

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Burkhard Göke

Funktioneller Vergleich von zwei Splicevarianten des bHLH Transkriptionsfaktors ITF2

Dissertation

Zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Simone Helferich
aus
Mannheim
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Frank T. Kolligs

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Georg Wilhelm Bornkamm
Prof. Dr. Hans-Gustav Klobeck

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Andreas Herbst

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. Maximilian
Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10. 06. 2010

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	4
1.1	Das kolorektale Karzinom	4
1.1.1	Epidemiologie	4
1.1.2	Ätiologie	4
1.1.3	Therapie.....	6
1.2	Mechanismen der Karzinogenese.....	7
1.2.1	Chromosomale Instabilität (CIN)	7
1.2.2	Mikrosatelliteninstabilität (MSI).....	8
1.2.3	Methylator-Pathway	9
1.3	Adenom- Karzinom- Sequenz	9
1.4	LOH der Region 18q21	11
1.4.1	DCC	11
1.4.2	SMAD 2 und 4.....	12
1.4.3	MBD, ME2, POLI.....	12
1.4.4	ITF2	13
1.4.4.1	Struktur und Funktion der Helix-Loop-Helix-Proteine	13
1.4.4.2	Klassifikation der bHLH-Proteine	14
1.4.4.3	Die Klasse I der bHLH-Proteine.....	15
1.4.4.4	Struktur und Funktion der ITF2-Genprodukte A und B.....	16
1.5	Fragestellung	18
2	Material und Methoden.....	19
2.1	Molekularbiologische Methoden.....	19
2.1.1	Isolation von RNA	19
2.1.2	Isolation von Protein.....	19
2.1.3	Konzentrationsbestimmung von RNA und Protein.....	20
2.1.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	20
2.1.5	Westernblot.....	22
2.1.6	Immunologischer Nachweis der Proteine	22
2.1.7	Reverse Transkription	23
2.1.8	Polymerase-Kettenreaktion	25
2.1.8.1	Allgemeines Funktionsprinzip	25
2.1.8.2	Real-time-PCR	25
2.1.8.3	Verwendete Primer und deren PCR-Bedingungen	26
2.1.9	Prinzip der gelelektrophoretischen Auftrennung	28
2.2	Kultur von humanen Kolonkarzinomzellen	28

2.2.1	Allgemeine Kulturbedingungen.....	28
2.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	29
2.2.3	Stabile Transfektion mit Lipofektion.....	29
2.3	Durchflußzytometrie.....	30
2.3.1	Allgemeines Funktionsprinzip.....	30
2.3.2	Zellzyklusanalyse nach Nicoletti.....	31
2.3.3	Probenpräparation und Anfärbung	31
2.4	MTT-Assay	32
2.5	DNA-Microarray	33
2.6	Reportergen-Assay.....	33
3	Ergebnisse	35
3.1	Zielgene von ITF2B.....	35
3.1.1	Testung von DLD1-Klonen, die ITF2B induzierbar exprimieren	35
3.1.2	Identifizierung von ITF2B-Zielgenen.....	37
3.1.3	ITF2B steigert p21 ^{Cip1} -Protein-Spiegel.....	39
3.1.4	Expression von ITF2B senkt die Proliferationsrate	41
3.1.5	Expression von ITF2B bewirkt Zellzyklusarrest	42
3.2	Vergleich von ITF2B mit ITF2A	44
3.2.1	Die ITF2A-Expression ist im Tumorgewebe deutlich verringert im Vergleich zum Normalgewebe	44
3.2.2	Generierung einer stabilen Zelllinie in DLD1, die ITF2A induzierbar exprimiert	46
3.2.3	ITF2A reguliert p21 ^{Cip1}	48
3.2.4	Expression von ITF2A hemmt Zellwachstum.....	51
3.3	Analyse der für die durch ITF2A und ITF2B vermittelte Transkriptionssteigerung wichtigen Regionen des CDKN1A-Genes.....	54
3.4	Validierung der Funktion von ITF2A in HCT116	57
3.4.1	Generierung einer stabilen Zelllinie in HCT116, die ITF2A induzierbar exprimiert	57
3.4.2	Expression von ITF2A hemmt Zellwachstum.....	59
3.4.3	Analyse der für die durch ITF2A und ITF2B vermittelte Transkriptionssteigerung wichtigen Regionen des CDKN1A-Genes.....	61
4	Diskussion.....	63
4.1	Zielgene von ITF2B.....	63
4.2	Vergleich von ITF2B mit ITF2A	65
4.3	Analyse der für die durch ITF2A und ITF2B vermittelte Transkriptionssteigerung wichtigen Regionen des CDKN1A-Genes.....	67
5	Zusammenfassung.....	70

6	Literaturverzeichnis	71
7	Anhang.....	77
7.1	Abkürzungsverzeichnis	77
7.2	Firmenverzeichnis.....	78
	Danksagung	79
	Lebenslauf.....	80

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom ist mit einem Häufigkeitsgipfel zwischen dem 50. und 70. Lebensjahr eine Erkrankung des Alters⁽¹⁾. Die Inzidenzraten des kolorektalen Karzinoms weisen zwar erhebliche regionale Divergenzen auf⁽²⁾, was insbesondere auf unterschiedliche Lebensgewohnheiten zurückgeführt wird⁽³⁾, sind aber in den letzten 20 Jahren stetig gestiegen. Inzwischen stellt es bei Männern nach dem Prostatakarzinom und bei Frauen nach dem Mammakarzinom die zweithäufigste Tumorerkrankung dar. Die Zahl der jährlichen Neuerkrankung wird in Deutschland auf etwa 80.000 Menschen pro Jahr geschätzt. Mit etwa 30.000 Todesfällen im Jahr ist das kolorektale Karzinom bei beiden Geschlechtern zweithäufigste Todesursache. Gegenüber der steigenden Inzidenz ist die Mortalitätsrate in den letzten Jahren gesunken, was auf die zunehmend frühzeitigere Diagnostik und erfolgreichere Therapie zurückzuführen ist⁽⁴⁾.

1.1.2 Ätiologie

Der weitaus größte Anteil kolorektaler Karzinome (65-80%) entsteht sporadisch und ist bislang nicht durch eine genetische Disposition erklärbar. Bei einem Fünftel (15-20%) lässt sich eine familiäre Disposition, das heißt eine familiäre Häufung der gleichen Tumorerkrankung, erkennen. Ein autosomal-dominanter Erbgang liegt nur einem kleinen Teil hereditärer Tumore (3-5%), wie dem HNPCC-Syndrom (*Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer*) und der FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*), zugrunde (Abb.1).

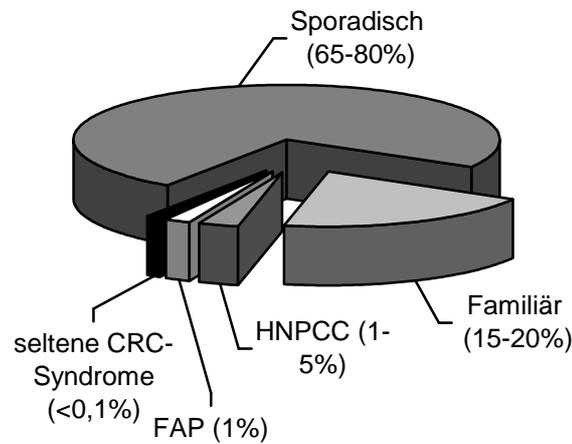


Abb. 1: Ätiologie des kolorektalen Karzinoms⁽⁵⁾.

45% der kolorektalen Karzinome entstehen im Rektum, 25% im Sigma. Die übrigen Tumore finden sich annähernd gleichermaßen im Zökum, Colon ascendens, Colon transversum und Colon descendens⁽⁶⁾. Als Ursache für die Entstehung sporadischer Karzinome werden exogene Faktoren wie Ernährung und Lebensstil verantwortlich gemacht. Dafür spricht die Tatsache, dass kolorektale Karzinome in den Industrieländern wesentlich häufiger auftreten als in armen Ländern und somit eine der klassischen Zivilisationskrankheiten ist. Studien belegen, dass eine kalorienreiche und ballaststoffarme Ernährung mit einem hohen Gehalt an tierischen Fetten eine Karzinomentstehung begünstigt⁽⁷⁾. Dies soll unter anderem durch die karzinogene Wirkung von N-Nitroverbindungen⁽⁸⁾ und heterozyklischen aromatischen Aminen verursacht sein⁽⁹⁾. Weitere Risikofaktoren sind neben Rauchen⁽¹⁰⁾ in einem hohen Body Mass Index und geringer körperlicher Tätigkeit, was zu einer verlängerten Kontaktzeit des Darminhaltes mit der Darmmukosa führt, zu sehen⁽¹¹⁾. Ein schützender Effekt wird in einer verstärkten Aufnahme von Substanzen mit antioxidativer Wirkung wie Folsäure, Methionin und Vitaminen vermutet⁽¹²⁾. In den Fällen von Kolonkarzinomerkrankungen, in denen ein gehäuftes Vorkommen innerhalb der Familie beobachtet wird, spielen neben den Lebensgewohnheiten auch genetische Faktoren eine Rolle.

1.1.3 Therapie

Das Therapiekonzept kolorektaler Karzinome besteht aus drei wichtigen Säulen: Chirurgie, Chemotherapie und Radiotherapie. Davon besitzt in der Regel nur die Chirurgie kuratives Potential. Die operative Therapie wird unter bestimmten Voraussetzungen noch mit einer prä- (neoadjuvante) oder postoperativen (adjuvante) Radio- und/oder Chemotherapie kombiniert.

In den letzten Jahren ist mit dem Einsatz monoklonaler Antikörper (Biologicals) ein neuer Ansatz in der Therapie kolorektaler Karzinome hinzugekommen. Er basiert auf Hemmung von für Tumorproliferation und -metastasierung wichtigen Mediatoren wie dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), der die Angiogenese fördert, oder dem epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGF-R), der die Proliferation fördert. Durch Kombination von Chemotherapie (5-Fluoruracil, Irinotecan, Oxaliplatin) mit VEGF- (Bevacizumab) oder EGF-Antikörpern (Cetuximab, Panitumumab) kann die Überlebenszeit signifikant verlängert werden⁽¹³⁻¹⁵⁾. Insgesamt ist die Prognose nach Therapie nur in den frühen UICC-Stadien gut (5-Jahresüberlebensrate: 80-95%), jedoch zeigen bei Diagnosestellung schon 20% der Patienten Lebermetastasen⁽¹⁶⁾. Die Kenntnis molekulargenetischer Grundlagen ist deshalb für neue Therapiekonzepte und frühzeitige Diagnostik besonders wichtig.

1.2 Mechanismen der Karzinogenese

Ein Tumor bezeichnet eine abnorme Zunahme von Gewebe basierend auf einer unkontrollierten Proliferation dysplastischer Zellen. Diese Progression dauert beim kolorektalen Karzinom etwa 10 Jahre und vollzieht sich auf genetischer Ebene. Sie kann durch verschiedene exogene (chemische und physikalische Kanzerogene) und endogene (Mutationen) Faktoren induziert werden. Eine Mutation reicht jedoch zur Transformation in eine maligne Zelle nicht aus. Man geht davon aus, dass 6-10 genetische Veränderungen zur Karzinomentstehung aufgetreten sein müssen, die in der Zelle akkumulieren und von einer Krebszellgeneration auf die nächste übertragen werden⁽¹⁷⁾. Diese verschiedenen Primärveränderungen des Genoms werden auch unter genomischer Instabilität zusammengefasst⁽¹⁸⁾. Je nach Art der Veränderung kann diese genomische Instabilität in drei Bereiche unterteilt werden: der Weg der Chromosomalen Instabilität (CIN), der Weg der Mikrosatelliteninstabilität (MSI) und der Methylator-Pathway⁽¹⁹⁾.

1.2.1 Chromosomale Instabilität (CIN)

Der überwiegende Teil kolorektaler Karzinome entwickelt sich aufgrund chromosomaler Instabilität^(19,20). Dies bezeichnet eine Akkumulation von genetischen Veränderungen, die in einer Aktivierung von Onkogenen und/oder einem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen münden⁽²¹⁾. Onkogene entstehen durch die Mutation von Protoonkogenen – Genen, die an der Regulation von Zellwachstum, Zellteilung und Zelldifferenzierung beteiligt sind. Bei deren Mutation kommt es vor allem zu einer ungehemmten Zellproliferation, Apoptoseresistenz, Metastasierung und gesteigerter Angiogenese. Dabei handelt es sich um einen dominanten Vorgang, da schon die Mutation eines der zwei Allele für diesen Effekt genügt. Ein Vertreter dieser Protoonkogene ist K-ras. Tumorsuppressorgene bilden die funktionellen Antagonisten der Protoonkogene. Sie regulieren die Zellteilung, in dem deren Genprodukte inadäquates Wachstum inhibieren können, und fördern die Ausdifferenzierung von Gewebe. Mutierte Tumorsuppressorgene codieren veränderte und dadurch funktionslose Proteine. Zu Tumorsuppressorgenen zählen APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), p53, DCC (*Deleted in Colorectal Cancer*)⁽²¹⁾ und MCC (*Mutated in Colorectal Cancer*)⁽²²⁾. Zu einem Funktionsverlust von Tumorsuppressorgenen kommt es durch einen Ausfall beider Allele (*loss of function*). Ein Mechanismus zur Inaktivierung beider Allele wurde 1971 von Knudson formuliert⁽²³⁾. Dieser entwickelte 1971 das genetische Konzept der sequenziellen Geninaktivierung. Er postulierte in seiner *Two-hit-hypothesis of carcinogenesis*, dass durch zwei rezessive allelische Mutationen eines Tumorsuppressorgens aus einer normalen Zelle eine Tumorzelle entstehen kann. Nach der ersten Veränderung (*first hit*) entsteht durch das veränderte Allel ein heterozygoter Genotyp.

Die Kontrolle des Zellzyklus übernimmt das noch intakte Allel. Durch eine zweite Veränderung (*second hit*) kommt es zu einem Verlust des intakten heterozygoten Allels (*loss of heterozygosity*). Dadurch geht aufgrund funktionsloser Proteine die Regulation des Zellzyklus verloren und resultiert in ungehemmtem Wachstum. Besonders hoch ist das Risiko zur Entstehung von Tumoren, wenn eine Mutation bereits in der Keimbahn entstanden ist⁽²³⁾. In diesem Fall manifestieren sich Tumore früher und häufiger als bei sporadischen Karzinomen. So ist bei einem einzelnen Adenom nur in 5%, bei der hereditären FAP aufgrund der Vielzahl von Adenomen in mehr als 95% und beim HNPCC in etwa 70% der Fälle mit der Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms zu rechnen⁽²⁴⁾.

Mit dieser Theorie ist jedoch die hohe Zahl sporadischer kolorektaler Karzinome schwer zu erklären, da eine sporadische Mutation beider Allele als Initiation der Tumorentstehung zu einem derart hohen Prozentsatz relativ unwahrscheinlich ist. Aus diesem Problem entstand die Hypothese der dominant negativen Mutation: mutierte Tumorsuppressorgene können trotz intaktem homologem Allel das Wachstumsverhalten der Zelle beeinflussen, in dem mutierte Genprodukte mit Wild-Typ-Genprodukten interagieren und diese inhibieren. Zudem lässt die Beobachtung beim p53-Gen, dass eine Punktmutation eines Allels häufig mit einer *Loss of heterozygosity* (LOH) des zweiten Allels vergesellschaftet ist, die Annahme zu, dass eine Veränderung eine andere bedingt. Dies führte zur Hypothese eines *Mutator Phenotypes*. Demnach könnte die zunehmende Mutationsrate während der Tumorprogression auf Mutationen bisher unbekannter Gene basieren, deren Genprodukte zur Stabilisierung und Regulation der DNA dienen und deren Fehlen ein erhöhtes Vorkommen von Mutationen begünstigt⁽²⁵⁾.

1.2.2 Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Mehr als 45% des nicht codierenden Teils des Humangenoms besteht aus Sequenzen mit einem hohen Grad an Wiederholungen⁽²⁶⁾. Ihre Funktion ist unbekannt. Im Gegensatz zu Normalgewebe zeichnen sich in Tumorgewebe diese Mikrosatellitensequenzen durch Insertionen und Deletionen aus. Durch die Analyse der hereditären HNPCC konnte der zugrunde liegende Defekt identifiziert werden: es liegen meist Keimbahnmutationen oder in sporadischen Karzinomen Promotormethylierung in den sogenannten Mismatch-Repairgenen vor, die an der Reparatur von Basenfehlpaarungen beteiligt sind (hMSH2, hMLH1, hPMS1 und 2)⁽²⁷⁾. Dadurch akkumulieren Fehlpaarungen der DNA, was zu einer Leserasterverschiebung beispielsweise in Tumorsuppressorgenen führt und damit deren Funktion beeinträchtigen kann. Neben der HNPCC liegt dieser Mechanismus etwa 15% der kolorektalen Karzinome zugrunde⁽²⁸⁾.

1.2.3 Methylator-Pathway

Veränderungen genetischer Regulationsmechanismen, die nicht durch Veränderung der DNA-Sequenz erklärbar sind, werden unter Epigenetik zusammengefasst⁽²⁹⁾. Ein Mechanismus ist die Methylierung der Base Cytosin, die nur in direkter Nachbarschaft zur Base Guanin erfolgen kann. Methylierte DNA ist normalerweise in nicht-kodierenden Bereichen lokalisiert. In Tumoren betreffen hypermethylierte Bereiche zusätzlich kodierende Regionen, die dann durch kompakte Chromatinstruktur und Transkriptionsstop bzw. Inaktivierung der Gene charakterisiert sind. Dieser Mechanismus nimmt einen hohen Stellenwert ein, da beinahe die Hälfte der Gene, die bei hereditären Tumoren mutiert sind, in sporadischen Tumoren ihre Funktion durch Hypermethylierung verlieren⁽³⁰⁾. Zudem soll Hypermethylierung anderen Inaktivierungsmustern wie Mutation oder LOH (*Loss of Heterozygosity*) in der Häufigkeit vergleichbar sein⁽³¹⁾.

1.3 Adenom- Karzinom- Sequenz

Seit Ende der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts haben sich die Erkenntnisse genetischer Grundlagen durch Analyse vererbter (FAP, HNPCC) und sporadischer kolorektaler Karzinome erheblich erweitert. Basierend auf den Arbeiten von Knudson wurde im allelischen Verlust ein wichtiger Mechanismus zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen gesehen. Bemühungen in den 80er Jahren, chromosomale Regionen kolorektaler Karzinome, auf denen sich Tumorsuppressorgene befinden könnten, zu identifizieren, offenbarten eine häufige LOH der chromosomalen Bereichen 5q, 8p, 17p und 18q⁽³²⁻³⁴⁾. Die Bedeutung von LOH 5q wurde in der Inaktivierung des APC-Gens und die von LOH 17p in der Inaktivierung des p53-Gens gesehen, während die Bedeutung von LOH 8p derzeit noch unklar ist^(21,33,34). Zudem konnte bei sporadischen kolorektalen Karzinomen immer wieder eine zeitliche Abfolge morphologischer Veränderungen vom Adenom bis zum Karzinom beobachtet werden, was 1990 zu der Hypothese des genetischen Mehrschrittmodells von Fearon und Vogelstein führte⁽²¹⁾. Demnach beruht die Progression vom Adenom zum Karzinom auf einer zunehmenden Akkumulation genetischer Veränderungen, wobei diese kumulative Aktivierung von Onkogenen bzw. Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen mit dem Grad der Dysplasie korreliert. Der tumorinitiierende Schritt wird meist durch eine Inaktivierung des Tumorsuppressorgens APC ausgelöst. Bei etwa 80% kolorektaler Karzinome ist dieser Verlust nachzuweisen⁽³⁵⁾. APC als ein Bestandteil des Wnt-Signalweges dient der Kontrolle von Zellwachstum, Apoptose und Differenzierung. Dessen Verlust führt zur Entstehung hyperproliferativen Epithels⁽³⁶⁾.

Der wichtigste Indikator der Progression eines Adenoms in ein Adenokarzinom ist die Größe, denn mit zunehmendem Durchmesser der Adenome steigt auch ihre Entartungshäufigkeit⁽³⁷⁾.

In der weiteren Tumorprogression tritt in wenigstens einer dieser Zellen eine Mutation im Proto-Onkogen K-ras (Chromosom 12p) auf. Das mutierte K-ras-Gen hat über die Aktivierung des MAP-Kinase-Signalweges autonomes Wachstum zur Folge. Die Hälfte der kolorektalen Karzinome weisen K-ras-Mutationen auf, welche für die Tumorprogression jedoch von untergeordneter Bedeutung eingestuft werden⁽³⁸⁾. Im weiteren Verlauf der malignen Transformation kommt es in 70% der Karzinome zu einem Verlust der Region 18q21 und in etwa 75% ist eine Deletion des kurzen Arms von Chromosom 17 nachzuweisen, dem Träger des p53-Gens. p53 initiiert bei DNA-Schäden Apoptose oder arretiert zur Reparatur den Zellzyklus in der G₁-Phase. Zellen mit fehlendem oder funktionslosen p53 gehen ohne Reparatur in die S-Phase über. Die anschließende Replikation geschädigter DNA kann wiederum genetische Veränderungen bedingen⁽³⁹⁾.

Jede Mutation lässt sich in allen Stadien der Tumorigenese finden, weshalb die Abbildung des genetischen Mehrschrittmodells eher als eine Art Häufigkeitsverteilung im zeitlichen Auftreten zu sehen ist⁽⁴⁰⁾. Welche Mutation letztendlich die maligne Transformation und Metastasierung einleitet, ist noch nicht geklärt. Zudem ist das Mehrschrittmodell nach Fearon und Vogelstein in einigen Punkten umstritten, da dieses Modell nur in einem geringeren Teil kolorektaler Karzinome zutrifft. Nach einer neueren Studie finden sich beispielsweise in etwa 40% der Karzinomen nur eine Mutation in entweder dem APC-, dem p53- oder dem K-ras-Gen. Nur in 6% sind alle drei Gene betroffen⁽⁴¹⁾. Diese Tatsache spricht gegen die Annahme, dass eine Akkumulation von Mutationen in mehreren Genen für die Tumorprogression ausschlaggebend sei. Zudem ist der Verlust des APC-Gens als meist initialer Schritt zur Entstehung einer Dysplasie in Frage gestellt. Die Feststellung, dass bei einem Teil der untersuchten Karzinome das APC-Gen nicht und bei Karzinomen nach Colitis-ulcerosa in weniger als 10% der Fälle mutiert ist, lässt den Schluss zu, dass K-ras-, p53- und andere Veränderungen ebenfalls das initiale Ereignis zur Entstehung einer Dysplasie darstellen können⁽⁴¹⁾. Aufgrunddessen muss das genetische Mehrschrittmodell nach Fearon und Vogelstein kritisch betrachtet werden⁽⁴¹⁾.

1.4 LOH der Region 18q21

Nähere Untersuchungen definierten den Genabschnitt 18q21 als die am meisten durch Veränderungen betroffene Region. Neben SMAD2 (*Mothers against decapentaplegic homolog 2*), MBD2 (*Methyl-CpG-binding-domain 2*), ME2 (*Malic enzyme 2*) und POLI (*DNA polymerase iota*) sind besonders zwei Gene dieser Region näher charakterisiert und als mögliche Tumorsuppressoren diskutiert worden: DCC⁽⁴²⁾ und SMAD4⁽⁴³⁾ (Abb. 2). Die Tatsache, dass LOH des Chromosoms 18q zu 40% in Adenomen, zu 70% in Karzinomen und zu etwa 100% in Lebermetastasen vorkommt, impliziert die Vermutung, dass diese Veränderung eine größere Rolle bei der Tumorphoregression als bei der Tumorentstehung spielt⁽⁴⁴⁾.

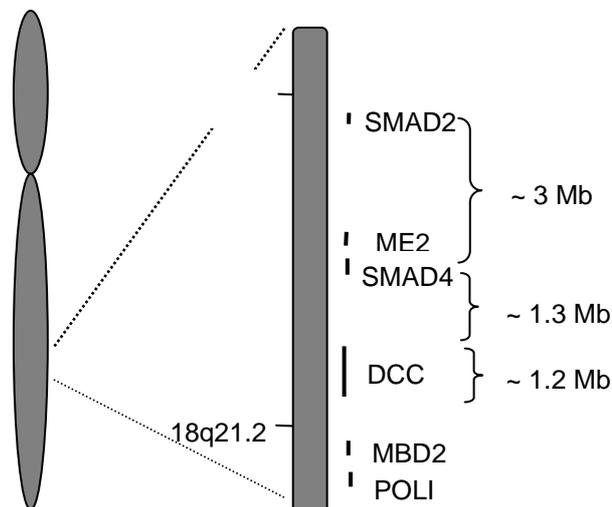


Abb. 2: Genomische Organisation des Chromosoms 18. Auf der rechten Seite sind die bekannten Gene der Region 18q21.1-q21.2 dargestellt⁽⁴⁴⁾.

1.4.1 DCC

Das DCC-Gen ist in über 90% der kolorektalen Karzinome bei einem Verlust der Region 18q betroffen. Es kodiert ein Typ I Transmembran-Glykoprotein. Die extrazelluläre Komponente weist Ähnlichkeiten zu neuronalen Zelladhäsionsmolekülen auf, weshalb DCC als ein Regulator der Zell-Zell-Adhäsion diskutiert wurde^(45,46). Die Tatsache, dass die DCC-Expression in kolorektalen Karzinomen stark reduziert ist beziehungsweise fehlt, führte zu der Annahme, dass das DCC-Gen einen wichtigen Faktor im Hinblick auf die

Tumorprogression darstellt⁽⁴²⁾. Unterstützt wird diese These durch mehrere Studien in Mäusen, die aufzeigen, dass die Wiederherstellung der DCC-Expression in Tumoren zu einem Rückgang des Tumorwachstums führt⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾. Diese Daten sind jedoch unzureichend, um DCC als Tumorsuppressorgen zu sichern. Dagegen sprechen die Beobachtungen, dass DCC-Keimbahnmutationen bei Mäusen anscheinend keine Prädisposition für eine Tumorentstehung darstellen und keine stärkere Tumorprogression beobachtet werden konnte, wenn in Mäusen zusätzlich zum APC-Gen auch das DCC-Gen mutiert war⁽⁵⁰⁾. Die Schlussfolgerungen dieser Daten sind jedoch umstritten, da Mausmodelle nur bedingt mit dem menschlichen System vergleichbar sind⁽⁴⁴⁾. In neueren Studien wird DCC als ein Teil eines Rezeptorkomplexes eingeführt, der Netrin-1 bindet. Für das Intestinum wurde die Hypothese formuliert, dass DCC und Netrin-1 eine Rolle in der Regulation des Zellüberlebens spielen. Demnach soll DCC in Abwesenheit von Netrin-1 Apoptose induzieren^(51,52), während der Verlust von DCC Apoptose senken und Tumorprogression fördern soll. Somit ist der Kandidatenstatus von DCC nicht abschließend geklärt⁽⁴⁴⁾.

1.4.2 SMAD 2 und 4

In der von LOH betroffenen Region befinden sich ebenfalls die SMAD2 und SMAD4-Gene. Sie kodieren Proteine mit einer Schlüsselfunktion im TGF- β -Signalweg und sind verantwortlich für den inhibitorischen Effekt von TGF- β auf Kolonepithelzellen. SMAD2 wird als möglicher Tumorsuppressorkandidat eine untergeordnete Rolle zugeschrieben, da die SMAD2-Expression in kolorektalen Karzinomen kaum vermindert ist und Genmutationen selten sind^(53,54). Zu SMAD4 wurde in kolorektalen Karzinomen festgestellt, dass Mäuse, bei denen APC und SMAD4 mutiert waren, eine wesentlich stärkere Tumorprogression zeigten als bei alleiniger APC-Mutation⁽⁵⁵⁾. Trotzdem scheint das SMAD4-Gen nicht das alleinige Ziel der Inaktivierung durch LOH zu sein, da das SMAD4-Gen nur in einem Drittel der Karzinome mit LOH mutiert war und in den übrigen zwei Dritteln die SMAD4-Expression unverändert blieb⁽⁵⁶⁾.

1.4.3 MBD, ME2, POLI

MBD2 gehört zur Familie der Methyl-CpG-bindenden Proteine, rekrutiert Histondeacetylasen und führt wahrscheinlich zu einer Repression der Transkription⁽⁵⁷⁾. ME2 kodiert ein mitochondriales Enzym, das eine Rolle im Citratzyklus spielt. POLI kodiert eine DNA-Polymerase. Diese Gene scheinen jedoch nicht als Tumorsuppressoren zu fungieren⁽⁵⁸⁾.

1.4.4 ITF2

In der Literatur wurden zwei mögliche Tumorsuppressoren in der Region 18q21 beschrieben: DCC und SMAD4⁽⁴³⁾. Welches Gen dieser Region eine solch signifikante Rolle als Tumorsuppressor spielt, um das häufige Auftreten von LOH in kolorektalen Karzinomen (70%) zu erklären, wurde noch nicht abschließend geklärt. Ein möglicher neuer Kandidat der Region 18q21 ist das ITF2-Gen, dessen Expressionsverlust im kolorektalen Karzinom eng mit dem von DCC und SMAD4 korreliert⁽⁵⁹⁾. Erstmals wurde ITF2 (*Immunoglobulin Transcription Factor 2*) 1990 als Aktivator (Enhancer) der Gene, die die schweren und leichten Ketten der Immunglobuline kodieren, beschrieben⁽⁶⁰⁾ und dessen Struktur veröffentlicht⁽⁶¹⁾. Ein Jahr danach konnte es der Klasse der Helix-Loop-Helix-Proteine zugeordnet werden⁽⁶²⁾.

1.4.4.1 Struktur und Funktion der Helix-Loop-Helix-Proteine

Der letzte Schritt in der Signaltransduktion besteht in der Regulation der Genexpression durch sogenannte Transkriptionsfaktoren. Dabei handelt es sich um Proteine, die in der Lage sind, spezifische Sequenzen zu erkennen und gezielt an die DNA zu binden. Im Wesentlichen kann man vier DNA-Bindungsmotive unterscheiden: der Leuzin-Zipper, das Faltblattmotiv, der Zinkfinger und das Helix-Loop-Helix-Motiv. Proteine mit diesem Helix-Loop-Helix-Motiv (Helix-Loop-Helix-Proteine) sind an der Entwicklung und Differenzierung verschiedenster Gewebearten wie beispielsweise Myogenese, Herz- und Pankreasentwicklung, Neurogenese und Hämatopoese beteiligt, indem sie die Hemmung der Proliferation und die Aktivierung gewebespezifischer Differenzierungsprogramme vermitteln⁽⁶³⁾.

Erstmals wurden 1985 Regionen in Genen der schweren und leichten Immunglobulinketten festgestellt, die Transkriptionsfaktoren binden und dadurch aktiviert werden können⁽⁶⁴⁾. Diese Regionen zeigten einen gemeinsamen Kern, bestehend aus einer Hexanukleotid-Sequenz CANNTG (wobei N für eine variable Base steht), und wurden nachträglich als E-Box (nach dem Erstbeschreiber Ephrussi) bezeichnet⁽⁶⁵⁾. Inzwischen wurden E-Boxen ebenfalls in Promotorbereichen und Aktivierungselementen in Muskel-, Nerven-, und Pankreasgenen entdeckt. Es wird angenommen, dass die spezifische Erkennung in den verschiedenen Geweben unter anderem durch der E-Box benachbarte Nukleotide oder durch ein mögliches Zusammenspiel diverser regulatorischer Proteine in den jeweiligen Gewebearten zustande kommt. Die wichtigste Erkennungssequenz der E-Box lautet GCAGXTGG/T (wobei X für eine variable Base steht)⁽⁶⁶⁾. Auf der Suche nach E-Box-bindenden Proteinen konnten 1989 zwei alternative Spliceprodukte von E2A isoliert werden: E12 und E47. Bei näherer Untersuchung deren cDNAs wurde eine zur Myc-Familie, Myo-D und Daughterless

homologe Sequenz festgestellt und aufgrund ihrer Struktur – zwei amphipatische alpha-Helices verbunden mit einer flexiblen Schleife – Helix-Loop-Helix bezeichnet. Diese Sequenz, etwa 50 Aminosäuren, wies ein für Lamine charakteristisches Heptadenmuster auf, weshalb die Überlegung aufkam, ob die HLH-Struktur (ähnlich den Laminen) der Dimerisierung diene⁽⁶⁷⁾. Weitere Studien an Myo-D enthüllten an der N-terminalen Seite des HLH-Motivs eine basische Domäne, die für die DNA-Bindung verantwortlich gemacht wurde⁽⁶⁸⁾. Tatsächlich bestätigten nachfolgende Röntgenstrukturanalysen das Vorhandensein und die Funktion der HLH und der basischen Domäne (deshalb auch *basic Helix-Loop-Helix*, bHLH). Es wird vermutet, dass dabei jedes Monomer mit drei Nukleotiden der Hexasequenz CANNTG (E-Box) interagiert^(69,70).

1.4.4.2 Klassifikation der bHLH-Proteine

Helix-Loop-Helix-Proteine werden durch zwei wichtige Regionen charakterisiert: den basischen Teil für die DNA-Bindung und die Helix-Loop-Helix-Sequenz für die Dimerisierung. Diese funktionell wichtigen Regionen sind phylogenetisch betrachtet sehr stark konserviert, weshalb man inzwischen 242 Proteine von der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* bis zum Menschen identifizieren konnte⁽⁷¹⁾. Inzwischen existieren zwei Einteilungsschemata:

Die Klassifikation nach Massari und Murre unterscheidet je Gewebevorkommen, Dimerisierungskapazitäten und DNA-Bindungsfähigkeit sieben verschiedene Klassen⁽⁷²⁾ (Tab. 1). Den sogenannten Id-Proteinen (Klasse V) fehlt die basische DNA-Bindungsdomäne. Sie können zwar nicht mehr an die DNA binden, hemmen die Transkription aber durch Bildung inaktiver Dimere⁽⁷³⁾.

Klasse	Charakteristika
I	Homo-, Heterodimere, ubiquitäre Expression
II	Heterodimere, gewebespezifische Expression
III	Leuzinzipper
IV	Homodimer, Heterodimer mit c-Myc
V	Fehlende DNA-Bindungsdomäne, Inhibitor von Klasse I und II
VI	Veränderte basische Domäne
VII	Besitzen bHLH-PAS-Domäne

Tab. 1: Charakteristika der einzelnen Klassen der bHLH-Proteine nach Massari und Murre⁽⁷²⁾.

Die genauere Klassifikation nach Atchley und Fitch stützt sich auf die Analyse von 242 Proteinen unter dem Gesichtspunkt der phylogenetischen Entwicklung und Verwandtschaft verschiedener Aminosäuresequenzen. Diese unterscheidet 24 Proteinfamilien, die je nach DNA-Bindevverhalten in vier Gruppen A-D eingeteilt wurden⁽⁷¹⁾.

1.4.4.3 Die Klasse I der bHLH-Proteine

ITF2 gehört zur Klasse I der bHLH-Proteine. Weitere wichtige Vertreter dieser Klasse sind E12, E47 und HEB. Die Klasse I unterscheidet sich von den anderen durch das Vorhandensein von Aktivierungsdomänen (AD). Aktivierungsdomänen dienen der Rekrutierung der generellen Transkriptionsmaschinerie, die Transkriptionsfaktoren und Kofaktoren beinhaltet. Diese Rekrutierung erfolgt meistens über Koaktivatoren oder Adaptoren. Zu solchen Koaktivatoren zählen SAGA-Proteinkomplexe, die Histonacetyltransferasen Ada und Gcn5 enthalten. In vielen bHLH-Proteinen wurde das hochkonservierte LDFS-Motiv entdeckt (in der Klasse I beispielsweise in der AD1), welches Ähnlichkeiten zu einem Motiv der Aktivierungsdomäne AAD (*Acidic Activation Domain*) zeigt⁽⁷²⁾. Durch Studien an Lymphozyten wurde belegt, dass dieses LDFS-Motiv direkt mit dem SAGA-Histonacetylasekomplex interagiert und somit die Histonacetylaseaktivität an Nukleosomen der Zielgene regulieren kann⁽⁷²⁾. Die Feststellung, dass der N-terminale Teil von E12 und E47 in zwei Translokationen der Akuten Lymphatischen Leukämie (t17/19 und t11/19) involviert ist, ließ eine wichtige Funktion der Domäne vermuten und lenkte das Interesse auf diesen Bereich⁽⁷⁴⁾. Untersuchungen des N-terminalen Endes deckten neben DNA-Bindungs- auch Transaktivierungskapazitäten auf, worauf zwei Aktivierungsdomänen charakterisiert werden konnten: die N-terminalere Aktivierungsdomäne 1 (AD1: AS 1-99) und die C-terminalere Aktivierungsdomäne 2 (AD2: AS 325 bis 432), wobei die Längenangaben in der Literatur variieren^(63,75). Diese beiden Aktivierungsdomänen wurden außer in der Klasse I der bHLH-Proteine bislang in keinen anderen Proteinen entdeckt. Die Aktivierungsdomäne 1 ist in E12, E47, ITF2 und HEB zu ca. 45% identisch und enthält das für ihre Aktivität erforderliche LDFS-Motiv. Sie beinhaltet nach dem Chou-Fasman-Algorithmus eine helikale Struktur, die bei eben genannten Proteinen zu über 85 % identisch ist⁽⁷²⁾. Die zweite Aktivierungsdomäne ist erstmals aufgrund der Proteinstruktur unter der Bezeichnung Loop-Helix-Motiv (LH) veröffentlicht worden. Die beiden Aktivierungsdomänen zeigen anscheinend ein unterschiedliches Aktivierungsmuster. So soll die Aktivierungsdomäne 1 in verschiedensten Gewebearten, die Aktivierungsdomäne 2 hauptsächlich in Pankreasgewebe aktiv sein⁽⁷⁵⁾. Da beide Aktivierungsdomänen bislang nur in der Klasse I der bHLH-Proteine nachzuweisen sind, könnte ein Sinn der Dimerisierung darin liegen, die Aktivierungsdomänen den anderen bHLH-Klassen zur Verfügung zu stellen⁽⁷⁵⁾. Dies könnte die Tatsache erklären, dass anscheinend die Anwesenheit eines Klasse I bHLH-Proteins notwendig ist, um in Dimerisierung mit einem in jeweiligem Gewebe exprimierten bHLH-Protein spezifische Differenzierungsprogramme zu veranlassen⁽⁷⁴⁾.

1.4.4.4 Struktur und Funktion der ITF2-Genprodukte A und B

Das ITF2-Gen kodiert die Genprodukte ITF2A und ITF2B. ITF2A entsteht vermutlich durch einen variablen Promotorgebrauch. Die längere Isoform, ITF2B, umfasst 667 Aminosäuren. Im Vergleich dazu ist ITF2A um 157 Aminosäuren verkürzt, wodurch es keine Aktivierungsdomäne 1 besitzt. Zusätzlich unterscheiden sich die ersten 27 Aminosäuren von ITF2A von der korrespondierenden ITF2B-Proteinsequenz⁽⁷⁶⁾ (Abb. 3).

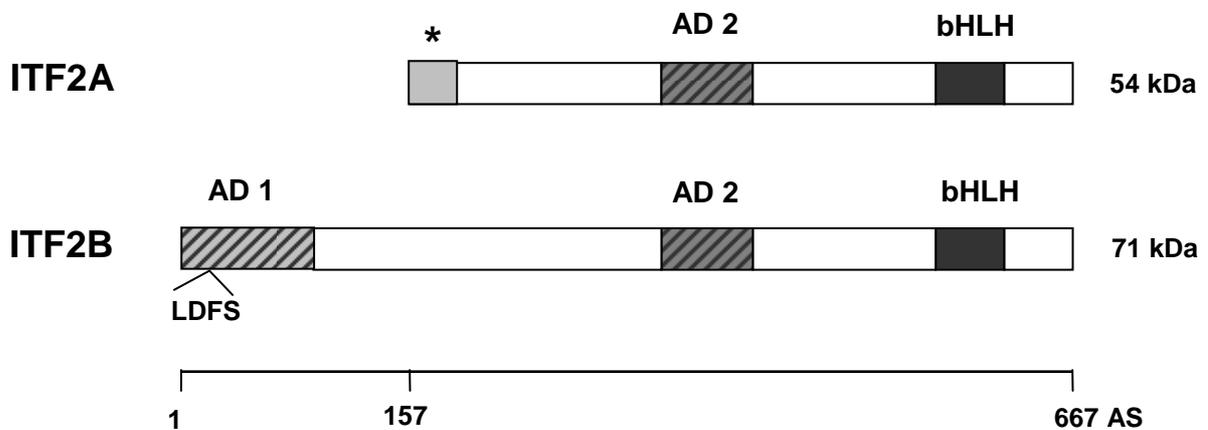


Abb. 3: Schematische Darstellung der Struktur der Proteine ITF2A und ITF2B⁽⁷⁷⁾. Die funktionellen Motive sind grau unterlegt. Die Aktivierungsdomäne 1 (AD 1) umfasst die Aminosäuren 1-99⁽⁷²⁾ und enthält das LDFS-Motiv. Die Aktivierungsdomäne 2 (AD 2) umfasst die Aminosäuren 336-405⁽⁷⁸⁾, die basic-Helix-Loop-Helix (bHLH) die Aminosäuren 564-618^(77,79). Die mit einem * markierte, grau unterlegte Region bezeichnet den spezifischen Beginn von ITF2A (Aminosäuren 1-27)⁽⁷⁶⁾. Das Molekulargewicht von ITF2A beträgt 54 kDa, das von ITF2B 71 kDa.

Das ubiquitär exprimierte ITF2B reguliert durch Dimerisierung mit gewebespezifischen bHLH-Proteinen Differenzierungsprozesse⁽⁸⁰⁾. Je nach untersuchtem Gewebe hat man einige solcher Dimerisierungspartner festgestellt wie Myo-D in Muskelgewebe, Hash-1 und Math1 in neuronalem Gewebe⁽⁸¹⁾ und Pod-1 in mesodermalem Gewebe⁽⁸²⁾. Explizite Zielgene von ITF2B sind nur wenige identifiziert worden. Dazu gehören der Muskel-spezifische Kreatinkinase-Promotor⁽⁸³⁾ in Muskelgewebe, Cyclin-dependent-Kinase-Inhibitoren (p15, p16, p21)⁽⁸⁴⁾ in Knochen- und Nierentumoren, Melanocyten-spezifischer-Transkriptionsfaktor (Mitf) in Melanocyten⁽⁷⁷⁾, das Transferrin-Gen in Sertoli-Zellen⁽⁸⁰⁾ und im Immunsystem die leichten und schweren Ketten IG-Enhancer⁽⁷²⁾.

Im Zusammenhang mit dem kolorektalen Karzinom wurde beobachtet, dass es bei Tumoren mit defektem APC-Gen zu einem über β -Catenin vermitteltem Anstieg der ITF2B-Expression kommt und dies die weitere neoplastische Transformation begünstigt. Im Gegensatz zu ITF2B zeigte ITF2A keine Regulation durch β -Catenin⁽⁷⁶⁾. Weitere Analysen von kolorektalen Adenomen und Karzinomen aller Stadien legten zudem dar, dass die Expression von ITF2B genau am Übergang vom Adenom zum Karzinom stark abfällt und in allen Stadien die Expression von ITF2B eng mit der Expression von p21^{Cip1} korreliert⁽⁵⁹⁾. Außerdem wurde gezeigt, dass ITF2B p53-unabhängig die Expression von Cyclin-dependent-Kinase-Inhibitor p21^{Cip1} induziert. p21^{Cip1} inhibiert klassischerweise über Interaktion mit Cyclin/CDK-Komplexen das Zellwachstums⁽⁸⁵⁾. Daneben fungiert es als negativer Regulator der Apoptose (p53-abhängig oder -unabhängig) und beeinflusst abhängig vom Zelltyp und deren Entwicklungsstatus die Differenzierung von Zellen. So weisen Zellen zu Beginn der Differenzierung ein deutlich höheres Expressionsniveau von p21^{Cip1} auf als in fortgeschritteneren Stadien⁽⁸⁶⁾.

Über das ITF2-Genprodukt ITF2A ist bislang nur wenig bekannt. Studien an Melanozyten ordneten ITF2A die gleiche Funktion jedoch in schwächerer Ausprägung wie ITF2B zu⁽⁷⁷⁾. Im Gegensatz zu ITF2B ist ITF2A allerdings nicht in der Lage, MyoD zu inhibieren⁽⁷⁸⁾.

1.5 Fragestellung

Kolorektale Karzinome sind in 70% der Fälle von einem Allelverlust (*Loss of heterozygosity*) der Region 18q21 betroffen. Auf der Suche nach Tumorsuppressorgenen in diesem chromosomalen Abschnitt wurden zwei Gene näher beschrieben: DCC und SMAD4. Die Funktion dieser Gene als Tumorsuppressorgene und deren Einfluss auf die Tumorprogression ist umstritten, weshalb nach weiteren Kandidaten geforscht wird. Ein solcher Tumorsuppressorgenkandidat ist das ITF2-Gen, welches in den meisten Karzinomen gemeinsam mit DCC und SMAD4 von einem Expressionsverlust betroffen ist. Die ITF2-Genprodukte (ITF2A und ITF2B) gehören zur Klasse I der basic-Helix-Loop-Helix-Proteine. Hierbei handelt es sich um ubiquitär exprimierte Transkriptionsfaktoren, die eine Hemmung der Proliferation und Aktivierung spezifischer Differenzierungsprogramme vermitteln. Die Inhibition der Expression von ITF2B scheint eine wichtige Rolle in der Progression kolorektaler Karzinome zu spielen, da das Gen im Laufe der Tumorigenese von einem zunehmenden Expressionsverlust betroffen ist.

Die Arbeit befasst sich mit der weiteren Charakterisierung des Tumorsuppressorgenkandidaten ITF-2. Folgende Fragestellungen sollten beantwortet werden:

1. Identifikation von Genen, deren Transkription durch ITF2B reguliert werden.
2. Vergleich der differentiellen Expression und Funktion der beiden Isoformen ITF2A und ITF2B.
3. Charakterisierung der differentiellen transkriptionellen Potenz von ITFA und ITF2B.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Isolation von RNA

Gesamt-RNA aus Gewebe wurde durch die Phenol/Chloroform-Extraktion (Chomczynski and Sacchi, 1987) unter Verwendung von Trizol (Invitrogen) nach Herstellerangaben gewonnen. Zuerst wurden die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 1ml Trizol-Reagenz aufgenommen. Nach Inkubation bei RT (5 min) wurden pro 1 ml Trizol 200 µl reines Chloroform (Sigma-Aldrich) hinzugegeben, geschüttelt und für 3 Minuten bei RT inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation (15 min, 4°C, 12000xg) wodurch drei voneinander getrennte Phasen entstanden: eine obere wässrige Phase mit der RNA, eine mittlere weiße Interphase und untere organische Phenol-Chloroformphase mit Proteinen und DNA. Die wässrige Phase wurde in ein neues steriles 1,5 ml-Gefäß überführt. Die RNA-Präzipitation erfolgte durch Zugabe von 500 µl Isopropanol (Merck) pro 1 ml Trizol. Nach kurzem Schwenken der Proben wurde die RNA in der anschließenden 10 minütigen Inkubation bei RT gefällt. Durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 12000xg) formte sich das RNA-Präzipitat zu einem sichtbaren Pellet. Nach Abnahme des Überstandes konnten restliche Salze und Isopropanol-Rückstände durch Zugabe von 1 ml eiskalten Ethanol (75%,) und anschließender Zentrifugation (5 Min, 4°C, 7500xg) ausgewaschen werden. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in entsprechender Menge DEPC-Wasser aufgenommen. Die Lagerung über Nacht bei 4°C unterstützte den Lösungsvorgang der RNA. Nach Bestimmung des RNA-Gehaltes mittels eines Spektrophotometers bei 260 und 280 nm konnten die Proben bei –80°C (Heraeus, Hanau) weggefroren werden.

2.1.2 Isolation von Protein

Zur Proteinextraktion wurden die Zellen gewaschen und abgeschabt. Nach Zentrifugation wurden die Zellen nach Zugabe einer entsprechenden Menge Reporterlysepuffer (Promega) unter Zusatz von Proteaseinhibitoren (Complete Mini, Roche) aufgeschlossen, indem sie solange resuspendiert wurden bis keine Zellaggregate mehr sichtbar waren. Ein anschließender Gefrier-Tau-Schritt unterstützte den Aufschluss. Die Zugabe von 1 µl Benzonase (Merck) und nachfolgender Inkubation (15 min) bei RT ermöglichte die endonukleatische Spaltung der noch vorhandenen Nukleinsäuren. Im Gegensatz zu anderen gängigen Verfahren, bei denen die DNA durch Zentrifugation entfernt wird, bietet dieses Vorgehen die Möglichkeit, an DNA gebundene Proteine ebenfalls mit zu erfassen. Die Aufbewahrung der Proben erfolgte bei –80°C.

2.1.3 Konzentrationsbestimmung von RNA und Protein

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration wurde die Nukleinsäure verdünnt in eine Quarzküvette aufgenommen und die optische Dichte bei den Absorptionsmaxima von 260 und 280 nm mittels eines Spektralphotometers (Photometer Ultrospec 1000, Amersham Pharmacia) gemessen. Einer OD_{260} von 1 entsprechen bei einer Wellenlänge von 260 nm 40 $\mu\text{g/ml}$ RNA.

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen erfolgte nach der Methode von Bradford (Bradford 1976). Die zur Messung verwendete BioRad-Proteinassay-Reagenz (BioRad) wurde 1:5 mit H_2O verdünnt. 1 ml dieses Ansatzes wurde in Plastikkuvetten mit 2 μl Proteinlösung gemischt und für fünf Minuten inkubiert. Nach Erstellen einer Eichgeraden mit 2, 4, 6 und 8 μg Rinderserumalbumin (BSA, Fluka) konnten die Proben bei einer Wellenlänge von 595 nm mittels eines Spektralphotometers gemessen und deren Konzentration bestimmt werden.

2.1.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Dieses Verfahren dient der Auftrennung von Proteinen in einer Acrylamidmatrix nach ihrer Größe mittels Elektrophorese. Dies wird durch einen von Laemmli etablierten Puffer ermöglicht, der das anionische Detergens Natrium Dodecyl Sulfate (SDS, Sigma-Aldrich) enthält, das die Eigenladung der Proteine maskiert und somit zu einer massenproportionalen negativen Nettoladung führt (Laemmli, 1970).

Bezeichnung	Zusammensetzung
Lämmli-puffer (4x)	125 mM Tris-HCl 4% (w/v) SDS 28% Glycerin Bromphenolblau 20% Mercaptoethanol (Zusatz kurz vor Gebrauch)

Zur Elektrophorese wurde die eindimensionale SDS-PAGE verwendet. 10 bis 80 μg Proteinextrakt wurden in entsprechender Menge mit Lämmli-puffer (4x) versetzt und aufgeköcht (95°C , 5 min). Das im Puffer enthaltene SDS führte zur Aufspaltung der Wasserstoffbrückenbindungen, die Thiolverbindung Mercaptoethanol (Merck) spaltete die Disulfidbrücken zwischen den Molekülen. Die Proteinproben wurden zunächst in einem weitmaschigen Sammelgel (5%) in schmalen Banden fokussiert, bevor im engmaschigeren Trenngel (10%) die Separation nach Proteingröße stattfand.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Trenngelpuffer (pH 8,8)	1,5 M Tris	
Sammelgelpuffer (pH 6,8)	1,5 M Tris	
APS-Lösung	10 % (w/v) Ammoniumpersulfat	
Sammelgel (5%)	Aqua bidestillata	4,1 ml
	Acryl-Bisacrylamid-Lösung (29:1)	1 ml
	Sammelgelpuffer	750 µl
	SDS (10%)	60 µl
	APS-Lösung (10%)	60 µl
	TEMED	6 µl
Trenngel (10%)	Aqua bidestillata	5,9 ml
	Acryl-Bisacrylamid-Lösung (29:1)	5 ml
	Trenngelpuffer	3,8 ml
	SDS (10%)	150 µl
	APS-Lösung (10%)	150 µl
	TEMED	6 µl

Nach Gießen der beiden Gele polymerisierten diese in einer Minigel-Apparatur vollständig aus. Die Quervernetzung des Acrylamids erfolgte durch Bisacrylamid. Zum Start dieser Reaktion diente Ammoniumpersulfat (APS, Sigma-Aldrich), als Katalysator TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin, BioRad). Anschließend konnten die Proben in die Geltaschen pipettiert und die Elektrophorese bei 100 V (Sammelgel) bzw. bei 200 V (Trenngel) in Laufpuffer durchgeführt werden (SLT Easy Reader SF Plus, SLT Labinstruments). Zur Größenbestimmung der einzelnen Proteine wurde der Proteinstandard „Precision Plus“ (BioRad) verwendet. Zur Detektion von ITF2A bzw. ITF2B wurden 10 µg, von p21^{Cip1} 80 µg und Aktin 40 µg Protein geladen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Laufpuffer (10x)	25 mM Tris-Base
	192 mM Glycin
	0,1% (w/v) SDS

2.1.5 Westernblot

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach dem „wet blot“ – Verfahren ebenfalls elektrophoretisch von dem Gel auf eine Polyvinyliden Fluorid Membran (PVDF) übertragen. Für die Dauer von 1 h wurde bei RT und einer Stromstärke von 400 mA ein elektrisches Feld erzeugt, das den Transfer der Proteine vom Trenngel auf die Polyvinyliden Fluorid Membran zur Folge hatte. Der Erfolg des Transfers konnte durch den vorgefärbten Proteinstandard kontrolliert werden.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Transferpuffer (10x)	25 mM Tris 192 mM Glycin 0,3% (w/v) SDS 20% Methanol

Nach dem Proteintransfer wurden die Membranen in TBST-Puffer mit 5% Magermilchanteil (Blocking-Reagenz, BioRad) für eine Stunde bei RT auf einem Schüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen.

2.1.6 Immunologischer Nachweis der Proteine

Zum Nachweis der gesuchten Proteine auf der Polyvinyliden Fluorid Membran, wurden die Immunoblots mit einem spezifischen Primärantikörper bei 4 °C über Nacht inkubiert. Da das in den Zellen exprimierte ITF2A bzw ITF2B Hämagglutinin (HA)- getagged war, wurde zum Nachweis von ITF2A bzw. ITF2B ein HA-Antikörper verwendet. Jeder Antikörper wurde zur Inkubation mit den Membranen mit einer 1% Magermilch-TBST-Lösung verdünnt. Zur Detektion des Erstantikörpers wurden die Membranen gewaschen und in TBST-Puffer mit dem entsprechenden Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper für eine Stunde bei RT geschüttelt. Nach weiterem Waschen erfolgte die Detektion des Zweitantikörpers mittels Chemiluminiscenz (ECL Western Blotting Detection Reagenz, GE Helthcare). Hierbei wurde nach Inkubation der Membran in einer Mischung aus ECL1 und ECL2 (1:1) das Luminol von der Zweitantikörper-gekoppelten Peroxidase oxidiert und die dadurch entstandene Lichtemission auf einem Spezialfilm dokumentiert und entwickelt (Filmentwickler AGFA Curix 60, AGFA). Der Film wurde dabei solange exponiert, bis eine optimale Bandenstärke des zu detektierenden Proteines erreicht war. Dies war bei p21^{Cip1} etwa nach 1-2 h, bei ITF2A, ITF2B und Aktin etwa zwischen 3 - 30 Sekunden der Fall.

Bezeichnung		Zusammensetzung		
TBST-Puffer		250 mM Tris 150 mM NaCl 0,15% (v/v) Tween		
Primärantikörper	Konzentration in Milch 1%	Inkubation	Isotyp	Hersteller
Anti-CIP1/WAF1	1:1000	4°C über Nacht	Maus-IgG	BD Biosciences
Anti-HA	1:1000	4°C über Nacht	Ratte-IgG	Roche Diagnostics
Anti-Aktin	1:2000	4°C über Nacht	Maus-IgG	MP-Biomedicals
Sekundärantikörper				
Anti-Maus-IgG	1:5000	1h bei RT	Schaf-IgG	Amersham Biosciences
Anti-Rat-IgG-HRP	1:5000	1h bei RT	Ziege-IgG	

2.1.7 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription stellt eine Methode zum Nachweis von mRNA-Transkripten eines Gens dar, indem die mRNA durch das retrovirale Enzym Reverse Transkriptase in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und damit der Amplifikation mittels PCR (*Polymerase Chain Reaction*) zugänglich gemacht wird.

Die Reverse Transkription (RT-Kit: SuperScript™ First Strand, Invitrogen) wurde im PCR-Block (Biozym) durchgeführt und bestand aus drei Schritten:

1. Verdau möglicher DNA in der Probe mittels DNase
2. Synthese der cDNA mittels Reverser Transkriptase (SuperScript II RT)
3. Verdau restlicher RNA mittels RNase

Zum Verdau der in der Probe vorhandenen DNA wurde nachfolgender Probenansatz inkubiert (15 min, 27°C):

Bezeichnung	Eingesetzte Menge
RNA	8 µl (4µg RNA + H ₂ O)
10x DNase I-Puffer	1,0 µl
DNase I	1,0 µl

Nach Zugabe von 1 µl 25mM EDTA-Lösung erfolgte das Erhitzen der Proben (15 min, 65°C), um Sekundärstrukturen aufzuspalten. Nach Abkühlen der Proben auf 4°C für 1 Minute und kurzem Mischen konnte die DNA-Synthese starten. Dazu wurden dem Probengemisch folgende Reagenzien hinzugesetzt:

Bezeichnung	Eingesetzte Menge
Random Hexamer Primer	1,375 µl
10 mM dNTP	1,375 µl

Anschließend wurden die Proben erhitzt (5 min, 65°C). Die Random Hexamer Primer dienen über zufällige Hybridisierung an die mRNA als Startpunkt für die Reverse Transkriptase. Nach anschließendem Abkühlen auf 4°C für 1 Minute wurde der Ansatz um folgende Reagenzien erweitert:

Bezeichnung	Eingesetzte Menge
10x RT-Puffer	2,75 µl
25 mM MgCl ₂	5,5 µl
0,1 M DTT	2,75 µl
DNase out	1,375 µl

Nach kurzem Mischen und Inkubation bei 25°C wurde die cDNA durch Zugabe von 1,38 µl SuperScript™ II synthetisiert. Dazu wurden die Proben zuerst auf 25°C (10 min), anschließend auf 42°C (50 min) und dann auf 70°C (15 min) erhitzt. Nach Abkühlen der Proben für 1 Minute auf 4°C erfolgte durch Zugabe von 1,38 µl RNaseH der RNA-Verdau (20 min, 37°C). Zur Kontrolle der Reversen Transkription wurde durch eine konventionelle PCR mit Primern für GAPDH mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt. Die Länge der GAPDH-PCR-Produkte sollte 453 Basenpaare umfassen (cDNA, genomische DNA: 556 bp.) Der 20µl-Ansatz für die Kontroll-PCR setzte sich folgendermaßen zusammen (PCR-Kit Hot Star Taq DNA Polymerase, Quiagen):

Bezeichnung	Eingesetzte Menge
10xPuffer	2 µl
25mM MgCl ₂	2 µl
dNTP	0,5 µl
GAPDH-FW-Primer	0,1 µl (0,2 µm)
GAPDH-RV-Primer	0,1 µl (0,2 µm)
Taq-Polymerase	0,2 µl
H ₂ O	14,6 µl
cDNA	0,5 µl

Es wurden alle Reagenzien bis auf die cDNA zu einem Mastermix pipettiert, der anschließend auf die einzelnen Gefäße verteilt wurde. Zum Schluß wurde die cDNA hinzugefügt und die PCR gestartet.

2.1.8 Polymerase-Kettenreaktion

2.1.8.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Das Verfahren der PCR ermöglicht es, ein spezifisches DNA-Stück aus einem komplexen Nukleinsäuregemisch (genomische DNA, Plasmid-DNA, cDNA) zu amplifizieren. Der zu vervielfältigende DNA-Abschnitt (*template*) wird durch Oligonukleotid-Primerpaare festgelegt und durch eine DNA-Polymerase synthetisiert.

Ein Zyklus der PCR-Reaktion umfasst drei Schritte: Denaturierung, Annealing und Elongation. Die Denaturierung bei 90-95°C ermöglicht das Annealing, die Hybridisierung der Primer an die komplementäre DNA-Zielsequenz. Die optimale Annealingtemperatur muss in der Regel empirisch ermittelt werden. Davon ausgehend erfolgt die Elongation, die DNA-Synthese mit Hilfe der thermostabilen DNA-Taq-Polymerase bei 72°C. Ein solcher Zyklus führt somit zur Verdopplung der zu untersuchenden DNA, die dann wiederum in der darauffolgenden Amplifikationsrunde als Matrize dienen kann. Da die Taq-Polymerase bereits während der initialen Aufheizphase des Thermocyclers aktiv ist, kann es zu unerwünschten Effekten wie Fehlhybridisierung oder Dimerbildung der Primer kommen. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Hot-Start-Technik wird die enzymatische Aktivität der Polymerase erst bei einer höheren Temperatur verfügbar. Für die PCR wurde ein Thermocycler verwendet.

2.1.8.2 Real-time-PCR

Bei der konventionellen PCR erfolgt die Detektion nach deren Abschluß mittels Gelelektrophorese. Sie liefert mehr Informationen über die Qualität als die Quantität der vorliegenden PCR-Produkte. Demgegenüber dient die quantitative *Real-Time-PCR* (qRT-PCR) der Auswertung der gebildeten DNA-Menge noch während der Amplifikation. Durch Zugabe eines Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green (Invitrogen), der sich unspezifisch an doppelsträngige DNA anlagert und gebunden nach Anregung 1000mal stärker fluoresziert, konnte die Fluoreszenz am Ende jedes Elongationsschrittes bei 480 nm in Echtzeit (*real time*) gemessen und gespeichert werden. Da sich die genannten Farbstoffe unspezifisch ebenso an Primer-Dimere oder unerwünschte PCR-Produkte anlagerten, konnte man zwischen den verschiedenen PCR-Produkten anhand deren Schmelzkurve oder anschließender Gelelektrophorese differenzieren. Um die Schmelzkurve zu erhalten, wurde am Ende jeden PCR-Laufes die Temperatur schrittweise auf 80°C erhöht, so dass die DNA-Stränge denaturierten, was den Abfall des Fluoreszenzsignals zur Folge hatte. Die erhobenen Ct-Werte wurden auf GAPDH normiert, um eventuelle Schwankungen in der eingesetzten DNA-Menge auszugleichen. Alle Daten wurden auf dem LightCycler von Roche (Heidelberg) erhoben.

2.1.8.3 Verwendete Primer und deren PCR-Bedingungen

Verwendete Primer (Metabion)

Oligoname	Sequenz (5' - 3')	T _M (°C)
ID3-694-FW	CAT CTC CAA CGA CAA AAG GAG	57,9
ID3-809-RV	CTT CCG GCA GGA GAG GTT	58,2
RUNDC2A-517-FW	TGA TGG ATG AAG AAA GGT CCA	55,9
RUNDC2A-585-RV	TCG CAA AGA GTA TGG AGT TCA G	58,4
FOXF1-924-FW	CAG CCT CTC CAC GCA CTC	60,5
FOXF1-1045-RV	CCT TTC GGT CAC ACA TGC T	56,7
SPSB2-730-FW	GAC CCT CTA TCC GGC AGT AA	59,4
SPSB2-830-RV	TCA GGT GCA GAA GGG AGT GT	59,4
NUPR1-189-FW	CTA TAG CCT GGC CCA TTC CT	59,4
NUPR1-248-RV	TCT CTC TTG GTG CGA CCT TT	57,3
CDKN1A-94-FW	CGC GAC TGT GAT GCG TA	58,2
CDKN1A-16-RV	CGG TGA CAA AGT CGA AGT TCC	59,8
h-GAPDH-FW	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	59,3
h-GAPDH-RV	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	59,3
ITF2B-353-FW	GGT TGC CAC CAG CAG AGT CT	61,4
ITF2B-420-RV	GTG GGC CAA AGG GTT CCT	58,2
ITF2A-99-RV	GTC GGC AGT GCT TGC GAT	58,2
ITF2A-26-FW	GCA TGG GCG GCA ACT C	56,9

Oligonukleotide ID3, SPSB2, NUPR1, CDKN1A, GAPDH, ITF2A, ITF2B

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
Enzym-Aktivierung	1	95°C	15 min
Denaturierung	40	95°C	30 s
Annealing		57°C	30 s
Elongation		72°C	30 s
Measure Point		80°C	15 s

Oligonukleotide RUNDC2A, FOXF1

Schritt	Anzahl der Zyklen	Temperatur	Zeit
Enzym-Aktivierung	1	95°C	15 min
Denaturierung	40	95°C	30 s
Annealing		55°C	30 s
Elongation		72°C	30 s
Measure Point		80°C	15 s

2.1.9 Prinzip der gelelektrophoretischen Auftrennung

Dieses Verfahren dient der Auftrennung unterschiedlicher DNA-Fragmente nach ihrer Größe. Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde ein 1,5 oder 3%iges Agarosegel hergestellt. Dafür wurden 1,5 g oder 3,0 g Agarose (PeqLab) in 100 ml TBE-Puffer zum Kochen gebracht. Nach Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid wurde es in einen Gelschlitten mit Probenkamm gegossen und nach Abkühlung in die Elektrophorese-Kammer (BioRad) eingelegt. Nach Entfernen des Kammes konnten die DNA-Proben mit Ladepuffer versetzt in die Geltaschen pipettiert werden. Um dies zu erleichtern enthielt der Ladepuffer einen Farbstoff und Glycerin, welches aufgrund seiner höheren Dichte zum raschen Absinken der Probe in der Tasche führte. Danach erfolgte die Elektrophorese bei 100 mA. Durch die Interkalierung des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid mit den Nukleotidsträngen konnte die Auftrennung der DNA-Fragmente anschließend im UV-Transilluminator kontrolliert und abgelichtet werden.

2.2 Kultur von humanen Kolonkarzinomzellen

2.2.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Die Zellkultur erfolgte in einem Begasungsbrutschrank bei einer Temperatur von 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und einem 5%igen CO₂/Luftgemisch (Heraeus). Die verwendeten Chemikalien stammten, wenn nicht anders angegeben, von der Firma PAA Laboratories. Zum Ausschluss von Kontaminationen wurden sämtliche Arbeiten und Experimente mit den Zellen unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow (Heraeus) durchgeführt. Die Klone der kolorektalen Adenokarzinomzelllinien DLD-1 und HCT116 (ATCC) wurden in Zellkulturschalen (10 cm) in DMEM-Kulturmedium kultiviert und regelmäßig lichtmikroskopisch auf Wachstumsverhalten und Anzeichen von mikrobieller Verunreinigung inspiziert. Für die Experimente kamen nur Passagen unter 20 zum Einsatz, um weitere Veränderungen der DNA möglichst auszuschließen. In allen Zelllinien wurde eine mögliche Kontamination mit Mykoplasmen mittels PCR ausgeschlossen.

Bei einer Zellkonfluenz von ungefähr 80-90% bzw. 3x pro Woche wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde das Medium entfernt und die Zellen mit PBS gewaschen. Nach Bedecken der Zellen mit einer Trypsin-Lösung und kurzer Inkubation im Brutschrank konnten die Zellen durch Resuspension abgelöst werden. Anschließend wurde das Zell-Trypsin-Gemisch in Medium gegeben, wozu es durch das darin enthaltene Antitrypsin zum Abbruch der enzymatischen Reaktion kommt, und zentrifugiert (5 min, 1200xg). Nach Resuspension in je nach dem weiteren Verwendungszweck entsprechender Menge Medium konnten die

Zellen entweder zur Kultur oder nach deren genauem Auszählen (Neubauer-Zählkammer) für Experimente ausgesäht werden.

Bezeichnung	Zusammensetzung
DMEM-Kulturmedium	90% DMEM 10% FCS 50 U/ml Penicillin 50 µg/ml Streptomycin

2.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zum Einfrieren von Zellen bei -80°C oder im Stickstofftank wurde Einfriermedium verwendet, das aus eiskaltem FCS mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma-Aldrich) bestand. DMSO verhindert eine mögliche Schädigung der Zellmembran durch Bildung von Eiskristallen. Aufgrund seiner Toxizität erfolgte der Vorgang des Einfrierens und Auftauens zügig.

Zum Einfrieren von Zellen wurden 10 cm-Platten mit ca. 85% Konfluenz verwendet. Nach dem Waschen, Ablösen und Zentrifugieren der Zellen wurde das Zellpellet in 2 ml Einfriermedium aufgenommen, gleichmäßig auf die Einfrierröhrchen verteilt und umgehend bei -80°C aufbewahrt.

Zum Auftauen von Zellen aus Lagerung bei -80°C wurde die Zell-Einfriermedium-Suspension zügig in Medium aufgenommen und anschließend zentrifugiert. Nach Resuspension des Zellpellets in Medium erfolgte die Aussaat mit etwa 40% Konfluenz in 10cm-Kulturschalen. Vor einer weiteren Verwendung für Versuchsansätze wurden die Zellen mindestens einmal passagiert.

2.2.3 Stabile Transfektion mit Lipofektion

Zur Herstellung stabil transfizierter Zellen verwendet man eine zirkuläre DNA (Plasmide), die zusätzlich zum Gen von Interesse ein Resistenzgen kodiert. Dies hat bei Kultivierung in entsprechendem Selektionsmedium (in diesem Fall Hygromycin) eine Selektion jener Zellen zur Folge, die diese Plasmid-DNA in ihr Genom integrierten und das Gen exprimieren können. Das für die Transfektion notwendige Plasmid (ITF2B-Supertight-Konstrukt) wurde durch Klonierung des ITF2-Genes in das Plasmid RTS-1⁽⁸⁷⁾ generiert. Dieses Plasmid enthält unter Kontrolle eines Hühner- β -Aktin-Promotor einen Tetrazyklin-kontrollierten-Transkriptionsaktivator (rtTA2s-M2) und –repressor (rTS-KRAB). Der zu untersuchende Genabschnitt, in diesem Fall für ITF2A und ITF2B, wird von einem auf rtTA2s-M2 und rTS-KRAB reagierenden Promotor kontrolliert. Dies führt bei Zugabe von Tetracyclin bzw.

Doxyzyklin (Stimulanz) zu einer Expression des ITF2-Genes und bei dessen Abwesenheit zu einer Suppression der Transkription. Weiterhin enthält das Plasmid ein Hygromycin-Resistenzgen, was im Laufe der Zellkultivierung zu einem Absterben derjenigen Zellen führt, die das Plasmid nicht aufgenommen haben. Das ITF2-Gen ist Hämagglutinin(HA)-getagged, wodurch eine Detektion des Proteins ITF2A bzw. ITF2B im Westernblot durch Verwendung eines HA-Antikörpers ermöglicht wird.

Zur Aufnahme der Fremd-DNA in die Zelle (Transfektion) wurde die Technik der Lipofektion verwendet. Hierzu wurden die Zellen in *6-well*-Platten aufgeteilt (5×10^5 Zellen pro Well) und 24 Stunden später transfiziert. Dazu wurden zuerst pro Well 2,5 µg des jeweiligen Plasmids in 100 µl OPTIMEM und 5 µl Fugene (2 µl/µg DNA, Roche Diagnostics) in 50 µl OPTIMEM gemischt. Nach Zugabe des Fugene-OPTIMEM-Gemisches zum Plasmid-OPTIMEM-Gemisch erfolgte eine 20minütige Inkubation. Anschließend wurden 100 µl dieses Ansatzes jedem Well nach Mediumwechsel hinzugegeben. An beiden darauffolgenden Tagen wurden jeweils ein Teil der Zellen in Trypsin gelöst, zentrifugiert, in 2 ml DMEM aufgenommen und in doppeltem Ansatz und unterschiedlicher Verdünnung auf 10-cm-Platten ausgesät. Die eine Hälfte der Zellen wurde sofort mit 400 µg/ml Hygromycin in Selektion genommen, die andere 24 Stunden später. Dieses Schema erleichtert trotz der Toxizität der Transfektionsreagenzien durch unterschiedliche Regenerationszeiten der Zellen deren Anwachsen. Das Wechseln des Selektionsmediums erfolgte alle 3-4 Tage, bis die Einzelklone einen Durchmesser von 3-5 mm hatten. Dann konnten nach Waschen der Platte mit PBS Klone isoliert werden, indem gut sichtbare Einzelkolonien erst in ca. 10 µl Trypsin angedaut und anschließend in eine *48-well*-Platte pipettiert wurden. Pro Well wurden 300 µl DMEM und zur Inhibition des Trypsins 20 µl FCS zugesetzt. Bei ca. 90%iger Konfluenz konnten die Zellen in *24*-, *12*-, *6-well*-Platten und 6-cm-Platten unter Beibehaltung der Selektion umgesetzt werden. Diese durch stabile Transfektion entstandenen Zellklone wurden im weiteren Verlauf permanent mit Hygromycin (200-250 µg/ml) unter Selektionsdruck genommen, um ein Ausstoßen des Plasmides zu vermeiden. Die Stimulation der Zellen für die Durchführung der Experimente erfolgte mit Doxyzyklin 1:1000 (Sigma-Aldrich).

2.3 Durchflußzytometrie

2.3.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Die Durchflußzytometrie (auch als FACS für *Fluorescence-activated cell sorters* bezeichnet) ist eine Methode zur Detektion und Analyse von Signalen, die von einzelnen Zellen oder anderen Partikeln in einem Flüssigkeitsstrom bei Durchtritt durch einen Lichtstrahl erhalten werden. Dazu werden die Zellen einer Zellsuspension in eine Messküvette gesaugt und

durch die basierend auf der Verringerung des Kapillardurchmessers dort herrschende laminare Strömung einzeln an einem Argon-Laserstrahl (488nm) vorbeigeleitet. Das dort entstehende Streulicht ist abhängig von den physikalischen Eigenschaften einer Zelle wie Querschnittsfläche, Refraktionsindex, Membranstruktur und intrazellulären Bestandteilen und wird in Quantität und Qualität vom Durchflusszytometer erfasst. Die Streulichtemissionen teilen sich auf in das Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter), das über die Lichtabsorption eine Aussage über die relative Zellgröße trifft, und das Seitwärtsstreulicht (Side Scatter), das über die Lichtreflektion eine Aussage über die relative optische Dichte, das heißt Zellgranularität und Membranfaltung, trifft. Zusätzlich kann durch die Verwendung fluoreszierender Farbstoffe, sei es Nukleinsäure-bindende Farbstoffe zur Erfassung des DNA-Gehaltes oder an Antikörper gebundene Farbstoffe zur Detektion von Oberflächenmolekülen oder intrazellulären Strukturen, eine genauere Beurteilung des Zellgemisches erfolgen. Die spezifischen Emissionsspektren der Fluoreszenzfarbstoffe werden nach Herausfilterung von unpolarisiertem Licht durch Hilfe von Bandpass-Filtern in drei Kanälen (FL1 = 537nm, FL2 = 597nm, FL3 = 650nm) erfasst.

2.3.2 Zellzyklusanalyse nach Nicoletti

Nukleinsäure kann durch spezifische Fluoreszenzfarbstoffe wie Ethidiumbromid oder Propidiumjodid angefärbt werden. Da Fluoreszenz und DNA-Gehalt einer Zelle proportional sind, kann darüber eine Aussage über DNA-Gehalt und somit Zellzyklusstatus einer Zelle getroffen werden. Apoptose (sub-G₁-Phase) ist durch einen niedrigeren DNA-Gehalt gekennzeichnet, da es zu einer Fragmentierung der DNA und Freisetzung dieser aus der Zelle kommt. Allerdings sind die genannten Farbstoffe nicht zellgängig, weshalb diese Methode eine Zellpermeabilisierung voraussetzt, zudem interkalieren sie ebenso mit vorhandener RNA, weshalb diese zuvor verdaut werden muss. Eine neue Methode von Ildo Nicoletti umgeht die Problematik durch Zusatz des Detergenz Triton X-100 (Sigma-Aldrich). Dieses Detergenz lysiert nur die zytoplasmatische Membran und nicht die Kernmembran von Zellen. Nach Freisetzung der Zellkerne und Anfärben der nukleären DNA mit Propidiumjodid können somit die einzelnen Zellkerne analysiert werden.

2.3.3 Probenpräparation und Anfärbung

Der Ansatz erfolgte im 12-Well ($8,5 \times 10^4$ Zellen/Well) oder im 6-Well ($3,5 \times 10^5$ Zellen /Well). Die Zellen wurden zur Arretierung in der G₀/G₁-Phase in DMEM-Medium mit 0,2% FCS ausgesäht. Acht Stunden danach erfolgte bei den entsprechenden Zellen die Stimulation mit Doxyzyklin. Nach weiteren 24 Stunden wurde unter Beibehaltung der Stimulation das Medium gegen DMEM mit 10% FCS ausgetauscht, um den Zellzyklus zu starten. Weitere 16

Stunden später konnten die Zellen vorsichtig abgeschabt, pelletiert und in 250-400 µl Nicolettipuffer resuspendiert werden. Nach mindestens 30 minütiger, lichtgeschützter Inkubation der Proben auf Eis oder 24 stündiger Inkubation bei 4°C konnten die Proben gemessen werden. Die Voreinstellung des Gerätes (FACScalibur, Becton Dickinson) wurde mit einer zusätzlich ausgesähten, unbehandelten Probe durchgeführt. Anhand dieser wurde der dem Farbstoff zugeordnete Messkanal so eingestellt, dass er die gesuchte Population gut erfasste. Die Verdünnung der Proben mit PBS richtete sich nach den in einem bestimmten Zeitraum gemessenen Ereignissen und sollte im Bereich von 700-900 Zellen pro Sekunde liegen. Die Datenauswertung wurde Cell Quest® software benutzt.

Bezeichnung	Zusammensetzung
Nicoletti-Puffer	0,1% Triton X-100 50 µg/ml Propidiumjodid 0,1% tri-Natriumcitrat-2-hydrat

2.4 MTT-Assay

Der MTT-Assay wird zur Messung der Zellproliferation verwendet. Lebende Zellen nehmen das gelbe Tetrazoliumsalz MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-Diphenyltetrazolinumbromid, Sigma-Aldrich) auf und setzen es mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem stark blauen, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff um. Für die photometrische Messung (492 nm) werden die Zellen lysiert, um den Farbstoff freizusetzen. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen und somit indirekt mit der Zellzahl. Bei Messungen über einen längeren Zeitraum, in dieser Arbeit nach 48h und 96h, kann dadurch indirekt eine Aussage über das Proliferationsverhalten einer Zellpopulation getroffen werden. Für den Assay wurden in zwei 96-Well-Platte pro Well 5000 Zellen in 250 µl DMEM-Kulturmedium ausgesäht. Das Stimulans Doxyzyklin wurde den entsprechenden Zellen im Verhältnis 1:1000 nach Aussaat zugesetzt und alle 24 Stunden gewechselt. Der Mediumwechsel der unstimulierten Zellen erfolgte nach zwei Tagen. Zur Messung der Zellproliferation nach 48 h wurde bei der ersten Platte das Medium abgesaugt und pro Well 225 µl Medium mit 25 µl MTT-Stammlösung (lichtgeschützte Aufbewahrung) gegeben. Anschließend wurde die Platte bei 37°C solange inkubiert, bis die Bildung der Formazankristalle im Lichtmikroskop analysiert werden konnte (meist nach 1 h). Nach Entfernen des Mediums und Zugabe von 100 µl eines Isopropanol-Salzsäure-Gemisches zum Lösen der Kristalle erfolgte eine 5 minütige Inkubation bei 37°C. Danach konnte die Exstinktion photometrisch im Elisa-Reader bei 492 nm bestimmt werden. Ebenso wurde zur Messung der Zellproliferation nach 96 h vorgegangen.

Bezeichnung	Zusammensetzung
MTT-Stammlösung	50 ml PBS 250 mg Thiazyl Blue (5 mg/ml)
Isopropanol-HCl-Lösung	50 ml Isopropanol 165 µl HCl (12 M)

2.5 DNA-Microarray

Anhand eines DNA-Microarrays ist es möglich, das Expressionsmuster mehrerer Gene (in dieser Arbeit etwa 1500) in verschiedenen Proben parallel zu analysieren und Unterschiede darzustellen. Als Microarray wird ein Träger bezeichnet, auf dem in definierten Positionen cDNA oder synthetisch hergestellte Oligonukleotide angebracht sind. Diese fungieren bei Hybridisierung mit dem fluoreszenzmarkierten Probenmaterial (cDNA) als Sonden, in dem die cDNA an ihren komplementären Strang auf dem Array bindet. Anschließend wird der Array mit einem Laser bei 540 nm und 630 nm ausgelesen. Nach der Auswertung des Arrays kann anhand der Farbe der Positionen den verschiedenen Genen die Veränderung im Expressionsmuster zugeordnet werden. Ein rotes Signal steht für Expressionssteigerung, ein grünes für Expressionsverringern und ein schwarzes Signal für fehlende Expressionsänderung in schwarzem Signal. Die in dieser Arbeit verwendeten Microarray-Analysen (PIQOR Oncology Array) wurden von der Firma Miltenyi-Biotec erstellt.

2.6 Reporteragen-Assay

Reporteragen-Assays ermöglichen den Nachweis von Veränderungen in der Genexpression. Das Prinzip basiert auf der Verknüpfung der zu untersuchenden Regulationseinheit mit einem Reporteragen, meist das Luziferasegen. Nach Transfektion in Zellen kann das Lumineszenzsignal, das bei der Spaltung von Luziferin durch die Luziferase entsteht, in einem Luminometer gemessen und das Expressionsmuster darüber analysiert werden. Zur Normierung wurde jeweils das Plasmid pCH110 kotransfiziert. Dieses exprimiert unter Kontrolle eines viralen Promotors konstitutiv β -Galaktosidase, welches o-Nitrophenyl- β -D-Galaktosid hydrolytisch zu o-Nitrophenol spaltet. Dadurch entsteht ein Lumineszenzsignal, das photometrisch im Elisa-Reader bestimmt werden kann. Je nach Aufbau des Experimentes kam der Vektor pCND3 (Invitrogen) zum Einsatz, der der Konstanthaltung der transfizierten DNA-Menge diente. Zur Untersuchung der Auswirkungen von ITF2A und

ITF2B wurden diese Proteine konstitutiv exprimierende Plasmide eingesetzt: pGB634 (pCNA3 + ITF2B) und pGB640 (pCNA3 + ITF2A).

Außerdem standen folgende Reportergerkonstrukte zur Verfügung und wurden für die Reportergerassays verwendet:

Verwendete Reportergerkonstrukte	Beschreibung
pGL3basic Cip1 K	Basen -268 bis +100
pGL3basic Cip1 L	Basen -2543 bis +100
pGL3basic Cip1 K/DA	Basen -287 bis +81 und +3748 bis +4361
pGL3basic Cip1 K/DA 11m	E-Box 11 (von Cip1 K/DA) mutiert
pGL3basic Cip1 K/DA 12m	E-Box 12 (von Cip1 K/DA) mutiert

Für die Assays wurden die Zellen in 12-Well-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden konnten die Reportergerne mit Nanofektin (3,2 µl/µg DNA) in die Zellen transient transfiziert werden. Nach 48 Stunden wurden das Medium abgesaugt, die Zellen gewaschen und in 125 µl Reportergerlysepuffer lysiert. Nach einem anschließenden Gefrier-Tau-Schritt wurde die Suspension in ein 1,5 ml-Gefäß überführt, bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Gefäß überführt. Zur Bestimmung der β-Galaktosidase wurden 40 µl des Überstandes in einer 96-well-Platte zur äquivalenten Menge β-Galaktosidase-Puffer pipettiert. Nach Inkubation der Platte bei 37°C konnte die ablaufende Reaktion (ersichtlich an einem gelblichen Farbumschlag) durch Zugabe von 125 µl Natriumcarbonat blockiert und die Extinktion im Elisa-Reader (SLT Microplatereader, SLT) bei 402 nm gemessen werden. Zur Bestimmung der Luziferase-Aktivität wurden 25 µl des Überstandes in einem speziellen Luminometer-Röhrchen mit der äquivalenten Menge Luziferase-Assay-Reagenz (Luziferase Assay System, Promega) gemischt und die Luziferaseaktivität für 30 Sekunden mit einem Luminometer bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1 Zielgene von ITF2B

3.1.1 Testung von DLD1-Klonen, die ITF2B induzierbar exprimieren

Im Laufe der Tumorigenese kolorektaler Karzinome kommt es unter anderem zu einem Heterozygotieverlust (LOH) der Region 18q21. Diese Region kodiert mehrere Gene, die im Hinblick auf eine mögliche Rolle in der Normal-Adenom-Karzinom-Sequenz untersucht worden sind. Bislang konnte jedoch keinem dieser Gene die alleinige Funktion als Tumorsuppressorgen dieser Region nachgewiesen werden, die die Häufigkeit von LOH der Region 18q21 erklären könnte (in 70% aller kolorektalen Karzinome). Unsere Untersuchungen konzentrierten sich deshalb auf das ITF2-Gen, das ebenfalls in dieser chromosomalen Region lokalisiert ist.

Um die Funktion von ITF2B analysieren zu können, sollte in der zu verwendenden Zelllinie möglichst wenig endogenes ITF2B vorhanden sein, um die Ergebnisse nicht zu verfälschen. Mit Hilfe der qRT-PCR wurden die endogenen ITF2B-mRNA-Spiegel in DLD1-Zellen gemessen und mit denen in gepooltem Normalgewebe verglichen (Abb. 4). Es konnte nachgewiesen werden, dass DLD1-Zellen im Vergleich zum Normalgewebe keine nennenswerten ITF2B-mRNA-Mengen exprimierten.

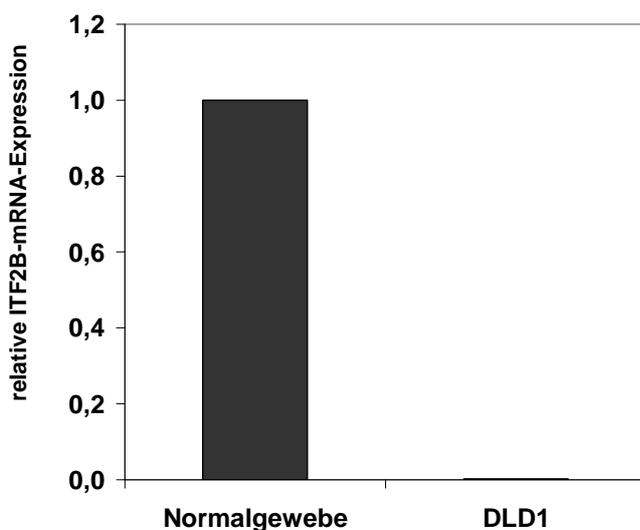


Abb. 4: DLD1-Zellen exprimieren keine nennenswerten ITF2B-mRNA-Mengen. Gezeigt ist der Faktor der mRNA-Expression von ITF2B in der Kolonkarzinomzelllinie DLD1 bezogen auf gepooltes, humanes Kolonnormalgewebe anhand qRT-PCR-Daten nach Normalisierung auf Aktin.

Zur Charakterisierung des Transkriptionsfaktors ITF2B standen Klone einer stabilen DLD1-Zelllinie zur Verfügung, die ITF2B nach Zugabe von Doxyzyklin induzierbar exprimierten. Zur Kontrolle, ob die Expression von ITF2B durch Zugabe von Doxyzyklin in DLD1-ITF2B-Klon D induziert werden konnte, wurden DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) für 24 Stunden mit Doxyzyklin stimuliert, anschließend lysiert und durch Immunodetektion auf die Expression von ITF2B untersucht. Es zeigte sich, dass DLD1-ITF2B-Klon D nach Stimulation mit Doxyzyklin ITF2B induzierbar exprimierte (Abb. 5).

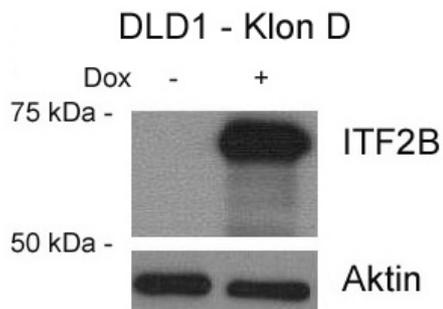


Abb. 5: Die Expression von ITF2B konnte in DLD1-ITF2B-Klon D induziert werden. DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) wurden für 24 h mit Doxyzyklin stimuliert (+) bzw. nicht behandelt (-), totales Zelllysate hergestellt und die Expression von ITF2B durch Immunodetektion mit dem HA-Antikörper nachgewiesen. Aktin diente als Ladungskontrolle.

3.1.2 Identifizierung von ITF2B-Zielgenen

Zur Charakterisierung des ITF2B-Proteins sollten dessen Zielgene ermittelt werden. Um diese zu identifizieren haben wir einen DNA-Microarray verwendet, der ca. 1500 Krebs-relevante Gene enthielt.

Zur Durchführung der DNA-Microarray-Experimente wurde DLD1-ITF2B-Klon D ausgewählt und Gesamt-RNA von unbehandeltem und für 24h mit Doxyzyklin stimuliertem Probenmaterial gewonnen. Anschließend erfolgte die reverse Transkription der RNA in cDNA, Hybridisierung mit der cDNA-Trägermatrix und Auswertung der Daten. Eine Wiederholung des Experimentes ergab, dass insgesamt 21 Gene durch ITF2B reguliert wurden. Wir wählten nach Literaturstudium diejenigen aus, von denen wir annahmen, dass sie einen möglichen Einfluss auf die kolorektale Karzinogenese besaßen (Tab. 2).

Gen-Name		Faktor der Regulation	Funktion	NM-Nummer
ITF2	Immunoglobulin Transcription Factor 2	1,76	Transkriptionsfaktor	NM_001083962
SPSB2	splA/ryanodine receptor domain and SOCS box	2,28	unbekannt	NM_001146316
NUPR1	nuclear protein 1	2,7	Antiapoptotischer Zellzyklusregulator	NM_012385
CDKN1A	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A	3,17	Inhibitor der CDK 2+4	NM_078467
ID3	inhibitor of DNA binding 3	3,23	Inhibitor der DNA-Bindung	NM_002167
RUNDC2A	RUN domain containing 2A	4,13	unbekannt	NM_032167
FOXF1	forkhead box F1	6,38	Transkriptionsfaktor	NM_001451

Tab. 2: Der Transkriptionsfaktor ITF2B induziert die Expression von mehreren Genen, die eine Rolle in der kolorektalen Karzinogenese spielen könnten. DLD1-ITF2B-Klon D wurde für zwei unabhängige DNA-Mikroarray-Experimente 24 h mit Doxyzyklin behandelt. Anschließend erfolgte die RNA-Extraktion, reverse Transkription in cDNA, Hybridisierung des DNA-Mikroarrays und Auswertung der Daten.

Um die Ergebnisse der DNA-Microarrays zu validieren, wurde die Expression der Zielgene nach Induktion von ITF2B per qRT-PCR analysiert. Die Auswertung aller qRT-PCR-Daten ergab folgendes Ergebnis: Die Gene FOXF1, NUPR1, RUNDC2A, SPSB2 und ID3 zeigten keine wesentliche Regulation durch ITF2B. Ein deutlicher Anstieg der mRNA-Expression um den Faktor 3,43 zeigte sich dagegen für CDKN1A. Diese Expressionsänderung von CDKN1A betrachteten wir als relevant, weshalb wir uns auf dieses Gen konzentrierten (Abb. 6).

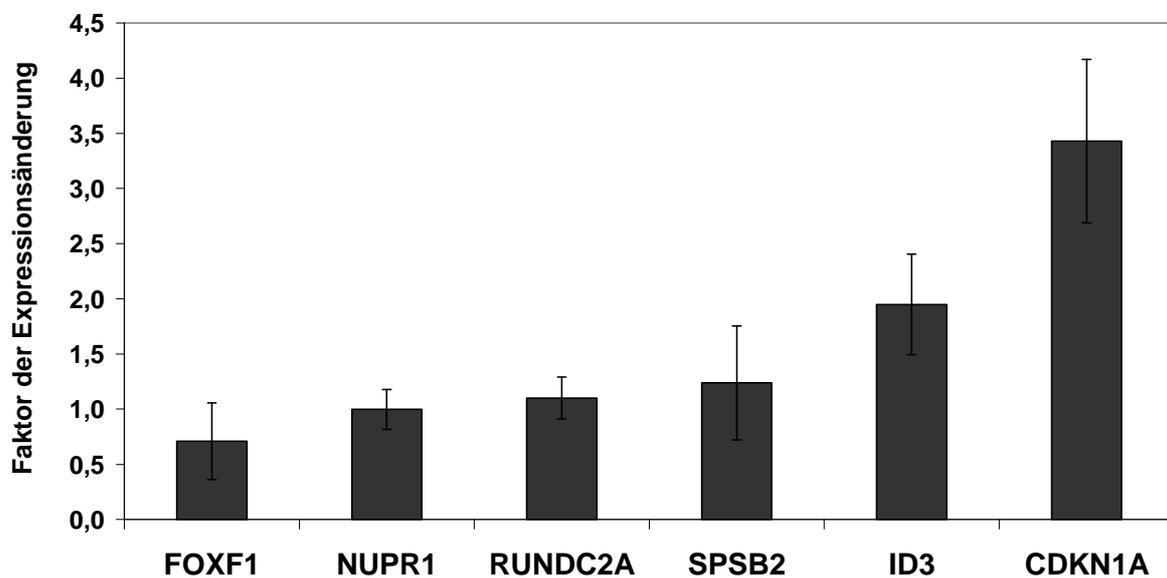


Abb. 6: ITF2B induziert die Expression von CDKN1A. DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) wurden für 24 h mit Doxyzyklin stimuliert. Anschließend erfolgte die RNA-Extraktion, reverse Transkription in cDNA und Quantifizierung der Zielgen-mRNA anhand qRT-PCR-Daten. Die Werte wurden auf GAPDH normalisiert. Standardabweichung und Mittelwerte wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.

3.1.3 ITF2B steigert p21^{Cip1}-Protein-Spiegel

Zum Nachweis, dass die CDKN1A-mRNA zu p21^{Cip1}-Protein translatiert wird (CDKN1A bezeichnet das Gen, p21^{Cip1} das Protein), wurde die p21^{Cip1}-Proteinmenge mit Hilfe der Immunodetektion untersucht. Dafür wurden DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) für 24 h mit Doxyzyklin stimuliert, lysiert und einer Immunodetektion unterzogen. Als Vergleich dienten DLD1-Zellen, die mit dem entsprechenden Kontrollvektor transfiziert worden sind. Es zeigte sich, dass die Induktion der Expression von ITF2B über eine Zunahme der CDKN1A-mRNA die p21^{Cip1}-Proteinexpression steigert (Abb. 7).

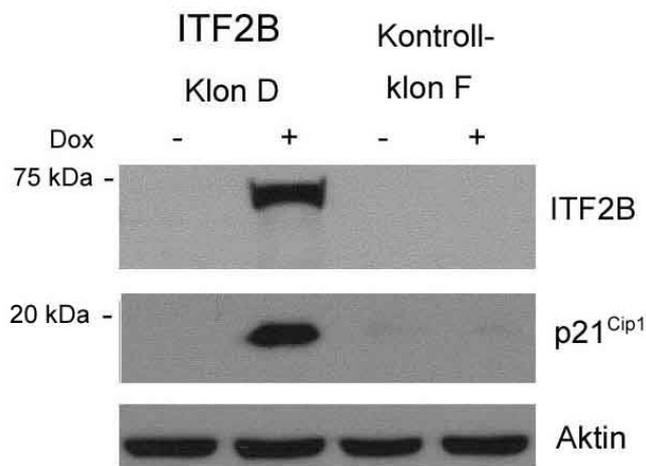


Abb. 7: ITF2B induziert die Expression von p21^{Cip1}. DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) wurden für 24 h mit Doxyzyklin stimuliert (+) bzw. nicht behandelt (-), totales Zelllysate hergestellt und die Expression von ITF2B und p21^{Cip1} durch Immunodetektion mit dem HA- und p21^{Cip1}-Antikörper nachgewiesen. Aktin diente als Ladungskontrolle.

Um die Ergebnisse zu validieren und zu verdeutlichen, dass der Anstieg an p21^{Cip1}-Protein in direktem Zusammenhang mit der zeitlichen Einwirkung von ITF2B steht, wurden DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) unterschiedlichen Stimulationszeiten mit Doxyzyklin (0, 6, 21, 18, 24, 48 h) unterzogen. Anschließend wurden totale Zelllysate hergestellt und diese mittels Immunodetektion untersucht. Zum Ausschluß unerwünschter Nebeneffekte wurden DLD1-Kontrollzellen (Klon F) mitgeführt. Die Daten belegten, dass die Zunahme der p21^{Cip1}-Proteinmenge direkt mit der Dauer der ITF2B-Expression korreliert (Abb. 8).

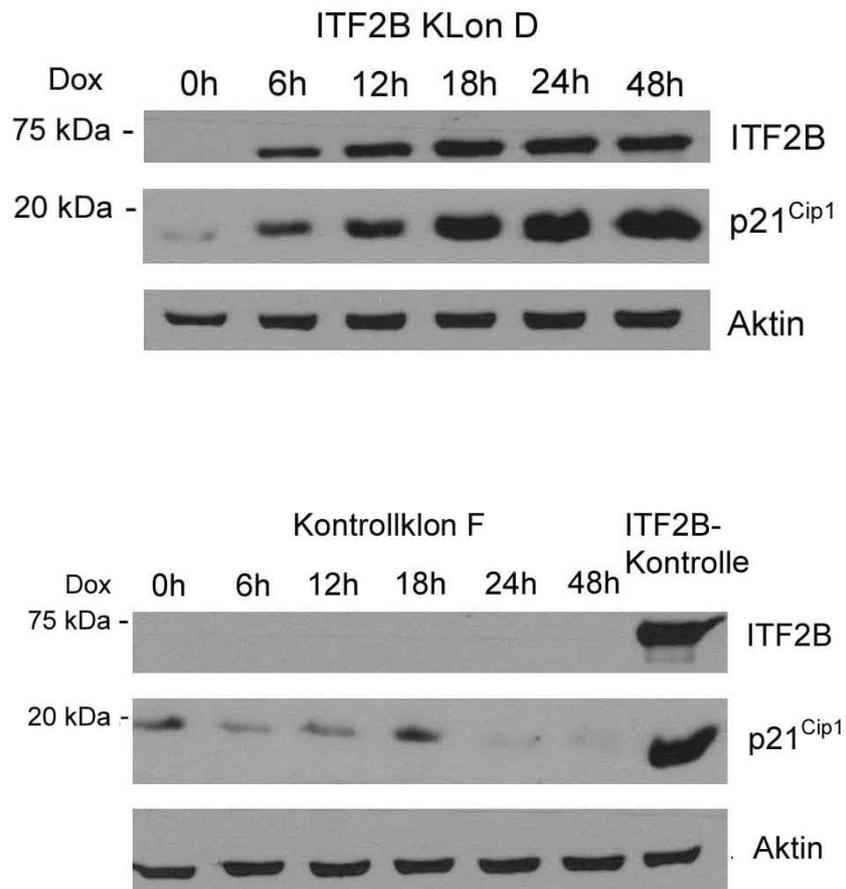


Abb. 8: Die p21^{Cip1}-Proteinmenge korreliert mit der ITF2B-Expression. DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) und DLD1-Kontrollzellen (Klon F) wurden für 0, 6, 12, 18, 24 und 48 h mit Doxzyklin stimuliert, totales Zelllysate hergestellt und die Expression von ITF2B und p21^{Cip1} durch Immunodetektion mit dem HA- und p21^{Cip1}-Antikörper nachgewiesen. Aktin diente als Ladungskontrolle.

3.1.4 Expression von ITF2B senkt die Proliferationsrate

Klassischerweise fungiert das Protein p21^{Cip1} über Interaktion mit dem Cyclin/CDK-Komplex als Wachstumsinhibitor. Deshalb sollte untersucht werden, welchen Einfluss die Expression von ITF2B auf das Wachstumsverhalten hat.

Dafür wurden DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) und DLD1-Kontrollzellen (Klon F) für 96 h mit Doxyzyklin stimuliert und die mitochondriale Aktivität mit Hilfe des MTT-Assays analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression von ITF2B zu einer Verringerung des Zellwachstums führt (Abb. 9).

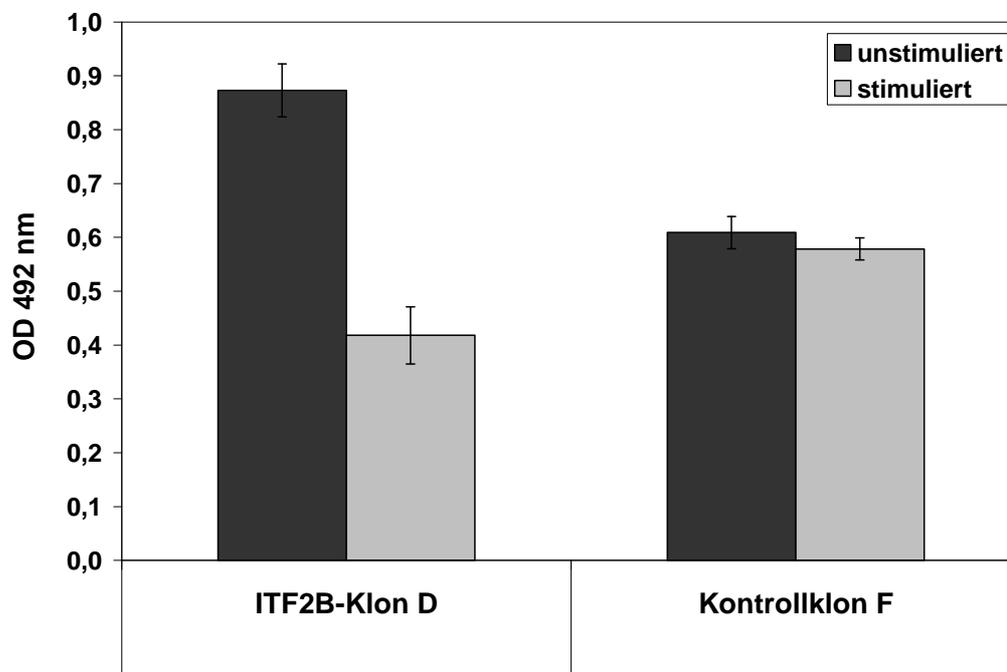


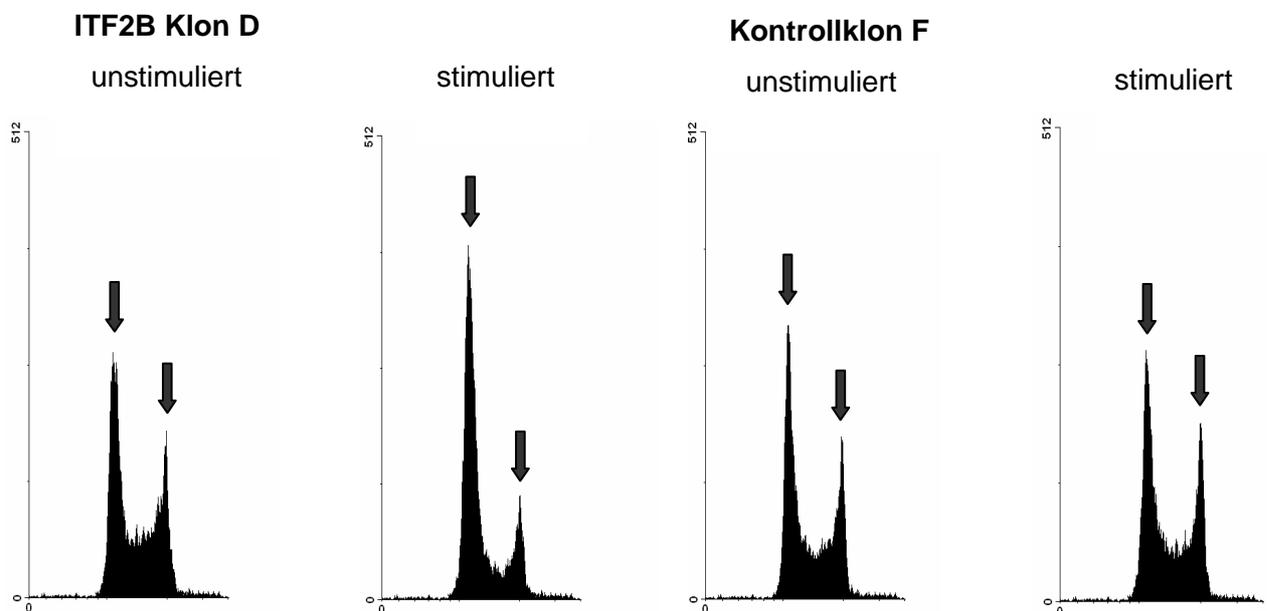
Abb. 9: Die Expression von ITF2B hemmt das Zellwachstum. Für den MTT-Assay wurden je 5000 DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) und DLD1-Kontrollzellen (Klon F) in eine 96-Well-Platte ausgesät, für 96 h mit Doxyzyklin stimuliert und die mitochondriale Aktivität gemessen. Mittelwert und Standardabweichung ergaben sich aus vier unabhängigen Ansätzen.

3.1.5 Expression von ITF2B bewirkt Zellzyklusarrest

Eine Verringerung der Wachstumsrate kann entweder auf Induktion von Apoptose oder Arretierung des Zellzykluses zurückzuführen sein. Um die Ursache für den Rückgang der Zellproliferation zu untersuchen, wurden FACS-Analysen durchgeführt.

Dafür wurden DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) und zur Kontrolle DLD1-Kontrollzellen (Klon F) in der G_0/G_1 -Phase durch Serumentzug arretiert, für 16 h mit 10% FKS stimuliert und die Zellzyklusverteilung mit Hilfe des Durchflußzytometers untersucht. Die Histogramme zeigen die Ergebnisse der FACS-Analysen. Es wird deutlich, dass die niedrigere Proliferationsrate durch einen Zellzyklusarrest in der G_0/G_1 -Phase verursacht wurde (Abb. 10A). In Form von Balkendiagrammen ist der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen (sub- G_1 -Phase) (Abb. 10B) und die prozentuale Verteilung der Zellzyklusphasen (Abb. 10C) von DLD1-ITF2B-Klon D und den DLD1-Kontrollzellen (Klon F) dargestellt. Die Daten zeigen, dass die Apoptoserate durch die Expression von ITF2B unbeeinflusst bleibt.

A



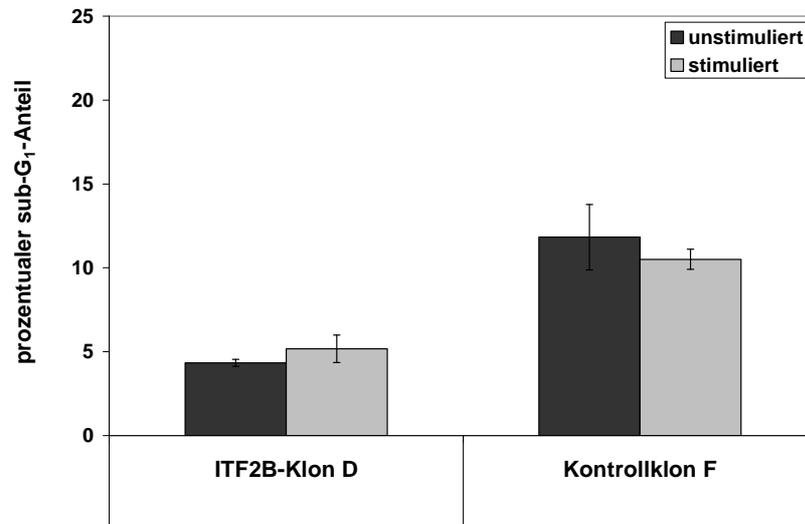
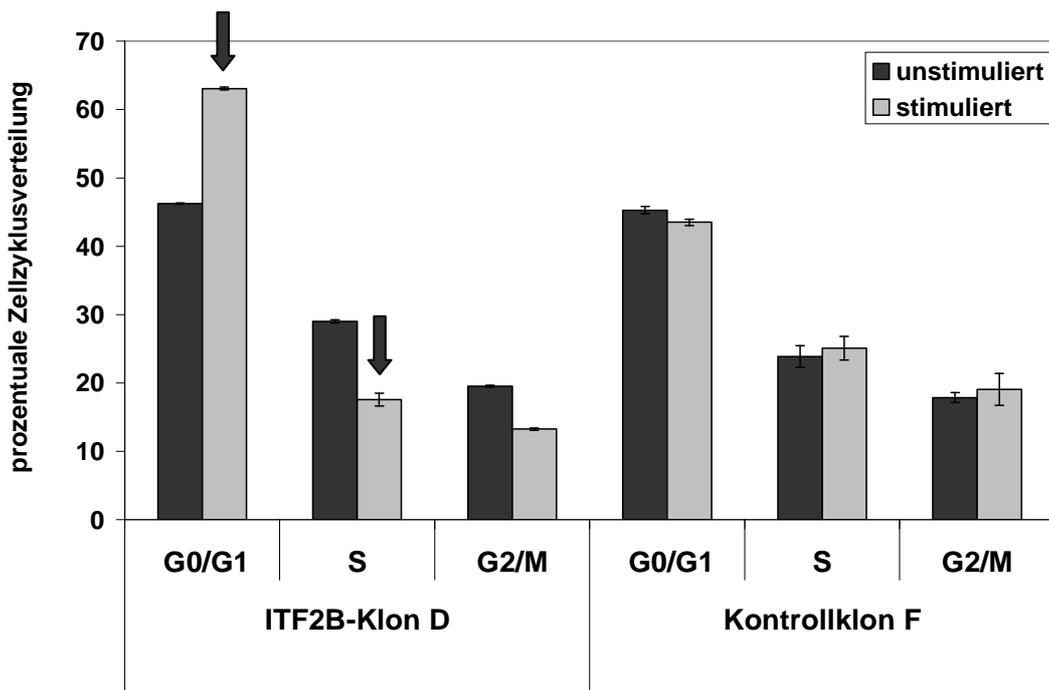
B**C**

Abb. 10: Die Expression von ITF2B induziert Zellzyklusarrest. DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) und DLD1-Kontrollzellen (Klon F) wurden arretiert, für 16 h mit 10% FKS stimuliert, mit Propidiumiodid angefärbt, der Zellzyklusstatus im FACS gemessen (A) und die Daten ausgewertet. Abb. B zeigt den Anteil der apoptotischen Zellen, Abb. C die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen G₀/G₁, S und G₂/M. Mittelwert und Standardabweichung wurden aus zwei unabhängigen Ansätzen berechnet.

3.2 Vergleich von ITF2B mit ITF2A

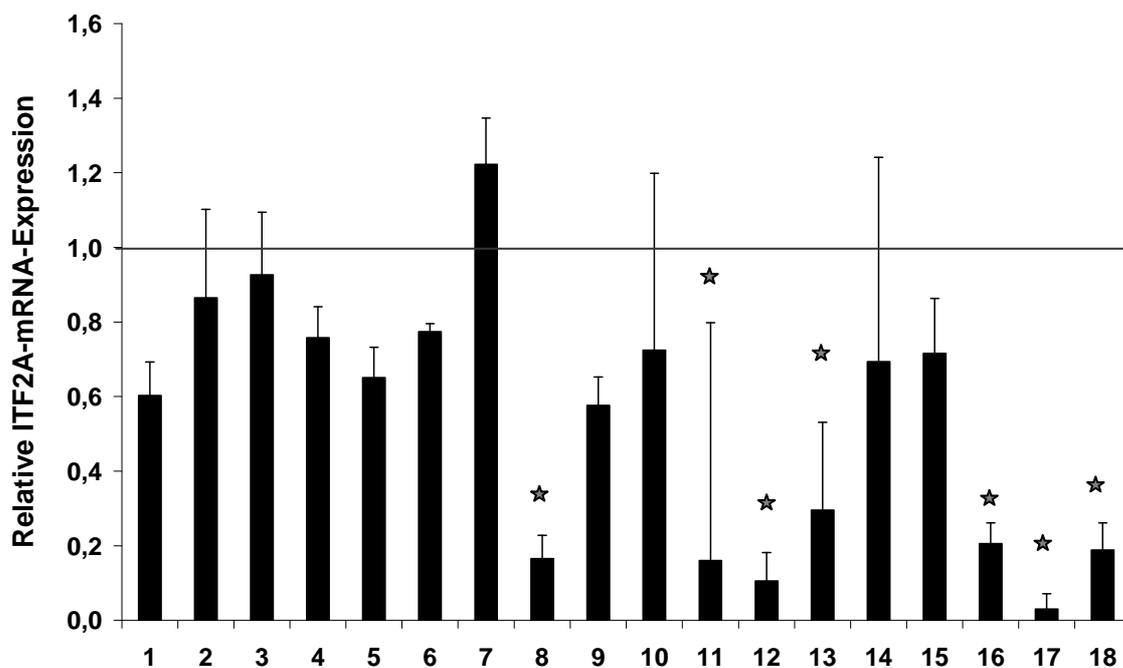
3.2.1 Die ITF2A-Expression ist im Tumorgewebe deutlich verringert im Vergleich zum Normalgewebe

Im Folgenden sollte untersucht werden, inwiefern sich die Isoformen ITF2B und ITF2A im Hinblick auf die Induktion des CDKN1A-Genes unterscheiden und welche Rolle die aminoterminal Transaktivierungsdomäne in diesem Zusammenhang besitzt.

Analysen von uns vorliegenden Kolonkarzinomproben, die aus OP-Päparaten von 18 Patienten mit kolorektalem Karzinom im UICC-Stadium III-IV stammten, hatten zeigten, dass die ITF2B-Expression in Tumorgewebe in 12 der 18 Fälle um mehr als die Hälfte im Vergleich zum Normalgewebe reduziert war (Abb.11B). Um nachzuweisen, dass auch die ITF2A-Expression in kolorektalen Karzinomen vermindert ist, bestimmten wir in diesen 18 Gewebeproben die ITF2A-mRNA-Konzentration für jeweils Normal- und Tumorgewebe. Das Probenmaterial aus den OP-Päparaten wurde schockgefroren und für diese Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt für die Isolierung von RNA verwendet. Die mRNA-Expression von ITF2A und ITF2B wurde mittels *quantitativer Real Time PCR* (qRT-PCR) gemessen.

Die Analysen zeigten, dass die ITF2A-mRNA-Expression in Tumorgewebe in 7 der 18 Fälle um mehr als die Hälfte im Vergleich zum Normalgewebe reduziert ist (Abb.11A).

A



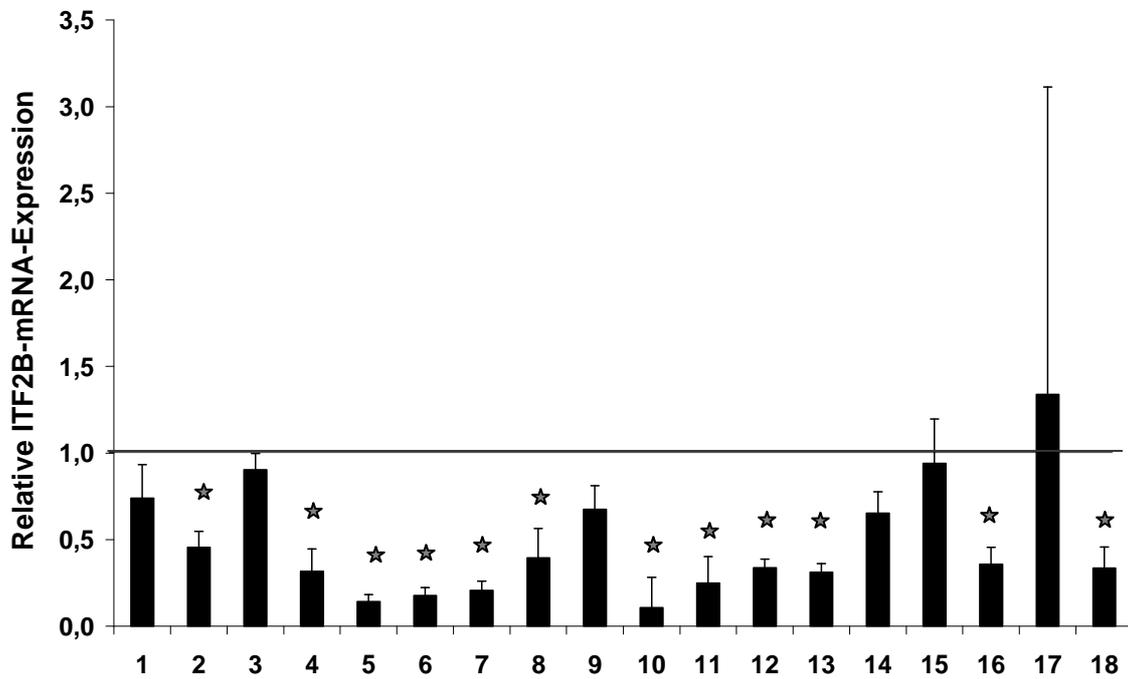
B

Abb. 11: Die mRNA-Expression von ITF2A und ITF2B ist in kolorektalen Karzinomen im Vergleich zum Normalgewebe deutlich verringert. Gezeigt ist die relative mRNA-Expression (gemessen per qRT-PCR) von ITF2A (Abb. A) und ITF2B (Abb. B) in kolorektalem Tumorgewebe im Vergleich zu benachbartem Normalgewebe (dessen relative Expression auf 1 gesetzt wurde). Die Sterne markieren Gewebeproben mit einer mRNA-Expression von 0,5 und niedriger im Verhältnis zum Normalgewebe. Die Werte wurden auf Aktin normalisiert. Mittelwert und Standardabweichung wurden aus drei unabhängigen Ansätzen berechnet.

3.2.2 Generierung einer stabilen Zelllinie in DLD1, die ITF2A induzierbar exprimiert

Um die funktionellen Unterschiede zwischen den Isoformen ITF2B und ITF2A und die Rolle der aminoterminalen Transaktivierungsdomäne zu untersuchen, wurden Klone einer stabilen DLD1-Zelllinie etabliert, die ITF2A nach Zugabe von Doxyzyklin induzierbar exprimierten. Zum Ausschluß relevanter endogener ITF2A-Mengen in DLD1-Zellen wurden mit Hilfe der qRT-PCR die endogenen ITF2A-mRNA-Spiegel in DLD1-Zellen gemessen und mit denen in gepooltem Normalgewebe verglichen (Abb.12). Es zeigte sich, dass DLD1-Zellen im Vergleich zum Normalgewebe keine nennenswerten ITF2A-mRNA-Mengen exprimierten und somit für die stabile Transfektion verwendet werden konnten.

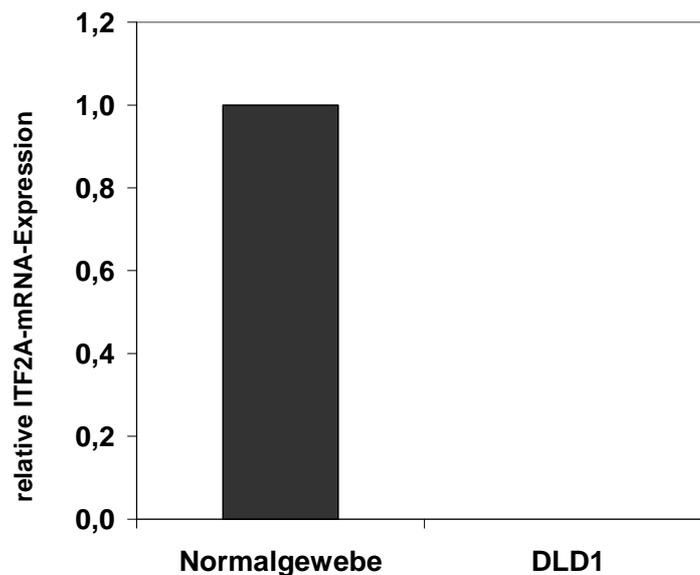


Abb. 12: DLD1-Zellen exprimieren keine nennenswerten ITF2A-mRNA-Mengen. Gezeigt ist der Faktor der mRNA-Expression von ITF2A in der Kolonkarzinomzelllinie DLD1 bezogen auf gepooltes, humanes Kolonnorgewebe. Die Quantifizierung der Zielgen-mRNA wurde anhand qRT-PCR-Daten gemessen und auf Aktin normalisiert.

Nach stabiler Transfektion des induzierbaren ITF2A-Konstruktes in DLD1-Zellen sollte kontrolliert werden, ob die Expression von ITF2A durch Zugabe von Doxyzyklin induziert werden konnte. Zu diesem Zweck wurden DLD1-ITF2A-Zellen (Klon 2 und 29) für 24 h mit Doxyzyklin stimuliert, anschließend lysiert und mit Hilfe einer Immunodetektion auf ITF2A untersucht. Es zeigte sich, dass die DLD1-ITF2A-Klone 2 und 29 nach Stimulation mit Doxyzyklin ITF2A exprimierten (Abb. 13).

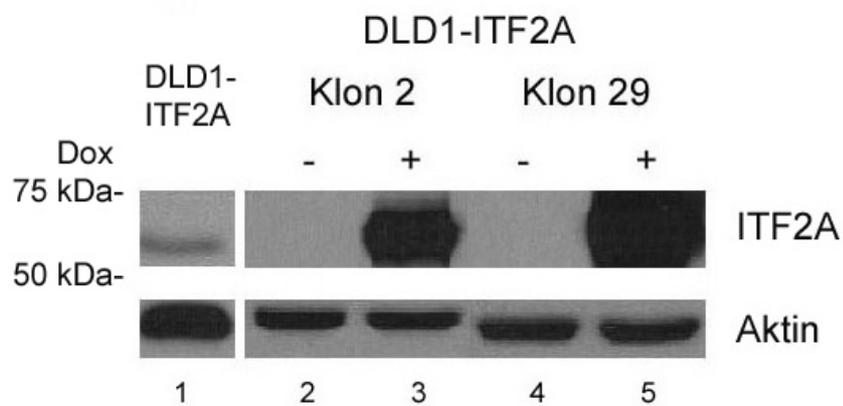


Abb. 13: Die Expression von ITF2A konnte in den DLD1-ITF2A-Klonen 2 und 29 induziert werden. DLD1-ITF2A-Zellen (Klone 2 und 29) wurden für 24 h mit Doxyzyklin stimuliert (+) bzw. nicht behandelt (-), totales Zelllysat hergestellt und die Expression von ITF2A durch Immunodetektion mit dem HA-Antikörper nachgewiesen. Aktin diente als Ladungskontrolle. Als Positionskontrolle dienten DLD1-Zellen, die transient mit einem konstitutiv aktiven Expressionsvektor für ITF2A transfiziert wurden (Bahn 1).

3.2.3 ITF2A reguliert p21^{Cip1}

Nach Etablierung stabil-transfizierter und induzierbarer DLD1-ITF2A-Klone sollte geklärt werden, ob ITF2A ebenfalls in der Lage ist, die Expression von p21^{Cip1} zu induzieren. Dafür wurden DLD1-ITF2A-Zellen (Klone 2 und 29) für 24 h mit Doxyzyklin stimuliert, lysiert und mittels qRT-PCR analysiert. Zur Kontrolle wurden DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) und DLD1-Kontrollzellen (Klon F) verwendet. Die Daten legen dar, dass ITF2A die Expression von CDKN1A induziert und zu einer Steigerung des CDKN1A-mRNA-Niveaus führt (Abb. 14).

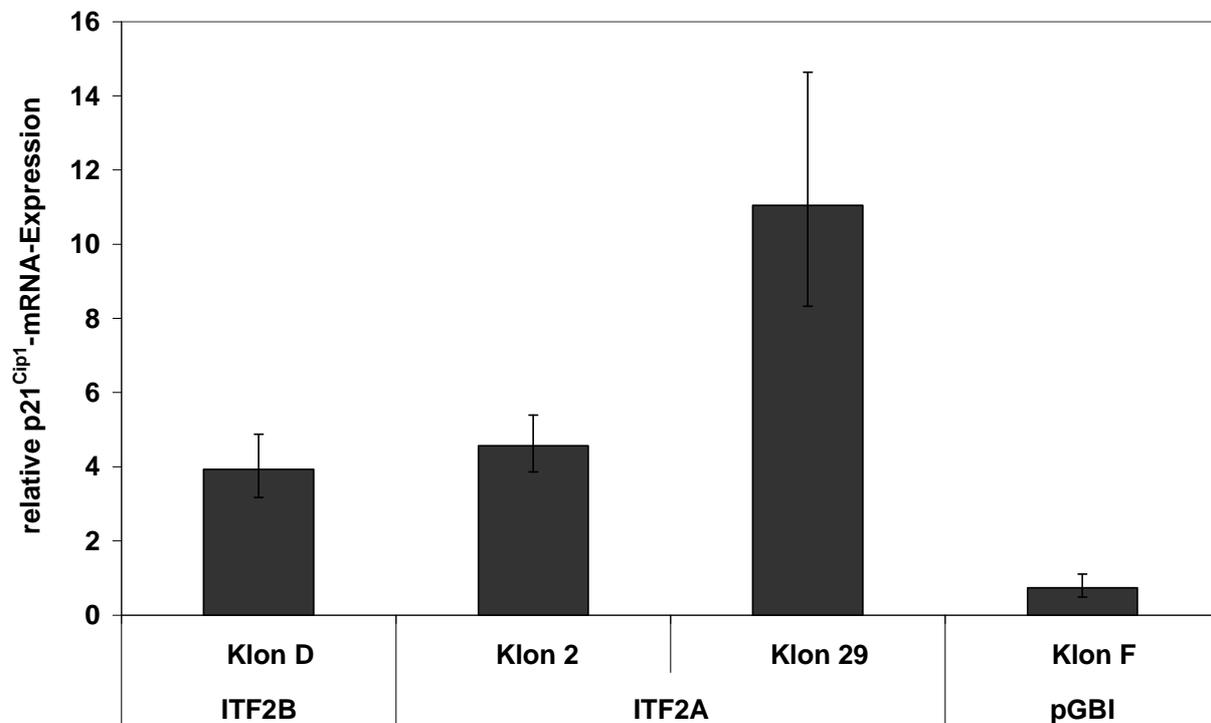


Abb. 14: ITF2A induziert die Expression von p21^{Cip1}. DLD1-ITF2A-Zellen (Klon 2 und 29) wurden für 24 h mit Doxyzyklin stimuliert. Anschließend erfolgte die RNA-Extraktion, reverse Transkription in cDNA und Quantifizierung der CDKN1A-mRNA mittels qRT-PCR. Gezeigt ist die relative p21^{Cip1}-mRNA-Expression nach Normalisierung auf GAPDH. Zur Kontrolle dienten DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) und DLD1-Kontrollzellen (Klon F). Mittelwert und Standardabweichung wurden aus 2 unabhängigen Ansätzen berechnet.

Zum Nachweis, dass ein Anstieg von CDKN1A-mRNA auch in einem Anstieg an p21^{Cip1} resultierte, wurde die p21^{Cip1}-Expression durch Immunodetektion analysiert. Dafür wurden DLD1-ITF2A-Zellen (Klon 2 und 29) für 24 h mit Doxyzyklin stimuliert, lysiert und einer Immunodetektion unterzogen. Als Vergleich dienten DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) und als Kontrolle DLD1-Kontrollzellen (Klon F). Es zeigte sich, dass die Induktion der Expression von ITF2A zu einer Steigerung der p21^{Cip1}-Proteinmenge führt (Abb. 15).

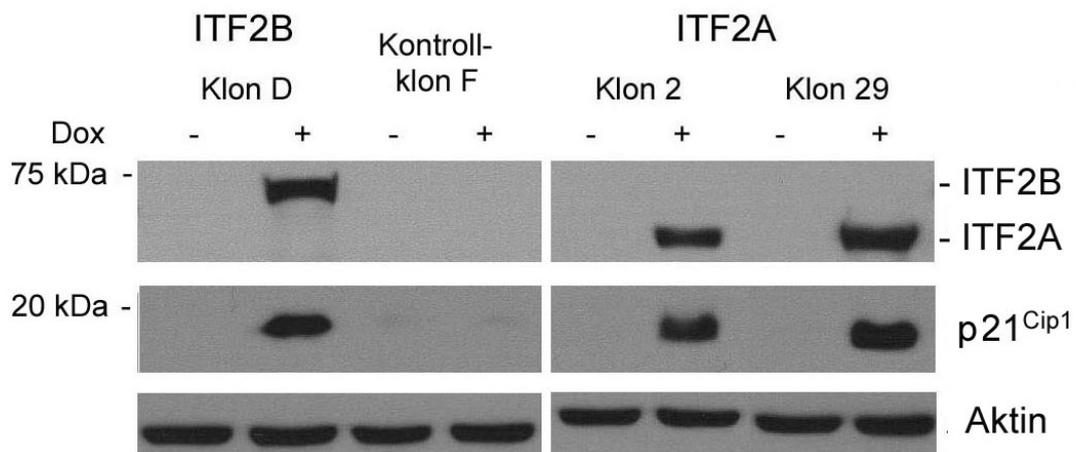


Abb. 15: ITF2A induziert die p21^{Cip1}-Expression in DLD1. DLD1-ITF2A-Zellen (Klon 2 und 29) wurden für 24 h mit Doxyzyklin stimuliert, totales Zelllysate hergestellt und die Expression von ITF2A und p21^{Cip1} durch Immunodetektion mit dem HA- und p21^{Cip1}-Antikörper nachgewiesen. Als Vergleich diente DLD1-ITF2B-Klon D und Kontrollklon F, als Ladungskontrolle Aktin.

Um die Ergebnisse zu validieren und festzustellen, ob die Expression von p21^{Cip1} mit der Expression von ITF2A zeitlich korreliert, wurden DLD1-ITF2A-Zellen (Klon 2 und 29) unterschiedlichen Stimulationszeiten mit Doxozyklin (0, 6, 12, 18, 24, 48 h) unterzogen. Anschließend wurden totale Zelllysate hergestellt und diese mittels Immunodetektion mit dem HA- und p21^{Cip1}-Antikörper untersucht. Als Kontrolle dienten DLD1-Kontrollzellen (Klon F). Die Daten belegten, dass die Zunahme der p21^{Cip1}-Proteinmenge direkt mit der Dauer der ITF2A-Expression korreliert (Abb. 16). Auch im Kontrollklon F konnten geringe p21^{Cip1}-Proteinmengen nachgewiesen werden, die allerdings deutlich geringer und nicht in allen Proben nachweisbar waren, insbesondere kam es hier nicht zu einer Induktion der Expression.

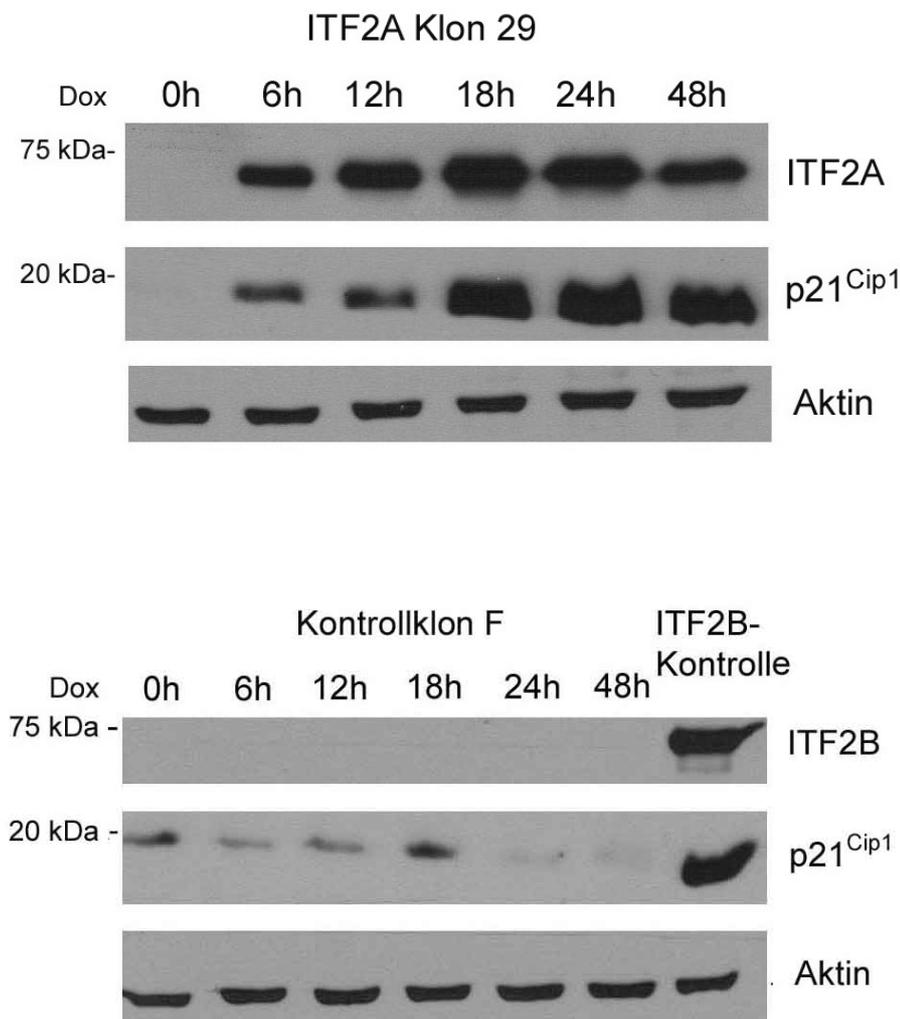


Abb. 16: p21^{Cip1}-Proteinmenge korreliert mit der ITF2A-Expression. DLD1-ITF2A-Zellen (Klon 2 und 29) und DLD1-Kontrollzellen (Klon F) wurden für 0, 6, 12, 18, 24 und 48 h mit Doxozyklin stimuliert, totales Zelllysate hergestellt und die Expression von ITF2A und p21^{Cip1} durch Immunodetektion nachgewiesen. Aktin diente als Ladungskontrolle.

3.2.4 Expression von ITF2A hemmt Zellwachstum

Um zu untersuchen, ob der Anstieg an p21^{Cip1} auch bei ITF2A Zellzyklusarrest bewirkt, wurden MTT-Assays durchgeführt. Dafür wurden DLD1-ITF2A-Zellen (Klon 2 und 29) und DLD1-Kontrollzellen (Klon F) für 96 h mit Doxyzyklin stimuliert und das Zellwachstum mit Hilfe des MTT-Assays analysiert. Die Ergebnisse zeigten, dass die Expression von ITF2A zu einer Verringerung der Zellproliferation führt (Abb. 17).

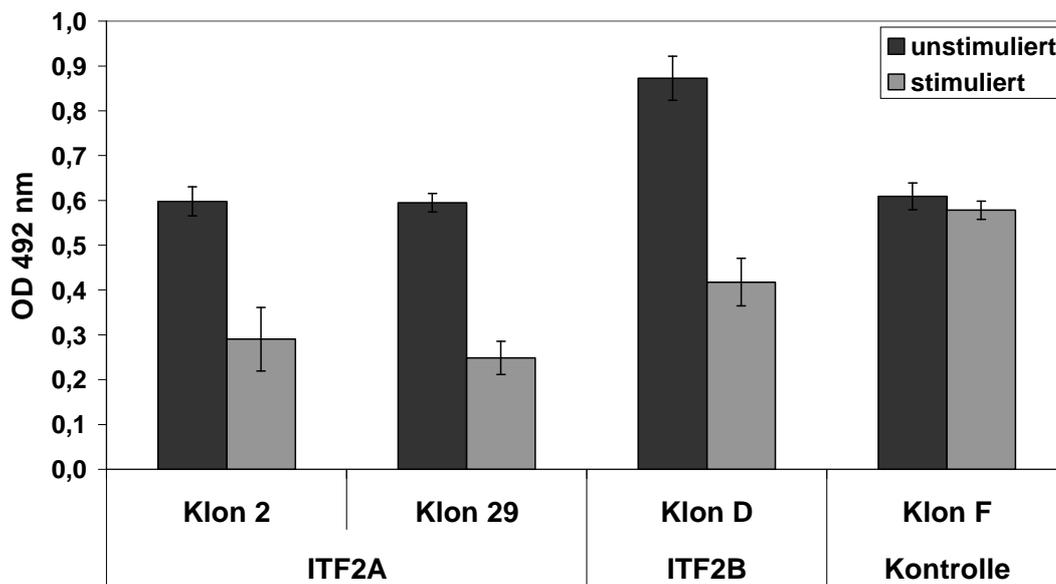
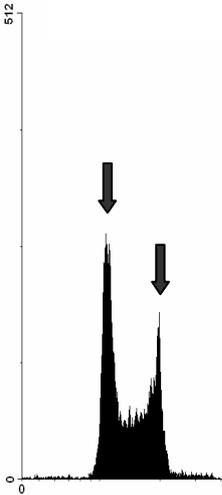


Abb. 17: Die Expression von ITF2A hemmt das Zellwachstum. Für den MTT-Assay wurden je 5000 DLD1-ITF2A-Zellen (Klon 2 und 29), DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) und DLD1-Kontrollzellen (Klon F) in eine 96-Well-Platte ausgesät, für 96 h mit Doxyzyklin stimuliert und das Zellwachstum gemessen. Mittelwert und Standardabweichung wurden aus 4 unabhängigen Ansätzen berechnet.

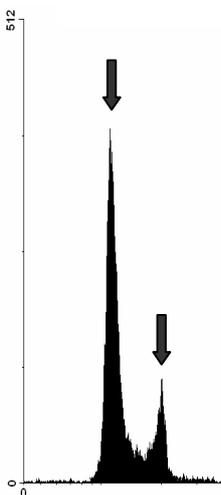
FACS-Analysen sollten nun zeigen, ob der Rückgang des Zellwachstums durch Apoptose oder Zellzyklusarrest verursacht ist. Dafür wurden DLD1-ITF2A-Zellen (Klon 2 und 29) und zur Kontrolle DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) und DLD1-Kontrollzellen (Klon F) durch Serumentzug in der G₀/G₁-Phase arretiert, für 16 h mit 10% FKS stimuliert und anhand des Durchflußzytometers untersucht. Die Histogramme zeigen die Ergebnisse der FACS-Analysen (Abb. 18A). In den nachfolgenden Balkendiagrammen ist der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen (subG₁-Phase) (Abb. 18B) und die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen (Abb. 18C) dargestellt. Es wird deutlich, dass die niedrigere Proliferationsrate durch einen Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase verursacht wurde (Abb. 18C), während die Apoptoserate unbeeinflusst blieb.

A

ITF2B Klon D
unstimuliert



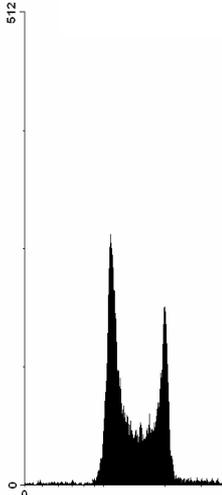
stimuliert



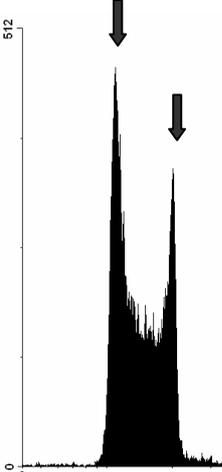
Kontrollklon F
unstimuliert



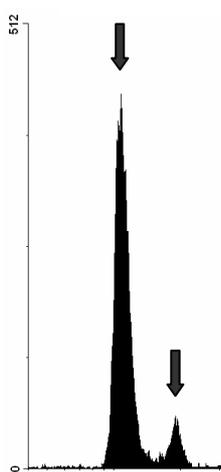
stimuliert



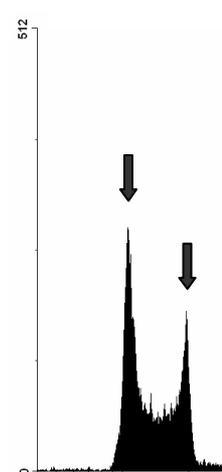
ITF2A Klon 2
unstimuliert



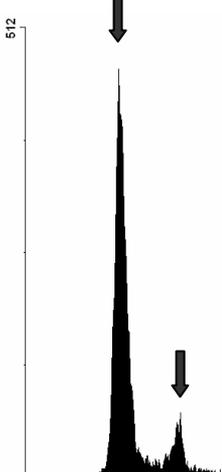
stimuliert



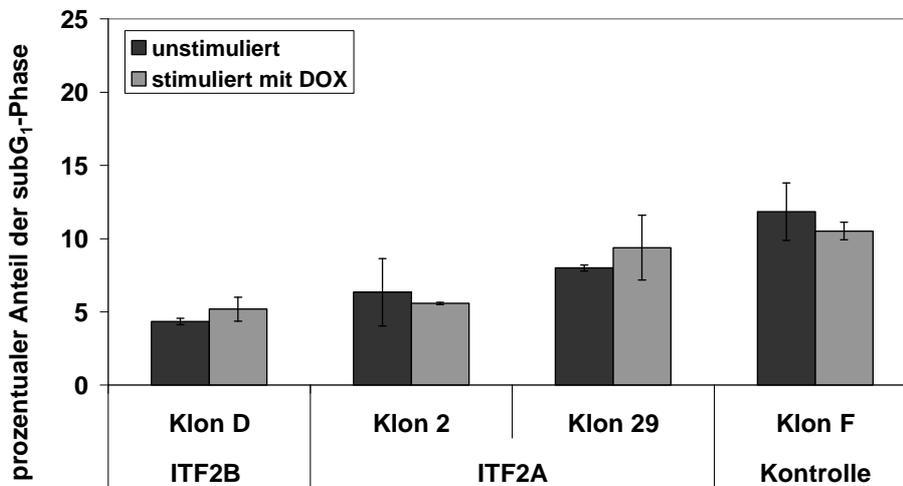
ITF2A Klon 29
unstimuliert



stimuliert



B



C

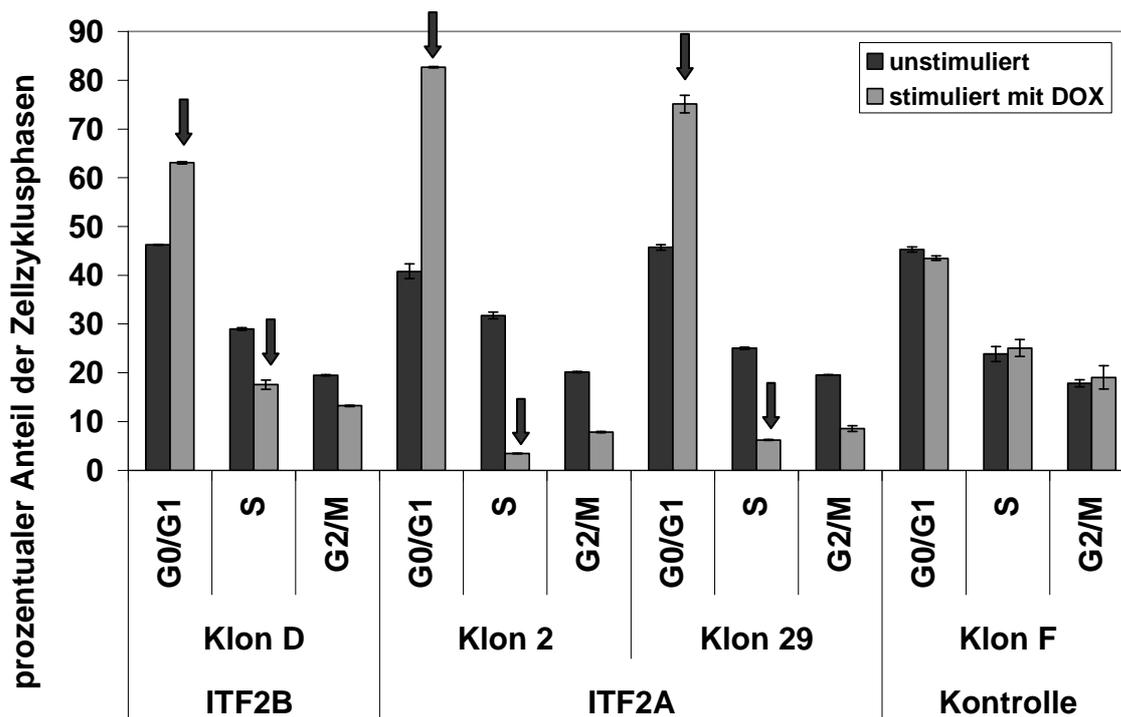


Abb. 18: Die Expression von ITF2A induziert Zellzyklusarrest. DLD1-ITF2A-Zellen (Klon 2 und 29) und zur Kontrolle DLD1-ITF2B-Zellen (Klon D) und DLD1-Kontrollzellen (Klon F) wurden arretiert, für 16 h mit 10% FKS stimuliert, mit Propidiumiodid angefärbt, der Zellzyklusstatus im FACS gemessen (Abb. A) und die Daten ausgewertet. In Abb. B ist der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen, in Abb. C die Verteilung der Zellzyklusphasen dargestellt. Mittelwert und Standardabweichung wurden aus 2 unabhängigen Ansätzen berechnet.

Zuerst sollte untersucht werden, ob über die proximalen E-Boxen 1-8 das CDKN1A-Gen induziert werden konnte. Dafür wurden DLD1-Zellen transient mit den Reportergenkonstrukten pGL3basic Cip1 K (kurz) und pGL3basic Cip1 L (lang) und einem konstitutiv ITF2B exprimierenden Expressionvektor transfiziert, lysiert und die Luziferaseaktivität im Luminometer untersucht. Die Normierung erfolgte auf β -Galaktosidase. Die Versuche zeigten, dass ITF2B weder das kurze Konstrukt pGL3basic Cip1 K noch das lange Konstrukt pGL3basic Cip1 L aktivieren konnte. Bezogen auf den Leervektor pCDNA3 konnte keine signifikante Induktion des Promotors nachgewiesen werden (Abb. 20). Damit kann ITF2B in DLD1 die Transkription des CDKN1A-Genes nicht über die proximalen E-Boxen 1-8 induzieren, weshalb wir uns der Untersuchung der distalen E-Boxen zuwandten.

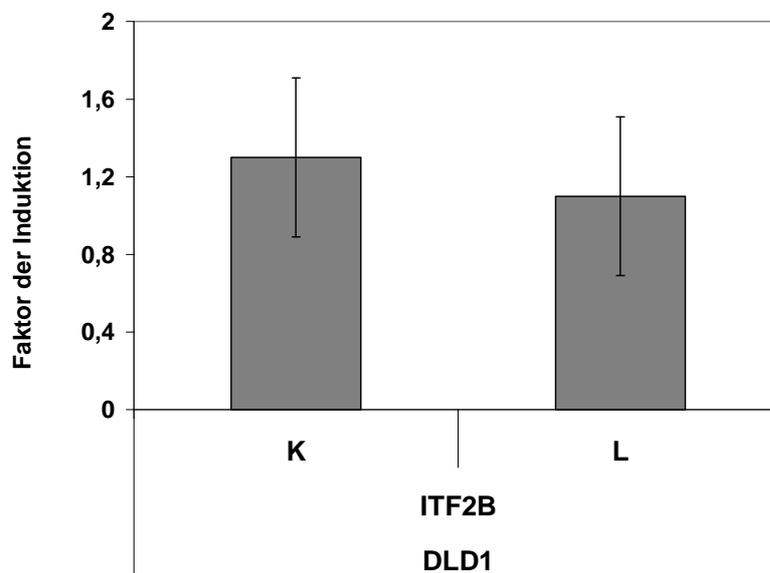


Abb. 20: ITF2B kann die Reportergenkonstrukte pGL3basic Cip1 K und pGL3basic Cip1 L in DLD1-Zellen nicht aktivieren. DLD1-Zellen wurden transient mit den Reportergenkonstrukten transfiziert, lysiert und die Luziferaseaktivität im Luminometer und zur Normierung die β -Galaktosidaseaktivität im Elisa-Reader gemessen. Dargestellt ist das Verhältnis der Luziferaseaktivität im Gegenwart von ITF2B bezogen auf den Leervektor (Kontrolle). Mittelwert und Standardabweichung ergaben sich aus 2 unabhängigen Ansätzen.

Da die 5' gelegenen E-Boxen 1-8 für die Induktion des CDKN1A-Genes durch ITF2B nicht in der Lage waren, wandten wir uns den 3' lokalisierteren E-Boxen 11 und 12 zu. Um zu klären, welche Rolle diese für die Aktivierung des CDKN1A-Promotors spielten, wurden weitere Reportergergenkonstrukte generiert: Das Konstrukt pGL3basic Cip1 K/DA beinhaltet neben dem kurzen Promotorfragment ein weiter 3' gelegenes Fragment mit den E-Boxen 11 und 12, bei den Konstrukten pGL3basic Cip1 K/DA E 11m und 12m waren jeweils die E-Boxen 11 oder 12 mutiert.

Zur Durchführung der Reportergergenassays wurden DLD1-Zellen transient mit den Reportergergenkonstrukten (pGL3basic Cip1 K, pGL3basic Cip1 K/DA, pGL3basic Cip1 K/DA E 11m und pGL3basic Cip1 K/DA E 12m) und mit konstitutiv ITF2A und ITF2B exprimierenden Plasmiden transfiziert, totales Zelllysate hergestellt und die Luziferaseaktivität im Luminometer gemessen. Die Normierung erfolgte auf β -Galaktosidase. Die Ergebnisse der Reportergergenassays zeigten, dass das Konstrukt pGL3basic Cip1 K/DA bei Expression von ITF2B und ITF2A eine deutlich höhere Luziferaseaktivität im Verhältnis zum Konstrukt pGL3basic Cip1 K aufwies (Abb. 21). Die Luziferaseaktivität sank bei Mutation der E-Boxen 11 und 12 etwa auf den Ausgangswert zurück. Diese Daten belegten, dass die E-Boxen 11 und 12 zur Induktion des CDKN1A-Genes durch ITF2B und ITF2A wesentlich sind.

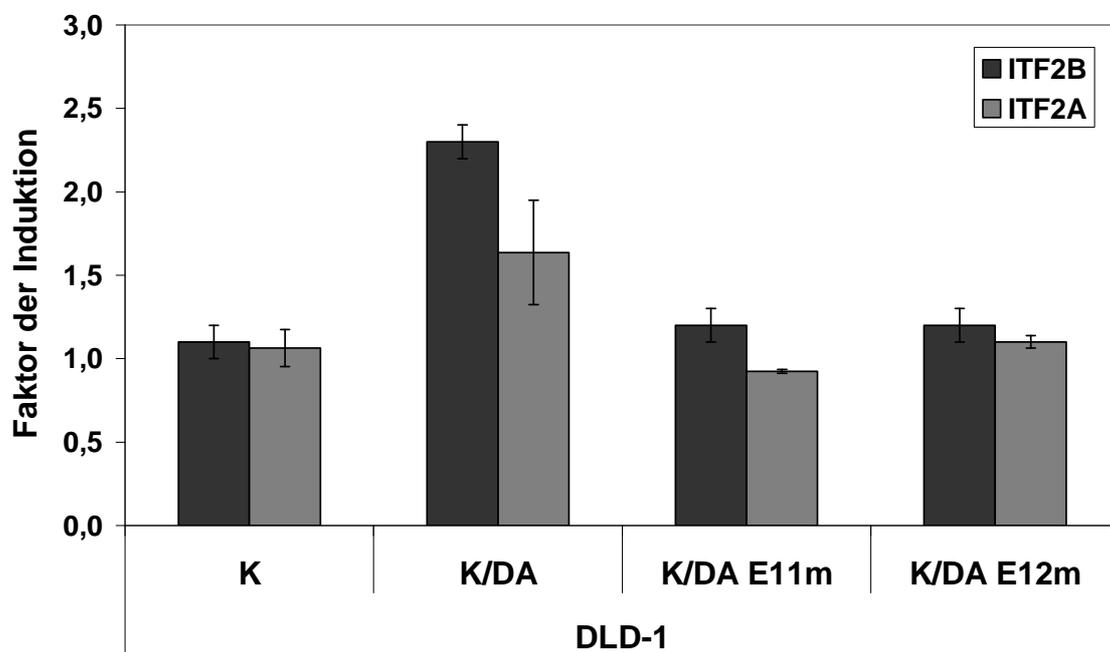


Abb. 21: Die E-Boxen 11 und 12 sind in DLD1 für eine Induktion des CDKN1A-Genes wesentlich. DLD1-Zellen wurden transient mit den Reportergergenkonstrukten transfiziert, lysiert und die Luziferaseaktivität im Luminometer und zur Normierung die β -Galaktosidaseaktivität im Elisa-Reader gemessen. Mittelwert und Standardabweichung wurden aus 2 unabhängigen Ansätzen berechnet.

3.4 Validierung der Funktion von ITF2A in HCT116

3.4.1 Generierung einer stabilen Zelllinie in HCT116, die ITF2A induzierbar exprimiert

DLD1-Zellen sind durch die Inaktivierung von p53 auf beiden Allelen gekennzeichnet⁽⁸⁸⁾. Um zum einen eine mögliche Interaktion von p53 mit ITF2 zu untersuchen und gleichzeitig die erhobenen Ergebnisse zu validieren, führten wir einige Versuche an der kolorektalen Karzinomzelllinie HCT116 (Wildtyp p53) durch. Dazu wurde eine stabile HCT116-ITF2A-Zelllinie etabliert, die induzierbar ITF2A exprimiert.

Zuvor wurden die endogenen ITF2A-mRNA-Spiegel mit Hilfe der qRT-PCR gemessen und mit denen in gepooltem Normalgewebe verglichen (Abb. 22). Es zeigte sich, dass HCT116-Zellen keine relevanten ITF2A-Spiegel exprimierten und somit für die stabile Transfektion verwendet werden konnten.

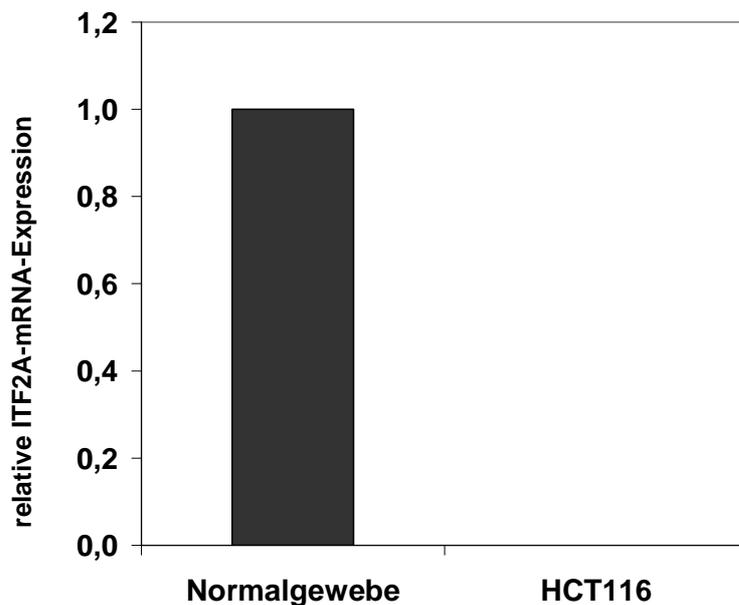


Abb. 22: HCT116-Zellen exprimieren keine relevanten ITF2A-mRNA-Mengen. Gezeigt ist der Faktor der mRNA-Expression von ITF2A in der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 bezogen auf gepooltes, humanes Kolonnormalgewebe. Die Quantifizierung der Zielgen-mRNA wurde anhand qRT-PCR-Daten gemessen und auf Aktin normalisiert.

Im Gegensatz zu den DLD1-ITF2A-Klonen wurden die HCT116-Zellen mit einem induzierbaren Expressionsvektor transfiziert, der ITF2A und GFP (*Green Fluorescence Protein*) kodiert. Kam es nach Stimulation mit Doxyzyklin zu einer Expression von GFP, erschienen jene Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop grün. Dieses Verfahren stellte eine einfache Möglichkeit dar, die Effizienz einer Stimulation zu überprüfen (Abb. 23).

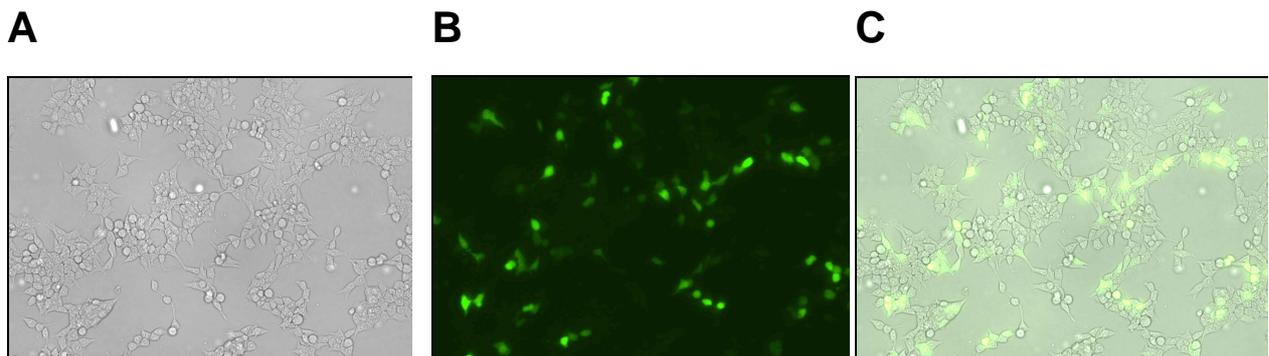


Abb. 23: GFP wird nach Stimulation mit Doxyzyklin in HCT116-ITF2A-Zellen exprimiert. Gezeigt sind die Zellen unter lichtmikroskopischer Sicht **(A)**, grün fluoreszierende Zellen unter Fluoreszenzmikroskopie **(B)** und die Überlagerung beider Bilder **(C)**.

Nach Herstellung der stabilen HCT116-ITF2A-Klone sollte kontrolliert werden, ob die Expression von ITF2A durch Zugabe von Doxyzyklin in den HCT116-ITF2A-Klonen induziert werden konnte. Dafür wurden HCT116-ITF2A-Zellen (Klon 14 und 25) für 24 h mit Doxyzyklin stimuliert, anschließend lysiert und durch Immunodetektion auf die Expression von ITF2A untersucht. Es zeigte sich, dass die HCT116-ITF2A-Klone 14 und 25 ITF2A induzierbar exprimierten (Abb. 24).

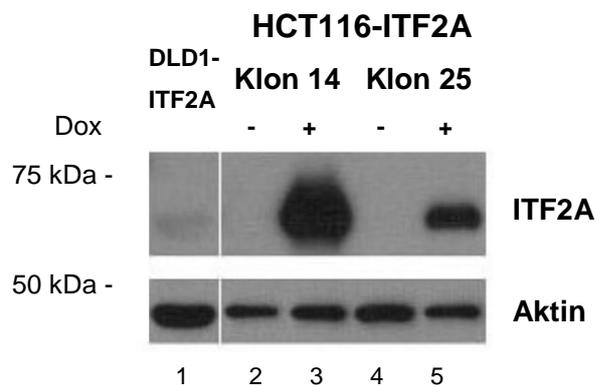


Abb. 24: Die Expression von ITF2A konnte in den HCT116-ITF2A-Klonen 14 und 25 induziert werden. HCT116-ITF2A-Zellen (Klone 14 + 25) wurden für 24 h mit Doxyzyklin stimuliert (+) bzw. nicht behandelt (-), totales Zelllysate hergestellt und die Expression von ITF2A durch Immunodetektion mit dem HA-Antikörper nachgewiesen. Aktin diente als Ladungskontrolle. Als Positionskontrolle dienten DLD1-Zellen, die transient mit einem konstitutiv aktiven Expressionsvektor für ITF2A transfiziert wurden (Bahn 1).

3.4.2 Expression von ITF2A hemmt Zellwachstum

Anschließend wurden FACS-Analysen mit den HCT116-ITF2A-Klonen 14 und 25 durchgeführt, um zu untersuchen, ob eine gesteigerte ITF2A-Expression zu einem Rückgang der Zellproliferation führt. Dafür wurden HCT116-ITF2A-Zellen (Klon 14 und 25) und HCT116-Kontrollzellen (Klon A) in der G_0/G_1 -Phase durch Serumentzug arretiert, für 16 h mit 10% FKS stimuliert und anhand des Durchflußzytometers untersucht. In den nachfolgenden Balkendiagrammen ist der prozentuale Anteil der sub G_1 -Phase (Abb. 25A) und der Zellzyklusphasen (Abb. 25B) der HCT116-ITF2A-Zellen dargestellt. Die Daten zeigten, dass die Expression von ITF2A auch in HCT116-Zellen zu einem Zellzyklusarrest in der G_0/G_1 -Phase führt. Anders als in DLD1-Zellen schien in den HCT116-ITF2A-Zellen die Stimulation mit Doxyzyklin einen Einfluß auf die Apoptoserate zu besitzen. Da jedoch nach Stimulation der Anteil der apoptotischen Zellen (sub G_1 -Phase) sowohl in den HCT116-ITF2A-Klonen 14 und 25 als auch im Kontrollklon A zunahm, konnte angenommen werden, dass dies ein ITF2A-unabhängiger Effekt und wahrscheinlich eine unspezifische Reaktion auf die Stimulation mit Doxyzyklin war.

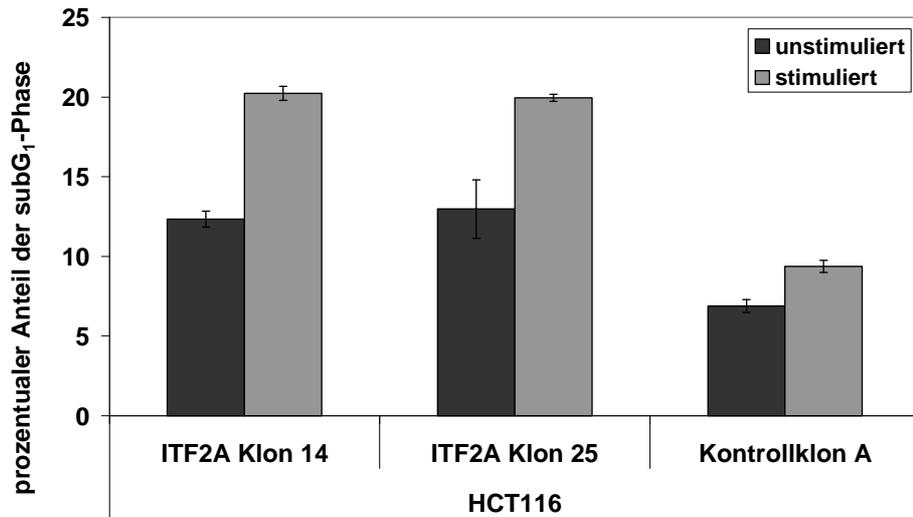
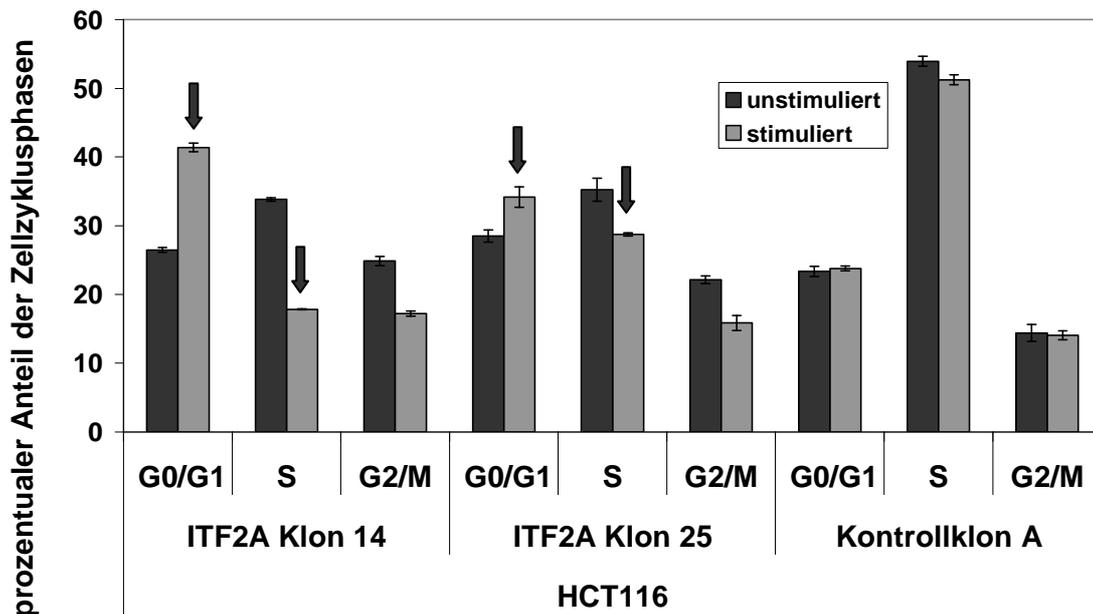
A**B**

Abb. 25: Die Expression von ITF2A induziert Zellzyklusarrest. HCT116-ITF2A-Zellen (Klon 14 und 25) und zur Kontrolle HCT116-Kontrollzellen (Klon A) wurden arretiert, für 16 h mit 10% FKS stimuliert, mit Propidiumiodid angefärbt und der Zellzyklusstatus im FACS gemessen. In Abb. A ist der prozentuale Anteil der apoptotischen Zellen, in Abb. B die Verteilung der Zellen in den Zellzyklusphasen aufgeführt. Mittelwert und Standardabweichung wurden aus 2 unabhängigen Ansätzen berechnet.

3.4.3 Analyse der für die durch ITF2A und ITF2B vermittelte Transkriptionssteigerung wichtigen Regionen des CDKN1A-Genes

Zur Validierung der Genregionen des CDKN1A-Genes, die in DLD1-Zellen für eine ITF2A- und ITF2B- vermittelte Transkriptionssteigerung wesentlich sind, wurden Reporteragenassays mit HCT116-Zellen unter Verwendung der gleichen Konstrukte wie in den DLD1-Zellen (s. Abb. 19) durchgeführt. Dafür wurden HCT116-Zellen zuerst transient mit den Reportergenkonstrukten pGL3basic Cip1 K (kurz) und pGL3basic Cip1 L (lang) und einem ITF2B-exprimierenden Plasmid transfiziert. Überraschenderweise konnte ITF2B in HCT116 das lange Konstrukt pGL3basic Cip1 L aktivieren, weshalb wir den Versuch hier ebenfalls mit ITF2A durchführten. Im Gegensatz zu DLD1 induzierte in HCT116 sowohl ITF2B als auch ITF2A das lange, jedoch nicht das kurze Reportergenkonstrukt (Abb. 26).

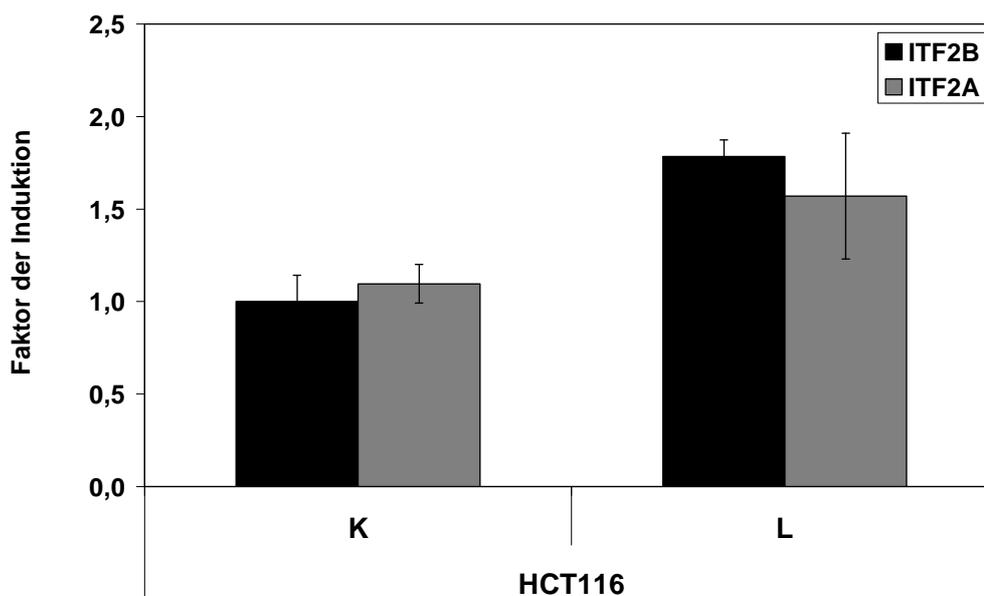


Abb. 26: ITF2B und ITF2A können das Reportergenkonstrukt pGL3basic Cip1 L, nicht aber das Konstrukt pGL3basic Cip1 K, in HCT116-Zellen aktivieren. HCT116-Zellen wurden transient mit den Reportergenkonstrukten transfiziert, lysiert und die Luziferaseaktivität im Luminometer und zur Normierung die β -Galaktosidaseaktivität im Elisa-Reader gemessen. Dargestellt ist das Verhältnis der Luziferaseaktivität in Gegenwart von ITF2B und ITF2A bezogen auf den Leervektor (Kontrolle). Mittelwert und Standardabweichung ergaben sich aus 2 unabhängigen Ansätzen.

Anschließend wurden Reporteragenassays mit den Konstrukten pGL3basic Cip1 K, pGL3basic Cip1 K/DA, pGL3basic Cip1 K/DA E 11m, pGL3basic Cip1 K/DA E 12m und ITF2A bzw. ITF2B exprimierenden Plasmiden durchgeführt, um die Auswirkungen der distalen E-Boxen 11 und 12 auf die Geninduktion durch ITF2B und ITF2A zu untersuchen. Die Ergebnisse der Reporteragenassays zeigten diesmal analog zu den DLD1-Zellen, dass das Konstrukt pGL3basic Cip1 K/DA bei Expression von ITF2B und ITF2A eine deutlich höhere Luziferaseaktivität im Verhältnis zum Konstrukt pGL3basic Cip1 K aufwies (Abb. 27), während die Luziferaseaktivität bei Mutation der E-Boxen 11 und 12 etwa auf den Ausgangswert zurücksank. Somit induzierte ITF2A in HCT116 das Konstrukt pGL3basic Cip1 K/DA deutlich schwächer im Vergleich zu ITF2B. Diese Daten bestätigten, dass die E-Boxen 11 und 12 für die Induktion des CDKN1A-Genes durch ITF2B und ITF2A notwendig sind.

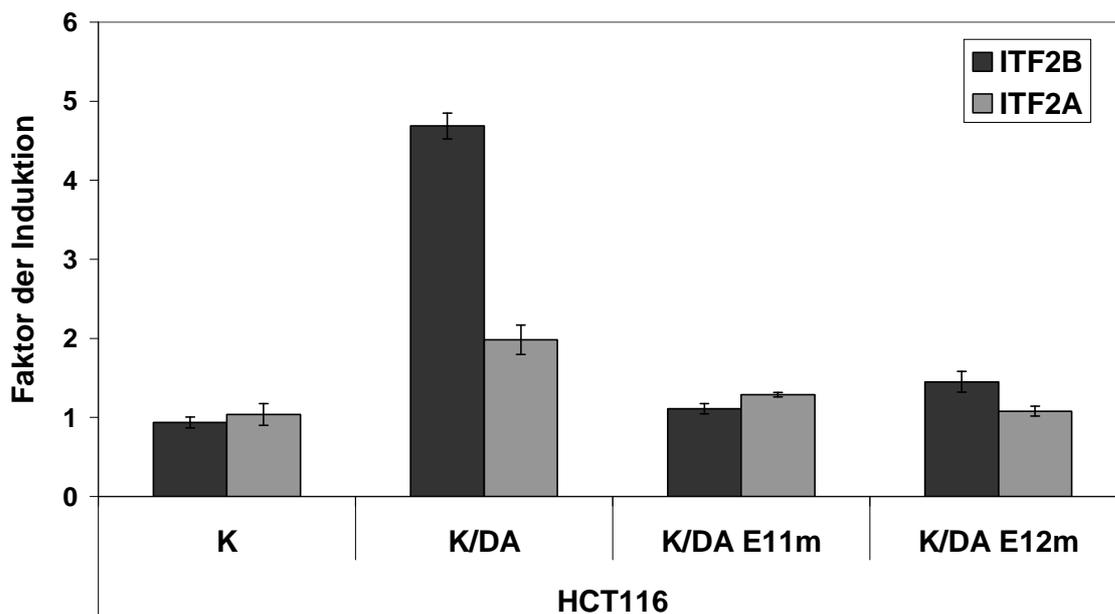


Abb. 27: In HCT116 sind die E-Boxen 11 und 12 zur Induktion des CDKN1A-Genes wichtig. HCT116-Zellen wurden transient mit den Reportergenkonstrukten transfiziert, lysiert und die Luziferaseaktivität im Luminometer und zur Normierung die β -Galaktosidaseaktivität im Elisa-Reader gemessen. Mittelwert und Standardabweichung wurden aus 2 unabhängigen Ansätzen berechnet.

4 Diskussion

Die Analyse kolorektaler Karzinome hat zu großen Fortschritten im Wissen um Pathomechanismen von Tumoren und molekulargenetischen Zusammenhängen geführt. Anfang der 90er Jahre wurde die Adenom-Karzinom-Sequenz formuliert, die die schrittweise Akkumulation genetischer Veränderungen als Ursache für die Zunahme der Dysplasie und der Entwicklung eines Tumors beschreibt⁽⁴²⁾. Ein Mechanismus der Tumorigenese ist der Funktionsausfall von Tumorsuppressorgenen durch „Loss of heterozygosity“ (LOH) - in kolorektalen Karzinomen sind davon besonders die Bereiche 5q, 8p, 17p und 18q betroffen⁽³²⁻³⁴⁾. Auf der Suche nach Tumorsuppressorgenen in diesen chromosomalen Regionen konnte auf Chromosom 5 das *Adenomatous polyposis coli*-Gen und auf Chromosom 17 das p53-Gen identifiziert werden, während die Bedeutung von LOH 8p derzeit noch unklar ist^(21,33,89). Für die Region 18q, welche in 70% der kolorektalen Karzinome inaktiviert wird, sind insbesondere die Gene DCC und SMAD4 näher charakterisiert und als mögliche Tumorsuppressoren diskutiert worden^(42,43).

Zwar existieren widersprüchliche Aussagen im Hinblick auf die prognostische Relevanz der LOH der Region 18q21⁽⁹⁰⁻⁹³⁾, doch eine relativ neue Metaanalyse von 2189 Patienten mit kolorektalen Karzinomen machte deutlich, dass eine LOH der Region 18q21 mit einer geringeren Gesamtüberlebenszeit korreliert⁽⁹⁴⁾.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass das ITF2-Gen einen weiteren Tumorsuppressorkandidaten der Region 18q21 darstellt, da es über Induktion des CDKN1A-Genes (Protein p21^{Cip1}) in der Lage ist, Zellzyklusarrest zu vermitteln. Studien an kolorektalen Adenomen und Karzinomen legten dar, dass ITF2B in Adenomen mit defektem APC-Gen hochreguliert wird⁽⁷⁶⁾, während es im Laufe der Tumorprogression genau am Übergang vom Adenom zum Karzinom zu einem starken Expressionsverlust von ITF2B kommt⁽⁵⁹⁾. Dies verdeutlicht, dass dessen Verlust ein wichtiger Faktor in der Progression kolorektaler Tumore darstellt.

4.1 Zielgene von ITF2B

ITF2B spielt als basic-Helix-Loop-Helix(bHLH)-Transkriptionsfaktor eine wichtige Rolle in der Regulation von Proliferations- und Differenzierungsprozessen verschiedenster Gewebearten. In Brustepithelzellen⁽⁹⁵⁾, Melanozyten⁽⁷⁷⁾ und Neuronalem Gewebe⁽⁹⁶⁾ beispielsweise ist ITF2B wesentlich an der Differenzierung der Zellen beteiligt. Unter anderem belegten Studien an Mäusen und hämatopoetischen Stammzellen zum einen, dass das Fehlen von ITF2B zu einem Abbruch der Entwicklung von T-Lymphozyten und Dendritischen Zellen in einem frühen Stadium führt, und zum anderen, dass ITF2B einen essentiellen Faktor für die Entwicklung und Differenzierung dieser Zellen darstellt⁽⁹⁷⁾.

Eine wichtige Voraussetzung für die Einleitung von Differenzierungsprozessen ist die Arretierung der Zellen in der G₁-Phase⁽⁹⁸⁾. Wir konnten in unseren Studien an DLD1 demonstrieren, dass ITF2B die Expression von p21^{Cip1} induziert und in diesem Zusammenhang Zellzyklusarrest über Arretierung der Zellen in der G₀/G₁-Phase vermittelt. Damit stimmen unsere Daten mit denen von Pagliuca et al.⁽⁸⁴⁾ überein, die zum einen in Colony-Formation-Assays einen ITF2B-vermittelten Rückgang der Koloniezahl beobachteten und zum anderen mittels Reportergenkonstrukten in 293T-Zellen zeigten, dass ITF2B an den CDKN1A-Promotor bindet und dessen Expression induziert. Darüber hinaus wiesen sie jedoch auch nach, dass ITF2B nicht nur den Promotor von CDKN1A, sondern ebenfalls den von p15, p16 und p57 induzieren kann. In Westernblot-Analysen an DLD1-Zellen allerdings konnte ITF2B p15, p16 und p57 nicht regulieren⁽⁵⁹⁾. Eine mögliche Erklärung für diese unterschiedlichen Ergebnisse wäre das Vorhandensein bzw. Fehlen von p53, da DLD1-Zellen durch einen mutierten p53-Status charakterisiert sind und p53 in der Lage ist, beispielsweise den CDKN1A-Promotor zu aktivieren⁽⁹⁹⁾.

Nicht nur für ITF2B, sondern auch für den bekanntesten Vertreter der Klasse I der bHLH-Proteine, E2A, und dessen Spliceprodukt E47 wurde nachgewiesen, dass sie sowohl die Expression von p21^{Cip1} induzieren, als auch den Zellzyklus arretieren können⁽¹⁰⁰⁻¹⁰²⁾. Mit diesem Hintergrund ist es ein eher unerwartetes Ergebnis, dass in den Studien von Pagliuca et al. durch eine ektope Expression von ITF2B überwiegend Apoptose und nur gering Zellzyklusarrestes verursacht wurde. Allerdings könnte dieser Unterschied ebenso ein Zelltyp-spezifischer Effekt sein⁽⁸⁴⁾.

Der Zyklin-abhängige-Kinase-Inhibitor p21^{Cip1} gehört zu Cip/Kip-Familie der Cdk-Inhibitoren und veranlasst Zellzyklusarrest über Bindung an den Zyklin D/Cdk-Komplex^(103,104). Die Expression von p21^{Cip1} wird überwiegend auf Transkriptionsebene über direkte Bindung von Transkriptionsfaktoren wie p53 reguliert⁽⁹⁹⁾. Studien mit E47 und verschiedenen Reportergenkonstrukten des CDKN1A-Promotors schlossen jedoch eine Beteiligung von p53 an der Arretierung in der G₀/G₁-Phase aus und bewiesen, dass diese p21^{Cip1}-vermittelt über direkte Bindung von E47 an den CDKN1A-Promotor zustande kommt^(100,101). Auch wir konnten p53 als unabhängigen Einflussfaktor auf die Induktion des CDKN1A-Genes und den p21^{Cip1}-vermittelten Zellzyklusarrest ausschließen, da die verwendeten DLD1-Zellen p53-defizient waren und somit p53 nicht exprimierten.

Die Funktion von ITF2B als Zellzyklusinhibitor ermöglicht durch Auslösen von Zellzyklusarrest den Start von Differenzierungsprogrammen. In kolorektalem Gewebe unterscheiden sich beispielsweise die zellulären p21^{Cip1}-Spiegel der Kryptenbasis von denen der Kryptenspitze. Die Kryptenbasis als Ort der Proliferation weist niedrigere p21^{Cip1}-Niveaus auf als die Zellen der Kryptenspitze. Dort erlauben ansteigende p21^{Cip1}-Spiegel zunehmende Differenzierung⁽¹⁰⁵⁾. ITF2B spielt über Regulation des CDKN1A-Genes eine entscheidende

Rolle in der Hemmung zellulärer Proliferation und Induktion kolorektaler Zelldifferenzierung, denn offensichtlich reicht die gezielte Expression von ITF2B in ITF2B-defizienten DLD1-Zellen aus, um die p21^{Cip1}-Spiegel zu steigern.

Die Relevanz von p21^{Cip} im Hinblick auf die Progression kolorektaler Tumore wird auch deutlich an Versuchen mit Mäusen, bei denen der Verlust von p21^{Cip} in einer verstärkten Zunahme von intestinalen Tumoren mündet⁽¹⁰⁶⁾. In kolorektalen Karzinomen sind die p21^{Cip}-Spiegel häufig reduziert, wobei in klinischer Hinsicht der Verlust von p21^{Cip} mit einer schlechteren Prognose assoziiert wird^(107,108). Diese Beobachtungen verdeutlichen die tumorsuppressive Wirkung von ITF2B im Zusammenhang mit kolorektalen Tumoren.

4.2 Vergleich von ITF2B mit ITF2A

Die Klasse I der bHLH-Proteine besitzen in ihrem N-terminalen Anteil zwei Aktivierungsdomänen (AD), die eine wichtige Rolle in der Einleitung gewebespezifischer Differenzierungsprogramme zu spielen scheinen. Die Merkmale dieser beiden Domänen liegen zum einen im ungewöhnlich starken Grad der Konservierung im Laufe der Evolution und zum anderen in ihrer Einzigartigkeit: sie weisen keine wesentlichen Übereinstimmungen zu bekannten Aktivierungsdomänen anderer Proteine auf⁽⁷⁵⁾.

Offensichtlich weisen die Aktivierungsdomänen 1 und 2 unterschiedliche, gewebespezifische Funktionen auf⁽⁷⁵⁾. Dafür spricht auch die Annahme, dass bei gleicher Funktion der beiden Domänen unter dem Selektionsdruck im Laufe der Evolution sicherlich eine Domäne verloren gegangen wäre. Der Aktivierungsdomäne 1 scheint eine besondere Rolle zuzukommen, da es eine Isoform ohne diese Domäne gibt - ITF2A.

Bei der Analyse von Gewebeproben aus jeweils Normal- und kolorektalem Karzinomgewebe von 18 Patienten zeigte sich, dass die ITF2B-Expression etwa in 66% der Fälle, die ITF2A-Expression dagegen nur in 33% der Fälle über die Hälfte im Vergleich zum Normalgewebe reduziert war. Anscheinend bietet der Verlust der ITF2B-Expression für die Progression kolorektaler Karzinome einen größeren Vorteil als der Verlust von ITF2A. Dennoch konnten wir in unseren Versuchen an DLD1- und HCT116-Zellen eindeutig nachweisen, dass ITF2A eine Induktion des CDKN1A-Gen bewirkt und in diesem Rahmen Zellzyklusarrest vermittelt. So zeigte sich in DLD1-ITF2A-Zellen eine deutliche Arretierung der Zellen in der G₀/G₁-Phase, während die Apoptoserate unbeeinflusst blieb. Entgegen der Studie von Pagliuca et al.⁽⁸⁴⁾ hatte in unseren Untersuchungen die ektope Expression von ITF2A und ITF2B in DLD1-Zellen keine Auswirkung auf die Apoptoserate. In den HCT116-ITF2A-Zellen allerdings kam es neben einem Anstieg der G₀/G₁-Phase zu einem deutlichen Anstieg der DNA-Fragmentierung sowohl des ITF2A- als auch Kontrollklons, wobei diese im Kontrollklon deutlich geringer ausfiel. Ein ähnliches Phänomen in HCT116 ist bereits in der Literatur

beschrieben. So konnte in HCT116 bei Überexpression eines Reparaturgenes (RAD50) vermehrte Apoptose nachgewiesen werden im Gegensatz zu p21-defizienten Zellen, in denen sich die Apoptoserate nicht änderte. Sogar Behandlung der Zellen mit dem Antioxidans Pyrrolidindithiocarbamat (PDTC) und Vitamin E steigerte den Zelltod⁽¹⁰⁾. Anscheinend ist HCT116 sehr störanfällig gegenüber äußeren Einflüssen. Bei den FACS-Analysen könnte FCS-Entzug oder Zugabe des Doxzyklin als Auslöser des Zelltodes in Betracht gezogen werden, insbesondere, da die Apoptoserate nach Stimulation auch im Kontrollklon anstieg. Eine andere Erklärung könnte in der bereits von Pagliuca et al. veröffentlichten Beobachtung liegen, dass es nach Überexpression von bHLH-Proteinen neben Zellzyklusarrest auch zu einer Zunahme der Apoptose kam⁽⁸⁴⁾. Dies würde bedeuten, dass der Effekt einer ITF2A-Expression abhängig vom Zelltyp ist. Möglicherweise hat auch der p53-Status einen Einfluss auf die Zunahme des Zelltodes, da HCT116 im Gegensatz zu den p53-defizienten DLD1 das Protein p53 exprimierten.

Dennoch ist die Aktivierungsdomäne 1 offensichtlich nicht zwingend zur Transkription des CDKN1A-Genes erforderlich, da auch ITF2A das CDKN1A-Gen induzierte. Massari et al. demonstrierten in COS-Zellen, dass die Aktivierungsdomänen 1 von E2A und ITF2B sogar in der Lage waren, Reportergenkonstrukte zu aktivieren⁽⁷²⁾. Damit unterstrichen sie zwar die anscheinend wichtige Rolle dieser Domäne in der Rekrutierung der Transkriptionsmaschinerie, aber auch die Ergebnisse von Furumura et al. belegten, dass ITF2A die gleiche Funktion wie ITF2B, jedoch in schwächerer Ausprägung, besitzt⁽⁷⁷⁾. Diese Beobachtung konnten wir in unseren Reportergenassays in DLD1- und HCT116-Zellen bestätigen, da ITF2B eine stärkere Induktion des CDKN1A-Promotors als ITF2A zur Folge hatte. Damit ist die Aktivierungsdomäne 1 für die Aktivierung der Transkription von Zielgenen zwar entbehrlich, sie bewirkt aber offenbar eine wesentliche Verstärkung dieses Signales.

Darüber hinaus gibt es Studien mit der embryonalen Karzinomzelllinie P19, die ITF2A und ITF2B gegenteilige Effekte zuschrieben. So postulierte Skerjanc et al., dass die N-terminale Domäne von ITF2B abhängig vom Dimerisierungspartner als Repressor oder Aktivator fungierte, da ITF2B, aber nicht ITF2A, die Aktivität von MyoD hemmte⁽⁷⁸⁾. Allerdings wurden die Versuche mit Maus-ITF2A/B durchgeführt, gleiche Versuche in COS-Zellen mit humanem ITF2B bewirkten in Heterodimerisierung mit MyoD eine Verstärkung der Aktivierung des Kreatinkinase-Promotors⁽¹⁰⁹⁾, ITF2A wurde hierbei aber nicht untersucht. Eine Studie mit den humanen Gefäßmuskelzellen A7R5 bewies ebenfalls, dass ITF2A und ITF2B als Homo-, sowie als Heterodimer offensichtlich unterschiedlich wirkten⁽¹¹⁰⁾. Im Zusammenhang mit dem kolorektalen Karzinom wurde nachgewiesen, dass die Transkription von ITF2B, nicht aber die von ITF2A, über β -Catenin reguliert wird⁽⁷⁶⁾. Eine Erklärung für diese unterschiedliche Funktion von ITF2A und ITF2B könnte sein, dass die Aktivierungsdomäne nicht nur einfach an der Transkriptionsaktivierung von E-Box-enthaltenden Genen beteiligt ist, sondern

ebenfalls je nach Promotoraufbau, Dimerisierungspartner und zelluläre Bedingungen Einfluss auf die Transkriptionsmaschinerie nimmt und damit eine funktionelle Domäne zur Steuerung gewebespezifischer Transkriptionsprogramme darstellt⁽⁷⁵⁾. Auffällig ist, dass beide Aktivierungsdomänen bislang nur in der Klasse I der bHLH-Proteine nachzuweisen sind und offenbar die Anwesenheit eines Klasse I bHLH-Proteins notwendig ist, um spezifische Differenzierungsprogramme zu induzieren⁽⁷⁴⁾. Unter Umständen liegt ein Sinn der Dimerisierung darin, die Aktivierungsdomänen der Klasse I den anderen bHLH-Klassen zur Verfügung zu stellen⁽⁷⁵⁾ und die gewebespezifische Gentranskription über Dimerisierung mit einem im jeweiligem Gewebe exprimierten bHLH-Protein zu sichern.

Abgesehen davon wurde kürzlich beim Vergleich primärer Proteinsequenzen von ITF2 und anderen bHLH-Proteinen der Klasse I zusätzlich zur Aktivierungsdomäne 1 und 2 eine bislang unbekannt Sequenz entdeckt, die 37 Aminosäuren umfasste und in verschiedensten Spezies nachgewiesen werden konnte⁽¹¹¹⁾. Dieser hoch konservierte Abschnitt, der sowohl in ITF2A als auch in ITF2B vorhanden war, konnte unabhängig die Funktion der Aktivierungsdomäne 1 und 2 reprimieren. Es wird deutlich, dass die Regulation von ITF2A und ITF2B einen komplexen Mechanismus darstellt.

4.3 Analyse der für die durch ITF2A und ITF2B vermittelte Transkriptionssteigerung wichtigen Regionen des CDKN1A-Genes

Für das E2A-Gen, dem prominentesten Vertreter der bHLH-Klasse I, und dessen Spliceprodukt E47 wurde bereits vor ITF2B nachgewiesen, dass sie die Expression des CDKN1A-Genes induzieren können^(98,100,101). Da bHLH-Proteine über sogenannte E-Boxen an die DNA binden, wurde für E47 untersucht, welche E-Boxen des CDKN1A-Promotors für die Aktivierung der Transkription wichtig sind. Eine Studie mit Reporter-genkonstrukten an 293T- und HeLa-Zellen belegte, dass die für die Induktion des CDKN1A-Genes essentiellen E-Boxen die zwischen TATA-Box und INR-Element gelegenen E-Boxen 1 und 2 sind⁽¹⁰¹⁾. Diesem Ergebnis widersprach eine Studie an MG63-Zellen. Bei deren Versuchen waren die proximalen drei E-Boxen zu einer eigenständigen Aktivierung des CDKN1A-Genes nicht in der Lage. Die Induktion des CDKN1A-Promotors wurde über zusätzliche, weiter 5' gelegene E-Boxen (E-Boxen 4-7) vermittelt⁽⁹⁸⁾. Allerdings wurden für diese beiden Studien Reporter-genkonstrukte verwendet, die nur ein unvollständiges Initiator-Element (INR) enthielten. Zwar binden bHLH-Proteine an E-Boxen und nicht an das Initiator-Element, aber für c-Myc, ein bHLH-Protein der Klasse 3, wurde bereits eine Aktivierung des INK4B (p15)-Promotors über das Initiator-Element beschrieben^(77,112). In unseren Untersuchungen, an welche E-Boxen des CDKN1A-Promotors ITF2A und ITF2B binden, verwendeten wir

deshalb Reportergenkonstrukte mit einem vollständigen Initiator-Element, um eine für ITF2A bzw. ITF2B möglicherweise wichtige Bindungsregion nicht zu übersehen und eine mögliche Fehlerquelle auszuschließen.

Entgegen den beiden bisherigen Studien kamen wir zu dem Ergebnis, dass ITF2B in DLD1-Zellen weder das kurze Reportergenkonstrukt des CDKN1A-Promotors mit den proximalen E-Boxen 1-3 (pGL3basic Cip1 K) noch das lange Reportergenkonstrukt mit den E-Boxen 1-8 (pGL3basic Cip1 L) aktivieren konnte. Somit scheint weder das Initiator-Element noch die 5' lokalisierten E-Boxen 4-8 zur Vermittlung der ITF2B-abhängigen Aktivierung eine wichtige Rolle zu spielen. Eine deutliche Aktivierung durch ITF2B wurde in DLD1-Zellen erst mit dem Konstrukt pGL3basic Cip1 K/DA, das zusätzlich zu den proximalen E-Boxen 1-3 die distalen E-Boxen 8-12 enthielt, hervorgerufen. Nach Mutation der E-Boxen 11 und 12 konnte ITF2B den CDKN1A-Promotor in DLD1-Zellen nicht mehr induzieren. ITF2A hatte dabei den gleichen Effekt auf die Aktivierung des CDKN1A-Promotors jedoch in deutlich schwächerer Ausprägung. Anders verhielten sich dagegen unsere Ergebnisse in den p53-Wildtyp-Zellen HCT116. Überraschenderweise konnten ITF2A und ITF2B das lange Reportergenkonstrukt (E-Boxen 1-8), jedoch nicht das kurze Konstrukt (E-Boxen 1-3), aktivieren. Da das Vorhandensein von p53 in dieser Zelllinie der kennzeichnendste Unterschied war, haben wir die Induktion des langen Reportergenkonstruktes durch ITF2A und ITF2B in HCT116 als einen p53-abhängigen Effekt interpretiert. Analog zu den Ergebnissen in DLD1-Zellen konnten ITF2B und ITF2A das kurze Promotorfragment (E-Boxen 1-3) nicht induzieren, die Konstrukte mit den E-Boxen 11 und 12 hingegen deutlich. Die Aktivierung durch ITF2A fiel im Vergleich zu ITF2B ebenso in HCT116 geringer aus. Dies unterstützt zum einen die Annahme, dass ITF2A aufgrund der fehlenden Aktivierungsdomäne 1 eine schwächere Funktion besitzt als ITF2B, und zum anderen, dass zur Induktion des CDKN1A-Promotors über ITF2A und ITF2B die E-Boxen 11 und 12 notwendig sind. Auffallend daran ist, dass diese E-Boxen sehr weit abwärts vom Promotor liegen.

Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass sowohl ITF2B als auch ITF2A die Transkription des CDKN1A-Genes – dessen Genprodukt p21^{Cip1} der wichtigste Inhibitor des Zellzyklus ist – aktivieren. Für diese Induktion sind distalere E-Boxen als bisher angenommen notwendig. Dabei wies ITF2B eine höhere transkriptionelle Potenz auf als ITF2A, dem die Aktivierungsdomäne 1 fehlt. Die Bedeutung dieser Aktivierungsdomäne 1 liegt offensichtlich in der Verstärkung des Transkriptionssignales, für die eigentliche Vermittlung der Genaktivierung ist sie jedoch unwesentlich. ITF2A und ITF2B bewirken über die Induzierung des CDKN1A-Genes eine Arretierung der Zellen in der G₀/G₁-Phase. Dies führt zu einer Hemmung des Zellwachstums. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ITF2 ein wichtiger Genkandidat für einen Tumorsuppressor der chromosomalen Region 18q21 ist.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass es sich bei dem Gen ITF2 um einen Tumorsuppressorgenkandidaten in der chromosomalen Region 18q21 handelt. Diese Region ist häufig von Allelverlusten (LOH) betroffen. Die beiden durch das ITF2-Gen kodierten Isoformen, ITF2A und ITF2B, unterscheiden sich in der Länge der Aminosäuresequenz und der Anzahl der vorhandenen transkriptionellen Aktivierungsdomänen, weisen aber in den analysierten Punkten viele funktionelle Gemeinsamkeiten auf. Um zu verstehen, ob und welche funktionellen Unterschiede diese beiden Proteine aufweisen, sollte in weiterführenden Experimenten deren Expressionsmuster, Regulation und Zielgene näher untersucht werden.

Eine wesentliche Rolle für die tumorsuppressive Wirkung der durch das ITF2-Gen kodierten Proteine ITF2A und ITF2B spielt die Induktion des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1} und die daraus resultierende verringerte Proliferation der Zellen. Die tumorsuppressive Funktion der beiden Proteine könnte an ITF2-*knock-out*-Mäusen untersucht werden. Die Keimbahnmutation sollte eine Prädisposition zur vermehrten Tumorentstehung darstellen. Bei Einkreuzung der ITF2-*knock-out*-Mäuse in APCmin-Mäuse wäre ein zusätzlich verstärktes Vorkommen von kolorektalen Karzinomen zu erwarten. Umgekehrt könnte die Überexpression von ITF2A oder ITF2B in APCmin-Mäusen zu einer Verringerung der Zahl der Adenome führen und damit die Hypothese bestätigen, dass es sich bei ITF2 um ein Tumorsuppressorgen handelt.

5 Zusammenfassung

In der Progression kolorektaler Karzinome ist neben den chromosomalen Regionen 5q, 8p und 17p besonders häufig die Region 18q21 von *Loss of heterozygosity* (LOH) betroffen. Diese umfasst neben den in der Literatur beschriebenen Genen *DCC* und *Smad4* das ITF2-Gen. ITF2 ist ein Zielgen des Wnt-Signalweges und kodiert für zwei Isoformen, ITF2A und ITF2B. Dabei unterscheidet sich ITF2A von ITF2B durch das Fehlen der Aktivierungsdomäne 1, während ITF2B zwei Aktivierungsdomänen aufweist. In Adenomen mit defektem APC-Gen kann ein Expressionsanstieg von ITF2B nachgewiesen werden. Am Übergang vom Adenom zum Karzinom kommt es dann zu einem Expressionsverlust. Dies geht mit einem Wachstumsvorteil und Apoptoseresistenz für die Karzinomzellen einher.

Zur Charakterisierung des ITF2-Gens und zum Vergleich der beiden Isoformen wurden die Auswirkungen einer gesteigerten ITF2A- bzw. ITF2B-Expression mittels Microarray-, PCR-, Westernblot- und FACS-Verfahrens analysiert. Dafür kamen stabil transfizierte Klone der Kolonkarzinomzelllinien DLD1 und HCT116 zum Einsatz, welche ITF2A bzw. ITF2B induzierbar exprimieren. Es konnte der Nachweis erbracht werden, dass sowohl ITF2B als auch ITF2A die Transkription des *CDKN1A*-Genes – dessen Genprodukt $p21^{Cip1}$ ein wichtiger Inhibitor des Zellzyklus ist – aktivieren.

Die transkriptionelle Regulation des *CDKN1A*-Genes durch ITF2A und ITF2B wurde anhand von Reporterassays analysiert. Wir belegten für beide Isoformen, dass sie das *CDKN1A*-Gen induzieren können und für diese Induktion distalere E-Boxen als bisher angenommen notwendig sind. ITF2B wies jedoch eine höhere transkriptionelle Potenz auf als ITF2A. Die Bedeutung der Aktivierungsdomäne 1 liegt offensichtlich in der Verstärkung des Transkriptionssignales, für die eigentliche Vermittlung der Genaktivierung ist sie jedoch unwesentlich. ITF2A und ITF2B bewirken über die Induzierung des *CDKN1A*-Genes eine Arretierung der Zellen in der G_0/G_1 -Phase. Dies führt zu einer Hemmung des Zellwachstums und unterstreicht die tumorsuppressive Wirkung dieser Proteine.

Diese Arbeit hat gezeigt, dass ITF2 ein Genkandidat für einen Tumorsuppressor der Region 18q21 ist und einen wichtigen Zielpunkt von LOH darstellt. Die beiden durch das ITF2-Gen kodierten Isoformen, ITF2A und ITF2B, weisen trotz der strukturellen Abweichungen viele funktionelle Gemeinsamkeiten auf. Die definitive Klärung des Tumorsuppressorgenstatus von ITF2 erfordert jetzt die Etablierung eines genetischen Tiermodells.

6 Literaturverzeichnis

1. Ruf G. et al. Leitlinien zum Kolorektalen Karzinom. 4 ed. 2007.
2. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;80:827-41.
3. Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, et al. Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men. *Cancer Res* 1994;54:2390-7.
4. <http://www.ekr.med.uni-erlangen.de/GEKID/Doc/kid2008.pdf> . 2009.
5. <http://onkologie-eschweiler.de/PDFS/Leseprobegit.pdf> . 2007.
6. www.gastro.med.uni-rostock.de/downloads/051%20Kolon_Handz%202006.ppt.pdf . 2007.
7. Mathew A, Peters U, Chatterjee N, Kulldorff M, Sinha R. Fat, fiber, fruits, vegetables, and risk of colorectal adenomas. *Int J Cancer* 2004;108:287-92.
8. Lewin MH, Bailey N, Bandaletova T, et al. Red meat enhances the colonic formation of the DNA adduct O6-carboxymethyl guanine: implications for colorectal cancer risk. *Cancer Res* 2006;66:1859-65.
9. Rohrmann S, Becker N. Development of a short questionnaire to assess the dietary intake of heterocyclic aromatic amines. *Public Health Nutr* 2002;5:699-705.
10. Gartel AL, Tyner AL. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2002;1:639-49.
11. Boutron-Ruault MC, Senesse P, Meance S, Belghiti C, Faivre J. Energy intake, body mass index, physical activity, and the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Nutr Cancer* 2001;39:50-7.
12. Fuchs CS, Willett WC, Colditz GA, et al. The influence of folate and multivitamin use on the familial risk of colon cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:227-34.
13. Shih T, Lindley C. Bevacizumab: an angiogenesis inhibitor for the treatment of solid malignancies. *Clin Ther* 2006;28:1779-802.
14. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004;350:2335-42.
15. Goldberg RM. Cetuximab. *Nat Rev Drug Discov* 2005;Suppl:S10-S11.
16. Pless TK, Nielsen HO. [Synchronous resection of colorectal cancer and liver metastasis]. *Ugeskr Laeger* 2008;170:1356-8.
17. Löffler G PP. *Biochemie & Pathobiochemie*. 7 ed. 2007.
18. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998;396:643-9.
19. Worthley DL, Whitehall VL, Spring KJ, Leggett BA. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol* 2007;13:3784-91.
20. Grady WM. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23:11-27.

21. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
22. Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991;251:1366-70.
23. Knudson AG, Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1971;68:820-3.
24. Kinzler KW, Vogelstein B. Landscaping the cancer terrain. *Science* 1998;280:1036-7.
25. Loeb LA. Mutator phenotype may be required for multistage carcinogenesis. *Cancer Res* 1991;51:3075-9.
26. Löffler G. *Basiswissen Biochemie*. 4 ed. Heidelberg: Springer; 2000.
27. Goel A, Arnold CN, Boland CR. Multistep progression of colorectal cancer in the setting of microsatellite instability: new details and novel insights. *Gastroenterology* 2001;121:1497-502.
28. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
29. Arnold C, Usadel H, Blum HE. [Epigenetics: significance for tumor genesis and clinical features]. *Dtsch Med Wochenschr* 2002;127:1701-3.
30. Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002;3:415-28.
31. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 2001;61:3225-9.
32. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989;244:207-11.
33. Macartney-Coxson DP, Hood KA, Shi HJ, et al. Metastatic susceptibility locus, an 8p hot-spot for tumour progression disrupted in colorectal liver metastases: 13 candidate genes examined at the DNA, mRNA and protein level. *BMC Cancer* 2008;8:187.
34. Mourra N, Zeitoun G, Portier G, et al. High-resolution genotyping of chromosome 8 in colon adenocarcinomas reveals recurrent break point but no gene mutation in the 8p21 region. *Diagn Mol Pathol* 2008;17:90-3.
35. Takayama T, Ohi M, Hayashi T, et al. Analysis of K-ras, APC, and beta-catenin in aberrant crypt foci in sporadic adenoma, cancer, and familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 2001;121:599-611.
36. Gregorieff A, Clevers H. Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 2005;19:877-90.
37. Vatn MH, Stalsberg H. The prevalence of polyps of the large intestine in Oslo: an autopsy study. *Cancer* 1982;49:819-25.
38. Jen J, Powell SM, Papadopoulos N, et al. Molecular determinants of dysplasia in colorectal lesions. *Cancer Res* 1994;54:5523-6.
39. Carethers JM. The cellular and molecular pathogenesis of colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1996;25:737-54.
40. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32.

41. Smith G, Carey FA, Beattie J, et al. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:9433-8.
42. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 1990;247:49-56.
43. Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, et al. Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet* 1996;13:343-6.
44. Mehlen P, Fearon ER. Role of the dependence receptor DCC in colorectal cancer pathogenesis. *J Clin Oncol* 2004;22:3420-8.
45. Chuong CM, Jiang TX, Yin E, Widelitz RB. cDCC (chicken homologue to a gene deleted in colorectal carcinoma) is an epithelial adhesion molecule expressed in the basal cells and involved in epithelial-mesenchymal interaction. *Dev Biol* 1994;164:383-97.
46. Martin M, Simon-Assmann P, Kedinger M, et al. DCC regulates cell adhesion in human colon cancer derived HT-29 cells and associates with ezrin. *Eur J Cell Biol* 2006;85:769-83.
47. Klingelhutz AJ, Smith PP, Garrett LR, McDougall JK. Alteration of the DCC tumor-suppressor gene in tumorigenic HPV-18 immortalized human keratinocytes transformed by nitrosomethylurea. *Oncogene* 1993;8:95-9.
48. Velcich A, Corner G, Palumbo L, Augenlicht L. Altered phenotype of HT29 colonic adenocarcinoma cells following expression of the DCC gene. *Oncogene* 1999;18:2599-606.
49. Kato H, Zhou Y, Asanoma K, et al. Suppressed tumorigenicity of human endometrial cancer cells by the restored expression of the DCC gene. *Br J Cancer* 2000;82:459-66.
50. Fazeli A, Dickinson SL, Hermiston ML, et al. Phenotype of mice lacking functional Deleted in colorectal cancer (Dcc) gene. *Nature* 1997;386:796-804.
51. Mehlen P, Rabizadeh S, Snipas SJ, et al. The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis. *Nature* 1998;395:801-4.
52. Furne C, Corset V, Herincs Z, et al. The dependence receptor DCC requires lipid raft localization for cell death signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:4128-33.
53. Takagi Y, Koumura H, Futamura M, et al. Somatic alterations of the SMAD-2 gene in human colorectal cancers. *Br J Cancer* 1998;78:1152-5.
54. Takenoshita S, Tani M, Mogi A, et al. Mutation analysis of the Smad2 gene in human colon cancers using genomic DNA and intron primers. *Carcinogenesis* 1998;19:803-7.
55. Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, et al. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell* 1998;92:645-56.
56. Korchynskiy O, Landstrom M, Stoika R, et al. Expression of Smad proteins in human colorectal cancer. *Int J Cancer* 1999;82:197-202.
57. Ng HH, Zhang Y, Hendrich B, et al. MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex. *Nat Genet* 1999;23:58-61.
58. Yanaihara N, Kohno T, Takakura S, et al. Physical and transcriptional map of a 311-kb segment of chromosome 18q21, a candidate lung tumor suppressor locus. *Genomics* 2001;72:169-79.
59. Herbst A, Bommer GT, Kriegl L, et al. ITF-2 is disrupted via allelic loss of chromosome 18q21, and ITF-2B expression is lost at the adenoma-carcinoma transition. *Gastroenterology* 2009;137:639-48, 648.

60. Henthorn P, Kiledjian M, Kadesch T. Two distinct transcription factors that bind the immunoglobulin enhancer microE5/kappa 2 motif. *Science* 1990;247:467-70.
61. Henthorn P, McCarrick-Walmsley R, Kadesch T. Sequence of the cDNA encoding ITF-2, a positive-acting transcription factor. *Nucleic Acids Res* 1990;18:678.
62. Corneliussen B, Thornell A, Hallberg B, Grundstrom T. Helix-loop-helix transcriptional activators bind to a sequence in glucocorticoid response elements of retrovirus enhancers. *J Virol* 1991;65:6084-93.
63. Massari ME, Murre C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 2000;20:429-40.
64. Church GM, Ephrussi A, Gilbert W, Tonegawa S. Cell-type-specific contacts to immunoglobulin enhancers in nuclei. *Nature* 1985;313:798-801.
65. Ephrussi A, Church GM, Tonegawa S, Gilbert W. B lineage--specific interactions of an immunoglobulin enhancer with cellular factors in vivo. *Science* 1985;227:134-40.
66. Murre C, Bain G, van Dijk MA, et al. Structure and function of helix-loop-helix proteins. *Biochim Biophys Acta* 1994;1218:129-35.
67. Murre C, McCaw PS, Baltimore D. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 1989;56:777-83.
68. Davis RL, Cheng PF, Lassar AB, Weintraub H. The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* 1990;60:733-46.
69. Ellenberger T, Fass D, Arnaud M, Harrison SC. Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev* 1994;8:970-80.
70. Ferre-D'Amare AR, Prendergast GC, Ziff EB, Burley SK. Recognition by Max of its cognate DNA through a dimeric b/HLH/Z domain. *Nature* 1993;363:38-45.
71. Atchley WR, Fitch WM. A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:5172-6.
72. Massari ME, Jennings PA, Murre C. The AD1 transactivation domain of E2A contains a highly conserved helix which is required for its activity in both *Saccharomyces cerevisiae* and mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1996;16:121-9.
73. Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. The protein Id: a negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell* 1990;61:49-59.
74. Quong MW, Massari ME, Zwart R, Murre C. A new transcriptional-activation motif restricted to a class of helix-loop-helix proteins is functionally conserved in both yeast and mammalian cells. *Mol Cell Biol* 1993;13:792-800.
75. Aronheim A, Shiran R, Rosen A, Walker MD. The E2A gene product contains two separable and functionally distinct transcription activation domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90:8063-7.
76. Kolligs FT, Nieman MT, Winer I, et al. ITF-2, a downstream target of the Wnt/TCF pathway, is activated in human cancers with beta-catenin defects and promotes neoplastic transformation. *Cancer Cell* 2002;1:145-55.
77. Furumura M, Potterf SB, Toyofuku K, et al. Involvement of ITF2 in the transcriptional regulation of melanogenic genes. *J Biol Chem* 2001;276:28147-54.

78. Skerjanc IS, Truong J, Filion P, McBurney MW. A splice variant of the ITF-2 transcript encodes a transcription factor that inhibits MyoD activity. *J Biol Chem* 1996;271:3555-61.
79. Petropoulos H, Skerjanc IS. Analysis of the inhibition of MyoD activity by ITF-2B and full-length E12/E47. *J Biol Chem* 2000;275:25095-101.
80. Muir T, Sadler-Riggleman I, Stevens JD, Skinner MK. Role of the basic helix-loop-helix protein ITF2 in the hormonal regulation of Sertoli cell differentiation. *Mol Reprod Dev* 2006;73:491-500.
81. Flora A, Garcia JJ, Thaller C, Zoghbi HY. The E-protein Tcf4 interacts with Math1 to regulate differentiation of a specific subset of neuronal progenitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:15382-7.
82. Miyagishi M, Hatta M, Ohshima T, et al. Cell type-dependent transactivation or repression of mesoderm-restricted basic helix-loop-helix protein, POD-1/Capsulin. *Mol Cell Biochem* 2000;205:141-7.
83. Chen B, Lim RW. Physical and functional interactions between the transcriptional inhibitors Id3 and ITF-2b. Evidence toward a novel mechanism regulating muscle-specific gene expression. *J Biol Chem* 1997;272:2459-63.
84. Pagliuca A, Gallo P, De Luca P, Lania L. Class A helix-loop-helix proteins are positive regulators of several cyclin-dependent kinase inhibitors' promoter activity and negatively affect cell growth. *Cancer Res* 2000;60:1376-82.
85. Sherr CJ, Roberts JM. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 1995;9:1149-63.
86. Dotto GP. p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? *Biochim Biophys Acta* 2000;1471:M43-M56.
87. Bornkamm GW, Berens C, Kuklik-Roos C, et al. Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res* 2005;33:e137.
88. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, et al. p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990;87:7555-9.
89. Leslie A, Pratt NR, Gillespie K, et al. Mutations of APC, K-ras, and p53 are associated with specific chromosomal aberrations in colorectal adenocarcinomas. *Cancer Res* 2003;63:4656-61.
90. Carethers JM, Hawn MT, Greenson JK, Hitchcock CL, Boland CR. Prognostic significance of allelic loss at chromosome 18q21 for stage II colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998;114:1188-95.
91. Cohn KH, Ornstein DL, Wang F, et al. The significance of allelic deletions and aneuploidy in colorectal carcinoma. Results of a 5-year follow-up study. *Cancer* 1997;79:233-44.
92. Jen J, Kim H, Piantadosi S, et al. Allelic loss of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994;331:213-21.
93. Martinez-Lopez E, Abad A, Font A, et al. Allelic loss on chromosome 18q as a prognostic marker in stage II colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998;114:1180-7.
94. Popat S, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of the relationship between chromosome 18q genotype, DCC status and colorectal cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2005;41:2060-70.

95. Parrinello S, Lin CQ, Murata K, et al. Id-1, ITF-2, and Id-2 comprise a network of helix-loop-helix proteins that regulate mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:39213-9.
96. Persson P, Jogi A, Grynfeld A, Pahlman S, Axelson H. HASH-1 and E2-2 are expressed in human neuroblastoma cells and form a functional complex. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;274:22-31.
97. Cisse B, Caton ML, Lehner M, et al. Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development. *Cell* 2008;135:37-48.
98. Funato N, Ohtani K, Ohyama K, Kuroda T, Nakamura M. Common regulation of growth arrest and differentiation of osteoblasts by helix-loop-helix factors. *Mol Cell Biol* 2001;21:7416-28.
99. Resnick-Silverman L, St Clair S, Maurer M, Zhao K, Manfredi JJ. Identification of a novel class of genomic DNA-binding sites suggests a mechanism for selectivity in target gene activation by the tumor suppressor protein p53. *Genes Dev* 1998;12:2102-7.
100. Engel I, Murre C. E2A proteins enforce a proliferation checkpoint in developing thymocytes. *EMBO J* 2004;23:202-11.
101. Prabhu S, Ignatova A, Park ST, Sun XH. Regulation of the expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 by E2A and Id proteins. *Mol Cell Biol* 1997;17:5888-96.
102. Peverali FA, Ramqvist T, Saffrich R, et al. Regulation of G1 progression by E2A and Id helix-loop-helix proteins. *EMBO J* 1994;13:4291-301.
103. Gartel AL, Radhakrishnan SK. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* 2005;65:3980-5.
104. El Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 1994;54:1169-74.
105. van de WM, Sancho E, Verweij C, et al. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 2002;111:241-50.
106. Yang W, Velcich A, Mariadason J, et al. p21(WAF1/cip1) is an important determinant of intestinal cell response to sulindac in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2001;61:6297-302.
107. Mitomi H, Ohkura Y, Fukui N, et al. P21WAF1/CIP1 expression in colorectal carcinomas is related to Kras mutations and prognosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007;19:883-9.
108. Zirbes TK, Baldus SE, Moenig SP, et al. Prognostic impact of p21/waf1/cip1 in colorectal cancer. *Int J Cancer* 2000;89:14-8.
109. Lassar AB, Davis RL, Wright WE, et al. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell* 1991;66:305-15.
110. Dhulipala PD, Lianos EA, Kotlikoff MI. Regulation of human P2X1 promoter activity by beta helix-loop-helix factors in smooth muscle cells. *Gene* 2001;269:167-75.
111. Herbst A, Kolligs FT. A conserved domain in the transcription factor ITF-2B attenuates its activity. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;370:327-31.
112. Gartel AL, Shchors K. Mechanisms of c-myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes. *Exp Cell Res* 2003;283:17-21.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäuren
AD	Aktivierungsdomäne
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cDNA	zur m-RNA komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonucleic acid
FCS	Fetales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
h	Stunden
HLA	Human Leukocyte Antigen
kb	Kilobasen
LOH	Loss of heterozygosity
mRNA	Messenger RNA
Min	Minute(n)
MSI	Mikrosatelliten-Instabilität
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung, <i>phosphat buffered saline</i>
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNA	Ribonucleicacid
RT	Raumtemperatur

7.2 Firmenverzeichnis

AGFA	Leverkusen	Deutschland
Amersham Pharmacia Bioscience	Freiburg	Deutschland
ATCC	Manassas	USA
BD Biosciences	Heidelberg	Deutschland
Becton Dickinson	Heidelberg	Deutschland
BioRad Laboratories	München	Deutschland
Biozym	Oldendorf	Deutschland
Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Fluka	Neu-Ulm	Deutschland
GE Hethcare	Wessling	Deutschland
Heraeus	Hanau	Deutschland
Invitrogen	Karlsruhe	Deutschland
Merck	Darmstadt	Deutschland
MP-Biomedicals	Eschwege	Deutschland
Metabion	München	Deutschland
Miltenyi-Biotec	Bergisch Gladbach	Deutschland
PAA Laboratories	Pasching	Österreich
Peqlab	Erlangen	Deutschland
Promega	Mannheim	Deutschland
Roche Diagnostics	Mannheim	Deutschland
Sigma-Aldrich	Steinheim	Deutschland
SLT Labinstruments	Crailsheim	Deutschland
Quiagen	Hilden	Deutschland

Danksagung

Zuerst möchte ich mich herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. Frank Kolligs für die Überlassung des Themas und die nette Aufnahme in das Team bedanken. Seine Geduld und Unterstützung habe ich sehr zu schätzen gelernt.

Für die geduldige Anleitung zum wissenschaftlichen Arbeiten und die kontinuierliche und intensive Betreuung möchte ich mich ausdrücklich bei meinem Betreuer Dr. rer. nat. Andreas Herbst bedanken.

Zudem habe ich mich sehr über die herzliche Zusammenarbeit und Unterstützung der Mitdoktoranden gefreut. Besonders erwähnen möchte ich Andrea Behrends, die mir immer zur rechten Zeit mit gutem Rat zur Seite stand. Außerdem möchte ich mich bei allen Mitarbeitern unserer und der benachbarten Arbeitsgruppen für die nette Atmosphäre bedanken.

Lebenslauf

Simone Helferich

Geboren am 17.06.1980 in Mannheim

Ausbildung

- 1991 – 2000: Humanistisch-Musisches Gymnasium Celtis, Schweinfurt
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife mit großem Latinum
- 2000-2003: Ausbildung zur Kinderkrankenschwester an der CNOPF'schen
Kinderklinik Nürnberg
Abschluss: Examen der Kinderkrankenpflege

Studium

- 2003 – 2005: Studium der Medizin an der LMU/TU München
Abschluss: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 2005 – 2009: Studium der Medizin an der TU München
- 2008 – 2009: Praktisches Jahr:
1. Tertial (Anästhesie): KH Rotes Kreuz, München
2. Tertial (Chirurgie): Katutura State Hospital, Windhuk, Namibia
Galway University Hospital, Ireland
3. Tertial (Innere Medizin): Kantonsspital St. Gallen, Schweiz
Abschluss: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Promotion

- 2005 – 2009: Doktorarbeit in der Gastrointestinalen Tumorforschung
Leiter: Prof. Dr. med. Frank T. Kolligs
Klinikum Großhadern der LMU München, Medizinische Klinik II
*Funktioneller Vergleich von zwei Splicevarianten des bHLH
Transkriptionsfaktors ITF2*
- Publikation
The transcription factor ITF-2A induces cell cycle arrest via p21^{Cip1},
Biochem. Biophys. Res. Commun., 2009; Volume 387, Issue 4,
Pages 736-740
Herbst Andreas, Helferich Simone, Behrens Andrea, Göke Burkhard,
Kolligs Frank T