 %iges Agarosegel in TPE aufgetragen und unter Anlage von 30 V innerhalb von 7,5 h aufgetrennt.

In Abb. 14 b ist das Trenngel mit den aufgetragenen Proben dargestellt. Die relativ geringe Fluoreszenz auf den Spuren, die die Proben 30, 56 und 142 enthielten, läßt auf eine im Vergleich zu den anderen Tumorproben geringere Menge aufgetragener DNA schließen. Die schwache Intensität der Banden für diese Tumorproben in Abb. 14 c ist die Folge dessen. Der Southernblot, die Hybridisierung, die Immundetektion und die Exposition mit dem Röntgenfilm wurde, wie in Absatz 3.6.2 – 3.6.4 beschrieben, durchgeführt. Um die zum Teil relativ kleinen *Sma* I-Fragmente sichtbar machen zu können, war eine vergleichsweise lange Expositionszeit notwendig, die allerdings auch die Ursache für die starke Kreuzreaktion darstellt. Abb. 14 c gibt das Ergebnis dieses Southernblots wieder.

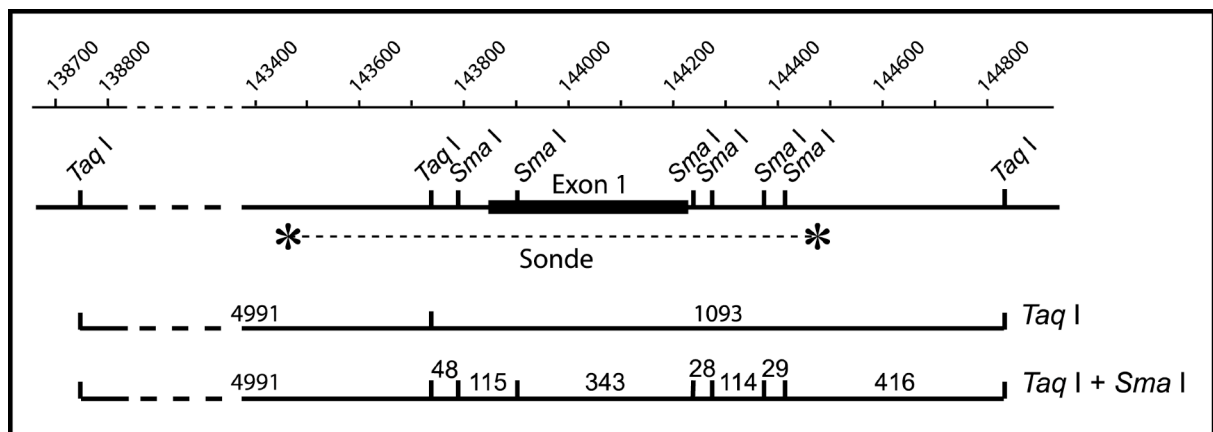


Abb. 14 a:
Restriktionskarte für den Einzelverdau mit *Taq* I und den Doppelverdau mit *Taq* I kombiniert *Sma* I
 Erklärungen siehe Abb. 11 a.

In der zweiten Spur von links auf dem Gel war die Probe der Zelllinie SW620 enthalten, die dem Einzelverdau mit *Taq* I zugeführt worden war. Auf dem in Abb. 14 c dargestellten Film ist mit einem Pfeil diejenige Bande markiert, die die diagnostischen *Taq* I-Fragmente einer Länge von 1093 bp beinhaltet.

Abb. 14 b:
Ethidiumbromidfärbung der aufgetrennten, restringierten genomischen DNA aus Tumorzellen

Sowohl von der ausschließlich mit *Taq* I geschnittenen Probe der Zelllinie SW620 als auch von allen übrigen mit den beiden Enzymen *Taq* I und *Sma* I doppelt-verdauten DNA-Proben wurden jeweils 7,5 µg auf einem 0,7 %igen Agarosegel in TPE unter Anlage von 30 V innerhalb von 7,5 h aufgetrennt.

Bei dem verwendeten Marker handelte es sich um 400 ng der 1 kb⁺-Leiter.

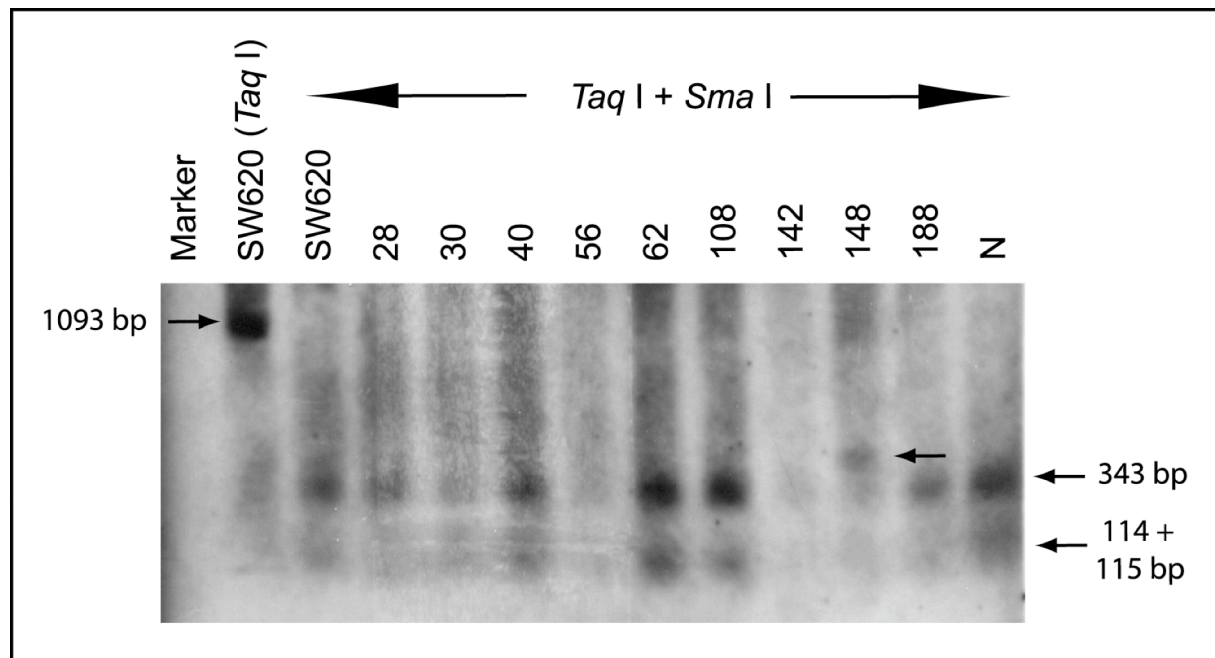
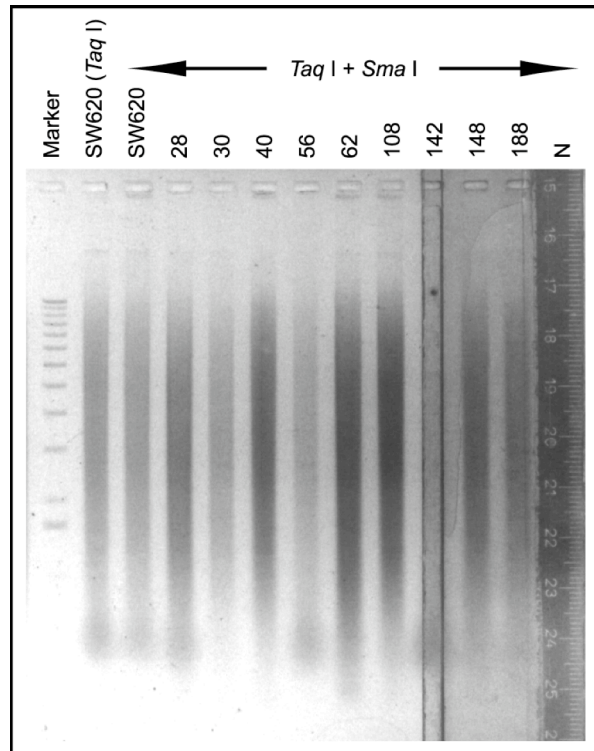


Abb. 14 c:
Restriktionsanalyse eines Teils der zu untersuchenden Kolonkarzinomproben mit den Restriktionsenzymen *Taq* I und *Sma* I

Der Southernblot aus Abb. 14 b wurde mit der *CD95*-Sonde hybridisiert. Die Exposition der Membran mit dem Röntgenfilm betrug 2 h.

In allen Doppelrestriktionen wird das 1093 bp-*Taq* I-Fragment von *Sma* I geschnitten. Überdies sind in allen Spuren, in denen eine ausreichende Menge der mit beiden Restriktionsenzymen gespaltenen DNA-Menge aufgebracht worden war (Proben SW620, 28, 30, 40, 62, 108, 142, 188, N), ein oder zwei kleinere Banden spezifischer Länge erkennbar. In diesen Tumorproben sind die *Sma* I-Erkennungssequenzen im Promotor, Exon 1 und Intron-Enhancer von *CD95* nicht methyliert. Bei allen DNA-Proben, die mit beiden Enzymen verdaut worden waren, mit Ausnahme der Kolonkarzinomprobe 148, liegen diese beiden erkennbaren Banden auf jeweils gleicher Höhe und sind rechts mit zwei Pfeilen unter Angabe der jeweiligen Fragmentlänge gekennzeichnet.

Der Doppelverdau der Tumorprobe 148 bildet eine Ausnahme, da hierbei ein zusätzliches Spaltprodukt auffällt, das bei keiner der anderen Proben nachweisbar war. In Abb. 14 c ist es mit einem Pfeil gekennzeichnet. Desweiteren fehlt im Vergleich zu allen anderen gezeigten Tumorproben bei dem Karzinom 148 die obere der beiden Banden, gleichzeitig ist die Doppelbande nur äußerst schwach erkennbar. Der Nachweis eines zusätzlichen größeren Spaltproduktes bei gleichzeitigem Fehlen eines kleinen zeigt an, daß das *Taq* I-Fragment an einer der *Sma* I-Schnittstellen wegen Methylierung nicht gespalten worden ist. Die genauere Untersuchung der Abweichung der Kolonkarzinomprobe 148 von den anderen Tumorproben ist Gegenstand des Abschnittes 4.2.5.

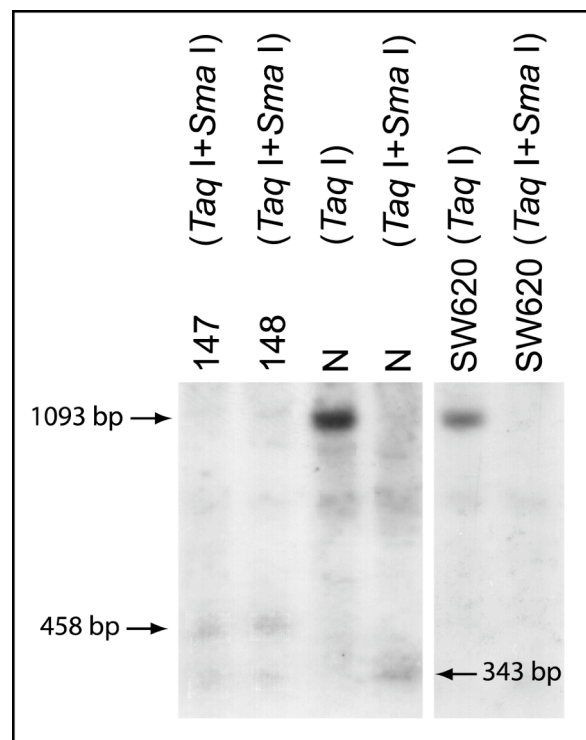
Auf dem in Abb. 14 c dargestellten Film sind die aus der Restriktionsanalyse mit *Taq* I und *Sma* I resultierenden Fragmente in den Spuren der Tumorproben 56 und 142 unzureichend erkennbar, da hier relativ wenig DNA aufgetragen worden war. Der Unterschied in der Menge der gespaltenen DNA ist in Abb. 14 b aus der im Vergleich zu den anderen Proben geringen Fluoreszenz ersichtlich. Neben diesen beiden Proben 56 und 142 wurde das Kolonkarzinom 148, das durch die zusätzliche Bande aufgefallen war, erneut der Restriktionsanalyse unterworfen. Ebenso wurden weitere zehn 17 *KRAS2*^{mut} – positive Tumoren des Gastrointestinaltrakts bezüglich der Methylierung ihrer *Sma* I-Schnittstellen in der 5'-*CD95*-Gensequenz untersucht. Sowohl die Spaltung mittels *Taq* I und der nachfolgende Probeauftrag auf einem EtBr-Gel als auch die Anwendung des Restriktionsenzym *Sma* I erfolgte in der gleichen Weise wie oben beschrieben. Der Southernblot und die anschließende Immundetektion wurde ebenfalls wie angegeben vorgenommen.

Die Restriktionsanalyse der weiteren untersuchten zehn Karzinom-DNA resultierte in folgendem Ergebnis: keine der untersuchten *Sma* I-Erkennungssequenzen liegt in methyliertem Zustand vor. Das gleiche Resultat wurde auch bei der erneuten Spaltung der Proben 56 und 142 unter Einsatz einer erhöhten DNA-Menge erzielt. Wegen der Übereinstimmung dieser Restriktionsanalysen mit der Abb. 14 c wurde auf die Darstellung dieser Proben

verzichtet. Von dem entsprechenden Southernblot ist daher in Abb. 15 nur derjenige Ausschnitt gezeigt, der die wiederholte Analyse des Tumors 148 wiedergibt, welcher durch das von den anderen Karzinomen abweichende Restriktionsmuster aufgefallen war. Da das größere Fragment der *Taq I/Sma I*-Doppelrestriktion durch Methylierung oder einen Polymorphismus in CCGGG erklärt werden kann, wurde auch die "normale" DNA aus Blut (DNA 147) des Tumorpatienten analysiert.

Abb. 15:
Restriktionsanalyse der varianten DNA sowohl aus Tumormaterial (148) als auch aus Blutzellen (147) mit den Restriktionsenzymen *Taq I* und *Sma I*

Details siehe Legende Abb. 13 c und 14 c. Die Expositionszeit betrug bei diesem Röntgenfilm 3,25 h. Erklärungen zur Bande einer Länge von 458 bp siehe Abschnitt 4.2.5.2.



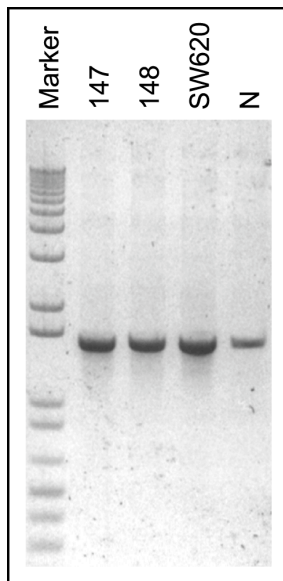
Im Vergleich zu den bei den Referenzproben (DNA aus Blut einer Normalperson (N) und der Zelllinie 620) im Doppolverdau nachweisbaren Fragmenten ist wiederum für den Tumor 148 ein zusätzliches Spaltprodukt erkennbar. Die selbe Variante im Restriktionsmuster tritt auch bei Untersuchung der Blut-DNA des gleichen Patienten auf (Probe 147). Die Abweichung innerhalb der DNA betrifft folglich nicht nur die Karzinomzellen, sondern ist auch in normaler DNA dieser Person vorhanden. Die Vermutung, daß an einer der *Sma I*-Schnittstellen ein Polymorphismus und keine Methylierung in der Sequenz vorhanden sein könnte, die die Spaltung in diesem Bereich verhindert, wurde im folgenden mittels Restriktion amplifizierter DNA näher untersucht.

4.2.5 Analyse der Proben 147 und 148

Die im vorhergehenden Abschnitt beschriebene Vorgehensweise der Spaltung unveränderter DNA, nachfolgender Auftrennung auf einem Agarosegel und anschließender Southernblot incl. Hybridisierung und Immundetektion der Membran birgt den Nachteil, daß Fragmente, deren homologe Sequenz zur Sonde relativ kurz ist, evtl. nicht erfaßt werden. Dies ist vor allem bei sehr kurzen Spaltprodukten der Fall, sowie bei Überlappung eines längeren Fragmentes mit der Sonde in einem nur äußerst geringen Bereich (siehe auch die obigen *Sma* I-Restriktionen. Erfolgt vor der Spaltung der DNA mittels der Restriktionsenzyme hingegen eine Amplifikation des relevanten Abschnittes, so können die Spaltprodukte sofort nach der Auftrennung auf einem Agarosegel visualisiert werden. Eine Methylierung wird in der PCR nicht weitergegeben, sodaß eine nicht geschnittene Erkennungssequenz auf eine Variation zurückgeführt werden kann. Diese Variation kann durch Sequenzbestimmung der amplifizierten DNA genau bestimmt werden. Die DNA der Karzinomprobe 148 und der PBL des gleichen Patienten (147) wurden im folgenden entsprechend untersucht.

4.2.5.1 Amplifikation der varianten CD95-Gensequenz mit dem Oligonukleotidpaar CD95-143461f und CD95-144961r

Während für die Amplifikation der DNA erneut das Oligonukleotid CD95-143461f gewählt wurde, das bereits für die Herstellung der Sonde gedient hatte, kam als Reverse-Primer ein weiter stromabwärts bindendes Oligomer zum Einsatz. Durch die Verwendung dieses Oligonukleotids CD95-144961r wurde auch die Einbeziehung einer weiteren *Taq* I-Schnittstelle erreicht. Die Bedingungen waren annähernd identisch mit denjenigen, die sich für das Oligonukleotidpaar CD95-143461f und CD95-144471r als optimal erwiesen hatten. Wegen des größeren Ausmaßes des zu erwartenden Amplifikates von 1500 bp wurde die Elongationszeit auf 90 sec verlängert. Um über eine ausreichende Menge an Amplifikat sowohl für eine erneute Restriktionsanalyse als auch für eine Sequenzierung des entsprechenden Bereiches zu verfügen, wurden die Proben 147, 148, SW620 und die DNA einer Normalperson mit dem Oligonukleotidpaar CD95-143461f und CD95-144961r in jeweils siebenfachen Ansätzen amplifiziert. Nach Vereinigung der sieben Ansätze einer Probe wurde das PCR-Produkt mittels des Kits NucleoTrap gereinigt und in 75 µl H₂O gelöst. Die Konzentration der gereinigten Amplifikate wurde auf einem Agarosegel im Vergleich zum Größenstandard abgeschätzt (Abb. 16).

**Abb. 16:****Abschätzung der DNA-Menge aus der Amplifikation mit den Oligonukleotiden CD95-143461f und CD95-144961r**

Die aus den sieben PCR-Ansätzen jeder Probe vereinigten Amplifikate wurden mit dem Kit NucleoTrap gereinigt und in 75 μl H_2O gelöst. Zur Mengenabschätzung wurde hiervon 1 μl und 8 μl (160 ng) der 1 kb⁺-Leiter auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt.

Die Banden des Größenstandards wurden mit denjenigen der aufgetrennten Proben hinsichtlich ihrer Intensität verglichen, wodurch sich die auf jeder Spur befindliche DNA-Menge abschätzen ließ. Im Falle der Probe 147 und 148 handelt es sich um etwa 30-50 ng DNA pro Spur, was bei einem Auftrag von 1 μl gereinigten Amplifikates einer Konzentration von 30-50 ng/ μl entspricht.

4.2.5.2 Restriktionsanalyse der Amplifikate der Tumorproben 147 und 148 mit den Enzymen *Taq I* und *Sma I*

Für die nachfolgende Restriktionsanalyse wurden die gereinigten Produkte der im Abschnitt 4.2.5.1 beschriebenen PCR eingesetzt. Die alleinige Spaltung durch *Taq I* (1 U pro Ansatz) erfolgte in einem Volumen von 20 μl und enthielt im Falle der Normalperson 3 μl , für die Analyse der übrigen Proben jeweils 2 μl der gereinigten Amplifikate. Allen Ansätzen, in denen *Taq I* zum Einsatz kam, wurde neben einer vom Hersteller empfohlenen Menge des Restriktionspuffers B 100 ng/ μl BSA zugesetzt. Die Inkubationszeit betrug jeweils 2,5 h.

Bei der Doppel-Restriktionsanalyse mit den beiden Enzymen wurde von der Probe der Normalperson hierfür 5 μl , für die übrigen Proben 4 μl der jeweiligen gereinigten DNA (Abb. 16) eingesetzt. Für den nachfolgenden Verdau wurden 1,5 U *Sma I*, 1,5 μl Restriktionspuffer A und 12 μl H_2O zugegeben, sodaß ein Gesamtvolumen von 37,5 μl resultierte. Die Inkubation erfolgte ÜN.

Abb. 17 zeigt die Amplifikate der PCR mit dem Oligonukleotidpaar CD95-143461f und CD95-144961r sowohl nach Einzel- als auch Doppelverdau auf einem EtBr-Gel aufgetrennt. Von den paarweise nebeneinander aufgetragenen Proben gleicher Herkunft sind jeweils links die ausschließlich mit *Taq* I geschnittenen Spaltprodukte dargestellt. Die Kennzeichnung der Lokalisation der resultierenden drei *Taq* I-Fragmente mit entsprechender Längenangabe erfolgte am linken Bildrand. Die jeweils rechts gelegene Spur läßt das Resultat des Doppelverdau der entsprechenden Probe mit *Taq* I und *Sma* I erkennen.

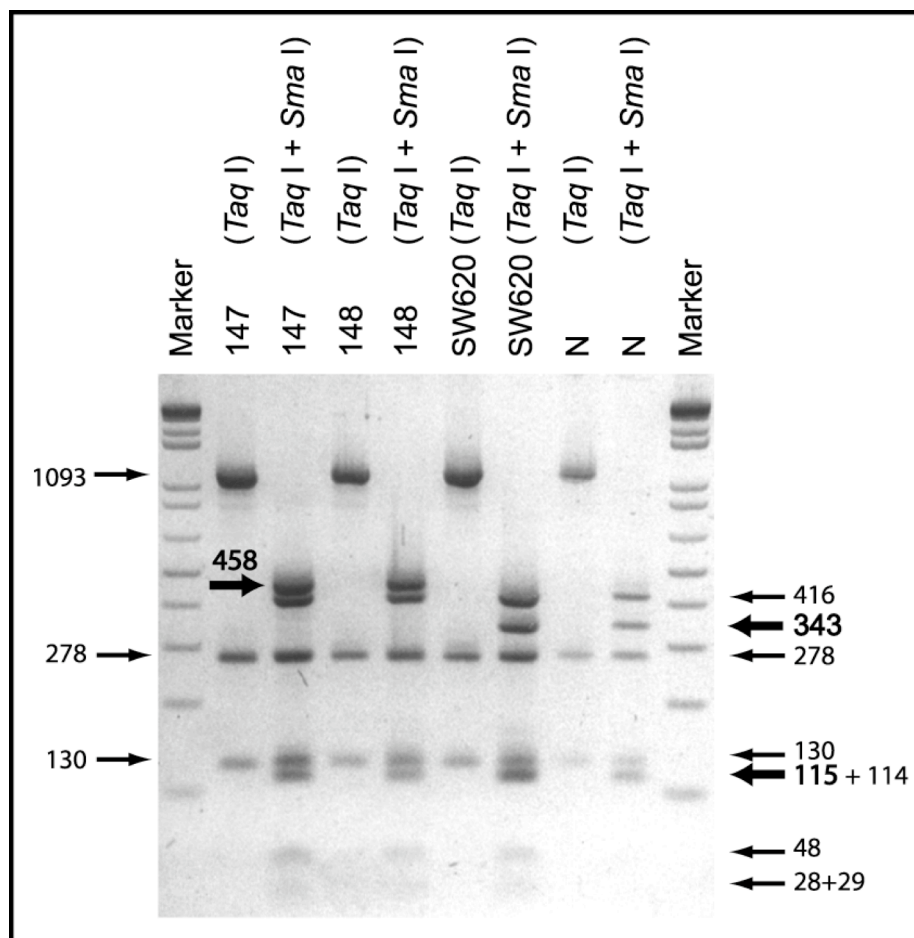


Abb. 17:

Restriktionsanalyse der Proben 147 und 148 mittels der Enzyme *Taq* I und *Sma* I

Das gesamte Volumen jedes Restriktionsansatzes wurde auf einem 1 %igen EtBr-Gel aufgetrennt. Von den paarweise nebeneinander aufgetragenen DNA-Proben ist links jeweils diejenige nach Einzelverdau mit *Taq* I und rechts davon diejenige nach Doppelverdau mit *Taq* I und *Sma* I dargestellt. Am linken Bildrand ist die Lokalisation aller drei *Taq* I-Fragmente angegeben. Das 1093 bp umfassende Spaltprodukt wird als einziges im nachfolgenden *Sma* I-Verdau weiter fragmentiert. Vollständiger Verdau der DNA einer Normalperson (N) und der Zelllinie SW620 mit *Taq* I und *Sma* I resultiert in den am rechten Bildrand gekennzeichneten Spaltprodukten. Hierbei sind zwei Doppelbanden nachweisbar. Von dem zu erwartenden Restriktionsmuster abweichend stellen sich die Proben 147 und 148 dar, bei denen außer dem Vorhandensein einer zusätzlichen Bande von 458 bp das Fragment einer Länge von 343 bp nicht nachgewiesen werden konnte. Desweiteren liegt bei diesen beiden Proben eine singuläre statt einer Doppelbande wie bei den Kontrollproben (115 + 114 bp) vor.

Während die *Taq* I-Spaltprodukte der Längen 130 und 278 bp keine *Sma* I Schnittstellen besitzen und somit unverändert bestehen bleiben, unterliegt der 1093 bp umfassende DNA-Bereich einer Fragmentierung durch *Sma* I in sieben Einzelteile. Größe und Lokalisation der zu erwartenden Spaltprodukte für die DNA-Probe der Normalperson und der Zelllinie SW620 bei Anwendung beider Enzyme ist am rechten Bildrand ersichtlich. Bei der DNA der Normalperson und der Zelllinie SW620 lassen sich die Fragmente einer Länge von 28 und 29 bp sowie 114 und 115 bp wegen einer ungenügenden Separierung aufgrund des sehr geringen Größenunterschieds als Doppelbanden erkennen. In Relation zur Länge der jeweiligen Fragmente treten sie deutlicher hervor als die übrigen Banden. Trotz des Vorhandenseins von insgesamt neun Fragmenten nach dem Doppelverdau sind daher bei den Kontroll-Nukleinsäuren der Normalperson und der Zelllinie SW620 außer den beiden unveränderten *Taq* I-Spaltprodukten nur fünf weitere Banden nachweisbar.

Während alle vier DNA-Proben bei alleiniger Anwendung der Restriktionsnuklease *Taq* I das gleiche Resultat hervorbrachten, wichen die Bandenmuster der Probe 147 und 148 beim Doppelverdau mit *Taq* I und *Sma* I in der selben Weise von demjenigen der DNA einer Normalperson und der Zelllinie SW620 ab. Neben dem Fehlen des Fragments einer Länge von 343 bp bei diesen beiden Proben, fällt eine zusätzliche Bande oberhalb des erwarteten Spaltproduktes von 416 bp auf. Die Größenabschätzung dieses Fragments allein legt die Vermutung nahe, daß die *Sma* I-Schnittstelle in Exon 1, die in der Restriktionskarte in Abb. 18 mit einem Stern markiert ist, von dem Enzym *Sma* I nicht erkannt wurde.

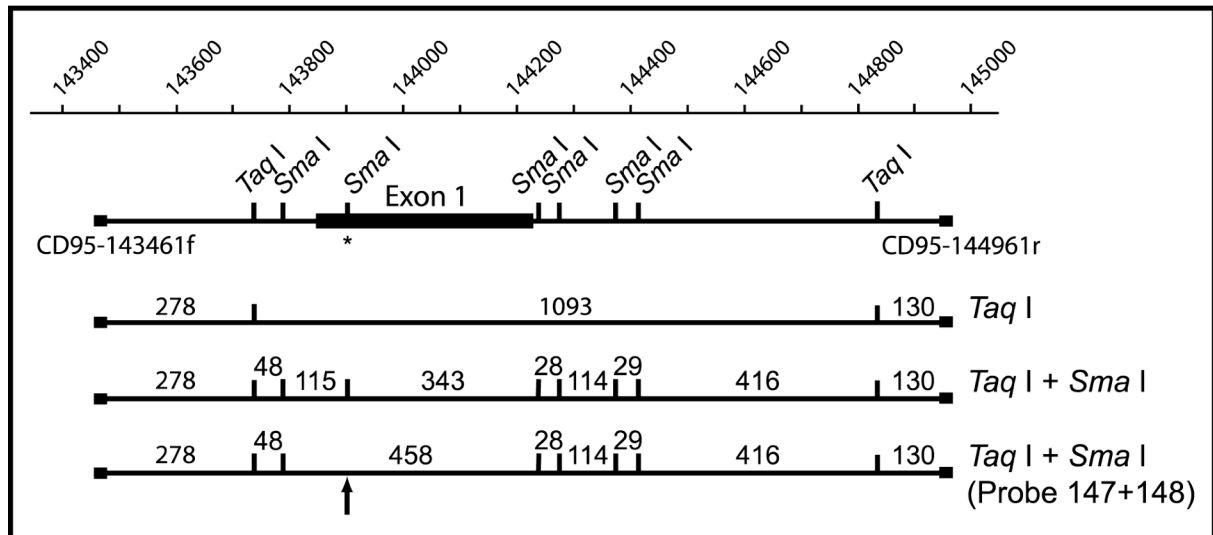


Abb. 18:

Restriktionskarte der Proben 147 und 148 im Vergleich zur DNA einer Normalperson für den Einzelverdau mittels *Taq* I und den Doppelverdau mit *Taq* I kombiniert mit *Sma* I

Mit einem Pfeil markiert ist die *Sma* I-Schnittstelle, für die ein Polymorphismus nachgewiesen wurde.

Im diesem Fall entstünde ein zusätzliches Fragment von 458 bp (343 + 115 bp). Bei genauer Betrachtung der Abb. 17 erkennt man, daß die DNA-Proben 147 und 148 vermutlich eine singuläre (114 bp) anstatt eine Doppelbande wie bei den Proben der Normalperson und der Zelllinie SW620 auf Höhe der Fragmente 115 und 114 bp aufweist. Dies in Zusammenhang mit dem Fehlen der Bande bei 343 bp spricht für eine nicht erfolgte Restriktion der Schnittstelle, die in Abb. 18 mit einem Pfeil markiert ist. Die Lokalisation der beiden für die DNA-Proben 147 und 148 nicht nachweisbaren Fragmente sowie diejenige für das zusätzliche Spaltprodukt sind in Abb. 18 mit dicken Pfeilen gekennzeichnet. Es wurde postuliert, die betroffene *Sma* I-Schnittstelle bei beiden DNA-Proben sei polymorph. Somit bestünde diesbezüglich kein Unterschied zwischen dem Kolonkarzinom 148 und der DNA der PBL bei der gleichen Person (Probe 147).

Die Recherche in der Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ergab keinen Hinweis auf einen Polymorphismus in diesem Bereich. Zur genaueren Abklärung wurden die Proben 147 und 148 sequenziert.

4.2.5.3 Sequenzierung zur Bestätigung des Vorhandenseins eines Polymorphismus bei den Proben 147 und 148

Wie in Abschnitt 4.2.5.1 beschrieben, waren der 5'-Genbereich von *CD95* für die DNA-Proben 147 und 148 mit dem Oligonukleotidpaar CD95-143461f und CD95-144961r amplifiziert worden. Diese PCR-Produkte dienten im folgenden der Sequenzierung des 1,5 kb umfassenden Bereiches. Hierzu kam neben den bereits vorhandenen Oligonukleotiden (CD95-143461f, CD95-144471r und CD95-144961r) zusätzlich der Primer CD95-144450f zur Anwendung.

Die Amplifikate der genomischen DNA aus Blut (147) und der Tumorprobe (Kolonkarzinom 148) ergaben dieselbe Sequenz. Neben den in der Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) beschriebenen Polymorphismen wurden weitere vier singuläre Nukleotidaustausche festgestellt (Abb. 19). Die Amplifikate waren in allen Positionen homozygot für die polymorphe Base.

Der nachgewiesene RFLP läßt sich durch einen G→A-Austausch innerhalb der polymorphen *Sma* I-Schnittstelle erklären. Von der normalen Zielsequenz dieses Restriktionsenzym (CCCGGG) unterscheidet sich der hier nachweisbare Bereich durch die Basenabfolge CCCAGG. Der Austausch G→A kann durch eine früher vorhandene Methylierung entstanden sein. Eine Desaminierung des 5-Methylcytosins auf dem Gegenstrang bewirkte möglicherweise seine Überführung in Thymin. Somit könnte dieser *Sma* I-RFLP die Folge einer ehemaligen Cytosinmethylierung sein. Weiterhin fallen drei weitere Polymorphismen im Intron auf, die nicht in der Konstellation CpG vorliegen und daher auch nicht durch die Methylierung von Cytosinbasen entstanden sein können. Mittlerweile sind drei der Austausche als SNP in der Datenbank aufgeführt: 6 = dbSNP 9658677, 9 = dbSNP 70799111 und 10 = dbSNP 3740286. Als neuer Polymorphismus bleibt der Austausch C→T in Position 144471. Weiterhin wurde nachgewiesen, daß das 3'-Nukleotid (11 = dbSNP 4064) des Primers CD95-144961r polymorph ist. Daher kann es sein, daß die bestimmte Sequenz nur von einem Allel amplifiziert wurde.

	CD95-143461f						
143461	<u>TCCCTTTTCA</u>	<u>GAGCCCTATG</u>	<u>GCGCAACATC</u>	TGTA <u>CTTTTT</u>	CATATGGTTA	ACTGTCCATT	C(1)
143521	CCAGAAACGT	CTGTGAGCCT	CTCATGTTGC	AGCCACAACA	TGGACAGCCC	AGTCAAATGC	G(2)
143581	CCC G CAAGTC	TTTCTCTGAG	TGACTCCAGC	AATTAGCCAA	GGCTCCTGTA	CCCAGGCAGG	
143641	ACCTCTGCGC	TCTGAGCTCC	ATTCTCCTTC	AAGACCTCCC	CAACTTCCCA	GGTTGAACTA	
143701	CAGCAGAAGC	CTTTAGAAAG	GGCAGGAGGC	CGGCTCTCGA	GGTCCTCACC	TGAAGTGAGC	(3)A
143761	ATGCCAGCCA	CTGCAGGAAC	GC <u>CCCCGG</u> AC	AGGAATGCC	ATTTGTGCAA	CGAACCCCTGA	T(4)
143821	CTCCTTCCTC	ACCCTGACTT	CTCCCCCTCC	CTACCCGCGC	GCAGGCCAAG	TTGCTGAATC	G(5)
143881	AATGGAGCCC	TCCCCAACCC	AGGCGTTCCC	CAGCGAGGCT	TCCTTCCCAT	CCTCCTGACC	G(6)
143941	ACCGGGGCTT	TTCGTGAGCT	CGTCTCTGAT	CTCGCGCAAG	AGTGACACAC	AGGTGTTCAA	
144001	AGACGCTTCT	GGGGAGTGAG	GGAAGCGGTT	TACGAGTGAC	TTGGCTGGAG	CCTCAGGGGC	
144061	GGGCACTGGC	ACGGAACACA	CCCTGAGGCC	AGCCCTGGCT	GCCAGGCGG	AGCTGCCTCT	A(7)
144121	TCTCCGCGG	GTTGGTGGAC	CCGCTCAGTA	CGGAGTTGGG	GAAGCTCTTT	CACTTCGGAG	A(8)
144181	GATTGCTCAA	CAACCATGCT	GGGCATCTGG	ACCCTCCTAC	CTCTGGTGAG	CCCTCTCCTG	
144241	<u>CCCCGGT</u> TGGA	GGCTTACCCC	GTCTTAGTCC	<u>CGGG</u> GATAGG	CAAAGTGGGG	CGGGCGCGGG	
144301	ACGCGTGCGG	GATTGCGGCG	GCAGCGGCGC	ACGCGGGCAC	CTGGGAGCGG	CGGGCTGCTG	
144361	CGGGAGGCGT	TGGAGACTGG	CT <u>CCCCGGG</u> G	CTGTTAGGAC	CTTCCCTCAG	<u>CCCCGGG</u> TGC	
	CD95-144450f						
	CD95-144471r						
144421	TCAGAACGCT	GGAGGACTTG	CTTTTCTTGG	<u>GCCTTGATGC</u>	<u>GAAGTGCTGA</u>	T CCCGCTGGG	C
144481	CAGGCGGGGC	AGCTCCGGCG	CTCCTCGGAG	ACCACTGCGC	TCCACGTTGA	GGTGGGCGTG	
144541	GGG G CGGAC	AGGAATTGAA	GCGGAAGTCT	GGGAAGCTTT	AGGGTCGCTG	GAGGGGACC	T(9)
144601	CCGTTTGGAG	AGAGGAGCGG	AACTCCTGGA	CAAGCCCTGA	CAAGCCAAGC	CAAAGGTCCG	
144661	CTCCGGCGCG	GGTGGGTGAG	TGCGCGCCGC	CCC G CGGGG	CGGGGAGAGA	GCCTGCAGCC	
144721	TTCAGAACAG	ATATTGCTCA	TTTTCTGGCA	GTTCTCAGAC	GTAGGAAATA	AGTCAGCACC	
144781	GAAGCAGTGG	TTAAGCCGGA	GGGCTCGGAA	GAACGGCACC	TTTTCTTTCT	CGAAAAAGTT	
144841	ATATGGGGGC	TGAATGAGCT	TCTGGAGGCT	TGTTTACCGT	TTTTTATTGT	CACACAGAAA	
	CD95-144961r						
144901	AGGAAACTGC	CTTGTCTCCC	TTCCGGGAAT	TCTCTCTTTA	<u>AGACTGTAAG</u>	<u>TCGCTGCCTG</u>	C(11)
144961	<u>AGTGGTTTCA</u>	TTTTGTTTTG	TTTTTCTGCC	CTTCTCTTTC	TTCTTTTGCC	CTTTCTTAGC	A(10)

Abb. 19:**Sequenz des untersuchten *CD95*-Ausschnittes der DNA aus PBL und dem Kolonkarzinom der gleichen Person (Probe 147 und 148)**

Die Numerierung bezieht sich auf die *CD95*-Sequenz von AL157394. Das Exon 1 ist rot abgehoben. Die Bindungsstellen der eingesetzten Oligonukleotide sind schwarz unterstrichen und die *Sma*I-Schnittstellen blau hervorgehoben.

Die zu Untersuchungsbeginn nicht beschriebenen, bei diesen beiden Proben vorhandenen Polymorphismen sind grün gekennzeichnet. Die entsprechenden Basen in AL157394 sind unterhalb aufgeführt.

Der schwarz unterlegte Basenaustausch ist bisher nicht beschrieben.

Die nebenstehenden Zahlen ermöglichen die Zuordnung der bekannten Polymorphismen zu den im folgenden angegebenen Referenznummern:

- (1) dbSNP 2234768
- (2) dbSNP 1800682
- (3) dbSNP 9658676
- (4) dbSNP 5030765
- (5) dbSNP 7474952
- (6) dbSNP 9658677
- (7) dbSNP 2274355
- (8) dbSNP 5030766
- (9) dbSNP 7079111
- (10) dbSNP 3740286
- (11) dbSNP 4064

Die Tatsache, daß die DNA der Tumorprobe und der PBL des gleichen Patienten eine identische Sequenz aufweisen, spricht gegen Mutationen im *CD95*-Promotor in Kolonkarzinomzellen. Eine Methylierung konnte als möglicher Beitrag zur Genabschaltung für die Probe 148 ebenfalls ausgeschlossen werden.

Zusammenfassung der Untersuchung auf Methylierung des CD95-Gens

Die Restriktionsanalyse für *Sma* I von 17 *KRAS2^{mut}* – positiven Tumoren des Gastrointestinaltrakts ergab für 16 hiervon im Bereich des Promotors, des Exon 1 und im Intron-Enhancer des CD95-Gens ein Restriktionsmuster, welches eine Methylierung der Cytosine in den CCGGG-Motiven ausschließt. Die nicht-geschnittene *Sma* I-Sequenz in einer Tumor-DNA (Position 143901) wurde auch für die Normal-DNA nachgewiesen und erwies sich als RFLP. Ein aufgrund dieses Ergebnisses postulierter, zum Zeitpunkt des Untersuchungsbeginns unbekannter Polymorphismus innerhalb einer *Sma* I-Schnittstelle konnte durch Sequenzierung der isolierten Sequenz aus dem entsprechenden Tumor verifiziert werden. Die Entstehung dieses Polymorphismus ist zwar möglicherweise die Folge einer ehemaligen Methylierung des Cytosins in der Konstellation CpG, allerdings kann der entsprechende Nukleotidaustausch als Folge der Karzinogenese ausgeschlossen werden, da die DNA aus PBL des gleichen Patienten eine identische Sequenz aufwies.

Insgesamt wurde somit für keinen der untersuchten Tumoren eine Abschaltung der *CD95*-Expression aufgrund einer Methylierung des Gens durch aktiviertes, onkogenes *Ras* festgestellt.

5 Diskussion

Für die neoplastische Transformation von Zellen wird neben weiteren Faktoren die transkriptionelle Inaktivierung verschiedener Gene durch Methylierung verantwortlich gemacht. Bei der Untersuchung von Karzinomen des Gastrointestinaltraktes wurden in der vorliegenden Arbeit Methylierungsdefekte in zwei Genen berücksichtigt. Der Nachweis von hypermethylierten CpG-Nukleotiden in Promotoren beinhaltet gegenüber dem Nachweis anderer DNA-Veränderungen in Karzinomen einige Vorteile. Zum einen stellt die anormale DNA-Methylierung einen chemisch und biologisch stabilen Marker dar, der unabhängig von der Genexpression analysiert werden kann. Im Vergleich zu Punktmutationen, die überall innerhalb eines Gens vorhanden sein können, ist das Auftreten von Methylierungsdefekten überdies an die Lokalisation von CpG-Nukleotiden gebunden. Schließlich stellt ein verändertes Methylierungsmuster ein positiv detektierbares Ereignis dar im Gegensatz zur Abwesenheit eines Signals, wie es z.B. bei Allelverlust in Tumoren der Fall ist (Boland und Goel, 2003).

Im ersten Teil der Arbeit wurde anhand mikrosatelliteninstabiler Tumorproben untersucht, ob die Abschaltung einer Komponente des DNA-Mismatch-Reparatursystems ursächlich für die MSI ist und der Promotor des *hMLH1*-Gens bezüglich seines Methylierungsstatus überprüft. Die analysierten Tumorproben müssen als MSI-H (Hohe Mikrosatelliteninstabilität) eingestuft werden, da mehr als 40 % der untersuchten Mikrosatelliten mutierte Längen aufwiesen (Umar et al., 2004).

Unter anderem basierend auf den Erkenntnissen, daß die transkriptionelle Stilllegung von *CD95* in epithelialen Neoplasien häufig, somatische Mutationen dieses Gens hingegen selten zu beobachten sind (Müschen et al., 2002), erfolgte zum anderen die Untersuchung von *KRAS2^{mut}* – positiven Karzinomen des Gastrointestinaltrakts auf eine veränderte DNA-Methylierung im Bereich des Promotors und Exon 1 des *CD95*-Gens.

5.1 Analyse des Methylierungsstatus des *hMLH1*-Promotors

Dem Auftreten einer Mikrosatelliteninstabilität in spontanen Tumoren liegt häufig die Inaktivierung der Komponente *hMLH1* des Mismatch-Reparatursystems durch Genabschaltung zugrunde (Wheeler et al., 2000). Die Analyse von neun mikrosatelliteninstabilen gastrointestinalen Tumoren bezüglich der Inaktivierung von *hMLH1* aufgrund von Promotormethylierung wurde nach der Methode von Chan et al., 2002 durchgeführt. Methylierung des *hMLH1*-Promotors wurde für sieben Tumor-DNA-Proben (77,7 %) nachgewiesen. Durch

Bisulfitbehandlung erfolgte die Desaminierung aller unmethylierten Cytosinbasen zu Uracil und – bei der nachfolgend durchgeführten PCR – der Ersatz durch Thymin, wohingegen die methylierten Cytosinbausteine bei gleichem Vorgehen bestehen blieben. Mittels Amplifikation unter Einsatz spezifischer Oligonukleotide für das unmethylierte bzw. das methylierte Allel konnte somit je nach Vorliegen oder Fehlen eines spezifischen PCR-Produktes auf den Methylierungsstatus des *hMLH1*-Promotors geschlossen werden. Bei sieben von neun Tumoren wurde als Ursache der Mikrosatelliteninstabilität die Inaktivierung des *hMLH1*-Gens aufgrund von Methylierung des Promotors identifiziert. Nachgewiesen wurde nur die methylierte Promotorsequenz, sodaß entweder beide Allele methyliert sind oder nur eine *hMLH1*-Kopie in methyliertem Zustand vorliegt bei gleichzeitigem Verlust der zweiten. Für die beiden übrigen Proben 94 und 152 wurde diesbezüglich kein eindeutiges Ergebnis erzielt.

Die in Abb. 4 bei genauer Betrachtung festzustellende leichte Grauschattierung in den Spuren der Karzinom-DNA-Proben 94 und 152 oberhalb der Primerdimere nach der PCR mit den Oligonukleotiden zum Nachweis unmethylierter DNA läßt allenfalls die Vermutung zu, bei diesen beiden Karzinomen läge möglicherweise eine spezifische Bande für das unmethylierte Allel vor. Berücksichtigt werden muß hierbei, daß sich die Amplifikation der unmethylierten DNA mit den dafür spezifischen Primern generell, so beispielsweise auch im Falle der Kontroll-DNA der Normalperson, als deutlich schwieriger erwiesen hatte als die PCR mit den Oligonukleotiden zum Nachweis des methylierten Allels. Trotz sehr zeitintensiven Austestens der Bedingungen konnte der Nachweis unmethylierter DNA nicht deutlich verbessert werden, weshalb das in der vorliegenden Arbeit zu diesem Zweck eingesetzte Oligonukleotidpaar als nicht optimal angesehen werden muß. Die Tumorproben 94 und 152 weisen eindeutig MSI auf, ohne daß eine Methylierung des *hMLH1*-Promotors nachgewiesen werden konnte. Entweder weist *hMLH1* eine inaktivierende Genmutation auf oder ein anderes MMR-Gen ist betroffen. Der schwache Nachweis des unmethylierten Allels in beiden Tumorproben deutet auf einen Allelverlust in *hMLH1* hin. Mutation in *hMLH1* gekoppelt mit dem Verlust des Wildtypallels würde in MSI resultieren.

Mögliche Gründe für den fehlenden Nachweis bzw. Ausschluß einer Methylierung

Für den fehlenden Nachweis von spezifischen PCR-Produkten einzelner Tumorproben sowohl mit den Oligonukleotiden zum Nachweis unmethylierter als auch mit denjenigen für methylierte DNA erscheinen diverse Erklärungsversuche plausibel. Zum einen besteht die Möglichkeit, daß die spezifische Anlagerung der entsprechenden Oligonukleotide an die Primerbindungsstellen nicht erfolgen konnte, obwohl die Cytosinbasen in der Konstellation CpG in diesem Bereich entweder einheitlich methyliert oder unmethyliert vorlagen. Eine

denkbare Ursache hierfür wäre die Existenz eines Polymorphismus im Bereich mindestens einer der Primerbindungsstellen. Als weiterer Grund für den ausbleibenden Nachweis eines spezifischen Amplifikates bei einheitlichem Methylierungsstatus kommt die ungenügende Modifikation der DNA durch Bisulfit in Betracht. Wegen der in diesem Fall ausbleibenden Desaminierung der unmethylierten Cytosinbasen zu Uracil könnte folglich der Austausch durch Thymin in der PCR nicht erfolgen, weswegen die Anlagerung der zur bisulfitmodifizierten DNA komplementären Primer somit nicht zustande käme. Für die beiden bezüglich ihres Methylierungsstatus nicht eindeutig einzustufenden Tumoren wurde eine mangelhafte Bisulfitmodifikation durch den Nachweis der maternalen Methylierung der *SNRPN*-Sequenz ausgeschlossen.

Überdies ist denkbar, daß nicht alle Cytosinbasen in der Konstellation CpG im Bereich der Primerbindungsstellen einheitlich methyliert bzw. unmethyliert vorlagen, sondern nur einige hiervon Methylgruppen besaßen. Auch in diesem Fall wäre weder eine Anlagerung der „methylierungsspezifischen“ Oligonukleotide noch derjenigen zum Nachweis des unmethylierten Allels möglich und somit eine Amplifikation ausgeschlossen gewesen.

Kürzlich wurden auch C^mWpG-Methylierungen (W = A oder T) beschrieben (Ramsahoye et al., 2000). Dabei ist häufig das erste Cytosin in der Abfolge CCA/TGG jedoch nicht das zweite methyliert. Diese Cytosinmethylierung resultiert ebenfalls in der Genrepression (Malone et al., 2001). In den Bindungsstellen für die Amplifikation der bisulfitmodifizierten Promotorsequenz sind CWG-Motive enthalten, die als nicht methyliert vorausgesetzt wurden, jedoch keine CCWGG-Abfolgen.

In der Literatur ist die Methylierung eines *hMLH1*-Allels und Verlust der zweiten Kopie beschrieben (Peltomaki, 2003). Bei einer möglicherweise vorliegenden Deletion eines Allels könnte die Anlagerung der Oligonukleotide nur an den anderen DNA-Strang erfolgen. Hieraus würde im Vergleich zu einer Probe, bei der beide Allele vorhanden sind, ein schwächeres Amplifikat resultieren. Im Falle einer geringen Menge an aufgetragener DNA ließe sich die dementsprechend schwache Bande unter Umständen nicht mehr erkennen. Um als mögliche Ursache des fehlenden Nachweises eines spezifischen Amplifikates für das unmethylierte bzw. methylierte Allel die Deletion des untersuchten Bereiches auszuschließen, erfolgte die Amplifikation der unmodifizierten DNA mit entsprechenden Oligonukleotiden. Dabei wurde der Primer *hMLH1-B* so ausgewählt, daß an seinem 3'-Ende die Konstellation CG vorlag, wodurch eine spezifische Anlagerung ermöglicht wurde. Allerdings fiel beim Austesten der Bedingungen auf, daß die Anwendung aller drei Annealing-Temperaturen 61, 63 und 65° C zur Amplifikation führte. Somit handelt es sich um ein robustes Oligonukleotidpaar, bei dessen Einsatz zwar eine Deletion des untersuchten Be-

reiches auf beiden Chromosomen ausgeschlossen, aber das Vorhandensein eines Polymorphismus an der Primerbindungsstelle nicht definitiv widerlegt werden kann. Die Sensitivität des Nachweises der DNA-Methylierung über die Bisulfitmodifikation und anschließende PCR kann durch eine zweite Amplifikation (nested PCR) erhöht werden. Da jedoch hierbei auch die Kontaminationsgefahr steigt, wurden die beiden nicht eindeutig bestimmten Tumor-DNA-Proben nicht zusätzlich mit diesem Ansatz analysiert.

Besonderheiten bezüglich der *hMLH1*-Promotor-Methylierung bei manchen Tumoren und der DNA der Normalpersonen

Bei der Analyse der Karzinome ließ sich trotz eindeutig vorliegender Methylierung vereinzelt zusätzlich ein äußerst schwaches Amplifikat für das unmethylierte Allel nachweisen. Dieses Ergebnis ist am ehesten dadurch begründet, daß die entsprechenden Proben nicht ausschließlich Tumorzellen, sondern zusätzlich unveränderte Zellen enthielten, aus denen die unmethylierte DNA stammte. Beispielsweise die in soliden Tumoren stark gesteigerte Angiogenese stellt einen der Gründe für das Vorhandensein einer nicht unerheblichen Anzahl an gesunden Zellen in Tumorproben dar. Überdies wird bei der chirurgischen Resektion - soweit möglich - auf einen ausreichenden Sicherheitsabstand zum Tumor geachtet, weshalb bei der Entnahme von Tumorgewebe aus dem Resektat eine „Verunreinigung“ durch unveränderte Zellen nicht auszuschließen ist.

Die Untersuchung der DNA aus PBL von Normalpersonen erbrachte überdies neben einem spezifischen Amplifikat für das unmethylierte Allel auch - ein zumeist sehr schwaches - für die methylierte Variante. Möglicherweise liegt in einigen Blutzellen bei Normalpersonen die *hMLH1*-Promotor-DNA in methylierter Form vor.

Gen für EPM2A interacting protein 1 in unmittelbarer Nachbarschaft zum *hMLH1*-Gen

Bei der Recherche in der Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) fiel das sich in direkter Nachbarschaft zum *hMLH1*-Promotor befindende Gen *EPM2AIP1* auf, das jedoch im Gegensatz zu *hMLH1* vom Gegenstrang transkribiert wird. Dessen Genprodukt EPM2AIP1 (Laforin interacting protein 1) ist ein Interaktionspartner für Laforin/EPM2A (Ianzano et al., 2003). Laforin stellt eine dual-spezifische Phosphatase dar, die an der Translationsregulation und am Glykogen-Stoffwechsel beteiligt ist. Mit ihr in funktionellem Kontakt steht das EMP2AIP1, das wie Laforin in nahezu allen Geweben exprimiert wird. Die Funktion von EPM2AIP1 ist unbekannt. Möglicherweise interagiert dieses mit weiteren dual-spezifischen Phosphatasen.

Abb. 20 zeigt die Lage des EPM2AIP1-Gens in Beziehung zum *hMLH1*-Promotor.

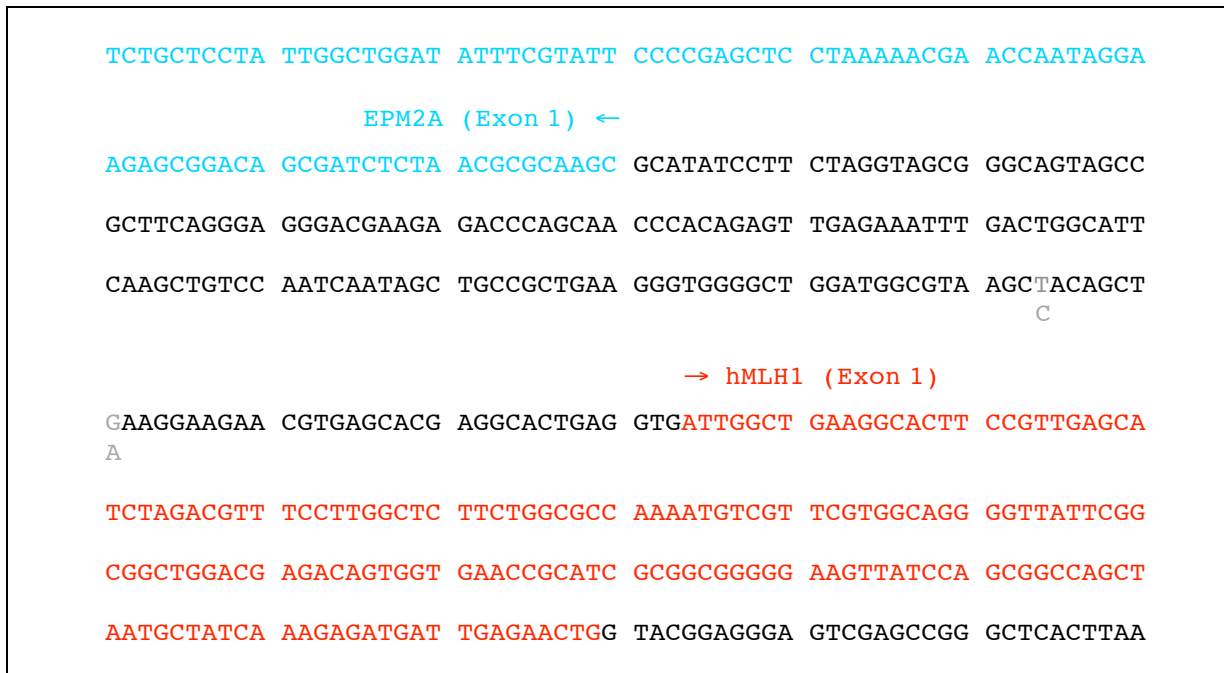


Abb. 20:

Region des bidirektionalen Promotors für das *hMLH1*- und das *EPM2AIP1*-Gen und benachbarte Sequenzen (NT_022517)

Das Exon 1 des *hMLH1*-Gens ist rot, die nicht transkribierte Sequenz schwarz dargestellt. Darüber hinaus ist das benachbarte *EPM2AIP1*-Gen blau markiert, das im Gegensatz zu *hMLH1* in umgekehrter Richtung abgelesen wird. Polymorphe Basen sind grau gekennzeichnet.

Während *hMLH1* auf 3p22 in Telomer → Zentromer-Richtung kodiert, erfolgt die Transkription von *EPM2AIP1* in entgegengesetzter Richtung 183 stromaufwärts vom Gegenstrang. Daraus kann geschlossen werden, daß es sich bei der zwischen beiden Genen liegenden Sequenz um einen bidirektionalen Promotor handelt. Im Falle der Methylierung dieses Bereiches wird somit nicht nur die Expression von *hMLH1*, sondern auch möglicherweise diejenige von *EMP2AIP1* herunterreguliert. Hinweise für eine denkbare Korrelation zwischen einer verminderten Transkription von *EMP2AIP1* und dem Auftreten von Karzinomen des Gastrointestinaltrakts wurden in der Literatur nicht gefunden.

Methylierung als Ursache der Mikrosatelliteninstabilität

Die Mikrosatelliteninstabilität für *BAT26* der in die Analyse einbezogenen Tumoren war vor Beginn der vorliegenden Arbeit unter Anwendung der in der Literatur beschriebenen Oligonukleotide nachgewiesen worden (Dietmaier et al., 1997). Bei sieben der neun untersuchten Karzinome stellt die verminderte *hMLH1*-Expression aufgrund von Promotormethylierung die Ursache der Mikrosatelliteninstabilität dar. Daneben war der Status für die Standardmarker *BAT40*, *Mfd15*, *BATRII* und *BAX* vor Versuchsbeginn bekannt. Ein Zusammenhang zwischen der Mikrosatelliteninstabilität an drei dieser vier Orte und dem *hMLH1*-Methylierungsstatus wurde nicht nachgewiesen. Auffällig war hingegen, daß *BATRII* in allen Tumoren mikrosatelliteninstabil ist, bei denen ein methylierter *hMLH1*-Promotor gefunden wurde. Im Gegensatz dazu ist in den beiden Tumoren mit nicht eindeutig nachgewiesenem Methylierungsstatus die Oligo-A-Sequenz im TGF β -Rezeptor II-Gen nicht mutiert. Ein Zusammenhang zwischen der Mikrosatelliteninstabilität für *BATRII* und der vorhandenen Methylierung des *hMLH1*-Promotors erscheint möglich.

5.2 Analyse des Methylierungsstatus des *CD95*-Promotors

In vielen Tumorzellen ist die *CD95*-Expression herunterreguliert und *CD95* kann als Tumorsuppressorgen eingeordnet werden (Müschen et al., 2002). Dies ist in einigen Fällen auf die Deletion des *CD95*-Gens zurückzuführen, da Genmaterialverluste dieser Region auf dem langen Arm von 10q23-24 beschrieben wurden (Steck et al., 1997). Auch Mutationen im zytoplasmatischen Anteil mit gestörter Signalweiterleitung würden den Tumorzellen einen Selektionsvorteil verleihen. Ein effizienter Weg, die *CD95*-Expression zu unterdrücken, besteht in der Inaktivierung des Gens über Methylierung oder Mutationen. Hypermethylierung ausgewählter Gene wird in Tumorzellen beobachtet. Die Methylierung von CpG-Nukleotiden in der CpG-reichen Promotorsequenz (476 bp-Fragment stromabwärts von Nukleotid 1 des Primers *CD95/143641f* (siehe Abb. 9)) führte in Reporteranalysen zur vollständigen Stilllegung der Promotoraktivität (Santourlidis et al., 2001). Der Verlust der Zelloberflächenexpression von *CD95* schützt nicht nur die Tumorzellen vor Apoptose-Induktion sondern erlaubt auch die Expression des *CD95*-Liganden, *CD95L*, zur Gegenattacke.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit einem möglichen Zusammenhang zwischen der in einigen gastrointestinalen Karzinomen vorliegenden *KRAS*-Mutation und dem veränderten Methylierungsstatus CpG-reicher Sequenzen im Bereich des *CD95*-Gens. Peli et al., 1999 wiesen nach, daß Transfektion von Epithel- und Fibroblastenzelllinien mit onkogenen, konstitutiv aktiven *Ras*-Mutanten zur fast vollständigen Hemmung der *CD95*-

Zelloberflächenexpression führte. Sie konnten zeigen, daß dies über DNA-Methylierung reguliert wurde und die CD95-mRNA unterdrückt war. Außerdem erhöht *Ras* die DNA-Methyltransferase-Spiegel (MacLeod et al., 1995), sodaß postuliert wird, daß die anti-apoptotische Funktion von onkogenem *Ras* zumindest teilweise auf der Abschaltung von *CD95* basiert.

Da Tumor-DNA-Proben mit charakterisierter *KRAS2*-Mutation zur Verfügung standen, sollte überprüft werden, ob onkogenes *Ras* in gastrointestinalen Tumoren die Methylierung des *CD95*-Promotors induziert. Es wurde nicht nur die *CD95*-Promotorsequenz selbst analysiert, sondern auch die CpG-reichen Exon 1- und Intron 1-Sequenzen. Im Intron 1 liegt der Enhancer für die p53-vermittelte Transkriptionsaktivierung von *CD95*, p53RE (Müller et al., 1998). Der CD95-Signalweg soll auch beim Abtöten von Tumorzellen durch DNA-schädigende Behandlungen beteiligt sein, da die Induktion von p53 die Transkription von *CD95* aktiviert (Ruiz-Ruiz et al., 2003).

Die Untersuchung von 17 *KRAS2*^{mut}-positiven Tumoren mittels des methylierungssensitiven Restriktionsenzym *Sma I*, welches sechs CpG-Dinukleotide in dem Bereich erkennt, ergab bei 16 hiervon ein mit der DNA von Normalpersonen übereinstimmendes Restriktionsmuster. Bei einem der Karzinome fiel hingegen eine nicht geschnittene *Sma I*-Schnittstelle auf, die sich als RFLP herausstellte, da die von *Sma I* geschnittene DNA aus Blut des Patienten das selbe Hybridisierungsmuster ergab (siehe Abb. 17). Die Sequenzierung der 5'-*CD95*-Gensequenz der DNA aus Blut und Tumor ergab die identische Sequenz und zeigte einen Polymorphismus im Bereich der *Sma I*-Schnittstelle in Exon 1 auf. CCCGGG ist zu CCCAGG mutiert. Der Austausch G→A in dieser Sequenz deutet darauf hin, daß das CpG hier in der Keimbahn-DNA methyliert ist und über die Desaminierung des 5'-Methyl-Cytosins auf dem Gegenstrang (T) das Allel mit A in dieser Position entstand.

Der nachgewiesene Nukleotidaustausch oder weitere Mutationen als Folge der Karzinogenese konnten somit ausgeschlossen werden. Insgesamt ließ sich für keinen der untersuchten Tumoren eine Abschaltung der *CD95*-Expression aufgrund einer Methylierung des Gens durch aktiviertes *Ras* feststellen.

Der analysierte *CD95*-Genbereich enthält insgesamt 70 CpG-Dinukleotide: sieben im 5'-flankierenden Bereich, 20 in Exon 1 und 46 in dem Intron 1-Anteil. Es ist unwahrscheinlich, daß das *CD95*-Gen in den Tumorproben über DNA-Methylierung an ausgewählten oder an allen CpG-Bereichen außerhalb der *Sma I*-Schnittstelle inaktiviert wurde, da die Cytosinmethylierung in den regulatorischen Sequenzen üblicherweise komplett durchgeführt wird. Santourlidis et al., 2001 wiesen außerdem in ihren Untersuchungen an Pankreastumorproben mit methyliertem *CD95*-Promotor eine Methylierung aller CpG-Motive inklusive der

Sma I-Erkennungssequenz in dem untersuchten 110 bp-Fragment nach. Peli et al., 1999 benutzten für ihre Untersuchungen onkogene *HRAS*-Mutanten. In der Signalweiterleitung sind Unterschiede zwischen den beiden *Ras*-Molekülen, die sich auf die Methylierung des *CD95*-Promotors auswirken könnten, nicht offensichtlich.

Analyse des *Sma* I-RFLP

Das Ergebnis der Restriktionsanalyse der Kolonkarzinomprobe 148 wich von demjenigen aller übrigen untersuchten Tumoren und der Normalperson ab. Als Ursache dessen wurde ein Nukleotidaustausch innerhalb einer *Sma* I-Schnittstelle (143898 der Gensequenz mit Accession-Nummer AL157394) festgestellt, der sich ebenfalls in der DNA aus PBL der gleichen Person nachweisen ließ. Das amplifizierte Fragment war homozygot für das A-Allel (siehe Abb. 17). Da hier ein potentiell regulatorischer Polymorphismus vorliegen kann, wurde im folgenden die Frequenz dieses Polymorphismus in der Population anhand von 100 DNA-Proben von Normalpersonen untersucht. In die Analyse gingen weiterhin 30 DNA-Proben von Kolonkarzinompatienten ein. Zum Einsatz kamen hierfür neu gewählte Oligonukleotide, die ein kürzeres Fragment von 355 bp generieren, das die polymorphe und eine weitere *Sma* I-Schnittstelle überspannt. Keine der untersuchten DNA-Proben wies den *Sma* I-RFLP auf. Die Proben 147 und 148 erwiesen sich als heterozygot, woraus folgt, daß in der TumordNA das Wildtypallel nicht verloren gegangen war. Aufgrund der Untersuchung von insgesamt 200 Allelen von Normalpersonen und 47 Kolonkarzinompatienten (94 Chromosomen) mit lediglich einem positiven Ergebnis (Probe 147) kann somit von einer seltenen Variante mit einer Allelfrequenz (1 auf 294) von etwa 0,34 % ausgegangen werden. Dieser Nukleotidaustausch konnte lediglich bei einem von insgesamt 47 untersuchten Karzinompatienten nachgewiesen werden und ist für die Kolonkarzinomentstehung nicht von Bedeutung.

Die in ihrem Restriktionsmuster von den anderen Karzinomen abweichende Tumorprobe 148 war homozygot für das Vorliegen des Polymorphismus innerhalb der *Sma* I-Schnittstelle. Die anschließend durchgeführte Sequenzierung des PCR-Produkts bestätigte dies und erbrachte den Nachweis der gleichen vier Nukleotidaustausche im untersuchten DNA-Bereich des Tumors und der PBL der gleichen Person. Die Southernblot-Analyse und die neue RFLP-Typisierung identifizierten die DNA als heterozygot. Bei der Suche nach der Ursache der selektiven Amplifikation nur eines Allels mit dem Primerpaar CD95-143461f/CD95-144961r fiel ein innerhalb des Zeitraums der Untersuchungen neu in die Datenbank aufgenommenen Polymorphismus auf (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Er befindet sich genau an der Endposition des 3'-Primers CD95-144961r (Abb. 21). Es wurde also ein G-allelspezifischer 3'-Primer gewählt. Das andere Chromosom 10 mit dem Wildtypallel an der *Sma* I-Erkennungssequenz

in Exon 1 von *CD95* kodiert in der Primerbindungsstelle das C-Allel (in Abb. 21 grün markierter Nukleotidaustausch G→C).

(A)	143881	AATGGAGCCC	TCCCCAACCC	AGGCGTTCCC	CAGCGAGGCT	TCCTTCCCAT	CCTCC...
(WT)	143881	AATGGAGCCC	TCCCCAACCC	GGGCGTTCCC	CAGCGAGGCT	TCCTTCCCAT	CCTCC...
						CD95-144961r	
(A)	144901	...ACTGC	CTTGTCTCCC	TTCCGGGAAT	TCTCTCTTTA	<u>AGACTGTAAG</u>	<u>TCGCTGCCTG</u>
						CD95-144961r	
(WT)	144901	...ACTGC	CTTGTCTCCC	TTCCGGGAAT	TCTCTCTTTA	<u>ACACTGTAAG</u>	<u>TCGCTGCCTG</u>

Abb. 21:

Darstellung der beiden *CD95*-Allele der Tumorprobe 148 und der DNA-Probe 147 aus PBL der gleichen Person

Von den beiden Allelen (A) und (WT) sind hier jeweils zwei Sequenzausschnitte gegenübergestellt. Das Allel A besitzt G an der Bindungsstelle für das Oligonukleotid CD95-144961r, weist aber im Bereich der *Sma* I-Schnittstellen den A-Nukleotidaustausch auf. Das Wildtypallel kodiert an diesen Positionen C bzw. G (grün hervorgehoben).

5.3 Resumée

Die in der Literatur (Kane et al., 1997; Hermann et al., 1998; Veigl et al., 1998) beschriebene Inaktivierung des hMLH1-Gens infolge von Promotormethylierung bei Kolonkarzinomen mit nachgewiesener MSI wurde in dieser Arbeit bestätigt. Die Analyse von Tumor-DNA bzgl. des Vorhandenseins einer *hMLH1*-Promotor-Methylierung kann bei Screening-Untersuchungen für mikrosatelliteninstabile Karzinome des Gastrointestinaltrakts eingesetzt werden. Grady et al., 2001 führten Methylierungstests für den *hMLH1*-Promotor von Kolonkarzinom-DNA-Proben und präoperativ gewonnenen Serumproben durch. Bei Vorliegen einer MSI konnte die Analyse der Serum-DNA den Tumor mit einer Sensitivität von 33 % und einer Spezifität von 100 % detektieren. Gelänge eine Verbesserung der Sensitivität dieser Methode, so könnte sie künftig im Rahmen von Screening-Untersuchungen für meist im proximalen Kolon auftretende mikrosatelliteninstabile Tumoren eingesetzt werden. Weiterhin ist vor allem auch eine Anwendung bei der Erkennung von postoperativen Rezidiven denkbar.

In der vorliegenden Arbeit ergab sich kein Hinweis auf eine Abschaltung der *CD95*-Expression aufgrund einer Methylierung des Promotors hervorgerufen durch onkogenes Ras. Es wurde jedoch nicht untersucht, ob die Expression des *CD95*-Moleküls in den Tumorproben mit mutiertem *KRAS2* abgeschaltet ist. Dieses Onkogen könnte über Induktion der Methylierung anderer Gene die *CD95*-Expression negativ regulieren.

6 Zusammenfassung

Die Grundlage für die Entstehung von Tumoren bildet der Erwerb genetischer Veränderungen, wobei neben Mutationen wie Chromosomeninstabilitäten, Insertionen, Deletionen oder Basenmutationen auch epigenetische Vorgänge von Bedeutung sind. Hierzu zählt die veränderte Methylierung von DNA in neoplastisch transformierten Zellen, die bei einigen Genen in deren transkriptionellen Inaktivierung resultiert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten Kolon- und Magenkarzinome auf bestehende Methylierungsdefekte in zwei Genen untersucht werden.

Im ersten Teil wurde ein in die Mismatch-Reparatur involviertes Gen, das hMLH1-Gen, untersucht. Gastrointestinale Karzinome wurden hierbei hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen ihrer Mikrosatelliteninstabilität und einer möglichen Methylierung von Cytosinbasen im *hMLH1*-Promotor analysiert. Hierfür kam die Bisulfitmethode zur Anwendung, bei der die Umwandlung von unmethylierten Cytosinbasen zu Uracil erfolgt und die damit die Grundlage für die anschließende methylierungssensitive PCR bildet. Insgesamt ließ sich die Mikrosatelliteninstabilität bei sieben von neun untersuchten Karzinomproben auf Methylierung der proximalen Promotorsequenz zurückführen. Der Methylierungsstatus der beiden übrigen mikrosatelliteninstabilen Tumoren konnte nicht eindeutig bestimmt werden, obwohl die Vollständigkeit der Bisulfitmodifikation über den Nachweis des maternalen Methylierungsmusters des Exons 1 von *SNRPN* bestätigt wurde. Überdies konnte eine Deletion dieser Sequenz mittels Überprüfung der unbehandelten DNA ausgeschlossen werden.

Gegenstand des zweiten Teils dieser Arbeit war die Untersuchung des CD95-Gens, eines Mitglieds der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor-Familie (sog. Todesrezeptoren), das eine entscheidende Rolle bei der ungestörten Apoptose von Zellen spielt. Grundlage hierfür waren die Ergebnisse von Peli et al., 1999, denen zufolge die *CD95*-Expression in mehreren etablierten Säugetierzelllinien durch onkogenes Ras (H-Ras) herunterreguliert wird, wodurch sich eine Resistenz der Zellen für CD95L-induzierte Apoptose entwickelt. Hinweise aus den genannten Untersuchungen, die Inaktivierung von *CD95* sei möglicherweise durch Methylierung des Promotors verursacht, sollte in der vorliegenden Arbeit anhand von gastrointestinalen Karzinomen näher analysiert werden. Hierzu wurde der Methylierungsstatus von Promotor, Exon 1 und Intron-Enhancer des *CD95*-Gens von 17 Tumorproben mit *Ras*-Mutationen (*KRAS2*-Mutation in Kodon 12) mittels methylierungssensitiver Restriktionsenzyme, nachfolgendem Southernblot und Hybridisierung ermittelt. Bei 16 Tumoren erbrachte die Restriktionsanalyse für *Sma* I ein Restriktionsmuster, das eine Methylierung der Cytosine der CCCGGG-Motive im genannten Bereich ausschließt. Die nicht geschnittene *Sma* I-Sequenz in einer Tumor-DNA (Position 143901) wurde auch für die Normal-DNA

nachgewiesen und erwies sich als RFLP. Ein aufgrund dieses Ergebnisses postulierter Polymorphismus innerhalb einer *Sma* I-Schnittstelle konnte durch Sequenzierung der isolierten Sequenz aus dem entsprechenden Tumor verifiziert werden. Möglicherweise ist die Entstehung dieses Polymorphismus zwar die Folge einer ehemaligen Methylierung des Cytosins in der Konstellation CpG; allerdings konnte nachgewiesen werden, daß der entsprechende Nukleotidaustausch nicht im Rahmen der Karzinogenese erfolgt war, da die DNA aus PBL des gleichen Patienten die identische Sequenz aufwies.

Insgesamt wurde somit für keinen der untersuchten Tumoren eine Abschaltung der *CD95*-Expression aufgrund einer Methylierung des Gens durch aktiviertes, onkogenes *Ras* festgestellt.

7 Literatur

Ahlquist DA, Shuber AP

Stool screening for colorectal cancer: evolution from occult blood to molecular markers
Clin Chim Acta. 2002; 315 (1-2): 157-68

Berger BM, Vucson BM, Diteberg JS

Gene mutations in advanced colonic polyps: potential marker selection for stool-based mutated human DNA assays for colon cancer screening
Clin Colorectal Cancer. 2003; 3 (3): 180-5

Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S et al.

A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells
Nature. 1997; 385 (6618): 729-33

Boland CR, Goel A

The silence of the genes: matching mismatch repair defects with tumors
Cancer. 2003; 98 (10): 2091-4

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, et al.

Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer
Nature. 1994; 368 (6468): 258-61

Chan AO, Issa JP, Morris JS, Hamilton SR, Rashid A

Concordant CpG island methylation in hyperplastic polyposis
Am J Pathol. 2002; 160 (2): 529-36

Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, Kim YS

Methylation of CpG in a small region of the hMLH1 promoter invariably correlates with the absence of gene expression
Cancer Res. 1999; 59 (9): 2029-33

Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J

Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression
Cancer Res. 1997; 57 (21): 4749-56

Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R

The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer
Cell. 1993; 75 (5): 1027-38

Fulda S, Kufer MU, Meyer E, van Valen F, Dockhorn-Dworniczak B, Debatin KM

Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer
Oncogene. 2001; 20 (41): 5865-77

Gansneder B

Die Überexpression des anti-apoptotischen Proteins c-FLIP_L verhindert die CD95-vermittelte Abtötung von T-Zellen durch Tumorzellen mit konsekutiver CD95L-Expression
Dissertation an der Fakultät der Biologie der Ludwig-Maximilians-Universität München
2001

Gayet J, Zhou XP, Duval A, Rolland S, Hoang JM, Cottu P, Hamelin R

Extensive characterization of genetic alterations in a series of human colorectal cancer cell lines
Oncogene. 2001; 20 (36): 5025-32

- Geisler JP, Goodheart MJ, Sood AK, Holmes RJ, Hatterman-Zogg MA, Buller RE
Mismatch repair gene expression defects contribute to microsatellite instability in ovarian carcinoma
Cancer. 2003; 98 (10): 2199-206
- Grady WM, Rajput A, Lutterbaugh JD, Markowitz SD
Detection of aberrantly methylated hMLH1 promoter DNA in the serum of patients with microsatellite unstable colon cancer
Cancer Res. 2001; 61 (3): 900-2
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW et al.
Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma
Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95 (12): 6870-5
- Ianzano L, Zhao XC, Minassian BA, Scherer SW
Identification of a novel protein interacting with laforin, the EPM2a progressive myoclonus epilepsy gene product
Genomics. 2003; 81 (6): 579-87
- Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ
Immunologie
Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 2002
- Jiricny J, Marra G
DNA repair defects in colon cancer
Curr Opin Genet Dev. 2003; 13 (1): 61-9
- Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R
Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines
Cancer Res. 1997; 57 (5): 808-11
- Kang GH, Lee S, Kim WH, Lee HW, Kim JC, Rhyu MG, Ro JY
Epstein-barr virus-positive gastric carcinoma demonstrates frequent aberrant methylation of multiple genes and constitutes CpG island methylator phenotype-positive gastric carcinoma
Am J Pathol. 2002; 160 (3): 787-94
- Kinzler KW, Vogelstein B
Lessons from hereditary colorectal cancer
Cell. 1996; 87 (2): 159-70
- Knippers R
Molekulare Genetik
Georg Thieme Verlag, 2001
- Kuismanen SA, Moision AL, Schweizer P, Truninger K, Salovaara R, Arola J, Butzow R, Jiricny J, Nystrom-Lahti M, Peltomaki P
Endometrial and colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colon cancer display different patterns of microsatellite instability
Am J Pathol. 2002; 160 (6): 1953-8
- Lehmann U, Langer F, Feist H, Glockner S, Hasemeier B, Kreipe H
Quantitative assessment of promoter hypermethylation during breast cancer development
Am J Pathol. 2002; 160 (2): 605-12
- Li H, Myeroff L, Kasturi L, Krumroy L, Schwartz S, Willson JK, Stanbridge E, Casey G, Markowitz S
Chromosomal autonomy of hMLH1 methylation in colon cancer
Oncogene. 2002; 21 (9): 1443-9

- MacLeod AR, Rouleau J, Szyf M
Regulation of DNA methylation by the Ras signaling pathway
J Biol Chem. 1995; 270 (19): 11327-37
- Malone CS, Miner MD, Doerr JR, Jackson JP, Jacobsen SE, Wall R, Teitell M
CmC(A/T)GG DNA methylation in mature B cell lymphoma gene silencing
Proc Natl Acad Sci U S A. 2001; 98 (18): 10404-9
- Markowitz S
TGF-beta receptors and DNA repair genes, coupled targets in a pathway of human colon carcinogenesis
Biochim Biophys Acta. 2000; 1470 (1): M13-20
- Markowitz SD, Dawson DM, Willis J, Willson JK
Focus on colon cancer
Cancer Cell. 2002; 1 (3): 233-6
- Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Fukayama N, Igarashi S, Kotake K, Matsui T, Koyama Y, Maekawa M, Nagai H
Methylation profile of the MLH1 promoter region and their relationship to colorectal carcinogenesis
Genes Chromosomes Cancer. 2003; 36 (1): 17-25
- Müller M, Wilder S, Bannasch D, Israeli D, Lehlbach K, Li-Weber M, Friedman SL, Galle PR, Stremmel W, Oren M, Krammer PH
p53 activates the CD95 (APO-1/Fas) gene in response to DNA damage by anticancer drugs
J Exp Med. 1998; 188 (11): 2033-45
- Müschen M, Rajewsky K, Kronke M, Kuppers R
The origin of CD95-gene mutations in B-cell lymphoma
Trends Immunol. 2002; 23 (2): 75-80
- Oehm A, Behrmann I, Falk W, Pawlita M, Maier G, Klas C, Li-Weber M, Richards S, Dhein J, Trauth BC, et al.
Purification and molecular cloning of the APO-1 cell surface antigen, a member of the tumor necrosis factor/nerve growth factor receptor superfamily. Sequence identity with the Fas antigen
J Biol Chem. 1992; 267 (15): 10709-15
- Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al.
Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer
Science. 1994; 263 (5153): 1625-9
- Papadopoulos N, Nicolaides NC, Liu B, Parsons R, Lengauer C, Palombo F, D'Arrigo A, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, et al.
Mutations of GTBP in genetically unstable cells
Science. 1995; 268 (5219): 1915-7
- Peli J, Schroter M, Rudaz C, Hahne M, Meyer C, Reichmann E, Tschopp J
Oncogenic Ras inhibits Fas ligand-mediated apoptosis by downregulating the expression of Fas
EMBO J. 1999; 18 (7): 1824-31
- Peltomaki P
Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer
J Clin Oncol. 2003; 21 (6): 1174-9
- Ramsahoye BH, Biniszkiwicz D, Lyko F, Clark V, Bird AP, Jaenisch R
Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a
Proc Natl Acad Sci U S A. 2000; 97 (10): 5237-42

Reichmann E

The biological role of the Fas/FasL system during tumor formation and progression
Semin Cancer Biol. 2002; 12 (4): 309-15

Rossi D, Gaidano G

Messengers of cell death: apoptotic signaling in health and disease
Haematologica. 2003; 88 (2): 212-8

Ruiz-Ruiz C, Robledo G, Cano E, Redondo JM, Lopez-Rivas

A Characterization of p53-mediated up-regulation of CD95 gene expression upon genotoxic treatment in human breast tumor cells
J Biol Chem. 2003; 278 (34): 31667-75

Santourlidis S, Warskulat U, Florl AR, Maas S, Pulte T, Fischer J, Müller W, Schulz WA

Hypermethylation of the tumor necrosis factor receptor superfamily 6 (APT1, Fas, CD95/Apo-1) gene promoter at rel/nuclear factor kappaB sites in prostatic carcinoma
Mol Carcinog. 2001; 32 (1): 36-43

Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ

The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity
Nat Immunol. 2000; 1 (6): 469-74

Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, Yung WK, Lin H, Ligon AH, Langford LA, Baumgard ML, Hattier T, Davis T et al.

Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers
Nat Genet. 1997 ; 15 (4): 356-62

Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV

A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death
Cell. 1993; 74 (5): 845-53

Tomlinson I, Sasieni P, Bodmer W

How many mutations in a cancer?
Am J Pathol. 2002; 160 (3): 755-8

Trauth BC, Klas C, Peters AM, Matzku S, Moller P, Falk W, Debatin KM, Krammer PH

Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis
Science. 1989; 245 (4915): 301-5

Traverso G, Shuber A, Olsson L, Levin B, Johnson C, Hamilton SR, Boynton K, Kinzler KW, Vogelstein B

Detection of proximal colorectal cancers through analysis of faecal DNA
Lancet. 2002; 359 (9304): 403-4

Umar A, Risinger JI, Hawk ET, Barrett JC

Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer
Nat Rev Cancer. 2004; (2): 153-8

Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma AH, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li GM, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD

Biallelic inactivation of hMLH1 by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers
Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95 (15): 8698-702

Vincent F, Nagashima M, Takenoshita S, Khan MA, Gemma A, Hagiwara K, Bennett WP

Mutation analysis of the transforming growth factor-beta type II receptor in human cell lines resistant to growth inhibition by transforming growth factor-beta
Oncogene. 1997; 15 (1): 117-22

Wajant H

The Fas signaling pathway: more than a paradigm
Science. 2002; 296 (5573): 1635-6

Wallach D, Kovalenko AV, Varfolomeev EE, Boldin MP

Death-inducing functions of ligands of the tumor necrosis factor family: a Sanhedrin verdict
Curr Opin Immunol. 1998; 10 (3): 279-88

Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, Benson AB, Hamilton SR

Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer
N Engl J Med. 2001; 344 (16): 1196-206

Wheeler JM, Beck NE, Kim HC, Tomlinson IP, Mortensen NJ, Bodmer WF

Mechanisms of inactivation of mismatch repair genes in human colorectal cancer cell lines: the predominant role of hMLH1

Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96 (18): 10296-301

Wheeler JM, Bodmer WF, Mortensen NJ

DNA mismatch repair genes and colorectal cancer
Gut. 2000; 47 (1): 148-53

Yonehara S, Ishii A, Yonehara M

A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor

J Exp Med. 1989; 169 (5): 1747-56

Zhou W, Goodman SN, Galizia G, Lieto E, Ferraraccio F, Pignatelli C, Purdie CA, Piris J, Morris R, Harrison DJ et al.

Counting alleles to predict recurrence of early-stage colorectal cancers
Lancet. 2002; 359 (9302): 219-25

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß für dieses interessante Thema und ihre hervorragende Betreuung. Unter ihrer Anleitung hatte ich die Möglichkeit, mich mit molekulargenetischen Methoden vertraut zu machen. Ihr möchte ich auch ausdrücklich für die Bereitstellung aller theoretischen und praktischen Mittel im Labor und ihr stetes Interesse am Erfolg dieses Projektes danken.

Frau Prof. Dr. Judith Johnson danke ich sehr für die Übernahme des Gutachtens.

Für die Bereitstellung der untersuchten Tumorproben möchte ich Herrn Dr. Kopp danken.

Bei allen Laborkolleg(inn)en möchte ich mich insbesondere für ihre Hilfsbereitschaft und das angenehme Arbeitsklima bedanken. Ein besseres Team hätte man sich nicht wünschen können!

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, daß die vorliegende Arbeit von mir selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen angefertigt wurde.

München, den 24. Mai 2004

.....

(Stefanie Hufner)

Lebenslauf

Angaben zur Person:

Geburtsdatum und -ort: 16.07.1973, München
 Familienstand: ledig

Schulbildung:

1979 – 1980 Grundschole an der Canisiusstraße, München
 1980 – 1983 Grundschole an der Sambergerstraße, München
 1983 – 1987 Marienstern-Gymnasium, München
 1987 – 1993 Dante-Gymnasium, München
 Juli 1993 Erlangung der allgemeinen Hochschulreife

Universität:

Sept. 1993 – April 1996 Studium an der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm
 April 1996 Ärztliche Vorprüfung
 April 1996 – Okt. 2000 Studium der Medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg/
 Klinikum Mannheim
 März 1998 Erster Teil der Ärztlichen Prüfung
 Sept. 2000 Zweiter Teil der Ärztlichen Prüfung
 Okt. 2000 – Nov. 2001 Studium an der Medizinischen Fakultät der Technischen
 Universität München (Praktisches Jahr)
 Nov. 2001 Dritter Teil der Ärztlichen Prüfung

Seit April 2002 Promotionsstudium am Department Biologie II, Anthropologie
 und Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität
 München unter Anleitung von Frau Prof. Dr. Elisabeth Weiß

München, den 24. Mai 2004