

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

Charakterisierung des bHLH-Transkriptionsfaktors ITF2-B

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

vorgelegt von
Endy Csanadi
aus
Temeschburg
2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Frank Kolligs
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Roland Kappler Prof. Dr. Carola Berking
Mitbetreuung durch den promovierten Mitarbeiter:	Dr. rer. nat. Andreas Herbst
Dekan:	Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR
Tag der mündlichen Prüfung:	26.04.2012

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Das kolorektale Karzinom	7
1.1.1	Epidemiologische Daten	7
1.1.2	Risikofaktoren/protective Faktoren.....	8
1.1.3	Lokalisation	8
1.1.4	Metastasierung	9
1.1.5	Stadieneinteilung	9
1.1.6	Symptomatik	9
1.1.7	Diagnostik	9
1.1.8	Therapie.....	10
1.1.9	Prognose	10
1.2	Modell der molekularen kolorektalen Karzinogenese.....	10
1.2.1	Das „Vogelstein-Modell“ der kolorektalen Karzinogenese	10
1.2.2	Mikrosatelliteninstabilität (MSI).....	10
1.2.3	CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp (CIMP).....	11
1.3	Der Wnt-Signalweg	11
1.3.1	Der kanonische Wnt-Signalweg.....	12
1.3.2	Die Bedeutung des Wnt-Signalwegs in der kolorektalen Karzinogenese und der Kolon-Homöostase.....	15
1.3.3	Zielgene von β -Catenin/TCF.....	18
1.3.4	Der Transkriptionsfaktor ITF-2B	19
1.4	Zielsetzung dieser Arbeit.....	22
2	Material und Methoden	23
2.1	Material.....	23
2.1.1	Geräte	23
2.1.2	Zellkultur	23
2.1.3	Reagenzien/Chemikalien/sonstiges Material	24
2.1.4	Antikörper	25
2.1.5	Puffer und Lösungen	26
2.2	Methoden.....	27
2.2.1	Zellkultur	27
2.2.2	Proteinchemische Methoden	29
2.2.3	Stabile Transfektion von DLD1-Zellen.....	32
2.2.4	Versuche mit Transfektion von siRNA.....	33
2.2.5	Durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen	35
2.2.6	Reportergen-Assays	40
2.2.7	Funktions-Assays	43
2.2.8	Molekularbiologische Methoden.....	45

3	Ergebnisse	50
3.1	Re-Expression von ITF-2B in kolorektalen Zelllinien führt zur Reduktion der Bildung von Kolonien in <i>Colony Forming Assays</i>	50
3.2	Stabile Transfektion von DLD1-Zellen mit induzierbarem Expressionsvektor für ITF-2B	52
3.3	Induzierte Expression von ITF-2B führt zur Reduktion des Proliferationsindex im MTT-Assay	53
3.4	Induzierte Expression von ITF-2B führt zur Reduktion der Bildung von Kolonien in <i>Soft Agar Assays</i>	54
3.5	Expression von ITF-2B führt zum Zellzyklusarrest	56
3.6	ITF-2B führt zur Expression des Zellzyklusinhibitors p21 ^{Cip1}	58
3.7	Die Expression von p21 ^{Cip1} erfolgt in zeitlicher Abhängigkeit von der Expression von ITF-2B	60
3.8	Die Expression von p21 ^{Cip1} in DLD1 Cip1-Zellen allein reicht aus, um einen Zellzyklusarrest zu induzieren	61
3.9	Der durch ITF-2B vermittelte Zellzyklusarrest in DLD1 ITF- 2B-Zellen wird durch <i>gene silencing</i> von CDKN1A abgeschwächt	64
3.10	ITF-2B reguliert CDKN1A auf transkriptioneller Ebene	67
3.11	ITF-2B interagiert mit den E-Boxen E11 + E12 von CDKN1A	70
3.12	ITF-2B reguliert p21 ^{Cip1} unabhängig von p53	72
4	Diskussion	73
4.1	ITF-2B führt zur Reduktion der Koloniebildung und Zellvitalität.....	73
4.2	ITF-2B führt zum Zellzyklusarrest über die Expression des Zellzyklusinhibitors p21 ^{Cip1}	76
4.3	ITF-2B reguliert CDKN1A auf transkriptioneller Ebene unabhängig von p53	80
5	Zusammenfassung	82
6	Literaturverzeichnis.....	84
7	Abkürzungsverzeichnis	103
8	Danksagung	105
9	Veröffentlichung	106

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom

1.1.1 Epidemiologische Daten

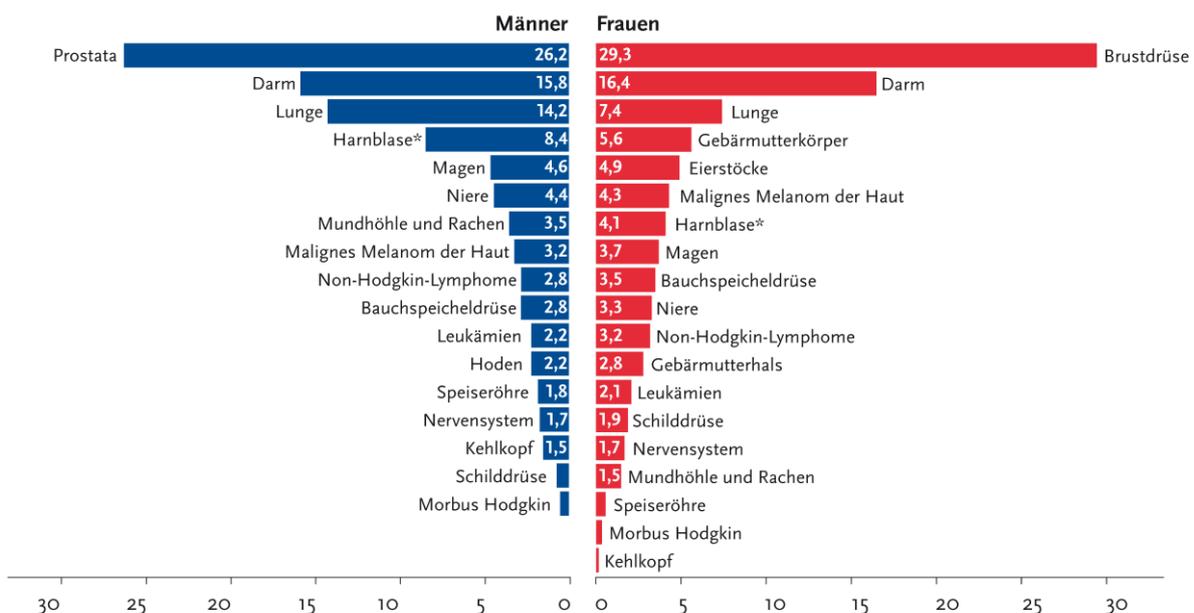
Weltweit werden jährlich ca. 945.000 Fälle kolorektaler Karzinome neu diagnostiziert und es versterben weltweit jährlich ca. 492.000 Menschen am kolorektalen Karzinom¹.

In Deutschland erkrankten im Jahr 2004 über 73.000 Menschen am kolorektalen Karzinom, davon waren 37.250 Männer und 36.000 Frauen. In der Krebstodesursachenstatistik für Deutschland des Jahres 2004 war der Darmkrebs sowohl bei den Männern (nach dem Lungenkrebs) als auch bei den Frauen (nach dem Brustkrebs) die zweithäufigste Todesursache². Das Lebenszeitrisko, an Darmkrebs zu erkranken, beträgt in der Normalbevölkerung etwa 6%.

In etwa 95% der Fälle tritt das kolorektale Karzinom sporadisch auf, in 5% der Fälle spielen genetische Faktoren eine entscheidende Rolle¹. Den Hauptanteil an den genetisch bedingten Formen stellt das hereditäre, nichtpolypöse Kolonkarzinom (HNPCC) mit ca. 5% aller kolorektalen Karzinome dar, gefolgt von der familiären adenomatösen Polyposis (FAP), die etwas unter 1% aller kolorektalen Karzinome ausmacht. Sowohl das HNPCC als auch die FAP sind autosomal dominant erblich. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinomen schlechtere 5-Jahres-Überlebensraten haben als Patienten mit HNPCC³.

Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2006

Quelle: Schätzung der Dachdokumentation Krebs im Robert Koch-Institut



*einschließlich bösartiger Neubildungen in situ und Neubildungen unsicheren Verhaltens

Abbildung 1: Darmkrebs ist bei Männern und Frauen die zweithäufigste Krebsart;

Abbildung aus: Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends²

Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2006

Quelle: Amtliche Todesursachenstatistik, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden

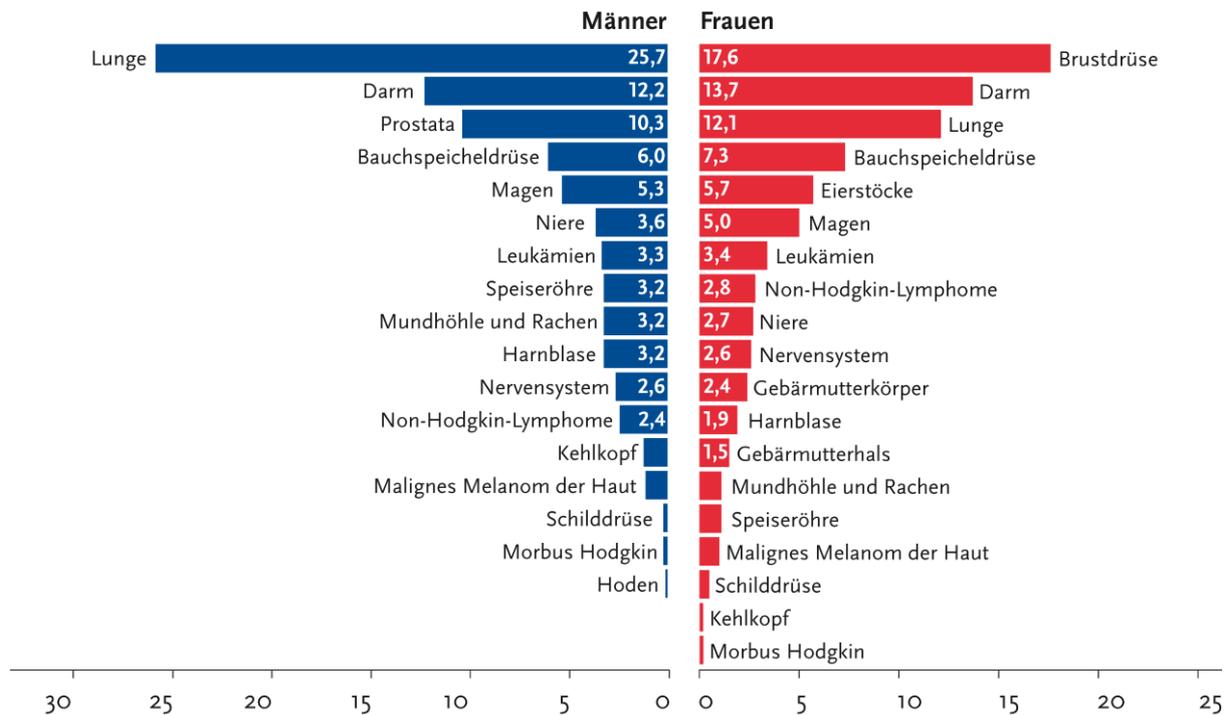


Abbildung 2: Darmkrebs ist bei Männern und Frauen die zweithäufigste Todesursache durch Krebs;

Abbildung aus: Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends²

1.1.2 Risikofaktoren/protective Faktoren

Als Risikofaktoren für die Entwicklung eines kolorektalen Karzinoms gelten ballaststoffarme Ernährung^{4, 5} sowie eine Ernährung, die arm an Obst und Gemüse ist⁶. Außerdem konnte gezeigt werden, dass der Konsum von rotem und verarbeitetem Fleisch zu einer leichten Erhöhung des Risikos für die Entwicklung von kolorektalen Karzinomen oder Adenomen führt^{7, 8}. Weiterhin gelten ein erhöhter Alkoholkonsum^{9, 10, 11} und Rauchen^{12, 13, 14} als Risikofaktoren. Ein erhöhter BMI (Body Mass Index) gilt auch als Risikofaktor^{15, 16}, während körperliche Aktivität das Kolonkarzinomrisiko reduziert¹⁷. Eine kalziumreiche Ernährung scheint das Kolonkarzinomrisiko ebenfalls zu reduzieren¹⁸.

1.1.3 Lokalisation

Etwa 55% aller kolorektalen Karzinome sind im Rektosigmoid lokalisiert. Nach der „Union International Contre Le Cancer“ (UICC) gelten Karzinome, bei denen der aborale Tumorrand bei starrer Rektosigmoidoskopie ≤ 16 cm von der Anokutanlinie lokalisiert ist, als Rektumkarzinome.

Die übrigen kolorektalen Karzinome sind wie folgt verteilt: Etwa 13% im Coecum, 8% im Colon ascendens, 11% im Colon transversum und 6% im Colon descendens.¹⁹

1.1.4 Metastasierung

Die Metastasierung erfolgt zum einen lymphogen zunächst in lokoregionäre Lymphknoten. Die hämatogene Metastasierung erfolgt über die Vena portae in die Leber und über die Vena cava in die Lunge. Je tiefer dabei der Tumor sitzt, umso häufiger finden sich Metastasen in der Lunge. Eine Metastasierung in andere Organe, wie Gehirn oder Skelett, erfolgt in der Regel erst in späteren Stadien.

1.1.5 Stadieneinteilung

Die Stadieneinteilung des kolorektalen Karzinoms erfolgt nach den Richtlinien des UICC.

1.1.6 Symptomatik

Die Symptomatik bei Vorliegen eines kolorektalen Karzinoms ist meist sehr uncharakteristisch. Blutauflagerungen auf dem Stuhl oder Blutbeimengungen im Stuhl, Änderungen der Stuhlgewohnheiten, paradoxe Diarrhoen (Obstipation und Diarrhoe im Wechsel), Müdigkeit, mangelnde Belastbarkeit oder Schmerzen beim Stuhlgang können symptomatisch auftreten und hinweisend auf das Vorliegen eines kolorektalen Karzinoms sein.^{20, 21}

1.1.7 Diagnostik

Nach der S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“ 2004/2008 sollten bei Personen mit durchschnittlichem Risiko (leere Familienanamnese für kolorektales Karzinom bzw. Polypen/Adenome) ab dem 50. Lebensjahr Früherkennungsuntersuchungen durchgeführt werden.

Dabei besitzt die komplette Koloskopie die höchste Sensitivität und Spezifität für das Auffinden kolorektaler Karzinome.

Wird eine Koloskopie abgelehnt, so werden eine Sigmoidoskopie alle 5 Jahre sowie jährlich ein FOBT (Fecal Occult Blood Test) empfohlen. Wird jegliches endoskopische Verfahren abgelehnt, so sollte jährlich ein FOBT durchgeführt werden, wobei ein positives Ergebnis in jedem Fall eine Koloskopie nach sich ziehen sollte.²²

Nach der S3-Leitlinie sollten folgende Untersuchungen obligater Bestandteil der präoperativen Diagnostik beim Kolorektalen Karzinom sein: eine digitale-rektale Untersuchung, eine komplette Koloskopie mit Biopsie - wobei im Falle einer nicht passierbaren Stenose eine Koloskopie 3-6 Monate postoperativ erfolgen sollte -, eine Abdomensonografie, ein Röntgen-Thorax in zwei Ebenen und eine CEA-Bestimmung.²²

Bei Rektumkarzinomen gehören die starre Rektoskopie und eine Endosonografie zur obligaten präoperativen Diagnostik.²²

Im Einzelfall können computer- oder kernspintomographische Verfahren oder Zusatzuntersuchungen wie eine Sphinktermanometrie, eine Zystoskopie oder eine gynäkologische Untersuchung sinnvoll sein.²²

1.1.8 Therapie

Als kurative Therapie des Kolonkarzinoms gilt die Resektion. Voraussetzung für eine adjuvante Therapie ist die R0-Resektion des Primärtumors.²²

Nach der S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“²² kann im UICC-Stadium II eine adjuvante Chemotherapie erwogen werden, im UICC-Stadium II in ausgewählten Risikosituationen (T4, Tumorperforation oder –einriss, Operation unter Notfallbedingungen, Anzahl untersuchter Lymphknoten zu gering) sollte sie erwogen werden. Im UICC-Stadium III ist eine adjuvante Chemotherapie indiziert.²²

Im UICC-Stadium III wird das FOLFOX-Schema, das aus der Gabe von Folinsäure plus 5-Fluoruracil in Kombination mit Oxaliplatin besteht, angewandt. In der MOSAIC-Studie²³ konnte gezeigt werden, dass die Kombination aus Folinsäure und 5-Fluoruracil plus Oxaliplatin der Gabe von Folinsäure und 5-Fluoruracil überlegen ist.

1.1.9 Prognose

Die Prognose kolorektaler Karzinome ist abhängig vom vorliegenden UICC-Stadium. So werden nach dem Tumorregister München im UICC-Stadium I 5-Jahresüberlebensraten (relatives Überleben) von bis zu 95% beschrieben, während die 5-Jahresüberlebensrate im UICC-Stadium IV etwa 9% beträgt.²⁴

1.2 Modell der molekularen kolorektalen Karzinogenese

1.2.1 Das „Vogelstein-Modell“ der kolorektalen Karzinogenese

Bert Vogelstein und Eric R. Fearon beschrieben Ende der achtziger Jahre des vorigen Jahrhunderts ein Modell der kolorektalen Karzinogenese, das Modell der molekularen Adenom-Karzinom-Sequenz. Sie beschrieben die kolorektale Karzinogenese als einen Mehrschrittprozess, bei dem neben der Aktivierung von Onkogenen (z.B. K-Ras) der Verlust von Tumorsuppressor-Genen zu histopathologischen Veränderungen des kolorektalen Epithels über das Stadium der dysplastischen Adenome bis hin zum invasiven kolorektalen Karzinom führt. Das Vogelstein-Modell geht davon aus, dass es im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese zu einer Anhäufung von aktivierenden Mutationen von Onkogenen und inaktivierenden Mutationen von Tumorsuppressor-Genen kommt. Es konnte gezeigt werden, dass der allelische Verlust bestimmter chromosomaler Arme, den man als LOH (Loss Of Heterozygosity) bezeichnet, häufig in kolorektalen Karzinomen zu finden ist. So ist z.B. ein LOH der Chromosomen 5q, 17p und 18q häufig in kolorektalen Tumoren nachweisbar, wobei auch LOHs anderer Regionen (z.B. 8p, 18p, 22q) beschrieben wurden.^{25, 26, 27}

1.2.2 Mikrosatelliteninstabilität (MSI)

Als Folge von defekten DNA-Reparaturproteinen kann es zu Längenveränderungen innerhalb von kurzen, repetitiven DNA-Sequenzen (Mikrosatelliten) kommen, die man als Mikrosatelliteninstabilität bezeichnet und einen Entartungsmechanismus der kolorektalen Karzinogenese darstellen.^{28, 29, 30} Der MSI liegen Keimbahnmutationen von Mismatch-

Reparatur-Genen (hMSH2, hMLH1, hPMS2) zu Grunde.^{31, 32, 33} MSI findet man bei ca. 90% der kolorektalen Karzinome von Patienten mit HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer)³⁴, allerdings auch bei ca. 20% der sporadischen kolorektalen Karzinome^{35, 36}.

1.2.3 CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp (CIMP)

Ein weiterer Mechanismus der kolorektalen Karzinogenese auf epigenetischer Ebene ist die Methylierung von CpG-reichen DNA-Abschnitten, den sogenannten „CpG“-Inseln, im Promotorbereich von Tumor-Suppressorgenen, was zur Inaktivierung dieser Tumorsuppressorgene führt^{37, 38, 39}. Dies wird als CpG-Insel-Methylierungs-Phänotyp bezeichnet⁴⁰. Kolorektale Karzinome mit einem CIMP sind oft wenig differenziert und häufig im proximalen Kolon lokalisiert⁴¹.

1.3 Der Wnt-Signalweg

Der Wnt-Signalweg ist während der Embryonalentwicklung von entscheidender Bedeutung und spielt auch in der Homöostase von adultem, regenerationsfähigem Gewebe eine wichtige Rolle. Die maligne Transformation solchen Gewebes, z.B. des intestinalen Epithels, ist eng mit Mutationen und der Deregulation im Wnt-Signalweg assoziiert.

Zur Zeit sind drei verschiedene Wnt-Signalwege bekannt: der kanonische Wnt-Signalweg, der nichtkanonische (PCP = Planar Cell Polarity) Wnt-Signalweg sowie der Wnt/Ca²⁺-Signalweg. Der Name Wnt entstand aus einer Verschmelzung von Wingless und Int-1. Das Int-1-Gen der Maus wurde im Jahr 1982 von Nusse und Varmus⁴² identifiziert. Rijsewijk et al.⁴³ konnten im Jahr 1987 zeigen, dass das Gen Wingless (wg) der Taufliege *Drosophila*, das die Segment-Polarität während der Entwicklung im Larvenstadium kontrolliert, homolog zum INT-1-Gen der Maus ist.

Mittlerweile sind in Säugetieren durch Genomsequenzierungen 20 sezernierte Wnt-Proteine bekannt⁴⁴. Wnt-Proteine sind Cystein-reiche Glykoproteine, die im aktiven Zustand an einem konservierten Cystein-Rest palmitoyliert⁴⁵ und wahrscheinlich dadurch relativ unlöslich sind.

In der Sekretion der Wnt-Proteine spielt das Gen Wntless (Wls) / *Evenness interrupted* (Evi), das für ein Protein mit sieben Transmembrandomänen kodiert und im Golgi-Apparat mit den Wnt-Proteinen interagiert, eine entscheidende Rolle, zumal in Abwesenheit von wls/evi die Wnt-Proteine nicht sezerniert werden können^{46, 47}. Eine ebenso wichtige Rolle für die Sekretion der Wnt-Proteine, aber auch für die Bildung eines Wnt-Konzentrations-Gradienten, kommt dem Retromer, einem am intrazellulären Transport beteiligtem Multiprotein-Komplex, der von Hefen bis zu Säugetieren konserviert ist, zu⁴⁸.

Die sezernierten Wnt-Proteine binden an Frizzled (Fz) - Rezeptoren mit sieben Transmembrandomänen und einer extrazellulären, Cystein-reichen Domäne (CRD = Cysteine-Rich Domain), wobei zum einen ein Wnt-Protein mehrere Fz-Rezeptoren und zum anderen ein Fz-Rezeptor mehrere Wnt-Proteine binden kann⁴⁹. Als Ko-Rezeptoren der Fz-Rezeptoren fungieren in Säugetieren LRP5 und LRP6^{50, 51} und in der Taufliege *Drosophila* Arrow⁵² - Proteine aus der LRP-Familie (LRP = Low-Density Lipoprotein Receptor (LDLR)-Related Protein). Die Bindung der Wnt-Proteine an Fz-Rezeptoren und LRP5/6 oder Arrow ist der erste Schritt im kanonischen Wnt-Signalweg, der zur Freisetzung von β -Catenin aus dem *destruction complex* im Zytosol (siehe 1.3.1) und nachfolgend zur Translokation von β -Catenin in den Zellkern, zur Assoziation von β -Catenin mit Transkriptionsfaktoren aus der

Tcf-Familie und somit zur Aktivierung von β -Catenin-Zielgenen führt. Die Wnt-Aktivierung führt also zu einem verminderten Abbau von β -catenin.

Neben den Wnt-Proteinen gibt es aber auch andere Proteine, die mit den Fz- oder LRP-/Arrow-Rezeptoren interagieren können: so kann z.B. Norrin an den Fz-Rezeptor 4 binden und den kanonischen Wnt-Signalweg aktivieren⁵³; auch Proteine der R-spondin-Familie können mit Fz- und LRP-Rezeptoren interagieren und die β -Catenin-abhängige Genexpression aktivieren⁵⁴.

Auf der anderen Seite gibt es Proteine, die mit den Rezeptoren interagieren, dabei aber zu einer Hemmung des Wnt-Signalwegs führen: Dickkopf (Dkk) – Proteine binden an LRP-Rezeptoren und hemmen die Wnt-Kaskade⁵⁵. Mao et al.⁵⁶ konnten zeigen, dass Dkk1 an Transmembran-Moleküle namens Kremen binden, zur Bildung eines Komplexes bestehend aus Dkk1, Kremen2 und LRP6 und nachfolgend zur Endozytose des Wnt-Co-Rezeptors LRP6 von der Plasmamembran führt. Auch SOST kann an LRP-Rezeptoren binden und zur Hemmung der Wnt-Kaskade führen⁵⁷. Neben reinen Inhibitoren und Aktivatoren der Wnt-Kaskade wurden auch Proteine wie z.B. Wise⁵⁸ beschrieben, die Kontext-abhängig zu einer Hemmung oder Aktivierung des Wnt-Signalwegs führen.

Daneben gibt es auch sezernierte Proteine, die direkt mit Wnt-Proteinen interagieren können. Dazu gehören die sFRPs (secreted Frizzled-Related Protein), WIF (Wnt Inhibitory Factor)-1, Cerberus und die bereits erwähnten Dickkopf-Proteine⁵⁵. Während WIF-1⁵⁹ und Cerberus⁶⁰ als Inhibitoren des Wnt-Signalwegs gelten, können einige sFRPs sowohl als Antagonisten als auch als Agonisten fungieren⁶¹.

1.3.1 Der kanonische Wnt-Signalweg

Der kanonische Wnt/ β -Catenin-Signalweg wird durch die Bindung von Wnt-Proteinen an den Frizzled-LRP-Rezeptor-Komplex in Gang gesetzt. Das Schlüsselprotein des Wnt-Signalwegs ist β -Catenin, dessen Stabilität durch den sogenannten *destruction complex* reguliert wird. Axin, der Tumor-Suppressor APC, die Glykogen-Synthase-Kinase3 β (GSK3) und β -Catenin sind Bestandteile des *destruction complex*, wobei Axin in diesem Komplex eine Gerüstfunktion zukommt⁶².

In Abwesenheit eines Wnt-Signals phosphoryliert die Casein Kinase I (CKI) β -catenin am N-Terminus an Serin 45^{63, 64}. Daraufhin wird β -Catenin durch die Glykogen-Synthase-Kinase3 β (GSK3) phosphoryliert⁶⁵. Durch die Phosphorylierung wird β -Catenin vom SCFbetaTrCP-Ubiquitin-Ligase-Komplex erkannt^{66, 67}, gebunden und dem proteasomalen Abbau zugeführt⁶⁸.

Während es also in Abwesenheit eines Wnt-Signals zu einer Degradation von β -Catenin kommt, wird durch Bindung von Wnt-Proteinen an den Frizzled/LRP-Rezeptor β -Catenin aus dem *destruction complex* freigesetzt und somit stabilisiert. Wie es im Einzelnen zur Freisetzung und Stabilisierung von β -Catenin aus dem Axin/APC/GSK3-Komplex kommt, ist noch nicht vollständig verstanden. Es konnte aber gezeigt werden, dass nach einer Wnt-Stimulation das Protein Dishevelled (Dsh) an die Zellmembran rekrutiert wird⁶⁹, an Axin aus dem *destruction complex* bindet und somit die durch die Glykogen-Synthase-Kinase3 β vermittelte Phosphorylierung von β -Catenin verhindert wird⁷⁰. Yang et al.⁷¹ zeigten, dass die Protein-Phosphatase PP2A an der Wnt-Signaltransduktion beteiligt ist. Es wird vermutet, dass eine durch PP2A vermittelte Dephosphorylierung zur Stabilisierung von β -Catenin beiträgt. Auf der anderen Seite konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der Wnt-Kaskade zur Phosphorylierung eines in der intrazellulären Domäne des LRP5/6-Rezeptors fünfmal

vorkommenden PPPSP-Motivs führt; durch diese Phosphorylierung fungiert der LRP5/6-Rezeptor als Andockstelle für das Protein Axin aus dem *destruction complex*⁷².

Nach seiner Freisetzung aus dem *destruction complex* wandert β -Catenin in den Zellkern. Der Transport von β -Catenin in den Zellkern ist unabhängig von Importinen/Karyopherinen – den Rezeptoren für Proteine mit einer nukleären Lokalisationssequenz (NLS = Nuclear Localisation Sequence) –, zumal β -Catenin keine solche NLS besitzt. β -Catenin wird durch direkte Bindung an die nukleäre Poren-Maschinerie in den Nukleus importiert⁷³. IRS-1 (Insulin Receptor Substrate – 1) scheint bei der Translokation von β -catenin eine Rolle zu spielen⁷⁴.

Im Zellkern bindet β -Catenin an Transkriptionsfaktoren der Tcf (T cell factor)/LEF (Lymphoid Enhancer Family)-Familie. Dies führt zur Transkription von Tcf-Zielgenen^{75, 76}. Die Aktivität der Tcf/LEF-Transkriptionsfaktoren wird in vielfacher Hinsicht kontrolliert. So assoziieren in Abwesenheit von β -Catenin die Tcf/LEF-Transkriptionsfaktoren mit bestimmten Repressoren der Transkription. Zu diesen Repressoren gehören Proteine der TLE/Groucho-Familie^{77, 78}, XCtBP (Xenopus C-terminal Binding Protein)⁷⁹, ICAT (Inhibitor of β -catenin and TCF4 (= TCF7L2))⁸⁰ und Chibby⁸¹. Auf der anderen Seite gibt es Faktoren, die für die Transkription von Tcf-Zielgenen notwendig sind. Zu diesen Faktoren zählt Pygopus^{82, 83} und BCL9/Legless⁸⁴. Pygopus und BCL9/Legless bilden mit β -Catenin und Tcf einen Komplex⁸⁴ und spielen eine Rolle in der Aktivierung von β -Catenin/Tcf-Zielgenen⁸⁵.

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über den kanonischen Wnt-Signalweg.

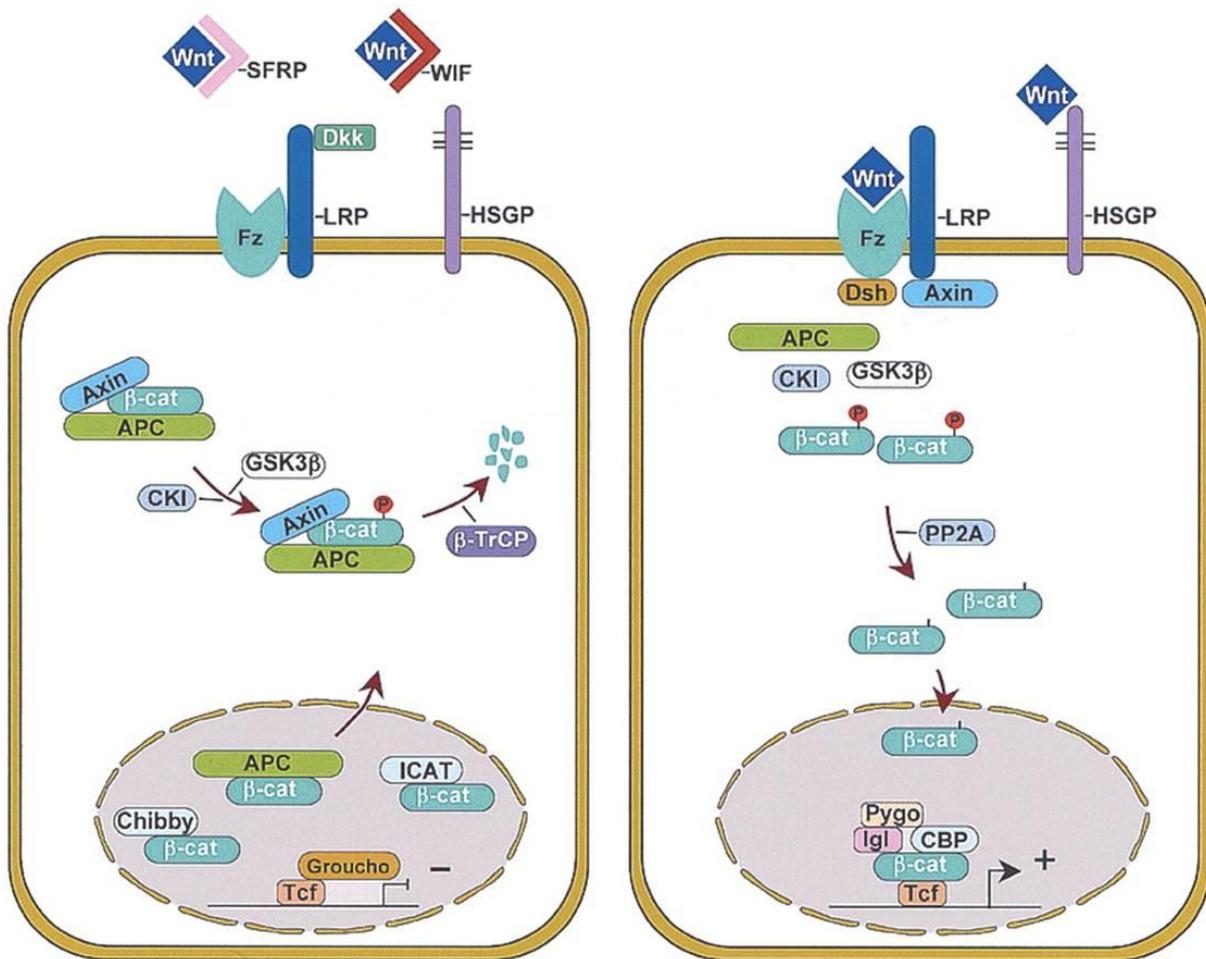


Abbildung 3: Der kanonische Wnt-Signalweg. Abbildung aus: Gregorieff A, Clevers H

(2005)⁸⁶. Linke Seite: In Abwesenheit eines Wnt-Signals wird β -catenin – vermittelt durch den *destruction complex* bestehend aus Axin, APC, GSK3 β und CKI – dem proteasomalen Abbau zugeführt. Rechte Seite: In Anwesenheit eines Wnt-Signals wird β -catenin aus dem *destruction complex* freigesetzt und durch den verminderten proteasomalen Abbau stabilisiert. Nach seiner Freisetzung wandert β -catenin in den Zellkern und führt zur Aktivierung von Tcf-Zielgenen.

1.3.2 Die Bedeutung des Wnt-Signalwegs in der kolorektalen Karzinogenese und der Kolon-Homöostase

Das APC-Gen war eines der ersten Tumorsuppressor-Gene, die identifiziert werden konnten. APC steht dabei für *Adenomatous Polyposis Coli*. Das APC-Gen wurde bei Patienten mit Familiärer adenomatöser Polyposis (FAP) entdeckt. Dabei handelt es sich um eine autosomal-dominant erbliche Erkrankung, bei der es zum Auftreten multipler kolorektaler Adenome kommt, die eine hohe Entartungstendenz zeigen. Nachdem zunächst gezeigt werden konnte, dass das Gen für die FAP auf dem langen Arm des Chromosoms 5 lokalisiert ist, wurde das APC-Gen identifiziert, der chromosomalen Region 5q21 zugeordnet und der Zusammenhang zwischen FAP und APC-Gen-Mutationen hergestellt.^{87, 88, 89}

Daraufhin stellte sich heraus, dass APC-Mutationen auch in der Entwicklung sporadischer kolorektaler Karzinome eine Rolle spielen^{90, 91}, wobei bereits in frühen Entwicklungsstadien kolorektaler Tumoren APC-Mutationen nachgewiesen werden konnten⁹¹. Im Jahre 1993 konnte dann zum ersten Mal eine Verbindung zwischen dem Tumorsuppressor-Gen APC und dem Wnt-Signalweg hergestellt werden, indem gezeigt wurde, dass APC mit β -Catenin interagiert^{92, 93}. Die Funktion von APC besteht darin, den β -Catenin-Spiegel in der Zelle zu regulieren, zumal es in kolorektalen Zelllinien mit Mutationen des APC-Gens und konsekutiv erhöhten Spiegeln an freiem β -Catenin gelang, durch exogen zugeführtes Wildtyp-APC den Spiegel an freiem β -Catenin zu senken⁹⁴. Ist das APC-Gen mutiert, kommt es zur Akkumulation von freiem β -Catenin in der Zelle und damit zur unkontrollierten Transkription von β -Catenin/TCF-Zielgenen; diese unkontrollierte Transkription ist ein entscheidender Schritt zur malignen Transformation der Zelle⁹⁵. Neben Mutationen von APC können auch andere Mutationen von Komponenten des Wnt-Signalwegs (z.B. Mutationen von Bestandteilen des *destruction complex*) zur Stabilisierung von freiem β -Catenin und zur Deregulation der Transkription von β -Catenin/TCF-Zielgenen führen. So kann z.B. durch Mutationen im β -Catenin-Gen (CTNNB1) β -Catenin aminoterminal an den Phosphorylierungsstellen der Glykogen-Synthase-Kinase3 β (GSK3) mutiert sein und somit dem proteasomalen Abbau entgehen⁹⁶. Des Weiteren wurden Mutationen von Axin2 in kolorektalen Tumoren nachgewiesen; auch diese Mutationen führen zu erhöhten Spiegeln an freiem β -Catenin⁹⁷.

Wie bisher gezeigt werden konnte, stellt die unkontrollierte Transkription von β -Catenin/TCF-Zielgenen einen entscheidenden Schritt in der Transformation einer normalen Epithelzelle der kolorektalen Schleimhaut zur maligne entarteten Zelle dar. Hier stellt sich jedoch die Frage, wie diese Deregulation im β -Catenin/TCF-Signalweg zur malignen Entartung normaler Epithelschleimhaut führt.

Während die Dünndarmschleimhaut aus Zotten und Krypten (Lieberkühn-Krypten) aufgebaut ist, finden sich im Dickdarm von der glatten Oberfläche der Schleimhaut ausgehend lediglich Krypten. Das Epithel der Oberfläche und der Krypten enthält Enterozyten, Schleim bildende Becherzellen und enteroendokrine Zellen. Neben diesen Zellen finden sich am Boden der Krypten pluripotente Stammzellen, aus denen proliferierende Vorläuferzellen hervorgehen. Diese Vorläuferzellen teilen sich und wandern, während Differenzierungsvorgänge ablaufen, vom Boden der Krypte aus in Richtung Oberfläche. An der Oberfläche gehen die Zellen in die Apoptose und werden ins Darmlumen abgestoßen. Dieser Vorgang dauert etwa drei bis fünf Tage⁹⁸.

Van de Wetering et al.⁹⁹ konnten zeigen, dass die Vorläuferzellen im unteren Drittel der Krypten normaler Kolon-Schleimhaut β -catenin im Zellkern anreichern und dass der Gehalt an β -Catenin einem Gradienten entspricht, der vom Boden der Krypten zur Oberfläche bzw.

zum Lumen hin abnimmt. Dabei führt die Abnahme des Gehalts an β -Catenin zum Zellzyklusarrest der sich differenzierenden Zellen. Dies zeigt, dass der β -Catenin/TCF-Signalweg wichtig für die Proliferation der Vorläuferzellen und für den Übergang der proliferierenden Zellen in sich differenzierende Zellen ist. Diese Beobachtungen legen den Verdacht nahe, dass Zellen, die eine Deregulation im Wnt-Signalweg erfahren haben, die zur unkontrollierten Transkription von β -Catenin/TCF-Zielgenen führt, den normalen Regulationsvorgängen entgehen und sich weiterhin wie proliferierende Vorläuferzellen verhalten. Anstatt sich zu differenzieren, proliferieren diese Zellen weiter und können in der Folge maligne entarten.

Dieses von van de Wetering et al.⁹⁹ entworfene Modell wird in der nachfolgenden Abbildung anschaulich dargestellt.

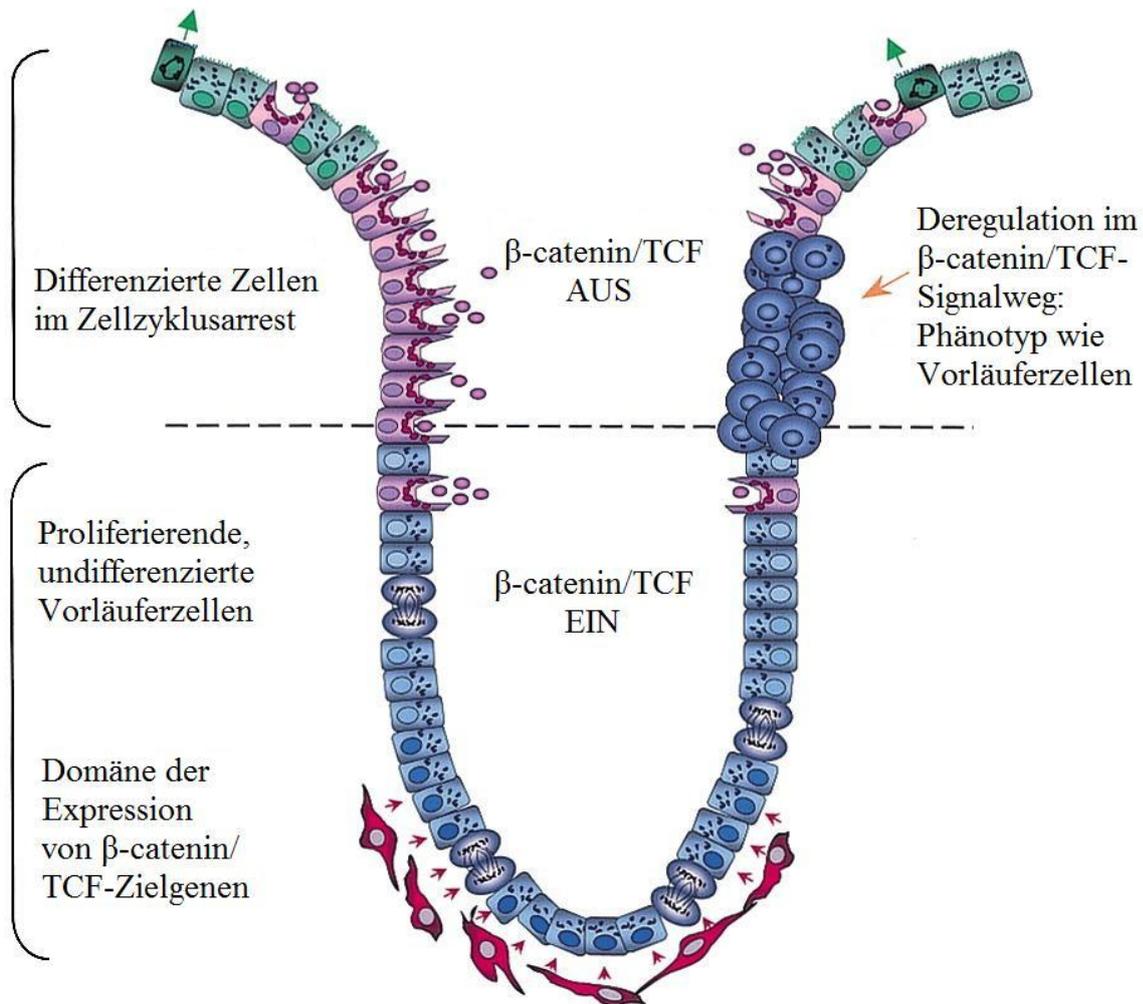


Abbildung 4: Rolle des β -Catenin/TCF-Signalweges

Dargestellt ist eine Krypte. Auf der linken Seite der Krypte sind die physiologischen Vorgänge abgebildet. Ausgehend von β -Catenin/TCF-Zielgen exprimierenden Zellen entstehen Vorläuferzellen, die in Richtung Darmlumen wandern und sich differenzieren, wobei die Expression von β -Catenin/TCF-Zielgenen immer weiter herunterreguliert wird, je weiter die Zelle sich differenziert und je weiter sie vom Boden der Krypte entfernt ist. Auf der rechten Seite der Krypte ist die Situation bei dereguliertem Wnt-Signalweg und unkontrollierter Expression von β -Catenin und β -Catenin/TCF-Zielgenen dargestellt. Die Zellen behalten den Phänotyp der Vorläuferzellen und proliferieren weiter anstatt sich zu differenzieren. Abbildung modifiziert nach van de Wetering et al. (2002)⁹⁹.

1.3.3 Zielgene von β -Catenin/TCF

Bislang wurde eine Vielzahl von β -Catenin/TCF-Zielgenen identifiziert. Eine laufend aktualisierte Übersicht über β -Catenin/TCF-Zielgene ist auf der Wnt-Homepage (<http://www.stanford.edu/group/nusselab/cgi-bin/wnt/>) aufgelistet. Die folgende Tabelle zeigt eine Auswahl von in der kolorektalen Karzinogenese relevanten Zielgenen.

Gen	Quelle
c-MYC	-He et al. (1998) ¹⁰⁰
Cyclin D1	- Tetsu O, McCormick F. (1999) ¹⁰¹ - Shtutman et al. (1999) ¹⁰²
Dickkopf	- Niida et al. (2004) ¹⁰³ - Chamorro et al. (2004) ¹⁰⁴ - González-Sancho et al. (2005) ¹⁰⁵
Endothelin-1	- Kim et al. (2005) ¹⁰⁶
EphB/ephrinB	- Batlle et al. (2002) ¹⁰⁷
Id2	- Rockman et al. (2001) ¹⁰⁸ - Willert et al. (2002) ¹⁰⁹
ITF-2	- Kolligs et al. (2002) ¹¹⁰
LEF-1	- Hovanes et al. (2001) ¹¹¹ - Filali et al. (2002) ¹¹²
Matrix Metalloproteinase-7 / Matrilysin	- Brabletz et al. (1999) ¹¹³ - Crawford et al. (1999) ¹¹⁴
PPAR δ	- He et al. (1999) ¹¹⁵
Nr-CAM	- Conacci-Sorrell et al. (2002) ¹¹⁶
Tcf1	- Roose et al. (1999) ¹¹⁷
VEGF	- Zhang et al. (2001) ¹¹⁸

Tabelle 1: Auswahl von β -Catenin/TCF-Zielgenen

1.3.4 Der Transkriptionsfaktor ITF-2B

Der Transkriptionsfaktor ITF-2 (Immunoglobulin Transcription Factor - 2) ist in der Literatur auch unter den Bezeichnungen E2-2, SEF2-1 und Tcf-4 (Transcription factor-4) bekannt. ITF-2 gehört zur Klasse I der bHLH (basic Helix-Loop-Helix) – Proteine. In der Literatur wird die Bezeichnung TCF4 verwirrend gebraucht: zum einen für den Transcription factor 7 – like 2 (TCF7L2), der durch das TCFL2-Gen kodiert wird; zum anderen für ITF-2, das durch das TCF-4-Gen kodiert wird.

Die Funktion von ITF-2 als Transkriptionsfaktor wurde durch seine Fähigkeit, an das μ E5/ κ 2-Motiv in den Enhancern der schweren und leichten Kette von Immunoglobulinen zu binden, entdeckt¹¹⁹. Corneliussen et al.¹²⁰ konnten aus menschlichen Thymozyten drei verschiedene cDNAs isolieren, die für verschiedene Isoformen von ITF-2 kodieren und die als SEF2-1A (=ITF-2A), SEF2-1B (=ITF-2B) und SEF2-1D (=ITF-2D) benannt wurden. Die drei Isoformen unterscheiden sich an ihrem N-Terminus, wobei ITF-2A und ITF-2D Amino-terminal verkürzte Formen von ITF-2B darstellen.

Die Proteine der bHLH-Transkriptionsfaktor-Familie zeichnen sich zum einen durch die Helix-Loop-Helix-Domäne aus, in der zwei amphipatische Helices durch eine Schleife voneinander getrennt sind. Die bHLH-Domäne vermittelt die Homodimerisierung und die Heterodimerisierung mit anderen bHLH-Transkriptionsfaktoren. Zum anderen besitzen die Proteine dieser Familie von Transkriptionsfaktoren eine Domäne, die reich an basischen Aminosäuren ist, Amino-terminal der bHLH-Domäne lokalisiert ist und die DNA-Bindung an sogenannte E-Boxen, die durch die Nukleotidsequenz CANNTG charakterisiert ist, vermittelt.^{121, 122}. Die Transkriptionsfaktoren der bHLH-Familie spielen eine große Rolle in vielen Prozessen, wie z.B. im Zellwachstum, in der Differenzierung, in der Neurogenese, in der Myogenese oder in der Hämatopoese.

Die folgende Abbildung verdeutlicht die dreidimensionale Struktur eines bHLH-Dimers am Beispiel des E47-Homodimers aus der Gruppe der Klasse I bHLH-Transkriptionsfaktoren.



Abbildung 5: Kristallstruktur des Klasse I bHLH-Transkriptionsfaktors E47

Dargestellt ist ein Homodimer von E47, das durch van der Waalsche Kräfte und hydrophobe Bindungen stabilisiert wird. Ein E47-Monomer ist in Grün, das zweite in Gelb dargestellt. Das E47-Homodimer interagiert mit der DNA (in Lila dargestellt) in einer Furche der DNA über sogenannte E-Boxen (mit der Nukleotidsequenz CANNTG, in diesem Fall CACCTG). Abbildung aus Ellenberger et al. (1994)¹²³

Die bHLH-Proteine werden in verschiedene Klassen eingeteilt. Die Proteine der Klasse I werden auch als E-Proteine bezeichnet. Zu ihnen gehören ITF-2¹¹⁹, HEB¹²⁴ sowie E12 und E47, die zwei Spliceprodukte des E2A-Gens darstellen¹²¹. Diese Proteine der Klasse I kommen ubiquitär vor und können entweder als Homodimere oder als Heterodimere mit Proteinen der Klasse II an E-Boxen binden. Die Proteine der Klasse II hingegen sind gewebsspezifisch und bilden bevorzugt Heterodimere mit Proteinen der Klasse I und nur sehr selten Homodimere. Zu ihnen gehören z.B. MyoD¹²⁵, NeuroD¹²⁶ oder Atonal, ein proneurales Gen der Taufliege *Drosophila*¹²⁷. Daneben gibt es viele weitere Proteine der bHLH-Transkriptionsfaktor-Familie, die den Klassen III-VII zugeordnet werden. Neben dieser Einteilung in sieben Klassen¹²⁸ gibt es noch eine weitere, in der die Transkriptionsfaktoren der bHLH-Familie nach evolutionärem Verwandtschaftsgrad in die Gruppen A-D eingeteilt werden¹²⁹. ITF-2 wird in dieser Klassifikation der Gruppe A zugeordnet.

Kolligs et al.¹³⁰ konnten im Jahr 1999 zeigen, dass N-terminal mutierte Formen von β -Catenin zur neoplastischen Transformation von Zellen der epithelialen RK3E-Zelllinie aus Rattennieren führen. Drei Jahre später gelang es Kolligs et al.¹¹⁰ eine Verbindung zwischen der Expression von β -Catenin und ITF-2B herzustellen. Es konnte gezeigt werden, dass RK3E-Zellen mit onkogen mutiertem β -Catenin eine erhöhte Expression von ITF-2B zeigten. Dabei steht die Expression von ITF-2B mit der Expression von β -Catenin in zeitlichem Zusammenhang. Mutationen von Tcf-4 (T cell factor-4) - einem Faktor, der mit β -Catenin im Zellkern assoziiert und zur Transkription von β -Catenin/Tcf-Zielgenen führt - hatten eine

reduzierte Expression von ITF-2B in RK3E-Zellen mit onkogen mutiertem β -Catenin zur Folge. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die induzierte Expression von Wildtyp-APC in Zellen der kolorektalen Zelllinie HT29, in der beide Allele von APC mutiert sind, zur reduzierten Expression von ITF-2B führt. Dies ist eine weitere Beobachtung, die die Verbindung zwischen dem Wnt-Signalweg und der Expression von ITF-2B herstellt. Mittels Reporteragen-Assays an Zellen der kolorektalen Zelllinien HCT116 und SW480 konnte gezeigt werden, dass β -Catenin mit dem Promotor des ITF-2B-Gens interagiert.

Des Weiteren wurde in endometrioiden Adenokarzinomen des Ovars die Höhe von ITF-2A- und ITF-2B-Transkripten mittels RT(Real Time)-PCR quantifiziert. Dabei eigneten sich die Karzinome sehr gut für diese Analyse, da nur 30-40% der Karzinome Mutationen im β -Catenin-Signalweg aufweisen und somit ein Vergleich der ITF-2 Levels von Karzinomen mit dereguliertem Signalweg mit Karzinomen mit intaktem Signalweg möglich war. Dabei zeigte sich eine signifikante Erhöhung an ITF-2A und ITF-2B-Transkripten in Karzinomen mit dereguliertem β -Catenin-Signalweg im Vergleich zu Karzinomen mit intaktem Signalweg, wobei die ITF-2B-Transkripte deutlich höher als die ITF-2A-Transkripte waren. In der immunhistochemischen Analyse konnten bei den Karzinomen mit dereguliertem β -Catenin-Signalweg sowohl β -Catenin als auch ITF-2 im Zellkern nachgewiesen werden, während bei den Karzinomen mit intaktem Signalweg kein Signal oder nur ein schwaches Signal im Zellkern nachweisbar war.

Kolligs et al.¹¹⁰ konnten auch zeigen, dass die Expression von ITF-2B zur neoplastischen Transformation von RK3E-Zellen führt – ähnlich wie bei den RK3E-Zellen mit onkogen mutiertem β -Catenin¹³⁰. Allerdings betrug die Anzahl der Foci mit morphologisch transformierten Zellen bei den mit ITF-2B transformierten Zellen etwa ein Drittel im Vergleich zur Anzahl der Foci bei den Zellen mit onkogen mutiertem β -Catenin. Während allerdings bei den RK3E-Zellen mit onkogen mutiertem β -Catenin eine intakte Tcf-Funktion für die Fähigkeit zur neoplastischen Transformation wichtig ist, bleibt bei den mit ITF-2B transfizierten Zellen diese Fähigkeit auch bei mutiertem Tcf erhalten. Außerdem zeigten ITF-2B exprimierende RK3E-Zellen (im Gegensatz zu nicht transfizierten Zellen) in Soft Agar Assays die Fähigkeit, auch unabhängig von einem Kontakt zum Untergrund zu wachsen und Kolonien zu bilden.

Herbst und Kolligs¹³¹ identifizierten durch Analyse der Proteinsequenz von Klasse I bHLH-Proteinen eine konservierte Domäne im Transkriptionsfaktor ITF-2B. Sie konnten nachweisen, dass diese Domäne die Transkriptionsaktivität von ITF-2B reduziert, zumal die Deletion dieser Domäne zu einer erhöhten Aktivität von ITF-2B führte. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass drei Lysin-Reste wichtig für die Funktion der konservierten Domäne sind. Die Mutation dieser Lysin-Reste führt zu einer Zunahme der transkriptionellen Aktivität von ITF-2B. Diese Zunahme der Aktivität nimmt dabei mit steigender Anzahl an mutierten Lysin-Resten zu, wobei die Stellung der Mutationen keine Rolle spielt. Sind alle drei Lysin-Reste mutiert, so entspricht die Aktivität von ITF-2B in etwa der Aktivität des ITF-2B mit deletierter konservierter Domäne. Herbst und Kolligs¹³¹ schlussfolgern daraus, dass durch Modifikation dieser Lysin-Reste (z.B. durch Acetylierung) die Aktivität von ITF-2B stufenweise reguliert und somit an verschiedene physiologische Bedingungen angepasst werden kann.

1.4 Zielsetzung dieser Arbeit

Der Transkriptionsfaktor ITF-2B, der zur Klasse I der *basic helix-loop-helix* (bHLH) Protein-Familie gehört, wurde als ein Zielgen von β -Catenin im kanonischen Wnt-Signalweg identifiziert¹¹⁰. Es ist bekannt, dass Deregulationen im Wnt-Signalweg entscheidende Faktoren in der neoplastischen Transformation normaler kolorektaler Schleimhaut darstellen. Des Weiteren ist bekannt, dass Proteine der Klasse I von bHLH-Transkriptionsfaktoren eine große Rolle in Vorgängen des Zellwachstums und der Differenzierung spielen.

Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von ITF-2B näher zu beschreiben, um die Bedeutung von ITF-2B für normale Darmzellen und in der kolorektalen Karzinogenese zu verstehen.

Dazu wurde zunächst der Einfluss von ITF-2B auf

- a.) die Fähigkeit zur Koloniebildung mit (mittels *Colony Forming Assays*) und ohne Kontakt zu einem festen Untergrund (mittels *Soft Agar Assays*)
 - b.) die Zellvitalität (mittels *MTT-Assays*)
 - c.) die Zellzyklusverteilung (mittels Durchflusszytometrie)
- untersucht.

Der in der Zellzyklusanalyse beobachtete, durch ITF-2B induzierte Zellzyklusarrest wurde dann in weiteren Versuchen näher charakterisiert, indem zunächst nach potentiell durch ITF-2B regulierten Zellzyklusinhibitoren gesucht wurde (mittels Western-Blot).

In weiteren Versuchen sollte dann analysiert werden, ob der Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1} – der im Western Blot das stärkste Signal zeigte – alleine ausreicht, um den beobachteten Zellzykluseffekt zu induzieren. Dazu wurde zum einen der Zellzykluseffekt von Zellen, die p21^{Cip1} induzierbar überexprimieren konnten, zum anderen der Einfluss des *gene silencing* von p21^{Cip1} auf die Zellzyklusverteilung untersucht.

Abschließend sollte mittels Reporter-gen-Assays untersucht werden, ob ITF-2B das p21^{Cip1}-Gen (CDKN1A) auf transkriptioneller Ebene reguliert und davon ausgehend der Promoterbereich des p21^{Cip1}-Gens, der mit ITF-2B interagiert, näher eingegrenzt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Gerät	Firma
Brutschrank HERA cell 240	Heraeus, Hanau, Deutschland
Elektrophoresekammer: MiniProtean [®] 3	Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.
BD FACSCalibur [™] Flow Cytometer	BD, Heidelberg, Deutschland
Filmentwickler Agfa Curix 60	Agfa AG, Leverkusen
Luminometer TD-20/20	Turner Designs, Sunnyvale, CA, U.S.A.
Photometer Ultrospec 3100 pro	Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland
Power-Supply: Power PAC 300	Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.
Sicherheitswerkbank HERA safe	Heraeus, Hanau, Deutschland
Tischzentrifugen: Eppendorf Centrifuge 5417R MiniSpin [®]	Eppendorf, Hamburg, Deutschland Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zellkultur-Zentrifuge: Rotina 46R	Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland

Tabelle 2: Geräte

2.1.2 Zellkultur

12-, 24-well Platten	BD, Heidelberg, Deutschland
Difco [™] Agar Noble	BD, Heidelberg, Deutschland
DMEM High Glucose (4,5 g/l)	PAA, Pasching, Österreich
Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM), powder (High Glucose)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Dulbecco's PBS (1x)	PAA, Pasching, Österreich
Foetal Bovine Serum Gold	PAA, Pasching, Österreich
Hygromycin B (50mg/ml)	PAA, Pasching, Österreich
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA, Pasching, Österreich
Pipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml): Costar [®] Stripette	Corning Incorporated, Corning, NY, U.S.A.
Trypsin-EDTA (1x)	PAA, Pasching, Österreich

Tabelle3: Materialien für die Zellkultur

2.1.3 Reagenzien/Chemikalien/sonstiges Material

30% Acrylamide/Bis Solution, 29:1	Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.
6× Loading Dye Solution	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Benzonase [®] Nuclease	Novagen, Merck Biosciences, Darmstadt, Deutschland
Biozym LE Agarose	Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.
Bradford Reagenz	Bio-Rad, München, Deutschland
Detection Reagents 1 + 2	GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, HP7 9NA, UK
Doxycycline hyclate	Sigma, Steinheim, Deutschland
DTT	
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid (1% Lösung in H ₂ O)	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Fugene [®] 6 Transfection Reagent	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland
Geneticin (G-418 Sulfat)	PAA, Pasching, Österreich
Gene Ruler [™] 1kb DNA Ladder Plus	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Glutaraldehyde 25%	Sigma, Steinheim, Deutschland
Isopropanol/HCl (0,04 N)	Sigma, Steinheim, Deutschland
LB Agar, powder (Lennox L Agar)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
LB Broth Base, powder (Lennox L Broth Base) [®]	
Lipofectamine [™] 2000 Reagent	Invitrogen [™] , Karlsruhe, Deutschland
Luciferase Assay System	Promega, Madison, WI, U.S.A.
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Methylene blue	Sigma, Steinheim, Deutschland
MTT Formazan powder	Sigma, Steinheim, Deutschland
Nanofectin I	PAA, Pasching, Österreich
Nitrozellulose-Membran	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
OPTI-MEM [®] I (1x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Precision Plus Protein [™] Standards All Blue	Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Reporter Lysis Buffer (5x)	Promega, Madison, WI, U.S.A.
Röntgenfilm: CL-X Posure [™] Film	Thermo Scientific, Rockford, U.S.A.
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
S.O.C. Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

T4 DNA Ligase (1u/µl)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
T4 DNA Ligase Buffer (10×)	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetracycline	Sigma, Steinheim, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton X-100	LKB Produkter AB, Bromma, Schweden
Tween	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Whatman® Paper	Biometra, Göttingen, Deutschland

Tabelle 4: Reagenzien/Chemikalien/sonstiges Material

2.1.4 Antikörper

Antikörper	Hersteller	Bestellnummer
anti-β-Actin	Sigma, Steinheim, Deutschland	A1978
anti-HA (Klon 3F10)	Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland	11867423001
anti-p15 ^{INK4B}	Cell Signaling Technology, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland	4822
anti-p16 ^{INK4A}	Cell Signaling Technology, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland	4824
anti-p21 ^{cip1}	Cell Signaling Technology, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland	2947
anti-p27 ^{Kip1}	Cell Signaling Technology, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland	2552
BD Transduction Laboratories™ Purified Mouse anti-Cip1/WAF1 Mab	BD Biosciences Pharmingen, Heidelberg, Deutschland	610233
ECL™ anti-rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey)	GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, HP7 9NA, UK	NA934-1ML
ECL™ anti-mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from sheep)	GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, HP7 9NA, UK	NA931-1ML
Fluorescein (FITC)-conjugated AffiniPure Goat Anti-Rat IgG (H+L)	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, U.S.A.	112-095-003
goat anti-rat IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland	sc-2006

Tabelle 5: Antikörper

2.1.5 Puffer und Lösungen

SDS-Laufpuffer (10x)	0,25M TRIS Base 1,92M Glycin 1% SDS Aqua dest.	30,3 g 144,0 g 10,0 g ad 1000,0 ml
SDS-Laufpuffer (1x)	1:10 Verdünnung des 10x-Puffers mit H ₂ O	
Transferpuffer (10x)	0,25M TRIS Base 1,92M Glycin 1% SDS Aqua dest.	30,0 g 144,1 g 30,0 g ad 1000,0 ml
Transferpuffer (1x)	Transferpuffer (10x) Methanol Aqua dest.	100,0 ml 200,0 ml ad 1000,0 ml
Trenngel (10%) für 2 Gele	H ₂ O 1,5M Tris (pH 8,8) 30% Acryl- Bisacryl-Mix 10% SDS 10% APS TEMED	5,9 ml 3,8 ml 5,0 ml 150,0 µl 50,0 µl 6,0 µl
Sammelgel (5%) für 2 Gele	H ₂ O 1,5M Tris (pH 6,8) 30% Acryl- Bisacryl-Mix 10% SDS 10% APS TEMED	3,4 ml 630,0 µl 830,0 µl 50,0 µl 50,0 µl 5,0 µl
TBS (25x)	Tris-Base NaCl 12 N HCl Aqua dest. →pH 7,6 eingestellt	60,0 g 200,0 g 7,9 ml ad 1000,0 ml
TBST (1x)	TBS (25x) Aqua dest. + Tween	40,0 ml ad 1000,0 ml 2,0 ml
Blocking-Lösung 5% (w/v)	Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk TBST (1x)	 5,0 ml 100,0 ml
β-Galaktosidase-Puffer (2x)	Na ₂ HPO ₄ NaH ₂ PO ₄	120,0 mM 80,0 mM

	MgCl ₂	2,0 mM
	β-Mercaptoethanol	100,0 mM
	o-Nitrophenyl-β-D-Galaktopyranosid	4,4 mM
Nicoletti-Puffer	Natriumcitrat	0,1 g
	Triton X-100	0,1 ml
	PBS (1x)	ad 100,0 ml
	+ Propidiumiodid	50,0 µg/ml

Tabelle 6: Puffer und Lösungen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Zelllinien

Die Experimente in dieser Arbeit wurden an den Zelllinien DLD-1, HCT116, LoVo, SW480 und SW620, die von ATCC (LGC Prochem, Wesel, Deutschland) geliefert wurden, sowie an DLD1 ITF2B-Zellen, die durch stabile Transfektion von DLD1-Zellen mit dem Expressionskonstrukt pRTS/ITF2B erzeugt wurden, durchgeführt. Desweiteren wurden für Experimente dieser Arbeit zum einen DLD1 Cip1-Zellen verwendet, die von der französischen Arbeitsgruppe um Bernard Ducommun vom *Institut de Pharmakologie et de Biologie Structurale du CNRS Université Paul Sabatier* (Toulouse, Frankreich) zur Verfügung gestellt wurden, zum anderen die Zelllinien HCT116 p53^{+/+} sowie HCT116 p53^{-/-}, die von B. Vogelstein von der Johns Hopkins University School of Medicine (Baltimore, Maryland, U.S.A.) zur Verfügung gestellt wurden.

2.2.1.2 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ bei 37°C inkubiert. Es wurde unter einer sterilen Sicherheitswerkbank mit sterilen Arbeitsmaterialien und sterilen Lösungen bzw. Medien gearbeitet. Als Medium wurde für alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zelllinien DMEM High Glucose (4,5g/l) (PAA, Pasching, Österreich) mit 10% Foetalem Bovine Serum Gold (PAA) sowie mit 1% Penicillin/Streptomycin (100x) (PAA) verwendet. Die DLD1 ITF2B-Zellen wurden mit 300 µg/ml Hygromycin B (50mg/ml) (PAA) unter Selektionsdruck gehalten.

2.2.1.3 Passagieren der Zellen und Zellzählung

Die Zellen wurden in 10cm-Petrischalen kultiviert. Sie wurden 2-3mal wöchentlich passagiert. Dazu wurde zunächst das Medium von der Zellkulturschale abgesaugt und die Zellen einmal mit PBS (1x) gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 1,5 ml Trypsin-EDTA für 3 Minuten im Brutschrank bei 37°C behandelt, so dass sie sich leicht von der Schale lösen ließen. Um die Zellen vor dem Verdau durch Trypsin zu schützen, wurden sie zügig in ein 15

ml-Falconröhrchen mit 8,5 ml DMEM High Glucose mit 10% Foetalem Bovinen Serum überführt und anschließend für 5 Minuten bei 1200 U/m zentrifugiert (Rotina 46 R, Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet je nach Konfluenz der passagierten Platte in 5-10 ml neuem Medium aufgenommen. Dann wurde 1 ml der verdünnten Zellsuspension auf eine neue Petrischale mit 9 ml Medium aufgebracht.

Um die Zellen für die Experimente in genauer Zellzahl auszusäen, wurden sie zuvor in einer Neubauerzählkammer gezählt.

2.2.1.4 Einfrieren der Zellen

Die Zellen wurden zweimal mit PBS (1x) gewaschen, drei Minuten lang bei 37°C trypsiniert, in FCS-haltigem Medium aufgenommen und 5 Minuten lang bei 1200 U/m zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 2 ml Einfriermedium aufgenommen. Als Einfriermedium diente FCS mit 10% DMSO, das die Bildung von Eiskristallen verhindert. Nun wurde je ein ml der in Einfriermedium aufgenommenen Zellen in ein Einfrierröhrchen pipettiert. Die Einfrierröhrchen kamen für 24 Stunden in eine Einfrierbox, in der die Zellen schrittweise um 1°C pro Minute bis zu -80°C herunter gekühlt wurden. Um die Zellen über längere Zeit aufzubewahren, wurden sie nach 24 Stunden in flüssigen Stickstoff von -180°C überführt.

2.2.1.5 Auftauen der Zellen

Die Einfrierröhrchen mit den Zellen wurden aus dem flüssigen Stickstoff entfernt und für 2-3 Minuten in der Hand aufgetaut. Unter der Sterilbank wurden die bereits aufgetauten Zellen im Einfrierröhrchen in FCS-haltiges Medium aufgenommen und schrittweise in ein 15ml Falconröhrchen, in das zuvor FCS-haltiges Medium vorgelegt wurde, überführt. Um DMSO zu entfernen, wurden die Zellen nun für 5 Minuten bei 1200 U/m zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und die Zellen auf eine 10 cm Zellkulturschale pipettiert.

2.2.2 Proteinchemische Methoden

2.2.2.1 Ernten der Zellen und Herstellung von totalen Zelllysaten

Die Zellkulturschalen wurden auf Eis gehalten. Die Zellen wurden zweimal mit PBS (4°C) gewaschen, anschließend wurde 1ml PBS auf die Platten gegeben und die Zellen mit einem Zellschaber abgeschabt. Die Zellsuspension wurde mit einer Pipette in ein Reaktionsgefäß überführt und zentrifugiert (13400 U/min, 1min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach Größe in 20-50µl *Reporter Lysis Buffer* aufgenommen. Das Lysat wurde für 15 Minuten bei -80°C inkubiert, aufgetaut und daraufhin mit 1µl Benzonase (25U/µl) für 10 Minuten bei Raumtemperatur behandelt. Die Benzonase ist eine Endonuklease ohne proteolytische Aktivität, die DNA und RNA abbaut.

2.2.2.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen, die dazu dient, im Western Blot gleiche Proteinmengen auftragen zu können, erfolgte mit der Methode nach Bradford entsprechend den Herstellerangaben (Bio-Rad). Dazu wurde mit Bovinem Serum Albumin (BSA) eine Standardkurve erstellt. Es wurden 0,5µl, 1µl, 2µl, 4µl und 8µl BSA mit der Konzentration 1mg/ml und 0,5µl des zu analysierenden Zelllysats in jeweils ein Reaktionsgefäß überführt. Das Bradford-Reagenz wurde 1:5 mit H₂O verdünnt und 1ml der verdünnten Bradford-Lösung in die Reaktionsgefäße -einschließlich eines leeren Reaktionsgefäßes zur Bestimmung eines Leerwertes- gegeben. Die Proben wurden in Küvetten überführt und die Absorption im Photometer bei 595nm gemessen. Die Proteinkonzentrationen konnten dann anhand der gleichzeitig erstellten BSA-Konzentrationsreihe berechnet werden.

2.2.2.3 Vorbereitung der Proben für die Protein-Gelelektrophorese

Zu 450µl Lämmli-Puffer (2x) wurden 50µl 1M DTT gegeben. Es wurden 20-40µg des Zelllysats entnommen und jeweils das gleiche Volumen des Lämmli-Puffers (mit dem DTT) zugegeben. Die Bestandteile des Lämmli-Puffers haben verschiedene Funktionen: das darin enthaltene SDS (Sodium-Dodecyl-Sulfat), ein anionisches Detergenz, verleiht dem Protein eine gleichmäßige negative Ladung, die dazu führt, dass die Proteine in der anschließenden Gelelektrophorese nur nach dem Molekulargewicht, nicht aber nach der Ladung aufgetrennt werden; Glycerol erhöht die Dichte in den Proben und verhindert so, dass diese beim Auftragen aus den Geltaschen laufen; Bromphenolblau dient als Farbindikator für die Lauffront während der Gelelektrophorese; durch DTT werden Disulfidbrücken reduziert und somit die Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen sowie von Dimeren verhindert.

Neben den Zelllysaten wurde auch 5µl eines Proteinmarkers (Precision Plus ProteinTM Standards All Blue, Bio-Rad) aufgetragen, dem soviel Lämmli-Puffer dazugegeben wurde, dass das Volumen mit dem Endvolumen der Zelllysate identisch war.

Um die Proteine zu denaturieren, wurden die Proben vor der Gelelektrophorese für 5 Minuten bei 95°C im Heizblock aufgeköcht.

2.2.2.4 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

In der SDS-PAGE erfolgte die Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht (Lämmli, 1970). Zunächst wurde ein 10%iges Trenngel gegossen und mit 0,1% SDS-Lösung überschichtet. Nach der Polymerisation des Trenngels (ca. 30 Minuten) wurde die 0,1% SDS-Lösung abgegossen, das Trenngel mit 5%igem Sammelgel überschichtet, ein Kamm zur Erzeugung der Geltaschen eingesetzt und das Gel für ca. 30 Minuten polymerisieren gelassen. Anschließend wurden die Gele in der Elektrophoresekammer platziert, die Kammer mit 1x SDS-Laufpuffer als Elektrolytlösung zwischen den Enden des Gels und den Elektroden gefüllt, die Kämmen entfernt und der Marker sowie die Proben in die Geltaschen gefüllt. Um die Proteine im Sammelgel zu konzentrieren, wurde zunächst für ca. 15 Minuten eine Spannung von 100V angelegt; um die Proteine im Trenngel aufzutrennen, wurde eine Spannung von 200V angelegt, bis die Bromphenolblau-Lauffront das untere Ende des Gels erreichte.

2.2.2.5 Western-Blot

Nach der Auftrennung der Proteine in der SDS-PAGE erfolgte das als Western-Blot bekannte Verfahren, bei dem die Proteine von dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert werden. In einer Schale mit kaltem Transferpuffer (1x) wurde in einer Transferkassette der Western-Blot-“Sandwich” in folgender Reihenfolge zusammengesetzt: Schwamm, Whatman-Papier, Nitrozellulose-Membran, Acrylamidgel, Whatman-Papier, Schwamm. Anschließend wurde die Transferkassette mit der Nitrozellulose-Membranseite zur Anode weisend in die Transferkammer eingesetzt. Die Transferkammer wurde mit Transferpuffer gefüllt und ein Eispack hinzugegeben. Der Transfer erfolgte dann über eine Stunde bei 400 mA.

2.2.2.6 Immundetektion

Die PVDF-Membran wurde nach dem Transfer für 60 Minuten bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C mit 5% Trockenmilch in TBST inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen von Proteinen auf der Membran zu blockieren. Danach wurde die Membran für eine Stunde bei Raumtemperatur bzw. über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper in einer 1%igen Trockenmilchlösung inkubiert. Es folgten zwei kurze sowie zwei fünf minütige Waschschrte mit TBST (1x), um die ungebundenen Erstantikörper zu entfernen. Anschließend wurde die Membran für 60 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper in einer 1%igen Trockenmilchlösung inkubiert. Der Sekundärantikörper ist mit einer Meerrettich-Peroxidase (Horseradish Peroxidase) konjugiert, die in Gegenwart geeigneter Substrate eine Reaktion katalysieren kann, bei der Lumineszenz entsteht, die durch Belichtung eines Röntgenfilms nachgewiesen werden kann. An die Inkubation mit dem Sekundärantikörper schlossen sich zwei kurze sowie zwei lange Waschschrte von jeweils 20 Minuten mit TBST (1x) an, um die ungebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Nun wurde die Nitrozellulose-Membran für eine Minute mit den ECLTM-Lösungen 1 und 2 inkubiert. Mit dem so entstandenen Chemilumineszenzsignal konnte dann ein Röntgenfilm (CL-X PosureTM, Thermo Scientific) belichtet werden. Die Entwicklung erfolgte in einem automatischen Filmentwickler (Curix60, Agfa) unter Lichtausschluss.

Die für die Immundetektion verwendeten Antikörper sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Primärantikörper		Sekundärantikörper	
Name	Verdünnung	Name	Verdünnung
anti- β -Actin (Klon AC-15, Sigma)	1:2.000	ECL TM anti-mouse (GE Healthcare UK Limited)	1:10.000
anti-cip1/WAF1 (BD Biosciences Pharmingen)	1:1.000	ECL TM anti-mouse (GE Healthcare UK Limited)	1:10.000
anti-HA (Klon 3F10, Roche)	1:2.000	goat anti-rat (Santa Cruz Biotechnology)	1:10.000
anti-ITF2B (Klon Ri 3B9)	1:1.000	ECL TM anti-mouse (GE Healthcare UK Limited)	1:10.000
anti-p15 ^{INK4B} (Cell Signaling Technology)	1:1.000	ECL TM anti-rabbit (GE Healthcare UK Limited)	1:10.000
anti-p16 ^{INK4A} (Cell Signaling Technology)	1:1.000	ECL TM anti-rabbit (GE Healthcare UK Limited)	1:10.000
anti-p21 ^{cip1} (Cell Signaling Technology)	1:1.000	ECL TM anti-rabbit (GE Healthcare UK Limited)	1:10.000
anti-p27 ^{Kip1} (Cell Signaling Technology)	1:1.000	ECL TM anti-rabbit (GE Healthcare UK Limited)	1:10.000

Tabelle 7: Antikörper für die Immundetektion

Der monoklonale Antikörper anti-ITF2B (Klon Ri 3B9) wurde von Dr. Andreas Herbst (Medizinische Klinik und Poliklinik II, Klinikum der LMU München Großhadern) zur Verfügung gestellt und wie von ihm beschrieben hergestellt¹³².

2.2.3 Stabile Transfektion von DLD1-Zellen

Um die Transkription von Zielgenen regulieren zu können gibt es sogenannte „Tet on-“¹³³ sowie „Tet off-“¹³⁴ Systeme. Bei den „Tet on-“ Systemen führt die Behandlung von Zellen mit Tetrazyklinen, wie z.B. Doxyzyklin, zur Aktivierung der Transkription von Zielgenen; bei den „Tet off-“ Systemen führt die Behandlung mit Tetrazyklinen, wie z.B. Doxyzyklin, zur Deaktivierung von Zielgenen.

DLD1-Zellen wurden mit dem Konstrukt pRTS/ITF-2B stabil transfiziert. Das Konstrukt pRTS/ITF-2B wurde hergestellt, indem die mit dem HA-Epitop markierte ITF-2B cDNA in den Expressionsvektor pRTS¹³⁵ kloniert wurde. Die auf diese Weise generierten DLD1 ITF-2B-Zellen exprimieren nach Behandlung mit Doxyzyklin ITF-2B. Als Kontrolle wurden DLD1-Zellen mit dem Leervektor pRTS, der nicht die Sequenz für die Expression von ITF-2B trägt, stabil transfiziert.

Der Expressionsvektor pRTS enthält die Sequenz für den Aktivator des Tetrazyklin-Operators (tetO) rtTA2^S-M2 und für den Repressor des Tetrazyklin-Operators tTS^{KRAB}. In Abwesenheit von Doxyzyklin bindet tTS^{KRAB} an den Tetrazyklin-Operator und verhindert die Transkription und somit die Expression von Zielgenen, in diesem Fall von ITF-2B. In Anwesenheit von Doxyzyklin diffundiert tTS^{KRAB} vom Tetrazyklin-Operator und rtTA2^S-M2 bindet an den Tetrazyklin-Operator und aktiviert die Transkription und somit die Expression von Zielgenen, in diesem Fall von ITF-2B.¹³⁵

5×10⁵ DLD1 Zellen wurden pro 6-well Platte ausgesät. 24 Stunden später wurden die Zellen mit pRTS/ITF-2B oder als Kontrolle mit pRTS transfiziert. Pro 6-well Platte wurden jeweils ein µg Plasmid sowie 2 µl Transfektionsreagenz (Fugene® 6 Transfection Reagent, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) eingesetzt. Für jedes 6-well wurde zunächst das Transfektionsreagenz direkt in 50 µl OPTI-MEM® I pipettiert. Das Gemisch wurde fünf Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend langsam zur Plasmid-DNA getropft. Es schloss sich eine Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur an. Dann wurde das Gemisch tropfenweise auf die Zellen pipettiert und die Zellen wurden dann im Brutschrank bei 37°C inkubiert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen in verschiedenen Dichten auf 10 cm Zellkulturplatten überführt und weitere 24 Stunden später wurden sie mit 300 µg/ml Hygromycin B (PAA, Pasching, Österreich) in Selektion genommen. Die Zellen wurden dann zwei bis dreimal wöchentlich mit PBS gewaschen und erneut mit Selektionsmedium versehen. Sobald gut sichtbare Kolonien gewachsen waren, wurden sie gepickt und angereichert. Der Erfolg der stabilen Transfektion wurde mittels Western Blot analysiert.

2.2.4 Versuche mit Transfektion von siRNA

2.2.4.1 Zum Mechanismus der siRNA-Transfektion

Die Transfektion von Zellen mit siRNA ist eine Methode, um Gene auf posttranskriptioneller mRNA-Ebene herunterzuregulieren und wird in der Literatur als *gene silencing* bezeichnet. Sie geht auf den Mechanismus der RNA Interferenz (RNAi) zurück; Fire et al. zeigten im Jahr 1998, dass durch das Einbringen von dsRNA in den Wurm *Caenorhabditis elegans* zur dsRNA homologe Gene herunterreguliert werden konnten¹³⁶. Es konnte in der Folgezeit gezeigt werden, dass die Degradierung der dsRNA zu doppelsträngigen siRNAs (small interfering RNAs) von 21-23 Nukleotiden Länge führt¹³⁷. Die dsRNA wird von einem Enzym, das Dicer genannt wird, gespalten¹³⁹. Die Arbeiten von Nicholson (1999) und Bernstein et al. (2001) legten den Verdacht nahe, dass es sich bei Dicer um ein Enzym aus der RNAase III-Familie bzw. um ein der RNAase III ähnliches Enzym handelt^{138, 139}. Die Spaltung der dsRNA durch Dicer ist ATP-abhängig¹³⁹⁻¹⁴¹. Die siRNA hat am 3'-Ende eine Hydroxyl und am 5'-Ende eine Phosphatgruppe und außerdem am 3'-Ende sowohl des Sense- als auch des Antisense-Stranges zwei überhängende Nukleotide¹⁴². Die Degradation der Ziel-mRNA erfolgt durch einen Proteinkomplex namens RISC (RNA-induced silencing complex)¹⁴³. Vor der Degradation erfolgt in einem weiteren ATP-abhängigen Schritt die Trennung der doppelsträngigen siRNA zu Einzelsträngen¹⁴¹. Martinez et al. konnten 2002 zeigen, das RISC mit dem Antisense-Strang assoziiert ist und dadurch aktiviert wird¹⁴⁴. Die Ziel-mRNA wird 11-12 Nukleotide downstream vom ersten Nukleotid, das komplementär zur siRNA-Sequenz ist, gespalten¹⁴². Die folgende Abbildung zeigt den Mechanismus der RNA Interferenz (RNAi).

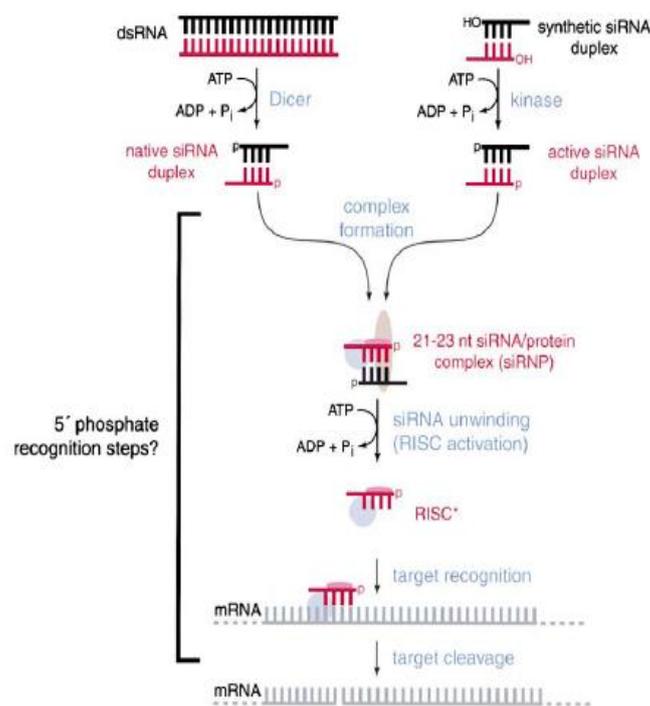


Abbildung 6: Modell der RNA-Interferenz (RNAi); Abbildung: Nykänen, A. et al. (2001)¹⁴¹

2.2.4.2 Einsaat und Behandlung der Zellen

Die Versuche wurden mit DLD1 ITF2B-Zellen durchgeführt. Es wurden je 30.000 Zellen auf 12-well-Platten ausgesät. Acht Stunden später wurde die Hälfte der Zellen mit Doxyzyklin im Verhältnis 1:1.000 behandelt. Nach 16 Stunden erfolgte die siRNA-Transfektion in Antibiotika-freiem DMEM High Glucose mit 0,2% FCS. 24 Stunden nach der Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM High Glucose mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin (100x). 16 Stunden nach dem Mediumwechsel wurden die Zellen für die Zellzyklusanalyse mittels FACS sowie für die Analyse im Western-Blot geerntet.

2.2.4.3 siRNA-Transfektion

Die originalen siRNA stocks (20µM) wurden aliquotiert und bei -40°C eingefroren. Für die Transfektion wurde die siRNA auf Eis aufgetaut.

Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Menge der eingesetzten siRNAs:

siRNA	Firma / Katalog #	Endkonzentration im 12-well
β-Gal	Dharmacon, Lafayette, CO, U.S.A. / HERAF-000001	25 nM
CDKN1A	Dharmacon, Lafayette, CO, U.S.A. / D-003471-02	25 nM

Tabelle 8: siRNAs

Es wurden sowohl mit Doxyzyklin behandelte als auch unbehandelte Zellen mit siRNA gegen CDKN1A und als Kontrolle mit siRNA gegen β-Galaktosidase transfiziert und analysiert.

Die siRNA wurde unter der Sterilbank mit 100 µl Optimem in einem Reaktionsgefäß gemischt, gut geschüttelt und für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Gleichzeitig wurde Lipofectamin in gleicher Menge wie die eingesetzte siRNA mit 100 µl Optimem gemischt, gut geschüttelt und ebenfalls für fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde das Lipofectamin-Optimem-Gemisch zu dem siRNA-Optimem-Gemisch pipettiert, gut geschüttelt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Während dieser Inkubationszeit wurden die Zellen auf der 12-well-Platte zweimal mit Antibiotika-freiem DMEM High Glucose gewaschen und dann wurden 1,0 ml des Antibiotika-freien Mediums auf jedes 12-well pipettiert. Nach der Inkubationszeit wurden jeweils 200 µl des siRNA-Lipofectamin-Optimem-Gemisches auf die einzelnen 12-wells pipettiert und mit dem Medium gemischt.

2.2.5 Durchflusszytometrische Zellzyklusanalysen

2.2.5.1 Durchflusszytometrie

Bei dieser Methode fließen die Zellen im Durchflusszytometer durch eine Messkammer, der sogenannten Flusszelle, in der sie seitlich von einem Laser bestrahlt werden. Dabei entsteht Streulicht, das proportional zur Größe und zur Granularität der Zellen ist, und von einem Detektor gemessen wird. Die Größe der Zellen wird im sogenannten Forward Scatter (FSC) erfasst, in dem das Streulicht in Richtung des ursprünglichen Laserstrahls gemessen wird. Je größer die Zellen sind, desto größer ist das Streulicht im Forward Scatter. Die Granularität der Zellen wird im sogenannten Side Scatter (SSC) erfasst, in dem das Streulicht im 90° Winkel zum Forward Scatter gemessen wird. Je größer die Granularität der Zellen ist, desto größer ist das Streulicht im Side Scatter. Der Forward Scatter wird in einem als Dot-Plot bezeichneten Diagramm gegen den Side Scatter aufgetragen.

2.2.5.2 Färbung der Zellen mit Propidiumiodid (PI)

Propidiumiodid (PI) ist ein in die DNA der Zellen interkalierender Fluoreszenzfarbstoff. Ist PI an DNA gebunden, so befindet sich das Exstinktionsmaximum bei 535 nm und das Emissionsmaximum bei 617 nm. PI kann dann durch eine Xenon-, Quecksilberdampf Lampe oder durch einen Argon-Ionen-Laser angeregt und im FL2-Kanal des Durchflusszytometers detektiert werden. PI ist Membran-impermeabel und dient normalerweise zur Unterscheidung lebender und toter Zellen; denn PI kann nur die Membran apoptotischer oder nekrotischer Zellen passieren, jedoch nicht die vitaler Zellen. Um den DNA-Gehalt der Zellen und somit die Verteilung im Zellzyklus mittels PI bestimmen zu können, werden die Membranen der zu analysierenden Zellen vor der Messung im Durchflusszytometer mit Hilfe von Nicoletti-Puffer, dem PI zugegeben wurde, permeabel gemacht.

2.2.5.3 Zellzyklusanalyse

Die Zellzyklusanalyse erfolgte im Durchflusszytometer FACSCalibur™ von BD (Heidelberg, Deutschland). FACS steht dabei für Fluorescence Activated Cell Sorting. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software CellQuest Pro 3.3.

In einem Dot-Plot, indem der Forward Scatter gegen den Side Scatter aufgetragen wird, wurden Zellen gleicher Größe und Granularität erfasst bzw. „gated“. Von diesen Zellen, die im Dot-Plot „gated“ wurden, wurden in den Messungen jeweils 10.000 Ereignisse im FL2-Detektor analysiert.

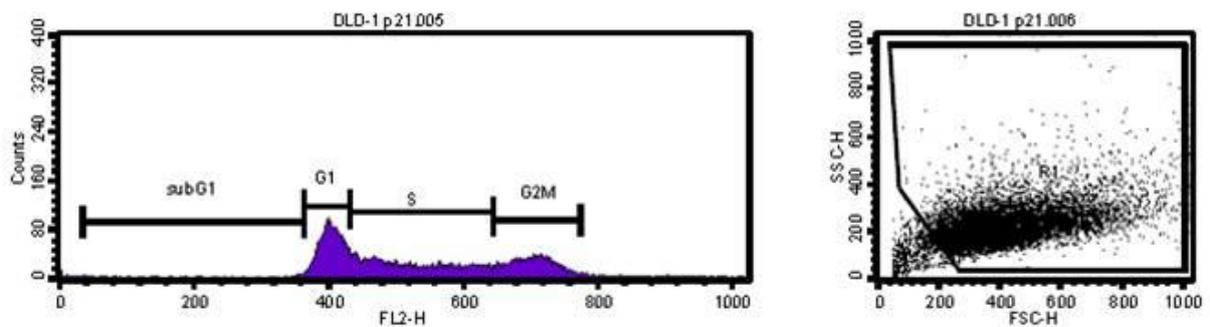


Abbildung 7: Zellzyklusanalyse im FACS

Das rechte Bild zeigt ein Beispiel eines „Dot-Plots“, in dem Zellen gleicher Größe und Granularität erfasst werden. Das linke Bild zeigt ein Histogramm mit eingezeichneten Zellzyklusphasen im FL2-Kanal. In der subG1-Phase werden Zellen mit fragmentierter DNA erfasst. Die subG1-Phase ist somit ein Maß für apoptotische Zellen.

2.2.5.4 Synchronisation von DLD1 ITF2B-Zellen und anschließende FACS-Analyse der Zellen

Durch die Synchronisation von DLD1 ITF2B-Zellen in den Zellzyklusphasen und eine anschließende FACS-Analyse dieser Zellen sollte der Einfluss von IFT-2B auf die Zellzyklusverteilung untersucht werden.

Die Versuche erstreckten sich über einen Zeitraum von drei Tagen. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Um 9 Uhr des ersten Tages wurden 5×10^5 DLD1 ITF2B-Zellen pro Zellkulturschale (10 cm) in DMEM High Glucose mit 0,2% FCS ausgesät. Um 17 Uhr des gleichen Tages wurde die Hälfte der Zellen mit Doxyzyklin (finale Doxyzyklin-Konzentration pro Zellkulturschale 50 $\mu\text{g/ml}$) behandelt. Um 17 Uhr des zweiten Tages erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM High Glucose mit 10% FCS, wobei die entsprechenden Zellen erneut mit Doxyzyklin stimuliert wurden. Weitere 16 Stunden später – um 9 Uhr des dritten Tages – wurden die Zellen geerntet. Ein Teil der geernteten Zellen wurde direkt in 250 μl Nicoletti-Puffer mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Propidiumiodid aufgenommen, aus dem anderen Teil wurden Zellysate für die Analyse im Western-Blot hergestellt. Die mit Nicoletti-Puffer und Propidiumiodid behandelten Zellen wurden vor der FACS-Messung 30 Minuten lang unter Lichtabschluss inkubiert.

In der folgenden Abbildung wird der Ablauf der Versuche anschaulich dargestellt werden.

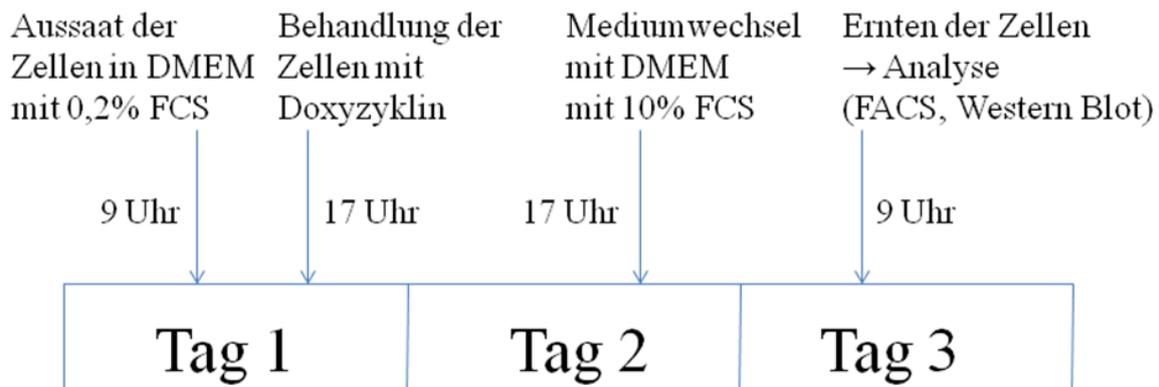


Abbildung 8: Protokoll für die Versuche mit DLD1 ITF2B-Zellen

2.2.5.5 Synchronisation von DLD1 Cip1-Zellen und anschließende FACS-Analyse der Zellen

Um den Einfluss von p21^{Cip1} auf die Zellzyklusverteilung von DLD1-Zellen zu untersuchen, wurden DLD1 Cip1-Zellen durch Serumentzug in den Zellzyklusphasen synchronisiert und der Einfluss von p21^{Cip1} auf die Zellzyklusverteilung durch FACS-Analyse erfasst.

Die einzelnen Versuche erstreckten sich über einen Zeitraum von fünf Tagen. Die Versuche wurden insgesamt dreimal durchgeführt, wobei zwei von diesen drei Versuchen als Doppelbestimmungen durchgeführt wurden. Um 9 Uhr des ersten Tages wurden 5×10^5 DLD1 Cip1-Zellen pro Zellkulturschale (10 cm) in DMEM High Glucose mit 10% FCS ausgesät. Die Hälfte der Zellen wurde mit Tetrazyklin im Verhältnis 1:2.000 behandelt. Die mit Tetrazyklin behandelten Zellen exprimieren kein p21^{Cip1}; die Zellen, denen kein Tetrazyklin zugegeben wurde, exprimieren p21^{Cip1}. Bei den zwei folgenden Mediumwechselln wurden die Zellen in gleicher Weise mit Tetrazyklin behandelt. Um 9 Uhr des dritten Tages erfolgte ein Mediumwechsel mit DMEM High Glucose mit 0,2% FCS. Dadurch wurden die Zellen in der G1-Phase angehäuft. Um 17 Uhr des vierten Tages -die Zellen waren 32 Stunden lang in 0,2%igem FCS- erfolgte ein zweiter Mediumwechsel mit DMEM High Glucose mit 10% FCS. Um 9 Uhr des fünften Tages wurden die Zellen geerntet. Ein Teil wurde direkt in 250 µl Nicoletti-Puffer mit 50 µg/ml Propidiumiodid aufgenommen, ein zweiter Teil wurde für die Immunfärbung der Zellen mittels HA- und FITC-Antikörper verwendet, aus dem dritten Teil wurden Zelllysate für die Analyse im Western-Blot hergestellt. Die mit Nicoletti-Puffer und Propidiumiodid behandelten Zellen wurden vor der FACS-Messung 30 Minuten lang unter Lichtabschluss inkubiert.

In der folgenden Abbildung soll der Ablauf der Versuche anschaulich dargestellt werden.

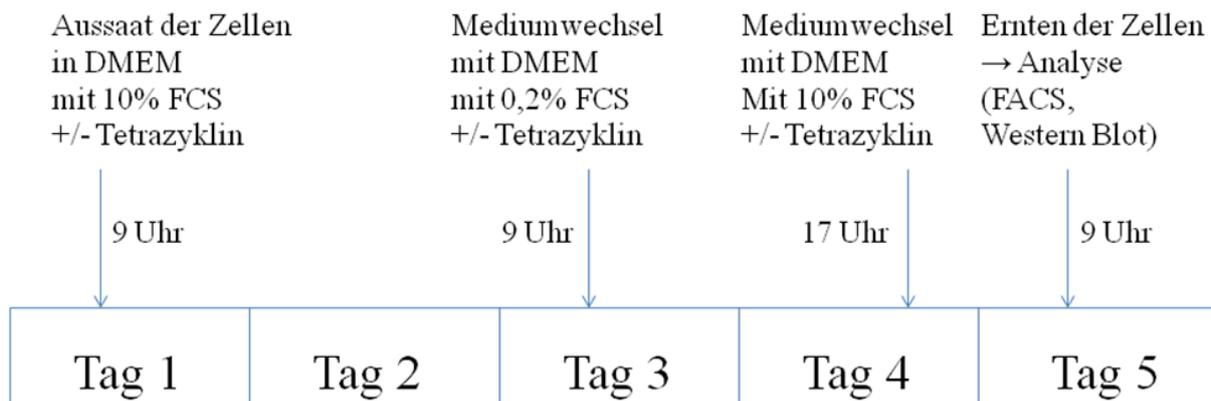


Abbildung 9: Protokoll für die Versuche mit DLD1 cip1-Zellen

2.2.5.6 Immunfärbung von DLD1 Cip1-Zellen

2.2.5.6.1 Fixierung der Zellen

Zunächst wurden die Platten unter der Sterilbank zweimal mit PBS (1x) gewaschen. Dann wurden die Zellen drei Minuten lang bei 37°C im Brutschrank mit 1,5 ml Trypsin behandelt. Die mit Trypsin von der Platte gelösten Zellen wurden dann in ein 15 ml Falconröhrchen, in das 8,5 ml DMEM High Glucose mit 10% FCS vorgelegt wurden, überführt und für 4 Minuten zentrifugiert (1300 U/m, 4°C). Die Zellen wurden nun in 5 ml PBS (1x) von 4°C resuspendiert. Es folgte eine zweite Zentrifugation von 4 Minuten (1300 U/m, 4°C). Das Zellpellet wurde nun in 1 ml PBS (1x) von 4°C resuspendiert. Im nächsten Schritt wurden 3 ml Ethanol (100%) von -20°C Tropfen für Tropfen hinzugefügt und das Falconröhrchen gleichzeitig vorsichtig „gevortext“. Die Proben wurden anschließend für eine Stunde bis zu mehreren Tagen bei -20°C aufbewahrt.

2.2.5.6.2 Immunfärbung der Zellen

Die mit Ethanol fixierten Zellen wurden aus dem Gefrierfach von -20°C entnommen und zunächst rehydriert, indem vorsichtig 2 ml PBS (1x) mit 1% BSA in das Falconröhrchen hinzugefügt und gleichzeitig „gevortext“ wurde. Es schloss sich eine Zentrifugation von 5 Minuten an (1300 U/m, 4°C). Das Zellpellet wurde in 1 ml PBS mit 1% BSA resuspendiert und erneut für 5 Minuten zentrifugiert (1300 U/m, 4°C). Dann wurden die Zellen permeabilisiert, indem das Zellpellet in 1 ml PBS (1x) von 4°C mit 1% BSA und 0,25% Triton X-100 resuspendiert und für 7 Minuten auf Eis inkubiert wurde. Dann wurden 3 ml PBS (1x) von 4°C mit 1% BSA hinzugefügt. Wiederum wurde für 5 Minuten zentrifugiert (1300 U/m, 4°C). Das Zellpellet wurde in 50 µl PBS (1x) mit 1% BSA und 0,5 µg anti-HA-Antikörper (Klon 3F10, Roche) resuspendiert und für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1 ml PBS (1x) mit 1% BSA hinzugefügt und für 5 Minuten zentrifugiert (1300 U/m, 4°C). Das Zellpellet wurde nun in 50 µl PBS (1x) mit 1% BSA und 3 µl anti-rat-FITC (Fluoreszein-Isothiocyanat)-konjugiertem Antikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, U.S.A.) aufgenommen und für eine Stunde unter Lichtabschluss inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1 ml PBS (1x) hinzugefügt und für 5 Minuten zentrifugiert (1300 U/m, 4°C). Das Zellpellet wurde nun in 200 µl Nicoletti-Puffer mit 50 µg/ml Propidiumiodid resuspendiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur vor der FACS-Analyse inkubiert. Im FACS wurden die FITC-positiven Zellen im FL1-H-Kanal gemessen und für die Zellzyklusanalyse „gated“. Es wurden auch hier jeweils 10.000 Ereignisse erfasst.

2.2.6 Reportergen-Assays

2.2.6.1 Messung der Luziferase-Aktivität

Mit Hilfe von Reportergen-Assays kann die Aktivität bestimmter Promotoren quantifiziert werden. Als Reporter diente in dieser Arbeit das Gen für die Luziferase des Glühwürmchens (Firefly) *Photinus pyralis* und war den zu untersuchenden Promotoren nachgeschaltet. Die Firefly-Luziferase katalysiert in Anwesenheit von Mg^{2+} und O_2 die ATP-abhängige oxidative Decarboxylierung von Luziferin zu Oxyluziferin. Dabei entstehen CO_2 und AMP und es wird Licht emittiert. Diese Lichtemission klingt normalerweise schnell ab. Um dies zu verhindern, ist in dem für diese Arbeit verwendeten Luciferase Assay System (Promega, Madison, WI, U.S.A.) Coenzym A im Reaktionsansatz vorhanden; Coenzym A verstärkt die Lichtemission und führt dazu, dass das Lichtsignal über mindestens eine Minute konstant bleibt. Die Lichtemission wurde im Luminometer TD-20/20 (Turner Designs, Sunnyvale, CA, U.S.A. gemessen.

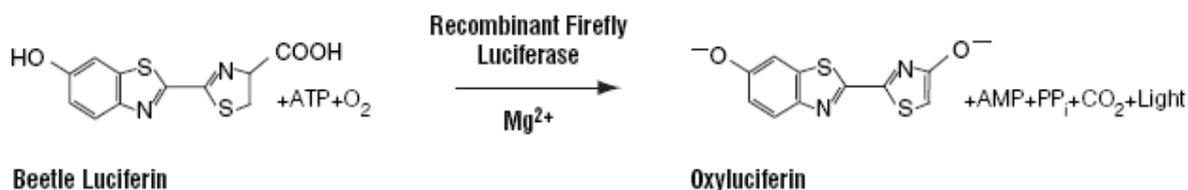


Abbildung 10: Oxidative Decarboxylierung von Luziferin; Abbildung: Sherf, B.A. et al. (1996)¹⁴⁵

Als Plasmid mit dem Gen für die Firefly Luziferase diente pGL3 basic von Promega (Madison, WI, U.S.A.). Die in dieser Arbeit verwendeten Reportergen-Konstrukte wurden generiert, indem bestimmte Promotorfragmente des CDKN1A-Gens, die gut charakterisierte E-Boxen und Bindestellen für p53 enthalten, per PCR amplifiziert und anschließend in das Plasmid pGL3 basic (Promega, Mannheim, Deutschland) oder in das zuvor hergestellte Konstrukt pGL3 basic CDKN1A K kloniert wurden.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die verwendeten Reporter-Gen-Konstrukte:

Bezeichnung des Konstrukts	Position des Promotorfragments bezogen auf die Startposition des ersten Exons des CDKN1A-Gens	Restriktionsenzym	kloniert in
pGL3 basic CDKN1A K	nt -268 – nt +100	HindIII	pGL3 basic
pGL3 basic CDKN1A L	nt -2523 – nt +100	HindIII	pGL3 basic
pGL3 basic CDKN1A M	nt -268 – nt +897	HindIII	pGL3 basic
pGL3 basic CDKN1A K/FL	nt +2819 – nt +5376	SalI	pGL3 basic CDKN1A K
pGL3 basic CDKN1A K/A	nt +2819 – nt +4686	SalI	pGL3 basic CDKN1A K
pGL3 basic CDKN1A K/B	nt +3748 – nt +5376	SalI	pGL3 basic CDKN1A K
pGL3 basic CDKN1A K/C	nt +2819 – nt +3748	SalI	pGL3 basic CDKN1A K
pGL3 basic CDKN1A K/D	nt +3748 – nt +4686	SalI	pGL3 basic CDKN1A K
pGL3 basic CDKN1A K/E	nt +4667 – nt +5376	SalI	pGL3 basic CDKN1A K
pGL3 basic CDKN1A K/DA	nt +3748 – nt +4361	SalI	pGL3 basic CDKN1A K
pGL3 basic CDKN1A K/DB	nt +4055 – nt +4686	SalI	pGL3 basic CDKN1A K
pGL3 basic CDKN1A K/DC	nt +3748 – nt +4073	SalI	pGL3 basic CDKN1A K
pGL3 basic CDKN1A K/DD	nt +4055 – nt +4361	SalI	pGL3 basic CDKN1A K
pGL3 basic CDKN1A K/DE	nt +4374 – nt +4686	SalI	pGL3 basic CDKN1A K

Tabelle 9: Reporter-Gen-Konstrukte

2.2.6.2 Messung der β -Galaktosidase-Aktivität

Um die Transfektionseffizienz bestimmen zu können, wurde in den Reporteragen-Assays das Plasmid pCH110 (Amersham Biosciences, München, Deutschland) kotransfiziert. Dieses Plasmid enthält das Gen für eine β -Galaktosidase, die konstitutiv exprimiert wird. Die β -Galaktosidase ist eine Glykosidase, die die hydrolytische Spaltung von β -galaktosidischen Bindungen katalysiert. Um die Aktivität der β -Galaktosidase bestimmen zu können, wurde ein 2x β -Galaktosidase-Puffer mit o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid (ONPG) als chromogenes Substrat verwendet. Die β -Galaktosidase hydrolysiert ONPG zu Galaktose und dem gelben Farbstoff o-Nitrophenol. Im Platten-Photometer (SLT Microplate Reader) wurde dann bei 405 nm die optische Dichte der Proben bestimmt.

2.2.6.3 Aktivator

Als konstitutiv exprimierter Aktivator diente für die Versuche dieser Arbeit das Konstrukt pcDNA3 ITF-2B HA. Dabei wurde zunächst das Hemagglutinin (HA) – Epitop an die Restriktionsstellen NheI und XhoI des Plasmids pcDNA3 von Invitrogen (Carlsbad, CA, U.S.A.) kloniert. Das per PCR amplifizierte ITF-2B wurde anschließend an die Restriktionsstellen BamHI und NheI des zuvor generierten – und das Epitop HA enthaltenden – pcDNA3-Konstruktes kloniert.

2.2.6.4 Experimentelle Durchführung der Reporteragen-Assays

Die Reporteragen-Assays wurden über einen Zeitraum von vier Tagen durchgeführt. Am ersten Tag wurden auf einer 24 well-Platte je 80.000 Zellen/well oder auf einer 12 well-Platte 150.000 Zellen/well eingesät. Am zweiten Tag erfolgte die Transfektion der Zellen mit den Plasmiden (Reporteragen, Aktivator, pCH110). Pro well wurden von jedem Plasmid (Reporteragen-Konstrukt, Aktivator, pCH110) 200 ng transfiziert - also insgesamt 600 ng Plasmid-DNA pro well - und 3,2 μ l Nanofectin I/ μ g Plasmid-DNA mit jeweils 100 μ l einer 150 mM NaCl Verdünnungslösung (Diluent, PAA, Pasching, Österreich). Dazu wurde zunächst für jedes einzelne well unter der Sterilbank Nanofectin I in 50 μ l Diluent aufgenommen und vorsichtig gemischt. Parallel dazu wurde die Plasmid-DNA für jedes well ebenfalls in 50 μ l Diluent aufgenommen. Das Nanofectin I-Diluent-Gemisch wurde dann zum Plasmid-DNA-Diluent-Gemisch dazugegeben, gemischt und für 15-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 100 μ l dieses Gemisches pro well pipettiert. Am vierten Tag – 48 Stunden nach der Transfektion – erfolgten die Luziferase- und die β -Galaktosidase-Messungen. Dazu wurden die Platten zunächst mit 1 ml PBS (1x) gewaschen und 100 μ l Reporter-Lyse-Puffer (1x) von Promega (Madison, WI, U.S.A.) auf jedes well pipettiert. Die Zellen wurden nun für fünf Minuten auf Eis inkubiert und dann für eine Stunde bei -80°C eingefroren. Nach einer Stunde wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit einem Zellschaber abgekratzt, in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 5 Minuten zentrifugiert (14.000 x g, 4°C). Dann wurde jeweils 20 μ l jeder Probe mit 20 μ l Luziferin-Lösung (Luciferase Assay System von Promega, Madison, WI, U.S.A.) gemischt und im Luminometer TD-20/20 von Turner Designs (Sunnyvale, CA, U.S.A.) die Luziferase-Aktivität gemessen. Zur Bestimmung der β -Galaktosidase-Aktivität wurden 40 μ l jeder Probe auf eine 96 well Platte überführt, mit jeweils 40 μ l des 2x β -Galaktosidase-Puffers gemischt

und solange bei Raumtemperatur inkubiert, bis die Proben kräftig gelb gefärbt waren. Die Platten wurden dann im Plattenphotometer bei 405 nm gemessen.

Der Wert der Luziferase-Aktivität jeder Probe wurde auf die jeweilige β -Galaktosidase-Aktivität bezogen, indem der Wert der Luziferase-Aktivität durch den entsprechenden Wert der β -Galaktosidase-Aktivität dividiert wurde.

Die Zellen wurden in einem parallelen Ansatz mit dem Kontroll-Plasmid pcDNA3 – anstatt des Aktivators pcDNA3 ITF-2B HA – transfiziert. Die Werte der auf die β -Galaktosidase-Aktivität bezogenen Luziferase-Aktivität der Proben mit transfiziertem Aktivator (pcDNA3 ITF-2B HA) wurden durch die entsprechenden Werte der Proben mit transfiziertem Kontroll-Plasmid (pcDNA3) geteilt, um so ein Maß für die Aktivität des entsprechenden Promotors zu erhalten (-fache Aktivierung, *fold induction*).

2.2.7 Funktions-Assays

2.2.7.1 Colony Forming Assays

Für die Colony Forming Assays wurden je Zelllinie (DLD1, HCT116, SW480, SW620, LoVo) $3\text{-}5 \times 10^5$ Zellen pro 6-well Platte ausgesät. 24 Stunden später wurden die Zellen mit pcDNA3 ITF-2B oder als Kontrolle mit pcDNA3 transfiziert. Pro 6-well Platte wurden jeweils ein μg Plasmid sowie 2 μl Transfektionsreagenz (Fugene® 6 Transfection Reagent, Roche) eingesetzt. Für jedes 6-well wurde zunächst das Transfektionsreagenz direkt in 50 μl OPTI-MEM® I pipettiert. Das Gemisch wurde fünf Minuten lang bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend langsam zur Plasmid-DNA getropft. Es schloss sich eine Inkubation von 15 Minuten bei Raumtemperatur an. Dann wurde das Gemisch tropfenweise auf die Zellen pipettiert und die Zellen wurden dann im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Nach 24 Stunden folgte ein Mediumwechsel und nach weiteren 24 Stunden die Aussaat der Zellen auf 10 cm Petrischalen. Dazu wurde das Medium von den 6-well Platten entfernt, die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin von der Platte gelöst. Die Zellen wurden in einer Neubauerzählkammer gezählt. Es wurden pro Plasmid je 5×10^5 Zellen in 10 cm Petrischalen ausgesät und mit 1 mg/ml Geneticin (PAA) in Selektion genommen.

Nach vier Wochen – pro Woche wurde zweimal das Medium auf den Platten gewechselt – folgte die Färbung der gebildeten Kolonien. Dazu wurde das Medium von den Platten abgesaugt, die Zellen mit PBS gewaschen und dann 30 Minuten mit Methylenblau (Sigma, Steinheim, Deutschland)-Lösung gefärbt. Für die Methylenblau-Lösung wurde 0,06 g Methylenblau in 96 ml PBS und 6 ml Glutaraldehyde 25% aufgenommen. Nach der 30-minütigen Färbepériode wurden die Platten mehrmals mit PBS und abschließend mit Aqua dest. gewaschen. Die Zellen/Kolonien wurden trocknen gelassen. Die Platten konnten dann fotografiert und die Kolonien gezählt werden.

2.2.7.2 Soft Agar Assays

In Soft Agar Assays wurde die Eigenschaft von DLD1 ITF2B Zellen untersucht, Kolonien ohne Kontakt zu einem festen Untergrund zu bilden. Die Methode wurde von Hamburger und Salmon¹⁴⁶ im Jahre 1977 zuerst beschrieben.

Zunächst wurde ein 1,2%iger Agar hergestellt, indem 0,6 g Agar (DifcoTM Agar Noble, BD, Heidelberg, Deutschland) in 50 ml Aqua bidest. gelöst wurden und die Lösung anschließend autoklaviert wurde.

Eine 2× DMEM-Lösung wurde folgender Maßen angesetzt: 6,69 g DMEM Trockenlösung (Invitrogen) wurden in 92,5 ml Aqua bidest. gelöst und mit 50 ml NaHCO₃ gemischt. Das Gemisch wurde auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt und mit 5 ml Penicillin/Streptomycin versetzt. 37,5 ml dieses Gemisches wurden dann mit 25 ml FBS gemischt, so dass sich nun ein zweifach konzentriertes Medium = „Working DMEM“ ergab, das unmittelbar vor den Versuchen auf 37°C im Brutschrank erwärmt wurde.

Die Versuche wurden auf 12-well Platten durchgeführt. Die Platten wurden zuerst mit einem 0,6%igen Agar (Underlayer) beschichtet: dazu wurde der 1,2%ige Agar in einer Mikrowelle vorsichtig aufgeköcht und im 45°C warmen Wasserbad abkühlen gelassen. Unter der Sterilbank wurde dann der 1,2%ige Agar im Verhältnis 1:1 mit dem „Working DMEM“ (2×) gemischt und 1 ml dieses Gemisches auf jedes 12-well möglichst ohne Luftblasen pipettiert. Der 0,6%ige Underlayer härtete dann über 5-10 Minuten unter der Sterilbank aus.

Anschließend wurde der Underlayer mit einem 0,3%igen Agar (Overlayer), indem die Zellen enthalten waren, überschichtet: Für jedes 12-well wurden 100 µl Zellsuspension, in der 10.000 Zellen enthalten waren, mit 500 µl „Working DMEM“ (2×), 150 µl Aqua bidest. und 250 µl 1,2%igem Agar gemischt und auf ein 12-well wieder möglichst ohne Luftblasen pipettiert. Die Hälfte der DLD1 ITF2B-Zellen wurde mit Doxyzyklin behandelt, indem dem Overlayer 10 µl Doxyzyklin zugesetzt wurde, die andere Hälfte blieb als Kontrolle unbehandelt. Der Overlayer härtete über 15-30 Minuten unter der Sterilbank aus.

Die Zellen wurden für vier Wochen im Brutschrank bei 37°C inkubiert, wobei alle zwei Tage je 10 µl Doxyzyklin auf die mit Doxyzyklin behandelten und je 10 µl Medium auf die unbehandelten Zellen pipettiert wurden.

Nach vier Wochen erfolgte die Färbung der Kolonien. Das überschüssige Medium wurde äußerst vorsichtig abgesaugt, um den Softagar nicht mit zu erfassen. Dann wurden die 12-wells mit jeweils 1 ml Methylenblau (Sigma, Steinheim, Deutschland) - Lösung (0,06 g Methylenblau in 96 ml PBS + 6 ml Glutaraldehyde 25%) bei 4°C über Nacht gefärbt.

Am nächsten Tag wurden die Platten sehr vorsichtig mit PBS gewaschen, fotografiert und die Kolonien gezählt.

2.2.7.3 MTT-Assay

Zur Messung der Zellvitalität wurde eine von Mosmann¹⁴⁷ im Jahre 1983 beschriebene Methode verwendet. Dabei wird das gelbe, wasserlösliche Substrat MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazanprodukt umgewandelt, dessen Konzentration im Elisa-Lesegerät photometrisch bestimmt werden kann. Die Reduktion von MTT zu Formazan erfolgt hauptsächlich durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums NADH-abhängig – gering auch NADPH-abhängig – und entgegen früherer Annahmen nur zu einem geringen Anteil durch mitochondriale Succinat-Dehydrogenasen¹⁴⁸.

Für die Versuche wurden je 4.000 DLD1 ITF2B-Zellen sowie Kontrollzellen (DLD1-Leervektor-Zellen) in 96-well Platten ausgesät und 96 Stunden lang mit 1 µg/ml Doxyzyklin behandelt oder als Kontrolle unbehandelt gelassen. Nach vier Tagen wurde das Medium abgesaugt und 225 µl frisches Medium mit 25 µl MTT-Stammlösung (5mg MTT pro ml PBS) auf jedes 96-well pipettiert. Die Zellen wurden für zwei Stunden bei 37°C im Brutschrank inkubiert, das Medium anschließend entfernt und 100 µl Isopropanol/HCl (0,04 N) zum Lösen der Kristalle zugegeben. Die Proben wurden für fünf Minuten bei 37°C inkubiert und dann im Elisa-Lesegerät bei 492 nm gemessen.

2.2.8 Molekularbiologische Methoden

2.2.8.1 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine Methode, mit der DNA amplifiziert werden kann. Als Vorlage (template) dient doppelsträngige DNA. Dabei wird der zu amplifizierende DNA-Abschnitt von zwei zu den Einzelsträngen komplementären, entgegengerichteten Oligonukleotidprimern (Forward = FW Primer; Reverse = RV Primer) flankiert. Eine hitzestabile DNA-Polymerase setzt an den Primern an und synthetisiert den Komplementärstrang mit Desoxyribonukleosid-5'-triphosphaten.

Ein üblicher PCR-Ansatz enthält in einem Volumen von 20 µl:

10× Pfu Puffer mit MgSO ₄	2,0 µl
Pfu-Polymerase (2,5 U/µl)	0,5 µl
template-DNA (5 ng/µl)	1,0 µl
FW Primer (125 ng/µl)	0,2 µl
RV Primer (125 ng/µl)	0,2 µl
dNTPs (2mM)	0,5 µl
Aqua bidest.	ad 20,0 µl

Tabelle 10: PCR-Ansatz

Die PCR-Reaktionen wurden gemäß folgendem Programm durchgeführt:

- | | | | |
|----|------------------------|--------------------------|---------------|
| 1. | Initiale Denaturierung | 95°C | 3 Minuten |
| 2. | Denaturierung | 95°C | 30 Sek. |
| 3. | Annealing | T _p (50-65°C) | 30 Sek. |
| 4. | Elongation | 72°C | 1 Minute / kb |
| 5. | terminale Elongation | 72°C | 10 Minuten |

Die Schritte 2.-4. wurden in der Regel 20-40mal durchlaufen. Die Annealing-Temperatur (T_p) wurde unter Berücksichtigung der im jeweiligen Reaktionsansatz verwendeten Primer errechnet. Die Elongationszeit wurde entsprechend der Länge des zu erwartenden PCR-Produktes gewählt, wobei für die Pfu-Polymerase eine Elongationszeit von 1000 bp pro Minute angesetzt wurde.

Zur Generierung der Reporter-gen-Konstrukte wurden folgende Primer verwendet:

Reporter-gen-Konstrukt pGL3 basic CDKN1A	Primer-Sequenz 5'-3'
K	FW: CCACAAGCTTCTCACTTCGTGGGGAAATGT RV: GAACAAGCTTCGCTCTCTCACCTCCTCTGA
L	FW: CCACAAGCTTCATTGTTCCAGCACTTCCT RV: GAACAAGCTTCGCTCTCTCACCTCCTCTGA
M	FW: CCACAAGCTTCTCACTTCGTGGGGAAATGT RV: GAACAAGCTTGCTTCCTTGGGAACAACTG
K/FL	FW: CCACGTCGACTTTCAGCCTCCCAAGTAACC RV: GAACGTCGACATACAAGGAAGGCCCTGGTC
K/A	FW: CCACGTCGACTTTCAGCCTCCCAAGTAACC RV: GAACGTCGACCAGCAAGGCAGACAGAACAG
K/B	FW: CCACGTCGACCTTCCATCTCCTGCCCTTTA RV: GAACGTCGACATACAAGGAAGGCCCTGGTC
K/C	FW: CCACGTCGACTTTCAGCCTCCCAAGTAACC RV: GAACGTCGACTTAAAGGGCAGGAGATGGAA
K/D	FW: CCACGTCGACCTTCCATCTCCTGCCCTTTA RV: GAACGTCGACCAGCAAGGCAGACAGAACAG
K/E	FW: CCACGTCGACCTGTTCTGTCTGCCCTTGCTG RV: GAACGTCGACATACAAGGAAGGCCCTGGTC
K/DA	FW: CCACGTCGACCTTCCATCTCCTGCCCTTTA RV: GAACGTCGACCCTGCCAACTACCTCCTTCA
K/DB	FW: CCACGTCGACCTCTCCGTTTTCCCTCTCCT RV: GAACGTCGACCAGCAAGGCAGACAGAACAG

K/DC	FW: CCACGTCGACCTTCCATCTCCTGCCCTTTA RV: GAACGTCGACGGAGAGGGAAAACGGAGAGT
K/DD	FW: CCACGTCGACCTCTCCGTTTTCCCTCTCCT RV: GAACGTCGACCCTGCCAACTACCTCCTTCA
K/DE	FW: CCACGTCGACGGGGGAGGCTCAGTAAACT RV: GAACGTCGACCAGCAAGGCAGACAGAACAG

Tabelle 11: Primer-Sequenzen für die Generierung von Reporter-Gen-Konstrukten

Zur Erzeugung der E-box Mutanten 9 und 10 wurde das von Ho et al.¹⁴⁹ im Jahre 1989 beschriebene Mutagenese-Verfahren mittels PCR verwendet. Dabei diente das Konstrukt pGL3 basic CDKN1A K/DA als Vorlage (template). Neben den Primern für das PCR-Produkt K/DA (s.o.) wurden dabei in einer ersten PCR zwei sich überlappende Primer eingesetzt, die komplementär zum Abschnitt der DNA um die zu mutierende Stelle waren und die gewünschte Mutation enthielten. Auf diese Weise wurden zwei überlappende PCR-Produkte mit der gewünschten Mutation im Überlappungsbereich erzeugt. Diese zwei PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und aus den Agarosegelen isoliert. In einer zweiten PCR wurde dann das durchgehende und mutierte Konstrukt DA generiert, indem neben den zwei überlappenden PCR-Produkten nur noch die beiden äußeren Primer – nämlich die zwei Primer für das PCR-Produkt K/DA (s.o.) – eingesetzt wurden. Das mutierte Konstrukt konnte dann in den Zielvektor (pGL3 basic CDKN1A K) ligiert werden.

Die Mutationen der E-box Mutanten 11 und 12 wurden ebenfalls nach dem eben beschriebenen Verfahren der PCR-Mutagenese durchgeführt. Da sich diese Mutationen allerdings am 3'-Ende des Konstrukts K/DA befinden, wurde in der PCR neben dem FW-Primer des Konstrukts K/DA lediglich ein RV-Primer mit der gewünschten Mutation eingesetzt.

In der folgenden Tabelle werden die für die Erzeugung der E-box Mutanten eingesetzten Primer, die die gewünschte Mutation enthalten, aufgeführt (bei den E-box Mutanten 11 und 12 enthält nur der RV-Primer die gewünschte Mutation):

Mutante	Primer-Sequenz 5'-3'
E-box 9	FW: CTGCCATATGTCTAGACTTCAGATCACCTGAT RV: TAGACATATGGCAGCCCCTGCCTCGTGTT
E-box 10	FW: CTGCATGGTGTCTAGACTTCAGATCACCATATGTGC RV: GCACATATGGTGATCTGAAGTCTAGACACCATGCAGC
E-box 11	K/DA FW: CCACGTCGACCTTCCATCTCCTGCCCTTTA RV: GAACGTCGACCCTGCCAACTACCTCCTTCA GACAGCAGCTGACATATGCTGTAGGCTGAGGGCCTT
E-box 12	K/DA FW: CACGTCGACCTTCCATCTCCTGCCCTTTA RV: GAACGTCGACCCTGCCAACTACCTCCTTC AGACAGATGCTGACAGCATCTGTAGG

Tabelle 12: Primer-Sequenzen zur Erzeugung der E-Box Mutanten 9-12

2.2.8.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese in 1,5%igen Agarose-Gelen (für Fragmente zwischen 100 bp und 1000 bp) bzw. 1,0%igen Agarose-Gelen (für Fragmente > 1000 bp) in 1×TAE-Laufpuffer. Je 100 ml Agarose-Gel enthielten 5 µl einer 1%igen Ethidiumbromidlösung in H₂O. Die Proben wurden vor dem Auftragen in die Geltaschen mit 1/6 Volumen eines 6× Ladepuffers (Loading Dye Solution, Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) versetzt. Als Längenstandard wurden 10 µl des Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder Plus (Fermentas) eingesetzt. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 120 V über ca. 20 Minuten. Anschließend konnten die Banden auf Grund des interkalierenden Ethidiumbromids im UV-Licht sichtbar gemacht und gegebenenfalls mit einem Skalpell ausgeschnitten werden.

2.2.8.3 DNA-Extraktion aus Agarose-Gelen

Die Isolierung der DNA-Fragmente aus den Agarose-Gelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits von Qiagen gemäß den Herstellerangaben.

2.2.8.4 Restriktionsverdau von DNA

Für die Restriktion von DNA wurden Restriktionsenzyme laut Herstellerangaben (Fermentas) in entsprechenden Puffern mit optimalen chemischen Bedingungen in einem Volumen von 20-50 µl eingesetzt. Pro µg DNA wurden 2-10 Units des Restriktionsenzym eingesetzt. Die Inkubationszeiten sowie -temperaturen richteten sich nach den Herstellerangaben.

2.2.8.5 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der T4 DNA Ligase (Stock: 1U/µl) von Fermentas in einem Endvolumen von 10 µl. Der Reaktionsansatz enthielt 1 µl eines 10× Ligationspuffers von Fermentas sowie 1 Unit der T4 DNA Ligase. Das Verhältnis von Vektor zu Insert wurde auf etwa 1:7 (v/v) eingestellt. Die Reaktion fand bei 4°C über Nacht statt.

2.2.8.6 Transformation von Plasmiden in kompetente Bakterien

DH5α™ kompetente Zellen (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) wurden auf Eis aufgetaut. Zu 2 µl eines Ligationansatzes wurden jeweils 50 µl der Bakteriensuspension pipettiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Bestimmung der Transformationseffizienz wurden in einem parallelen Ansatz 2 µl pUC19 DNA-Lösung (0,01 µg/ml) (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) ebenfalls zu 50 µl der Bakteriensuspension pipettiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 40 Sekunden bei 42°C im Wasserbad. Es folgte eine erneute Inkubation auf Eis für fünf Minuten. Dann wurden die Ansätze mit jeweils 300 µl S.O.C.-Medium (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) versetzt und für eine Stunde bei 37°C im Schüttler inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Ansätze auf

LB-Agar-Platten (LB Agar, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), die mit Ampicillin im Verhältnis von 1:1.000 versetzt wurden, ausplattiert und im Brutschrank bei 37°C über Nacht inkubiert. Über Nacht gewachsene Bakterienklone wurden in jeweils 4 ml LB-Medium (LB Broth Base, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland), das mit Ampicillin im Verhältnis 1:1.000 versetzt wurde, aufgenommen und für 14-17 Stunden bei 37°C im Schüttler (225 Upm) inkubiert.

2.2.8.7 Plasmidpräparation aus DH5 α TM

Die Plasmid-DNA wurde aus den DH5 α TM kompetenten Zellen mit Hilfe des Kits NucleoSpin[®] Plasmid (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Herstellerangaben gewonnen.

2.2.8.8 Sequenzierung von DNA

DNA-Sequenzierungen wurden vom LAFUGA (Laboratory for Functional Genome Analysis) des Genzentrums der LMU München durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Re-Expression von ITF-2B in kolorektalen Zelllinien führt zur Reduktion der Bildung von Kolonien in *Colony Forming Assays*

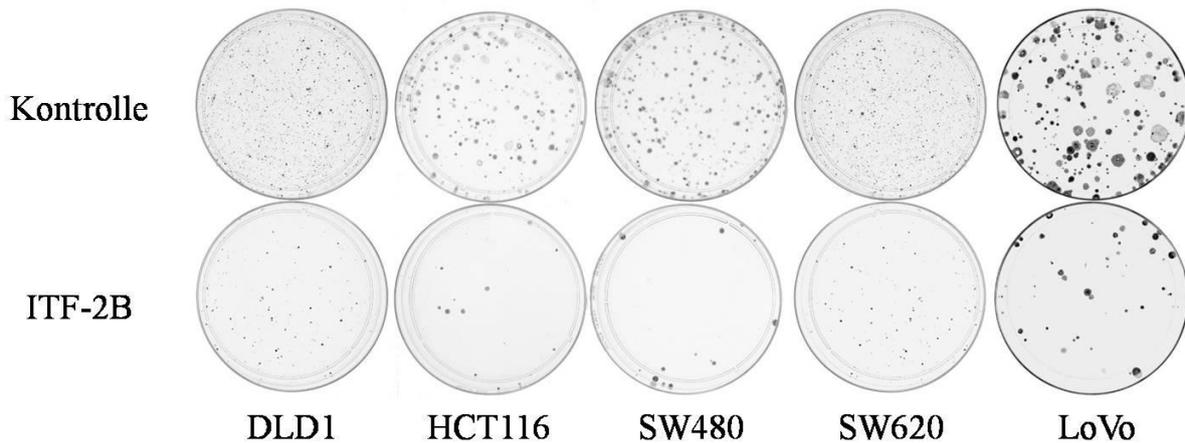
Um die Rolle von ITF-2B in der kolorektalen Karzinogenese näher zu charakterisieren, wurde zunächst der Einfluss von ITF-2B auf die Bildung von Kolonien mittels *Colony Forming Assays* untersucht.

Die Versuche wurden an den fünf kolorektalen Zelllinien DLD1, HCT116, SW480, SW620 und LoVo, die keine oder nur eine geringe endogene Expression von ITF-2B zeigten, durchgeführt. Die Zellen wurden mit dem Expressionskonstrukt für ITF-2B oder als Kontrolle mit dem Leervektor transfiziert und über einen Zeitraum von vier Wochen mit Geneticin in Selektion genommen. Anschließend wurden die gebildeten Kolonien mit Methylenblau gefärbt, die Platten photographiert und die gebildeten Kolonien gezählt.

In allen fünf Zelllinien zeigte sich – sowohl rein optisch als auch in der Auszählung – eine reduzierte Anzahl an Kolonien bei den mit ITF-2B transfizierten Zellen in Vergleich zu den Kontrollen.

Die Reexpression von ITF-2B führte also zu einer Beeinträchtigung des Koloniewachstums in den jeweiligen Zelllinien.

(A)



(B)

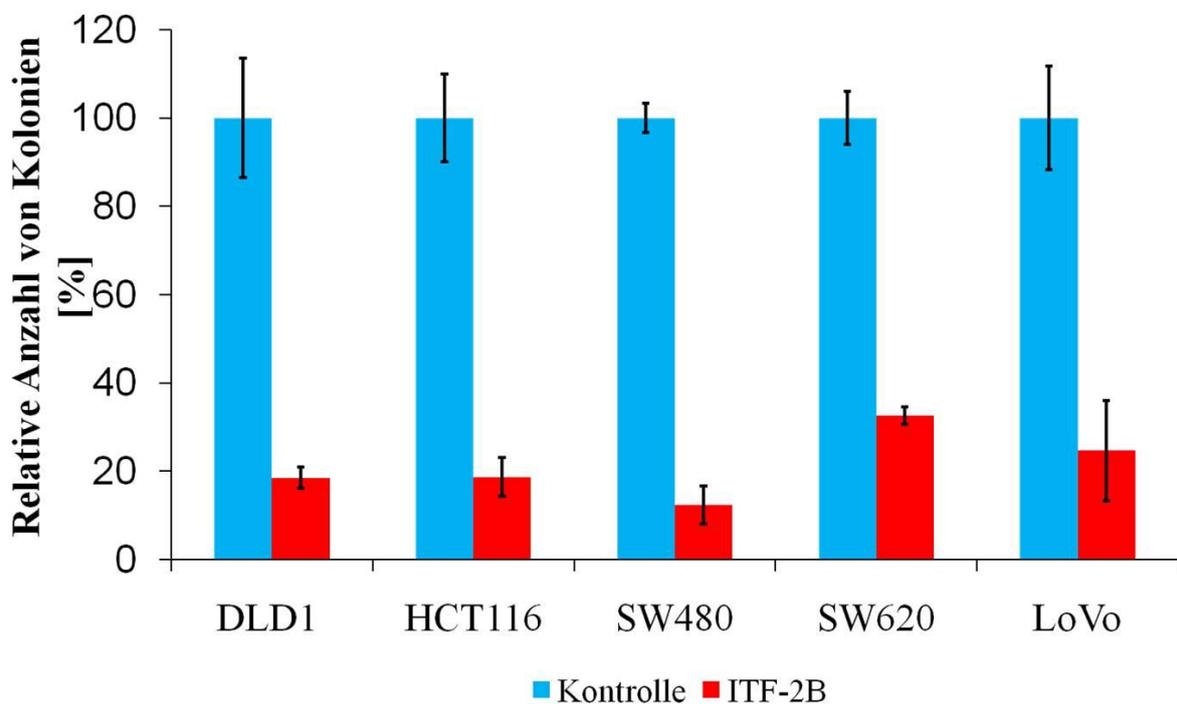


Abbildung 11: Reexpression von ITF-2B hemmt das Koloniewachstum in Colony Forming Assays
 (A) DLD1-, HCT116-, SW480, SW620- und LoVo-Zellen wurden entweder mit einem Leervektor als Kontrolle oder mit einem Expressionskonstrukt für ITF-2B transfiziert, für vier Wochen mit Geneticin selektioniert, die gebildeten Kolonien mit Methylenblau angefärbt, die Platten photographiert und die Kolonien ausgezählt. (B) Graphische Darstellung der unter (A) gezeigten Kolonien. Die jeweilige Anzahl der Kolonien der Kontrollzellen wurde als 100% definiert und die Anzahl der Kolonien der mit dem Expressionskonstrukt für ITF-2B behandelten Zellen wurde darauf bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei durchgeführten Versuchen.

3.2 Stabile Transfektion von DLD1-Zellen mit induzierbaren Expressionsvektor für ITF-2B

Um die Funktionen von ITF-2B näher charakterisieren zu können, wurde ein „Tet on“-System generiert, indem DLD1-Zellen mit dem Konstrukt pRTS/ITF-2B stabil transfiziert wurden. Die auf diese Weise generierten Zellen wurden DLD1 ITF-2B-Zellen genannt. Der Expressionsvektor pRTS enthält sowohl die Sequenz für den Aktivator als auch für den Repressor des Tetrazyklin-Operators. In Abwesenheit von Doxyzyklin bindet der Repressor an den Tetrazyklin-Operator und verhindert die Transkription und somit die Expression von ITF-2B. In Anwesenheit von Doxyzyklin diffundiert der Repressor vom Tetrazyklin-Operator, der Aktivator bindet an den Tetrazyklin-Operator und aktiviert die Transkription und somit die Expression von ITF-2B.

DLD1 ITF-2B-Zellen – in diesem Fall die Klone (#) B1 und B2 –, die über 24 Stunden mit Doxyzyklin behandelt wurden, zeigten im Western Blot eine starke Expression von ITF-2B, während die Kontrollklone (#) C1 und C2 nach Doxyzyklin-Behandlung und die unbehandelten Zellen im Western Blot kein Signal für ITF-2B zeigten.

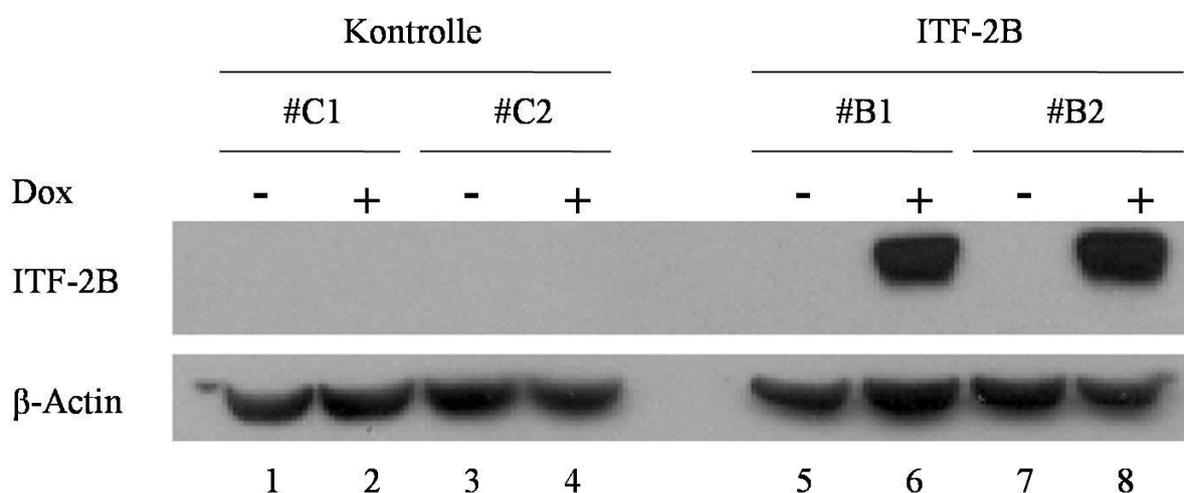


Abbildung 12: Durch Doxyzyklin wird in DLD1 ITF-2B-Zellen die Expression von ITF-2B induziert. DLD1 ITF-2B-Zellen (#B1 und #B2) und DLD1-Leervektor-Zellen (#C1 und #C2) wurden für 24 Stunden mit Doxyzyklin behandelt (jeweils die Proben mit geraden Nummern) oder unbehandelt gelassen (jeweils die Proben mit ungeraden Nummern). Zur Detektion von ITF-2B wurde der Antikörper anti-HA verwendet. Als Ladungskontrolle diente β -Actin.

3.3 Induzierte Expression von ITF-2B führt zur Reduktion des Proliferationsindex im MTT-Assay

Um den Einfluss von ITF-2B auf die Zellvitalität bestimmen zu können, wurden MTT-Assays durchgeführt. Dazu wurde eine von Mosmann¹⁴⁷ beschriebene Methode verwendet, bei der das gelbe, wasserlösliche Substrat MTT in ein blau-violettes, wasserunlösliches Formazanprodukt umgewandelt wird, dessen Konzentration im Elisa-Lesegerät photometrisch bestimmt werden kann. Dabei erfolgt die Reduktion von MTT zu Formazan hauptsächlich durch Enzyme des endoplasmatischen Retikulums NADH- und zu einem geringen Anteil auch NADPH-abhängig.

DLD1 ITF2B-Zellen (#B1 und #B2) sowie Kontrollzellen (DLD1-Leervektor-Zellen; #C1 und #C2) wurden über 96 Stunden mit Doxyzyklin behandelt oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurde der Proliferationsindex mittels MTT-Assay bestimmt.

Es zeigte sich, dass die induzierte Expression von ITF-2B in den DLD1 ITF-2B-Zellen zu einer deutlichen Reduktion des Proliferationsindex führt, während die Kontrollzellen (DLD1-Leervektor-Zellen) eine nur geringe Änderung des Proliferationsindex durch die Doxyzyklin-Behandlung zeigten.

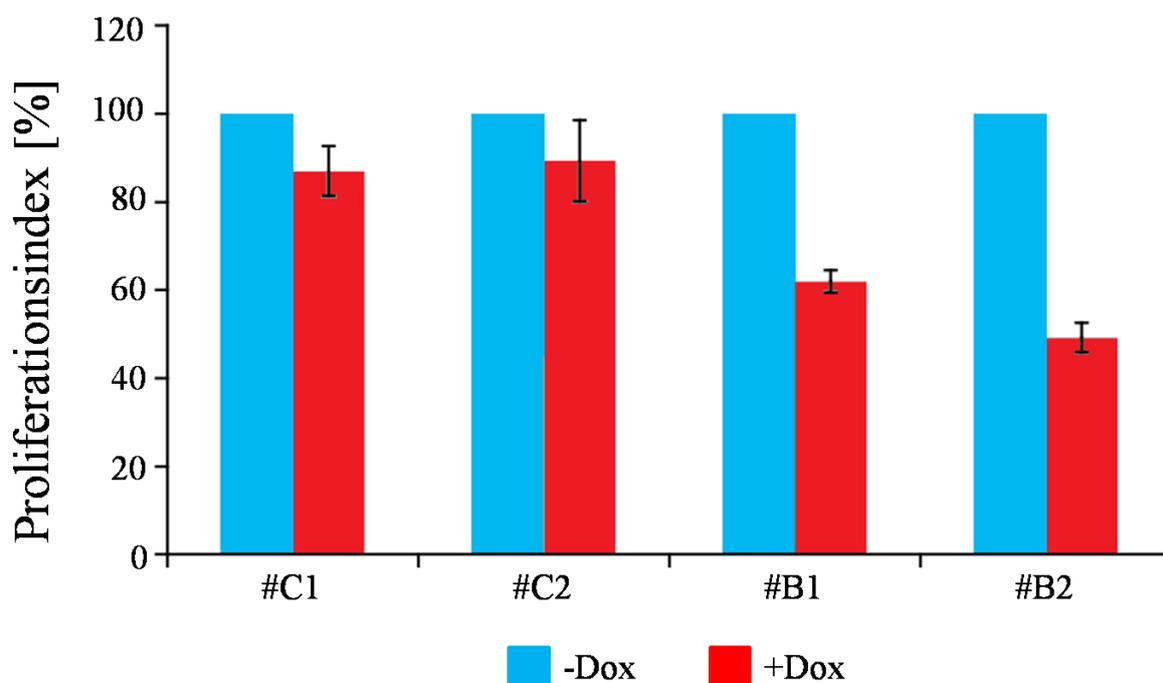


Abbildung 13: Expression von ITF-2B führt zur Reduktion der Proliferation

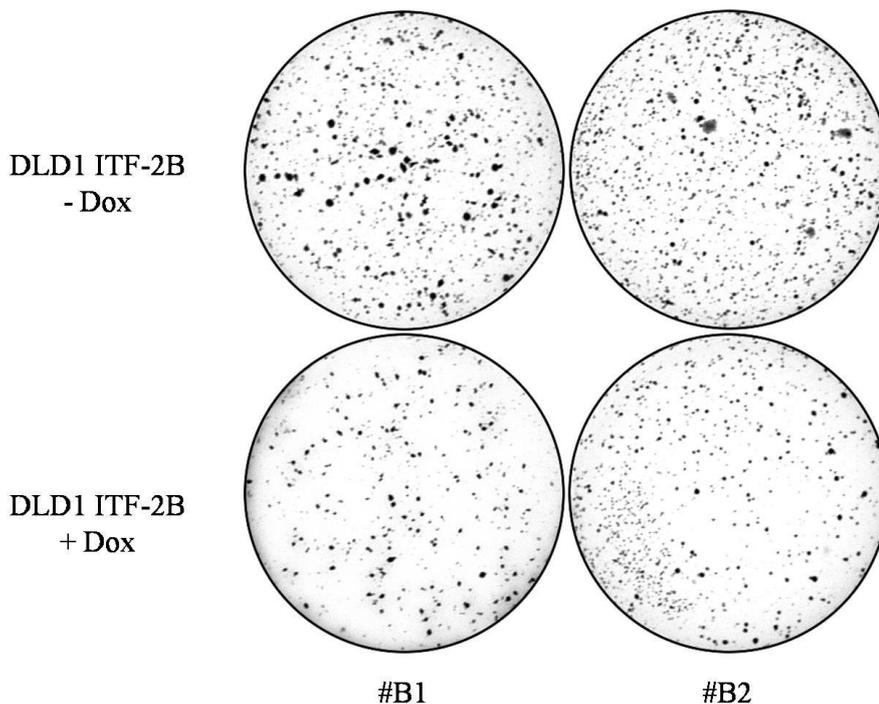
DLD1-Leervektor-Zellen (#C1 und #C2) sowie DLD1 ITF-2B-Zellen (#B1 und #B2) wurden über 96 Stunden mit Doxyzyklin (+Dox) behandelt oder unbehandelt gelassen und anschließend wurde der Proliferationsindex mittels MTT-Assay bestimmt. Der jeweilige Proliferationsindex der nicht mit Doxyzyklin behandelten Zellen (-Dox) wurde als 100% definiert und der Proliferationsindex der mit Doxyzyklin behandelten Zellen darauf bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.4 Induzierte Expression von ITF-2B führt zur Reduktion der Bildung von Kolonien in *Soft Agar Assays*

Als nächstes wurde das Wachstumsverhalten von DLD1 ITF-2B-Zellen ohne Kontakt zu einem festen Untergrund mittels *Soft Agar Assays* untersucht. In diesen Assays wurde die Fähigkeit der Zellen zur Proliferation in einem semi-soliden Medium, das es den Zellen erschwert Kontakt zu einem festen Untergrund zu gewinnen, durch manuelles Auszählen von gebildeten Kolonien bestimmt. Um dies zu erreichen, wurden die Zellkulturplatten zunächst mit einem 0,6%igen Agar beschichtet. Anschließend wurden die Zellen in einen mit DMEM versetzten 0,3%igen Agar eingebracht. Der die Zellen enthaltende 0,3%ige Agar wurde dann über den 0,6%igen Agar geschichtet. Die DLD1 ITF-2B-Zellen – es wurden sowohl Zellen des Klons (#) B1 als auch des Klons (#) B2 analysiert – wurden dann über vier Wochen mit Doxyzyklin behandelt oder als Kontrolle unbehandelt gelassen. Nach vier Wochen wurden die gebildeten Kolonien mit Methylenblau gefärbt, die Platten fotografiert und die Kolonien ausgezählt.

Beide Zellklone (B1 und B2) zeigten – sowohl in der Auszählung als auch rein optisch – bei den mit Doxyzyklin – und somit ITF-2B exprimierenden – Zellen eine deutliche Reduktion der Bildung von Kolonien im Vergleich zu den nicht mit Doxyzyklin behandelten DLD1 ITF-2B-Zellen.

(A)



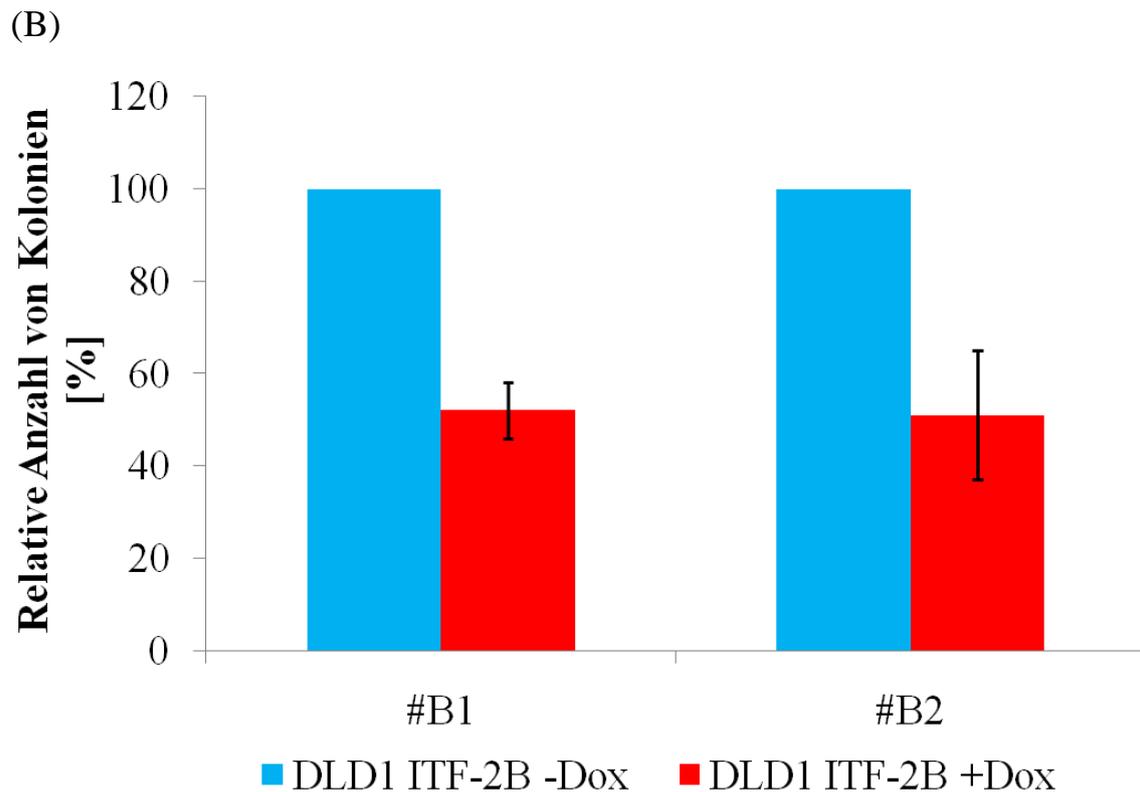


Abbildung 14: Expression von ITF-2B inhibiert die Bildung von Kolonien in *Soft Agar Assays*

(A) DLD1 ITF-2B-Zellen (#B1 und #B2) wurden in semi-soliden Agar eingebracht und über 4 Wochen mit Doxyzyklin behandelt oder als Kontrolle unbehandelt gelassen. Nach 4 Wochen wurden die Platten mit Methylenblau gefärbt und photographiert. (B) Graphische Darstellung der Ergebnisse aus (A). Die jeweilige Anzahl der Kolonien der Kontrollzellen (nicht mit Doxyzyklin stimulierte DLD1 ITF-2B-Zellen) wurde als 100% definiert und die Anzahl der Kolonien der mit Doxyzyklin behandelten Zellen wurde darauf bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.5 Expression von ITF-2B führt zum Zellzyklusarrest

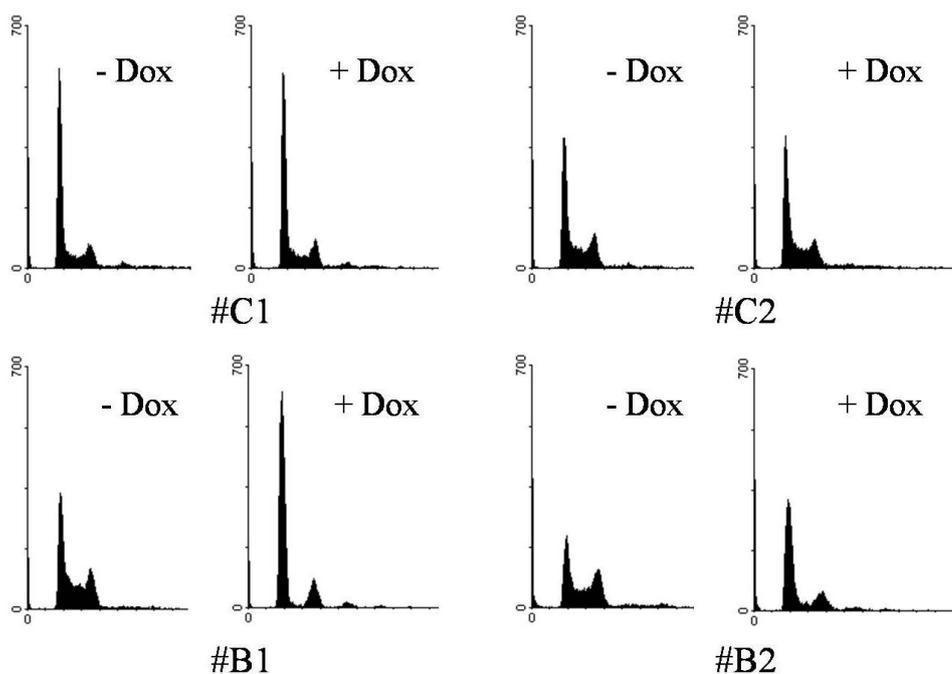
In den *Colony Forming*-, *Soft Agar*- und MTT-Assays konnte gezeigt werden, dass die Expression von ITF-2B zu einer Hemmung der Proliferation der betreffenden Zellen führt. Theoretisch kommen für diese beobachtete Hemmung der Proliferation eine Apoptose-Induktion oder ein Zellzyklusarrest in Frage.

Um herauszufinden, über welchen Mechanismus die Proliferation der Zellen durch ITF-2B gehemmt wird, wurde die Zellzyklusverteilung von DLD1 ITF-2B-Zellen (#B1 und #B2) und als Kontrolle von DLD1-Leervektor-Zellen (#C1 und #C2) untersucht.

Dabei zeigte sich bei den mit Doxyzyklin behandelten DLD1 ITF-2B-Zellen eine deutliche Zunahme der Zellen in der G₀/G₁-Phase bei einer gleichzeitigen Abnahme der Zellen in der S- und der G₂/M-Phase. Bei den zur Kontrolle analysierten DLD1-Leervektor-Klonen zeigte sich bei den mit Doxyzyklin stimulierten Zellen kein Unterschied in der Zellzyklusverteilung im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen.

Somit induziert ITF-2B einen Zellzyklusarrest, hat aber bei einer fehlenden Zunahme von Zellen in der subG₁-Fraktion keinen Einfluss auf die Spontanapoptose.

(A)



(B)

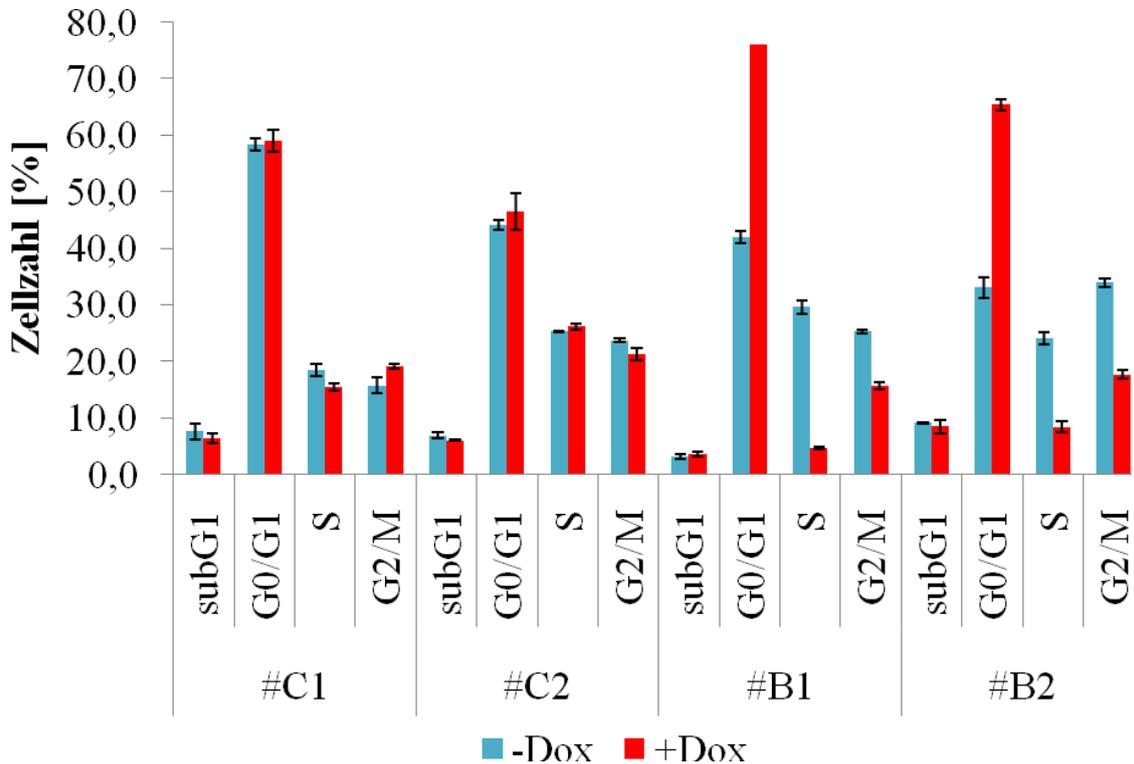


Abbildung 15: Expression von ITF-2B bewirkt einen Zellzyklusarrest

(A) DLD1 ITF-2B-Zellen (#B1 und #B2) und DLD1-Leervektor-Zellen (#C1 und #C2) wurden synchronisiert und mit Doxyzyklin behandelt (+Dox) oder unbehandelt gelassen (-Dox). Anschließend erfolgte die Analyse der Zellzyklusverteilung im Durchflusszytometer. Zu sehen sind repräsentativ Histogramme von zwei durchgeführten Versuchen. (B) Quantitative Auswertung der mittels FACS analysierten Zellzyklusverteilung. Das Histogramm zeigt die prozentuale Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen (G₀/G₁, S, G₂/M) einschließlich der subG₁-Phase, in der avitale Zellen erfasst werden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus mehrfach unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.6 ITF-2B führt zur Expression des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1}

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ITF-2B zu einem Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase führt, wurde nun der Mechanismus der Zellzyklusregulation näher untersucht.

Dazu wurden DLD1 ITF-2B-Zellen für 24 Stunden mit Doxyzyklin stimuliert und anschließend im Western Blot auf die Expression der Zellzyklusinhibitoren p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p21^{Cip1} sowie p27^{Kip1} hin untersucht. p15^{INK4B} und p16^{INK4A} gehören zu den CDKIs (Inhibitoren der CDKs = Cyclin-Dependent Kinases) aus der INK4-Familie, während p21^{Cip1} sowie p27^{Kip1} CDKIs aus der Cip/Kip-Familie sind¹⁵⁰. All diese Faktoren stellen wichtige Zellzyklusregulatoren dar, durch die der durch ITF-2B induzierte Zellzyklusarrest potenziell vermittelt werden konnte.

Im Western Blot zeigte sich kein Effekt von ITF-2B auf die Expression von p15^{INK4B} und p16^{INK4A} sowie ein inkonsistenter Befund auf die Expression von p27^{Kip1} bezogen auf die verschiedenen Zellklone. Dahingegen führte die Expression von ITF-2B zu einer deutlichen Zunahme der Expression des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1}.

Dies legte die Vermutung nahe, dass der durch ITF-2B vermittelte Zellzyklusarrest über den Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1} reguliert wird.

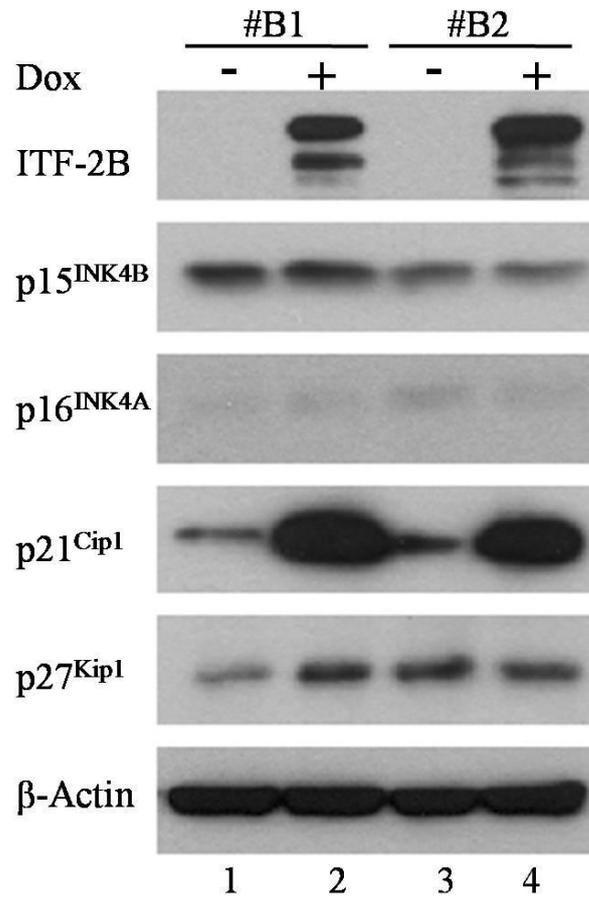


Abbildung 16: Expression von ITF-2B führt zur Expression des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1}
 DLD1 ITF-2B-Zellen (#B1 und #B2) wurden für 24 Stunden mit Doxyzyklin behandelt (+Dox) oder als Kontrolle unbehandelt gelassen (-Dox). Anschließend wurde die Expression von ITF-2B, p15^{INK4B}, p16^{INK4A}, p21^{Cip1} sowie p27^{Kip1} im Western Blot analysiert. Als Ladungskontrolle diente β-Actin.

3.7 Die Expression von p21^{Cip1} erfolgt in zeitlicher Abhängigkeit von der Expression von ITF-2B

Als nächstes wurde der zeitliche Zusammenhang zwischen der Expression von ITF-2B und p21^{Cip1} untersucht. Dazu wurden DLD1 ITF-2B-Zellen (#B1) mit Doxyzyklin stimuliert und die Expression von ITF-2B und p21^{Cip1} nach unterschiedlichen Zeitintervallen im Western Blot analysiert.

Dabei zeigte sich zuerst ein Signal für ITF-2B (nach vierständiger Stimulation mit Doxyzyklin) und erst mit einer zeitlichen Verzögerung ein Signal für p21^{Cip1} (nach achtständiger Stimulation mit Doxyzyklin). Dies zeigt also, dass die Expression von p21^{Cip1} zeitlich auf die Expression von ITF-2B folgt.

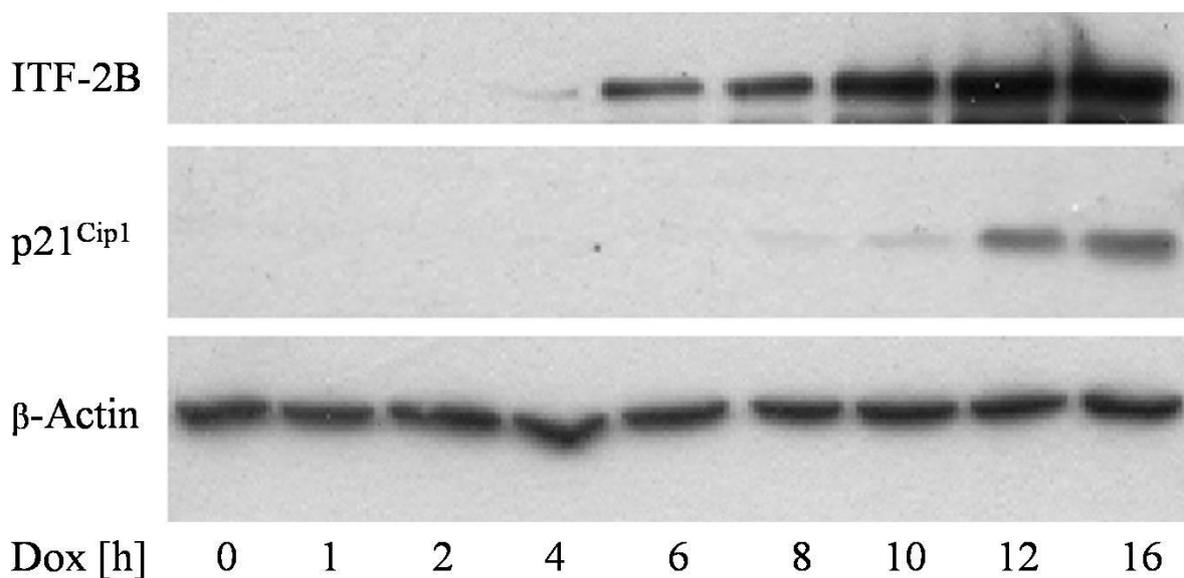


Abbildung 17: Expression von p21^{Cip1} folgt zeitlich abhängig von der Expression von ITF-2B
DLD1 ITF-2B-Zellen (#B1) wurden mit Doxyzyklin stimuliert und die Expression von ITF-2B und p21^{Cip1} nach unterschiedlichen Zeitintervallen im Western Blot analysiert. Als Ladungskontrolle diente β-Actin.

3.8 Die Expression von p21^{Cip1} in DLD1 Cip1-Zellen allein reicht aus, um einen Zellzyklusarrest zu induzieren

In den vorhergehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Expression von ITF-2B zu einer Wachstumshemmung über die Induktion eines Zellzyklusarrestes führt und dass dieser Arrest über den Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1} vermittelt wird.

Nun wurde als nächstes untersucht, ob die alleinige Expression von p21^{Cip1} ausreicht, um den beobachteten Zellzyklusarrest zu induzieren.

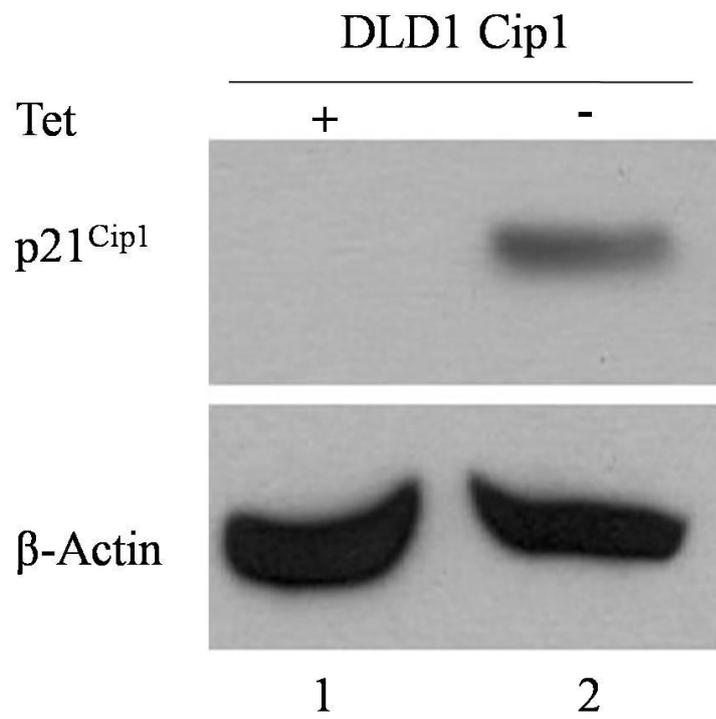
Um dies zu untersuchen, wurden DLD1 Cip1-Zellen eingesetzt, die von der französischen Arbeitsgruppe um Bernard Ducommun vom *Institut de Pharmakologie et de Biologie Structurale du CNRS Université Paul Sabatier* (Toulouse, Frankreich) zur Verfügung gestellt wurden. Diese Zellen verfügen über ein „Tet off“-¹³⁴System. Dies bedeutet, dass die Expression von p21^{Cip1} in Anwesenheit von Tetracyclin supprimiert wird, während der Entzug des Tetracyclins aus dem Medium zur Expression von p21^{Cip1} führt.¹⁵¹

Die DLD1 Cip1-Zellen wurden in den Zellzyklusphasen synchronisiert und zum einen im Western Blot auf die Expression von p21^{Cip1} hin untersucht. Zum anderen wurde die Zellzyklusverteilung analysiert. Die Zellen wurden dafür entweder direkt mit Propidiumiodid (PI) oder mit HA- und FITC-konjugiertem Antikörper gefärbt. Propidiumiodid ist ein in die DNA der Zellen interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, der durch eine Xenon-, Quecksilberdampfampe oder durch einen Argon-Ionen-Laser angeregt und im FL2-Kanal des Durchflusszytometers detektiert werden kann. Dadurch kann über den DNA-Gehalt der Zellen eine Zuordnung zu den Zellzyklusphasen erfolgen. Der Unterschied in der Analyse zwischen direkt mit PI gefärbten Zellen und Zellen mit Doppelfärbung (FITC/PI) liegt in der Tatsache, dass man bei den immungefärbten Zellen nur p21^{Cip1} exprimierende Zellen erfasst, während bei den direkt mit PI gefärbten Zellen auch Zellen mit erfasst werden können, die kein p21^{Cip1} exprimieren.

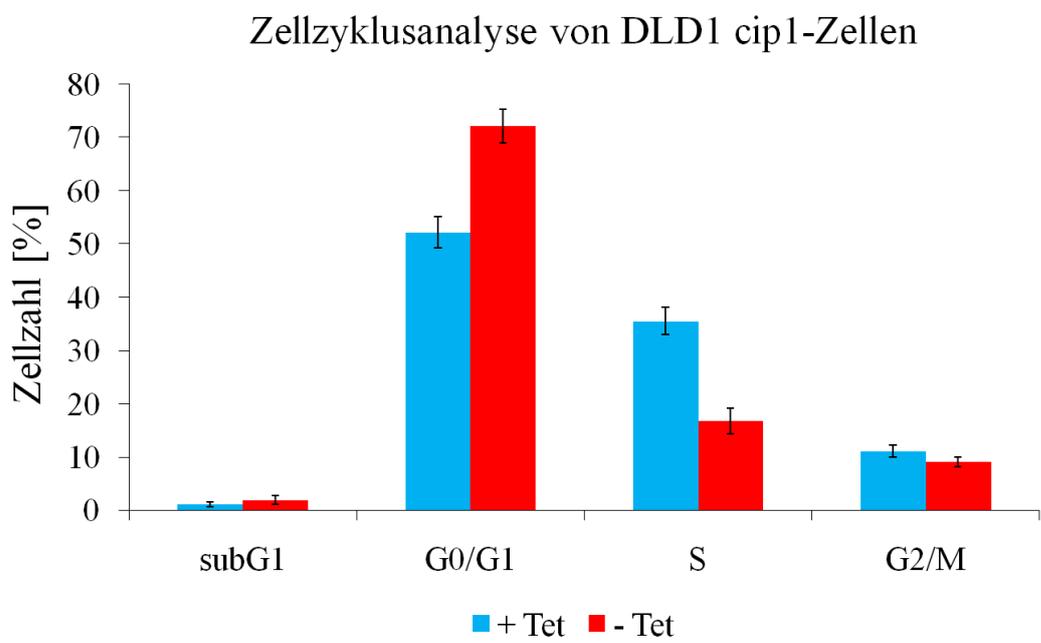
Es zeigte sich, dass die Expression von p21^{Cip1} in beiden Fällen – sowohl bei den direkt mit PI gefärbten Zellen als auch bei den Zellen mit Doppelfärbung (FITC/PI) – zu einem deutlichen Arrest der Zellen in der G₀/G₁-Phase führte. Die Zahl der Zellen in der S-Phase war in beiden Fällen leicht vermindert, während die Zellzahl in der G₂/M-Phase kaum beeinflusst wurde. Der prozentuale Anteil der doppelgefärbten (FITC/PI) Zellen in der G₀/G₁-Phase war dabei etwas höher als der Anteil der einfach mit PI gefärbten Zellen, was sich aus der Tatsache erklären lässt, dass bei den Zellen mit Doppelfärbung nur die p21^{Cip1} exprimierenden Zellen erfasst werden.

Diese Ergebnisse konnten also zeigen, dass die alleinige Expression von p21^{Cip1} ausreicht, um einen Zellzyklusarrest in DLD1-Zellen zu induzieren.

(A)



(B)



(C)

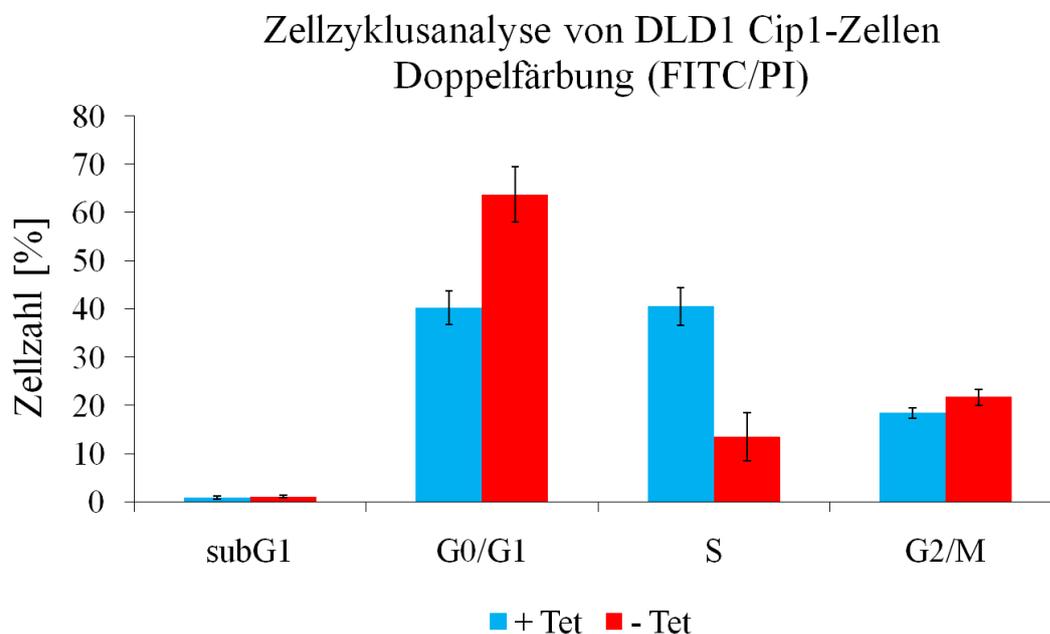


Abbildung 18: Expression von p21^{Cip1} führt zum Zellzyklusarrest in DLD1 Cip1-Zellen

DLD1 Cip1-Zellen wurden synchronisiert. (A) Analyse der Expression von p21^{Cip1} mittels anti-HA Antikörper. Als Ladungskontrolle diente β -Actin. Quantitative Auswertung der im Durchflusszytometer analysierten Zellzyklusverteilung von mit PI gefärbten (B) und von mit FITC/PI doppeltgefärbten (C) DLD1 Cip1-Zellen. Die Histogramme zeigen die prozentuale Verteilung der Zellen auf die Zellzyklusphasen (G₀/G₁, S, G₂/M) einschließlich der subG₁-Phase, in der avitale Zellen erfasst werden. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen (zwei dieser Versuche wurden als Doppelbestimmung, einer als Einfachbestimmung durchgeführt).

3.9 Der durch ITF-2B vermittelte Zellzyklusarrest in DLD1 ITF-2B-Zellen wird durch *gene silencing* von CDKN1A abgeschwächt

In den vorangehenden Versuchen konnte bereits gezeigt werden, dass die induzierte Expression von ITF-2B in DLD1 ITF-2B-Zellen mit der Expression von p21^{Cip1} einhergeht und mit dieser in zeitlichem Zusammenhang steht.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die alleinige Expression von p21^{Cip1} ausreicht, um in DLD1-Zellen einen Zellzyklusarrest zu induzieren, wurde als nächstes untersucht, ob der in den DLD1 ITF-2B-Zellen über ITF-2B vermittelte Zellzyklusarrest in kausalem Zusammenhang mit der Expression von p21^{Cip1} steht.

Um dies zu untersuchen, wurde die Methode des *gene silencing* angewandt: hierbei werden Gene unter Einsatz von siRNA auf posttranskriptioneller Ebene herunterreguliert. In diesem Fall wurde siRNA gegen CDKN1A (Cyclin dependent kinase inhibitor 1A, p21^{Cip1}-Gen) und als Kontrolle gegen β -Galaktosidase eingesetzt.

Die DLD1 ITF-2B-Zellen wurden acht Stunden nach ihrer Aussaat mit Doxyzyklin behandelt oder unbehandelt gelassen. 24 Stunden nach der Aussaat erfolgte die siRNA-Transfektion in Medium mit 0,2% FCS, um die Zellen in den Zellzyklusphasen zu synchronisieren. 24 Stunden nach der siRNA-Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit 10% FCS haltigem Medium, mit dem die Zellen weitere 16 Stunden inkubiert wurden. Bei jedem Mediumwechsel wurden die entsprechenden Zellen mit Doxyzyklin behandelt oder unbehandelt gelassen. Nach der Inkubation wurde im Western Blot die Expression von p21^{Cip1} und im Durchflusszytometer die Zellzyklusverteilung analysiert.

Im Western Blot zeigte sich, dass die siRNA-Transfektion gegen CDKN1A zu einer deutlichen Abschwächung des Signals für p21^{Cip1} bei den mit Doxyzyklin stimulierten DLD1 ITF-2B-Zellen führte, während die siRNA-Transfektion gegen β -Galaktosidase die Expression von p21^{Cip1} der mit Doxyzyklin stimulierten Zellen nicht beeinflusste.

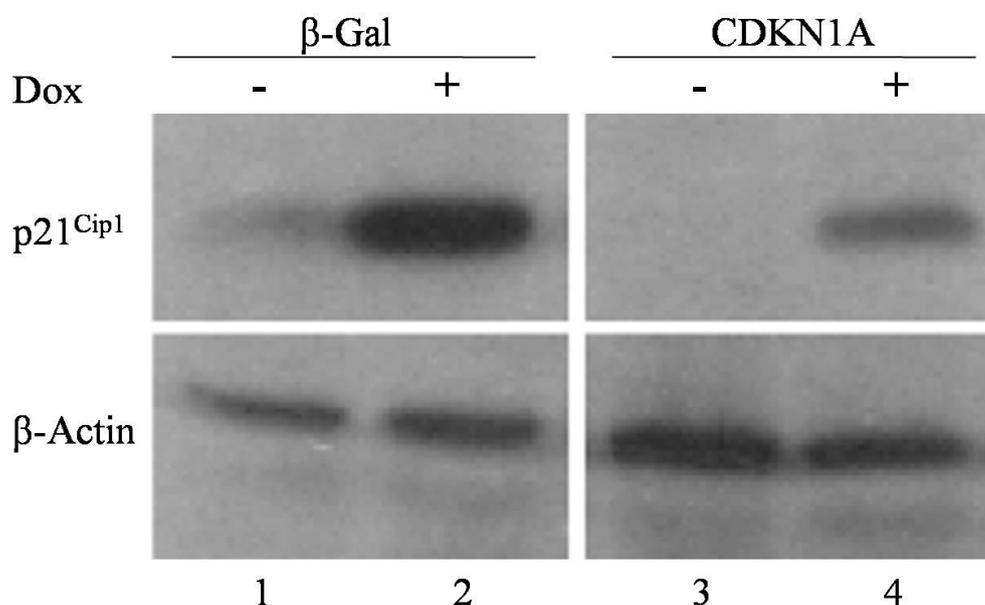


Abbildung 19: Expression von p21^{Cip1} wird durch siRNA gegen CDKN1A mRNA abgeschwächt
DLD1 ITF-2B-Zellen wurden acht Stunden nach ihrer Aussaat mit Doxyzyklin behandelt oder unbehandelt gelassen. 24 Stunden nach der Aussaat erfolgte die siRNA-Transfektion mit siRNA gegen CDKN1A (Cyclin dependent kinase inhibitor 1A) oder als Kontrolle gegen β -Galaktosidase in Medium mit 0,2% FCS, um die Zellen in den Zellzyklusphasen zu synchronisieren. 24 Stunden nach der siRNA-Transfektion erfolgte ein Mediumwechsel mit 10% FCS haltigem Medium, mit dem die Zellen weitere 16 Stunden inkubiert wurden. Bei jedem Mediumwechsel wurden die entsprechenden Zellen mit Doxyzyklin behandelt oder unbehandelt gelassen. Nach der Inkubation wurde im Western Blot die Expression von p21^{Cip1} mittels anti-cip1/WAF1 analysiert. Als Ladungskontrolle diente β -Actin.

In der Zellzyklusanalyse wurde das jeweilige Verhältnis der Zellen in der G₀/G₁-Phase zu den Zellen in der S-Phase analysiert. Dabei wurde bei den mit siRNA gegen β -Galaktosidase oder gegen CDKN1A transfizierten Zellen das Verhältnis G₀G₁/S der mit Doxyzyklin stimulierten Zellen auf das jeweilige Verhältnis G₀G₁/S der unstimulierten Zellen bezogen.

Es zeigte sich, dass durch die Herunterregulation von CDKN1A das Verhältnis G₀G₁/S bei den mit Doxyzyklin behandelten Zellen deutlich reduziert werden konnte.

Gene silencing von CDKN1A – dies war im Western Blot nachzuweisen – führte also in DLD1 ITF-2B-Zellen, in denen die Expression von ITF-2B durch Stimulation mit Doxyzyklin induziert wird, zu einer deutlichen Abschwächung des Zellzyklusarrestes.

Dies zeigte, dass der durch ITF-2B induzierte Zellzyklusarrest in DLD1 ITF-2B-Zellen ebenfalls über p21^{Cip1} vermittelt wurde.

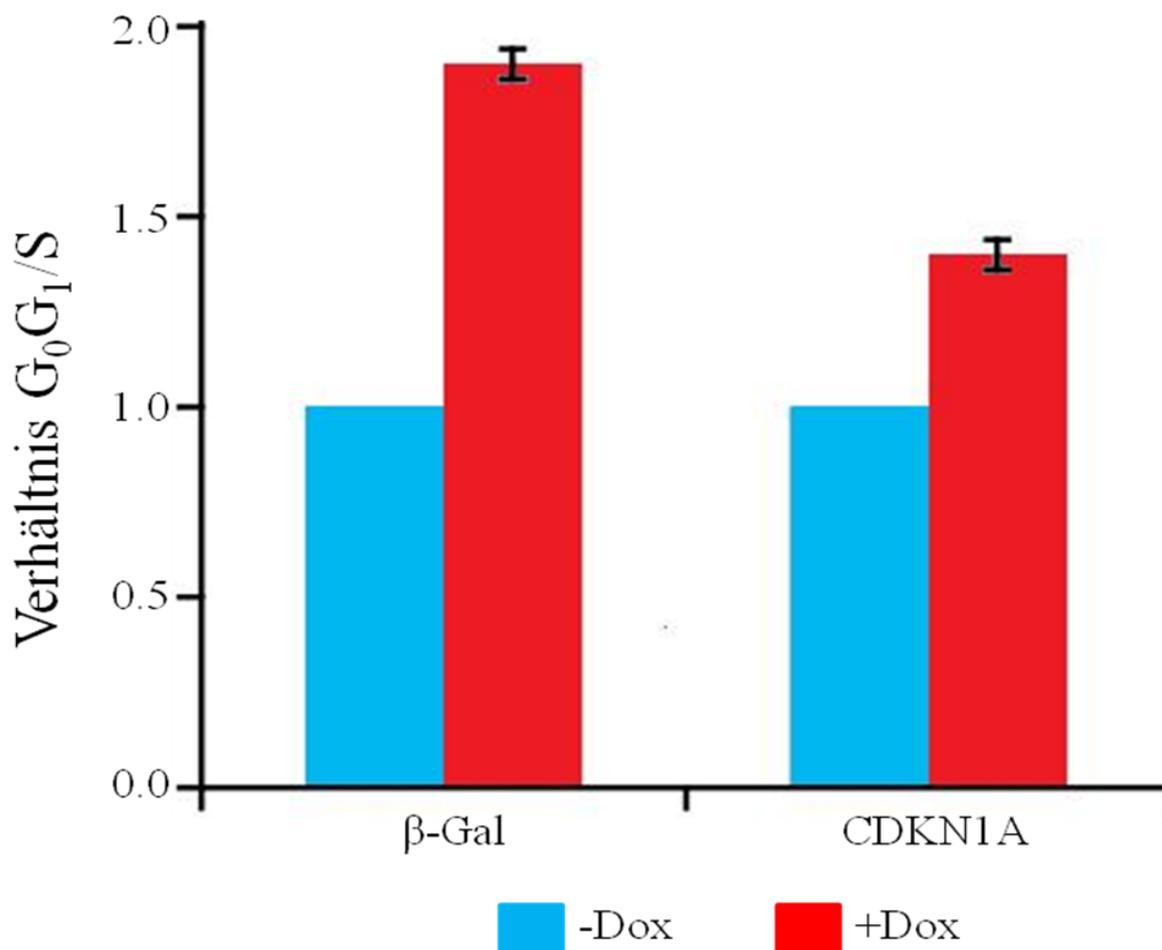


Abbildung 20: *Silencing* von CDKN1A reduziert den Zellzykluseffekt von ITF-2B in DLD1 ITF-2B-Zellen

DLD1 ITF-2B-Zellen wurden mit siRNA gegen CDKN1A oder als Kontrolle gegen β-Galaktosidase behandelt und mit Doxyzyklin stimuliert. Das Histogramm zeigt – sowohl für die mit siRNA gegen CDKN1A als auch für die mit siRNA gegen β-Galaktosidase transfizierten Zellen – das Verhältnis G₀G₁/S der mit Doxyzyklin stimulierten Zellen bezogen auf das Verhältnis G₀G₁/S der nicht mit Doxyzyklin stimulierten Zellen, das als 1,0 definiert wurde. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.10 ITF-2B reguliert CDKN1A auf transkriptioneller Ebene

Nachdem gezeigt werden konnte, dass ITF-2B einen Zellzyklusarrest über den Zellzyklusinhibitor $p21^{Cip1}$ induziert, wurde nun untersucht, ob ITF-2B als bHLH-Transkriptionsfaktor das $p21^{Cip1}$ -Gen (CDKN1A) auf transkriptioneller Ebene reguliert.

Zunächst wurden Reporteragen-Konstrukte mit den Promotorfragmenten K, L und M, die sich nahe dem Transkriptionsstart von CDKN1A befinden und E-Boxen enthalten, generiert.

Als E-Box wird die palindromische Sequenz CANNTG (N steht dabei für ein beliebiges Nukleotid) bezeichnet, mit der bHLH-Transkriptionsfaktoren interagieren können.

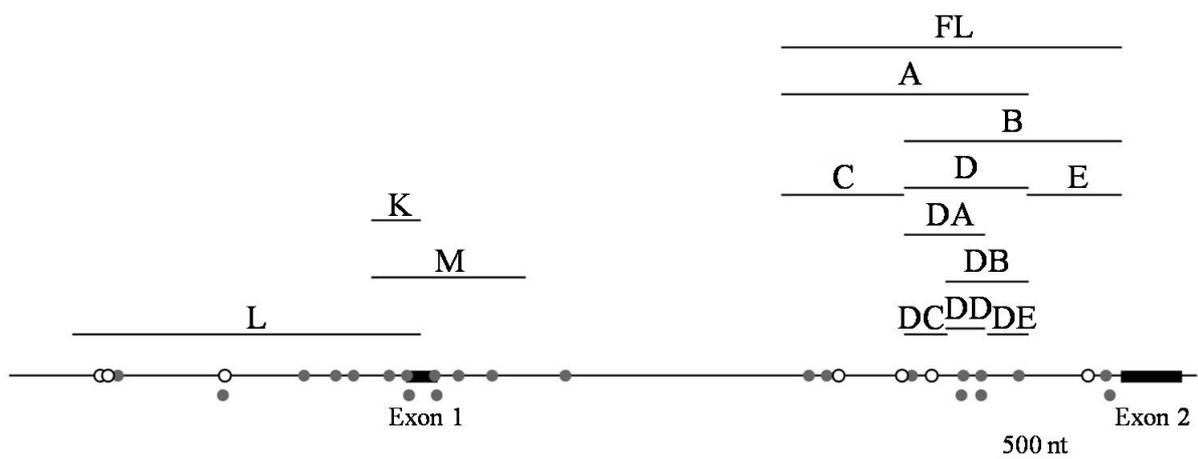


Abbildung 21: Teil des CDKN1A-Gens

Die Abbildung zeigt – maßstäblich gezeichnet – einen Ausschnitt des $p21^{Cip1}$ -Gens mit den Exons 1 und 2. Die Position und die Länge der jeweiligen Promotor-Fragmente sind eingezeichnet. Die grauen Punkte markieren die Lage von E-Boxen, die weißen Punkte die Lage von Bindestellen für p53.

Es folgten Reporteragen-Assays mit den Reporteragen-Konstrukten K, L und M. Als Zellen dienten für diese Versuche zum einen DLD1-Zellen, die eine biallelische Inaktivierung von p53 aufweisen¹⁵², und zum anderen HCT116 WT-Zellen, die den p53-Wildtyp aufweisen¹⁵³.

In den DLD1-Zellen konnte keine bzw. nur eine geringe Aktivierung dieser Reporteragen-Konstrukte durch ITF-2B nachgewiesen werden. In den HCT116-Zellen zeigte sich bei den Konstrukten mit den Promotor-Fragmenten K und M ebenfalls keine oder nur eine allenfalls geringe Aktivierung, während das Konstrukt mit dem Promotor-Fragment L hingegen eine zweifache Aktivierung zeigte.

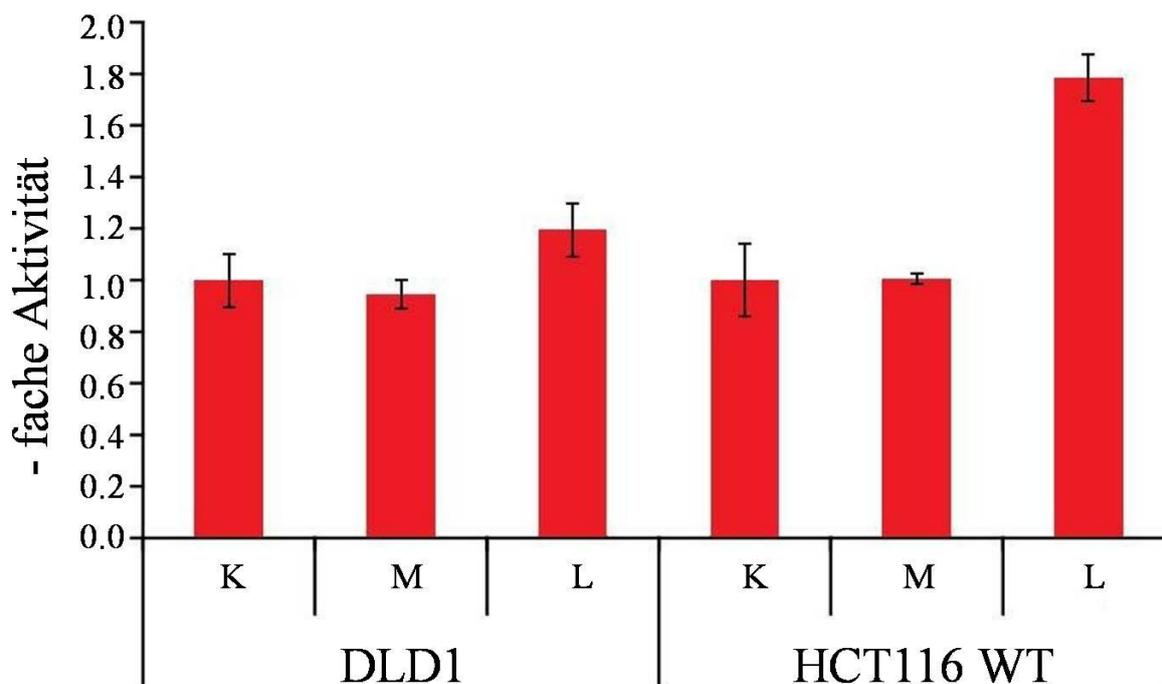


Abbildung 22: Ausmaß der Aktivierung der Konstrukte K, M und L durch ITF-2B in DLD1- und HCT116 WT-Zellen

DLD1- sowie HCT116-Zellen wurden mit den Reporter-Gen-Konstrukten K, L und M, dem Plasmid pcDNA3 ITF-2B HA als Aktivator der jeweiligen Reporter-Gene bzw. dem (Leervektor-)Plasmid pcDNA3 und dem Plasmid pCH110 zur Bestimmung der Transfektionseffizienz transfiziert. Der Wert der Luziferase-Aktivität jeder Probe wurde durch den entsprechenden Wert der β -Galaktosidase-Aktivität dividiert. Die Werte der auf die β -Galaktosidase-Aktivität bezogenen Luziferase-Aktivität der Proben mit transfiziertem Aktivator (pcDNA3 ITF-2B HA) wurden durch die entsprechenden Werte der Proben mit transfiziertem Kontroll-Plasmid (pcDNA3) geteilt, um so ein Maß für die Aktivität des entsprechenden Promotors zu erhalten (-fache Aktivierung, *fold induction*). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Da die Aktivierung der Reporter-Gen-Konstrukte K, L und M durch ITF-2B allenfalls sehr gering ausfiel, wurde nach anderen E-Boxen innerhalb des $p21^{Cip1}$ -Gens gesucht. HCT116-Zellen sind p53-Wildtyp-Zellen. Die beobachtete Aktivierung des L-Konstruktes in diesen Zellen wird demnach vermutlich indirekt über p53 vermittelt. Von größerem Interesse im Sinne der Fragestellungen dieser Arbeit waren jedoch direkte Interaktionen zwischen ITF-2B und CDKN1A.

Es wurden neue Reporter-Gen-Konstrukte mit den Promotor-Fragmenten FL, A, B, C, D und E (siehe Abbildung 21) generiert, indem diese Promotor-Fragmente in das zuvor hergestellte Konstrukt pGL3 basic CDKN1A K kloniert wurden.

Mit diesen neuen Reporter-Gen-Konstrukten wurden Reporter-Gen-Assays in HCT116-Zellen durchgeführt. Die Aktivitäten der jeweiligen neuen Konstrukte wurde auf die Aktivität des Konstruktes pGL3 basic CDKN1A K bezogen.

Die geringste Aktivierung zeigte sich bei dem Konstrukt K/E, eine Zunahme der Aktivierung in aufsteigender Reihenfolge bei den Konstrukten K/C, K/B, K/A und K/FL. Die größte Aktivierung durch ITF-2B allerdings zeigte das Konstrukt K/D.

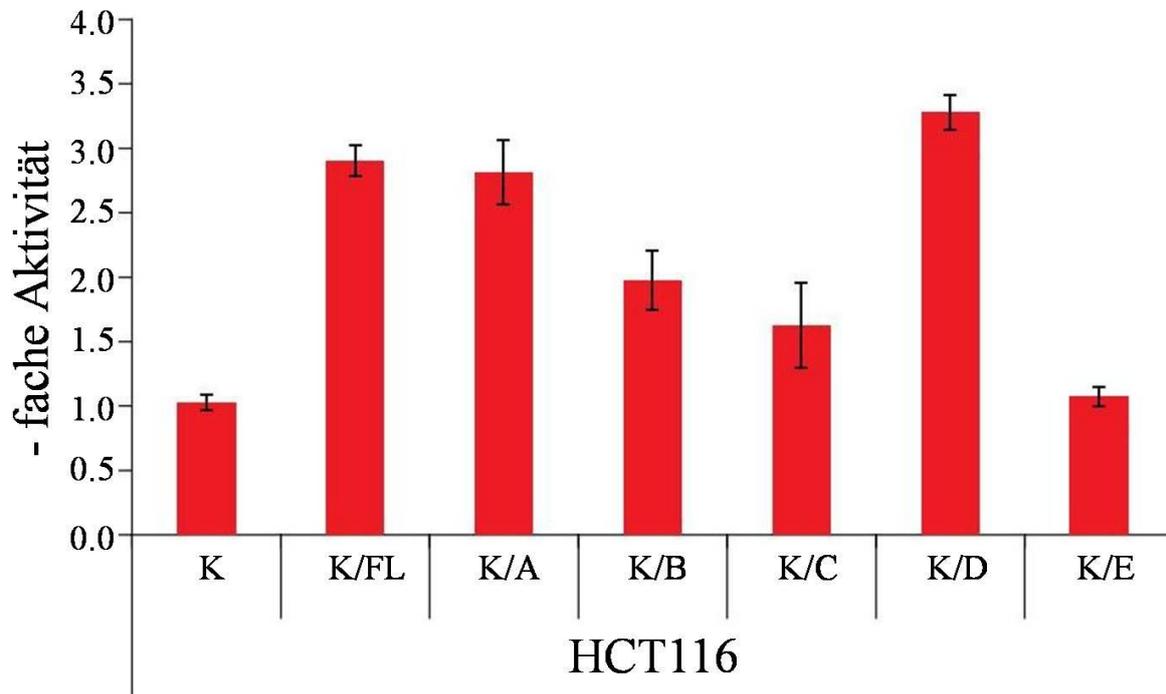


Abbildung 23: Ausmaß der Aktivierung der Konstrukte K/FL, K/A, K/B, K/C, K/D und K/E durch ITF-2B in HCT116-Zellen

HCT116-Zellen wurden mit den Konstrukten K, K/FL, K/A, K/B, K/C, K/D und K/E transfiziert und die Reportergen-Aktivität bestimmt (siehe Abbildung 21). Die jeweiligen Aktivitäten der Reportergen-Konstrukte wurden auf die Aktivität des Konstrukts K bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

Da sich die größte Aktivierung durch ITF-2B bei dem Konstrukt K/D zeigte, wurde das Promotor-Fragment weiter in die Fragmente DA, DB, DC, DD und DE unterteilt (siehe Abbildung 21) und diese Promotor-Fragmente wurden in das zuvor hergestellte Konstrukt pGL3 basic CDKN1A K kloniert. Die Reportergen-Assays wurden erneut in HCT116-Zellen durchgeführt und die Aktivitäten der jeweiligen neuen Konstrukte wurde auch hier auf die Aktivität des Konstrukts pGL3 basic CDKN1A K bezogen. Zum Vergleich wurde auch nochmal die Aktivität des Konstrukts K/FL mitbestimmt.

Die größte Aktivität der Konstrukte mit den Promotor-Fragmenten DA, DB, DC, DD und DE zeigte sich dabei bei dem Konstrukt K/DA, dessen Aktivität fast die Aktivität des Konstrukts mit dem langen Promotor-Fragment FL erreichte und fünf E-Boxen enthält.

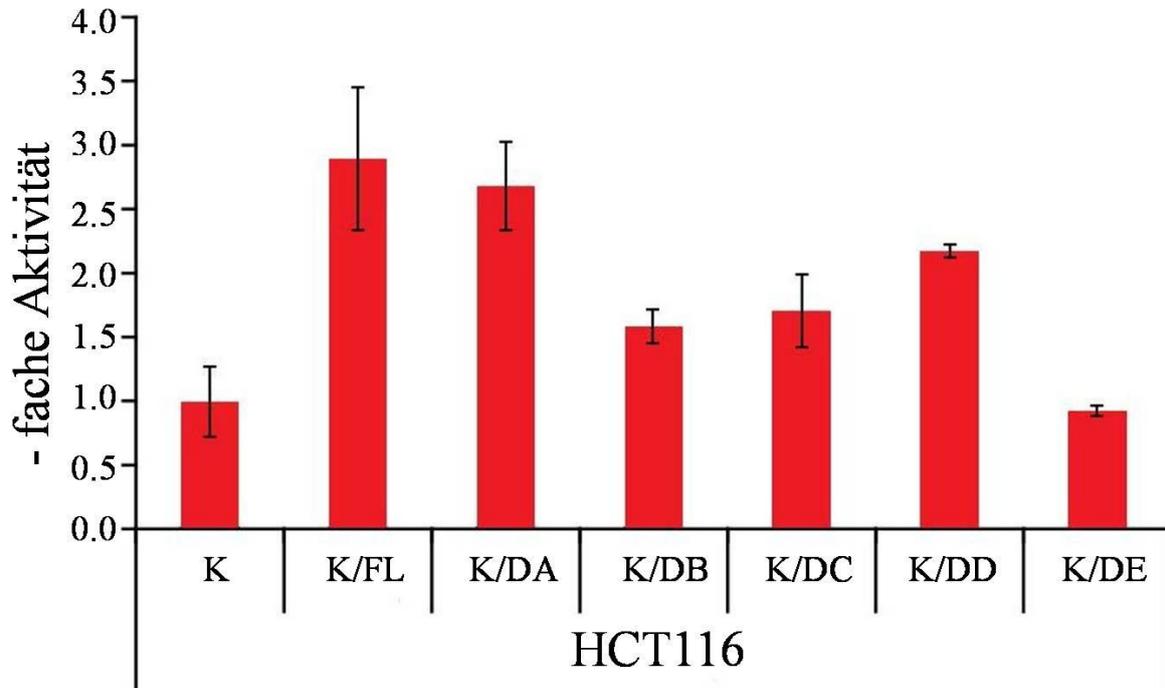


Abbildung 24: Ausmaß der Aktivierung der Konstrukte K/FL, K/DA, K/DB, K/DC, K/DD und K/DE durch ITF-2B in HCT116-Zellen

HCT116-Zellen wurden mit den Konstrukten K, K/FL, K/DA, K/DB, K/DC, K/DD und K/DE transfiziert und die Reporter-Gen-Aktivität bestimmt (siehe Abbildung 21). Die jeweiligen Aktivitäten der Reporter-Gen-Konstrukte wurden auf die Aktivität des Konstrukts K bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.11 ITF-2B interagiert mit den E-Boxen E11 + E12 von CDKN1A

Durch diese Reporter-Gen-Assays konnte also das sehr kleine Promotor-Fragment DA (siehe Abbildung 21) im Bereich des ersten Introns des CDKN1A-Gens gefunden werden, das fünf E-Boxen (E8, E9, E10, E11, E12) beinhaltet und über ITF-2B reguliert wird.

Um herauszufinden, welche dieser E-Boxen mit ITF-2B interagiert, wurde jede einzelne E-Box des Reporter-Gen-Konstrukts K/DA mittels PCR-Mutagenese mutiert. Mit diesen die einzelnen Mutationen enthaltenden Reporter-Gen-Konstrukten wurden Reporter-Gen-Assays in HCT116-Zellen durchgeführt, wobei zum Vergleich auch die Aktivität des Konstrukts K und des Konstrukts K/DA mitbestimmt wurde.

Hier zeigte sich die größte Abnahme der Aktivität im Vergleich zum Ausgangs-Konstrukt K/DA bei den Konstrukten, bei denen die E-Box E11 oder E12 mutiert wurden. Bei diesen beiden Konstrukten mit den mutierten E-Boxen E11 oder E12 konnte die Aktivität fast auf

das Niveau der Aktivität des Konstrukts K, das lediglich ein sehr kleines Promotor-Fragment um den Transkriptionsstart des CDKN1A-Gens enthält, reduziert werden.

Somit konnten die E-Box E11 sowie die E-Box E12 als Bindestellen für den bHLH-Transkriptionsfaktor ITF-2B identifiziert werden.

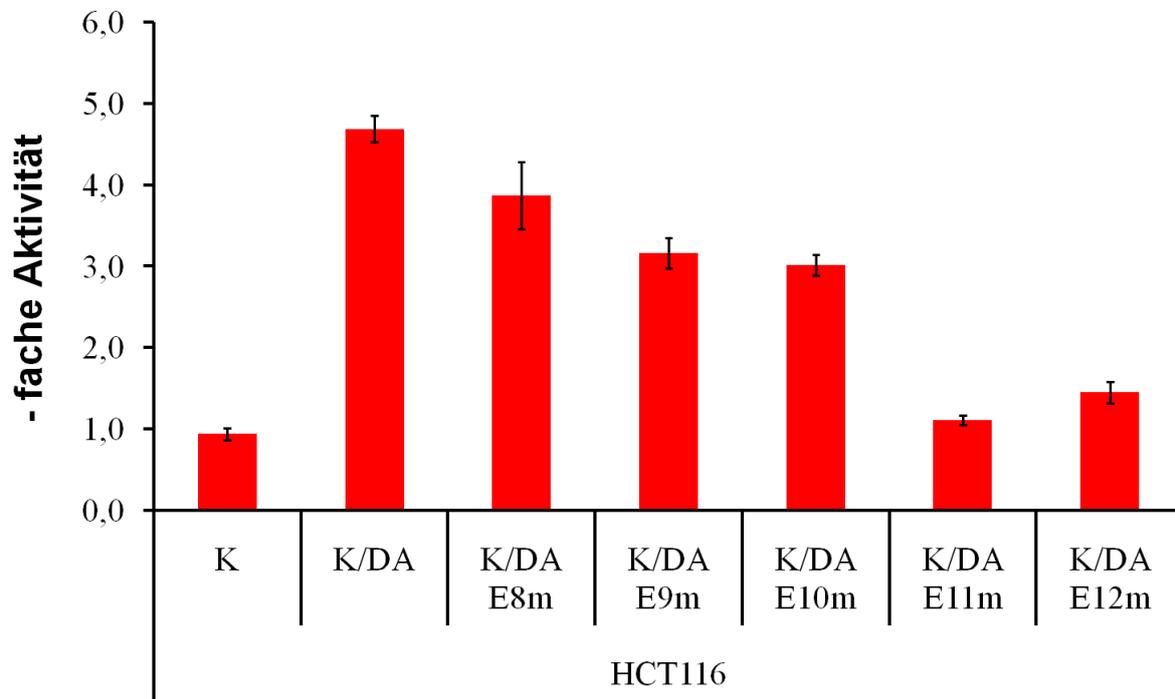


Abbildung 25: Ausmaß der Aktivierung der Konstrukte K, K/DA sowie der mutierten K/DA-Konstrukte (E8m - E12m) durch ITF-2B in HCT116-Zellen

HCT116-Zellen wurden mit den Konstrukten K, K/DA und den K/DA-Konstrukten mit den mutierten E-Boxen E8 (E8m), E9 (E9m), E10 (E10m), E11 (E11m) und E12 (E12m) transfiziert und die Reporter-gen-Aktivität bestimmt (siehe Abbildung 21). Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

3.12 ITF-2B reguliert p21^{Cip1} unabhängig von p53

Als nächstes sollte die Fragestellung untersucht werden, ob die Aktivierung des Promoter-Fragmentes DA (siehe Abbildung 21) durch ITF-2B abhängig oder unabhängig von p53 ist.

Hierfür wurden Reporteragen-Assays mit den Konstrukten K, L und K/DA in Zellen der Zelllinie HCT116 p53^{+/+} sowie HCT116 p53^{-/-}, die von B. Vogelstein von der Johns Hopkins University School of Medicine (Baltimore, U.S.A.) zur Verfügung gestellt wurden, durchgeführt.

Während die Aktivität des Konstrukts mit dem Promotor-Fragment L in den p53-defizienten Zellen im Vergleich zu den Wildtyp-Zellen reduziert war, war die Aktivität des Konstrukts K/DA in beiden Zelllinien etwa vergleichbar groß.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung des Promotor-Fragments DA des CDKN1A-Gens unabhängig von p53 ist.

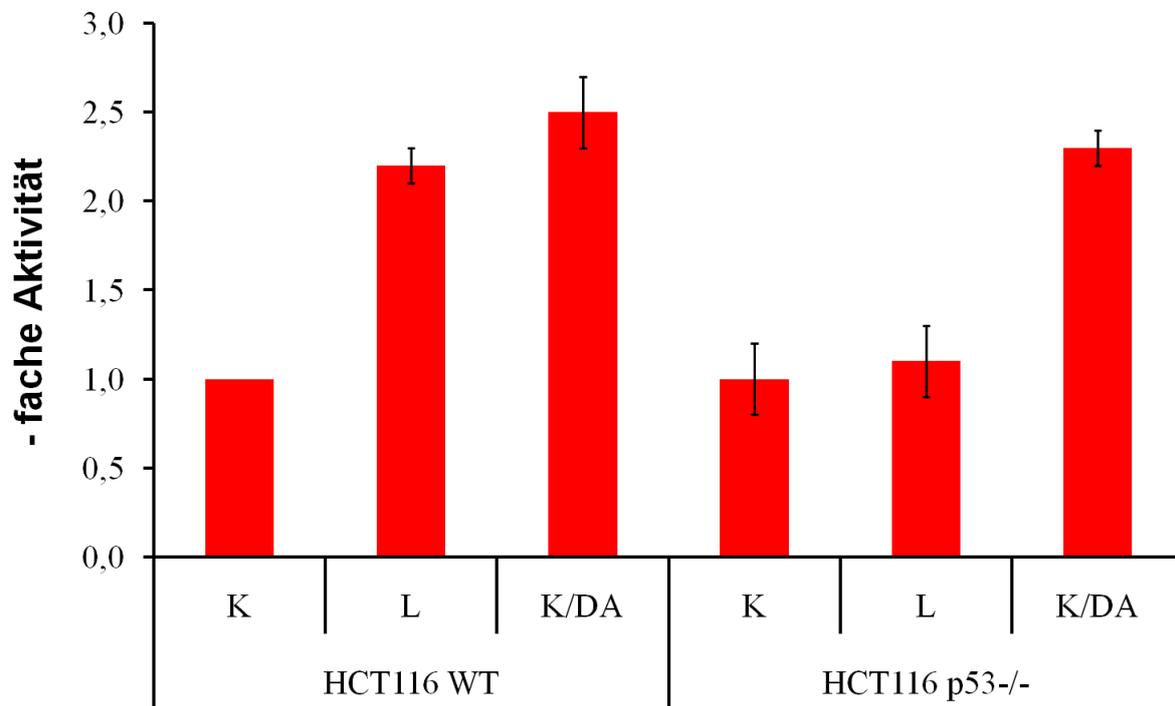


Abbildung 26: Aktivierung des Konstrukts K/DA durch ITF-2B ist unabhängig von p53

HCT116 WT-Zellen und HCT116 p53^{-/-}-Zellen wurden jeweils mit den Konstrukten K, L und K/DA transfiziert und die Reporteragen-Aktivität bestimmt (siehe Abbildung 21). Die jeweiligen Aktivitäten der Reporteragen-Konstrukte wurden auf die Aktivität des Konstrukts K bezogen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus zwei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchen.

4 Diskussion

4.1 ITF-2B führt zur Reduktion der Koloniebildung und Zellvitalität

ITF-2B gehört zur Klasse I¹²⁸ bzw. A¹²⁹ der bHLH Transkriptionsfaktoren. Kolligs et al.¹¹⁰ konnten im Jahr 2002 ITF-2B als ein Zielgen von β -Catenin, des Schlüssel molekuls im Wnt-Signalweg, identifizieren. Der Wnt-Signalweg und insbesondere die Deregulation von Komponenten in der Wnt-Kaskade nimmt in der kolorektalen Karzinogenese eine Schlüsselposition ein⁹⁵⁻⁹⁷. Durch Mutationen von Komponenten der Wnt-Kaskade kommt es zur Stabilisierung von β -Catenin und in der Folge zur unkontrollierten Transkription von β -Catenin/TCF-Zielgenen wie z.B. von ITF-2B. Aus diesem Grund ist es von besonderem Interesse, die Funktion von ITF-2B und seine Rolle im Prozess der kolorektalen Karzinogenese näher zu charakterisieren.

Es ist bekannt, dass den Proteinen der Klasse I der bHLH-Transkriptionsfaktoren vielfältige Aufgaben in Bereichen des Zellwachstums und der Differenzierung zukommen. Pagliuca et al. (2000)¹⁵⁴ konnten bereits zeigen, dass die Faktoren der Klasse A von bHLH-Transkriptionsfaktoren, zu denen die Faktoren ITF-2¹¹⁹ (=E2-2), HEB¹²⁴ sowie E12 und E47¹²¹ gehören, die Zellproliferation negativ regulieren. HeLa-Zellen (epitheliale Zervixkarzinom-Zellen), U2OS-Zellen und SaOS-2-Zellen (Osteosarkom-Zellen), NIH3T3-Zellen (murine Fibroblast-Zellen) und 293T-Zellen (humane Nierenkarzinomzellen) wurden jeweils mit den Faktoren ITF-2, HEB sowie E12 und E47 transfiziert und die Fähigkeit zur Koloniebildung mittels Colony Forming Assays analysiert. Dabei zeigte sich eine Reduktion der Anzahl der Kolonien durch die Expression der jeweiligen Faktoren. Dies zeigte, dass ITF-2 die Proliferationsfähigkeit der Zellen hemmt, eine Feststellung, die unerwartet erscheinen kann, zumal man bei einem Zielgen von β -Catenin, dessen mutierte Formen zur neoplastischen Transformation von Zellen führt¹³⁰, an Stelle von antiproliferativen Eigenschaften eher proliferative Effekte vermuten könnte. Diese Erkenntnisse jedoch waren ein erster Hinweis darauf, dass es sich bei ITF-2 und somit auch bei seiner Isoform ITF-2B eher um einen Tumorsuppressor als um ein Onkogen handelt. Da es sich bei den Zellen der Osteosarkom-Zelllinien um Zellen mit positivem (U2OS-Zellen) oder negativem (SaOS-2-Zellen) p53-Status handelt, bei beiden Zelllinien die Expression der Klasse I bHLH-Transkriptionsfaktoren jedoch zur Reduktion der Koloniebildung führte, kann man davon ausgehen, dass der beobachtete antiproliferative Effekt dieser Faktoren – und somit der von ITF-2 – unabhängig vom p53-Status ist¹⁵⁴.

Nachdem Pagliuca et al.¹⁵⁴ eine Reduktion der Koloniebildung durch E2-2 (=ITF-2) in verschiedenen nicht kolorektalen Zelllinien nachweisen konnten, war es zunächst Ziel dieser Arbeit, den Einfluss der ITF-2-Isoform ITF-2B auf die Koloniebildung in den kolorektalen Zelllinien DLD1, HCT116, SW480, SW620 und LoVo, die keine oder nur eine geringe endogene Expression von ITF-2B zeigen, mittels Colony Forming Assays zu untersuchen.

Hier zeigte sich, dass die Ergebnisse von Pagliuca et al.¹⁵⁴ auch auf die ITF-2-Isoform ITF-2B übertragen werden können, denn die Transfektion der kolorektalen Zelllinien mit pcDNA3 ITF-2B führte in all diesen Zelllinien zu einer deutlichen Reduktion der ausgezählten Kolonien.

Darüber hinaus wurde der Einfluss von ITF-2B auf die Fähigkeit von DLD1 ITF-2B-Zellen zur Bildung von Kolonien ohne Kontakt zu einem festen Untergrund untersucht. Dazu wurden Soft Agar Assays durchgeführt, eine von Hamburger und Salmon¹⁴⁶ beschriebene Methode. Für diesen und weitere Versuche wurden DLD1 ITF-2B-Zellen generiert, die durch Doxyzyklin induzierbar ITF-2B exprimieren können. In diesen Versuchen konnte auch der hemmende Einfluss von ITF-2B auf die Koloniebildung in Soft Agar Assays, d.h. auf Zellen, die keinen Kontakt zu einem festen Untergrund haben, gezeigt werden. Die Eigenschaft von neoplastisch transformierten Zellen ohne Kontakt zu einem festen Untergrund zu wachsen (*anchorage independent growth*) wurde bereits in den sechziger Jahren des vorigen Jahrhunderts von Macpherson und Montagnier¹⁵⁵ beschrieben. Allerdings konnte bereits in den siebziger Jahren des vorigen Jahrhunderts gezeigt werden, dass es zum einen Tumorzellen gibt, die nur auf festem Untergrund wachsen können¹⁵⁶, und zum anderen nicht neoplastisch veränderte Zellen in der Lage sein können, ohne Kontakt zu einem festen Untergrund zu wachsen¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. Die Fähigkeit von Zellen ohne Kontakt zu einem festen Untergrund zu wachsen ist ein sehr gutes Korrelat für die Malignität von Zellen *in vitro*^{160, 161}, wobei nicht jede Zelle mit dieser Eigenschaft zwingend neoplastisch verändert sein muss und nicht jede neoplastisch veränderte Zelle diese Eigenschaft besitzen muss. Die Zellen der kolorektalen Karzinomlinie DLD1 ITF-2B besitzen diese Eigenschaft des *anchorage independent growth*. Die induzierte Expression von ITF-2B in diesen Zellen führt aber zur Reduktion der Koloniebildung in Soft Agar, in dem die Zellen keinen Kontakt zum festen Untergrund haben. Wenn man die Eigenschaft des *anchorage independent growth* als Maß für die Malignität dieser Zellen auffasst, so kann man feststellen, dass durch die Expression von ITF-2B dieses Maß für die Malignität abnimmt. Diese Beobachtung unterstreicht weiterhin die antiproliferativen Eigenschaften von ITF-2B und seine Bedeutung als möglicher Tumorsuppressor. Die in den Colony Forming- und Soft Agar Assays beobachteten antiproliferativen Eigenschaften von ITF-2B konnten auch mittels MTT-Assay bestätigt werden: es zeigte sich nämlich, dass die induzierte Expression von ITF-2B zu einer deutlichen Reduktion des Proliferationsindex führt.

Herbst et al. (2009)¹³² konnten zeigen, dass ITF-2B, das auf dem Chromosom 18q21 lokalisiert wurde, vom allelischen Verlust dieser chromosomalen Region im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese betroffen ist. Dieser allelische Verlust wird als LOH (Loss of Heterozygosity) bezeichnet. Ein LOH auf dem langen Arm von Chromosom 18 kann in etwa 60-70% der kolorektalen Karzinome festgestellt werden, wobei der von dem allelischen Verlust betroffene chromosomale Bereich auf die Region 18q21 eingegrenzt werden konnte^{162, 163}. Vogelstein et al.²⁶ fanden im Jahr 1989 heraus, dass viele verschiedene chromosomale Regionen in kolorektalen Karzinomen vom LOH betroffen sein können,

darunter die Region 5q, auf der das APC-Gen lokalisiert ist, sowie die Regionen 8p, 18p, 18q, 22q und weitere mehr. Schon früh wurde der LOH als ein Mechanismus verstanden, mit dem Tumorzellen im Laufe der Karzinogenese Tumorsuppressorgene inaktivieren können. Aus diesem Grund wurde nach potentiellen Tumorsuppressorgenen gefahndet, die von LOH im kolorektalen Karzinom betroffen sind. Das erste potentielle Tumorsuppressorgen in der chromosomalen Region 18q21, in der auch das Gen für ITF-2B zu finden ist, wurde von Fearon et al.¹⁶² im Jahr 1990 entdeckt und als DCC (Deleted in Colon Cancer) bezeichnet. Andere potentielle Tumorsuppressorgene in dieser Region sind SMAD4 (DPC4)¹⁶⁴ und SMAD2 (MADR2)^{165, 166}. Allerdings waren Mutationen von DCC¹⁶⁷, SMAD2^{163, 169} und SMAD4^{168, 169} nur selten in kolorektalen Karzinomen nachweisbar; so zeigten etwa 35% der metastasierten kolorektalen Karzinome Mutationen von SMAD4¹⁶⁹.

Der allelische Verlust der chromosomalen Region 18q21 konnte häufiger in fortgeschrittenen Stadien kolorektaler Tumoren nachgewiesen werden; dies ist ein Hinweis darauf, dass der LOH zur Tumorprogression beiträgt^{169, 170}. Allerdings findet sich der LOH der chromosomalen Region 18q21 auch schon in frühen Stadien kolorektaler Karzinome¹⁷¹.

Herbst et al.¹³² identifizierten ITF-2B als ein Tumorsuppressorgen der Region 18q21, das vom LOH betroffen wird. Es konnte gezeigt werden, dass ITF-2B in Adenomen überexprimiert wird, während diese Expression in kolorektalen Karzinomen reduziert und in den meisten Fällen sogar vollständig verloren geht. Der Verlust der Expression von ITF-2B liegt also am Übergang vom Adenom- zum Karzinomstadium. Die Herabregulation von ITF-2B war allerdings unabhängig von β -Catenin-Signalweg.

Histondeacetylierung ist neben LOH ein zweiter Mechanismus zur Herabregulation der Expression von ITF-2B¹³².

Die in den Colony Forming-, Soft Agar- und MTT-Assays beschriebenen antiproliferativen Eigenschaften von ITF-2B lassen sich gut mit den Eigenschaften eines Tumorsuppressors vereinbaren, der im Stadium des Adenoms überexprimiert wird und somit die Tumorprogression aufhält. Durch den Verlust dieses Tumorsuppressors – bedingt durch LOH der chromosomalen Region 18q21 – am Übergang vom Adenom- zum Karzinomstadium fällt dieser antiproliferative Effekt weg und die Tumorprogression kann fortschreiten.

4.2 ITF-2B führt zum Zellzyklusarrest über die Expression des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1}

Der in den Colony Forming-, Soft Agar- sowie MTT-Assays beobachtete antiproliferative Effekt durch die Expression von ITF-2B warf die Frage nach dem Mechanismus der Proliferationshemmung auf. Um dies zu untersuchen, wurde die Zellzyklusverteilung von ITF-2B induzierbar exprimierenden DLD1 ITF-2B-Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Hierbei konnte durch die Expression von ITF-2B eine deutliche Zunahme der Zellen in der G₀/G₁-Phase bei einer gleichzeitigen Abnahme der Zellen in der S- und der G₂/M-Phase festgestellt werden, wobei keine Veränderung in der subG₁-Phase, die als Maß für avitale respektive apoptotische Zellen dienen kann, beobachtet werden konnte. Dies erhärtete den Verdacht, dass ITF-2B zu einer Proliferationshemmung über die Regulation des Zellzyklus führt.

Der Zellzyklus wird in verschiedene Phasen eingeteilt. Der M-Phase (Mitose-Phase) folgt die G₁-Phase (Gap₁-Phase), in der die diploide Zelle ihr Volumen vergrößert und sich auf die S-Phase (Synthese-Phase) vorbereitet, in der die DNA-Replikation stattfindet. Die nun tetraploide Zelle geht in die G₂-Phase über, in der sie sich auf die M-Phase vorbereitet, in der die Zelle geteilt und der Chromosomenbestand somit auf die beiden Tochterzellen verteilt wird. Nach der M-Phase folgt wieder die G₁-Phase. Daneben kann die Zelle nach der M-Phase in eine Ruhe-Phase, die sogenannte G₀-Phase übergehen, aus der sie aber wieder in den Zellzyklus eintreten kann. Die Phase des Zellzyklus zwischen zwei Mitosen wird auch als Interphase bezeichnet.¹⁷²

Der Zellzyklus wird in vielfacher Hinsicht reguliert. Dabei spielen Cyclin abhängige Kinasen (CDKs = Cyclin-Dependent Kinases), Cycline sowie Inhibitoren der CDKs, sogenannte CDKIs, eine wichtige Rolle. Die Cycline binden an die CDKs und aktivieren sie dadurch, wobei es verschiedene Cyclin/CDK-Komplexe gibt, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Zellzyklus aktiviert werden. So ist z.B. der Cyclin D/CDK4- oder der Cyclin D/CDK6-Komplex während der G₁-Phase von Bedeutung, während der Cyclin E/CDK2-Komplex für den Übergang von der G₁- in die S-Phase wichtig ist und der Cyclin B/CDK1-Komplex für den Übergang von der G₂- in die M-Phase entscheidend ist.¹⁷³⁻¹⁷⁵ Die Aktivität der CDKs wird durch die Aktivität der Cycline im Zellkern reguliert, denn die einzelnen Cycline sind nur während bestimmter Zellzyklusphasen aktiv¹⁷⁶.

Im Zellzyklus gibt es sogenannte „Checkpoints“, an denen der Zellzyklus angehalten werden kann, um eventuell aufgetretene Fehler zu korrigieren. Solche „Checkpoints“ gibt es z.B. beim Übergang von der G₁-Phase in die S-Phase und beim Übergang von der G₂-Phase in die M-Phase. Die Entscheidung, ob eine Zelle in die S-Phase eintreten kann, fällt am sog. R-Punkt (Restriktionspunkt)^{177, 178}. Hier wird durch die Aktivität der Cyclin D/CDK4(6)-Komplexe das Retinoblastomprotein, das als Wächter des Restriktionspunktes agiert, phosphoryliert. Dadurch werden Transkriptionsfaktoren der E2F-Familie aus der Bindung mit dem Retinoblastomprotein entlassen. Diese Transkriptionsfaktoren führen zur Expression

von für die S-Phase wichtigen Faktoren, wie z.B. von Cyclin E, und ermöglichen somit den Eintritt der Zelle in die S-Phase^{173, 174, 176-179}.

Die folgende Abbildung stellt den Zellzyklus mit den für die jeweiligen Zyklusphasen wichtigen Cyclinen und CDKs dar.

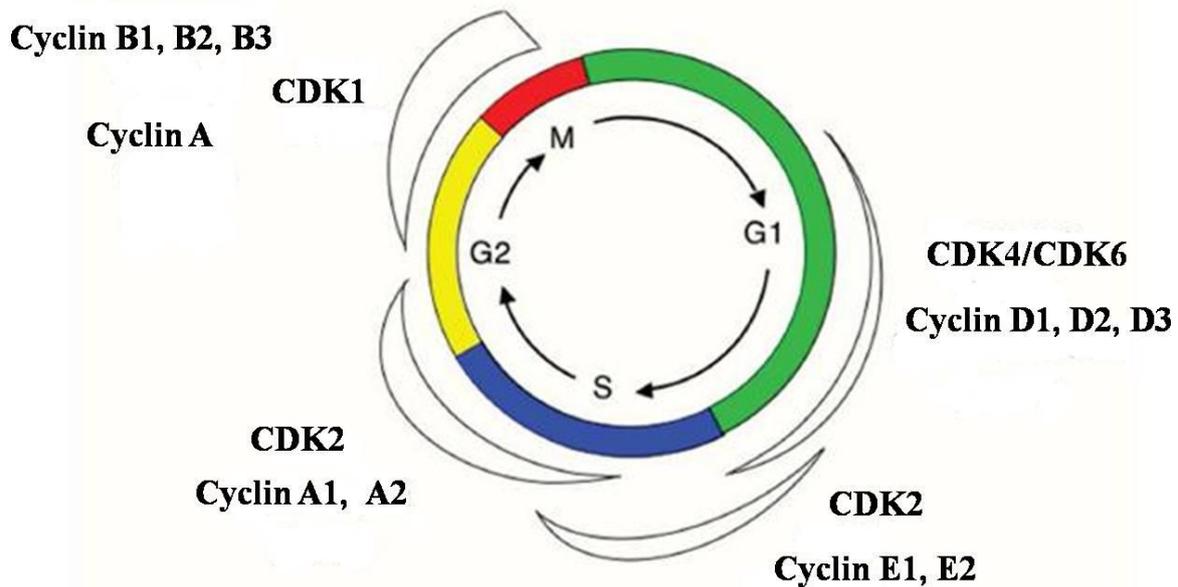


Abbildung 27: Zellzyklusphasen

Die Abbildung stellt die einzelnen Zellzyklusphasen (ausgenommen G_0 -Phase) und die jeweils für die einzelnen Phasen wichtigen Cycline und CDKs dar. Die Streifen um den Ring stellen die unterschiedliche Aktivität der einzelnen Cyclin/CDK-Komplexe in den jeweiligen Zellzyklusphasen dar. Abbildung modifiziert nach van den Heuvel (2005)¹⁷²

Außer durch Cycline wird die Aktivität der CDKs durch sogenannte CDKIs, das sind Inhibitoren der CDKs, reguliert. Die Inhibitoren der CDKs werden in zwei Familien eingeteilt. Eine Familie davon ist die INK4-Familie, die aus $p16^{INK4A}$ (p16), $p15^{INK4B}$ (p15), $p18^{INK4C}$ (p18) und $p19^{INK4D}$ (p19) besteht. Die Proteine dieser Familie bilden mit CDK4, CDK6 sowie den D-Cyclinen Komplexe und inaktivieren sie dadurch¹⁵⁰. Die zweite Familie der CDKIs ist die Cip/Kip-Familie, die aus $p21^{WAF1/Cip1}$ (p21), $p27^{Kip1}$ (p27) und $p57^{Kip2}$ (p57) besteht. Die Proteine der Cip/Kip-Familie gelten als universelle Inhibitoren der CDKs, da sie mit vielen verschiedenen CDKs und Cyclinen interagieren können^{150, 180}. Die Mitglieder der einzelnen CDKI-Familien, wie z.B. $p16^{181}$ oder $p21^{182}$, führen durch die Inhibition der CDKs, die für die Progression im Zellzyklus verantwortlich sind, zum Zellzyklusarrest.

Da in der durchflusszytometrischen Analyse der Zellzyklusverteilung von ITF-2B exprimierenden Zellen ein Zellzyklusarrest der Zellen in der G_0/G_1 -Phase nachzuweisen war,

wurde als nächstes untersucht, über welchen Zellzyklusinhibitor dieser Arrest durch ITF-2B vermittelt wird. Dabei zeigte sich in Western-Blot-Analysen, dass hauptsächlich der Zellzyklusinhibitor p21^{Cip1}, der zur Cip/Kip-Familie der CDKIs gehört, durch ITF-2B hochreguliert wird, wobei nachgewiesen werden konnte, dass die Expression von p21^{Cip1} in zeitlicher Abhängigkeit von der Expression von ITF-2B abhängt.

Darüber hinaus konnte durch die induzierbare Überexpression von p21^{Cip1} in DLD1 Cip1-Zellen durchflusszytometrisch nachgewiesen werden, dass die Expression von p21^{Cip1} alleine ausreicht, um den beobachteten Zellzykluseffekt hervorzurufen. Diese Ergebnisse stimmen mit von Cayrol et al.¹⁸³ gewonnenen Daten überein. Während Cayrol et al. aber einen durch p21^{Cip1} verursachten Zellzyklusarrest sowohl in der G₀/G₁- als auch in der G₂/M-Phase nachwies, konnte bei den Versuchen dieser Arbeit vor allem ein Arrest in der G₀/G₁-Phase festgestellt werden, der aber im Vergleich zu den Daten von Cayrol et al. viel ausgeprägter ausfiel. Es ist zu vermuten, dass der Unterschied möglicherweise durch die unterschiedlichen zur Anwendung gekommenen Protokolle mitbedingt ist: denn während in den Versuchen dieser Arbeit die DLD1 Cip1-Zellen während eines 96-stündigen Tetrazyklin-Entzugs nach zwei Tagen durch einen 32-stündigen Serumentzug in den Zellzyklusphasen synchronisiert wurden, untersuchten Cayrol et al. die Zellzyklusverteilung der DLD1 Cip1-Zellen nach 96-stündigem Tetrazyklin-Entzug ohne eine Synchronisierung der Zellen in den Zellzyklusphasen.

Durch *gene silencing* von CDKN1A – des p21^{Cip1}-Gens – auf posttranskriptioneller Ebene mittels siRNA-Transfektion konnte zudem gezeigt werden, dass der in den DLD1 ITF-2B-Zellen durch die induzierbare Expression von ITF-2B beobachtete Zellzyklusarrest durch das *gene silencing* von CDKN1A deutlich reduziert wurde. Somit war nachzuweisen, dass der durch ITF-2B vermittelte Zellzyklusarrest hauptsächlich über den CDK-Inhibitor p21^{Cip1} gesteuert wird.

Weiterführende Analysen von Herbst et al.¹³² untermauerten die Bedeutung von ITF-2B in der Regulation von p21^{Cip1}. So zeigten sie in immunhistochemischen Analysen, dass sowohl ITF-2B als auch p21^{Cip1} in Adenomen exprimiert werden, dass aber die Expression beider Faktoren am Übergang vom Adenom- ins Karzinomstadium verloren geht. Darüber hinaus wurde sowohl für das Adenom- als auch für das Karzinomstadium eine signifikante statistische Korrelation zwischen der Expression der beiden Faktoren ITF-2B und p21^{Cip1} nachgewiesen.

Die Versuche von El-Deiry et al.¹⁸⁴ zeigten, dass p21^{Cip1} abhängig vom Tumorsuppressor p53¹⁸⁵ hochreguliert wird und zum Zellzyklusarrest führt. Sie entwarfen folgendes Modell: Wird eine Zelle geschädigt, so wird der Tumorsuppressor p53 vermehrt exprimiert. Dieser wiederum interagiert mit regulatorischen Elementen von CDKN1A und führt dadurch zur Expression von p21^{Cip1}. p21^{Cip1} interagiert seinerseits im Zellkern mit Cyclin/CDK-Komplexen. Dadurch kann die Zelle nicht in die S-Phase übergehen und wird in der G₁-Phase

arretiert. Dieses Modell wurde durch die Tatsache unterstützt, dass p21^{Cip1}-defiziente Embryo-Fibroblasten der Maus in ihrer Fähigkeit beeinträchtigt werden, nach erlittenem Zellschaden einen durch p53 induzierten Zellzyklusarrest zu bewirken¹⁸⁶. In p21^{Cip1}-defizienten kolorektalen Karzinomzellen wurde diese Fähigkeit der Zellen, einen G₁-Arrest nach erlittenem Zellschaden zu induzieren, sogar komplett aufgehoben¹⁸⁷.

Allerdings kann p21^{Cip1} einen Zellzyklusarrest auch unabhängig von p53 induzieren¹⁸³, denn die Expression von p21^{Cip1} in p53-defizienten DLD1 Cip1-Zellen führt zum Zellzyklusarrest. Cayrol et al.¹⁸³ gelang es zu zeigen, dass es neben der Inhibition von CDKs einen weiteren Mechanismus gibt, über den p21^{Cip1} einen Zellzyklusarrest induzieren kann. p21^{Cip1} kann nämlich als einziger der CDKIs an PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) binden. PCNA spielt eine wichtige Rolle in der DNA-Replikation: es dient den DNA-Polymerasen δ und ϵ als eine Art Klemme bzw. Halterung, in dem es die Polymerasen während der Replikation an den DNA-Strang führt. Außerdem wird PCNA auch für die DNA-Reparatur und für DNA-Rekombinationen benötigt¹⁸⁸. Cayrol et al.¹⁸³ fanden heraus, dass p53-defiziente DLD1 Zellen, die den p21^{Cip1}-Wildtyp exprimieren, ebenso einen G₁- und G₂-Arrest induzieren konnten wie DLD1-Zellen, die eine in der Bindungsregion für die CDKs mutierte Form von p21^{Cip1} exprimieren. Dagegen konnte bei DLD1-Zellen, die eine mutierte Form von p21^{Cip1} mit Mutationen in der Bindungsregion für PCNA enthielten, kein Zellzyklusarrest nachgewiesen werden. p21^{Cip1} kann also einen Zellzyklusarrest zum einen über die Inhibition von CDKs bewirken, zum anderen über die Interaktion und Hemmung des für die DNA-Replikation wichtigen PCNA. Diese unterschiedlichen Mechanismen könnten auch erklären, warum zum einen Systeme beschrieben wurden, in denen p21^{Cip1} einen G₁-Arrest induziert, während in anderen Fällen sowohl ein G₁- als auch ein G₂-Arrest beobachtet werden kann. Cayrol et al.¹⁸³ schließen aus ihren Versuchen, dass der von ihnen beobachtete Zellzyklusarrest sowohl in der G₁- als auch in der G₂-Phase über die Interaktion von p21^{Cip1} mit PCNA vermittelt wird; überwiegt hingegen die Interaktion von p21^{Cip1} mit den CDKs, so resultiert ein Arrest in der G₁-Phase. In den Versuchen dieser Arbeit konnte durch die Überexpression von p21^{Cip1} ein starker Arrest der DLD1-Zellen in der G₁-Phase nachgewiesen werden. Legt man nun dieses von Cayrol et al.¹⁸³ entworfene Modell zu Grunde, so kann man folgern, dass in den Versuchen dieser Arbeit die Interaktion von p21^{Cip1} mit den CDKs überwog und somit die Interaktion von p21^{Cip1} mit PCNA maskiert wurde. Für den beobachteten G₁-Arrest in den Versuchen dieser Arbeit ist also vermutlich eher der Mechanismus von Bedeutung und weniger der Unterschied in den zu Grunde liegenden Protokollen – wie weiter oben angenommen wurde.

Die Versuche mit den DLD1 Cip1-Zellen, in denen die Zellzyklusverteilung auf die induzierte Überexpression von p21^{Cip1} hin analysiert wurde, und die Versuche mit den DLD1 ITF-2B-Zellen, in denen der Effekt des *gene silencing* von CDKN1A auf die Zellzyklusverteilung analysiert wurde, zeigten, dass p21^{Cip1} in diesen Zellen alleine ausreicht, um einen Zellzyklusarrest zu induzieren. Diese Feststellung ist deswegen wichtig, weil die Expression von p21^{Cip1} alleine nicht zwangsläufig die Proliferation hemmt. So konnten z.B.

Jung et al.¹⁸⁹ zeigen, dass p21^{Cip1} in Glioblastom-Zellen nicht ausreicht, um das Zellwachstum zu hemmen. Barboule et al.¹⁹⁰ konnten in humanen Adenokarzinomen des Ovars keine signifikante Korrelation zwischen der Expression von p21^{Cip1} und der Proliferationsrate der Tumoren feststellen. Darüber hinaus ist es wichtig festzuhalten, dass es viele Faktoren gibt, die mit p21^{Cip1} interagieren können und dadurch zur Aktivierung oder Hemmung von p21^{Cip1} führen können¹⁹¹. Zu diesen Faktoren gehört beispielsweise Delta NP63¹⁹², eine Splice-Variante des zu p53 homologen Proteins p63. Die Aktivität von p21^{Cip1} wird außerdem durch die Modulation der Aktivität mancher p21^{Cip1}-regulierender Faktoren und durch die Modulation auf transkriptioneller oder epigenetischer Ebene reguliert¹⁹¹.

4.3 ITF-2B reguliert CDKN1A auf transkriptioneller Ebene unabhängig von p53

Die Erkenntnis, dass der bHLH-Transkriptionsfaktor ITF-2B zum Zellzyklusarrest in der G₁-Phase über die Expression des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1} führt, zog weitere Untersuchungen nach sich, die sich mit der Frage beschäftigten, ob ITF-2B das p21^{Cip1}-Gen auf transkriptioneller Ebene reguliert und welche Promotor-Regionen für diese Interaktion verantwortlich sind.

Pagliuca et al.¹⁵⁴ konnten zuvor bereits zeigen, dass Vertreter der Klasse I von bHLH-Transkriptionsfaktoren die Promotoren verschiedener Gene von CDKs regulieren können. So konnte auch eine mäßig ausgeprägte Aktivierung eines p21^{Cip1}-Promotorfragments durch den Faktor E2-2 (=ITF-2B) nachgewiesen werden. Diese Experimente wurden an Zellen der humanen Nierenkarzinomzelllinie 293T sowie an Zellen der Zervixkarzinomzelllinie HeLa durchgeführt. Der durch ITF-2B aktivierte Promotorbereich reichte in den Versuchen von Pagliuca et al.¹⁵⁴ vom Nukleotid -2329 bis zum Nukleotid +11 bezogen auf die Startposition des ersten Exons des CDKN1A-Gens.

In den Reportergen Assays dieser Arbeit konnten die Ergebnisse von Pagliuca et al.¹⁵⁴ bestätigt werden. In Zellen der kolorektalen Karzinomzelllinie HCT116 konnte ITF-2B ein Promotorfragment (Nukleotid -2523 bis Nukleotid +100 bezogen auf die Startposition des ersten Exons von CDKN1A), dessen Länge und Position dem von Pagliuca et al.¹⁵⁴ gewählten sehr ähnlich ist, aktivieren, wenn auch nur gering.

Die Suche nach weiteren potentiellen Bindungsstellen für ITF-2B führte zur Identifikation des sehr kleinen Promotor-Fragments DA (siehe Abbildung 21) im Bereich des ersten Introns von CDKN1A, das fünf E-Boxen (E8, E9, E10, E11, E12) beinhaltet und über ITF-2B reguliert wird. Als E-Box wird die palindromische Sequenz CANNTG (N steht dabei für ein beliebiges Nukleotid) bezeichnet, mit der bHLH-Transkriptionsfaktoren interagieren können. Durch Mutation jeder einzelnen E-Box im Promotorfragment DA konnten die E-Boxen E11 sowie E12 als Bindestellen für den bHLH-Transkriptionsfaktor ITF-2B identifiziert werden. Durch Chromatin-Immunpräzipitation konnte die direkte Interaktion von ITF-2B mit den E-Boxen 9-12 nachgewiesen werden¹³².

Somit ließen sich neue mit ITF-2B interagierende E-Boxen identifizieren. Darüber hinaus zeigte sich, dass ITF-2B mit dem Promotor-Fragment DA von CDKN1A unabhängig vom p53-Status interagiert. Diese Erkenntnis stimmt mit Daten von Pagliuca et al.¹⁵⁴ überein, die

nachgewiesen haben, dass E2-2 (=ITF-2B) zu einer Reduktion der Koloniebildung unabhängig vom p53-Status führt.

p21^{Cip1} spielt eine wichtige Rolle im Prozess der kolorektalen Karzinogenese. Herbst et al.¹³² zeigten, dass die Expression von p21^{Cip1} am Übergang vom Adenom- ins Karzinomstadium stark reduziert wird. Man kann aus dieser Erkenntnis folgern, dass die Expression von p21^{Cip1} eine protektive Funktion im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese innehat. Efeyan et al.¹⁹³ konnten in einem Mausmodell, in dem Fibrosarkome induziert wurden, folgendes zeigen: Super-p53-Mäuse, die drei Kopien des p53-Gens besitzen, haben bezogen auf das Tumorfremie Überleben einen Überlebensvorteil im Vergleich zu Mäusen mit p53-Wildtyp. In Abwesenheit von p21^{Cip1} wird dieser protektive Effekt der Super-p53-Mäuse allerdings signifikant gemindert. Dies unterstreicht weiterhin den protektiven Effekt von p21^{Cip1}.

In APC1638^{+/-}-Mäusen, die ein mutiertes APC-Allel besitzen, führt die Elimination beider Allele des Gens für p21^{Cip1} zur Zunahme der Häufigkeit und der Größe intestinaler Tumoren¹⁹⁴.

Die Expression von p21^{Cip1} hat auch klinische Relevanz: Zirbes et al.¹⁹⁵ konnten in 67% der untersuchten kolorektalen Karzinome die Expression von p21^{Cip1} nachweisen. Die 5-Jahres-Überlebensrate von Patienten mit p21^{Cip1} exprimierenden kolorektalen Tumoren lag bei 52,3%, während sie bei Patienten mit kolorektalen Tumoren mit negativem p21^{Cip1}-Status bei 38,1% lag. Eine neuere Studie bei Patienten mit kolorektalen Karzinomen konnte die prognostische Relevanz des p21^{Cip1}-Status unterstreichen: während bei Patienten mit niedrigem p21^{Cip1}-Status eine 5-Jahres-Überlebensrate von 56% festgestellt wurde, lag sie bei Patienten mit hohem p21^{Cip1}-Status bei 70%¹⁹⁶.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass durch die Versuche dieser Arbeit die Rolle von ITF-2B als potentieller Tumorsuppressor gefestigt werden konnte. Es konnte gezeigt werden, dass ITF-2B einen antiproliferativen Effekt besitzt, der über die Regulation des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1} auf transkriptioneller Ebene vermittelt wird. Dabei konnten neue E-Boxen im Bereich des ersten Introns von CDKN1A identifiziert werden, mit denen ITF-2B interagiert. Der antiproliferative Effekt von ITF-2B beruht dabei auf einem durch p21^{Cip1} induzierten Zellzyklusarrest.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Funktion von ITF-2B zu charakterisieren. Es ist gelungen den antiproliferativen Effekt in verschiedenen methodischen Ansätzen (*Colony Forming*-, *Soft Agar*-, MTT-Assays) aufzuzeigen und den zu Grunde liegenden Mechanismus der Zellzyklusinhibition vermittelt über p21^{Cip1} näher zu beschreiben. Zusammen mit weiterführenden Analysen von Herbst et al.¹³² konnte die Bedeutung von ITF-2B als möglicher Tumorsuppressor im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese herausgearbeitet werden.

5 Zusammenfassung

Darmkrebs ist in Deutschland sowohl bei Männern als auch bei Frauen die zweithäufigste Krebsart und die zweithäufigste Todesursache durch Krebs.

Deregulationen im Wnt-Signalweg sind entscheidende Faktoren in der neoplastischen Transformation normaler kolorektaler Schleimhaut. Durch Deregulationen in der Wnt-Kaskade kommt es zur Stabilisierung von freiem β -Catenin und zur Deregulation der Transkription von β -Catenin/Tcf-Zielgenen. Bis heute sind bereits viele β -Catenin/Tcf-Zielgene identifiziert worden. ITF-2B konnte als eines dieser Zielgene identifiziert werden. ITF-2B ist ein Transkriptionsfaktor aus der Klasse I der basic Helix-Loop-Helix (bHLH) – Transkriptionsfaktoren. Proteine der Klasse I von bHLH-Transkriptionsfaktoren spielen eine bedeutende Rolle in Vorgängen des Zellwachstums und der Differenzierung.

Ziel dieser Arbeit war es die Funktion von ITF-2B zu charakterisieren, um einen Beitrag zum Verständnis der Rolle bzw. der Funktion von ITF-2B im Rahmen der kolorektalen Karzinogenese zu leisten. Da ITF-2B ein Vertreter der bHLH-Transkriptionsfaktoren, die für das Zellwachstum und in Differenzierungsvorgängen von Bedeutung sind, darstellt, wurde zunächst der Einfluss von ITF-2B auf die Proliferation in verschiedenen methodischen Ansätzen (*Colony Forming*-, *Soft Agar*-, MTT-Assays) untersucht und davon ausgehend der zu Grunde liegende Mechanismus der Zellzyklusinhibition auf proteinchemischer und molekularbiologischer Ebene näher beschrieben.

Zunächst konnte in verschiedenen kolorektalen Karzinomzelllinien gezeigt werden, dass die Expression von ITF-2B zur Reduktion der Anzahl von Kolonien in *Colony Forming Assays* führt. Es wurden DLD1 ITF-2B-Zellen generiert, um ein System zur Verfügung zu haben, mit dem die Expression von ITF-2B durch Doxyzyklin induziert werden kann. Mit Hilfe dieser Zellen bestätigte sich der antiproliferative Effekt von ITF-2B sowohl in *Soft Agar Assays*, in denen die Fähigkeit zur Koloniebildung ohne festen Kontakt zu einem festen Untergrund untersucht wird, als auch in MTT-Assays.

In der durchflusszytometrischen Untersuchung von DLD1 ITF-2B-Zellen konnte der antiproliferative Effekt von ITF-2B auf die Induktion eines Zellzyklusarrestes zurückgeführt werden. Weitere Untersuchungen ergaben, dass der durch ITF-2B induzierte Zellzyklusarrest über den Cyclin Dependent Kinase Inhibitor (CDKI) p21^{Cip1} aus der Cip/Kip-Familie der CDKIs vermittelt wird. Dabei konnte sowohl durch Versuche mit DLD1 Cip1-Zellen, in denen p21^{Cip1} induzierbar überexprimiert wurde, als auch durch Versuche mit DLD1 ITF-2B-Zellen, in denen das p21^{Cip1}-Gen CDKN1A durch *gene silencing* auf posttranskriptioneller mRNA-Ebene herunterreguliert wurde, gezeigt werden, dass die Expression von p21^{Cip1} in diesen Zellen alleine ausreicht, um einen Zellzyklusarrest zu induzieren.

Durch Reportergen Assays konnte dann abschließend gezeigt werden, dass ITF-2B CDKN1A auf transkriptioneller Ebene unabhängig von p53 reguliert. Es gelang, das sehr kleine Promotor-Fragment DA (siehe Abbildung 21) im Bereich des ersten Introns von CDKN1A zu identifizieren, das fünf E-Boxen (E8, E9, E10, E11, E12) enthält und über ITF-2B reguliert wird. Durch Mutation jeder einzelnen E-Box im Promotorfragment DA konnten die E-Boxen E11 sowie E12 als Bindestellen für den bHLH-Transkriptionsfaktor ITF-2B identifiziert werden.

Insgesamt konnte durch die Versuche dieser Arbeit gezeigt werden, dass ITF-2B einen antiproliferativen Effekt besitzt, der über die Regulation des Zellzyklusinhibitors p21^{Cip1} auf

transkriptioneller Ebene vermittelt wird. Die Rolle von ITF-2B als potentieller Tumorsuppressor wird dadurch unterstützt.

6 Literaturverzeichnis

1. Stewart B.W. and Kleihues P. (Eds): World Cancer Report. IARCPress. Lyon 2003. Seite 198
2. Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe . Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg). Berlin, 2010
3. Stigliano V., Assisi, D., Cosimelli, M., Palmirota, R., Giannarelli, D., Mottolese, M., Mete, L.S., Mancini, R., Casale, V. (2008). Survival of hereditary non-polyposis colorectal cancer patients compared with sporadic colorectal cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res.* 19, 27-39
4. Peters U et al. (2003). Dietary fibre and colorectal adenoma in a colorectal cancer early detection programme. *Lancet* 361, 1491–1495
5. Bingham S.A. et al. (2003). Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study. *Lancet* 361, 1496–1501
6. Terry P et al. (2001). Fruit, vegetables, dietary fiber, and risk of colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 93, 525–533
7. Voskuil DW et al. (2002.) Meat consumption and meat preparation in relation to colorectal adenomas among sporadic and HNPCC family patients in The Netherlands. *Eur J Cancer* 38, 2300–2308
8. Yoon H et al. (2000). Systematic review of epidemiological studies on meat, dairy products and egg consumption and risk of colorectal adenomas. *Eur J Cancer Prev* 9, 151–164
9. Takeshita T et al. (2000). Relationships between cigarette smoking, alcohol drinking, the ALDH2 genotype and adenomatous types of colorectal polyps in male self defense force officials. *J Epidemiol* 10, 366–371
10. Fuchs CS et al. (2002). The influence of folate and multivitamin use on the familial risk of colon cancer in women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11, 227–234

11. Pedersen A, Johansen C, Gronbaek M. (2003). Relations between amount and type of alcohol and colon and rectal cancer in a Danish population based cohort study. *Gut* 52, 861–867
12. Chao A et al. (2000). Cigarette smoking and colorectal cancer mortality in the cancer prevention study II. *J Natl Cancer Inst* 92, 1888–1896
13. Giovannucci E. (2001). An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 725–731
14. Reid ME et al. (2003). Smoking exposure as a risk factor for prevalent and recurrent colorectal adenomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12, 1006–1011
15. Martinez ME et al. (1999). Physical activity, body mass index, and prostaglandin E2 levels in rectal mucosa. *J Natl Cancer Inst* 91, 950–953
16. Giovannucci E. (2002). Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 31, 925–943
17. Friedenreich CM, Orenstein MR. (2002). Physical activity and cancer prevention: etiologic evidence and biological mechanisms. *J Nutr* 132, 3456S–3464S
18. Wu K et al. (2002). Calcium intake and risk of colon cancer in women and men. *J Natl Cancer Inst* 94, 437–446
19. Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität. *Manual Gastrointestinale Tumoren*. 8. Auflage 2010. S. 149
20. Jellema P, van der Windt DA, Bruinvels DJ, Mallen CD, van Weyenberg SJ, Mulder CJ, de Vet HC. Value of symptoms and additional diagnostic tests for colorectal cancer in primary care: systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2010 Mar 31;340:c1269. doi: 10.1136/bmj.c1269. Review.
21. Astin M, Griffin T, Neal RD, Rose P, Hamilton W. The diagnostic value of symptoms for colorectal cancer in primary care: a systematic review. *Br J Gen Pract*. 2011 May;61(586):e231-43. Review.
22. Schmiegel W et al. S3-Leitlinie „Kolorektales Karzinom“... *Z Gastroenterol* 2008; 46: 1–73

23. André T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, Navarro M, Taberero J, Hickish T, Topham C, Zaninelli M, Clingan P, Bridgewater J, Tabah-Fisch I, de Gramont A; Multicenter International Study of Oxaliplatin/5-Fluorouracil/Leucovorin in the Adjuvant Treatment of Colon Cancer (MOSAIC) Investigators. (2004). Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med.* 350, 2343-51
24. Tumorregister München (TRM) des Tumorzentrums München (TZM) am Institut für medizinische Informationsverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie (IBE)
25. B Vogelstein, ER Fearon, SR Hamilton, SE Kern, AC Preisinger, M Leppert, Y Nakamura, R White, AM Smits, and JL Bos (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319, 525-532
26. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R (1989). Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 244, 207-11
27. Fearon ER, Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 61, 759-67
28. Tamura G, Sakata K, Maesawa C, Suzuki Y, Terashima M, Satoh K, Sekiyama S, Suzuki A, Eda Y, Satodate R (1995). Microsatellite alterations in adenoma and differentiated adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res.* 55, 1933-6
29. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature.* 363, 558-61
30. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science.* 260, 816-9
31. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R (1993). The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell.* 75, 1027-38
32. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, et al. (1994). Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature.* 368, 258-61
33. Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al. (1994). Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science.* 263, 1625-9

34. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, et al. (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 260, 812-6
35. Rüschoff J, Bocker T, Schlegel J, Stumm G, Hofstaedter F (1995). Microsatellite instability: new aspects in the carcinogenesis of colorectal carcinoma. *Virchows Arch*. 426, 215-22
36. Marra G, Boland CR (1995). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst*. 87, 1114-25
37. Kondo Y, Issa JP (2004). Epigenetic changes in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 23, 29-39
38. Issa JP (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer*. 4, 988-93
39. Rashid A, Issa JP (2004). CpG island methylation in gastroenterologic neoplasia: a maturing field. *Gastroenterology*. 127, 1578-88
40. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, Issa JP (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 9681-6
41. van Rijnsoever M, Grieu F, Elsaleh H, Joseph D, Iacopetta B (2002). Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut*. 51, 797-802
42. Nusse R, Varmus HE. (1982). Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, 99-109
43. Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. (1987). The *Drosophila* homolog of the mouse mammary oncogene *int-1* is identical to the segment polarity gene *wingless*. *Cell*. 50, 649-57
44. Clevers H (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480. Review
45. Willert K, Brown JD, Danenberg E, Duncan AW, Weissman IL, Reya T, Yates JR 3rd, Nusse R. (2003). Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors. *Nature* 423, 448-52

46. Banziger, C., Soldini, D., Schutt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G., Basler, K. (2006). Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of wnt proteins from signaling cells. *Cell* 125, 509–522.
47. Bartscherer, K., Pelte, N., Ingelfinger, D., and Boutros, M. (2006). Secretion of wnt ligands requires evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* 125, 523–533.
48. Coudreuse, D.Y., Roel, G., Betist, M.C., Destree, O., and Korswagen, H.C. (2006). Wnt gradient formation requires retromer function in Wntproducing cells. *Science* 312, 921–924.
49. Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. (1996). A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* 382, 225-30
50. Pinson KI, Brennan J, Monkley S, Avery BJ, Skarnes WC. (2000). An LDL-receptor-related protein mediates Wnt signalling in mice. *Nature* 407, 535-8
51. Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407, 530-5
52. Wehrli M, Dougan ST, Caldwell K, O'Keefe L, Schwartz S, Vaizel-Ohayon D, Schejter E, Tomlinson A, DiNardo S. (2000). arrow encodes an LDL-receptor-related protein essential for Wingless signalling. *Nature* 407, 527-30
53. Xu, Q., Wang, Y., Dabdoub, A., Smallwood, P.M., Williams, J., Woods, C., Kelley, M.W., Jiang, L., Tasman, W., Zhang, K., and Nathans, J. (2004). Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 116, 883–895.
54. Nam, J.S., Turcotte, T.J., Smith, P.F., Choi, S., and Yoon, J.K. (2006). Mouse Cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *J. Biol. Chem.* 281, 13247–13257
55. Glinka, A., Wu, W., Delius, H., Monaghan, A.P., Blumenstock, C., and Niehrs, C. (1998). Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature* 391, 357–362

56. Mao, B., Wu, W., Davidson, G., Marhold, J., Li, M., Mechler, B.M., Delius, H., Hoppe, D., Stannek, P., Walter, C., et al. (2002). Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signaling. *Nature* 417, 664–667
57. Semenov, M., Tamai, K., and He, X. (2005). SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *J. Biol. Chem.* 280, 26770–26775
58. Itasaki, N., Jones, C.M., Mercurio, S., Rowe, A., Domingos, P.M., Smith, J.C., and Krumlauf, R. (2003). Wise, a context-dependent activator and inhibitor of Wnt signaling. *Development* 130, 4295–4305
59. Hsieh, J.C., Kodjabachian, L., Rebert, M.L., Rattner, A., Smallwood, P.M., Samos, C.H., Nusse, R., Dawid, I.B., and Nathans, J. (1999). A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature* 398, 431–436
60. Piccolo, S., Agius, E., Leyns, L., Bhattacharyya, S., Grunz, H., Bouwmeester, T. and de Robertis, E. M. (1999). The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. *Nature* 397, 707-710
61. Uren, A., Reichsman, F., Anest, V., Taylor, W. G., Muraiso, K., Bottaro, D. P., Cumberledge, S. and Rubin, J. S. (2000). Secreted frizzled-related protein-1 binds directly to Wingless and is a biphasic modulator of Wnt signaling. *J. Biol. Chem.* 275, 4374-4382
62. Hart MJ, de los Santos R, Albert IN, Rubinfeld B, Polakis P. (1998). Downregulation of beta-catenin by human Axin and its association with the APC tumor suppressor, beta-catenin and GSK3 beta. *Curr Biol.* 8, 573-81
63. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. (2002). Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell* 108, 837-47
64. Amit S, Hatzubai A, Birman Y, Andersen JS, Ben-Shushan E, Mann M, Ben-Neriah Y, Alkalay I. (2002). Axin-mediated CKI phosphorylation of beta-catenin at Ser 45: a molecular switch for the Wnt pathway. *Genes Dev* 16, 1066-76
65. Ikeda S, Kishida S, Yamamoto H, Murai H, Koyama S, Kikuchi A. (1998). Axin, a negative regulator of the Wnt signaling pathway, forms a complex with GSK-3beta and beta-catenin and promotes GSK-3beta-dependent phosphorylation of beta-catenin. *EMBO J* 17, 1371-84

66. Hart M, Concordet JP, Lassot I, Albert I, del los Santos R, Durand H, Perret C, Rubinfeld B, Margottin F, Benarous R, Polakis P. (1999). The F-box protein beta-TrCP associates with phosphorylated beta-catenin and regulates its activity in the cell. *Curr Biol* 9, 207-10
67. Winston JT, Strack P, Beer-Romero P, Chu CY, Elledge SJ, Harper JW. (1999). The SCFbeta-TRCP-ubiquitin ligase complex associates specifically with phosphorylated destruction motifs in IkappaBalpha and beta-catenin and stimulates IkappaBalpha ubiquitination in vitro. *Genes Dev* 13, 270-83
68. Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. (1997). beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J* 16, 3797-804
69. Axelrod JD, Miller JR, Shulman JM, Moon RT, Perrimon N. (1998). Differential recruitment of Dishevelled provides signaling specificity in the planar cell polarity and Wingless signaling pathways. *Genes Dev* 12, 2610-22
70. Kishida S, Yamamoto H, Hino S, Ikeda S, Kishida M, Kikuchi A. (1999). DIX domains of Dvl and axin are necessary for protein interactions and their ability to regulate beta-catenin stability. *Mol Cell Biol* 19, 4414-22
71. Yang J, Wu J, Tan C, Klein PS. (2003). PP2A:B56epsilon is required for Wnt/beta-catenin signaling during embryonic development. *Development* 130, 5569-78
72. Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z, He X. (2004). A mechanism for Wnt coreceptor activation. *Mol Cell* 13, 149-56
73. Fagotto F, Glück U, Gumbiner BM. (1998). Nuclear localization signal-independent and importin/karyopherin-independent nuclear import of beta-catenin. *Curr Biol* 8, 181-90
74. Chen J, Wu A, Sun H, Drakas R, Garofalo C, Cascio S, Surmacz E, Baserga R (2005). Functional significance of type 1 insulin-like growth factor-mediated nuclear translocation of the insulin receptor substrate-1 and beta-catenin. *J Biol Chem.* 280, 29912-20
75. Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. (1996). Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* 382, 638-42
76. Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H. (1996). XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell* 86, 391-9

77. Levanon, D., Goldstein, R.E., Bernstein, Y., Tang, H., Goldenberg, D., Stifani, S., Paroush, Z., and Groner, Y. (1998). Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 11590–11595
78. Roose, J., Molenaar, M., Peterson, J., Hurenkamp, J., Brantjes, H., Moerer, P., van de Wetering, M., Destree, O., and Clevers, H. (1998). The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature* 395, 608–612
79. Brannon, M., Brown, J.D., Bates, R., Kimelman, D., and Moon, R.T. (1999). XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development* 126, 3159–3170
80. Tago K, Nakamura T, Nishita M, Hyodo J, Nagai S, Murata Y, Adachi S, Ohwada S, Morishita Y, Shibuya H, Akiyama T. (2000). Inhibition of Wnt signaling by ICAT, a novel beta-catenin-interacting protein. *Genes Dev* 14, 1741-9
81. Takemaru K, Yamaguchi S, Lee YS, Zhang Y, Carthew RW, Moon RT.(2003). Chibby, a nuclear beta-catenin-associated antagonist of the Wnt/Wingless pathway. *Nature* 422, 905-9
82. Thompson B, Townsley F, Rosin-Arbesfeld R, Musisi H, Bienz M. (2002). A new nuclear component of the Wnt signalling pathway. *Nat Cell Biol* 4, 367-73
83. Parker, D.S., Jemison, J., and Cadigan, K.M. (2002). Pygopus, a nuclear PHD-finger protein required for Wingless signaling in *Drosophila*. *Development* 129, 2565–2576
84. Kramps, T., Peter, O., Brunner, E., Nellen, D., Froesch, B., Chatterjee, S., Murone, M., Zullig, S., and Basler, K. (2002). Wnt/wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear beta-catenin-TCF complex. *Cell* 109, 47–60
85. Hoffmans, R., Stadeli, R., and Basler, K. (2005). Pygopus and legless provide essential transcriptional coactivator functions to armadillo/beta-catenin. *Curr. Biol.* 15, 1207–1211
86. Gregorieff A, Clevers H (2005). Wnt signaling in the intestinal epithelium: from endoderm to cancer. *Genes Dev* 19, 877-90

87. Bodmer WF, Bailey CJ, Bodmer J, Bussey HJ, Ellis A, Gorman P, Lucibello FC, Murday VA, Rider SH, Scambler P, et al. (1987). Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature* 328, 614-6
88. Leppert M, Dobbs M, Scambler P, O'Connell P, Nakamura Y, Stauffer D, Woodward S, Burt R, Hughes J, Gardner E, et al. (1987). The gene for familial polyposis coli maps to the long arm of chromosome 5. *Science* 238, 1411-3
89. Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, et al. (1991). Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 253, 661-5
90. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y (1992). Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1, 229-33
91. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 359, 235-7
92. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Müller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P (1993). Association of the APC gene product with beta-catenin. *Science* 262, 1731-4
93. Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW (1993). Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 262, 1734-7
94. Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P (1995). Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 3046-50
95. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H (1997). Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science* 275, 1784-7
96. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW (1997). Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 275, 1787-90

97. Liu W, Dong X, Mai M, Seelan RS, Taniguchi K, Krishnadath KK, Halling KC, Cunningham JM, Boardman LA, Qian C, Christensen E, Schmidt SS, Roche PC, Smith DI, Thibodeau SN (2000). Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet* 26, 146-7
98. Potten CS, Loeffler M (1990). Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development* 110, 1001-20
99. van de Wetering M, Sancho E, Verweij C, de Lau W, Oving I, Hurlstone A, van der Horn K, Batlle E, Coudreuse D, Haramis AP, Tjon-Pon-Fong M, Moerer P, van den Born M, Soete G, Pals S, Eilers M, Medema R, Clevers H (2002). The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell* 111, 241-50
100. He TC, Sparks AB, Rago C, Hermeking H, Zawel L, da Costa LT, Morin PJ, Vogelstein B, Kinzler KW. (1998). Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science* 281, 1509-12
101. Tetsu O, McCormick F. (1999). Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-6
102. Shtutman M, Zhurinsky J, Simcha I, Albanese C, D'Amico M, Pestell R, Ben-Ze'ev A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the beta-catenin/LEF-1 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 5522-7
103. Niida A, Hiroko T, Kasai M, Furukawa Y, Nakamura Y, Suzuki Y, Sugano S, Akiyama T (2004). DKK1, a negative regulator of Wnt signaling, is a target of the beta-catenin/TCF pathway. *Oncogene* 23, 8520-6
104. Chamorro MN, Schwartz DR, Vonica A, Brivanlou AH, Cho KR, Varmus HE (2004). FGF-20 and DKK1 are transcriptional targets of beta-catenin and FGF-20 is implicated in cancer and development. *EMBO J* 24, 73-84
105. González-Sancho JM, Aguilera O, García JM, Pendás-Franco N, Peña C, Cal S, García de Herreros A, Bonilla F, Muñoz A (2005). The Wnt antagonist DICKKOPF-1 gene is a downstream target of beta-catenin/TCF and is downregulated in human colon cancer. *Oncogene* 24, 1098-103
106. Kim TH, Xiong H, Zhang Z, Ren B (2005). Beta-Catenin activates the growth factor endothelin-1 in colon cancer cells. *Oncogene* 24, 597-604

107. Battle E, Henderson JT, Beghtel H, van den Born MM, Sancho E, Huls G, Meeldijk J, Robertson J, van de Wetering M, Pawson T, Clevers H (2002). Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 111, 251-63
108. Rockman SP, Currie SA, Ciavarella M, Vincan E, Dow C, Thomas RJ, Phillips WA (2001). Id2 is a target of the beta-catenin/T cell factor pathway in colon carcinoma. *J Biol Chem* 276, 45113-9
109. Willert J, Epping M, Pollack JR, Brown PO, Nusse R (2002). A transcriptional response to Wnt protein in human embryonic carcinoma cells. *BMC Dev Biol.* 2002 Jul 2;2:8
110. Kolligs FT, Nieman MT, Winer I, Hu G, Van Mater D, Feng Y, Smith IM, Wu R, Zhai Y, Cho KR, Fearon ER (2002). 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* 1, 145-55
111. Hovanes K, Li TW, Munguia JE, Truong T, Milovanovic T, Lawrence Marsh J, Holcombe RF, Waterman ML. (2001). Beta-catenin-sensitive isoforms of lymphoid enhancer factor-1 are selectively expressed in colon cancer. *Nat Genet* 28, 53-7
112. Filali M, Cheng N, Abbott D, Leontiev V, Engelhardt JF. (2002). Wnt-3A/beta-catenin signaling induces transcription from the LEF-1 promoter. *J Biol Chem* 277, 33398-410
113. Brabletz T, Jung A, Dag S, Hlubek F, Kirchner T (1999). beta-catenin regulates the expression of the matrix metalloproteinase-7 in human colorectal cancer. *Am J Pathol* 155, 1033-8
114. Crawford HC, Fingleton BM, Rudolph-Owen LA, Goss KJ, Rubinfeld B, Polakis P, Matrisian LM (1999). The metalloproteinase matrilysin is a target of beta-catenin transactivation in intestinal tumors. *Oncogene* 18, 2883-91
115. He TC, Chan TA, Vogelstein B, Kinzler KW (1999). PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 99, 335-45
116. Conacci-Sorrell ME, Ben-Yedidia T, Shtutman M, Feinstein E, Einat P, Ben-Ze'ev A (2002). Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev* 16, 2058-72

117. Roose J, Huls G, van Beest M, Moerer P, van der Horn K, Goldschmeding R, Logtenberg T, Clevers H. (1999). Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science* 285, 1923-6
118. Zhang X, Gaspard JP, Chung DC (2001). Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia. *Cancer Res* 61, 6050-4
119. Henthorn P, Kiledjian M, Kadesch T (1990). Two distinct transcription factors that bind the immunoglobulin enhancer microE5/kappa 2 motif. *Science* 247, 467-70
120. Corneliussen B, Thornell A, Hallberg B, Grundström T (1991). Helix-loop-helix transcriptional activators bind to a sequence in glucocorticoid response elements of retrovirus enhancers. *J Virol* 65, 6084-93
121. Murre C, McCaw PS, Baltimore D (1989). A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins. *Cell* 56, 777-83
122. Murre C, McCaw PS, Vaessin H, Caudy M, Jan LY, Jan YN, Cabrera CV, Buskin JN, Hauschka SD, Lassar AB, et al. (1989). Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* 58, 537-44
123. Ellenberger T, Fass D, Arnaud M, Harrison SC (1994). Crystal structure of transcription factor E47: E-box recognition by a basic region helix-loop-helix dimer. *Genes Dev* 8, 970-80
124. Hu JS, Olson EN, Kingston RE (1992). HEB, a helix-loop-helix protein related to E2A and ITF2 that can modulate the DNA-binding ability of myogenic regulatory factors. *Mol Cell Biol* 12, 1031-42
125. Lassar AB, Buskin JN, Lockshon D, Davis RL, Apone S, Hauschka SD, Weintraub H (1989). MyoD is a sequence-specific DNA binding protein requiring a region of myc homology to bind to the muscle creatine kinase enhancer. *Cell* 58, 823-31
126. Lee JE, Hollenberg SM, Snider L, Turner DL, Lipnick N, Weintraub H (1995). Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. *Science* 268, 836-44
127. Jarman AP, Grau Y, Jan LY, Jan YN (1993). atonal is a proneural gene that directs chordotonal organ formation in the *Drosophila* peripheral nervous system. *Cell* 73, 1307-21

128. Massari ME, Murre C (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol Cell Biol* 20, 429-40
129. Atchley WR, Fitch WM (1997). A natural classification of the basic helix-loop-helix class of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 5172-6
130. Kolligs FT, Hu G, Dang CV, Fearon ER (1999). Neoplastic transformation of RK3E by mutant beta-catenin requires deregulation of Tcf/Lef transcription but not activation of c-myc expression. *Mol Cell Biol* 19, 5696-706
131. Herbst A, Kolligs FT (2008). A conserved domain in the transcription factor ITF-2B attenuates its activity. *Biochem Biophys Res Commun* 370, 327-31
132. Herbst A, Bommer GT, Kriegl L, Jung A, Behrens A, Csanadi E, Gerhard M, Bolz C, Riesenberg R, Zimmermann W, Dietmaier W, Wolf I, Brabletz T, Göke B, Kolligs FT (2009). ITF-2 is disrupted via allelic loss of chromosome 18q21, and ITF-2B expression is lost at the adenoma-carcinoma transition. *Gastroenterology* 137, 639-48, 648.e1-9. Epub 2009 Apr 23.
133. Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Müller G., Hillen W., Bujard H. (1995). Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268, 1766-1769
134. Gossen M., Bujard H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89, 5547-5551
135. Bornkamm G.W., Berens C., Kuklik-Roos C., Bechet J.M., Laux G., Bachl J., Korndoerfer M., Schlee M., Hölzel M., Malamoussi A., Chapman R.D., Nimmerjahn F., Mautner J., Hillen W., Bujard H., Feuillard J. (2005). Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res.* 33(No. 16), e137
136. Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S. A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391, 806-811.
137. Zamore, P.D., Tuschl, T., Sharp, P.A., and Bartel, D.P. (2000). RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101, 25-33.
138. Nicholson, A.W. (1999). Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 371-390.

139. Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409, 363-366.
140. Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H.A. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15, 2654-2659.
141. Nykänen, A., Haley, B., and Zamore, P.D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* 107, 309-321.
142. Elbashir, S.M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15, 188-200.
143. Hammond, S.M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404, 293-296.
144. Martinez, J., Patkaniowska, A., Urlaub, H., Luhrmann, R., and Tuschl, T. (2002). Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 110, 563-574.
145. Sherf, B.A., Navarro, S.L., Hannah, R.R., and Wood, K.V. (1996). Dual-Luciferase™ Reporter Assay: An Advanced Co-Reporter Technology Integrating Firefly and Renilla Luciferase Assays. *Promega Notes Magazine* Number 57, p.02
146. Hamburger AW, Salmon SE (1977). Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 197, 461-463
147. Mosmann T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65, 55-63
148. Berridge, M. V., Tan, A. S., McCoy, K. D. & Wang, R. (1996). The Biochemical and Cellular Basis of Cell Proliferation Assays That Use Tetrazolium Salts. *BIOCHEMICA* No. 4
149. Ho, S. N., H. D. Hunt, R. M. Horton, J. K. Pullen, and L. R. Pease (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene* 77, 51-59.
150. Vidal A, Koff A (2000). Cell-cycle inhibitors: three families united by a common cause. *Gene* 247, 1-15

151. Cayrol C., Knibiehler M., Ducommun B. (1998). p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 16, 311-320
152. Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, Kerr IB, Bodmer WF, Gannon JV, Lane DP (1990). p53 mutations in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 7555-7559.
153. O'Connor PM, Jackman J, Bae I, Myers TG, Fan S, Mutoh M, Scudiero DA, Monks A, Sausville EA, Weinstein JN, Friend S, Fornace AJ Jr, Kohn KW (1997). Characterization of the p53 tumor suppressor pathway in cell lines of the National Cancer Institute anticancer drug screen and correlations with the growth-inhibitory potency of 123 anticancer agents. *Cancer Res.* 57,4285-4300
154. Pagliuca A, Gallo P, De Luca P, Lania L (2000). Class A helix-loop-helix proteins are positive regulators of several cyclin-dependent kinase inhibitors' promoter activity and negatively affect cell growth. *Cancer Res* 60, 1376-82
155. Macpherson I, Montagnier L (1964). Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology* 23, 291-4
156. Marshall CJ (1979). Expression of the transformed phenotype and tumorigenicity in somatic cell hybrids. *J Cell Sci* 39, 319-27
157. Stiles CD, Desmond W, Chuman LM, Sato G, Saier MH Jr. (1976). Relationship of cell growth behavior in vitro to tumorigenicity in athymic nude mice. *Cancer Res* 36, 3300-5
158. Gallimore PH, McDougall JK, Chen LB (1977). In vitro traits of adenovirus-transformed cell lines and their relevance to tumorigenicity in nude mice. *Cell* 10, 669-78
159. Stanbridge EJ, Wilkinson J (1978). Analysis of malignancy in human cells: malignant and transformed phenotypes are under separate genetic control. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75, 1466-9
160. Freedman VH, Shin SI (1974). Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell* 3, 355-9
161. Shin SI, Freedman VH, Risser R, Pollack R (1975). Tumorigenicity of virus-transformed cells in nude mice is correlated specifically with anchorage independent growth in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 4435-9

162. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Ruppert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al. (1990). Identification of a chromosome 18q gene that is altered in colorectal cancers. *Science* 247, 49-56
163. Thiagalingam S, Lengauer C, Leach FS, Schutte M, Hahn SA, Overhauser J, Willson JK, Markowitz S, Hamilton SR, Kern SE, Kinzler KW, Vogelstein B. (1996). Evaluation of candidate tumour suppressor genes on chromosome 18 in colorectal cancers. *Nat Genet* 13, 343-6
164. Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, Moskaluk CA, da Costa LT, Rozenblum E, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE (1996). DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271, 350-3
165. Nakao A, Röijer E, Imamura T, Souchelnytskyi S, Stenman G, Heldin CH, ten Dijke P (1997). Identification of Smad2, a human Mad-related protein in the transforming growth factor beta signaling pathway. *J Biol Chem* 272, 2896-900
166. Eppert K, Scherer SW, Ozcelik H, Pirone R, Hoodless P, Kim H, Tsui LC, Bapat B, Gallinger S, Andrulis IL, Thomsen GH, Wrana JL, Attisano L (1996). MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell* 86, 543-52
167. Cho KR, Oliner JD, Simons JW, Hedrick L, Fearon ER, Preisinger AC, Hedge P, Silverman GA, Vogelstein B (1994). The DCC gene: structural analysis and mutations in colorectal carcinomas. *Genomics* 19, 525-31
168. Takagi Y, Kohmura H, Futamura M, Kida H, Tanemura H, Shimokawa K, Saji S (1996). Somatic alterations of the DPC4 gene in human colorectal cancers in vivo. *Gastroenterology* 111, 1369-72
169. Miyaki M, Iijima T, Konishi M, Sakai K, Ishii A, Yasuno M, Hishima T, Koike M, Shitara N, Iwama T, Utsunomiya J, Kuroki T, Mori T (1999). Higher frequency of Smad4 gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene* 18, 3098-103
170. Frank CJ, McClatchey KD, Devaney KO, Carey TE (1997). Evidence that loss of chromosome 18q is associated with tumor progression. *Cancer Res* 57, 824-7
171. Miyaki M, Seki M, Okamoto M, Yamanaka A, Maeda Y, Tanaka K, Kikuchi R, Iwama T, Ikeuchi T, Tonomura A, et al. (1990). Genetic changes and histopathological types in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res.* 50, 7166-73.

172. van den Heuvel S (2005). Cell-cycle regulation. *WormBook*. 2005 Sep 21:1-16
173. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN (2003). The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* 36, 131-49
Kato J (1999). Induction of S phase by G1 regulatory factors. *Front Biosci* 4, D787-92
174. Kato J (1999). Induction of S phase by G1 regulatory factors. *Front Biosci* 4, D787-92
175. Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Kroemer G (2002). Cyclin-dependent kinase-1: linking apoptosis to cell cycle and mitotic catastrophe. *Cell Death Differ* 9, 1287-93
176. Johnson DG, Walker CL (1999). Cyclins and cell cycle checkpoints. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 39, 295-312
177. Zetterberg A, Larsson O, Wiman KG (1995). What is the restriction point? *Curr Opin Cell Biol* 7, 835-42
178. Martinsson HS, Starborg M, Erlandsson F, Zetterberg A (2005). Single cell analysis of G1 check points-the relationship between the restriction point and phosphorylation of pRb. *Exp Cell Res* 305, 383-91
179. Weinberg RA (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-30
180. Xiong Y, Hannon GJ, Zhang H, Casso D, Kobayashi R, Beach D (1993). p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* 366, 701-4
181. Jin X, Nguyen D, Zhang WW, Kyritsis AP, Roth JA (1995). Cell cycle arrest and inhibition of tumor cell proliferation by the p16INK4 gene mediated by an adenovirus vector. *Cancer Res* 55, 3250-3
182. Niculescu AB 3rd, Chen X, Smeets M, Hengst L, Prives C, Reed SI (1998). Effects of p21(Cip1/Waf1) at both the G1/S and the G2/M cell cycle transitions: pRb is a critical determinant in blocking DNA replication and in preventing endoreduplication. *Mol Cell Biol* 18, 629-43
183. Cayrol C, Knibiehler M, Ducommun B (1998). p21 binding to PCNA causes G1 and G2 cell cycle arrest in p53-deficient cells. *Oncogene* 16, 311-20
184. el-Deiry WS, Harper JW, O'Connor PM, Velculescu VE, Canman CE, Jackman J, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, et al. (1994). WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54, 1169-74

185. Vogelstein B, Kinzler KW (1992). p53 function and dysfunction. *Cell* 70, 523-6
186. Deng C, Zhang P, Harper JW, Elledge SJ, Leder P (1995). Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* 82, 675-84
187. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B (1995). p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 55, 5187-90
188. Kelman Z (1997). PCNA: structure, functions and interactions. *Oncogene* 14, 629-40
189. Jung JM, Li H, Kobayashi T, Kyritsis AP, Langford LA, Bruner JM, Levin VA, Zhang W (1995). Inhibition of human glioblastoma cell growth by WAF1/Cip1 can be attenuated by mutant p53. *Cell Growth Differ* 6, 909-13
190. Barboule N, Mazars P, Baldin V, Vidal S, Jozan S, Martel P, Valette A (1995). Expression of p21WAF1/CIP1 is heterogeneous and unrelated to proliferation index in human ovarian carcinoma. *Int J Cancer* 63, 611-5
191. Gartel AL, Radhakrishnan SK (2005). Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res* 65, 3980-5
192. Westfall MD, Mays DJ, Sniezek JC, Pietenpol JA (2003). The Delta Np63 alpha phosphoprotein binds the p21 and 14-3-3 sigma promoters in vivo and has transcriptional repressor activity that is reduced by Hay-Wells syndrome-derived mutations. *Mol Cell Biol* 23, 2264-76
193. Efeyan A, Collado M, Velasco-Miguel S, Serrano M (2007). Genetic dissection of the role of p21Cip1/Waf1 in p53-mediated tumour suppression. *Oncogene* 26, 1645-9
194. Yang WC, Mathew J, Velcich A, Edelmann W, Kucherlapati R, Lipkin M, Yang K, Augenlicht LH (2001). Targeted inactivation of the p21(WAF1/cip1) gene enhances Apc-initiated tumor formation and the tumor-promoting activity of a Western-style high-risk diet by altering cell maturation in the intestinal mucosal. *Cancer Res* 61, 565-9
195. Zirbes TK, Baldus SE, Moenig SP, Nolden S, Kunze D, Shafizadeh ST, Schneider PM, Thiele J, Hoelscher AH, Dienes HP (2000). Prognostic impact of p21/waf1/cip1 in colorectal cancer. *Int J Cancer* 89, 14-8

196. Mitomi H, Ohkura Y, Fukui N, Kanazawa H, Kishimoto I, Nakamura T, Yokoyama K, Sada M, Kobayashi K, Tanabe S, Saigenji K (2007). P21WAF1/CIP1 expression in colorectal carcinomas is related to Kras mutations and prognosis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 19, 883-9

7 Abkürzungsverzeichnis

APC	Adenomatous Polyposis Coli
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine Serum Albumin
CDK	Cyclin-Dependent Kinase
CDKI	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor
CDKN1A	Cyclin dependent kinase inhibitor 1A
CKI	Casein Kinase I
CRD	Cysteine-Rich Domain
DCC	Deleted in Colon Cancer
Dkk	Dickkopf
Dsh	Dishevelled
Evi	Evenness interrupted
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FOBT	Fecal Occult Blood Test
FW	Forward
Fz	Frizzled
GSK3	Glykogen-Synthase-Kinase3 β
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FSC	Forward Scatter
HNPCC	Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer
ICAT	Inhibitor of β -catenin and TCF4
ITF-2	Immunoglobulin Transcription Factor - 2
LDLR	Low-Density Lipoprotein Receptor
LEF	Lymphoid Enhancer Family
LOH	Loss Of Heterozygosity
LRP	LRP = Low-Density Lipoprotein Receptor Related Protein
MTT	3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NLS	Nuclear Localisazion Sequence
ONPG	o-Nitrophenyl- β -D-Galaktopyranosid
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerase Chain Reaction
PI	Propidiumiodid
PP2A	Protein Phosphatase2A
RISC	RNA-induced silencing complex
RNAi	RNA interference

R-Punkt	Restriktions-Punkt
RT-PCR	Real Time - Polymerase Chain Reaction
RV	Reverse
SDS	Sodium-Dodecyl-Sulfat
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
sFRPs	secreted Frizzled-Related Protein
siRNA	small interfering RNA
SSC	Side Scatter
TCF	T Cell Factor
Tcf-4	Transcription factor-4
UICC	Union International Contre Le Cancer
WIF	Wnt Inhibitory Factor-1
Wls	Wntless
XCtBP	Xenopus C-terminal Binding Protein

8 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Frank Kolligs für die freundliche Überlassung des Themas und seine umfassende Unterstützung sowohl während der aktiven Zeit im Labor als auch bei der Erstellung und Korrektur dieser Arbeit bedanken.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. rer. nat. Andreas Herbst für die wissenschaftliche Anleitung, die große Unterstützung in der laborexperimentellen Phase, den Ideen bei der Umsetzung und den Korrekturen der schriftlichen Arbeit.

Bedanken möchte ich mich auch bei Andrea Ofner, Isabella Wolf, Benjamin Hirschi, Constanze Frank, Claudia Wypior sowie den übrigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekulare Gastroenterologie für die vielen praktischen Tipps und das freundschaftliche Miteinander im Labor.

9 Veröffentlichung

Teile dieser Dissertation wurden publiziert:

Herbst A, Bommer GT, Kriegl L, Jung A, Behrens A, Csanadi E, Gerhard M, Bolz C, Riesenberg R, Zimmermann W, Dietmaier W, Wolf I, Brabletz T, Göke B, Kolligs FT (2009). ITF-2 is disrupted via allelic loss of chromosome 18q21, and ITF-2B expression is lost at the adenoma-carcinoma transition. *Gastroenterology* 137, 639-48, 648.e1-9. Epub 2009 Apr 23.