

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Arbeit angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Eckhard Wolf
Angefertigt am Institut für Experimentelle Medizin der Uniklinik Köln
(Univ.-Prof. Dr. Anja Sterner- Kock)

Mechanistische Untersuchung der LTBP4 Dysregulation in epithelialen Tumoren

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde der
Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Edith Marion Kramlich
aus München

München 2012

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Wolf

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Wanke

Tag der Promotion: 11.2.2012

Meiner Familie

Inhalt

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abbildungsverzeichnis.....	II
Abkürzungen.....	III

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	TGF- β UND SEIN BINDUNGSPROTEIN LATENT TGF- β BINDENDENES PROTEIN 4 (LTBP4).....	1
1.1.1	Struktur und Funktion von TGF- β	1
1.1.2	Pathologische Prozesse im Zusammenhang mit TGF- β	4
1.1.3	Allgemeine Struktur und Funktion der Latent TGF- β binding Proteine (LTBPs).....	6
1.1.3.1	Spezielle Strukturen und Funktionen von LTBP1, LTBP2 und LTBP3.....	9
1.1.4	Spezielle Struktur und Funktion von LTBP4.....	10
1.1.5	Bedeutung von LTBP4 in pathologischen Prozessen.....	12
1.2	EPIGENETIK UND IHRE MECHANISMEN.....	16
1.2.1	Verschiedene Definitionen des Begriffs im Wandel der Zeit.....	16
1.2.2	Unterschiedliche Mechanismen der Epigenetik.....	17
1.2.2.1	Kovalente Histonmodifikationen.....	17
1.2.2.2	Nukleosom Positionierung und Histonvarianten.....	18
1.2.2.3	Nicht kodierende RNA (micro RNA).....	19
1.2.3	Hypo- und Hypermethylierung.....	19
1.2.4	Epigenetische Mechanismen im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen.....	22
1.2.4.1	Epigenetische Mechanismen in Tumoren.....	23
1.2.4.1.1	Globale Hypomethylierung in Tumoren.....	25
1.2.4.1.2	Promotorhypermethylierung in Tumoren.....	26
1.2.4.2	Epigenetische Therapiemöglichkeiten.....	28
1.2.5	Potentieller Zusammenhang zwischen Hypermethylierung und LTBP4.....	31
1.3	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	32
2	MATERIAL.....	33
2.1	KULTUR VON SÄUGERZELLEN.....	33

2.1.1	Zelllinien	33
2.1.2	Medien für die Kultur von Säugerzellen	33
2.1.3	Verwendete Zusätze für die Zellkultur	34
2.2	KULTUR VON BAKTERIEN	34
2.2.1	Bakterienstamm	34
2.2.2	Lösungen für Bakterienkulturen	34
2.2.2.1	(LB) Medium nach Lennox	34
2.2.2.2	Nährmedien für die Herstellung kompetenter Bakterien	35
2.3	CHEMIKALIEN, ENZYME, KITS	36
2.3.1	Chemikalien und Enzyme	36
2.3.2	Restriktionsenzyme	37
2.3.3	Kits	37
2.4	ANTIKÖRPER	38
2.5	PLASMIDE UND TRANSKRIPTIONSFAKTOREN	39
2.6	OLIGONUKLEOTIDE	40
2.7	PUFFER UND STAMMLÖSUNGEN	41
2.7.1	Puffer für molekularbiologische Methoden	41
2.7.1.1	TE Puffer	41
2.7.1.2	Puffer für Lyse der genomischen DNA	41
2.7.1.3	Puffer für Alkalische Lyse	41
2.7.2	Puffer für Agarosegele	42
2.7.2.1	TAE-Puffer	42
2.7.2.2	6x Probenpuffer für DNA	42
2.7.3	Puffer für Western Blot und SDS-Page	43
2.7.3.1	Sammelgelpuffer	43
2.7.3.2	Trenngelpuffer	43
2.7.3.3	10% APS	43
2.7.3.4	10x Blot-Puffer	43
2.7.3.5	10x Lauf-Puffer	43
2.7.3.6	TBS	44
2.7.3.7	Ponceau S-Lösung	44
2.7.3.8	ECL Substrate	44
2.7.3.9	Protein-Lysepuffer	45
2.8	GERÄTE	45

3	METHODEN.....	47
3.1	ZELLKULTUR-METHODEN.....	47
3.1.1	Kultivierung von Säuger-Zellen.....	47
3.1.2	Auftauen von Zellen.....	47
3.1.3	Kryokonservieren von Zellen	47
3.1.4	Bestimmung der Zellzahl	47
3.1.5	Transfektion von Zellen mit jetPRIME™	48
3.1.6	5´-Aza-2`deoxycytidin Behandlung von Zellen.....	48
3.2	ALLGEMEINE MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	49
3.2.1	Präparation von Nukleinsäuren.....	49
3.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus E.coli (Miniprep/Midiprep).....	49
3.2.1.2	Präparation von Gesamt-RNA mit TRIzol® aus Zellen.....	49
3.2.1.3	Präparation von genomischer DNA aus Zellen.....	50
3.2.2	Enzymatische Behandlung von DNA	50
3.2.2.1	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	50
3.2.2.2	Ligation von DNA in pGEM®-T Vektor	51
3.2.2.3	Exo-Sap-Enzymverdau.....	51
3.2.3	Transformation von Bakterien.....	51
3.2.3.1	Herstellung kompetenter Bakterien	51
3.2.3.2	Transformation von Bakterien.....	52
3.2.3.3	DNA–Plasmidpräparation (Alkalische Lyse)	52
3.2.4	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	53
3.2.5	Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen	53
3.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	53
3.2.7	Umschreiben von mRNA in cDNA	56
3.2.8	Real-Time-PCR-Analyse (qPCR).....	57
3.2.9	DNA Fällung	58
3.2.10	Sequenzierungsanalysen.....	58
3.3	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	59
3.3.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	59
3.3.2	Western Blot	60
3.3.3	Luciferase Assay	60
3.4	UNTERSUCHUNG VON 5MC-DNA METHYLIERUNG	61
3.4.1	Bisulfitreaktion	61

4	ERGEBNISSE	63
4.1	IDENTIFIZIERUNG UND ÜBERPRÜFUNG POTENTIELLER TRANSKRIPTIONS-FAKTOREN FÜR LTBP4	63
4.1.1	In silico- und Literaturgestützte Suche nach möglichen Promotor- Bereichen von LTBP4	63
4.1.2	Synthese von 2Prom, 1Prom und L4Prom	67
4.1.3	Klonierung der Promotorbereiche in pGL4.23 mit und ohne Minimalpromotor	68
4.1.4	Transiente Transfektion der pGL4-Promotorkonstrukte in HEK293 Zellen	73
4.1.5	In silico-Analyse potentieller Transkriptionsfaktoren von LTBP4	74
4.1.6	Analyse der potentiellen Transkriptionsfaktoren mittels Luciferase Assays	75
4.2	EXPRESSIONSSTUDIEN UND PROMOTOR-METHYLIERUNGSANALYSEN VON LTBP 4	77
4.2.1	Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Demethylierungsreagens 5'-Aza-2'-deoxycytidin	78
4.2.2	Semiquantitative Analyse von HEK293 und MCF7 Zellen	79
4.2.3	Quantitative Analyse der LTBP4 Expression mittels real time RT-PCR	83
4.2.4	In silico-Analyse nach geeigneten CpG-Inseln von LTBP4	86
4.2.5	Überprüfung der CpG-Inseln hinsichtlich ihres Methylierungs- Status mit Hilfe der Bisulfitreaktion	87
4.2.6	Analyse der Ergebnisse der Bisulfitreaktion mit Hilfe des Programms Biq-Analyzer	89
5	DISKUSSION	99
5.1	PROMOTORSTRUKTURANALYSEN VON LTBP4	99
5.1.1	Identifizierung möglicher Transkriptionsfaktoren	99
5.1.2	Sp1 als potentieller Transkriptionsfaktor von LTBP4	101
5.2	METHYLIERUNGSSPEZIFISCHE DNA-ANALYSEN DER LTBP4-PROMOTOREN? ...	103
5.2.1	Analyse der Expressionsmuster von LTBP4 in verschiedenen epithelialen Tumor-Zelllinien	105

5.2.2	Wird LTBP4 in epithelialen Tumoren durch Promotorhypermethylierung herunterreguliert?	108
5.2.3	Ausblick	110
6	ZUSAMMENFASSUNG	112
7	SUMMARY	114
8	LITERATURVERZEICHNIS	116
	ANHANG	127
	ERKLÄRUNGEN ZUR PROMOTIONSORDNUNG (§ 4 ABS. 1 NR. 2 - 4)	141

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Schematische Darstellung des hochmolekularen Proteinkomplexes in welchem latentes TGF- β aus der Zelle sezerniert wird.	2
Abb. 1.2: Schematische Darstellung des TGF- β Signalweges.	4
Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Struktur der LTBP4s.	8
Abb. 1.4: Schematische Darstellung der strukturellen Unterschiede zwischen den N-terminal verschiedenen LTBP4 Isoformen.	11
Abb. 1.5: Expressionsmuster von LTBP4S und LTBP4L in humanem Gewebe.	12
Abb. 1.6: Pathologische Veränderungen in LTBP4 hypomorphen Mäusen.	14
Abb. 1.7: Chemische Formel von Cytosin und 5-Methylcytosin.	20
Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Veränderungen der DNA Methylierung in Tumoren.	24
Abb. 1.9: Die Abbildung zeigt die Aktivierung von Protoonkogenen durch globale Hypomethylierung.	26
Abb. 1.10: Die Abbildung zeigt die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Promotorhypermethylierung.	27
Abb. 1.11: Schematische Darstellung des „Two-hit“ Modells von Alfred Knudson. ...	28
Abb. 1.12: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von DNMT Inhibitoren.	29
Abb. 3.1: Prinzip der Bisulfitmethode zur Untersuchung von CpG-Inseln auf ihren Methylierungsstatus.	61
Abb. 4.1: Darstellung der Promotorregionen von LTBP4S und LTBP4L.	64
Abb. 4.2: Dargestellt ist der Promotorbereich von L4Prom.	65
Abb. 4.3: Dargestellt ist der Promotorbereich von 1Prom und 2Prom.	66
Abb. 4.4: Gelelektrophoretische Darstellung von 1Prom und 2 Prom.	67
Abb. 4.5: Schematische Darstellung von pGL4-1Prom.	68
Abb. 4.6: Schematische Darstellung von pGL4-L4Prom.	69
Abb. 4.7: Schematische Darstellung von pGL4-2Prom.	69
Abb. 4.8: Gelelektrophoretische Darstellung von pGL4.23 und 2Prom.	70
Abb. 4.9: Schematische Darstellung von pGL4-1Prom Δ minP.	71
Abb. 4.10: Schematische Darstellung von pGL4-2Prom Δ minP.	72
Abb. 4.11: Schematische Darstellung von pGL4-L4Prom Δ minP.	72

Abb. 4.12: Die Abbildung zeigt das Transfektionsschema der HEK293 Zellen mit den pGL4-Promotorkonstrukten und dem potentiellen Transkriptionsfaktor Sp1.....	74
Abb. 4.13: Schematische Darstellung der putativen Transkriptionsfaktoren von LTBP4.	75
Abb. 4.14: Die Tabelle zeigt die Expression von LTBP4 gemessen im Luciferase Assay.....	76
Abb. 4.15: Die Tabelle zeigt die Expression von LTBP4 gemessen im Luciferase Assay.....	77
Abb. 4.16: PCNA und Aktin Expression in den mit 5´-Aza-2´-deoxycytidin behandelten Zelllinien.....	79
Abb. 4.17: Gelelektrophoretische Darstellung von LTBP4L und LTBP4S in HEK293, PC3 und MCF-7 Zelllinien.	80
Abb. 4.18: RNA Qualität von den mit 5´-Aza-2´-deoxycytidin behandelten Zellen HEK293 und MCF7 (jeweils unverdünnt und 1:10 verdünnt) gemessen mittels RNA Elektrophorese.	81
Abb. 4.19: Semiquantitative Expression von LTBP4S und LTBP4L in mit 5´-Aza-2´-deoxycytidin behandelten MCF7 Zellen.....	82
Abb. 4.20 Semiquantitative Expression von LTBP4S und LTBP4L in mit 5´-Aza-2´-deoxycytidin behandelten HEK293 Zellen.	82
Abb. 4.21:Quantitative Expression von LTBP4 in HEK293 Zellen gemessen mit real time qPCR.	84
Abb. 4.22: Quantitative Expression von LTBP4 in MCF7 Zellen gemessen mit real time qPCR.	84
Abb. 4.23: Quantitative Expression von LTBP4 in PC3 Zellen gemessen mit real time qPCR.	85
Abb. 4.24: Quantitative Expression von LTBP4 in DLD1 Zellen gemessen mit real time qPCR.	85
Abb. 4.25: Quantitative Expression von LTBP4 in CaCo2 Zellen gemessen mit real time qPCR.	86
Abb. 4.26: Schematische Darstellung der Lokalisation der beiden CpG-Inseln CpG 25 und CpG 34 bezogen auf die potentiellen Promotorbereiche von LTBP4.....	87

Abb. 4.27: Gelelektrophoretische Darstellung unterschiedlicher Schritte in der Überprüfung des LTBP4 Promotors hinsichtlich seines Methylierungsstatus mittels Bisulfitreaktion.....	88
Abb. 4.28: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 25, in HEK293 Zellen.....	90
Abb. 4.29: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 25, in MCF7 Zellen.	90
Abb. 4.30: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 25, in PC3 Zellen.	91
Abb. 4.31: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 25, in DLD1 Zellen.	91
Abb. 4.32: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 25, in CaCo2 Zellen.	92
Abb. 4.33: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 25, in Hs578T Zellen.....	92
Abb. 4.34: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 25, in Hs578Bst Zellen.....	93
Abb. 4.35: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 34, in HEK293 Zellen.....	94
Abb. 4.36: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 34, in MCF7 Zellen.	94
Abb. 4.37: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 34, in PC3 Zellen.	95
Abb. 4.38: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 34, in DLD1 Zellen.	95
Abb. 4.39: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, Cp 34, in CaCo2 Zellen.....	96
Abb. 4.40: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 34, inHs578T Zellen.....	96
Abb. 4.41: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 34, in Hs578Bst Zellen.....	97

Abkürzungsverzeichnis

<i>A. bidest</i>	Aqua bidest (zweifach destilliertes Wasser)
Abb.	Abbildung
ad.	Lateinisch für an, bei, zu
Ak	Antikörper
AP	Antarktische Phosphatase
AP-2	Activating protein 2
APS	Ammoniumpersulfat
AR	Androgenrezeptor
ArtNr.	Artikelnummer
As	Aminosäuren
BES	N,N-bis(hydroxyethyl)-2- aminoethansulfonat
bp	Basenpaare (base pairs)
bzw.	beziehungsweise
5mC	5-Methylcytosin
CaCl ₂	Calciumchlorid
Ca ₂ PO ₄	Calciumphosphat
cDNA	zur mRNA komplementäre DNA (complementary deoxyribonucleic acid)
c-myb	c- myblastosis
COBRA	komibinierte Bisulfit-Restriktionsanalyse
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin-Dinukleotid
CREB	cAMP response element-binding protein
d	Tag
DAXX	Death associated protein 6
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure (deoxyribonucleic acid)
DNMT	DNA Methyltransferase
dNTP	2´-Deoxynucleotid-5´-triphosphat (deoxynucleotide triphosphates)
ECL	enhanced chemiluminescence
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EMEM	Eagle's minimal essential Medium
ER	Östrogen Rezeptor
et al.	et alii (und andere)
FAM	Carboxyfluorescein
FCS	Fetales Kälberserum (fetal calf serum)
FOS	AP1 = Activating Protein 1 (zusammen mit Jun)
FRET	Fluorescence resonance energy transfer
g	Gramm
g	relative centrifugal force (RCF) ($=1,119 \times 10^{-5} \times \text{rpm}^2 \times r$)
GATA	globin transcription factor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IF	Immunfluoreszenz
IGF2	Insulin-like-growth factor
Jun	AP1 = Activating Protein 1 (zusammen mit FOS)
KAc	Kaliumacetat
kb	Kilobyte
KCl	Kaliumchlorid
kDa	kiloDalton
KH ₂ PO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
kg	Kilogramm
l	Liter
LAP	Latenz-assoziiertes Peptid
LB	Luria Bertani
L-Glu	L-Glucose
LP	Large Plate
LTBP	latent-TGF-β-binding protein
M	Molar (mol/l)
mA	MiliAmpere
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
mg	Milligram
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
Mg ₂ SO ₄	Magnesiumsulfat

µg	Mikrogramm
min	Minute
mind.	mindestens
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar(mmol/l)
MnCl ₂	Mangan(II)-chlorid Tetrahydrat
MOPS	3-Morpholino-Propansulfonsäure
mRNA	messenger RNA
N	Normale Lösung
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO ₃	Natriumhydrogencarbonat
Na ₂ HPO ₄	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natronlauge
NEAA	Non-Essential Amino Acid
nt	Nucleotide
OD	Optische Dichte
P300	E1A binding protein p300
P53	Protein 53
p.a.	pro analysis
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pen Strep	Penicillin Streptomycin
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RPLPO	ribosomal protein P0
rpm	Umdrehungen pro min (rounds per minute)
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR/ Real Time PCR
SAM	S-adenosyl-methionin
SCR3	Steroid coaktivator 3
sec.	Sekunde

SDS	Natriumlaurylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SLC	kleiner latenter TGF- β 1-Komplex (small latent complex)
SMAD	Mothers against decapentaplegic homolog
Sp1	Specificity Protein 1
Std.	Stunde
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/HCl/Acetat/EDTA-Puffer
TAMRA	Carboxytetramethylrhodamine
TBP	TATA box binding protein
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung (Tris buffered saline)
TM	Schmelztemperatur
TWEEN 20	Polysorbat 20
U	Unit
ÜN	über Nacht
WB	Western Blot
X-Gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl- beta-D-galactopyranoside

1 Einleitung

1.1 TGF- β und sein Bindungsprotein Latent TGF- β bindendes Protein 4 (LTBP4)

1.1.1 Struktur und Funktion von TGF- β

Der Transforming growth factor β (TGF- β) ist Teil einer Superfamilie von wachstumsmodellierenden Polypeptiden (SAHARINEN et al., 1998). Zu diesen Zytokinen gehören, neben den Isoformen von TGF- β , auch Aktivin, bone morphogenic Protein (BMP) sowie Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (GDFs) (MASSAGUÉ, 2008; URBAN et al., 2009). In Säugern existieren drei verschiedene TGF- β Isoformen: TGF- β 1, TGF- β 2 und TGF- β 3, die aus homo- und heterodimeren Polypeptiden bestehen. Sie werden als Vorläufermoleküle synthetisiert und reifen mittels proteolytischer Spaltung durch Endoproteasen (z.B. Furin) zu fertigem TGF- β (DUBOIS CM, 1995; MEULMEESTER & TEN DIJKE, 2011). Diese Wachstumsfaktoren regulieren, abhängig von den jeweiligen Zielzellen, multiple zelluläre Prozesse, wie Proliferation, Differenzierung, Adhäsion, Apoptose, Kontrolle des Zellzyklus sowie Invasion und Migration. Die verschiedenen und vielfältigen Effekte machen deutlich, welche komplexe Rolle TGF- β in physiologischen Zellen spielt und zeigen seine Zuständigkeit für die Gewebe-Homöostase auf (KINGSLEY, 1994; WAHL, 1994; KESKI-OJA, 1997; SAHARINEN J, 1999; SIEGEL PM, 2003; MASSAGUÉ, 2008; URBAN et al., 2009). Darüber hinaus ist TGF- β essentiell für die Embryogenese. Das Zytokin und sein verwandtes Molekül BMP terminieren während der Entwicklung z.B. die links-rechts Achsenentwicklung der Vertebraten (HACKETT, 2002).

Aus der Vielzahl an Aufgaben von TGF- β lässt sich schließen, dass eine Störung des Signalweges zur Entwicklung diverser Krankheiten, inklusive Tumoren führen kann, worauf in Punkt 1.1.2 näher eingegangen wird.

In der Zelle wird TGF- β von seinem initialen Translationsprodukt, dem Latenz assoziiertem Propeptid (LAP), abgespalten. LAP ist jedoch weiterhin nicht kovalent mit dem C-terminalen Ende von TGF- β assoziiert, wodurch der Wachstumsfaktor in einem latenten Zustand verbleibt (JANSSENS K, 2005). Der Komplex zwischen TGF- β und LAP wird small latent complex (SLC) genannt (GILTAY et al., 1997; SAHARINEN J, 1999; YOSHINAGA et al., 2008). Die meisten Zellen sezernieren den SLC kovalent gebunden an ein Latent TGF- β Binding Protein (LTBP). Die Anwesenheit von LTBPs fördert die Sekretion des entstandenen hochmolekularen Proteinkomplexes, der lar-

ge latent complex (LLC) genannt wird, und sichern eine korrekte Disulfidbindung zwischen LAP, TGF- β und LTBP (MIYAZONO K, 1991; GILTAY et al., 1997). Nach der Sekretion lagern sich die LTBPs in die Matrix ein und bewirken somit eine sekundäre Anhaftung von latentem TGF- β an die Extrazellulären Matrix (ECM). Die ECM dient einer Vielzahl unterschiedlicher latenter Wachstumsfaktoren als Reservoir und reguliert deren Aktivierung (KANTOLA et al., 2010). TGF- β Depots können Gewebe mit einem schnell induzierbaren und stark lokalisiertem TGF- β Signal ausstatten (SAHARINEN J, 1999; KOLI K, 2001a). Durch z.B. Proteinasen, Thrombospondin, reaktive Sauerstoffspezies oder Integrin wird das TGF- β von seinem LLC abgespalten und dadurch aktiviert (YOSHINAGA et al., 2008). Die Aktivierung des LLC stellt einen wichtigen regulatorischen Schritt im TGF- β Signalweg dar (KANTOLA et al., 2010).

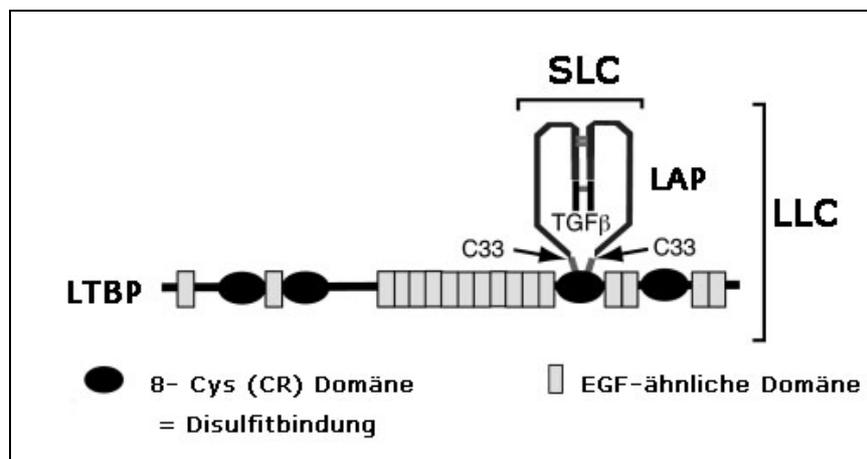


Abb. 1.1: Schematische Darstellung des hochmolekularen Proteinkomplexes in welchem latentes TGF- β aus der Zelle sezerniert wird.

Der Komplex zwischen TGF- β , LAP und LTBP wird large latent complex (LLC) genannt, wohingegen der Komplex zwischen TGF- β und LAP small latent complex genannt wird. Schwarze Kreise symbolisieren die 8-Cystein Domänen, graue Rechtecke die Epidermal Growth Factor (EGF) ähnlichen Domänen aus denen LTBPs aufgebaut werden. Das Bild wurde modifiziert nach Yoshinaga *et al.* (2008).

Nach der Aktivierung binden die TGF- β Dimere an TGF- β TypII Rezeptoren, was zu einer Komplexbildung mit TGF- β TypI Rezeptoren und damit zu einer Phosphorylierung der zwei Rezeptoren führt. Beide Rezeptortypen sind mit Serin/Threonin Kinase Aktivität ausgestattet (SHI Y, 2003; MEULMEESTER & TEN DIJKE, 2011). Der aktivierte TGF- β TypI Rezeptor rekrutiert und phosphoryliert im Folgenden die Smad Proteine 2 und 3 (MARKOWITZ S, 1996; MEULMEESTER & TEN DIJKE, 2011).

Die Smad Proteine sind intrazelluläre Mediatoren, die das TGF- β Signal regulieren. Sie besitzen am N- und C-terminalen Ende zwei Regionen (MH1 und MH2), die

durch eine Prolin-reiche Domäne verbunden sind (GRADY WM, 2002). Smads werden in drei Hauptklassen unterteilt: 1) Rezeptor-regulierende Smads (R-Smads) 2) Common Smads (C-Smads) und 3) Inhibitorische Smads (I-Smads) (GRADY WM, 2002).

Die Smad 2 und Smad 3 Proteine gehören zu den R-Smads und bilden nach ihrer Aktivierung einen Komplex mit Smad 4, einem C-Smad. Dieser Komplex transferiert anschließend in den Zellkern (MASSAGUÉ, 1996; WRANA J, 1997; SHI Y, 2003; HILL, 2009). Da er eine geringe Affinität für die Bindung an DNA besitzt, lagert sich nachfolgend ein zusätzlicher Transkriptionsfaktor an den Smad-Komplex an. Diese sogenannten Co-Faktoren, wie z.B. p300, Ski und C-Jun regulieren hierdurch die unterschiedlichsten Zielgene (LUO K, 1999; CHUNG, 2000; MEULMEESTER & TEN DIJKE, 2011). So kann eine Zelltyp-spezifische Antwort auf TGF- β Stimulation zum Teil durch die unterschiedlichen Regulatoren der Expression erklärt werden (MEULMEESTER & TEN DIJKE, 2011).

Jeder Schritt des TGF- β Signalweges ist streng kontrolliert um die Intensität und Dauer des TGF- β Effektes zu bestimmen (ITOH S, 2007). So werden z.B. die I-Smads (Smad 6 und 7) durch BMP und TGF- β Aktivierung transkriptionell aktiviert. Desweiteren regulieren auch Mitglieder der HDAC Familie (siehe Punkt 1.2.2.1) den TGF- β Signalweg, indem sie mit Smad 2 und Smad 3 interagieren (LUO K, 1999; STROSCHEIN SL, 1999).

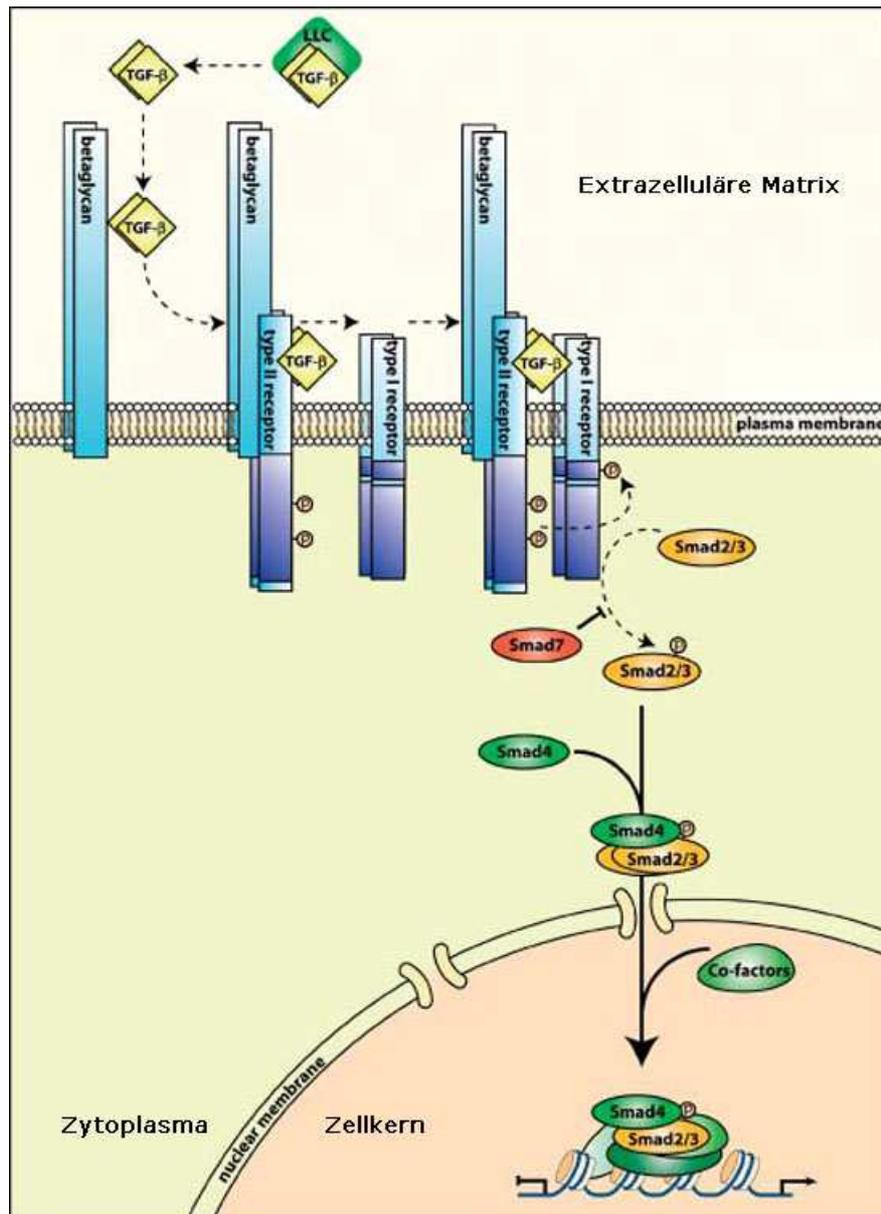


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des TGF- β Signalweges.

Nach Abspaltung von dem LLC bindet das aktivierte TGF- β an den TGF- β TypII Rezeptor wodurch dieser phosphoryliert wird. Anschließend wird ein Komplex mit dem TGF- β TypI Rezeptor gebildet der ebenfalls phosphoryliert wird und im Folgenden Smad 2 und Smad 3 aktiviert. Zusammen mit Smad 4 transferiert der aktivierte Smad Komplex in den Zellkern wo er zusammen mit Transkriptionsfaktoren, die als Co-Faktoren fungieren, die Transkription der Zielgene bewirkt. Diese Abbildung wurde modifiziert nach Meulmeester *et al.* (2010).

1.1.2 Pathologische Prozesse im Zusammenhang mit TGF- β

Während der Entwicklung und während verschiedener pathologischer Prozesse ist die Aktivität der TGF- β Superfamilie streng reguliert. Dysregulationen in der TGF- β Sekretion, Positionierung, Aktivierung und in den nachgeschalteten Zielgenen des Signalweges führen zu einer Vielzahl von Krankheiten, unter anderem häufig zu Tu-

moren (GRADY WM, 2002; MAUEL et al., 2007; YOSHINAGA et al., 2008; URBAN et al., 2009; BERG et al., 2010; KANTOLA et al., 2010; MEULMEESTER & TEN DIJKE, 2011).

Der TGF- β Signalweg ist eng verbunden mit der Integrität elastischer Fasern. Mutationen im Fibrillin 1 Gen verursachen das Marfan Syndrom (DIETZ H.C, 1991; LEE B, 1991; PUTNAM EA, 1995). Bei dieser schweren Bindegewebsstörung führen strukturelle Abnormalitäten der Mikrofibrillen zu einer pathologisch erhöhten TGF- β Aktivierung (NEPTUNE E.R, 2003). Diese vermehrte Aktivierung trägt dabei essentiell zur Manifestation des Syndroms bei, da Fibrilline mit LTBP_s interagieren und somit zerstörte Mikrofibrillen den LLC aktivierenden Mechanismen aussetzen (ISOGAI Z, 2003; NEPTUNE E.R, 2003). Beim Loeys-Dietz Syndrom ist diese erhöhte Aktivierung zusätzlich assoziiert mit TGF- β Typl und TyplI Rezeptormutationen, wodurch es zu einer beeinträchtigten Ablagerung elastischer Fasern kommt. Im Aortic Tortuosity Syndrom (ATS) führen Genmutationen zu einer Zerrei β ung elastischer Fasern sowie zu einem veränderten TGF- β Signalweg (COUCKE P.J, 2006).

In der Karzinogenese spielt TGF- β eine wichtige und duale Rolle. Das Zytokin hat sowohl Tumor hemmende als auch Tumor fördernde Eigenschaften (AKHURST RJ, 2001; ROBERTS AB, 2003; MEULMEESTER & TEN DIJKE, 2011). Eine hemmende Wirkung erzielt TGF- β durch die Regulierung von Zellproliferation und Apoptose. Deletionen, Mutationen oder „Loss of heterozygosity“ (LOH) in den zentralen Komponenten des TGF- β Signalweges führen dabei in der frühen Phase der Tumorentwicklung zu suppressiven Effekten (LEVY L, 2006). Ein Beispiel hierfür ist die Inaktivierung von TGF- β TyplI Rezeptoren in Kolonkarzinomen (MARKOWITZ S, 1995).

Sehr aggressive Tumore können jedoch die Tumorsuppressor Effekte von TGF- β umgehen und im Folgenden verschiedene Aspekte des TGF- β Signalweges für das Tumorwachstum nutzen. Diese Tumoren, zu denen z.B. Brust- oder Prostata Tumoren zählen, weisen in den Kernteilen des Signalweges keine Mutationen auf, wodurch sie gegenüber der TGF- β vermittelten Wachstumshemmung immun sind (MAUEL et al., 2007; MEULMEESTER & TEN DIJKE, 2011). In diesen Tumoren trägt TGF- β aktiv zur Metastasierung bei (MEULMEESTER & TEN DIJKE, 2011). Zusätzlich erhöht TGF- β die Motilität und Invasivität verschiedener Tumorzellen und fördert die Immunevasion (TEN DIJKE P, 2002; FLAVELL RA, 2010; IKUSHIMA H, 2010). Hieraus ist zu erkennen, dass die TGF- β Antwort stark von Zell-, Gewebe- und Tumortyp abhängig ist.

Besonders häufig sind Bestandteile des TGF- β Signalweges in kolorektalen Tumoren sowie Kolonkarzinomen verändert (EPPERT K, 1996; HAHN SA, 1996; TAKAKU K, 1998; ZHU Y, 1998; GRADY WM, 1999; BERG et al., 2010). Bei dieser Art Tumor führen genetische und epigenetische Veränderungen zur Transformation von normalem Kolonepithel in Adenokarzinome (GRADY WM, 2002). In 30 % aller kolorektalen Tumoren werden Mutationen im TGF- β Typ II Rezeptor gefunden, wodurch Tumorzellen resistent gegenüber TGF- β werden und der TGF- β Signalweg inaktiviert wird (BERG et al., 2010). Auch Mutationen in Smad 4 und Smad 2 werden häufig in dieser Art von Tumoren nachgewiesen, während Mutationen im TGF- β Typ I Rezeptor selten sind (GRADY WM, 2002; BERG et al., 2010). Mutationen von Smad 4 in der Keimbahn führen z.B. zur Entstehung juveniler Polypen (BERG et al., 2010).

Erste klinische Studien testen die Wirkung von systemischen TGF- β Signalweg-Inhibitoren für die Behandlung von Tumorpatienten. Betrachtet man jedoch die wichtige Rolle von TGF- β in den unterschiedlichen Gewebearten ist ein sehr vorsichtiges Vorgehen diesbezüglich nötig, um unerwünschte Nebeneffekte zu minimieren (MEULMEESTER & TEN DIJKE, 2011). Dennoch gibt es schon viel versprechende Ergebnisse in diesem sehr jungen Forschungsgebiet. So konnte in einer Behandlung von Mäusen mit löslichen TGF- β Typ II Rezeptoren die metastatische Ausbreitung von z.B. Brusttumoren verhindert werden. Die Rezeptoren bewirken hierbei, dass der Ligand TGF- β vorwiegend an die im Überfluss vorhandenen verabreichten Rezeptoren bindet, im Gegensatz zu seinen natürlichen Rezeptoren (YANG YA, 2002).

1.1.3 Allgemeine Struktur und Funktion der Latent TGF- β binding Proteine (LTBPs)

LTBPs gehören zu der LTBP/Fibrillin Protein Familie, welche die Glykoproteine LTBP 1-4 sowie Fibrillin 1-3 enthält (SAHARINEN J, 1999). Fibrilline formen die ECM-Mikrofibrillen und interagieren mit LTBPs (ISOGAI Z, 2003; RAMIREZ F, 2009; KANTOLA et al., 2010). LTBPs sind wichtige Modulatoren der TGF- β Bioverfügbarkeit und zuständig für eine korrekte Faltung, effiziente Sekretion und Anhaftung von TGF- β in der ECM. Diese gezielte Anlagerung an extrazelluläre Strukturen stellt dabei eine effektive Kontrolle der Aktivität von TGF- β dar. Die Funktion sich an die Matrix zu binden ist demnach eine wichtige Eigenschaft von LTBPs (SAHARINEN et al., 1998). Darüber hinaus sind LTBPs eine strukturelle Komponente der ECM-Mikrofibrillen (SAHARINEN et al., 1998; STERNER-KOCK et al., 2002; BERG et al., 2010; FORSTI et al., 2010).

Die Familie dieser extrazellulären und transmembranären Proteine ist charakterisiert durch lange Bereiche von Epidermal Growth Faktor (EGF-) ähnlichen calciumbindenden Domänen (GILTAY et al., 1997). Diese zentralen Anteile aus langen EGF-Wiederholungen sind wahrscheinlich für die stabförmige Struktur der LTBP/Fibrillin Familie zuständig (SAHARINEN et al., 1998). Neben den EGF-Domänen enthalten die vier bisher bekannten LTBP (LTBP 1-4), sowie Fibrillin 2 und 3, auch noch vier LTBP-ähnliche (TB-) Module (ETTORE APPELLAA, 1988; GILTAY et al., 1997; URBAN et al., 2009). Diese TB-Module bestehen aus einem charakteristischen Muster von jeweils acht Cystein-Molekülen (GILTAY et al., 1997; SAHARINEN et al., 1998). Mehr als 60 % der Proteinstruktur von LTBP besteht aus diesen sich wiederholenden EGF- und TB-Domänen. Beide Strukturen vermitteln Interaktionen zwischen Proteinen wie z.B. zwischen Zelloberflächen-Rezeptoren und ihren Liganden (SAHARINEN et al., 1998; STERNER-KOCK et al., 2002).

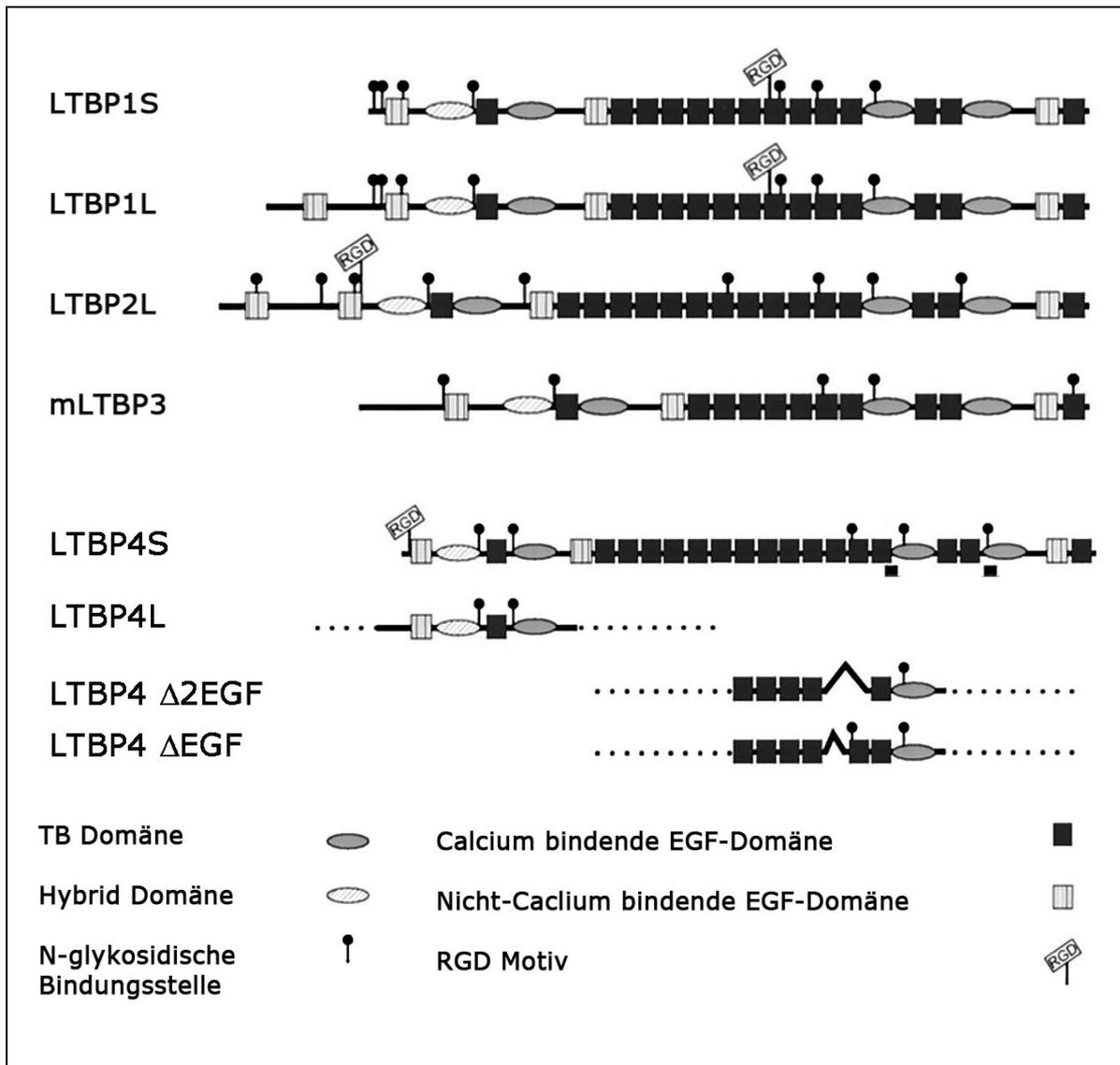


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Struktur der LTBP4s.

LTBP4s bestehen aus langen Bereichen von Epidermal Growth Faktor (EGF-) ähnlichen calciumbindenden Domänen sowie aus vier LTBP-ähnlichen (TB-) Modulen mit charakteristischem 8-Cystein Muster. Die Abbildung wurde modifiziert nach Saharinen *et al.* (1998).

Durch die Anzahl der zentralen EGF-Domänen können die vier humanen LTBP4s voneinander unterschieden werden. Dabei besitzt LTBP1 11, LTBP2 13, LTBP3 8 und LTBP4 14 EGF Wiederholungen (MOREN A, 1994; YIN W, 1995; GLEIZES, 1996; SAHARINEN *et al.*, 1998). Der N-Terminus der LTBP4s ist verantwortlich für die Assoziation mit der ECM, genauer gesagt mit Fibronectin und Fibrillin (GLEIZES, 1996). Diesem Ende folgt eine Proteinase sensitive Region mit hohem Prolin-Anteil. An dieser Stelle wird der LLC durch Proteolyse von der Matrix gelöst. Der C-Terminus von LTBP1, 3 und 4 bindet an den SLC (SAHARINEN J, 1999; YOSHINAGA *et al.*, 2008; FORSTI *et al.*, 2010). Während LTBP1 und 3 an alle drei

Isoformen von TGF- β binden können, interagiert LTBP4 ausschließlich mit TGF- β 1 (SAHARINEN J, 1999). LTBP2 assoziiert nicht mit dem SLC und besitzt Funktionen in der Zelladhäsion und Migration (SAHARINEN J, 1999; VEHVILÄINEN P, 2003). Am C-terminalen Ende der LTBP4 befindet sich eine typische Struktur von zwei EGF-Domänen eingerahmt durch zwei TB Domänen. TGF- β ist über Disulfidbrücken kovalent assoziiert mit der ersten 8 Cystein-Domäne in diesem Muster. Bezogen auf das komplette Protein ist diese Bindungsstelle die dritte TB Domäne. Die Assoziation von LTBP4 mit dem latenten SLC ist essentiell für die richtige Funktionsweise von TGF- β . Zwar gibt es Mechanismen, die latentes TGF- β in Abwesenheit von LTBP4 aktivieren, diese sind jedoch bei weitem nicht so effektiv (YOSHINAGA et al., 2008).

1.1.3.1 Spezielle Strukturen und Funktionen von LTBP1, LTBP2 und LTBP3

Jedes der vier LTBP Gene besitzt mehrere Isoformen, die durch duale Promotoren oder alternatives Spleißen entstehen (RIFKIN, 2005). Die Rolle der unterschiedlichen Spleißvarianten ist noch nicht vollständig geklärt. Es könnte sich jedoch um eine Feintuning der TGF- β Aktivierung handeln, da die verschiedenen Varianten eine unterschiedliche Affinität für die ECM Strukturen besitzen (KANTOLA et al., 2010). Die Funktionen der einzelnen LTBP Gene sind gewebespezifisch, was sich in den Expressionsmustern zeigt (SAHARINEN et al., 1998; KOLI et al., 2004).

LTBP1 wird vorwiegend im Herzen, der Plazenta und der Lunge exprimiert, jedoch nicht im Pankreas. LTBP2 wird ebenfalls nicht im Pankreas dafür aber stark in Lunge, Skelettmuskeln, Leber und Plazenta ausgebildet (MOREN A, 1994; GILTAY et al., 1997). LTBP3 wird vor allem im Herz, Skelettmuskel, der Prostata und in Ovarien exprimiert (PENTTINEN C, 2002).

In verschiedenen Studien mit Mäusen wurden die spezifischen Funktionen der LTBP Gene eruiert. Mutationen im LTBP1 Gen führen z.B. zu Entwicklungsanomalien in Herz, Lunge und Knochen (YOSHINAGA et al., 2008). LTBP2 knockout Mäuse sterben in einem sehr frühen Entwicklungsstadium, wahrscheinlich aufgrund einer gestörten Implantation (SHIPLEY J.M, 2000). Mutationen im LTBP2 Gen sind mit kongenitalem Glaukom, Extopia lentis und Osteopenie verbunden, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass LTBP2 essentiell für eine normale Augenentwicklung ist (ALI M., 2009). LTBP3 knockout Mäuse zeigen ein abnormales Knochenwachstum und ein generelles Wachstumsdefizit, während Mutationen im LTBP3 Gen mit Oligodontia, kleiner Statur, erhöhter Knochendichte und Skoliose assoziiert sind. LTBP3 ist demnach wichtig für die Zahnentwicklung und das physiologische Kno-

chenwachstum (DABOVIC B, 2002a; NOOR A., 2009). Alle Mausphänotypen mit Mutationen in LTBP 1 oder 3 weisen eine verminderte TGF- β Aktivität auf (YOSHINAGA et al., 2008). LTBPs sind für eine korrekte Faltung und Sekretion von TGF- β nötig und spielen ebenfalls eine wichtige Rolle in der Pathogenese verschiedener Neoplasien. Einige Mamma-Karzinome zeigen, verglichen mit normalem Gewebe, niedrigere Level an LTBP1 und 3 (DALLAS SL, 1994; KOSKI C, 1999; OKLU R, 2000). LTBP1 ist zudem in verschiedenen epithelialen Neoplasien der Leber, der Ovarien und in neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltraktes herunterreguliert (CHAUDHRY A, 1994; HENRIKSEN R, 1995; ROTH-EICHHORN S HEITMANN B, 2001).

Transgene hypomorphe LTBP4-Mäuse entwickeln u.a. schwere pulmonale Emphyseme, Kardiomyopathien und kolorektale Tumore (STERNER-KOCK et al., 2002). Auf die verschiedenen bekannten Funktionen von LTBP4 wird im Folgenden genauer eingegangen.

1.1.4 Spezielle Struktur und Funktion von LTBP4

Das von Giltay *et al.* (1997) beschriebene Gen LTBP4 ist bis dato das jüngste Mitglied der LTBP Familie und auf Chromosom 19 lokalisiert. Dieses Chromosom besitzt die höchste Gendichte aller humanen Chromosomen, große gebündelte Genfamilien und einen hohen GC-Gehalt. Dies deutet auf eine erhebliche biologische und evolutionäre Signifikanz hin (GRIMWOOD J, 2004). LTBP4, das in allen bislang getesteten Säugern (Maus, Ratte, Affe, Mensch) vorkommt, beinhaltet 20 EGF-Domänen, wovon 17 Konsensussequenzen für eine Calciumbindung aufweisen (SAHARINEN J, 1999). LTBP4 besitzt mindestens vier verschiedene Isoformen, von denen zwei Isoformen ein unterschiedliches N-terminales Ende besitzen (GILTAY et al., 1997; SAHARINEN et al., 1998). Eine weitere Isoform ist unfähig TGF- β zu binden, weil die dritte TB Domäne, an der die Bindung normalerweise stattfindet, nicht vorhanden ist (KOLI K, 2001b). Dies deutet stark auf eine TGF- β unabhängige Funktion von LTBP4 hin (KANTOLA et al., 2010). Die beiden N-terminal verschiedenen Isoformen werden aufgrund ihrer Länge LTBP4 long (LTBP4L) und LTBP4 short (LTBP4S) genannt. Während die LTBP4S Sequenz ein Cluster von 4-Cystein Resten im N-terminalen Bereich aufweist, besitzt LTBP4L zwei solcher Cluster. LTBP4L und LTBP4S zeigen deutliche Unterschiede in der Expression, der Sekretion, der Aufbereitung und der Positionierung in der ECM.

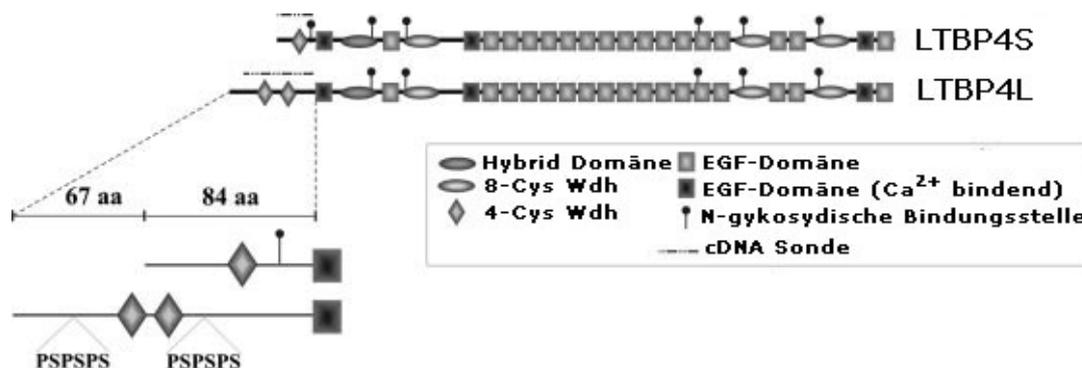


Abb. 1.4: Schematische Darstellung der strukturellen Unterschiede zwischen den N-terminal verschiedenen LTBP4 Isoformen.

Dargestellt sind LTBP4S und LTBP4L. Während LTBP4S ein Cluster von vier Cystein Resten im N-terminalen Bereich aufweist, besitzt LTBP4L zwei davon. PSPSPS zeigt die Lokalisierung von Prolin-Serin-Wiederholungen unbekannter Funktion, im N-Terminus von LTBP4L an. Die Abbildung wurde modifiziert nach Kantola *et al.* (2010).

Beide Varianten werden sehr stark im Herz, in den interstitiellen Fibroblasten der Herzklappen, sowie stark im Skelettmuskel exprimiert (GILTAY *et al.*, 1997; SAHARINEN *et al.*, 1998). Darüber hinaus wird LTBP4L in der Leber und LTBP4S in Lunge und Dünndarm gefunden. Dieses gewebespezifische Expressionsmuster entsteht durch die Kontrolle der Transkription mittels zwei verschiedener Promotoren und weist auf eine unabhängige und spezifische Rolle der Varianten in humanen Geweben hin (KANTOLA *et al.*, 2010). LTBP4L und LTBP4S können zusätzlich in Pankreas, Uterus und Plazenta nachgewiesen werden. Gehirn, Leber und Nieren weisen nur eine sehr geringe Expression auf (GILTAY *et al.*, 1997; SAHARINEN *et al.*, 1998). Auffallend ist, dass die LTBP4 Expression in adultem Gewebe signifikant höher ist als in embryonalem Gewebe (SAHARINEN *et al.*, 1998).

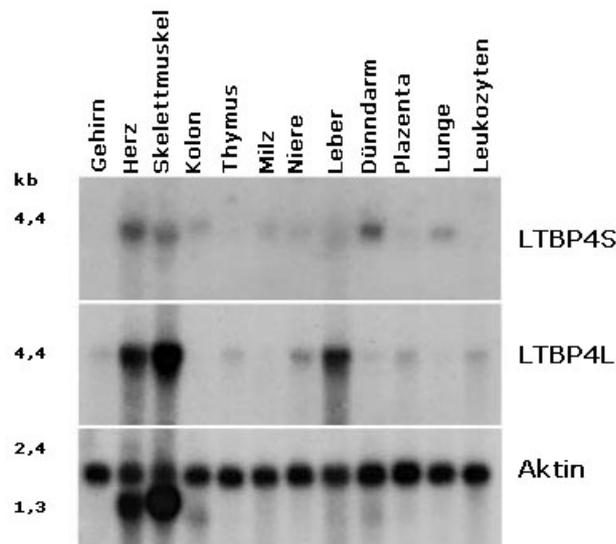


Abb. 1.5: Expressionsmuster von LTBP4S und LTBP4L in humanem Gewebe.

Dargestellt sind die mRNA Expressionslevel von den beiden N-terminal verschiedenen Isoformen von LTBP4 in 12 unterschiedlichen Organsystemen. Beide Varianten werden sehr stark in Herz und Skelettmuskel exprimiert. Während LTBP4S zusätzlich vor allem in Dünndarm und Lunge zu finden ist, lässt sich LTBP4L vor allem in der Leber nachweisen. Als Positivkontrolle wurde Aktin verwendet. Die Abbildung wurde modifiziert nach Kantola *et al.* (2010)

Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden LTBP4 Varianten ist die Sekretion aus der Zelle. LTBP4L bildet hierfür einen Komplex mit TGF- β und fördert und beschleunigt so dessen Sekretion. LTBP4S hingegen wird vorwiegend in freier Form sezerniert und kann deshalb, im Gegensatz zu LTBP4L, in der ECM detektiert werden (KANTOLA *et al.*, 2010).

Neben der Funktion die TGF- β Bioverfügbarkeit zu regulieren, werden LTBP4 weitere bedeutende Funktionen zugesprochen. LTBP4 ist demnach wichtig für den Aufbau elastischer Fasern und fungiert als potentielles Tumorsuppressorgen (STERNER-KOCK *et al.*, 2002; KANTOLA AK, 2008; DABOVIC B, 2009; KRETSCHMER *et al.*, 2011). Darüber hinaus ist das Gen essentiell für die Entwicklung der viszeralen Organe, inklusive Lunge, Darm und Urogenitaltrakt. Eine Störung der LTBP4 Expression ist mit einer Reihe schwerwiegender pathologischer Prozesse assoziiert (URBAN *et al.*, 2009).

1.1.5 Bedeutung von LTBP4 in pathologischen Prozessen

Eine Reihe von Studien beschäftigt sich mit pathologischen Prozessen im Zusammenhang mit LTBP4. Die aus einer Störung der LTBP4 Funktion resultierenden Pathologien sind verschieden und mannigfaltig.

Transgene hypomorphe LTBP4 Mäuse, die mittels „gene trap“-Strategie erzeugt wurden, entwickeln u.a. schwere pulmonale Emphyseme, Kardiomyopathien und kolorektale Tumore. Diese stark gewebe-spezifischen Veränderungen sind verknüpft mit erheblichen Defekten in der Struktur von elastischen Fasern und mit einer reduzierten Deponierung von TGF- β in der ECM. Als Konsequenz aus reduziertem LTBP4 und in der Folge reduziertem TGF- β 1 zeigen epitheliale Zellen reduzierte Level an phosphoryliertem Smad2, eine erhöhte c-myc Expression sowie eine unkontrollierte Proliferation. LTBP4 ist ein stark gewebespezifisches Protein, weshalb seine Funktionen nur zum Teil von anderen LTBP Proteinen ersetzt werden kann (STERNER-KOCK et al., 2002; KOLI et al., 2004). Die abnormale Lungenentwicklung in diesen Mäusen führt zu, bereits bei der Geburt vorhandenen, progredienten Lungenemphysemen (STERNER-KOCK et al., 2002).

Die Lungenfibroblasten produzieren hierbei weniger aktives TGF- β 1, wohingegen die Sekretion von latentem TGF- β deutlich erhöht ist. Diese Veränderungen führen zu einer ECM mit mehr Fibronectin und damit zum pulmonalen Phänotyp (KOLI et al., 2004). Eine Kardiomyopathie des rechten Herzens und als Folge daraus eine myofibrilläre Hypertrophie wird ebenfalls beobachtet. Unklar ist jedoch, ob die Veränderungen am Herzen primär oder sekundär bedingt sind (STERNER-KOCK et al., 2002).

Mutationen im LTBP4 Gen sind auch in humanen Patienten beobachtet worden. In einer Studie von Urban *et al.* (2009) wiesen vier, voneinander unabhängige, Patienten rezessive Mutationen im LTBP4 Gen auf. Vier der fünf festgestellten Mutationen führen zu einem prämaturnen Stopp der Translation und einer Destabilisierung der LTBP4 mRNA. Die reduzierte Synthese und das verminderte Vorhandensein von LTBP4 in der ECM verursachen eine erhöhte TGF- β Aktivität sowie eine Zerreißung elastischer Fasern. Dieses Urban-Rifkin-Davis Syndrom (URDS) ist gekennzeichnet durch kraniofaciale Anomalien, schwerwiegende pulmonale und viszerale Beteiligung sowie cutis laxa. Die Patienten leiden an den verschiedensten Symptomen wie z.B. starker Dyspnoe, hervorgerufen durch zystische und atelektatische Veränderungen der Lunge sowie Zwerchfellhernien. Auch gastrointestinale Malformationen, wie Divertikel oder Stenosen, sowie Hydronephrosen und offene Fontanellen werden beobachtet (URBAN et al., 2009). Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Anordnung von TGF- β in der ECM und das TGF- β Signaling essentiell sind für eine normale Entwicklung und dass dies durch multifunktionelle Proteine wie LTBP4 erreicht

wird. Dabei ist davon auszugehen, dass die vollständige Rolle der LTBP4 während der Entwicklung noch nicht hinreichend bekannt ist (URBAN et al., 2009).

Viele Studien beschäftigen sich vorwiegend mit der Rolle von LTBP4 in der Karzinogenese (STERNER-KOCK A, 2002; MAUEL et al., 2007; BERG et al., 2010; FORSTI et al., 2010; KRETSCHMER et al., 2011). Es wird geschätzt, dass 30 % aller Patienten mit kolorektalen Tumoren ein genetisches Risiko dafür tragen (BERG et al., 2010). LTBP4 ist unter den Genen, die ein signifikant unterschiedliches mRNA Expressionslevel bei Patienten mit genetisch bedingten Tumoren aufweisen (BERG et al., 2010). In der bereits erwähnten Studie von Sterner-Kock *et al.* (2002) entwickeln die für LTBP4 hypomorphen Mäuse bereits mit vier Wochen einen, durch ein extensives Schleimhautödem induzierten, rektalen Prolaps. Mit 12 bis 14 Wochen entwickeln die meisten Tiere Adenome aus denen mit sechs bis acht Monaten, im distalen Bereich des Kolorektums sichtbare Adenokarzinome werden. Die Läsionen ähneln derer die sich in Smad3 knockout Mäusen entwickeln (ZHU Y, 1998).



Abb. 1.6: Pathologische Veränderungen in LTBP4 hypomorphen Mäusen.

Auf dem linken Bild ist eine ca. vier Wochen alte Maus mit Rektalprolaps dargestellt. Nach 12-14 Wochen entwickeln die meisten Tiere Adenome aus denen mit 6-8 Monaten Adenokarzinome werden. Auf dem rechten Bild ist der Darm einer LTBP4- Maus abgebildet. Der rote Pfeil zeigt auf das gut sichtbare Adenokarzinom im Bereich des Rektums. Die Bilder wurden modifiziert nach Sterner-Kock *et al.* (2002).

Auch ein „single-nucleotide“ Polymorphismus (SNP) im LTBP4 Gen ist mit der Entwicklung kolorektaler Tumoren assoziiert. Dieser SNP wurde dabei signifikant häufiger bei weniger aggressiven Tumoren (Duke Stage A+B im Gegensatz zu Duke Stage C+D) gefunden. Die Genotypisierung dieser SNPs könnte zukünftig eine einfache Methode darstellen, um das Risiko für eine Tumorentstehung im Patienten einzuschätzen (FORSTI et al., 2010).

Während die meisten Studien die Entwicklung von Tumoren mit einer Verminderung der LTBP4 Expression in Zusammenhang bringen, beschreiben Berg *et al.* (2010) eine Erhöhung der LTBP4 Expression bei kolorektalen Tumoren (STERNER-KOCK *et al.*, 2002; KOLI *et al.*, 2004; MAUEL *et al.*, 2007; FORSTI *et al.*, 2010; KRETSCHMER *et al.*, 2011). Eine Erhöhung der Expression könnte demnach zu einer vermehrten Bindung von TGF- β an die ECM führen. Damit würde eine Bindung von TGF- β an seinen Rezeptor und somit seine Tumor hemmenden Eigenschaften, wie Apoptose oder Wachstumshemmung, verhindert werden (BERG *et al.*, 2010).

Auch in Mamma-Tumoren ist LTBP4 in die neoplastische Transformation involviert. In zwei verschiedenen Studien konnte eine Verminderung der LTBP4 Expression in Adenokarzinomen, sowohl bei Mäusen als auch in humanen Patienten, nachgewiesen werden (MAUEL *et al.*, 2007; KRETSCHMER *et al.*, 2011). Als Folge ist TGF- β 1 ebenfalls herunterreguliert, was eine reduzierte TGF- β Bioverfügbarkeit bewirkt. Eine verminderte Expression von TGF- β 1 hat einen proliferativen Effekt auf epitheliale Zellen, was kanzerogene Prozesse auslösen könnte. TGF- β 2 wird, da sein Suppressor TGF- β 1 vermindert vorhanden ist, kompensatorisch vermehrt exprimiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass LTBP4 klar in die Karzinogenese epithelialer Tumoren involviert ist. Es lässt sich jedoch nicht mit Sicherheit feststellen, ob eine Verminderung der LTBP4 Expression die Tumorgenese auslöst, oder ob transformierte Zellen LTPB4 sekundär herunterregulieren. Auch ist nicht klar, ob LTBP4 unabhängig von TGF- β zur Entstehung des LTBP4- Phänotyps beiträgt. Diese unabhängige Wirkung kann jedoch nicht ausgeschlossen werden (KOLI *et al.*, 2004). Dennoch darf davon ausgegangen werden, dass LTBP4 ein potentieller Tumorsuppressor ist, dessen Beitrag zur Integrität der ECM wahrscheinlich die Tumorzellinvasion und die metastatische Verbreitung verhindert (STERNER-KOCK *et al.*, 2002; MAUEL *et al.*, 2007; KRETSCHMER *et al.*, 2011). Weiterhin ist es möglich, dass LTBP4 im Kolon allein verantwortlich für die Anhaftung von TGF- β an die ECM ist (STERNER-KOCK *et al.*, 2002). Bis dato ist z.B. unbekannt ob es einen Rezeptor für LTBP4 gibt, der eine direkte Interaktion mit Zielzellen ermöglichen würde (MAUEL *et al.*, 2007).

1.2 Epigenetik und ihre Mechanismen

1.2.1 Verschiedene Definitionen des Begriffs im Wandel der Zeit

Während die Rolle genetischer Prozesse in der Entstehung pathologischer Krankheitsbilder, wie Tumoren, seit langer Zeit ein weithin bekannter Fakt ist, hat die Relevanz epigenetischer Mechanismen auf diesem Gebiet erst in den letzten beiden Jahrzehnten an Akzeptanz gewonnen. Auch die Definition des Begriff Epigenetik hat einen Wandel durchlaufen. Die ursprüngliche Definition von C.H. Waddington lautete: „The causal interactions between genes and their products, which bring the phenotype into being.” (WADDINGTON, 1942). Diese Definition bezieht sich auf die Rolle der Epigenetik in der embryonalen Entwicklung und involviert das Verständnis für die Chromatinstruktur und ihren Einfluss darauf Gene zu aktivieren oder zu hemmen. Eine zeitgemäßere Definition wäre: „The study of heritable changes in gene expression that occur independent of changes in the primary DNA sequence.” (SHARMA et al., 2010). Der Begriff Epigenetik ist demnach das Studium erblicher Veränderungen in der Genexpression die ohne Veränderungen in der DNA Sequenz stattfinden (EGGER et al., 2004; FEINBERG, 2008). Die meisten dieser Veränderungen der Genexpression etablieren sich während der embryonalen Differenzierung und bleiben auch während der Zellteilung stabil. Epigenetische Veränderungen können also bewirken, dass Zellen, trotz identischer genetischer Information, verschiedene Identitäten mit unterschiedlicher phänotypischer Ausprägung haben. Dies bietet einen Mechanismus für zelluläre Vielfalt durch posttranskriptionale Regulierung des Genoms (JONES & BAYLIN, 2002; EGGER et al., 2004). Ein weiteres, sehr wichtiges Kriterium der Epigenetik ist die Tatsache, dass ihre Effekte, im Gegensatz zu genetischen Veränderungen, potentiell reversibel sind (REN et al., 2011). Dies hat zu dem relativ neuen Feld der epigenetischen Therapie geführt (YOO & JONES, 2006). Ziel bei dieser Art der Therapie ist es, die für pathologische Prozesse ursächlichen Veränderungen rückgängig zu machen. Fakt ist ebenso, dass die DNA Methylierung unabkömmlich ist für die embryonale Entwicklung von Säugern. In einer Studie von Li *et al.* (1992) wurde gezeigt, dass sich Mäuseembryos mit inaktiver DNA Methyltransferase nicht über die mittlere Gestationsperiode hinaus entwickeln.

Zusammengefasst lässt sich also sagen, dass epigenetische Eigenschaften partiell reversibel, somatisch hereditär, für die embryonale Entwicklung essentiell und DNA Sequenz unabhängig sind. Sie modulieren die Genexpression, die Chromatinstruktur

und Zellfunktionen wie Zellzyklus und Apoptose. Epigenetische Mechanismen sind folglich grundlegend für die Vervollständigung genetischer Informationen, die Embryogenese, die Gewebe- und Organentwicklung, die Erhaltung physiologischer Funktionen, Alterungsprozesse und für die Pathogenese von Krankheiten wenn eine Störung der Mechanismen vorliegt, verantwortlich (REN et al., 2011).

1.2.2 Unterschiedliche Mechanismen der Epigenetik

Epigenetische Mechanismen werden in vier Kategorien eingeteilt: DNA Methylierung, kovalente Histonmodifikationen, nicht kovalente Mechanismen und nicht kodierende RNA wie z.B. mikro-RNA (SHARMA et al., 2010). Diese Mechanismen verändern die Struktur und Dynamik, vor allem aber die Erreichbarkeit und Kompaktheit des Chromatins und somit die Funktionalität des Genoms. Das Zusammenspiel aller epigenetischen Veränderungen schafft die so genannte epigenetische Landschaft. Diese reguliert, in welcher Form sich das Genom in den unterschiedlichen Zelltypen, Entwicklungsstadien und Krankheitszuständen manifestiert (EGGER et al., 2004; ZHANG et al., 2006; BERNSTEIN et al., 2007; KOUZARIDES, 2007; SUZUKI & BIRD, 2008; JIANG & PUGH, 2009). So können Gene, die in spezifischen Zellen nicht gebraucht werden durch epigenetische Kontrollmechanismen unterdrückt werden. Die DNA Methylierung ist der am besten erforschte Mechanismus der Epigenetik und wird deshalb in Punkt 1.2.3 ausführlich dargestellt.

1.2.2.1 Kovalente Histonmodifikationen

Histone sind basische Proteine, die für die Verpackung der DNA zuständig sind. Je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 lagern sich zu einem Oktamer zusammen um welches sich die DNA annähernd zweimal windet. Dieser Komplex aus DNA und Histonen wird Nukleosom genannt. Histonproteine besitzen eine globale C-terminale Domäne und ein unstrukturiertes N-terminales Ende (LUGER et al., 1997). Dieses N-terminale Ende kann posttranslational kovalent modifiziert werden durch z.B. Methylierung, Acetylierung, Ubiquitinierung und Phosphorylierung spezifischer Reste. Diese Änderungen sind an der Regulation zellulärer Schlüsselprozesse wie Transkription, Replikation und Reparatur beteiligt (KOUZARIDES, 2007).

Alle Veränderungen zusammengenommen stellen den sogenannten „Histone Code“ dar, der die Struktur und Aktivität der unterschiedlichen Chromatinregionen festlegt und das epigenetische Gedächtnis der Zelle repräsentiert (JENUWEIN & ALLIS, 2001). Dabei können die Modifikationen entweder die Zugänglichkeit von Chromatin

verändern, oder bestimmte Effektor Proteinen rekrutieren. Bislang sind viele dieser, oben beschriebenen, kovalenten Histonmodifikationen erforscht worden. Dies hilft die Art und Weise zu verstehen wie Genexpressionsmuster reguliert werden.

Je nachdem welcher Histonrest wodurch modifiziert ist, können die Veränderungen zur Aktivierung oder zur Hemmung der Transkription führen. Die Acetylierung von Lysin z.B. kann zu transkriptionaler Aktivierung führen wohingegen die Methylierung von Lysin zur Aktivierung oder Hemmung der Transkription, abhängig davon welcher Rest wie stark methyliert ist, führen kann (KOUZARIDES, 2007). Histonmodifikationsmuster werden durch Enzyme dynamisch reguliert. Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Methyltransferasen (MHMTs) fügen Acetyl- und Methylgruppen an bestimmte Lysine der Histonproteine hinzu, während Histon-Deacetylasen (HDACs) und Histon-Demethylasen (HDMs) Acetyl- bzw. Methylgruppen entfernen (HABERLAND et al., 2009).

DNA Methylierung und Histonmodifikationen interagieren auf verschiedenen Ebenen miteinander um den Genexpressionsstatus, die Chromatinorganisation und die zelluläre Identität festzulegen (CEDAR & BERGMAN, 2009; SHARMA et al., 2010). So können z.B. verschiedenen HMTs, wie G9a, SUV39H1 oder PRMT5, DNA Methyltransferasen (DNMTs) direkt rekrutieren oder die Stabilität der DNMT Proteine regulieren um Gene stillzulegen (CEDAR & BERGMAN, 2009; SHARMA et al., 2010). DNMTs hingegen können z.B. HDACs rekrutieren. Die Interaktion zwischen beiden Mechanismen verstärkt die Komplexität der epigenetischen Regulation der Genexpression (SHARMA et al., 2010).

1.2.2.2 Nukleosom Positionierung und Histonvarianten

Neben den eben beschriebenen kovalenten Modifikationen spielen auch nicht kovalente Mechanismen eine wichtige Rolle bei der Regulierung der Genaktivität durch Veränderungen der Chromatinstruktur. Zu diesen nicht kovalenten Mechanismen gehören die Umgestaltung von Nukleosomen und das Ersetzen von Histonproteinen durch spezialisierte Histonvarianten (SHARMA et al., 2010). Nukleosome sind, wie oben bereits erwähnt, Basis-Module für die DNA Verpackung in der Zelle. Zusätzlich können sie jedoch auch die Genexpression verändern, indem sie die Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren zu regulatorischen DNA Abschnitten beeinflussen (JIANG & PUGH, 2009). Nukleosome werden demnach gezielt um Promotorstrukturen positioniert um deren Zugänglichkeit zu beeinflussen (MAVRICH et al., 2008). Die Positionierung eines Nukleosoms unmittelbar strangaufwärts des Transkriptionsstartpunk-

tes ist direkt verknüpft mit der Stilllegung von Genen (LIN et al., 2007; SHIVASWAMY et al., 2008). Im Rückkehrschluss ist ein maskieren des Startpunktes durch ein Nukleosom mit einer Hemmung des Gens assoziiert (SCHONES et al., 2008).

Histonvarianten, wie z.B. H3.3 oder H2A.Z können ebenfalls die Positionierung der Nukleosome und damit die Genaktivierung steuern (SANTENARD & TORRES-PADILLA, 2009). Normalerweise werden Histone in der S-Phase nach der Replikation an die DNA gekoppelt. Bei den Histonvarianten hingegen geschieht ein Austausch mit physiologischen Histonen während des gesamten Zellzyklus (SANTENARD & TORRES-PADILLA, 2009). Sie lagern sich vor allem in Promotorregionen aktiver Gene an und verändern die Stabilität der Nukleosome indem sie die Genaktivierung steuern (JIN & FELSENFELD, 2007). H2A.Z kann so z.B. Gene vor einer unerwünschten Methylierung schützen (ZILBERMAN et al., 2008).

1.2.2.3 Nicht kodierende RNA (micro RNA)

MicroRNAs (miRNAs) sind nicht kodierende, sehr kleine (ca. 22 nt) RNA Moleküle welche die Genexpression durch posttranskriptionale Stilllegung von Zielgenen regulieren. Innerhalb eines RNA induzierten "silencing-Komplex" findet eine sequenzspezifische Basenpaarung der miRNA mit der 3'-Region der Boten RNA (mRNA) statt. Dies resultiert in der Degradierung der Ziel-mRNA oder in der Inhibierung der Translation (HE & HANNON, 2004). Eine Vielzahl biologischer Prozesse, wie Zellproliferation, Apoptose und Differenzierung werden von den gewebespezifisch exprimierten miRNAs kontrolliert. Zusätzlich können miRNAs auch Enzyme modulieren die für die DNA Methylierung und für Histonmodifikationen verantwortlich sind (FABBRI et al., 2007; FRIEDMAN et al., 2009). Dadurch wird erneut deutlich wie eng alle epigenetischen Veränderungen zusammen wirken und dass man einzelne Mechanismen nicht isoliert betrachten darf, will man ein Verständnis für die komplexe Regulation zellulärer Prozesse entwickeln.

1.2.3 Hypo- und Hypermethylierung

Der bislang am intensivsten erforschte Bereich der Epigenetik ist die spezie- und gewebespezifische DNA Methylierung (EHRlich, 2002). Dabei wird durch kovalente Modifikation der postreplikativen DNA aus Cytosin Methylcytosin hergestellt, indem an die fünfte Carbonposition des Pyrimidinrings eine Methylgruppe hinzugefügt wird (CHIANG et al., 1996; REN et al., 2011). Als Methyl donor wird hierfür das ubiquitäre

S-adenosyl-methionin (SAM) verwendet. Abgesehen von 5-Methylcystein gibt es noch zwei weitere häufige Basenmodifikation durch Methylierung: N6-Methyladenin und N4-Methylcytosin (LAIRD & JAENISCH, 1996). Da in dieser Arbeit ausschließlich die DNA-Methylierung von Cytosinbasen untersucht wurde, ist immer die Modifikation von Cytosin (5_mC) gemeint, wenn von DNA-Methylierung gesprochen wird.

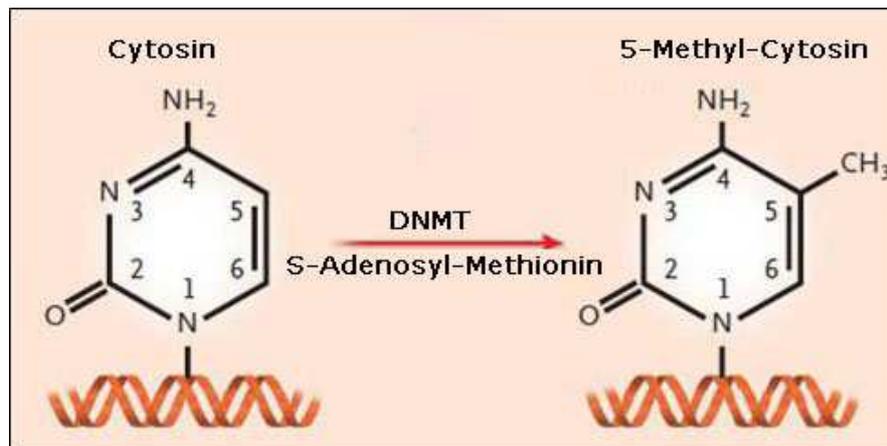


Abb. 1.7: Chemische Formel von Cytosin und 5-Methylcytosin.

An die fünfte Carbonposition des Pyrimidinrings wird dabei eine Methylgruppe angehängt. Methyl-donor ist das ubiquitäre SAM und die katalysierenden Enzyme sind die sogenannten DNMTs. Die Abbildung wurde modifiziert nach Herman *et al.* (2003).

Methylierungsmuster werden durch die koordinierenden Aktionen der DNA-Methyltransferasen (DNMTs) und ihrer assoziierten Faktoren, wie z.B. den Polycomb Proteinen etabliert (REN *et al.*, 2011). Die DNMT Familie der Säuger beinhaltet aktuell fünf Mitglieder: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B und DNMT3L. Sie sind verantwortlich für die Entstehung von Methylierungsmuster während der Embryogenese und der somatischen Gewebeerwicklung (REN *et al.*, 2011). DNMTs bestehen aus zwei Teilen, einem C-terminalen katalytischen Teil und einem großen N-terminalen Teil, der regulierende Funktionen besitzt (REN *et al.*, 2011). DNMT1 ist, im komplexen Zusammenspiel mit DNMT3A und DNMT3B, das Hauptenzym für die Erhaltung und Wartung der Methylierung während der Replikation (LIANG *et al.*, 2002; EL-OSTA, 2003). Es ist an der Replikationsgabel lokalisiert, methyliert neu synthetisierte DNA und ist mit zuständig für die Stabilität der unmethylierten CpG-Inseln (REN *et al.*, 2011). DNMT1 scheint, zum Teil auch in Zusammenarbeit mit DNMT3A, für die meiste Methylierung in Tumorzellen verantwortlich zu sein (RHEE *et al.*, 2000; RHEE *et al.*, 2002). DNMT2 besteht als kleinste Methyltransferase ausschließlich aus der C-terminalen Domäne und erkennt u.a. DNA Schäden (REN *et al.*, 2011). DNMT3A und

DNMT3B initiieren und etablieren während der frühen Embryogenese die *de novo* Methylierung (OKANO et al., 1999; GOLL & BESTOR, 2005). DNMT3L, das keine katalytische Domäne besitzt, ist dabei mit DNMT3B assoziiert und koordiniert unter anderem die Expression von DNMT3A und DNMT3B (GOWHER et al., 2005; REN et al., 2011). Nach der Differenzierung sind DNMT3A und DNMT3B im physiologischen Organismus nur noch sehr gering ausgeprägt, obwohl *de novo* Methylierung auch noch in adulten somatischen Zellen stattfinden kann, z.B. während des Alterungsprozesses (ISSA, 2000). In der Zelle sind beide Enzyme eng mit Nukleosomen verbunden, die methylierte DNA enthalten (REN et al., 2011). DNMTs werden noch weitere Funktionen im Prozess der Stilllegung von Genen zugeschrieben. Sie interagieren z.B. direkt mit Histondeacetylasen oder potentiellen Transkriptioninhibitor-Proteinen (ROUNTREE et al., 2000; BACHMAN et al., 2001; BAYLIN et al., 2001; BURGERS et al., 2002).

In Säugern findet die Methylierung ausschließlich an Cytosinen statt, denen ein Guanin folgt (CpG-Dinukleotide) (OSTER et al., 2011). Ungefähr 80% aller CpG-Dinukleotide des humanen Genoms liegen methyliert vor (EHRlich et al., 1982). Dies trägt zur chromosomalen Stabilität bei und unterdrückt effektiv die Transkription in inaktiven Regionen des Genoms (REN et al., 2011). Ausnahmen sind die CpG-Inseln in Promotorregionen welche meist unmethyliert vorliegen. CpG-Inseln sind ca. 1 kb große, GC-reiche Regionen und es wird geschätzt, dass ca. die Hälfte des Säuger-genoms CpG-Inseln aufweist (ANTEQUERA & BIRD, 1993; REN et al., 2011). Ungefähr bei 4 % der Gene, die CpG-Inseln im Promotorbereich aufweisen, liegen diese CpG-Inseln auch bei physiologischen Verhältnissen methyliert und damit abgeschaltet vor (SHEN et al., 2007). Beispiele hierfür sind das inaktive X-Chromosom weiblicher Säuger, aber auch genomisches Imprinting bei denen nur ein parentales Allel aktiviert ist (ANTEQUERA & BIRD, 1993; BIRD, 2002). Im Falle des inaktivierten X-Chromosoms, wird die Methylierung wahrscheinlich erst nach der Stilllegung des Gens durch ein RNA Produkt des Xist Gens ausgelöst. Dennoch ist die Methylierung wahrscheinlich essentiell daran beteiligt die Transkription effektiv zu hemmen (CSANKOVSKY et al., 2001). Verschiedene Studien führen dies als Beispiel für die Sichtweise, dass DNA Methylierung einen sekundären Event darstellt und für die Stabilität der Inaktivierung zuständig ist (KEOHANE et al., 1996; WUTZ & JAENISCH, 2000). Neuere Studien gehen jedoch von der Annahme aus, dass die DNA Methylierung in Promotorregionen, zusammen mit anderen epigenetischen Me-

chanismen, ursächlich für die Stilllegung bestimmter Gene ist (SHARMA et al., 2010; OSTER et al., 2011; REN et al., 2011). Hypermethylierung limitiert den Zugang von Transkriptionsfaktoren zum Promotor und unterstützt die Bindung von Methylbindenden-Proteinen (MBDs). Daraus resultiert die Rekrutierung zusätzlicher silencing-assoziiierter Proteine, was schlussendlich zum Gensilencing führt (REN et al., 2011).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die DNA Methylierung die Kontrolle der Genexpression während der Entwicklung und Differenzierung unterstützt bzw. initiiert und unterhält. Methylierung im Bereich nichtkodierender DNA schützt die DNA vor Transkription und dient der Stabilisierung der DNA Struktur. Hypermethylierung im Bereich von Promotorstrukturen führt zur Inaktivierung dieser spezifischen Gene.

1.2.4 Epigenetische Mechanismen im Zusammenhang mit pathologischen Prozessen

Epigenetische Mechanismen sind essentiell für eine normale Entwicklung. Viele dieser Mechanismen werden jedoch abseits physiologischer Entwicklungsprozesse, bei denen die epigenetischen Kontrollmechanismen fehlgeleitet sind, beobachtet (WOLFFE & MATZKE, 1999). Veränderungen der epigenetischen Landschaft können zu einer Vielzahl pathologischer Krankheitsbilder führen wie z.B. Tumore, Arteriosklerose, Insulinresistenz, Nierenerkrankungen, Autoimmunerkrankungen, Alzheimer und eine Reihe psychischer Erkrankungen (POGRIBNY & BELAND, 2009; REN et al., 2011). Veränderte DNA Methylierungs- und damit Expressionsmuster bei imprinteten Genen führen z.B. zum Beckwith-Wiedemann, zum Angelmann- oder zum Prader-Willi-Syndrom. Bei dem Beckwith-Wiedemann Syndrom kommt es zu Großwuchs, Fehlbildungen und Tumoren, während das Angelmann Syndrom mit psychischen und motorischen Entwicklungsverzögerungen assoziiert ist. Das seltene Prader-Willi Syndrom verursacht eine ausgeprägte Muskelhypotonie, reduzierter Fertilität und kognitiven Beeinträchtigungen (WOLFFE & MATZKE, 1999). Abweichendes Imprinting von IGF2 dient beim Beckwith-Wiedemann Syndrom (BWS) als Schlüsselfaktor für die Entwicklung. Bei diesem Überwachstumssyndrom besteht auch ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Nieren- und Lebertumoren (EHRlich, 2002). Die, auf den Verlust des Imprinting folgende, Überexpression von IGF2 führt dabei wahrscheinlich zum Frühstadium der Tumorentwicklung (EHRlich, 2002).

1.2.4.1 Epigenetische Mechanismen in Tumoren

Am intensivsten ist bisher der Zusammenhang zwischen epigenetischen Veränderungen und der Tumorgenese erforscht. Dabei wurden für die Initiation und Progression von Tumoren ursprünglich rein genetische Ursachen diskutiert. Heute weiß man, dass die Gesamtheit epigenetischer und genetischer Veränderungen ursächlich für die Karzinogenese sind (JONES & BAYLIN, 2002). Das epigenetische Silencing des DNA Reperaturgens MLH kann z.B. zu genetischer Hypermethylierung führen, was u.a. in manchen Arten von Ösophagustumoren beobachtet werden kann (REN et al., 2011). Es kommt ebenfalls vor, dass in bestimmten Tumorsuppressorgenen ein Allel genetisch mutiert und das andere Allel epigenetisch herunterreguliert ist (REN et al., 2011). Unzählige genetische und epigenetische Veränderungen interagieren in allen Stadien der Karzinogenese miteinander und in manchen Tumorarten sind sie die Schlüsselmechanismen zur Tumorentstehung (JONES & BAYLIN, 2002; FEINBERG et al., 2006; JONES & BAYLIN, 2007).

Das Tumorepigenom ist charakterisiert durch globale Veränderungen in der DNA Methylierung, Histonmodifikationsmustern und einem veränderten Expressionsprofil von Chromatin modifizierenden Enzymen (EGGER et al., 2004). Die Ursachen für die Epimutationen sind noch nicht komplett verstanden aber es ist bekannt, dass sie zur Aktivierung von Onkogenen und zur Hemmung von Tumorsuppressorgenen führen (SHARMA et al., 2010).

Darüber hinaus sind diese Veränderungen hereditär, weshalb in einer schnell wachsenden Tumorphilipulation daraufhin selektiert wird. Dies stellt einen erheblichen Wachstumsvorteil für Tumorzellen dar und führt zu unkontrolliertem Wachstum und globaler Dysregulation des Genexpressionsprofils (SHARMA et al., 2010). Ein gut untersuchtes Beispiel hierfür ist der Wilms' Tumor. In diesem malignen, im Kindesalter auftretenden, Nierentumor führt Hypomethylierung zur Aktivierung von Wachstumsgenen sowie dem Verlust des Imprinting im IGF2 Gen. Die daraufhin folgende biallele Expression führt zur Aktivierung von Protoonkogenen (OGAWA et al., 1993; WOLFFE & MATZKE, 1999; WILSON et al., 2007).

Neben Veränderungen der Methylierung sind auch andere epigenetische Mechanismen an der globalen Dysregulation des Epigenoms beteiligt und demnach für die Tumorentwicklung von Bedeutung. Der Verlust der Histonacetylierung, durch eine Überexpression der HDACs in Tumoren, führt z.B. zur Hemmung spezifischer Gene (FRAGA et al., 2005; SHARMA et al., 2010). Eine Zellzyklusbeschleunigung kann

z.B. durch die Histonvariante H2A.Z ausgelöst werden, die in verschiedenen Tumorarten überexprimiert ist (SVOTELIS et al., 2009). Auch Veränderungen in der miRNA Expression tragen zur Tumorgenese bei (LU et al., 2005). Abhängig von ihrem Zielgen fungieren sie dabei als Tumorsuppressoren oder Onkogene. Der Tumorsuppressor mi-127 ist z.B. in verschiedenen Tumoren durch Methylierung ausgeschaltet (TOYOTA et al., 2008).

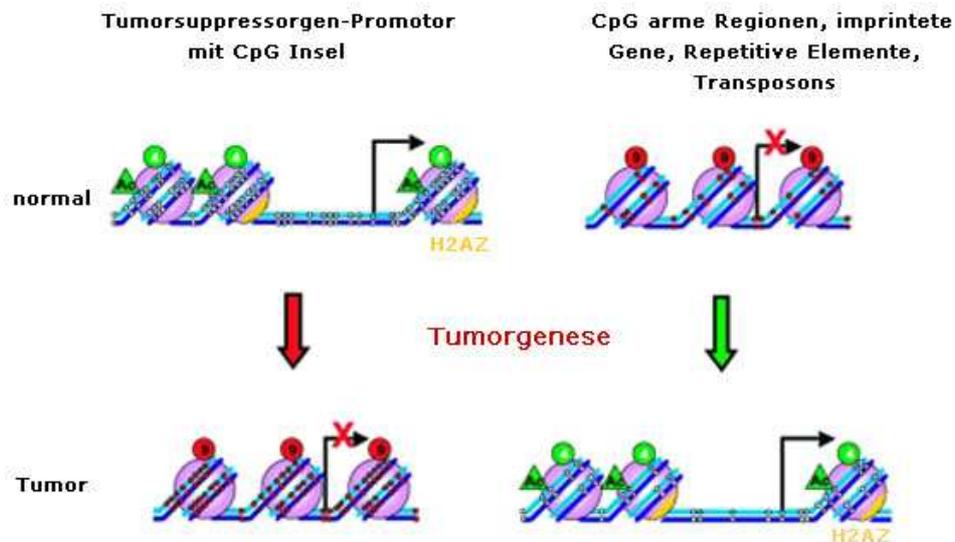


Abb. 1.8: Schematische Darstellung der Veränderungen der DNA Methylierung in Tumoren.

In normalen Zellen sind CpG-Inseln in Promotoren generell unmethyliert und die Histone sind acetyliert (grüne Kreise). Repetitive Elemente, Transposons und imprintete Gene sind dagegen stark methyliert ebenso wie Histone (rote Kreise). Während der Tumorgenese werden CpG-Inseln methyliert wodurch das Gen gehemmt wird (angezeigt durch den roten Pfeil). Im Gegensatz dazu erfahren die nicht-kodierenden Regionen eine globale Hypomethylierung und damit eine abweichende Aktivierung (angezeigt durch den grünen Pfeil). Die Abbildung wurde modifiziert nach Sharma *et al.* 2010.

Die globalen epigenetischen Veränderungen in Tumoren beinhalten die Dysregulation von hunderten Genen während der Tumorgenese. Die Mechanismen wie eine Tumorzelle diese Vielzahl an abnormen Veränderungen kontrolliert sind noch nicht vollständig verstanden (FEINBERG et al., 2006). Es ist möglich, dass Epimutationen einen Selektionsvorteil für Tumorzellen darstellen. Dennoch ist es unwahrscheinlich, dass diese Vielzahl an Veränderungen zufällig und unabhängig voneinander ablaufen. Eine plausible Erklärung wäre, dass eine initiale Veränderung in einem sehr frühen Stadium der neoplastischen Evolution zur Akkumulation epigenetischer Veränderungen führt (FEINBERG et al., 2006). Dieses initiiierende Ereignis prädisponiert die Tumorzelle demnach dazu, weitere epigenetische Änderungen anzuhäufen. Diese These wird das "Tumor Stammzellen Modell" genannt. Das Modell schlägt vor,

dass epigenetische Veränderungen, die in Stamm- oder Progenitorzellen stattfinden, die frühesten Ereignisse der Karzinogenese darstellen (FEINBERG et al., 2006). Diese Theorie wird gestützt von der Tatsache, dass epigenetische Veränderungen zu den ersten Ereignissen in verschiedenen Tumorarten zählen und dass physiologisches Gewebe veränderte Progenitorzellen in Krebspatienten aufweist (CUI et al., 2003; SHARMA et al., 2010). Interessanterweise sind hypermethylierte Regionen in Tumoren oft vorgekennzeichnet mit H3K27me3 polycomb Markierungen in embryonalen Stammzellen. Diese Tatsache stellt ebenfalls eine Verbindung zwischen der Regulierung der Entwicklung und der Tumorgenese her (SCHLESINGER et al., 2007; WIDSCHWENDTER et al., 2007).

1.2.4.1.1 Globale Hypomethylierung in Tumoren

DNA Hypomethylierung findet in Tumoren an repetitiven Elementen, Retrotransposons, CpG armen Promotoren und Introns statt (RODRIGUEZ J, 2006). Die Hypomethylierung der repetitiven Sequenzen führt zu erhöhter genomischer Instabilität, indem chromosomale Umstrukturierungen gefördert werden (JONES & BAYLIN, 2002). Retrotransposons können durch Hypomethylierung aktiviert und in andere Regionen verlagert werden, wodurch ebenfalls eine genomische Instabilität gefördert wird (HOWARD et al., 2008). Beispiel hierfür ist das ICF Syndrom (ICF= Immundefekt, Zentromer-Instabilität und faziale Dysmorphien), bei dem eine Mutation im DNMT3B Enzym zu Hypomethylierung und im Folgendem zu Immundefizienz und Zentromerinstabilität führt (OKANO et al., 1999; XU GL, 1999; HERMAN & BAYLIN, 2003). Hypomethylierung wurde darüber hinaus bei sehr vielen verschiedenen Tumorarten nachgewiesen: Prostata Tumore, chronische B-Zell Lymphome, hepatozelluläre Karzinome und Zervixtumore (EHRLICH, 2002). Die hohe Frequenz von tumorassoziiertes DNA Hypomethylierung ohne gleichzeitiger DNA Hypermethylierung lässt auf eine unabhängige Rolle von DNA Hypomethylierung in Bezug auf die Tumorentstehung und das Tumorstadium schließen (EHRLICH, 2002; REN et al., 2011). Diese Hypothese wird von einer Reihe von Studien gestützt (LAIRD & JAENISCH, 1996). So ergab z.B. eine Fütterung von Ratten mit einer methyl-restriktiven Diät eine erhöhte Inzidenz von Lebertumoren (MIKOL et al., 1983).

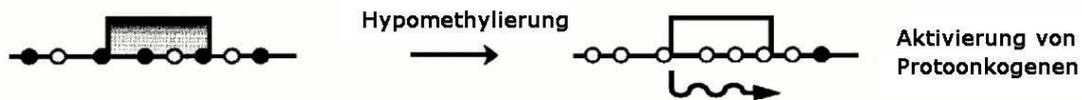


Abb. 1.9: Die Abbildung zeigt die Aktivierung von Protoonkogenen durch globale Hypomethylierung.

Die DNA ist als Linie dargestellt, die methylierten CpG-Dinukleotide als schwarze Kreise und die unmethylierten CpG-Dinukleotide als weiße Kreise. Die Promotoren sind als rechteckige Kästen dargestellt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Laird und Jaenisch (1996).

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass sich zwei mögliche Konsequenzen aus der DNA Hypomethylierung in Tumoren ergeben. Einerseits wird die Transkription in physiologisch inaktiven Regionen nicht mehr effektiv unterdrückt, was zur schädlichen Expression viraler Gene oder repetitiver Elemente führen kann (HERMAN & BAYLIN, 2003). Andererseits kann die funktionelle Stabilität der Chromosomen verloren gehen.

1.2.4.1.2 Promotorhypermethylierung in Tumoren

DNA Hypermethylierung in Tumoren findet in den meisten Fällen in den CpG-Inseln der Promotorregion des betroffenen Gens statt (SHARMA et al., 2010). Zuerst entdeckt wurde dieses Phänomen in dem Promotor des sogenannten Retinoblastom Protein (Rb), das eine Tumorsuppressorfunktion bei Retinoblastomen aufweist (GREGER et al., 1989). Seitdem konnten bei zahlreichen weiteren Genen wie z.B. p16, MLH1 oder BRCA1 eine Hypermethylierung der Promotorregion nachgewiesen werden (JONES & BAYLIN, 2002; SHARMA et al., 2010). Diese Gene sind grundsätzlich in zelluläre Prozesse involviert die unabdingbar für die Karzinogenese, wie z.B. DNA-Reparatur, Zellzyklus, Adhäsion, Apoptose und Angiogenese, sind (SHARMA et al., 2010). Zusätzlich zur direkten Inaktivierung von Tumorsuppressoren können Gene auch indirekt gehemmt werden z.B. durch die Hemmung von Transkriptionsfaktoren (LONG et al., 2007).

Die Relevanz der Hypermethylierung in Promotorregionen lässt sich anhand einer Methylierungsstudie nachweisen, in der geschätzt wurde, dass durchschnittlich 600 von 45 000 CpG-Inseln in Tumoren hypermethyliert sind (COSTELLO et al., 2000).

Die detaillierten Abläufe die zur Hypermethylierung eines Gens führen sind noch immer unklar. Erhöhte DNMT Level könnten DNA Hypermethylierungen erleichtern, was einen Wachstumsvorteil darstellen könnte (REN et al., 2011). Ein alternativer Mechanismus wäre, dass Tumorzellen einen Prozess durchlaufen, der der aktiven

epigenetischen Reprogrammierung während der Entwicklung ähnelt (REN et al., 2011). Dieser epigenetische Schalter könnte durch DNMTs zusammen mit anderen Proteinen reguliert werden.

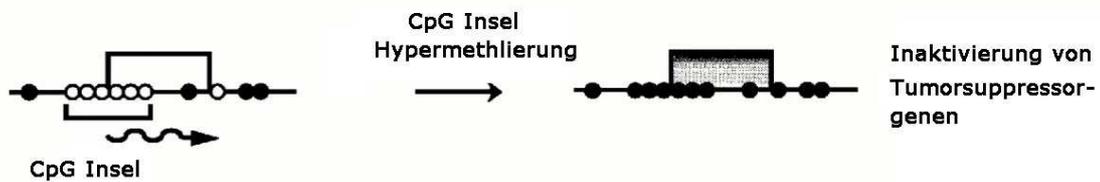


Abb. 1.10: Die Abbildung zeigt die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Promotorhypermethylierung.

Die DNA ist als Linie dargestellt, die methylierten CpG-Dinukleotide als schwarze Kreise und die unmethylierten CpG-Dinukleotide als weiße Kreise. Die Promotoren sind als rechteckige Kästen dargestellt. Die Abbildung wurde modifiziert nach Laird und Jaenisch (1996).

Ein weiterer Hinweis darauf, dass Hypermethylierung als ursächliches Ereignis für die Karzinogenese in Frage kommt, liefert das „two-hit model“ von Alfred Knudson (KNUDSON, 2001). Knudson geht davon aus, dass die DNA zwei „Treffer“ erleiden muss, damit sich Tumore entwickeln können. Keimbahnmutationen in hereditären Tumoren oder somatische Mutationen in nicht erblichen Tumoren können hierbei als erster „Treffer“ auf die DNA dienen. Damit wird jedoch nur ein Allel des Gens ausgeschaltet. Um eine Tumorentwicklung zu erreichen, müssen beide Kopien des Gens betroffen sein. Der zweite „Treffer“ führt demnach zum Verlust des zweiten Allels. Abnorme Methylierung des Promotors kann in dieser Hypothese den gleichen Effekt haben wie der erste „Treffer“. In hereditären Tumoren fungieren epigenetische Veränderungen jedoch oft als der zweite „Treffer“. Aber auch die Hypermethylierung beider Allele ist keine Seltenheit (ESTELLER et al., 2001).

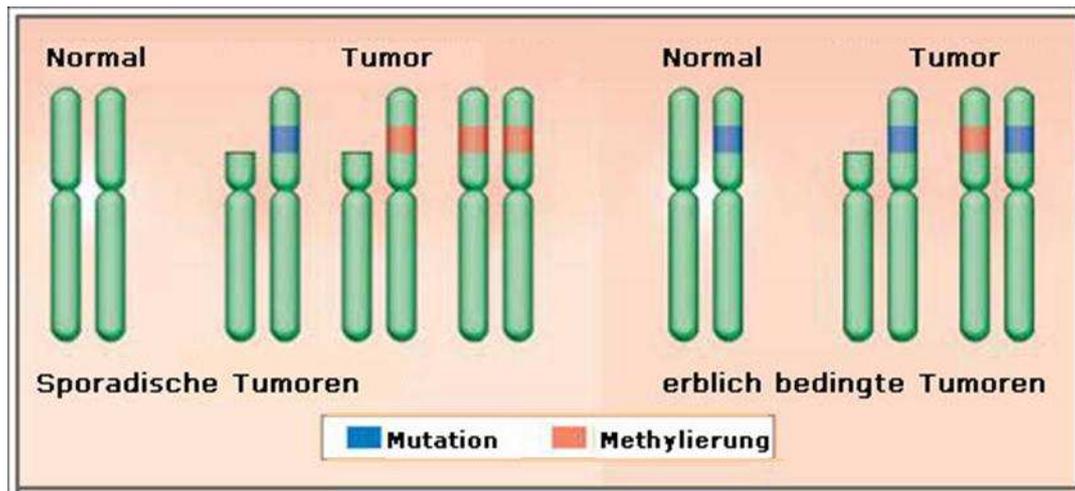


Abb. 1.11: Schematische Darstellung des „Two-hit“ Modells von Alfred Knudson.

Der erste Treffer, dargestellt am kurzen Arm des grünen Chromosoms, kann eine Mutation in einer kodierenden Region eines Tumorsuppressor Gens sein. Dies kann bei erblich bedingten Tumoren in der Keimbahn, oder somatisch bedingt in sporadischen Tumoren vorkommen. Alternativ stellt die Promotorhypermethylierung den ersten Treffer in sporadischen Tumoren dar. Der zweite Treffer eliminiert das verbleibende Allel. Dies kann durch chromosomale Deletionen oder ebenfalls Promotorhypermethylierung in geschehen. Die Abbildung wurde modifiziert nach Herman *et al.* (2003)

1.2.4.2 Epigenetische Therapiemöglichkeiten

Parallel zu der Erforschung des Zusammenhangs zwischen epigenetischen Mechanismen und pathologischen Prozessen hat sich das Feld der epigenetischen Therapie etabliert. Ursächlich hierfür war die Entdeckung, dass epigenetische Prozesse potentiell reversibel sind (REN *et al.*, 2011). Die beiden ersten und am besten untersuchten epigenetischen Medikamente sind die Nukleosidanaloga 5'-Azacytidin und 5'-Aza-2'-deoxycytidin. In den 1980igern wurde die demethylierende Eigenschaft dieser beiden Pyrimidinanaloga entdeckt. Nach Inkorporation in die DNA von aktiv replizierenden Tumorzellen, durch das Bilden eines kovalenten Protein-DNA-Komplexes, können diese zytotoxischen Reagenzien ihre demethylierende Eigenschaft entfalten (REN *et al.*, 2011). Diese beiden zur Therapie der myeloischer Leukämie zugelassenen Medikamente hemmen die DNA Methyltransferasen und gehören somit zu den DNMT Inhibitoren (DNMTi) (REN *et al.*, 2011).

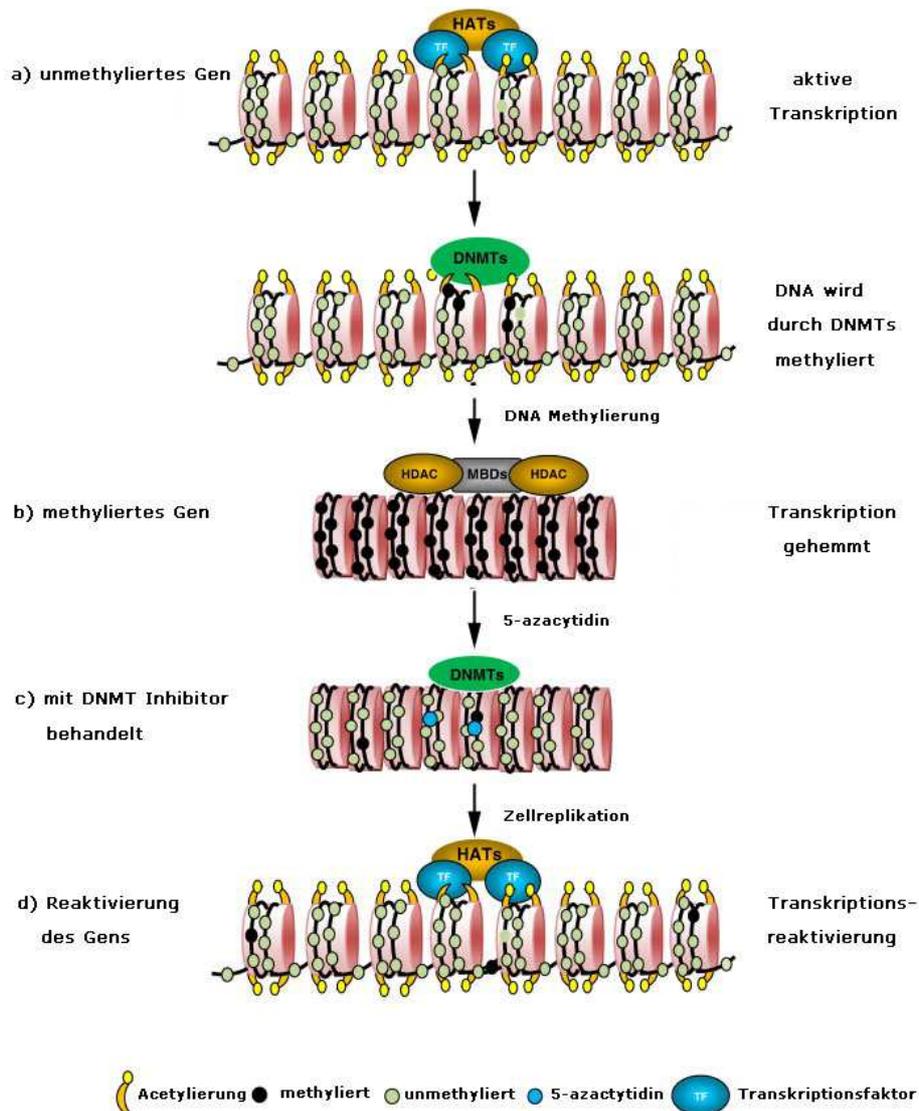


Abb. 1.12: Schematische Darstellung der Wirkungsweise von DNMT Inhibitoren.

a) zeigt transkriptionel aktives Chromatin mit unmethylierter DNA und acetylierten Histonen. Im Folgenden wird die DNA durch DNMTs methyliert. b) zeigt das methylierte Gen. Die Methylbindeproteine (MBDs) binden an die methylierte DNA und rekrutieren HDACs wodurch die Histone deacetyliert werden. Das Chromatin kondensiert und die Transkription ist gehemmt. c) nach Behandlung der DNA mit 5-azacytidin ist eine Methylierung der neu synthetisierten DNA durch DNMTs nicht mehr möglich. d) die reduzierte DNA Methylierung und die erhöhte Histonacetylierung führen zur Transkriptionsreaktivierung. Die Abbildung wurde modifiziert nach Juan *et al.* (2011).

Im Laufe der letzten Jahre wurden viele neue DNMTi's, wie z.B. Zeburaline und 5-fluoro-2'-deoxycytidine, mit erhöhter Effektivität und reduzierter Toxizität entwickelt. Sie hemmen das Tumorstadium, induzieren die Tumorzellapoptose und reduzieren das Tumorstadium (YOO & JONES, 2006; REN *et al.*, 2011). Neben den Nukleosid DNMTi's gibt es auch Nicht-nukleosid DNMTis wie Procain und Procainamid. Trotz ihrer Effizienz in der Veränderung der Methylierungsmuster, sind aktuell erhältliche DNMT Inhibitoren alle nicht selektiv, was die meisten Nebenwirkungen allen voran

die Zytotoxizität, erklärt. Aufgrund dessen werden zurzeit verschiedene Kombinations-therapien geprüft um bessere Therapiemöglichkeiten zu erschließen. In einer Studie von Braiteh *et al.* (2008) konnten so z.B., mit einer Kombination aus 5'-Azacytidin und dem Histondeacetylase-Inhibitor Valproinsäure, vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von Brust- sowie Kolontumoren in fortgeschrittenen Stadien erzielt werden (BRAITEH, 2008). Eine weitere Möglichkeit wäre die individualisierbare Therapie, basierend auf Tests ob der einzelne Patient auf eine DNMTi Behandlung anspricht oder nicht (REN *et al.*, 2011). Trotz erster positiver Ergebnisse gibt es dennoch auch kritische Stimmen, was die Therapie mit Demethylierungsreagenzien anbelangt. Die Induktion von DNA Hypomethylierung hat zwar kurzzeitige Antitumor-Effekte könnte aber ebenso dazu beitragen, dass das Tumorwachstum von Zellen, die die Chemotherapie überlebt haben, beschleunigt wird (EHRlich, 2002). Die Signifikanz der DNA Hypomethylierung in Tumoren ist zwar noch nicht ausreichend verstanden, aber mehrere Studien weisen auf eine wichtige Rolle in der Karzinogenese, unabhängig von der DNA Hypermethylierung, hin (COSTELLO *et al.*, 2000; EHRlich, 2002). Deshalb ist es umso wichtiger alternative Wege in der epigenetischen Therapie zu erforschen. Viel versprechende Ziele sind u.a. HDAC Inhibitoren, HMT Inhibitoren oder auch synthetische miRNAs die dazu genutzt werden könnten Onkogene in Tumoren selektiv zu unterdrücken (SHARMA *et al.*, 2010).

Auch im Bereich der Diagnostik haben sich durch epigenetische Forschung neue Möglichkeiten eröffnet. Die Hypermethylierung von CpG-Inseln kann z.B. als molekularer Marker für die Früherkennung von Tumoren dienen. Methylierte DNA Sequenzen können in u.a. Sputum, Serum oder Urin bei den verschiedenen Tumorarten durch hoch sensitive PCR's erkannt werden (HERMAN & BAYLIN, 2003). Eine Studie über Lungenkrebs bei Rauchern hat ergeben, dass das Tumorwachstum, bis zu 3 Jahre bevor der Tumor klinisch detektierbar wird in Sputum vorhergesagt werden kann (PALMISANO *et al.*, 2000). Auch veränderte Methylierungsmuster im Kolon können schon in frühen prämaligen Läsionen und in tumorangrenzender unverändert erscheinender Mucosa gefunden werden (HERMAN & BAYLIN, 2003). Eine weitere potentielle Anwendung der Detektion von Hypermethylation ist das Abklären der Prognose. So haben z.B. Patienten mit Lungentumoren bei denen ein bestimmtes Gen hypermethyliert ist eine kürzere Überlebensspanne nach Diagnosestellung als Patienten ohne diese Veränderung (TANG *et al.*, 2000).

1.2.5 Potentieller Zusammenhang zwischen Hypermethylierung und LTBP4

In dieser Arbeit wird die These überprüft ob LTBP4 in Tumoren durch Hypermethylierung herunterreguliert sein könnte.

Grundlage dieser Hypothese ist, dass LTBP4 als potentielles Tumorsuppressorgen in Tumoren vermindert exprimiert wird (STERNER-KOCK et al., 2002; KOLI et al., 2004; MAUEL et al., 2007; FORSTI et al., 2010; KRETSCHMER et al., 2011). Tumorsuppressorgene werden sehr oft durch Promotorhypermethylierung reguliert. Auch der Zusammenhang zwischen LTBP4 und der Entwicklung von epithelialen Neoplasien, wie Kolonkarzinomen oder Adenokarzinomen der Mamma, ist hinreichend dokumentiert (STERNER-KOCK et al., 2002; KOLI et al., 2004; MAUEL et al., 2007; FORSTI et al., 2010; KRETSCHMER et al., 2011). So zeigen z.B. LTBP4 hypomorphe Mäuse nach ca. vier Wochen p.p. einen Rektumprolaps als Vorstufe für ein Kolonkarzinom (STERNER-KOCK et al., 2002). Kolonkarzinome gehören zu den Tumoren mit der höchsten CpG-Insel Hypermethylierungsrate (EHRlich, 2002). Auch in anderen epithelialen Tumoren ist eine Hypermethylierung des Promotors häufig anzutreffen (siehe Punkt 1.2.4.1.2).

Desweiteren ist LTBP4 auf dem Chromosom 19 lokalisiert welches einen sehr hohen GC Gehalt aufweist (BERG et al., 2010). Dies ist Voraussetzung für ein Vorhandensein von CpG-Inseln. Es wird geschätzt, dass etwa die Hälfte des Säuger-genoms CpG-Inseln besitzt (REN et al., 2011). Hypermethylierung von Promotorbereichen setzt an diesen CpG-Inseln an.

Ob LTBP4 eine, von TGF- β unabhängige, Rolle in der Karzinogenese besitzt ist bislang nicht bewiesen. Die Tatsache, dass LTBP4 von TGF- β unabhängige Funktionen in der physiologischen Zelle besitzt lässt dies jedoch wahrscheinlicher werden. So wird z.B. LTBP4S vorwiegend in freier Form, ohne SLC, aus der Zelle sezerniert und eine strukturelle Isoform von LTBP4 ist sogar unfähig TGF- β zu binden (KANTOLA et al., 2010).

Eine Verbindung zwischen TGF- β und epigenetischen Mechanismen ist leicht herzustellen. Mitglieder der HDAC Familie, welche durch epigenetische Veränderungen an der Tumorentstehung beteiligt sind, interagieren mit Smad 2 und 3. Diese beiden Proteine sind Hauptziele im TGF- β Signalweg (siehe Punkt 1.2.2.1 sowie Punkt.1.1.1).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Doktorarbeit ist es die Dysregulationen von LTBP4 in epithelialen Tumoren, sowie die generelle Regulation von LTBP4 in physiologischen Zellen besser zu verstehen und ursächliche Mechanismen nachzuweisen. Hierfür werden zwei verschiedene Ansätze überprüft.

Einerseits wird die Hypothese, dass LTBP4 in epithelialen Tumoren durch Promotorhypermethylierung herunterreguliert ist, kontrolliert. Dies geschieht mit Hilfe von quantitativen Untersuchungen des LTBP4 Status in Tumorzellen und ergänzend mittels Methylierungsstudien. Diese Analysen könnten einen ersten Hinweis darauf geben, ob epigenetische Mechanismen die Expression des LTBP4 Gens inaktivieren könnten.

Parallel zu diesem Ansatz sollen potentielle Transkriptionsfaktoren, die gegebenenfalls an den Promotorbereich von LTBP4 binden, ausfindig gemacht werden und anhand von Luciferase Assays in Promotorstudien auf ihre Funktionalität hin überprüft werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen neue Erkenntnisse über LTBP4 und seinen Zusammenhang mit der Karzinogenese liefern.

2 Material

2.1 Kultur von Säugerzellen

2.1.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden verschiedene humane epitheliale (Tumor-)Zelllinien unterschiedlicher Herkunft kultiviert. Bezogen wurden die Zelllinien von ATCC und ECACC. Die Zelllinien sind nachfolgend unter Angabe ihrer histologischen Herkunft, Malignität (soweit bekannt) und Spezies aufgelistet:

Zelllinie	Spezies	Histologische Herkunft	Malignitätsgrad
CaCo2	human	Kolonadenokarzinom	II
DLD1	human	Kolonkarzinom	I
HEK293	human	Embryonale Nierenzelllinie	-
Hs578Bst	human	Brustzelllinie	-
Hs578T	human	Brustkarzinom	-
MCF7	human	Brustkarzinom	-
PC3	human	Prostatakarzinom	IV

2.1.2 Medien für die Kultur von Säugerzellen

Die verwendeten Zellkulturlösungen- und Medien wurden von der Firma Invitrogen sowie der Firma ATCC bezogen. Alle Medien wurden vor Gebrauch mit 1 % Pen/Strep und 10 % FCS versetzt. Nachfolgend sind die Kulturbedingungen der verschiedenen Zelllinien aufgeführt:

Zelllinie	Medium	weitere Zusätze	CO ₂ -Gehalt
CaCo2	EMEM	1% NEAA	5%
DLD1	RPMI-1640	2 mM L-Glutamat	10%
Hek293	DMEM	--	5%
Hs578Bst	HybriCare	30 ng/ml mouse EGF	5%
Hs578T	DMEM	0,01 mg/ml bovine insulin	5%
MCF-7	RPMI-1640	--	5%
PC3	RPMI-1640	--	5%

2.1.3 Verwendete Zusätze für die Zellkultur

FCS wurde von der Firma Biochrom AG, Trypsin EDTA, PBS und Pen/Strep von der Firma Invitrogen bezogen.

BES-Buffered Solution (BBS) wurde wie folgt selbst hergestellt.

2x BBS (pH 6,96)	50 mM	BES
	1,5 mM	Na ₂ HPO ₄
	280 mM	NaCl
	Add 200 ml	<i>A. bidest.</i>

Die Einstellung des pH Wertes erfolgte mit NaOH, anschließend wurde die Lösung steril filtriert.

Lagerung bei -80°C

2.2 Kultur von Bakterien

2.2.1 Bakterienstamm

Der in dieser Arbeit ausschließlich verwendete Bakterienstamm wurde über die Firma NEB (Frankfurt) bezogen. Im Folgenden ist er unter Angabe des Genotyps aufgeführt:

NEB 5-alpha Competent <i>E.coli</i>	<i>fhuA2Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)</i>
(High Efficiency)	M15 <i>gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17</i>

2.2.2 Lösungen für Bakterienkulturen

2.2.2.1 (LB) Medium nach Lennox

LB	10g	Trypton
	5g	Hefe-Extrakt
	10g	NaCl
	Ad 1 l	<i>A. bi-</i>
		<i>dest.</i>

für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert und bei 4 °C gelagert.

Folgende Zusätze wurden in folgenden Konzentrationen verwendet:

Ampicillin 0,1 mg/ ml

X Gal 0,032 mg/ ml

Lagerung der Zusätze bei -20°C

2.2.2.2 Nährmedien für die Herstellung kompetenter Bakterien

TFB1 30mM NaAc oder KAc (pH 6)
 50mM MnCl₂
 100mM NaCl
 10mM CaCl₂
 15% Glycerin
 Add 100ml *A. bidest*

TFB2 10mM MOPS (pH 7,0)
 75mM CaCl₂
 100mM NaCl
 15% Glycerin
 Add 100ml *A. bidest*

YT-Medium 5g NaCl
 (1l) 10g Hefe-Extrakt
 16g Trypton
 Add 1 l *A. bidest.*
 pH 7,0 mit 5 N NaOH einstellen

YB-Medium YT-Medium
 + 10mM KCl
 + 20mM Mg₂SO₄

(100ml frisch ansetzen)

Die Medien wurden für 20 Minuten bei 121 °C autoklaviert und bei 4 °C gelagert

2.3 Chemikalien, Enzyme, Kits

2.3.1 Chemikalien und Enzyme

Alle Chemikalien sind, soweit nicht anders angegeben, in p.a.-Qualität verwendet worden.

5 Aza-2'-deoxycytidin	SIGMA, Deisenhofen
2-Propanol	Carl ROTH, Karlsruhe
Acrylamid	Carl ROTH, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Carl ROTH, Karlsruhe
Antarctic Phosphatase	Fermentas, St. Leon-Roth
Bromphenol blue	SIGMA, Deisenhofen
CaCl ₂	Carl ROTH, Karlsruhe
Ca ₂ PO ₄	MERCK, Darmstadt
Chloroform	MERCK, Darmstadt
DEPC (Diethylpyrocarbonat) Wasser	Carl ROTH, Karlsruhe
D (+) Glucose	SIGMA, Deisenhofen
DMSO	SIGMA, Deisenhofen
EDTA	SIGMA, Deisenhofen
Essigsäure	Carl ROTH, Karlsruhe
Ethanol	Carl ROTH, Karlsruhe
Exonuclease I	NEB, Frankfurt
Ethidiumbromid-Lösung 1%	AppliChem, Darmstadt
Glycerin	MERCK, Darmstadt
GoTaq [®] Flexi DNA Polymerase	Promega, Heidelberg
H ₂ O ₂	MERCK, Darmstadt
Hefe Extrakt	Carl ROTH, Karlsruhe
Kaliumacetat	Carl ROTH, Karlsruhe
KCl	MERCK, Darmstadt
KH ₂ PO ₄	MERCK, Darmstadt
LB-Agar (Lennox)	Carl ROTH, Karlsruhe
MgCl ₂	MERCK, Darmstadt
MnCl ₂	Carl ROTH, Karlsruhe
MOPS	SIGMA, Deisenhofen
NaCl	AppliChem, Darmstadt

NaHCO ₃	Carl ROTH, Karlsruhe
Na ₂ HPO ₄	Carl ROTH, Karlsruhe
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Carl ROTH, Karlsruhe
Non fat dry milk	Cell Signaling Technology, Danvers
Ponceau S Solution	SIGMA, Deisenhofen
Proteinase K	AppliChem, Darmstadt
SOC-Medium	NEB, Frankfurt
T4 DNA Ligase	Roche Applied Science Mannheim
Temed	Carl ROTH, Karlsruhe
Tris	Carl ROTH, Karlsruhe
Trizol [®] Reagent	Invitrogen, Darmstadt
Trypsin EDTA	BIOCHROM AG, Berlin
Trypton	Carl ROTH, Karlsruhe
TWEEN-20	Caesar & Loretz GmbH, Hilden

2.3.2 Restriktionsenzyme

Alle Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) und der Firma NEB (Frankfurt) bezogen. Im Folgenden sind alle verwendeten Restriktionsenzyme aufgeführt:

BglII, HindIII, NcoI, NotI, SacI

2.3.3 Kits

100bp DNA Ladder Plus	Peqlab, Erlangen
100bp DNA Ladder Quick Load [®]	NEB, Frankfurt
1Kb DNA Ladder	Peqlab, Erlangen
1kb DNA Ladder Quick Load [®]	NEB, Frankfurt
ABI PRISM [®] BigDye [™] Primer Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
AB Taqman Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, Darmstadt
BigDye [®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Darmstadt
Dual-Luciferase [®] Reporter Assay System	Promega, Heidelberg
EpiTect [®] Bisulfite Kit	Qiagen, Hilden

Experion™ RNA StdSensAnalysis Kit	BIO RAD, München
GC-RICH PCR System	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Phusion® High Fidelity PCR Kit	NEB, Frankfurt
High Fidelity PCR Master	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
jetPRIME™, Polyplus-transfection Kit	Peqlab, Erlangen
Nucleo Spin® Extrakt II Gel Extraction	Macherey-Nagel, Düren
peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I	peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pGEM® -T Vector System I	Promega, Heidelberg
Platinum® Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Pre-Developed TaqMan® Assay Reagent	Applied Biosystems, Darmstadt
Pure Link™ HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Pure Yield™ Plasmid Midiprep System	Promega, Heidelberg
Qiaprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit	Invitrogen, Karlsruhe

2.4 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind neben ihrer Bezugsquelle nachfolgend aufgeführt. Die verwendeten Verdünnungen für Western Blot (WB)-Analysen sind angegeben. Die Antikörper wurden in TBST verdünnt.

Primärantikörper	Sekundärantikörper	Quelle	WB
Aktin (Clone AC-74)	Maus (monoklonal)	Sigma-Aldrich	1: 1000
PCNA	Maus (monoklonal)	Dako	1: 1000

2.5 Plasmide und Transkriptionsfaktoren

Folgende Klonierungs- und Expressionsvektoren wurden in dieser Arbeit verwendet:

Name	Charakteristika	Quelle
pGEM-T Vector System	Amp ^R /lacZ mit MCS, in der MCS linearisierter Vektor mit überhängenden T- Enden zur Klonierung von PCR-Produkten	Promega, Heidelberg
pGl4.23	[luc2/minP] Vektor	Promega, Heidelberg
pGl4.74	[hRluc/TK] Vektor	Promega, Heidelberg
pBluescript II SK (+)		Fermentas, St. Leon Roth
pEGFP-C1		Clontech, Saint-Germain-en-Laye (Frankreich)

Der in dieser Arbeit verwendete Transkriptionsfaktor Sp1 wurde freundlicherweise von Frau Dr. Conradi (Experimentelle Medizin, Köln) aus eigenem Bestand zur Verfügung gestellt.

2.6 Oligonukleotide

dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)

MBI Fermentas, St. Leon Roth

Die folgenden verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen synthetisiert. Nachfolgend sind alle Sequenzen der Oligonukleotide, die für die Klonierungsexperimente eingesetzt wurden, mit Angabe ihrer Schmelztemperatur (T_M) und ihrer Position aufgeführt.

Oligonukleotid	Sequenz (5'->3')	T_M (°C)
Prom4L-forBgIII	AAGATCTGAACTCCTGACCTCATGATC	53
Prom4L-revHindIII	CTAAGCTTGAAGAGCGGCAGCAACAG	56
2Prom4S-forBgIII	AAGATCTACCAGATGGCCTCATCCT	53
1Prom4S-forBgIII	AAGATCTCGTTGTAGCTCAGCACCCA	54
Prom4S-revHindIII	CTAAGCTTCAGCAGCACCAATAGCGAC	56
beta-Actin-for	CGTGGGCCGCCCTAGGCACCAG	61
beta-Actin-rev	TTGGCCTTAGGGTTCAGGGGGG	55
L4CpG25d_for	TTTATAGATTTGGGGGTTATAGG	51
L4CpG25d_rev	ATAAAACCATCTAATAAAAAACCTC	51
L4CpG34_for	ATTATTGAGAAGGAGGTTTTTATAG	53
L4CpG34_rev	CCCCACAATCTTAAACATTTAATAC	53
L4-cDNA-f	CCACGGGCTGCGGAATGC	52
L4-cDNA-r	CTTCGGGCACACTCATCCA	48
L4L-cDNA-f	AGGAGGAGCCGCTGCATC	50
L4LS-cDNA-r	ACGCTCACCATAGATGCCAC	49
L4S-cDNA-f	CGCAACGCCACCAGCGTG	52
M13 uni (-21)	TGTAAAACGACGGCCAGT	58
M13 rev (-29)	CAGGAAACAGCTATGACC	58

Des Weiteren wurden folgende Oligonukleotide für die qPCR von der Firma Applied Biosystems aus Darmstadt erworben.

HS 00947774 LTBP4L

HS 00945347 LTBP4S

Human RPLPO (FAM/MGB Probe) (ArtNr. 4333769)

Human TBP (FAM/MGB Probe) (Art.Nr. 4333761)

2.7 Puffer und Stammlösungen

Alle Lösungen wurden in zweifach deionisiertem Wasser (*A. bidest*) angesetzt und bis auf den Ladepuffer für 20 Minuten bzw. 1 h für RNA-Arbeiten bei 121 °C autoklaviert.

2.7.1 Puffer für molekularbiologische Methoden

2.7.1.1 TE Puffer

10x TE (pH 7,4)	100 mM	Tris/HC
	10 mM	EDTA

Lagerung bei RT

2.7.1.2 Puffer für Lyse der genomischen DNA

Lysispuffer (pH 7,4)	155mM	NH ₄ Cl
	10mM	KHCO ₃
	0,1mM	EDTA

Kern-Lysis-Puffer(pH 8,2)	10mM	TrisHCl
	400mM	NaCl
	2mM	EDTA

Lagerung bei 4°C

2.7.1.3 Puffer für Alkalische Lyse

Lysispuffer P1	50mM	Tris/HCl (pH 8,0)
	10mM	EDTA
	add 1 l	<i>A. bidest</i>

Lagerung bei 4°C

2.7.3.6 TBS

10x TBS (pH 7,5)	1,5 M	NaCl
	100m M	Tris
TBS-T	1 x	TBS
	0,05 %	Tween 20

Lagerung bei RT

2.7.3.7 Ponceau S-Lösung

Ponceau Lösung	0,1-0,5 %	Ponceau S
----------------	-----------	-----------

Lagerung bei RT

2.7.3.8 ECL Substrate

Solution A	200 ml	0,1 M Tris-HCl (pH 8,6)
	50 mg	Luminol

Lagerung bei 4°C

Solution B	11 mg	paraHydroxycoumarinsäure
	10 ml	DMSO

Lagerung bei RT im Dunkeln

2.7.3.9 Protein-Lysepuffer

Phosphatlysepuffer (PLP)	20 mM	NaPO ₄ pH 8,0
	140 mM	NaCl
	3 mM	MgCl ₂
	0,5 %	(v/v) NP-40
	1 mM	DTT
NEM	25 mg/ml	NEM (N-Ethyl-Maleimid)
	33 %	(v/v) Glyzerin
		gesättigt mit Bromphenolblau (0,1% (w/v))
Protein-Probenpuffer (5x)	625 mM	Tris/HCl pH 6,8
	100 mM	DTT
	16,5 %	(w/v) SDS

2.8 Geräte

7500Real Time PCR System	Applied Biosystems, Darmstadt
Axiovert 25	Zeiss, Göttingen
BioDoc Analyze	Biometra, Göttingen
Bio Photometer plus	Eppendorf, Hamburg
Biowizard Xtra Golden Line Sterilbank	KOJAIR, Nideggen
Blockheater	Stuart Scientific, Chelmsford
Centrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Duomax 1030	Heidolph instruments
Experion Automated Electrophoresis System	BIO RAD, München
Glo Max Multi Detection System	Promega, Heidelberg
HeizThermoMixer MH323	HCL BioTech, Pforzheim
Hera freeza	Heraeus, München
Herasafe Sterilbank	Heraeus, München
Molecular Imager ChemiDoc™ XRS Imaging System	BIO RAD, München
Multifuge1 L-R	Heraeus, München
Nano Quant infinite M200PRO	TECAN, Mainz
peqPOWER 300	Peqlab, Erlangen
Rotina 420R	Hettich Zentrifugen, Mühlheim
T Gradient Thermocycler	Biometra, Göttingen

Ultra low -152°C chest freezer

Unimax 1010

Wasserbad

Western Blot Kammern

Sanyo, München

Heidolph instruments,

Schwabach

Lauda, Königshofen

BIORAD, München

3 Methoden

3.1 Zellkultur-Methoden

3.1.1 Kultivierung von Säuger-Zellen

Die Kultivierung von Säugerzellen erfolgte bei 37 °C und je nach Zelllinie in einer 5 %-igen oder 10 %-igen CO₂-Atmosphäre (siehe Punkt 2.1.1). Zum Passagieren wurden die Zellen 2x mit PBS- gewaschen und dann mit 0,05% Trypsin für 3-5 min bei 37 °C von der Kulturschale abgelöst. Die Zellen wurden bei 200 x g für 1-2 min sedimentiert und je nach Zelllinie in entsprechendem frischen Medium (siehe Punkt 2.1.2) in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 verdünnt und auf neue Zellkulturschalen ausplattiert. Ein Wechsel des Kulturmediums fand im Abstand von zwei bis drei Tagen statt. Um Kontaminationen der Zellen zu vermeiden, wurden alle Arbeiten in der Zellkultur unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

3.1.2 Auftauen von Zellen

Kryokonservierte Zellen wurden unverzüglich nach Entnahme aus dem flüssigen Stickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad verbracht. Nach einer ca. 2-3 minütigen Wartezeit wurden die Zellen in 5 ml frischem Medium resuspendiert, abzentrifugiert, in neues Medium aufgenommen und auf einer Zellkulturschale ausplattiert.

3.1.3 Kryokonservieren von Zellen

Zur langfristigen Lagerung wurden exponentiell wachsende Zellen mit PBS gewaschen und abtrypsinisiert. Die Zellen wurden bei 100 x g für 5 min sedimentiert und in vorgekühltem Medium mit 20 % FCS und 10 % DMSO resuspendiert. Es folgte eine schrittweise Abkühlung (2 h -20 °C, ÜN -80 °C), bevor sie in flüssigem Stickstoff (-151 °C) dauergelagert wurden.

3.1.4 Bestimmung der Zellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte nach Anfärben der toten Zellen (eines Aliquots der Zellsuspension) mit 0,16% Trypanblau in einer Neubauer-Zählkammer. Durch die defekte Zellmembran der toten Zellen, kann der saure Azofarbstoff in das Zytosol eindringen und an die Zellproteine binden. Dadurch werden die Zellen tiefblau gefärbt. Die Zellen, die nicht blau gefärbt sind, können anschließend unter dem Mikroskop gezählt werden. In dieser Arbeit wurde hierzu das Axiovert 25 Mikroskop der Firma Zeiss verwendet.

3.1.5 Transfektion von Zellen mit jetPRIME™

Die transiente Transfektion von Zellen erfolgte entsprechend der Herstellerangaben mit dem jetPRIME™, Polyplus-transfection Kit der Firma Peqlab (Erlangen). Bei diesem Verfahren bildet die DNA mit dem alkalischen jetPRIME™-Reagenz einen Komplex, welcher an die Zelle bindet und die lysosomale Endozytose ermöglicht. Am Vortag der Transfektion wurden die subkonfluenten Zellen gezählt (siehe Punkt 3.1.4) und auf eine 96-well Platte ausplattiert. Dabei wurden pro Vertiefung 5.000 Zellen verwendet. Als Zelllinie für die Transfektion dienten, wegen ihrer schnellen Wachstumsrate und der guten Bereitschaft Fremd-DNA in sich aufzunehmen, HEK 293 Zellen. Die Transfektion erfolgte jeweils mit 100 ng Gesamt-DNA und 0,5 µl jetPRIME™ Reagenz je 96-well Vertiefung. Nach einem Zusammenmischen der Reagenzien erfolgte, nach kurzer Durchmischung und abzentrifugieren, eine 10 minütige Inkubation bei RT. Die Transfektionsansätze wurden tropfenweise unter ständigem Schwenken zu den kultivierten Zellen in das Kulturmedium gegeben und für 24 Stunden bei 37°C und 10% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einem Luciferase Assay (siehe Punkt 3.3.3) analysiert. Als Positivkontrolle für die erfolgreiche Transfektion wurden die Zellen mit einem GFP-Vektor transfiziert, der bei Anregung mit UV-Licht grün fluoresziert. Als Negativkontrollen dienten zum Einen ein Transfektionsansatz mit Luciferasekonstrukt aber ohne den getesteten Transkriptionsfaktor sowie zum Anderen untransfizierte Zellen. Um Transfektionsstress und unterschiedliche Transfektionseffizienzen auszugleichen wurde die transfizierte DNA-Menge durch das Plasmid pBluescript II SK (+) (Fermentas) konstant gehalten und es wurden für jeden Ansatz Dreifachbestimmungen durchgeführt. Die Transfektionseffizienz lag konstant über 90%.

3.1.6 5'-Aza-2'-deoxycytidin Behandlung von Zellen

Die Zellen einer 10 cm Zellkulturschale wurden auf drei 6 cm Zellkulturplatten erweitert. Am folgenden Tag wurden die 3 Platten mit 0 µM, 2,5 µM und 5 µM 5'-Aza-2'-deoxycytidin versetzt. Nach 72 Stunden wurden die Zellen, nach 2maligem Waschen mit PBS, mit 1ml PBS (siehe Punkt 2.1.3.2) versehen und abgeschabt. Anschließend wurden sie bei 100 x g für 1-2 min sedimentiert und bis zur Isolation der RNA mit TRIzol® (siehe 3.2.1.2) bei -80°C tiefgefroren.

3.2 Allgemeine molekularbiologische Methoden

3.2.1 Präparation von Nukleinsäuren

3.2.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* (Miniprep/Midiprep)

Zur Isolierung von Plasmid-DNA standen folgende Kits zur Verfügung: peqGOLD Plasmid Miniprep Kit I (peqLab Biotechnologie GmbH), Quiaprep[®] Spin Miniprep Kit (Quiagen), Pure Link[™] HiPure Plasmid Filter Midiprep Kit (Invitrogen) und Pure Yield[™] Plasmid Midiprep System (Promega). Die Kits wurden jeweils entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

3.2.1.2 Präparation von Gesamt-RNA mit TRIzol[®] aus Zellen

Die Präparation der RNA aus Säugerzellen wurde mit TRIzol[®] (Invitrogen) durchgeführt. Dazu wurde eine konfluent bewachsene große Zellkulturschale (10 cm Durchmesser) 2x mit eiskaltem PBS (siehe Punkt 2.1.3.2) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen, mit 1ml PBS versehen, mit einem Gummischaber von der Platte abgeschabt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach 3 minütiger Zentrifugation bei 100 x g und RT wurde der Überstand abgesaugt.

Die Lyse erfolgte bei diesem Vorgehen im Reaktionsgefäß. Dazu wurden die Zellen mit 1 ml TRIzol[®] versetzt und durch vorsichtiges auf- und abpipettieren resuspendiert. Nach einer 5 minütigen Inkubationszeit bei RT wurde den Zellen 200 µl Chloroform zugegeben und anschließend so lange gevortext bis die Mischung milchig-rosa wurde (ca. 15 sec.). Nach einer 3 minütigen Inkubationszeit bei RT erfolgte für 15 min. bei 16.000 x g in einer 4°C kalten Zentrifuge die Phasentrennung. Im Folgenden wurde die obere farblose Phase mit der Gesamt-RNA in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurde diese wässrige Phase mit 500 µl eiskaltem Isopropanol versetzt und mindestens 10 min. bei RT inkubiert. Der Inkubationsphase folgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 16.000 x g und 4°C. Der Überstand wurde verworfen und das RNA-Pellet mit 1ml eiskaltem 70%igen EtOH gewaschen und anschließend erneut zentrifugiert (5min, 5.400 x g, 4°C). Nach Entfernung des Überstandes und Trocknung des Pellets bei 55°C wurde die RNA in 30 µl DEPC-H₂O gelöst. Die Qualität und die Konzentration der RNA wurde mit einer RNA Elektrophorese (siehe Punkt 3.2.7) überprüft. Zusätzlich wurde zur Überprüfung der RNA Konzentration eine photometrische Messung mit dem NanoQuant (TECAN) durchgeführt.

3.2.1.3 Präparation von genomischer DNA aus Zellen

Um genomische DNA aus Säugerzellen zu präparieren, wurden 3 konfluent bewachsene 10 cm Zellkulturschalen 2x mit PBS (siehe Punkt 2.1.3.2) gewaschen, die Zellen mit einem Gummischaber abgeschabt, in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 150 x g (5 Min bei RT) sedimentiert. Die Lyse der pelletierten Zellen erfolgte in 1 ml eiskaltem Lysispuffer (siehe Punkt 2.7.1.3) für 15 min auf Eis. Die Zellkerne wurden durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 150 x g und 4°C sedimentiert und mit 300 µl Kern-Lysis-Puffer (siehe Punkt 2.7.1.3) gewaschen. Anschließend erfolgte der Aufschluss der Zellkerne und die proteolytische Spaltung der Proteine durch die Zugabe von 500 µl Kern-Lysis-Puffer, 16,5 µl 20 %-iger SDS-Lösung, 25 µl Proteinase K (100 µg/ml) und Inkubation bei 37 °C ÜN in einem Drehinkubator. Am nächsten Tag wurden die Proteinfragmente unter Zugabe von 166 µl gesättigter NaCl-Lösung unter starkem Schütteln für 15 s denaturiert und bei 3500 x g für 30 Min bei RT abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch die Zugabe von 700 µl kaltem Isopropanol unter leichtem Schwenken die genomische DNA aus dem Überstand gefällt („DNA Flocke“).

Die gefällte genomische DNA wurde unter Zuhilfenahme einer sterilen Pipettenspitze aus der Lösung gefischt, in 100 µl eiskalten 70%-igen Ethanol überführt und gewaschen. Das DNA-Pellet wurde nach kurzer Trocknung bei 55°C in 40 µl 1xTE Puffer (siehe Punkt 2.7.1.1) gelöst und bei 4°C gelagert. Die Messung der Konzentration der genomischen DNA erfolgte mit dem NanoQuant (TECAN).

3.2.2 Enzymatische Behandlung von DNA

3.2.2.1 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Für einen Restriktionsenzym-Verdau wurde die eingesetzte DNA mit dem empfohlenen Puffer und bei der erforderlichen Temperatur für 45 min in einem Volumen von 10 µl inkubiert. In der Regel wurden 10 Einheiten (U) Enzym pro µg DNA verwendet. Anschließend wurde das komplette Volumen auf ein Agarosegel aufgetragen zur Überprüfung des Erfolgs des Verdau bzw. zur weiteren Aufreinigung der DNA über das Gel (siehe Punkt 3.2.2.2).

3.2.2.2 Ligation von DNA in pGEM[®]-T Vektor

Die Ligation von DNA in den pGEM[®]-T Vektor wurde mit dem pGEM[®]-T Vector System I (Promega) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Dabei wurden 10 µl des 20 µl Ansatzes nach 1 Std. Inkubation bei RT in kompetente Bakterien transformiert. Die anderen 10 µl des Ligationsansatzes wurden ÜN bei 4°C inkubiert und dann ebenfalls transformiert, falls beim ersten Ansatz keine Bakterienkolonien gewachsen waren.

3.2.2.3 Exo-Sap-Enzymverdau

Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgte im Exo-Sap-Enzymverdau. Dabei wurde anstelle der Shrimp Alkaline Phosphatase (Sap) die Antarktische Phosphatase (Ap) verwendet. Für 7 µl PCR-Produkt wurden 3,6 U Exonuklease I (NEB) und 3,2 U AP (NEB) eingesetzt und mit *A. bidest.* zu einem 10 µl-Ansatz aufgefüllt. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C für 30 Minuten und anschließend eine Hitzeinaktivierung bei 85°C für 15 Minuten. Danach wurde die Quantität der DNA mit Hilfe des Nano Quant (TECAN) gemessen und das aufgereinigte PCR Produkt in der Big Dye Reaktion (siehe Punkt 3.2.9) eingesetzt.

3.2.3 Transformation von Bakterien

3.2.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Die Herstellung kompetenter Bakterien wurden nach der Methode von Hanahan (HANAHAN, 1983) durchgeführt.

Der verwendete Bakterienstamm (NEB 5-alpha Competent *E.coli* (High Efficiency) von NEB) wurde aus einer Dauerkultur zunächst in 2ml LB Medium (siehe Punkt 2.2.2.1) angeimpft und über Nacht bei 37°C im Schüttler bebrütet. Des Weiteren wurden 50 ml YB-Medium (siehe Punkt 2.2.2.2) in einem 250 ml Kolben ebenfalls über Nacht bei 37°C inkubiert um eventuelle Kontaminationen auszuschließen. Am nächsten Tag wurde das YB-Medium mit 500 µl Vorkultur (1:100) angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 bis 0,65 (2,5-3,5 Std.) kultiviert. Anschließend wurden die Zellen in ein vorgekühltes Reaktionsgefäß gegossen und nach einer 10 bis 15 minütigen Inkubation auf Eis für 5 min bei 4°C und 1.300 x g zentrifugiert. Nach der Dekantierung des Überstandes wurde das Bakterienpellet in 10 ml eiskaltem TFB I resuspendiert, für 10 min auf Eis inkubiert und dann für 5 min bei 4°C und

1300 x g abzentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet auf Eis in 2 ml eiskaltem TBF2 (siehe Punkt 2.2.2.2) resuspendiert, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

3.2.3.2 Transformation von Bakterien

Zur Transformation wurden 100 µl kompetente *E.coli* Bakterien langsam auf Eis aufgetaut und vorsichtig mit der zu transformierenden DNA (10 µl eines Ligationsansatzes) vermischt. Nach einer 30 minütigen Inkubationszeit auf Eis erfolgte für exakt 30 sec ein Hitzeschock bei 42°C. Es folgte eine sofortige 5minütige Wartezeit auf Eis. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 950 µl SOC oder LB-Medium (siehe Punkt 2.2.2.1 sowie 2.2.2.2) versetzt und für 60 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Inkubationszeit ermöglichte den transformierten Bakterien die Expression des Antibiotika-Resistenzgens. Im Folgenden wurden 200 µl des Ansatzes auf antibiotikahaltigen LB-Platten aufgebracht, mit einem sterilen Drigalskispatel ausplattiert und bei 37°C ÜN bebrütet. Nach 12 bis 16 Stunden Inkubationszeit waren Einzelkolonien sichtbar. Einzelne Kolonien wurden mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in ein mit LB-Medium befülltes Glasröhrchen überführt. Diese Kolonien wurden erneut ÜN bei 37°C bebrütet. Als nächstes folgte eine DNA Plasmidpräparation (siehe Punkt 3.2.3.3)

3.2.3.3 DNA-Plasmidpräparation (Alkalische Lyse)

Von der ÜN-Kultur der Bakterienkolonien (siehe Punkt 3.2.3.2) wurde 1,5 ml bewachsenes LB-Medium in ein Reaktionsgefäß überführt und bei 13.400 x g für 1 min abzentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 200 µl P1 (siehe Punkt 2.7.1.3) resuspendiert. Nach Zugabe von 400 µl P2 (siehe Punkt 2.7.1.3) und Schwenken des Gefäßes bis die Lösung klar war folgte eine 5 minütige Inkubation bei RT. Anschließend wurden 300 µl P3 (siehe Punkt 2.7.1.3) zugegeben, das Gemisch 3-4 x invertiert und 5 min auf Eis gestellt. Nach 10 minütiger Sedimentation (13.400 x g, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 600 µl kaltem Isopropanol versetzt. Im Folgenden wurde die DNA für mind. 15 min bei -20°C gefällt und erneut 15 min (13.400 x g, 4°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 200 µl kaltem 70%igen EtOH gewaschen und für 4 min bei 13.400 x g (RT oder 4°C) sedimentiert. Das gereinigte Pellet wurde kurz bei 50-55°C getrocknet und in 20 µl TE (siehe Punkt 2.7.1.1) gelöst.

3.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Aufgrund der negativen Ladung von DNA kann sie in einem elektrischen Feld anhand ihrer Fragmentlänge aufgetrennt werden. Je nach Fragmentgröße wurden 0,8-2%ige Agarosegele in TAE Puffer (siehe Punkt 2.7.2.1) verwendet. Zur Visualisierung der Fragmente wurde dem Agarosegel der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid in einer Konzentration von 0,4 µg/ml zugegeben. Ethidiumbromid interkaliert in DNA, welche dadurch unter UV-Licht sichtbar wird. Die Proben wurden mit 1/5 Volumenanteil 6x Ladepuffer versetzt und in die Geltaschen pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V in TAE-Puffer. Als Größenstandards bei der Auftrennung wurden folgende DNA-Marker verwendet: Quick Load® 100bp DNA Ladder (NEB) sowie Quick Load® 1kb DNA Ladder (NEB).

Alle Gele wurden unter Verwendung des BioDoc Analyze Gel Documentation Systems (Biometra) dokumentiert.

3.2.5 Isolierung und Aufreinigung von DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden von anderen nicht benötigten Molekülen abgetrennt, bevor sie weiter verwendet wurden. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte über Gelelektrophorese in einem 1 – 1,5 %igen TAE-Gel (Durchführung der Agarosegelelektrophorese siehe Punkt 3.2.4). Nach Gellauf und photographischer Dokumentation des Gels im BioDoc Analyze Gel Dokumentationssystem (Biometra) wurde das benötigte Fragment unter UV-Licht mit einer Skalpellklinge aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die DNA mit dem Nucleo Spin® Extrakt II Gel Extraction Kit (Macherey-Nagel) entsprechend der Herstellerangaben aus dem Gel isoliert. Die Konzentration der isolierten DNA wurde mittels Agarosegelelektrophorese mit einem 1-1,5% igen TAE-Gel ermittelt.

3.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die exponentielle Amplifikation definierter DNA-Abschnitte aus einer geringen DNA-Ausgangsmenge wurde das *in vitro* Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) verwendet. Durch wiederholte Folgen von Denaturierung, Hybridisierung mit synthetischen Oligonukleotiden und Strang-Synthese mittels einer hitzestabilen DNA-Polymerase führte die PCR zu einer Amplifikation des gewünschten DNA-Abschnitts.

Für die PCR-Reaktion wurden synthetische Oligonukleotide verwendet, die über

einen Bereich von ca. 10-30 Basen zu den 5'- bzw. 3'-Enden der zu amplifizierenden DNA homolog sind. Bevorzugt wurde ein DNA-Bereich gewählt, der einen GC-Gehalt von 40-60% aufweist. Die Schmelztemperatur (T_M) der Oligonukleotide lässt sich nach folgender vereinfachter Formel berechnen:

$$T_M = 59,9 + (0,41 \times \text{GC-Gehalt [\%]}) - (600/\text{Primer-Länge [bp]}).$$

Der Bereich der Schmelztemperatur eines Oligonukleotids sollte zwischen 50°C und 60°C liegen, außerdem sollte sich die Schmelztemperatur eines Oligonukleotid-Paares so wenig wie möglich unterscheiden. Die Schmelztemperaturen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind unter Punkt 2.6 für jedes verwendete Oligonukleotid aufgeführt. Die PCR wurde in einem T Gradient-Thermocycler (Biometra) durchgeführt. Je nach Anwendung wurden das GoTaq™ DNA Polymerase System (Promega), das GC-RICH PCR System (Roche) oder die Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) verwendet. Der Reaktionsansatz setzte sich für die unterschiedlichen Polymerasen im Allgemeinen wie folgt zusammen.

GoTaq™ DNA Polymerase System:

PCR Ansatz:

5x Green or Colorless GoTaq®Flexi Buffer	1x
MgCl ₂ Solution, 25mM	1,5-2,0mM
Nucleotid Mix 10mM	0,2mM je dNTP
Oligonucleotide je	1,0µM
GoTaq® DNA Polymerase (5U/µl)	1,25U
Template DNA	<0,5µg
Aqua bidest.	ad. 20 µl

PCR Bedingungen:

Anfangsdenaturierung	95°C	2 min.	
Denaturierung	95°C	45 sek.] x 30-40
Annealing	x*	1 min.	
Extension	72°C	1 min/kb	
Abschlusselongation	72°C	10 min.	
Pause	4°C	∞	

x* = T_M (siehe Punkt 2.6)

Das GoTaq™ DNA Polymerase System wurde für folgende Oligonukleotide verwendet: β -Actin-for, β -Actin-rev. Des Weiteren wurden, für die Methylierungsanalysen (siehe Punkt 4.2.5), noch eine sogenannte "Klon-PCR" mit den Primern M13 uni (-21) und M13 rev (-29) durchgeführt. Dabei wurde anstelle der reinen Template DNA 1 μ l der Bakterienkultur verwendet.

GC-RICH PCR System:

PCR Master Mix 1:

PCR Grade Nucleotide Mix	200 μ M je dNTP
Primer Mix	0,2 μ M, je Primer
Template DNA	1-100 ng cDNA
GC-RICH resolution solution	0-2 M
Aqua bidest.	ad 35 μ l

PCR Master Mix 2:

5x GC-RICH PCR reaction buffer mit DMSO	1x (1,5 mM MgCl ₂)
GC-RICH PCR System enzyme mix	2 U/ 50 μ l
Aqua bidest	ad 15 μ l

Nach separater Vorbereitung wurde Master Mix 2 in Master Mix 1 gegeben und in den Thermocycler gestellt.

PCR Bedingungen:

Anfangsdenaturierung	95°C	3 min.	
Denaturierung	95°C	30 sek.	x 10
Annealing	x*	30 sek.	
Extension	72°C	45 sek/kb	
Denaturierung	95°C	30 sek.	x 25
Annealing	x*	30 sek.	
Extension	72°C	45 sek/kb	
Abschlusselongation	72°C	10 min.	
Pause	4°C	∞	

x* = TM (siehe Punkt 2.6)

Das GC-RICH PCR System wurde für folgende Oligonukleotide verwendet: 2Prom4S-for*Bgl*II, Prom4S-rev*Hind*III.

Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen):

PCR Ansatz:

10x PCR Puffer		1x
10 mM Nucleotid Mix	0,2 mM je dNTP	
50 mM MgCl ₂	1,5 mM	
Primer Mix (je 10µM)	0,2 µM je Primer	
Template DNA	≥ 1 µl	
Platinum [®] Taq DNA Polymerase	1,0 U	
Aqua bidest.	ad 50 µl	

PCR Bedingungen:

Anfangsdenaturierung	95°C	10 min.	
Denaturierung	94°C	45 sek.] x 40
Annealing	x*	45 sek.	
Extension	72°C	1 min.	
Abschlusselongation	72°C	10 min.	
Pause	4°C	∞	

x* = TM (siehe Punkt 2.6)

Die Platinum[®] Taq DNA Polymerase wurde für folgende Oligonucleotide im Rahmen der Bisulfitreaktion verwendet: L4CpG25d_for, L4CpG25d_rev, L4CpG34_for, L4CpG34_rev.

Die Sequenzierung der Klone, die auf Ihren Methylierungsstatus (siehe Punkt 4.2.5) untersucht wurden, erfolgte im Cologne Center for Genomics (CCG) der Universität Köln. Plasmid DNA wurde jedoch von der Firma Eurofins (MGW) sequenziert. Bevor die Sequenzierung erfolgte, wurde eine BigDye Reaktion zur Vorbereitung der Proben vorgenommen. Das hierfür verwendete ABI PRISM[®] BigDye[™] Primer Sequencing Kit (Applied Biosystems) wurde entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Als Primer fanden M13 uni (-21) und M13 rev (-29) Anwendung.

3.2.7 Umschreiben von mRNA in cDNA

Zur Überprüfung der Qualität sowie der Menge der isolierten RNA (siehe Punkt 3.2.1.2) wurden die Proben mit Hilfe des Experion Automated Electrophoresis System (BIO RAD) analysiert. Hierzu wurde das Experion[™] RNA StdSensAnalysis Kit (BIO RAD) entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

Zur Expressionsanalyse von Genen im Zellkulturmodell wurde die RT-PCR angewendet. Die präparierte Gesamt-RNA (siehe 3.2.1.2) wurde mit Hilfe des Super Script® VILO™ cDNA Synthesis Kits (Invitrogen) entsprechend den Angaben des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Diese Methode basiert darauf, dass die meisten Gen-Transkripte an ihrem 3'-Ende einen Poly-A-Schwanz besitzen. Bei der RT-Reaktion wird deshalb ein Oligo-dT-Oligonukleotid eingesetzt, das an die Poly-A-Schwänze der mRNAs bindet. Von diesem Oligonukleotid ausgehend synthetisiert die Reverse Transkriptase dann die entsprechende cDNA. Um zu überprüfen, ob die cDNA frei von genomischen Verunreinigungen war, wurde eine Kontroll-PCR mit den Oligonukleotiden *β-Aktin-for* und *β-Aktin-rev* durchgeführt. Diese Oligonukleotide flankieren eine Intron-Sequenz des *β-Aktin*-Gens. Ist das Intron durch Spleißen entfernt, so entsteht ein PCR-Produkt mit einer Größe von 243 bp. Weist die umgeschriebene cDNA noch genomische Verunreinigungen auf, so entsteht durch die Anwesenheit des Introns ein zusätzliches PCR-Produkt von 330 bp Länge. War die cDNA frei von genomischen Verunreinigungen, wurde sie für RT-PCR-Analysen eingesetzt.

3.2.8 Real-Time-PCR-Analyse (qPCR)

Um den Expressionsstatus von LTBP4 in, mit Demethylierungsreagenz-behandelten, Zellen zu bestimmen, wurde die Real-Time-PCR-Analyse angewendet. Ziel dieser sogenannten quantitativen RT-PCR (qRT-PCR) ist es, aus der Menge an amplifiziertem PCR-Produkt auf die Transkriptionshäufigkeit bestimmter Gene zu schließen. Zur Quantifizierung der qPCR Produkte wurde eine Taqman-Sonde benutzt. Dabei gibt ein Donor-Fluorochrom (Reporter), das durch eine Lichtquelle angeregt wird, einen Teil seiner Energie an ein Akzeptor-Fluorochrom (Quencher) ab. Der Abstand zwischen Akzeptor und Donor bestimmt dabei die Höhe des Fluoreszenzsignals und errechnet somit mit einer hohen Spezifität die Quantität.

In dieser Arbeit wurden TaqMan-Sonden mit den Fluoreszenzfarbstoffen FAM (Reporter) und TAMRA (Quencher) verwendet. Als qPCR Gerät stand das 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) zur Verfügung. Als Referenzgene (Housekeeping genes) für die relative Quantifizierung und die Vergleichbarkeit der Platten untereinander wurden RPLPO und TBP verwendet. Die 20 µl Amplifikationsansätze wurden mit Hilfe des AB Taqman Gene Expression Master Mix Kits entsprechend der Herstellerangaben angesetzt. Standards und Negativkontrollen („non template control“) wurden als Duplikate, unbekannte Proben als Triplikate pipettiert. Die Standard-

kurve wurde durch die Verwendung von 8 seriellen Verdünnungen (1:1 bis 1:128) erhalten. Die Bedingungen für die qPCR waren:

Anfangsdenaturierung	50°C	2 min.	
Denaturierung	95°C	10 min.] x 40
Annealing	95°C	15 sek.	
Extension	60°C	1 min.	

Der initiale Startschritt dient der Aktivierung der AmpErase® während die 10 minütige Denaturierung bei 95°C zur optimalen Aktivierung der AmpliTaq Gold® DNA Polymerase führt. Zur Überprüfung der Spezifität der Amplifikate und um die Bildung von Primerdimeren auszuschließen erfolgte im Anschluss an die qPCR die Auftrennung der Amplifikate durch Agarosegelelektrophorese.

3.2.9 DNA Fällung

Bevor DNA zum Sequenzieren an die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) geschickt wurde, ist eine DNA Fällung zu Reinigungs- und Konzentrierungszwecken durchgeführt worden. Zu Beginn wurden 3 µg DNA auf 300 µl *A.bidest.* aufgefüllt und mit 18 µl 5M Natriumacetat und 210 µl Isopropanol versetzt. Nach Inkubation ÜN bei -20°C wird die Probe für 15 min bei 4°C und 16.000 rpm abzentrifugiert. Es folgte ein Waschschrift mit 200 µl 70 % EtOH und ein erneutes abzentrifugieren für 5 min bei 4°C und 16.000 x g. Der Überstand wurde restlos abgesaugt und die Probe bei 50 °C für 5 min getrocknet.

3.2.10 Sequenzierungsanalysen

Die Sequenzierungsreaktionen wurden mit Hilfe des BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurden 3 – 10 ng aufgereinigte (siehe Punkt 3.2.2.3) PCR-Produkt sowie der Primer M13 uni (-21) (siehe Punkt 2.6) in einem Reaktionsvolumen von 10 µl verwendet. Die Kettenabbruchreaktion wurde als PCR (siehe Punkt 3.2.6) in einem TGradient-Thermocycler (Biometra) nach folgendem Programm durchgeführt:

Anfangsdenaturierung	96°C	1 min.	
Denaturierung	96°C	30 sek.] x90
Annealing	50°C	15 sek.	
Extension	60°C	4 min.	
Pause	4°C	∞	

Nach dem Abschluss der Reaktion wurden die Proben auf 4°C abgekühlt und zur weiteren Analyse und Auswertung an das CCG Köln (Cologne Center for genomics) geschickt. Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms BiQ Analyser.

3.3 Proteinbiochemische Methoden

3.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Mit Hilfe der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page) können Proteine anhand ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden. Aufgrund der Anlagerung der negativ geladenen SDS-Anionen an ungefähr jeden zweiten Aminosäurerest werden die Proteine lang gestreckt und ihre natürliche Konformation sowie ihre Eigenladung werden kompensiert. Die Laufgeschwindigkeit des so entstandenen stark negativ geladenen Komplexes verhält sich proportional zur Masse des Proteins. Durch Anlegen einer Spannung wird das Proteingemisch getrennt, da kleine Proteine schneller als große zur Anode wandern. Als erstes werden die Proteine auf eine Lauffront konzentriert, um sie dann in Abhängigkeit von der Molekularmasse aufzutrennen (LAEMMLI, 1970).

Zunächst wurden das grobporige Sammelgel und das Trenngel wie nachfolgend beschrieben gegossen. Die Konzentration der Gele ergab sich aus dem Molekulargewicht der verwendeten Proteine PCNA (29 kDa) und Aktin (40 kDa):

	Trenngel 10 %	Sammelgel 10%
<i>A. bidest.</i>	3,4 ml	2,0 ml
Trenn-/Sammelgelpuffer*	1,7 ml	0,82 ml
Acrylamid	1,7 ml	0,5 ml
APS*	68 µl	10 µl
Temed	5 µl	5 µl

* (siehe Punkt 2.7.3)

Das zwischen die Platten der Kammer gegossene Trenngel, wird mit Isopropanol überschichtet und für die Dauer des Auspolymerisierens stehen gelassen. Nach Entfernung des Isopropanol wird das Sammelgel über das Trenngel gegossen und nach erfolgreicher Polymerisation mit Marker und Proben befüllt. Die Auftrennung der Proteine erfolgte, in der mit Lauf-Puffer (siehe Punkt 2.7.3.5) gefüllten Kammer, bei einer

Stromstärke von 16 mA bis zum Erreichen des Trenngeles und im Folgenden mit 20-25 mA. Hierzu verwendet wurden Kammern von der Firma Biorad.

3.3.2 Western Blot

Nach Abschluss der Gelelektrophorese (siehe Punkt 3.3.1) wurden die Proteine vom SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wo sie mit Hilfe von spezifischen Antikörpern detektiert werden können. Dieses Verfahren dient dem immunologischen Nachweis von Proteinen (TOWBIN et al., 1979; BURNETTE, 1981). Die Übertragung der Proteine auf die Nitrozellulosemembran (0,45 µm Porengröße) erfolgte, in einer mit eiskaltem Blot-Puffer (siehe Punkt 2.7.3.4) gefüllten Western Blot-Kammer (Biorad), durch Elektrotransfer bei 80 V für eine Stunde. Im Anschluss wurde die Membran mit Ponceau-S-Lösung (siehe Punkt 2.7.3.7) gefärbt, um den Erfolg der Übertragung auf die Nitrozellulosemembran zu überprüfen. Dann wurde die Membran mit TBST (siehe Punkt 2.7.3.6) entfärbt und in 5 % Magermilchpulver (Cell Signaling Technology) für mindestens 1 Std. bei RT geblockt. Dadurch wurden die verbliebenen freien Bindungsstellen der Membran abgesättigt. Die Inkubation der Blot-Membran mit dem Erstantikörper erfolgte rotierend in TBST für 1 Stunde. Danach wurde die Membran 2x für 5 min. mit TBST gewaschen und für 25 min. zusammen mit dem sekundären, an Meerrettich Peroxidase gekoppelten, Antikörper für 30 Minuten bei RT inkubiert. Nach erneutem 2maligem Waschen mit TBST (5 min.) sowie einmaligem Waschen mit TBST für 10 min wurde die Membran in ECL Lösung, bestehend aus 2 ml SA (siehe Punkt 2.7.3.8), 0,6 µl 30% H₂O₂ (MERCK) und 200 µl SB (siehe Punkt 2.7.3.8) überführt. Mit Hilfe des Molecular Imager ChemiDoc™ XRS Imaging System (BIO RAD) wurde anschließend die Chemolumineszenz gemessen und die Banden visualisiert.

3.3.3 Luciferase Assay

Die Lumineszenzmessung erfolgte im Luminometer GloMax Multi Detection System der Firma Promega. Für die Durchführung der Luciferase Assays wurde das Dual-Luciferase® Reporter Assay Kit der Firma Promega (Heidelberg) entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

Das Kit enthält die sensitive „Firefly“ Luciferase als Reporter und die „Renilla“ Luciferase als Transfektionskontrolle. Für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität wurden 50 µl Zelllysat auf die 96-well-Platte gegeben und in der Messkammer des Luminometers platziert. Um temperaturbedingte Schwankungen der Enzymaktivität zu

vermeiden, wurde das Lysat vor der Messung an Raumtemperatur adaptiert. Als Leerwert wurde der zur Lyse der transfizierten Zellen verwendete Puffer eingesetzt. Die Chemilumineszenz wurde durch automatische Injektion von 80 µl Luciferin-Reaktionsgemisch des Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Kit pro Probe für 10 sec gemessen und der Messwert in RLU/s (Relative Light Units pro Sekunde) ausgegeben. Die Messwerte der Proben wurden auf die Renilla-Aktivität bezogen.

3.4 Untersuchung von 5mC-DNA Methylierung

3.4.1 Bisulfitreaktion

Die Untersuchung der, im Promotorbereich liegenden, CpG-Inseln auf ihren Methylierungsstatus erfolgte mit dem EpiTect[®] Bisulfite Kit (Quiagen) entsprechend der Herstellerangaben. Die eingesetzte Menge DNA belief sich auf 2 µg. In einem ersten Schritt wurden hierbei alle unmethylierten Cytosine einer DNA, durch Einwirken von Bisulfit und mit Hilfe einer nachfolgenden Alkalibehandlung zu Uracil desaminiert und bei der anschließenden PCR durch Thymin ersetzt. Durch die Methylierung sind die 5-Methyl-Cytosinbasen jedoch vor einer Umwandlung geschützt und verbleiben im amplifizierten Fragment als Cytosine.

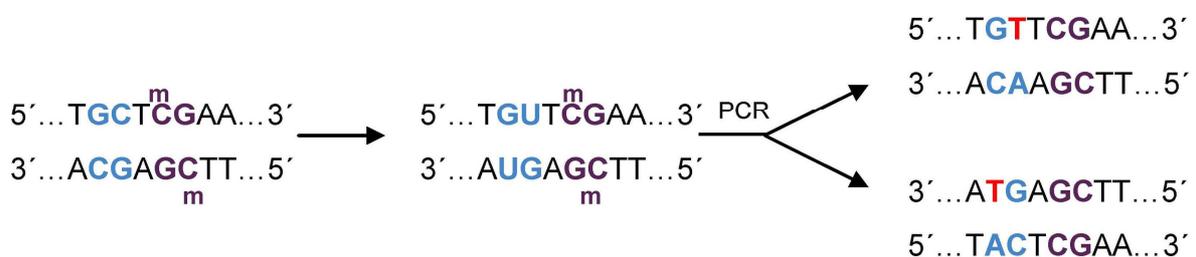


Abb. 3.1: Prinzip der Bisulfitmethode zur Untersuchung von CpG-Inseln auf ihren Methylierungsstatus.

Mit Hilfe des Bisulfits werden die unmethylierten Cytosinmoleküle zu Uracil desaminiert und bei einer anschließenden PCR durch Thymin ersetzt. Methylierte Cytosinbasen sind jedoch vor einer Umwandlung geschützt und bleiben Cytosine.

Die methylierte DNA wurde entsprechend der Herstellerangaben aufgereinigt und mit Hilfe der Platinum[®] Taq DNA Polymerase (Invitrogen) in einer sogenannten Methylierungs-PCR (siehe Punkt 3.2.6) amplifiziert. Als Kontrolle wurden 5 µl der Reaktion in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Im Folgenden wurde das PCR Produkt in den pGEMT-Vektor ligiert und anschließend in kompetente *E.coli* transformiert (siehe Punkt 3.2.3.2). Am nächsten Tag wurden pro Zelllinie und CpG-Insel

jeweils 5 Klone gepickt und für 2-3 Stunden bei 37°C inkubiert. Von diesen bewachsenen Platten wurden pro Zelllinie und CpG-Insel jeweils 15-20 Klone in einer Klon-PCR mit Hilfe der GoTaq™ DNA Polymerase amplifiziert (siehe Punkt 3.2.6). Hierfür wurden die Primer M13 uni (-21) und M13 rev (-29) der Firma Invitrogen verwendet (siehe Punkt 2.6). Es folgte eine Aufreinigung des PCR-Produkts mittels Exo-Sap-Enzymverdau (siehe Punkt 3.2.2.3). Im Anschluss wurden die Proben mit Hilfe des ABI PRISM® BigDye™ Primer Sequencing Kit (Applied Biosystems) für die abschließende Sequenzierung vorbereitet (siehe Punkt 3.2.6). Die Analyse der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Programms Biq-Analyzer vorgenommen und wird in Punkt 4.2.6. näher erläutert.

4 Ergebnisse

4.1 Identifizierung und Überprüfung potentieller Transkriptionsfaktoren für LTBP4

Latent TGF-beta binding proteins (LTBPs) gehören zur Familie der Fibrilline. Sie übernehmen Funktionen in der Signaltransduktion und in der Regulation der extrazellulären Matrix. Man unterscheidet in Säugern vier verschiedene Isotypen (LTBP1-4), die hoch gewebespezifisch exprimiert werden. LTBP1, 3 und 4 vermitteln u.a. die Sekretion und die Anhaftung von TGF- β an die extrazelluläre Matrix und sind damit wichtige Modulatoren der TGF- β -Bioverfügbarkeit (SAHARINEN J, 1999). Während LTBP4 ausschließlich mit TGF- β 1 einen Komplex bildet, interagieren LTBP1 und 3 mit allen drei TGF- β Typen (SAHARINEN J, 1999). Eine Feineinstellung für die TGF- β Sekretion und Aktivierung wird wahrscheinlich durch die, hoch gewebespezifisch exprimierten, Spleißvarianten von LTBP4 ermöglicht (SAHARINEN et al., 1998; KANTOLA et al., 2010).

Um die Funktion und die Regulationsmechanismen von LTBP4 besser verstehen zu können und weiter zu erforschen, wurden in dieser Arbeit potentielle Transkriptionsfaktoren für LTBP4 ermittelt und mittels Luciferase Assays in Hinblick auf Ihre Funktionalität überprüft. Dafür wurde neben einer *in silico*-Analyse nach möglichen Transkriptionsfaktoren auch eine Promotorbereich-Analyse von LTBP4 vorgenommen. Im Mensch unterscheidet man drei N-terminal verschiedene LTBP4 Transkripte, die von zwei unabhängigen Promotoren transkribiert werden (KANTOLA et al., 2010).

4.1.1 *In silico*- und Literaturgestützte Suche nach möglichen Promotorbereichen von LTBP4

Die Suche nach allgemeinen Promotorstrukturen und Enhancer Elementen zur Identifizierung möglicher Promotorbereiche von LTBP4, basierte auf einer Literaturrecherche und einer *in silico*-Analyse der strangaufwärts gelegenen Region von LTBP4S und LTBP4L. Die für die Analysen verwendeten Programme waren Softberry FPROM (TAHIRI-ALAOUI et al., 2009) und Proscan Version 1.7 (Advanced Biosciences Computing Center, University of Minnesota). Hinweise auf potentielle Promotorbereiche für LTBP4L und LTBP4S wurden in einer Veröffentlichung von Kantola *et al.* (2009) gefunden. Die dort verwendeten Softwareprogramme MatInspector (CARTHARIUS et al., 2005) und TFSEARCH (HEINEMEYER et al., 1998) fanden

keinerlei TATA-Boxen, aber mehrere XCPE Stellen. XCPE Bindungsstellen sind aktivierende, TBP-abhängige allgemeine Promotorstrukturen für TATA lose Promotoren (TOKUSUMI et al., 2007).

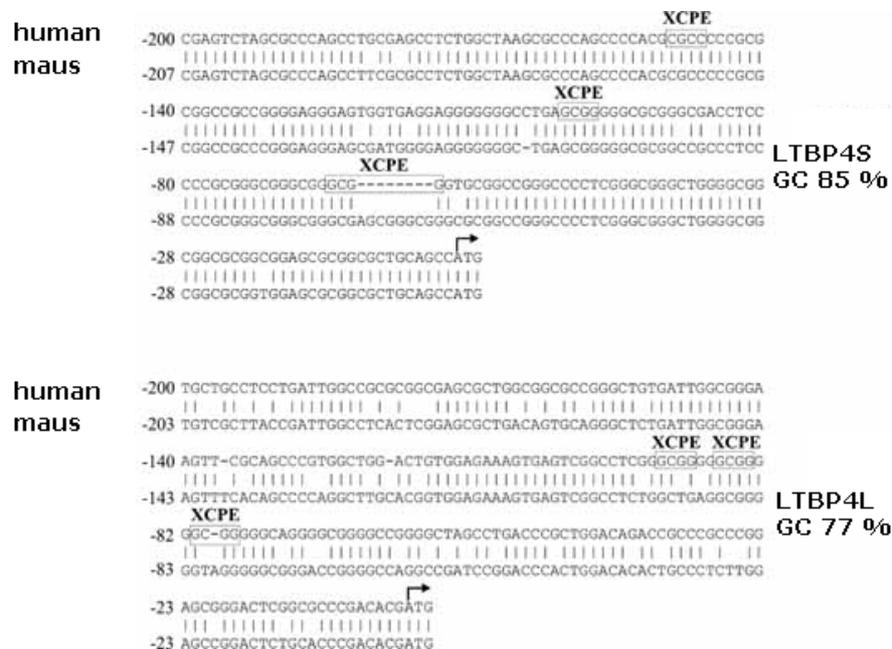


Abb. 4.1: Darstellung der Promotorregionen von LTB4S und LTB4L.

Die Promotorregionen der beiden Spleißvarianten von LTBP4 sind hoch gewebespezifisch. Abgebildet sind jeweils 200 bp proximal des Translations-Startpunkts von LTB4S und LTB4L. Translations-Initiationsstellen sind mit Pfeilen, XCPE Elemente mit Boxen gekennzeichnet. Der GC-Gehalt der LTBP4 proximalen Region ist angegeben. Die Abbildung wurde modifiziert nach Kantola *et al.* (2009)

Die eigene Analyse ergab jedoch ein anderes Bild. Mehrere TATA-Boxen und Enhancer Elemente wurden für den strangaufwärts gelegenen Bereich von LTBP4 vorhergesagt. Für LTB4L decken sich die ergebenden Promotorbereiche vollständig mit den bereits postulierten Bereichen (KANTOLA et al., 2010). Für eine funktionelle Analyse dieses Promotors, wurde der Bereich mit den ebenfalls beschriebenen Primern Prom4L-for*Bgl*II und Prom4L-rev*Hind*III amplifiziert (siehe Punkt 2.6). Der resultierende Promotor wird im nachfolgenden L4Prom genannt.

Für LTB4S ergaben sich aus den Recherchen zwei mögliche Promotorbereiche. 1Prom, wurde mit den Primern 1Prom4S-for*Bgl*II und Prom4S-rev*Hind*III amplifiziert, 2Prom mit den Primern 2Prom4S-for*Bgl*II und Prom4S-rev*Hind*III (siehe Punkt 2.6). Dabei umfasst 2Prom den kompletten Bereich von 1Prom und zusätzlich weitere, durch die Software vorhergesagte Promotorbereiche. 1Prom überschneidet sich vollständig mit dem bereits beschriebenen TATA-losen Promotorbereich für LTB4S (KANTOLA et al., 2010). Beide vorhergesagten Promotorbereiche sind sehr GC

reich, was sich mit den Promotorbereichen von LTBP1 (KOSKI C, 1999) und LTBP3 (KANTOLA et al., 2005) deckt.

Alle designten Primer wurden mit Hilfe des Programms NetPrimer (Premier Biosoft) einerseits auf sekundäre Primer Strukturen, wie z.B. Hairpins, überprüft und andererseits hinsichtlich ihrer Schmelztemperatur getestet. Durch Blastn wurde die Spezifität der Primer sichergestellt.

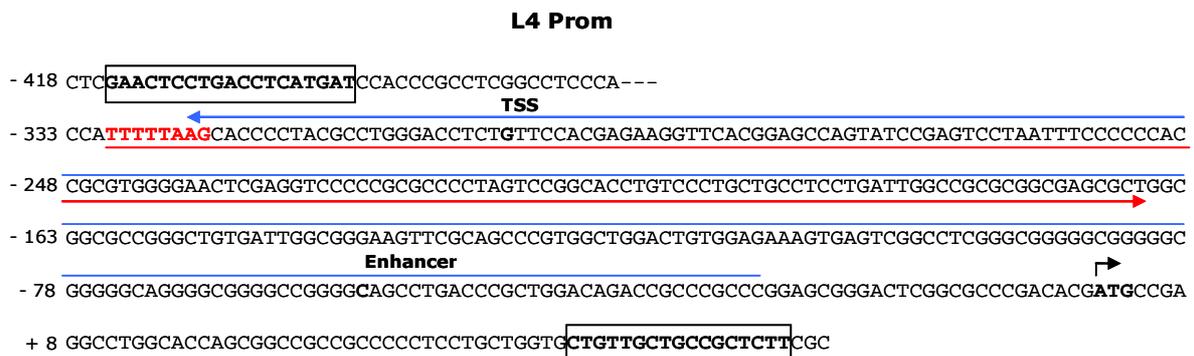


Abb. 4.2: Dargestellt ist der Promotorbereich von L4Prom.

Die verwendeten Primer sind rechteckig einrahmt. Bei den Primern handelt es sich von oben nach unten um Prom4L-for*Bgl*II und Prom4L-rev*Hind*III. Die von den Programmen Softberry FPRO (TAHIRI-ALAOUI et al., 2009) und Proscan Version 1.7 (Advanced Biosciences Computing Center, University of Minnesota) vorhergesagte TATA-Box ist in roter Schrift dargestellt. Die *in silico*-Analyse ergab den, mit roten und blauen Pfeilen dargestellten, Promotorbereich für LTBP4L. Dabei wurde der potentielle Promotorbereich sowohl in der vorwärts, als auch in der rückwärts Leserichtung mit einer Wahrscheinlichkeit von über 90 % vorhergesagt.

4.1.2 Synthese von 2Prom, 1Prom und L4Prom

Aufgrund des hohen GC-Gehalts von L4Prom wurde die Synthese des Promotors an die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) abgegeben. 2Prom und 1Prom wurden dagegen mit den o.g. Primern amplifiziert (siehe Punkt 3.2.6) und im nachfolgenden in den Vektor pGEM[®]-T (Promega) zwischenkloniert, um die erfolgreiche und richtige Amplifikation zunächst einmal durch Sequenzierung bestätigen zu können.

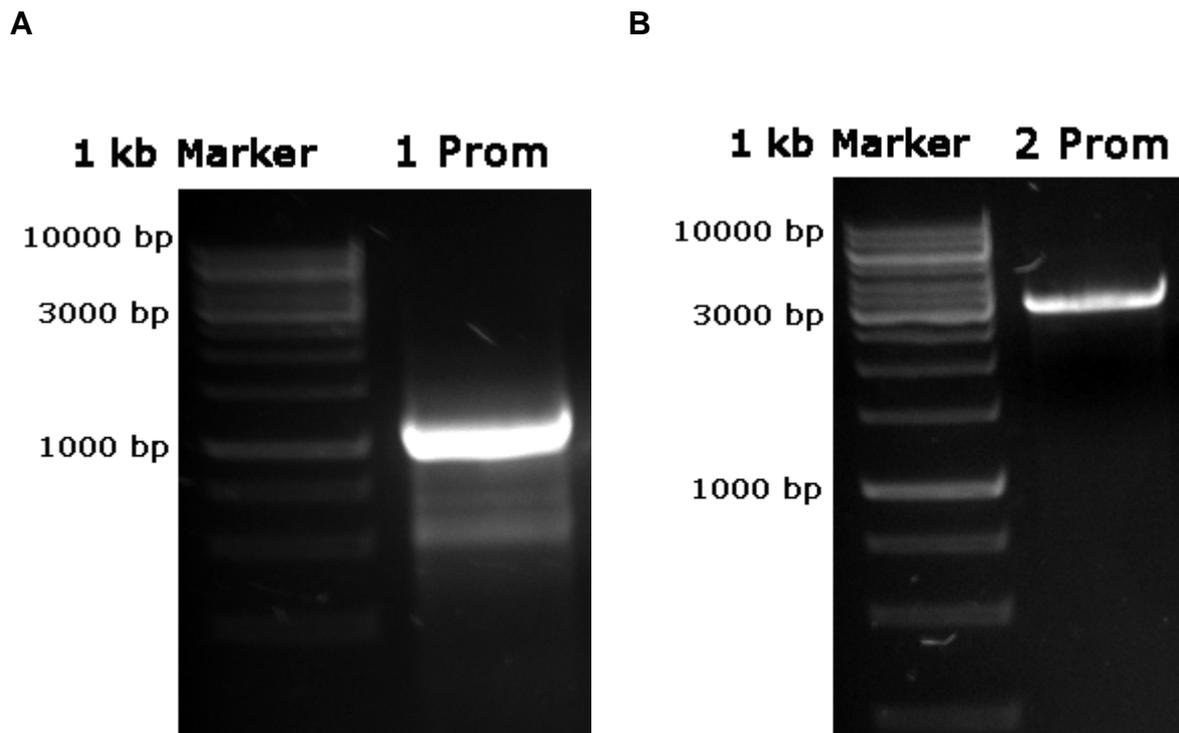


Abb. 4.4: Gelelektrophoretische Darstellung von 1Prom und 2Prom.

A: Das Fragment liegt auf einer Höhe von ca. 1000 bp was der Größe von 1Prom (1160 bp) entspricht.
 B: Das Fragment liegt auf einer Höhe von ca. 3 kb was der Größe von 2Prom (3137 bp) entspricht.
 Die anschließend durchgeführte Sequenzierung bestätigte, dass es sich um 1Prom bzw. 2Prom handelt.

Nach der Ligation wurden beide Ansätze (pGEM-T-1Prom und pGEM-T-2Prom) in NEB 5-alpha kompetente *E.coli* transformiert und somit vervielfältigt. Anschließend wurde die Plasmid-DNA aus den Bakterien isoliert. Es folgte ein Restriktionsenzymverdau (siehe Punkt 3.2.2.1) zur Überprüfung der erfolgreichen Ligation des richtigen Fragments (siehe Bild 4.4). Die anschließende Sequenzierung der gefällten DNA wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) durchgeführt (siehe Anhang), und bestätigte die vollständige und fehlerfreie Amplifikation von 1Prom und 2Prom.

4.1.3 Klonierung der Promotorbereiche in pGL4.23 mit und ohne Minimalpromotor

Im Folgenden wurden die in Punkt 4.1.2 synthetisierten Promotoren in den pGL4.23 Luciferase Reporter Vektor kloniert. Dafür wurden mittels *Bgl*II *Hind*III-Verdau die Promotorfragmente aus pGEMT-2Prom, pGEMT-1Prom bzw. pGEMT-L4-Prom isoliert.

Der Luciferasereporter-Vektor pGL4.23 wurde ebenfalls mit *Bgl*II und *Hind*III (Fermentas) geschnitten. Vor der Aufreinigung über ein Agarosegel des linearisierten Vektors wurde jedoch noch eine Inkubation mit der Antarctic Phosphatase (Fermentas) durchgeführt. Das Enzym dephosphoryliert die Enden des Vektors, wodurch verhindert wird, dass dieser mit sich selbst religiert.

Es folgte die Ligation der Fragmente 2Prom, 1Prom und L4Prom in den pGL4.23. Parallel wurde eine Religationskontrolle mit *A. bidest.* anstelle der Promotor DNA durchgeführt.

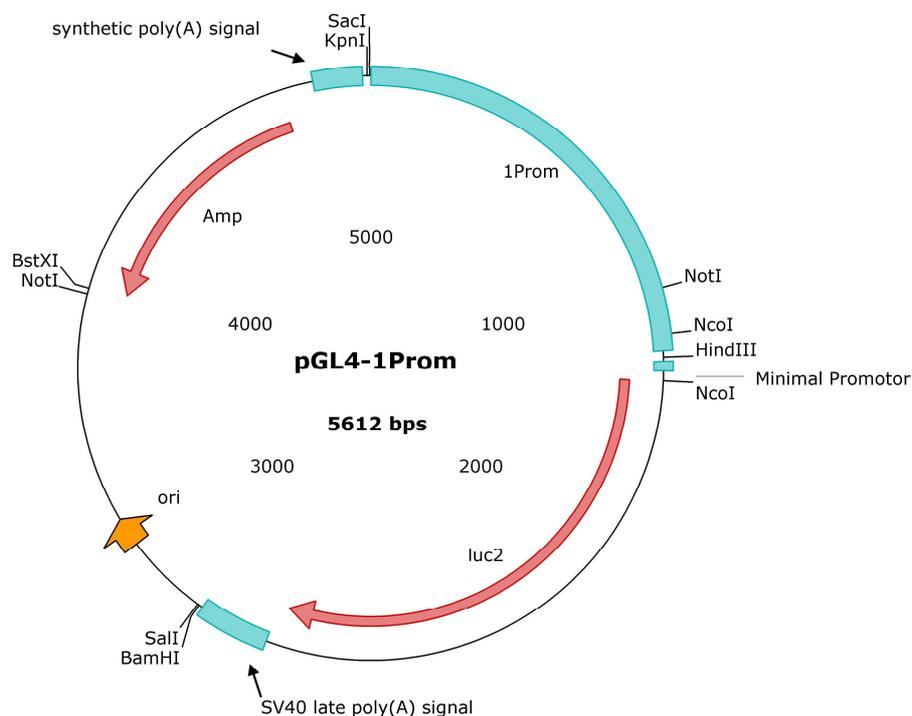


Abb. 4.5: Schematische Darstellung von pGL4-1Prom.

Das Promotorfragment 1Prom wird in den, mit *Bgl*II und *Hind*III enzymatisch verdauten, Luciferasereporter pGL4.23 ligiert.

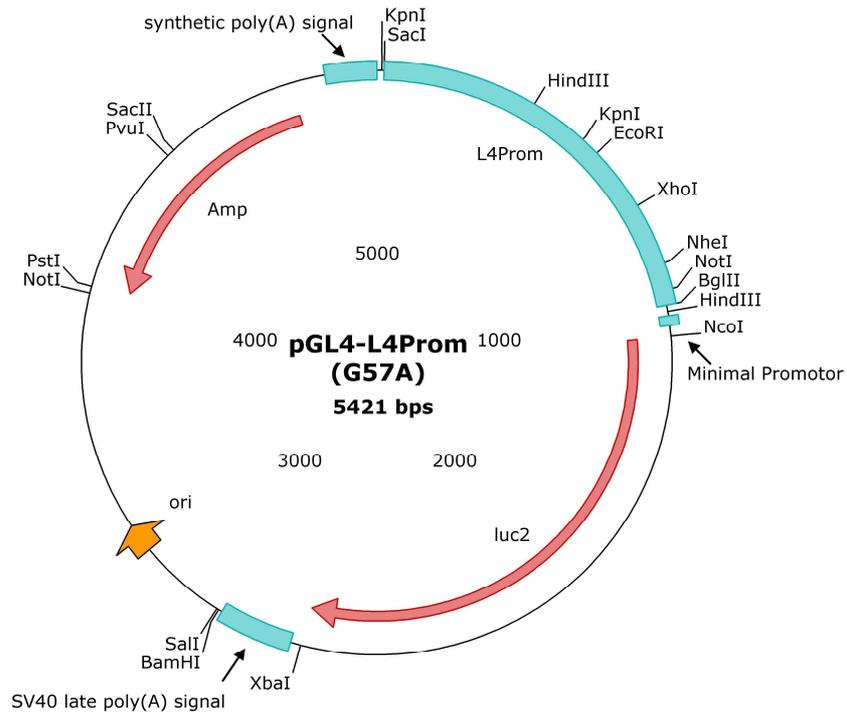


Abb. 4.6: Schematische Darstellung von pGL4-L4Prom.

Das Promotorfragment L4Prom wird in den, mit *BglII* und *HindIII* enzymatisch verdauten, Luciferasereporter pGL4.23 ligiert.

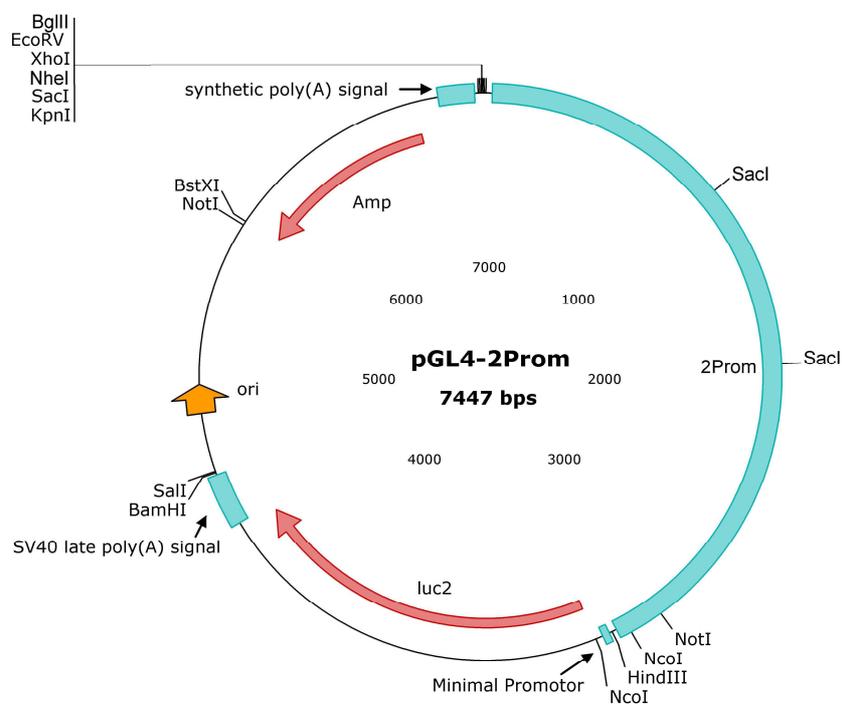


Abb. 4.7: Schematische Darstellung von pGL4-2Prom.

Das Promotorfragment 2Prom wird in den, mit *BglII* und *HindIII* enzymatisch verdauten, Luciferasereporter pGL4.23 ligiert.

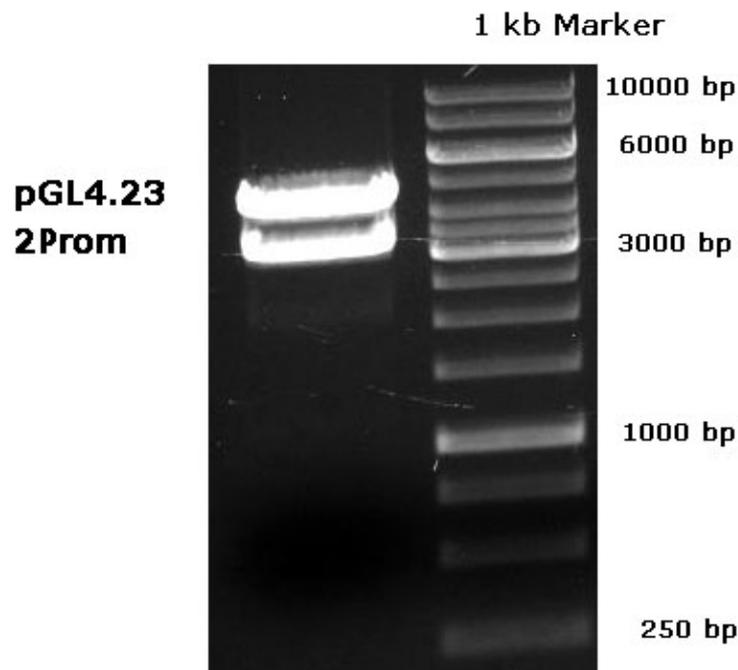


Abb. 4.8: Gelelektrophoretische Darstellung von pGL4.23 und 2Prom.

Nach Klonierung von 1Prom, 2Prom und L4Prom in pGL4.23 wurden diese erneut mit den entsprechenden Restriktionsenzymen, zu Kontrollzwecken, geschnitten. Beispielhaft ist auf diesem Bild pGL4.23 und 2Prom zu sehen. Die Größe von pGL4.23 beträgt ca. 4,3 kb, die von 2Prom ca. 3,1 kb.

Nach Ligation der Promotoren in das Luciferasereporterplasmid pGL4.23 wurde erneut in NEB 5-alpha kompetente *E.coli* (NEB) transformiert und eine Alkalische Lyse (siehe Punkt 3.2.3.3) zur Präparation der Plasmid-DNA durchgeführt. Mittels Test-Restriktionsenzymverdau wurden die erfolgreich transformierten Klone ermittelt. Dafür wurde pGL4-2Prom mit *NotI*, pGL4-1Prom mit *BglII* und *HindIII* und pGL4-L4Prom mit *SacI* und *BglII* geschnitten (siehe Bild 4.6).

Um eine genauere Aussage über die Effizienz der Aktivierung von LTBP4 durch potentielle Transkriptionsfaktoren treffen zu können, wurde das pGL4.23-Promotor Konstrukt zusätzlich noch ohne den Minimalpromotor kloniert. Minimalpromotoren sind wenige Nukleotide der Promotorsequenz die unerlässlich sind für die Bindung der Transkriptionsfaktoren und die Initiation der Transkription. Der Minimalpromotor in pGL4.23 ist eine TATA-Box mit der Funktion die Transkription der Luciferase unspezifisch zu verstärken. Würde die Luciferase-Expression ohne Minimalpromotor

genauso hoch ausfallen wie mit, wäre das ein Zeichen für die Spezifität und Funktionalität der getesteten Transkriptionsfaktoren.

Zu diesem Zweck wurden die Plasmide pGL4.-2Prom, -1Prom und -L4 Prom mit Hilfe des Restriktionsenzym NcoI geschnitten und der Minimalpromotor somit aus dem Konstrukt herausgetrennt. Dies ergibt bei der folgenden gelelektrophoretischen Auftrennung eine ca. 7 kb und eine ca. 150 bp große Bande. Die 7kb Bande, die das pGL4.23-Promotorkonstrukt ohne Minimalpromotor repräsentiert, wurde aus dem Gel herausgeschnitten, aufgereinigt und religiert.

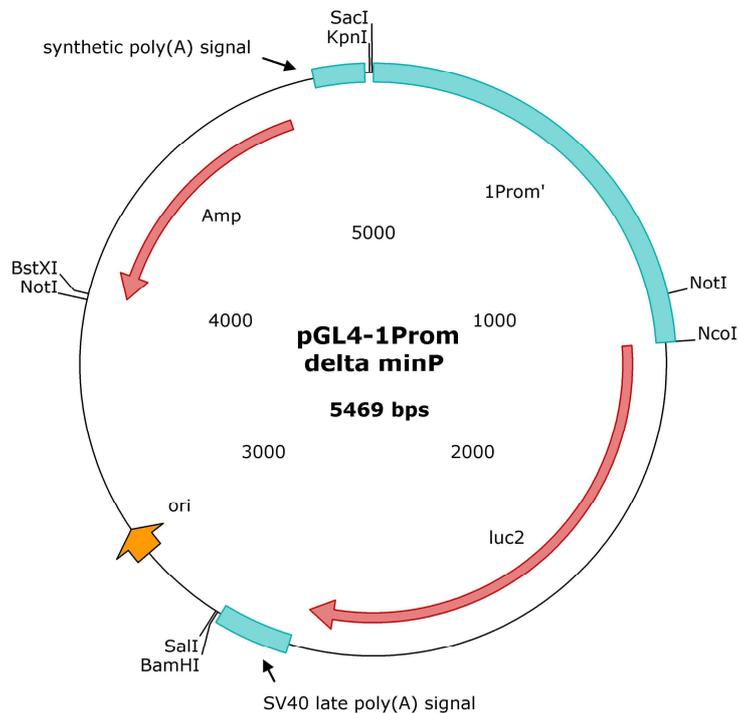


Abb. 4.9: Schematische Darstellung von pGL4-1Prom Δ minP.

Durch einen enzymatischen Verdau mit NcoI von pGL4-1Prom und anschließender Religation der Vektoren wurde der Minimalpromotor (minP) aus dem o.g. Vektoren entfernt.

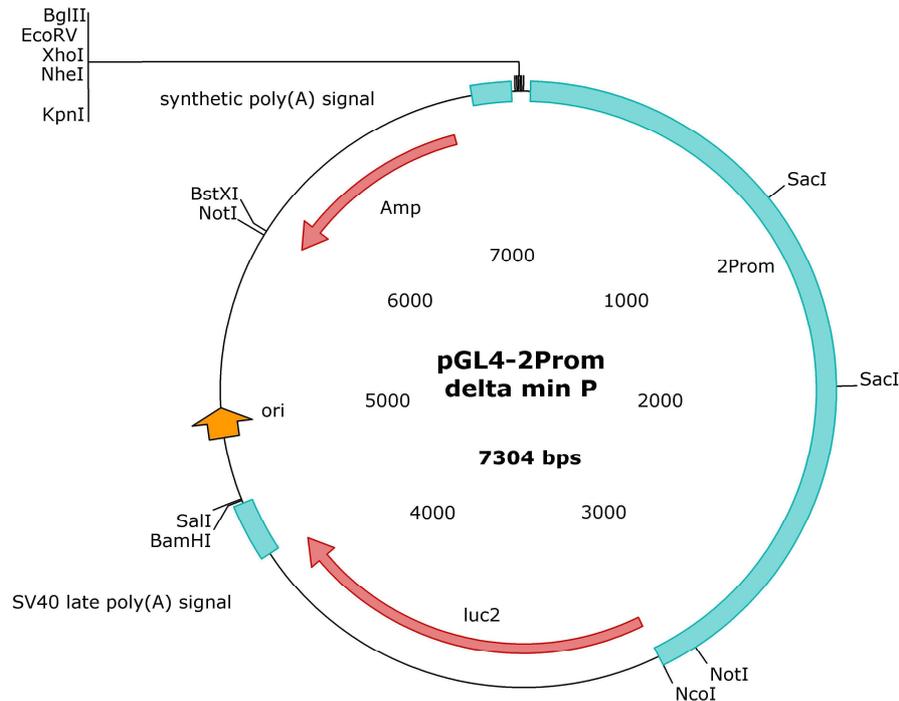


Abb. 4.10: Schematische Darstellung von pGL4-2Prom Δ minP.

Durch einen enzymatischen Verdau mit *NcoI* von pGL4-2Prom und anschließender Religation der Vektoren wurde der Minimalpromotor (minP) aus dem o.g. Vektoren entfernt.

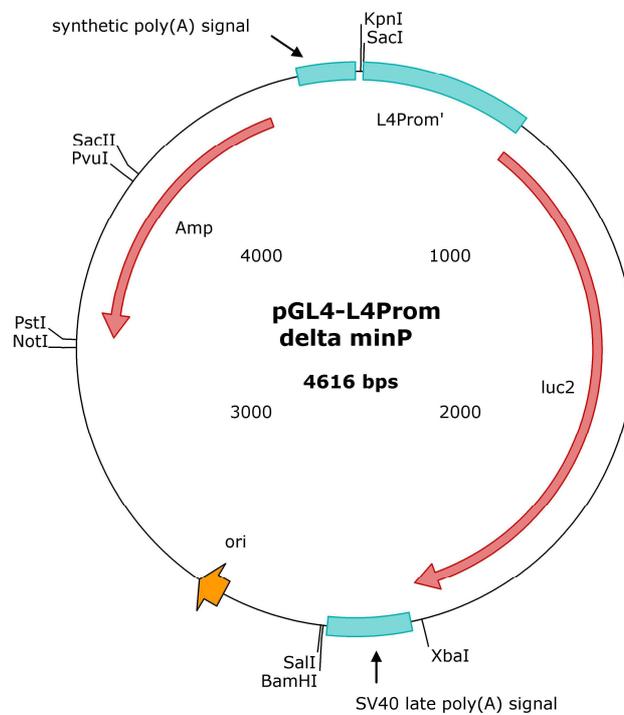
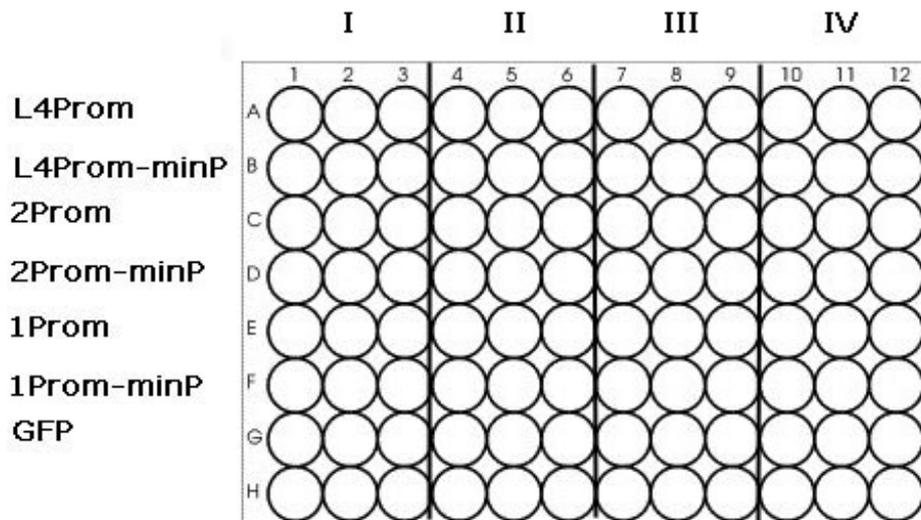


Abb. 4.11: Schematische Darstellung von pGL4-L4Prom Δ minP.

Durch einen enzymatischen Verdau mit *NcoI* von pGL4-L4Prom und anschließender Religation der Vektoren wurde der Minimalpromotor (minP) aus dem o.g. Vektoren entfernt.

4.1.4 Transiente Transfektion der pGL4-Promotorkonstrukte in HEK293 Zellen

Im Anschluss wurden die pGL4-Promotorkonstrukte (pGL4-2Prom, -1Prom, -L4Prom und pGL4-2Prom Δ minP, -1Prom Δ minP und -L4Prom Δ minP) zusammen mit dem potentiellen Transkriptionsfaktor Sp1 in die embryonale Nierenzelllinie HEK293 transient transfiziert (siehe Punkt 3.1.5). Bei einer transienten Transfektion wird, im Gegensatz zur stabilen Transfektion, die Fremd-DNA (in Form eines Plasmids) nur vorübergehend in die eukaryotische Zelle aufgenommen. Darüber hinaus erfolgt keine Integration der Fremd-DNA in das Genom der Zelle. Die Konstrukte wurden sowohl mit als auch ohne Minimalpromotor in die Zellen eingebracht. Zusätzlich wurden unterschiedliche Konzentrationen des potentiellen Transkriptionsfaktor Sp1 verwendet um zu testen, ob der potentielle Transkriptionsfaktor eine mengenabhängige Expression initiieren kann. Die getesteten Konzentrationen von Sp1 waren 10 ng, 20 ng und 40 ng. Die transfizierten Zellen wurden im Weiteren mittels Luciferase Assays untersucht (siehe Punkt 4.1.6). Um Transfektionsstress und unterschiedliche Transfektionseffizienzen auszugleichen erfolgte jeder Transfektionsansatz mit genau 100 ng DNA. Zum Auffüllen auf die erforderliche DNA-Menge wurde als neutrales Plasmid pBluescript verwendet, um die Anzahl an spezifischen eukaryotischen Promotorelementen so gering wie möglich zu halten. Als zusätzliche Transfektionskontrolle wurde GFP verwendet. Sollte Sp1 ein tatsächlicher Transkriptionsfaktor für LTBP4 sein, würde die Expression der Luciferase in den Zellen initiiert werden und könnte mit Hilfe dieser Methode sensitiv detektiert werden. Das Schema der Transfektion ist in Abb. 4.12 dargestellt.



I: 45 ng A-F+15 ng pGL4.74+40 ng pblue

II: 45 ng A-F+15 ng pGL4.74+10 ng Sp1+30 ng pblue

III: 45 ng A-F+15 ng pGL4.74+20 ng Sp1+20 ng pblue

IV: 45 ng A-F+15 ng pGL4.74+40 ng Sp1

Abb. 4.12: Die Abbildung zeigt das Transfektionsschema der HEK293 Zellen mit den pGL4-Promotorkonstrukten und dem potentiellen Transkriptionsfaktor Sp1.

I: 45 ng A-F+15 ng pGL4.74+40 ng pBluescript;

II: 45 ng A-F+15 ng pGL4.74+10 ng Sp1+30 ng pBluescript;

III: 45 ng A-F+15 ng pGL4.74+20 ng Sp1+20 ng pBluescript;

IV: 45 ng A-F+15 ng pGL4.74+40 ng Sp1

Als zusätzliche Transfektionskontrolle wurde GFP verwendet.

4.1.5 *In silico*-Analse potentieller Transkriptionsfaktoren von LTBP4

Die Analyse nach potentiellen Transkriptionsfaktoren erfolgte mittels der Computerprogramme Proscan Version 1.7 (Advanced Biosciences Computing Center, University of Minnesota), SABiosciences Text Mining Application (SABioscience, Quiagen) und UCSC Genome Browser (KENT et al., 2002). In der Literatur finden das Zinkfingerprotein Sp1, die GATA Familie und die Smad Bindungsstellen als mögliche Transkriptionsfaktoren Erwähnung. Wobei Smad Bindungsstellen ausschließlich in der strangaufwärts gelegenen Sequenz von LTBP4S gefunden wurden (KANTOLA et al., 2010). Die *in silico*-Analyse ergab 69 putativen Bindungsstellen für Sp1 in der strangaufwärts gelegenen Region für beide LTBP4 Isoformen (siehe Anhang). Bindungsstellen wurden ebenfalls für Smad 2 und 3 gefunden (siehe Anhang).

Zusätzliche von den Computerprogrammen vorhergesagte putative Bindungsstellen für beide Isoformen von LTBP4 waren z.B.: AP-2, KROX-24, CREB, c-Myb, p300, p53, Jun, E2F, FOS oder DAXX. Eine Übersicht der *in silico* Analyse nach Transkriptionsfaktoren befindet sich im Anhang.

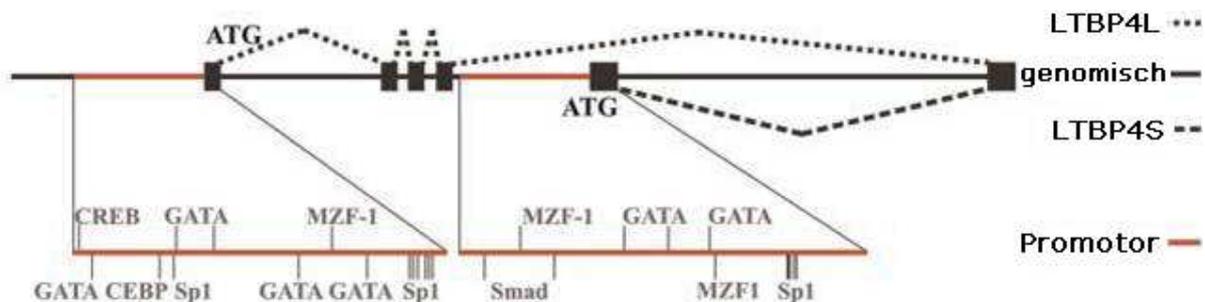


Abb. 4.13: Schematische Darstellung der putativen Transkriptionsfaktoren von LTBP4.

Die potentiellen Transkriptionsfaktoren wurden durch *in silico* Analyse sowie Literaturrecherche ermittelt. Die im Promotorbereich von LTBP4S bzw. LTBP4L liegenden putativen Bindungsstellen sind abhängig von ihrer Lokalisation in obiger Abbildung dargestellt. Die detaillierten Resultate befinden sich im Anhang. Die Abbildung wurde modifiziert nach Kantola *et al.* (2010)

Aufgrund der zahlreichen putativen Bindungsstellen wurde für die weitere Analyse mittels Luciferase Assays der Transkriptionsfaktor Sp1 gewählt (siehe 5.1.1).

4.1.6 Analyse der potentiellen Transkriptionsfaktoren mittels Luciferase Assays

Die Methode des Luciferase-Assays ist hocheffektiv und sensitiv. Durch Kopplung der Promotorbereiche mit einem Versuchsreporter wird, nach Aktivierung des potentiellen LTBP4 Promotorelements durch Zugabe der Transkriptionsfaktoren, Luciferase exprimiert. Dem Testsystem zugegebenes Luciferin wird daraufhin unter Freisetzung von Chemilumineszenz zu Oxyluciferin umgebaut. Die Intensität der Lichtemission wird anschließend gemessen, wodurch eine Aussage über die Effizienz der Transkriptionsfaktoren möglich ist (CONTAG CH, 2002).

Als Versuchsreporter wurde das Luciferasegen (*luc2*) aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*) verwendet. Das Luciferasegen (*hRluc*) der Seefeder (*Renilla reniformis*) wurde als Kontrollreporter zum Abgleich ko-transfiziert. Sämtliche Versuche wurden dreimal wiederholt und die Werte der Einzelversuche gemittelt. Die Basalexpression von pGL4-L4Prom, -2Prom und -1Prom bzw. pGL4-L4Prom Δ minP, -2Prom Δ minP, -1Prom Δ minP, jeweils ohne Zugabe von Sp1 wurden auf 1 gesetzt und die Werte mit Transkriptionsfaktor auf diese Basalexpression bezogen. Die Analyse des potentiell-

len Transkriptionsfaktors Sp1 ergab für L4Prom eine Steigerung der Expression um etwa das Doppelte. Dabei ergab eine Steigerung der Menge an Sp1 von 10 ng auf 20 ng eine geringe Erhöhung der Expression. Zwischen 20 ng und 40 ng konnte kein Unterschied in der Expression festgestellt werden. L4Prom Δ minP hingegen zeigte keine Erhöhung der Expression bezogen auf den Grundwert. Die Expression der Luciferase konnte mit Hilfe von Sp1 um ein vierfaches erhöht werden. Bei einer Sp1 Konzentration von 40 ng zeigte sich im Falle von 1Prom sogar eine fünffache Erhöhung der Expression. Die LTBP4 Expression ohne Minimalpromotor ergab hingegen, unabhängig von der Sp1 Konzentration, keinerlei Erhöhung der Expression. Alle Werte ohne Minimalpromotor ergaben, bezogen auf die Grundexpression von LTBP4, sogar eine deutliche Erniedrigung der Expression.

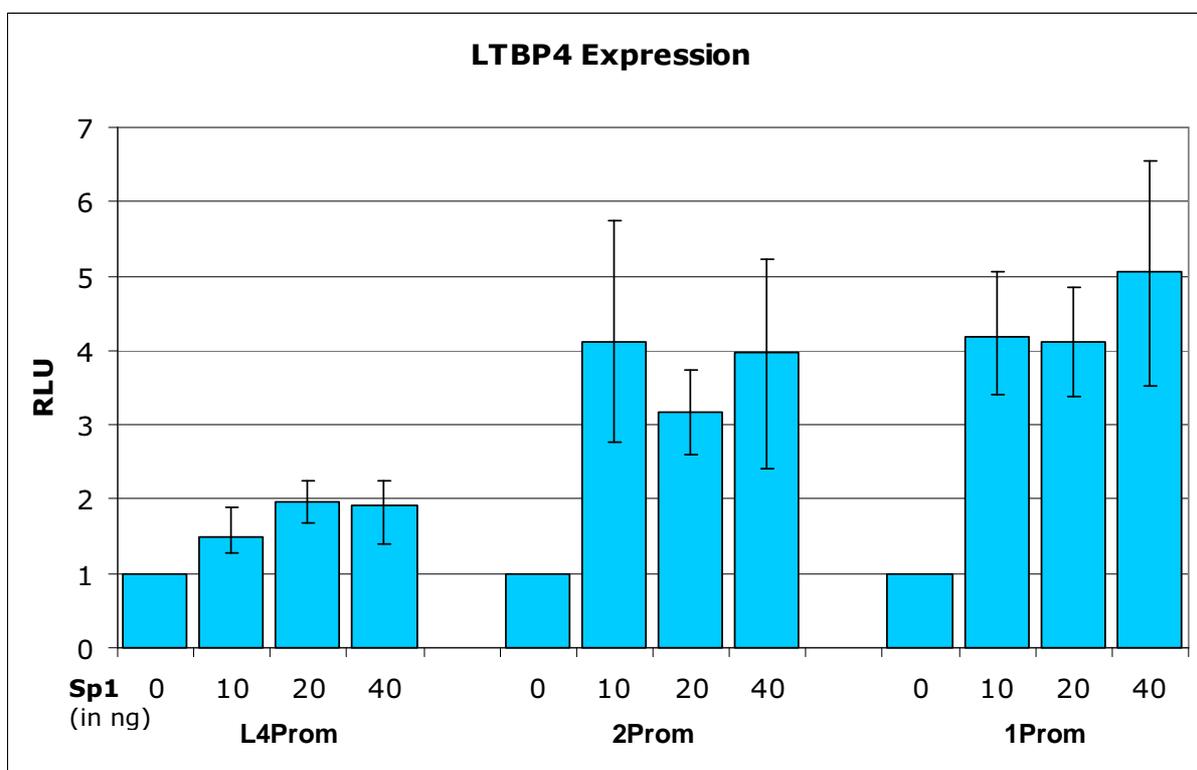


Abb. 4.14: Die Tabelle zeigt die Expression von LTBP4 gemessen im Luciferase Assay.

Dabei wurden L4Prom, 2Prom und 1Prom jeweils ohne, mit 10 ng, 20 ng und 40 ng des Transkriptionsfaktors Sp1 transfiziert. Das Ergebnis zeigt eine deutliche Steigerung für L4Prom um das Zweifache. Im Fall von 2Prom und 1Prom steigt die Expression um ca. das Vierfache der Basalexpression. Die Erhöhung der Menge an Sp1 zeigt keine deutliche Steigerung. Die Standardabweichung ist angegeben.

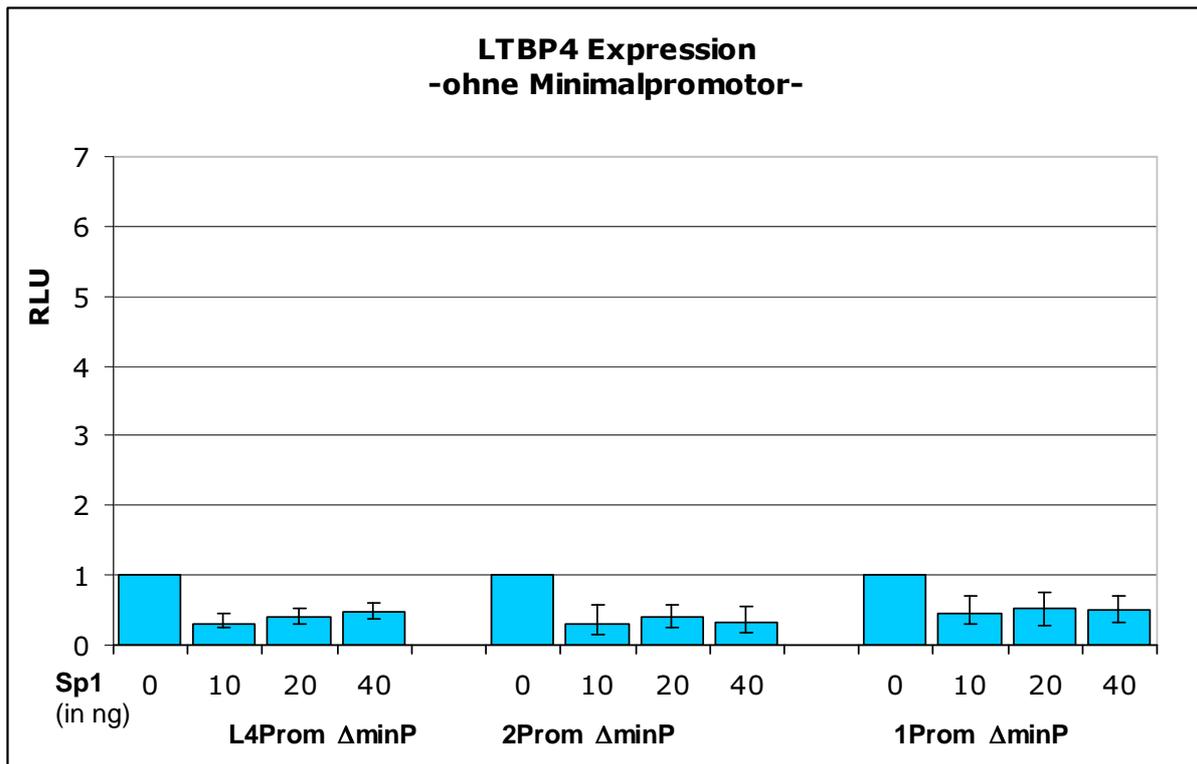


Abb. 4.15: Die Tabelle zeigt die Expression von LTBP4 gemessen im Luciferase Assay.

Dabei wurden L4Prom Δ minP, 2Prom Δ minP und 1Prom Δ minP jeweils ohne, mit 10 ng, 20 ng und 40 ng des Transkriptionsfaktors Sp1 transfiziert. Das Ergebnis zeigt in keinem Fall eine Steigerung der Expression bezogen auf die Grundexpression. Die Standardabweichung ist angegeben.

4.2 Expressionsstudien und Promotor-Methylierungsanalysen von LTBP 4

Neben genetischen Veränderungen, wie z.B. Mutation oder Deletion spielen epigenetische Veränderungen eine sehr große Rolle in der Karzinogenese. Wachstumsfördernde Protoonkogene werden hierbei aktiviert und wachstumshemmende Tumorsuppressorgene runterreguliert. Dies liefert entscheidende Wachstumsvorteile in der Tumorentstehung. Zu den epigenetischen Mechanismen gehören u.a. die Methylierung von DNA Basen, die posttranslationale Modifikation von Histonproteinen, die Positionierung von Nucleosomen entlang der DNA und das posttranskriptionale Silencing von Zielgenen. Epigenetische Mechanismen regulieren die Genexpression ohne Veränderungen in der DNA-Sequenz zu bewirken. Die unkontrollierte DNA-Methylierung spielt bei der Tumorentwicklung eine sehr wichtige Rolle (JONES & BAYLIN, 2002; FEINBERG et al., 2006; JONES & BAYLIN, 2007).

Im Verlauf der Tumorgenese werden hierbei entweder Protoonkogene durch Promotor-Hypomethylierung verstärkt aktiviert oder Tumorsuppressorgene durch Promotor-

Hypermethylierung stillgelegt (BAYLIN & OHM, 2006). Im Folgenden wurde von der Hypothese ausgegangen, dass LTBP4 als potentielles Tumorsuppressorgen durch Promotorhypermethylierung herunterreguliert ist. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden die verwendeten Zelllinien mit dem Demethylierungsreagens 5'-Aza-2'-deoxycytidin behandelt und anschließend wurde die LTBP4 Expression semiquantitativ und quantitativ ermittelt. Im Weiteren wurden Methylierungsanalysen mit Hilfe der Bisulfitreaktion durchgeführt um den Methylierungsstatus der einzelnen CpG-Inseln zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich die DNA-Methylierung von Cytosinbasen untersucht, weshalb immer die Modifikation von Cytosin (^{5m}C) gemeint ist, wenn von DNA Methylierung gesprochen wird.

4.2.1 Behandlung der Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Demethylierungsreagens 5'-Aza-2'-deoxycytidin

Um analysieren zu können ob LTBP4 durch Promotorhypermethylierung reguliert werden könnte, wurden die Zelllinien HEK293, MCF7, PC3, DLD1 und CaCo2 (siehe Punkt 2.1.1) mit dem zytotoxischen Demethylierungsreagens und zugelassenem Chemotherapeutikum 5'-Aza-2'-deoxycytidin behandelt (CIHÁK, 1974). Das Nucleosidanalogen wird während der Replikation in die DNA aufgenommen und hemmt die DNA Methylierung, indem sie mit der DNA Methyltransferase einen Komplex und somit einen stabilen Intermediärzustand ausbildet. Dadurch kann neu gebildete DNA nicht mehr methyliert werden (CIHÁK, 1974). Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen über einen definierten Zeitraum mit dem Reagens behandelt. Jeweils eine konfluent bewachsene 10 cm Platte jeder Zelllinie wurde am Tag 0 passagiert und gleichmäßig auf drei 6 cm Platten ausplattiert. Am folgenden Tag wurde 5'-Aza-2'-deoxycytidin in definierter Konzentration von 2,5 µM und 5 µM zugegeben. Eine der drei 6 cm Platten blieb jeweils unbehandelt um einen Basalwert zu erhalten. Nach 72 Stunden wurden die Zellen geerntet. Dieser Versuch wurde für alle verwendeten Zelllinien fünfmal wiederholt. Um auszuschließen, dass die Zelllinien die Behandlung mit dem zytotoxischen Reagens nicht überleben, wurde nach dessen Anwendung zur Kontrolle der Vitalität ein Western Blot (siehe Punkt 3.3.2) durchgeführt. Hierfür wurde das für die DNA Replikation und Reparatur wichtige Protein PCNA (siehe Punkt 2.4) verwendet (HOEGE C, 2002). In geschädigten Zellen wird PCNA mit Hilfe des Tumorsuppressors p53 inaktiviert, wodurch die Replikation umgehend stoppt (HOEGE C, 2002). Demzufolge ist PCNA ein geeigneter Marker um die Vitalität von Zellen zu kontrollieren. Als Positivkontrolle

wurde Aktin (siehe Punkt 2.4) verwendet. Das Ergebnis des Western Blots zeigt, dass sich auch bei der höchsten Konzentration 5'-Aza-2'-deoxycytidin die Vitalität der Zellen nicht verändert.

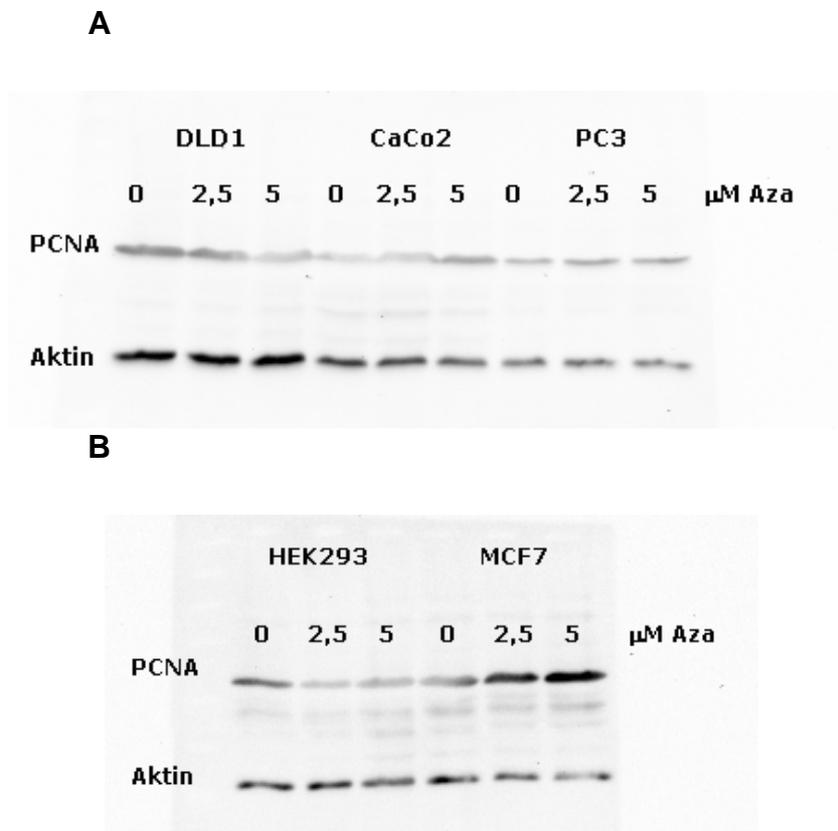


Abb. 4.16: PCNA und Aktin Expression in den mit 5'-Aza-2'-deoxycytidin behandelten Zelllinien.

A/B: zeigen die Expression der Antikörper PCNA (28,7 kDa) Aktin (42 kDa) in den Zelllinien DLD1, CaCo2 und PC3 bzw. HEK293 und MCF7 nach Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen von 5'-Aza-2'-deoxycytidin (0 µM, 2,5 µM, 5 µM). PCNA dient als Marker für die Vitalität der Zellen, während Aktin als Positivkontrolle eingesetzt wurde. Ein Verlust der Vitalität durch eine Behandlung mit 5'-Aza-2'-deoxycytidin ist bei keiner Zelllinie zu erkennen. Es wurde bei 80V für eine Stunde gelottet und ein 10 % Gel verwendet.

4.2.2 Semiquantitative Analyse von HEK293 und MCF7 Zellen

Bei dieser Untersuchung handelte es sich um Vorversuche, die eine Tendenz aufzeigen sollten, ob die Herunterregulation von LTBP4 in Tumoren auf Promotorhypermethylierung zurückzuführen ist. Hierfür wurden zunächst die LTBP4S und LTBP4L Expressionslevel, dargestellt in Abbildung 4.13, der Zelllinien HEK293, PC3 und MCF-7 ermittelt.

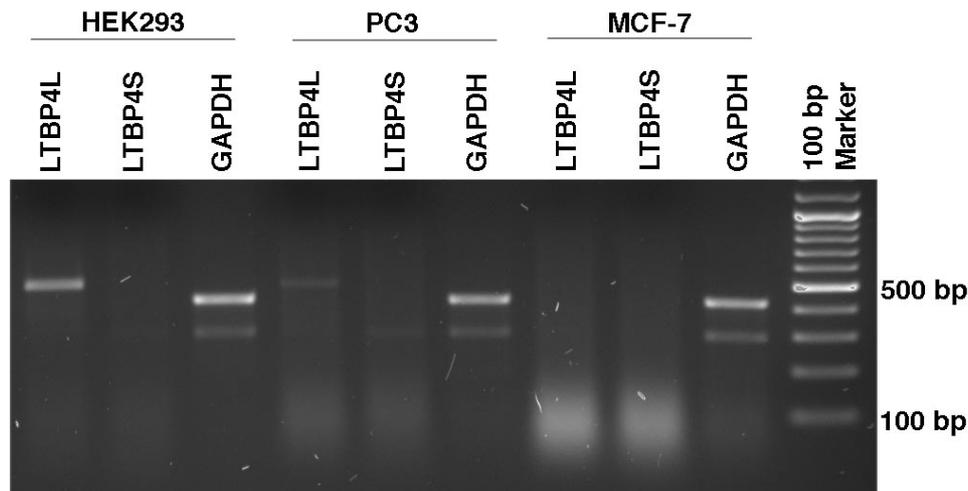


Abb. 4.17: Gelelektrophoretische Darstellung von LTBP4L und LTBP4S in HEK293, PC3 und MCF-7 Zelllinien.

Als Positivkontrolle wurde GAPDH verwendet. In der Embryonalen Nierenzelllinie HEK293 ist ausschließlich LTBP4L exprimiert. In der Prostatakarzinomzelllinie PC3 sind beide N-terminale Varianten von LTBP4 deutlich runterreguliert. In der Brustkrebszelllinie MCF-7 sind beide Formen nicht mehr zu detektieren.

LTBP4S und LTBP4L sind in den MCF-7 Zellen fast vollständig herunterreguliert. In den HEK293 Zellen hingegen ist LTBP4L relativ stark exprimiert wohingegen LTBP4S nicht exprimiert vorliegt. In PC3 Zellen konnten beide N-terminalen Varianten schwach nachgewiesen werden, wodurch die Ergebnisse einer semiquantitativen Analyse schwerer zu interpretieren sein könnten. Aus diesem Grund wurden für die semiquantitativen Versuche ausschließlich die Zelllinien MCF7 und HEK293 verwendet. Bei MCF7 Zellen handelt es sich um eine Brustkrebszelllinie und bei HEK293 Zellen um eine embryonale Nierenzelllinie.

Aus den behandelten und unbehandelten Zellen wurde RNA isoliert (siehe Punkt 3.2.1.2) und anschließend wurde die Qualität die Konzentration der isolierten RNA mit Hilfe einer RNA Elektrophorese (siehe Punkt 3.2.7) überprüft. Zusätzlich wurde die RNA Konzentration photometrisch mit dem NanoQuant der Firma TECAN bestimmt.

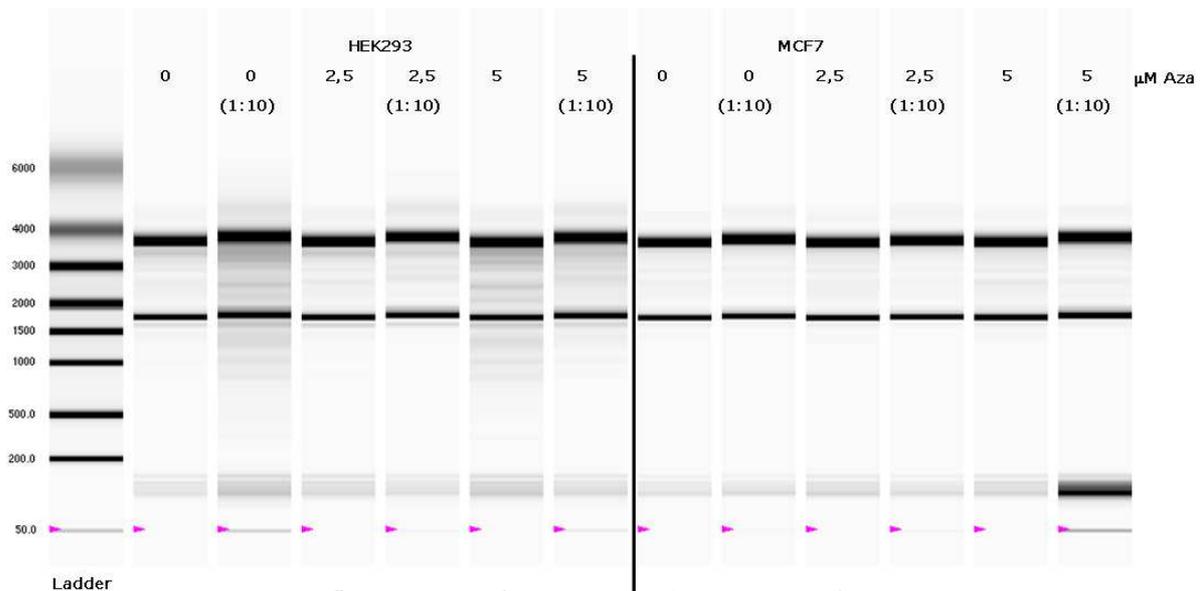


Abb. 4.18: RNA Qualität von den mit 5'-Aza-2'-deoxycytidin behandelten Zellen HEK293 und MCF7 (jeweils unverdünnt und 1:10 verdünnt) gemessen mittels RNA Elektrophorese.

Weder die Menge der RNA noch die Qualität wurde durch die Behandlung mit dem Demethylierungsreagens beeinträchtigt. Die RNA Qualität wurde mit Hilfe der Kapillar-Elektrophorese gemessen und durchwegs mit einen RQI („RNA Quality Index“) von 10 (= sehr gut) bewertet. Für die Messung wurde das Gerät Experion der Firma Biorad verwendet.

Nach Umwandlung der RNA in cDNA (siehe Punkt 3.2.7) wurde in einer spezifischen PCR etwa 500bp des LTBP4 Gens amplifiziert um die Expression zu überprüfen. Dazu wurden folgende Primer Kombinationen verwendet: L4S-cDNA-f und L4LS-cDNA-r für LTBP4S und L4L-cDNA-f und L4LS-cDNA-r für LTBP4L (siehe Punkt 2.6). Nach der Amplifikation wurde das Produkt in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (siehe Punkt 3.2.4).

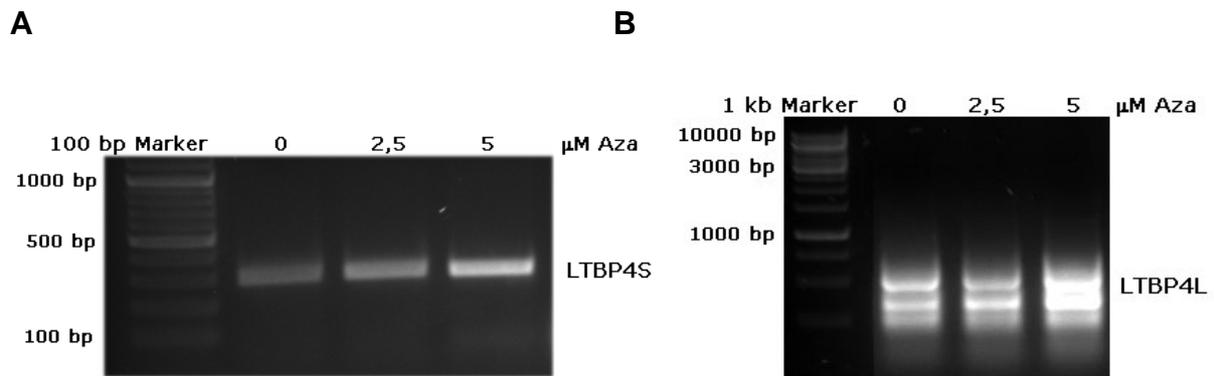


Abb. 4.19: Semiquantitative Expression von LTBP4S und LTBP4L in mit 5'-Aza-2'-deoxycytidin behandelten MCF7 Zellen.

Mittels PCR wurde die semiquantitative Expression von LTBP4S (Bild A) bzw. LTBP4L (Bild B) in un-behandelten bzw. mit 2,5 oder 5 μM Aza-behandelten Zellen bestimmt. Dafür wurde aus den Zellen zunächst die Gesamt-RNA isoliert und anschließend die mRNA in cDNA umgeschrieben. Die folgende semiquantitative PCR wurde mit folgenden Primer Kombinationen durchgeführt: L4S-cDNA-f und L4LS-cDNA-r für LTBP4S und L4L-cDNA-f und L4LS-cDNA-r für LTBP4L. Die Expression von LTBP4S und LTBP4L nimmt mit steigender 5'-Aza-2'-deoxycytidin Konzentration deutlich zu.

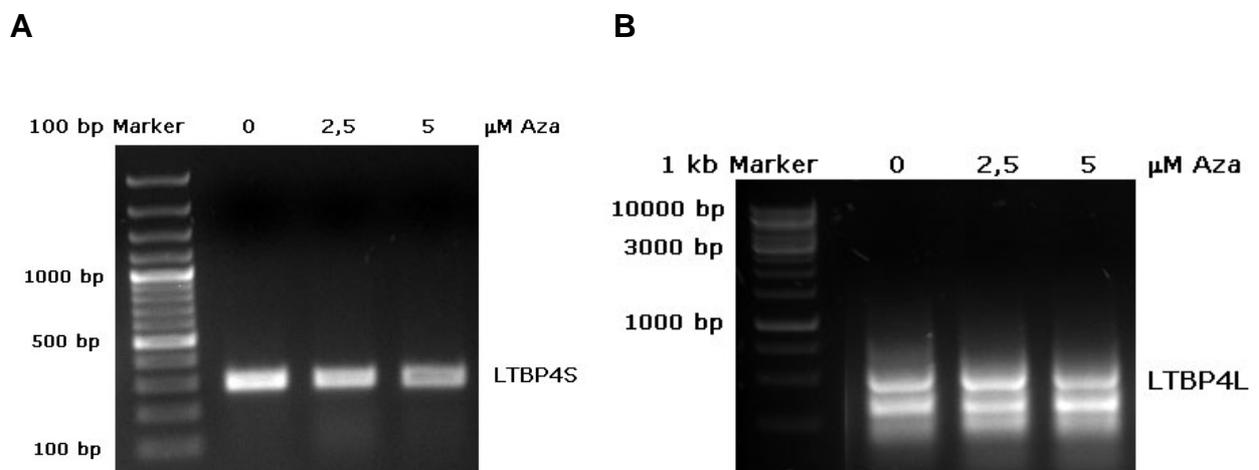


Abb. 4.20 Semiquantitative Expression von LTBP4S und LTBP4L in mit 5'-Aza-2'-deoxycytidin behandelten HEK293 Zellen.

Mittels PCR wurde die semiquantitative Expression von LTBP4S (Bild A) bzw. LTBP4L (Bild B) in un-behandelten bzw. mit 2,5 oder 5 μM Aza-behandelten Zellen bestimmt. Dafür wurde aus den Zellen zunächst die Gesamt-RNA isoliert und anschließend die mRNA in cDNA umgeschrieben. Die folgende semiquantitative PCR wurde mit folgenden Primer Kombinationen durchgeführt: L4S-cDNA-f und L4LS-cDNA-r für LTBP4S und L4L-cDNA-f und L4LS-cDNA-r für LTBP4L. Die Expression von LTBP4S und LTBP4L bleibt trotz steigender 5'-Aza-2'-deoxycytidin Konzentration gleich.

Die Ergebnisse zeigten eine deutliche Erhöhung der Expression von LTBP4S in MCF7 Zellen. Diese Tendenz zeigte sich ebenfalls für LTBP4L. Im Falle der HEK293 Zellen war keine eindeutige Steigerung der Expression mit Zunahme der 5'-Aza-2'-deoxycytidin Konzentration zu erkennen. Die Ergebnisse dieser Vorversuche deuten darauf hin, dass Hypermethylierung bei der Regulation von LTBP4 in Tumorzellen eine Rolle spielen könnte. Aufgrund dessen wurde im weiteren Verlauf die Expression von LTBP4 quantitativ auf mRNA Ebene untersucht.

4.2.3 Quantitative Analyse der LTBP4 Expression mittels real time RT-PCR

Für die Untersuchung der LTBP4 Expression auf mRNA Ebene wurden die verwendeten Zelllinien HEK293, MCF7, PC3, DLD1 und CaCo2 (siehe Punkt 2.1.1) wie in Punkt 4.2.1 beschrieben mit 5'-Aza-2'-deoxycytidin behandelt. Anschließend wurde die RNA isoliert, gemessen und in cDNA umgeschrieben (siehe Punkt 4.2.2). Die cDNA wurde in einer real time RT-PCR amplifiziert und dabei die LTBP4 Konzentration mit Hilfe der Chemilumineszenz quantitativ bestimmt (siehe Punkt 3.2.8). Jede Probe wurde als Triplet pipettiert und jede Zelllinie mindestens 3mal getestet. Als Negativkontrolle wurde bei jedem Versuch *A. bidest.* verwendet. Als Housekeeping Gene wurden, nach Überprüfung ihrer stabilen Expression in den gegebenen experimentellen Bedingungen, RPLPO und TBP verwendet. Housekeeping Gene sind Gene die, im Gegensatz zu den regulierten Genen, unabhängig von Zelltyp, Zellstadium und äußeren Einflüssen exprimiert werden. Sie dienen als interner Vergleichsstandard (BUTTE AJ, 2001; EISENBERG E, 2003 ; GREER S, 2010).

Mit Hilfe des Computerprogramms geNorm wurde, basierend auf den Expressionen von RPLPO und TBP, der Normierungsfaktor errechnet (BUTTE AJ, 2001; EISENBERG E, 2003 ; GREER S, 2010). Die Normierungsfaktoren der Triplets wurden gemittelt. Anschließend wurde die Quantität jeder einzelnen Probe durch den jeweiligen Normierungsfaktor-Mittelwert geteilt. Die so generierten relativen Expressionen wurden ebenfalls gemittelt. Die erhaltenen Werte wurden mit dem Statistics Programm SPSS von der Firma IBM analysiert. Dabei wurden die relativen Expressionen der mit 2,5 μM und 5 μM 5'-Aza-2'-deoxycytidin behandelten Proben jeweils einzeln auf die relative Expression der unbehandelten Zellen bezogen. Da es sich bei den hier generierten Daten um nicht parametrische verbundene Stichproben handelt, fand der Wilcoxon-Mann-Whitney Test Anwendung (MANN, 1947). Das Signifikanzniveau wurde mit $p < 0,05$ festgelegt.

Die statistische Auswertung der relativen Expressionen ergab für keine der untersuchten Zelllinien ein signifikantes Ergebnis. Es konnte auch keine Tendenz zur Methylierung festgestellt werden. Durch Behandlung der verwendeten Zellen mit dem Demethylierungsreagens 5'-Aza-2'-deoxycytidin konnte demnach keine Regulierung der Genexpression durch Methylierung festgestellt werden.

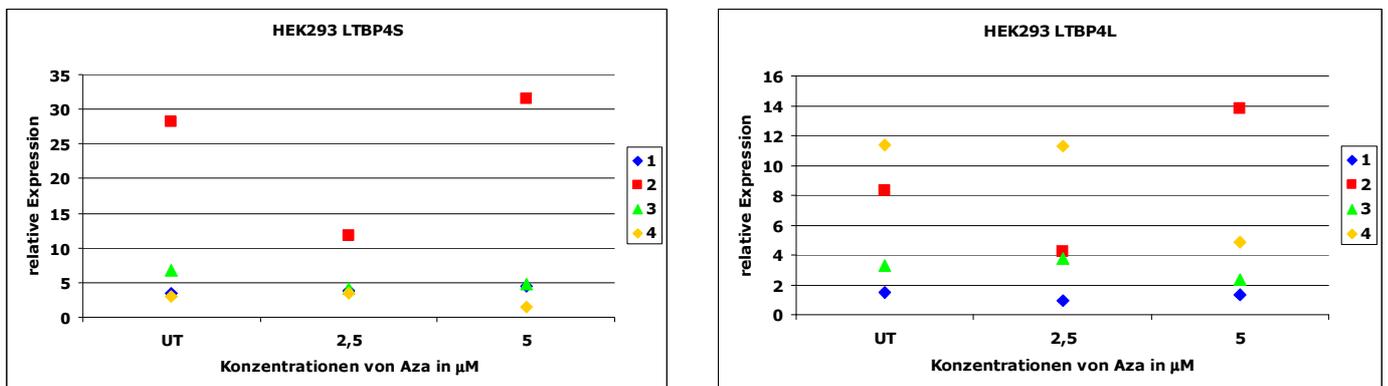


Abb. 4.21: Quantitative Expression von LTBP4 in HEK293 Zellen gemessen mit real time qPCR.

Die Tabellen HEK293 L4S und HEK293 L4L zeigen die quantitative Expression von LTBP4 S und L in Abhängigkeit von der Dosis des Demethylierungsreagens 5'-Aza-2'-deoxycytidin. Dabei wurde ein Nullwert gemessen UT (untransfiziert) und dann jeweils 2,5 μM und 5 μM 5'-Aza-2'-deoxycytidin. In der Zelllinie HEK293 konnte keine Signifikanz bezüglich einer Veränderung der LTBP4 Expression durch 5'-Aza-2'-deoxycytidin nachgewiesen werden.

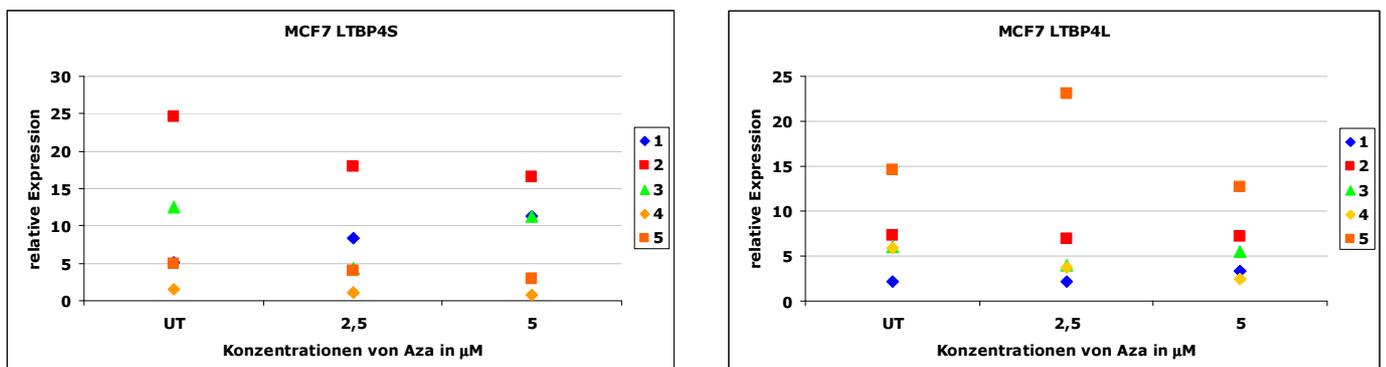


Abb. 4.22: Quantitative Expression von LTBP4 in MCF7 Zellen gemessen mit real time qPCR.

Die Tabellen MCF7 L4S und MCF7 L4L zeigen die quantitative Expression von LTBP4 S und L in Abhängigkeit von der Dosis des Demethylierungsreagens 5'-Aza-2'-deoxycytidin. Dabei wurde ein Nullwert gemessen UT (untransfiziert) und dann jeweils 2,5 μM und 5 μM 5'-Aza-2'-deoxycytidin. In der Zelllinie MCF7 konnte keine Signifikanz bezüglich einer Veränderung der LTBP4 Expression durch 5'-Aza-2'-deoxycytidin nachgewiesen werden.

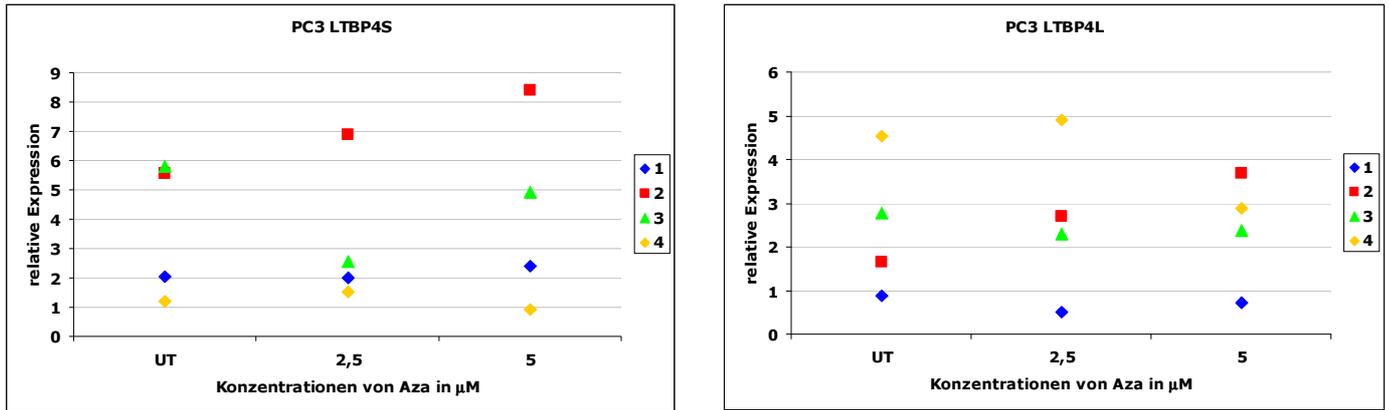


Abb. 4.23: Quantitative Expression von LTBP4 in PC3 Zellen gemessen mit real time qPCR.

Die Tabellen PC3 L4S und PC3 L4L zeigen die quantitative Expression von LTBP4 S und L in Abhängigkeit von der Dosis des Demethylierungsreagens 5'-Aza-2'-deoxycytidin. Dabei wurde ein Nullwert gemessen UT (untransfiziert) und dann jeweils 2,5 μM und 5 μM 5'-Aza-2'-deoxycytidin. In der Zelllinie PC3 konnte keine Signifikanz bezüglich einer Veränderung der LTBP4 Expression durch 5'-Aza-2'-deoxycytidin nachgewiesen werden.

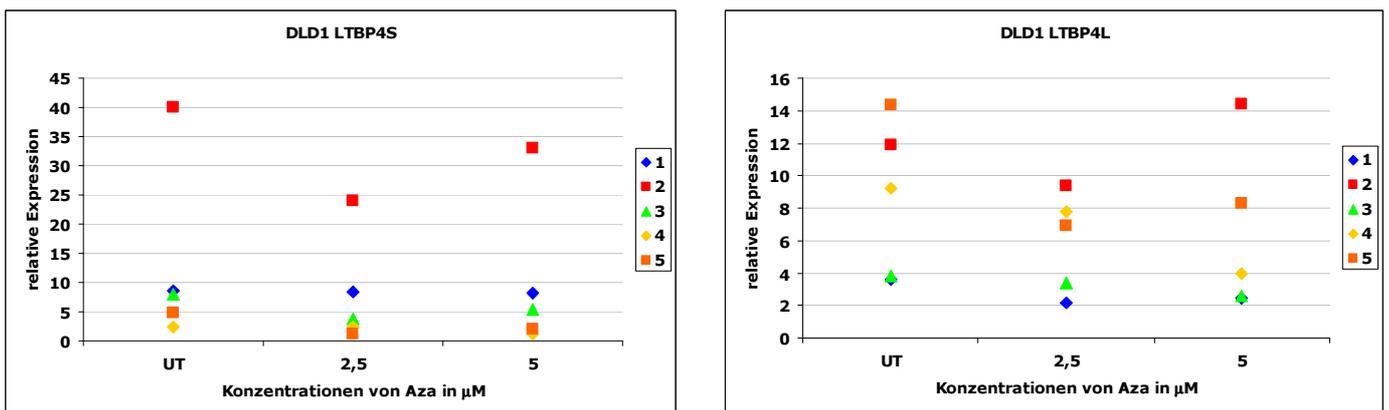


Abb. 4.24: Quantitative Expression von LTBP4 in DLD1 Zellen gemessen mit real time qPCR.

Die Tabellen DLD1 L4S und DLD1 L4L zeigen die quantitative Expression von LTBP4 S und L in Abhängigkeit von der Dosis des Demethylierungsreagens 5'-Aza-2'-deoxycytidin. Dabei wurde ein Nullwert gemessen UT (untransfiziert) und dann jeweils 2,5 μM und 5 μM 5'-Aza-2'-deoxycytidin. In der Zelllinie DLD1 konnte keine Signifikanz bezüglich einer Veränderung der LTBP4 Expression durch 5'-Aza-2'-deoxycytidin nachgewiesen werden.

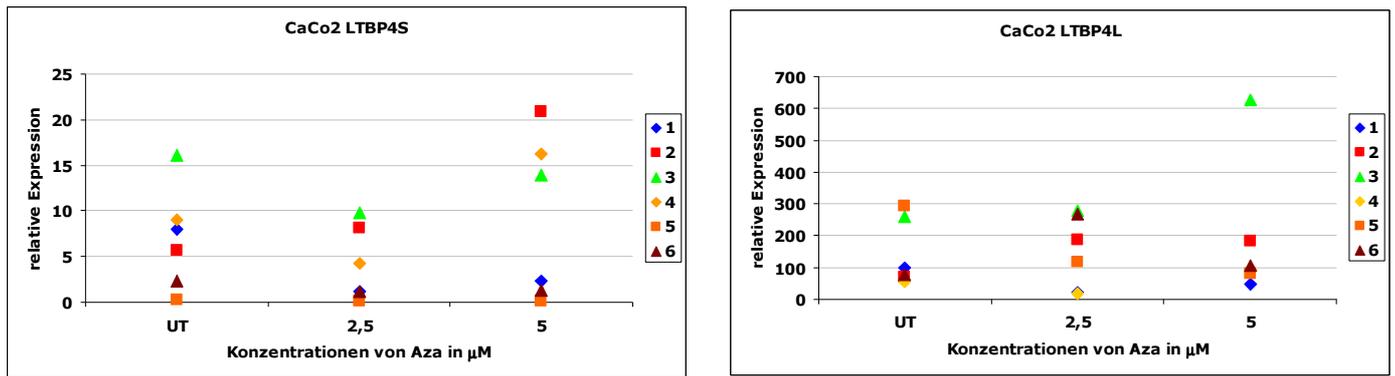


Abb. 4.25: Quantitative Expression von LTBP4 in CaCo2 Zellen gemessen mit real time qPCR.

Die Tabellen CaCo2 L4S und CaCo L4L zeigen die quantitative Expression von LTBP4 S und L in Abhängigkeit von der Dosis des Demethylierungsreagens 5'-Aza-2'-deoxycytidin. Dabei wurde ein Nullwert gemessen UT (untransfiziert) und dann jeweils 2,5 µM und 5 µM 5'-Aza-2'-deoxycytidin. In der Zelllinie CaCo2 konnte keine Signifikanz bezüglich einer Veränderung der LTBP4 Expression durch 5'-Aza-2'-deoxycytidin nachgewiesen werden.

Um die Ergebnisse der real time RT-PCR, die im Kontrast zu den erfolgten Vorversuchen standen (siehe Punkt 4.2.2), zu untermauern bzw. zu widerlegen wurde im Folgenden eine Methylierungsanalyse des LTBP4 Promotors mit Hilfe der Bisulfitreaktion durchgeführt.

4.2.4 *In silico*-Analyse nach geeigneten CpG-Inseln von LTBP4

Sich im Promotorbereich befindende CpG-Inseln sind Regionen im Genom mit erhöhter CpG-Dinukleotid-Dichte, die in den meisten Fällen unmethyliert vorliegen (SHARMA et al., 2010; REN et al., 2011). In Tumoren jedoch sind diese CpG-Inseln oft hypermethyliert um Tumorsuppressorgene auszuschalten (SHARMA et al., 2010; REN et al., 2011). Für die Suche nach geeigneten CpG-Inseln wurde das Computerprogramm UCSC Genome Browser Bioinformatics verwendet (KENT et al., 2002). Mit Hilfe dieses Programms können CpG-Inseln lokalisiert werden, indem die DNA Abschnitte im Hinblick auf ihren GC-Gehalt untersucht werden. Die Einstellungen des Computerprogramms wurden so gewählt, dass mindestens ein GC-Gehalt von 50 % in einem DNA-Fragment von mindestens 200 bp und maximal 500 bp Länge vorliegen muss, um als potentielle CpG-Insel identifiziert zu werden. Darüber hinaus musste das Verhältnis von beobachteten CpGs zu erwarteten CpGs größer als 0,6 sein.

Es wurden zwei CpG-Inseln, CpG 25 und CpG 34, gefunden die beide innerhalb von 6 kb in der 5'upstream Region von LTBP4S liegen. CpG 34, mit einem GC Gehalt von 71,7 %, liegt zu 100 % in 2Prom (siehe Punkt 4.1.2), dem potentiellen Promotorbereich von LTBP4S. Zusätzlich liegt CpG 34 zu 65 % in 1Prom. CpG 25, mit einem

GC Gehalt von 64,6 %, hingegen liegt zwischen L4Prom und 2Prom. Es überschneidet sich mit 2Prom in 15 bp.

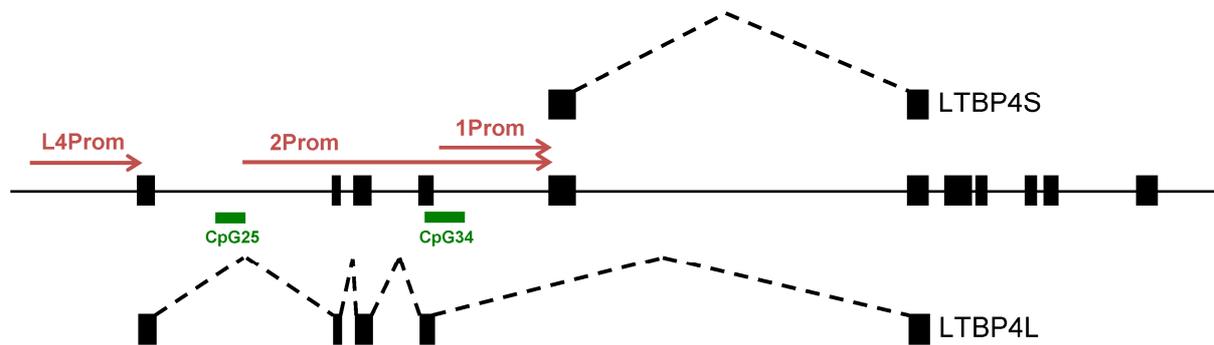


Abb. 4.26: Schematische Darstellung der Lokalisation der beiden CpG-Inseln CpG 25 und CpG 34 bezogen auf die potentiellen Promotorbereiche von LTBP4.

CpG-Insel 34 liegt vollständig in dem potentiellen Promotorbereich 2Prom und zu 65% in 1Prom. CpG-Insel 25 ist zwischen L4Prom und 2Prom lokalisiert und überschneidet sich nur zu einem geringen Teil mit 2Prom. Beide Inseln liegen strangaufwärts von LTBP4S und innerhalb von LTBP4L.

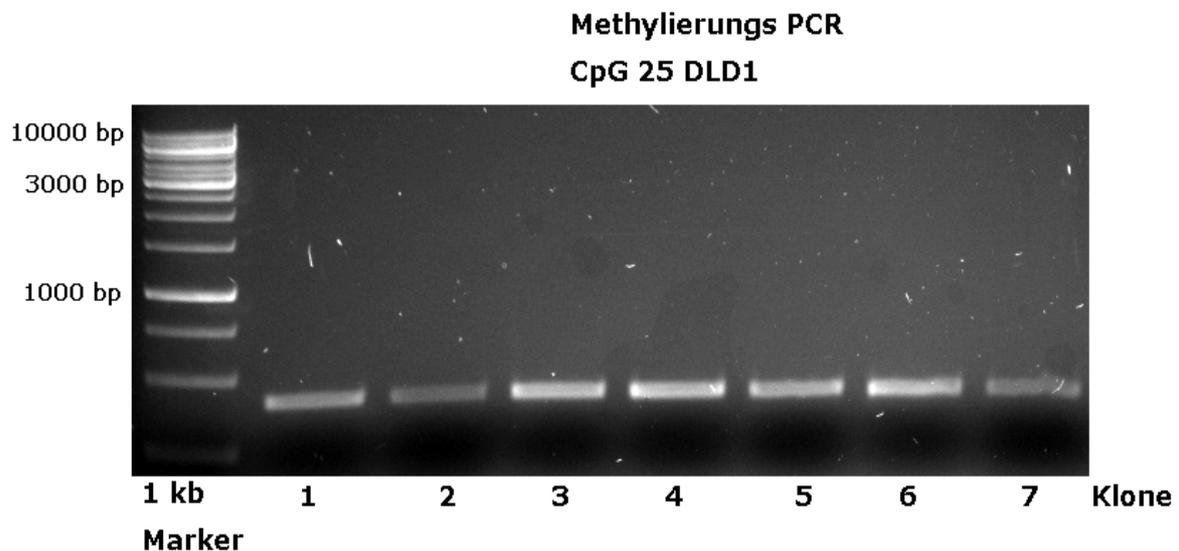
Um Primer für die relevanten CpG-Inseln zu finden wurden diese anschließend mit dem Programm MethPrimer (LI LC, 2002) analysiert. Dabei wurde die maximale T_M Differenz auf 1 gesetzt. Die so generierten Primer L4CpG25d_for, L4CpG25d_rev, L4CpG34_for und L4CpG34_rev (siehe Punkt 2.6) wurden zur Amplifizierung der beiden CpG-Inseln eingesetzt.

4.2.5 Überprüfung der CpG-Inseln hinsichtlich ihres Methylierungs- Status mit Hilfe der Bisulfitreaktion

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen Zelllinien HEK293, MCF7, PC3, DLD1 und CaCo2 wurden für die Methylierungsanalysen zwei weitere Zelllinien untersucht. Die Brustkarzinom Zelllinie HS578T und die Brustzelllinie HS578Bst (siehe Punkt 2.1.1). Zunächst wurde aus allen verwendeten Zelllinien genomische DNA isoliert (siehe Punkt 3.2.1.3). Diese wurde anschließend mit Hilfe der Bisulfitreaktion behandelt. Bei dieser Methode (siehe Punkt 3.4.1) werden alle unmethylierten Cytosinreste mittels Bisulfit in Uracil umgewandelt. In der sich anschließenden Methylierungs-PCR werden alle Uracil Moleküle als Thymin gelesen, während die methylierten Cytosine weiterhin als Cytosin Moleküle erkannt werden (HERMAN JG, 1996). Hierbei finden die CpG-Insel spezifischen Primer L4CpG25d_for, L4CpG25d_rev, L4CpG34_for und L4CpG34_rev Anwendung. Das Amplifikat wurde in den pGEM[®]-T Vektor System I (Promega) kloniert und anschließend in NEB 5-alpha kompetente *E.coli* (NEB) transformiert (siehe Punkt 3.2.2.2 und 3.2.3.2). Pro Zelllinie wurden 15 bis 20 Klone in ei-

ner Klon PCR (siehe Punkt 3.2.6) vervielfältigt und anschließend sequenziert. Die Sequenzierung der Klone fand, nach erfolgter Big Dye Reaktion (siehe Punkt 3.2.6), im Cologne Center for Genomics (CCG) der Universität Köln statt.

A



B

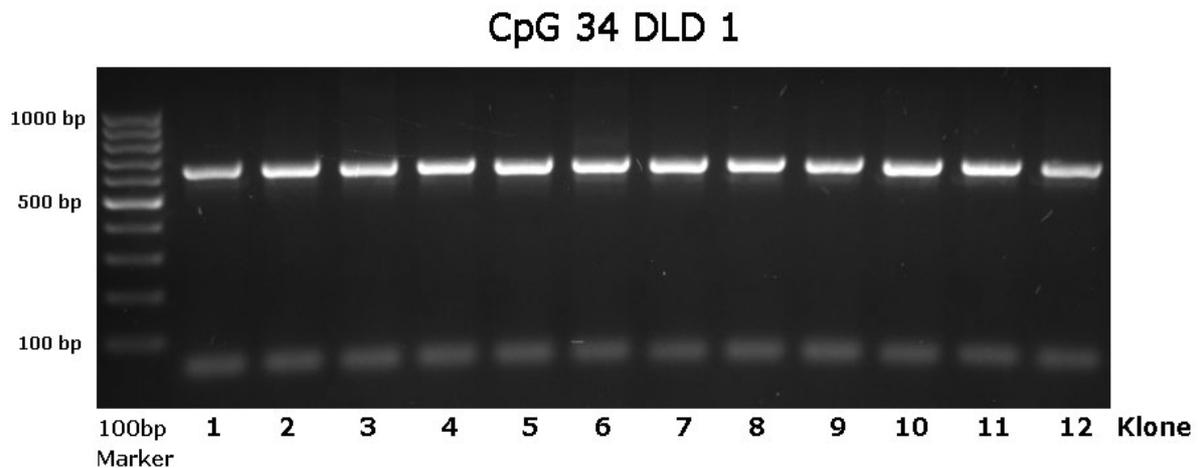


Abb. 4.27: Gelelektrophoretische Darstellung unterschiedlicher Schritte in der Überprüfung des LTBP4 Promotors hinsichtlich seines Methylierungsstatus mittels Bisulfitreaktion.

A: Methylierungs-PCR von 7 Klonen der CpG-Insel 34 in der Zelllinie DLD1. Hierbei werden methylierte Cytosine weiterhin als Cytosin erkannt, während in der Bisulfitreaktion in Uracil umgewandelte unmethylierte Cytosine in Thymin umgewandelt werden. B: Klon-PCR von 12 Klonen der CpG-Insel 34 in der Zelllinie DLD1. Das Amplifikat der Methylierungs-PCR wurde in pGEMT kloniert und anschließend in kompetente E.coli transformiert. Die Klone werden in der Klon-PCR vervielfältigt und anschließend sequenziert..

4.2.6 Analyse der Ergebnisse der Bisulfitreaktion mit Hilfe des Programms

Biq-Analyzer

Die sequenzierten Klone wurden mit Hilfe des Programms Biq-Analyzer (BOCK, 2005) analysiert. Mittels dieses Programms können CpG-Inseln lokalisiert werden, indem die DNA Abschnitte im Hinblick auf ihren GC-Gehalt untersucht werden. Das Programm untersucht zusätzlich auch die Qualität der Daten und hilft unvollständig konvertierte Cytosinbasen nach der Bisulfitbehandlung, Klonsequenzen und Sequenzierungsfehler zu erkennen und auszuschließen (BOCK, 2005). Die Einstellungen des Biq-Analyzer wurden so gewählt, dass mindestens ein GC-Gehalt von 50 % in einem Fragment von mindestens 200 bp Länge vorliegen muss. Abgesehen davon musste das Verhältnis von beobachteten CpGs zu erwarteten CpGs größer als 0,6 sein.

Die Analyse der Daten ergab folgende Ergebnisse:

Für die CpG-Insel CpG 25 waren die Zelllinien HEK293, MCF7, PC3, HS578T und HS578Bst eindeutig in allen CpG-Dinukleotiden unmethyliert. In den beiden Kolonkarzinom Zelllinien CaCo2 und DLD1 lagen nicht alle, aber die meisten CpG-Dinukleotide unmethyliert vor. Bei der Zelllinie CaCo2 waren 2 CpG-Nukleotide methyliert und 2 CpG-Nukleotide wahrscheinlich methyliert. In der Zelllinie DLD1 waren 2 CpG-Nukleotide wahrscheinlich methyliert. Beide Kolonkarzinomzelllinien wiesen damit eine schwache Methylierung in der CpG-Insel CpG25 auf.

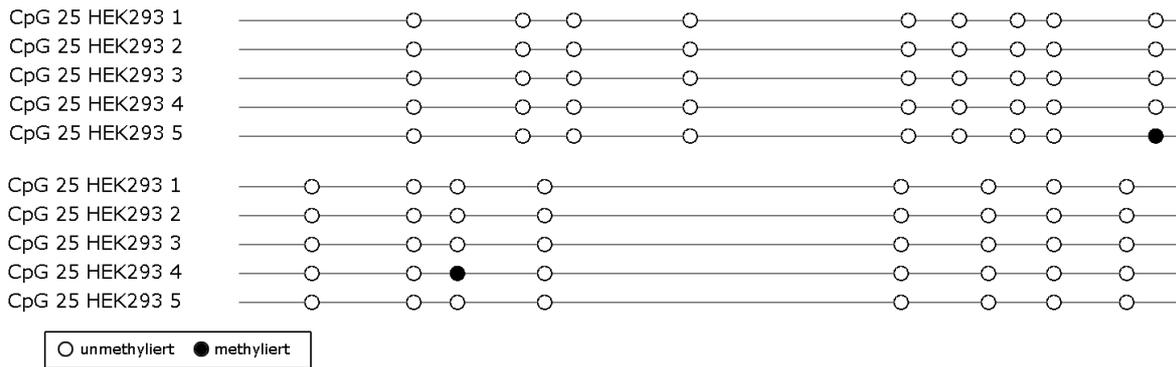


Abb. 4.28: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 25, in HEK293 Zellen.

Das amplifizierte Promotorfragment ist als Linie dargestellt. Die gefüllten schwarzen Kreise symbolisieren methylierte, die ungefüllten Kreise unmethylierte Cytosinbasen. Die CpG-Insel 25 aus dem Promotorbereich von LTBP4 ist in HEK293 Zellen nicht methyliert.

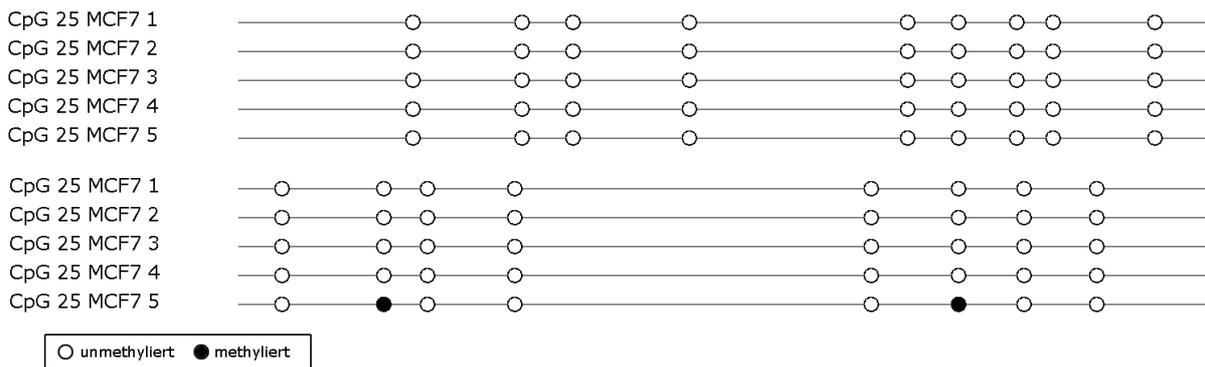


Abb. 4.29: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 25, in MCF7 Zellen.

Das amplifizierte Promotorfragment ist als Linie dargestellt. Die gefüllten schwarzen Kreise symbolisieren methylierte, die ungefüllten Kreise unmethylierte Cytosinbasen. Die CpG-Insel 25 aus dem Promotorbereich von LTBP4 ist in MCF7 Zellen nicht methyliert.

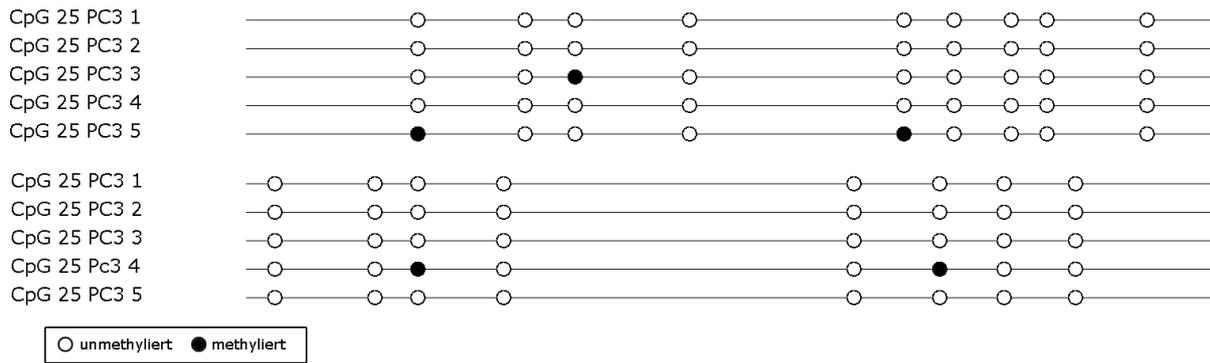


Abb. 4.30: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 25, in PC3 Zellen.

Das amplifizierte Promotorfragment ist als Linie dargestellt. Die gefüllten schwarzen Kreise symbolisieren methylierte, die ungefüllten Kreise unmethylierte Cytosinbasen. Die CpG-Insel 25 aus dem Promotorbereich von LTBP4 ist in PC3 Zellen nicht methyliert.

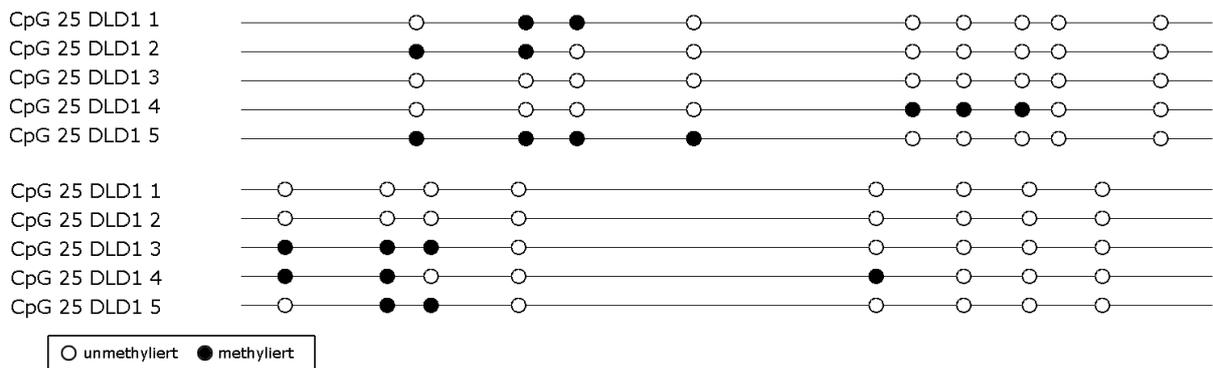


Abb. 4.31: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 25, in DLD1 Zellen.

Das amplifizierte Promotorfragment ist als Linie dargestellt. Die gefüllten schwarzen Kreise symbolisieren methylierte, die ungefüllten Kreise unmethylierte Cytosinbasen. Die CpG-Insel 25 aus dem Promotorbereich von LTBP4 ist in DLD1 Zellen schwach methyliert.

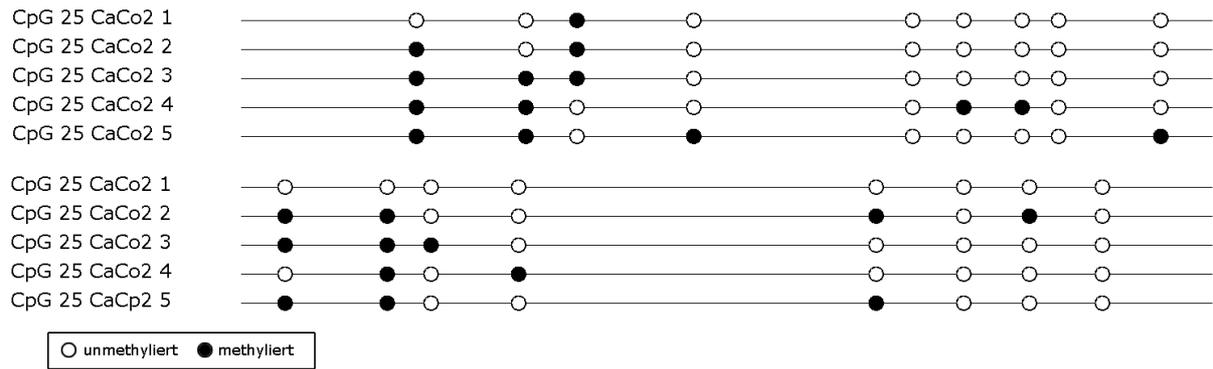


Abb. 4.32: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 25, in CaCo2 Zellen.

Das amplifizierte Promotorfragment ist als Linie dargestellt. Die gefüllten schwarzen Kreise symbolisieren methylierte, die ungefüllten Kreise unmethylierte Cytosinbasen. Die CpG-Insel 25 aus dem Promotorbereich von LTBP4 ist in CaCo2 Zellen schwach methyliert.

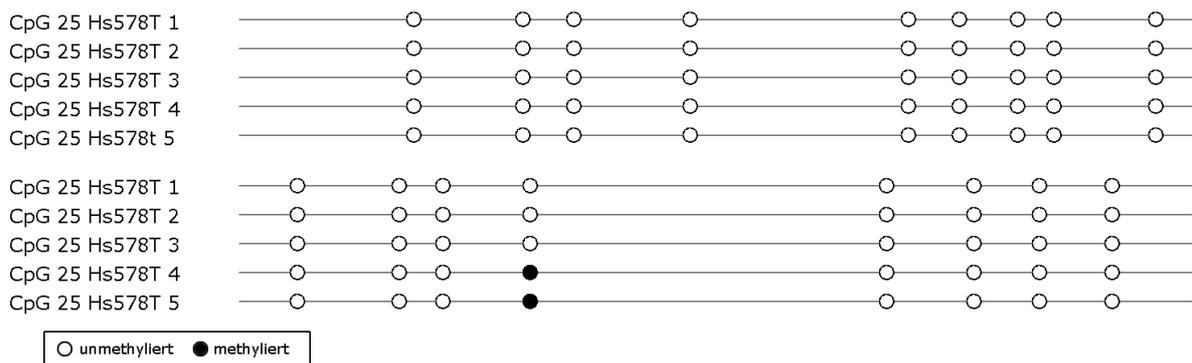


Abb. 4.33: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 25, in Hs578T Zellen.

Das amplifizierte Promotorfragment ist als Linie dargestellt. Die gefüllten schwarzen Kreise symbolisieren methylierte, die ungefüllten Kreise unmethylierte Cytosinbasen. Die CpG-Insel 25 aus dem Promotorbereich von LTBP4 ist in Hs578T Zellen nicht methyliert.

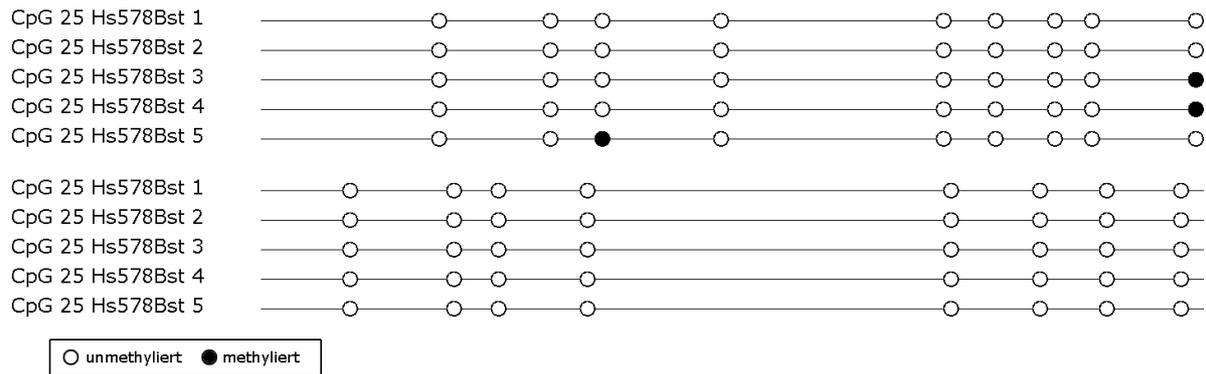


Abb. 4.34: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 25, in Hs578Bst Zellen.

Das amplifizierte Promotorfragment ist als Linie dargestellt. Die gefüllten schwarzen Kreise symbolisieren methylierte, die ungefüllten Kreise unmethylierte Cytosinbasen. Die CpG-Insel 25 aus dem Promotorbereich von LTBP4 ist in Hs578Bst Zellen nicht methyliert.

Die zweite untersuchte CpG-Insel, CpG 34, zeigte ein heterogeneres Bild verglichen mit den Ergebnissen von CpG 25. Die überwiegende Mehrheit der CpG-Dinukleotide in den Zelllinien HEK293 und PC3 waren methyliert. Während bei den PC3 Zellen das 16. und wahrscheinlich 20. CpG-Dinukleotid nicht methyliert waren, zeigten sich bei den HEK293 keine eindeutigen nicht methylierten Dinukleotide. Die CpG-Dinukleotide der Tumorkarzinomlinie CaCo2 waren zu 65 % methyliert, die der Brustkrebszelllinie MCF7 zu 33 %. Die Mehrheit der CpG-Dinukleotide der Zelllinien DLD1, HS578T und HS578Bst waren nur schwach methyliert. Es fiel auf, dass bei den Zelllinien MCF7, DLD1, HS578T und HS578Bst einige CpG-Dinukleotide der untersuchten Klone, trotz erhöhter Stichprobenzahl, keine eindeutigen Ergebnisse lieferten. Die Hälfte der Klone zeigte für bestimmte Dinukleotide Methylierung, die andere Hälfte zeigte das Dinukleotid als nicht methyliert an. Es ist daher nicht auszuschließen, dass dort eine Allel-spezifische Methylierung erfolgt.

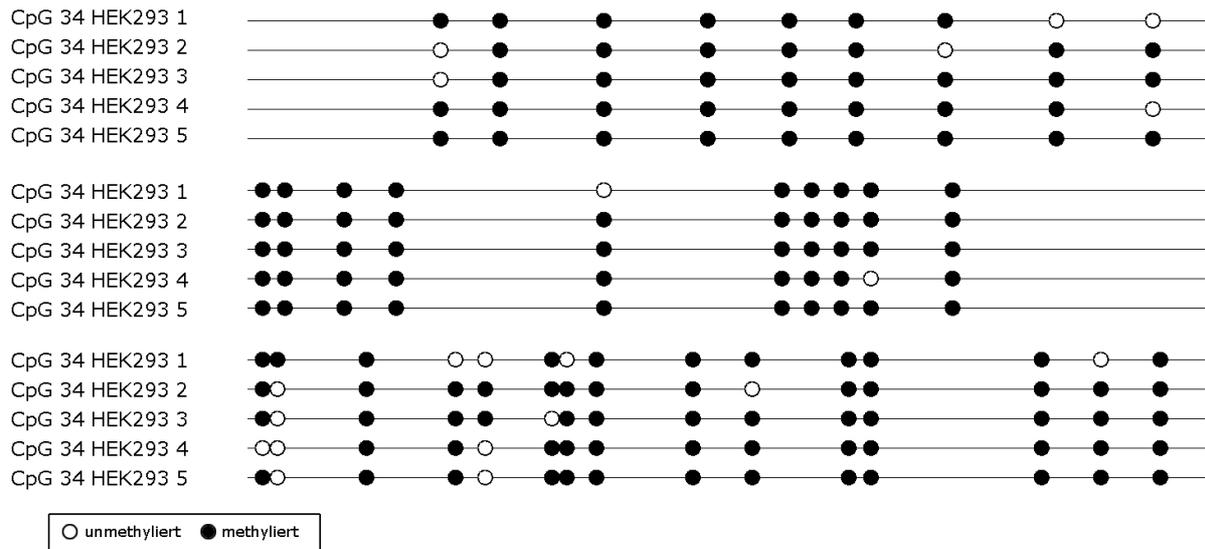


Abb. 4.35: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 34, in HEK293 Zellen.

Das amplifizierte Promotorfragment ist als Linie dargestellt. Die gefüllten schwarzen Kreise symbolisieren methylierte, die ungefüllten Kreise unmethylierte Cytosinbasen. Die CpG-Insel 34 aus dem Promotorbereich von LTBP4 ist in HEK293 Zellen stark methyliert.

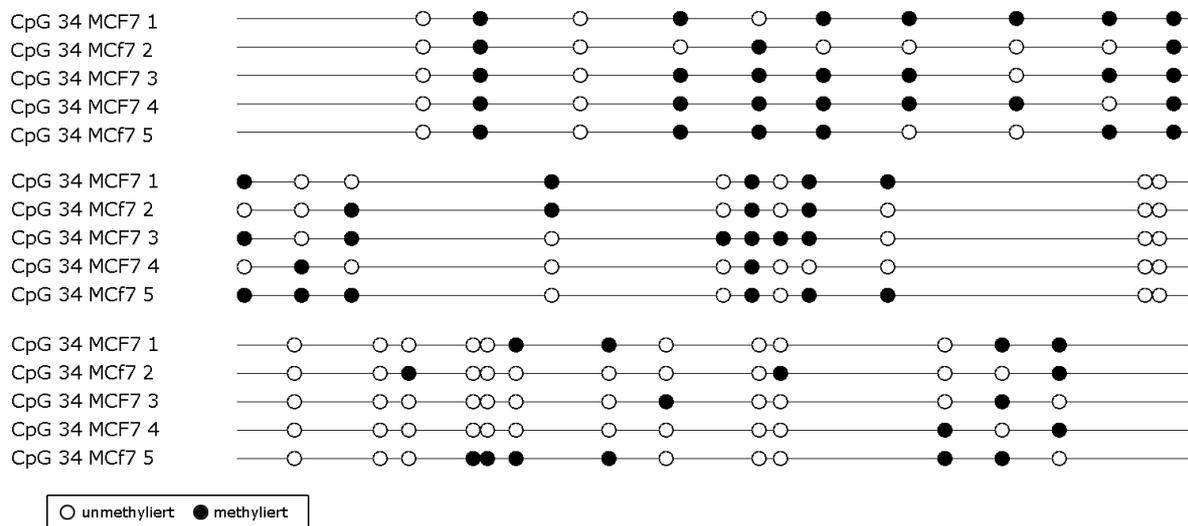


Abb. 4.36: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 34, in MCF7 Zellen.

Das amplifizierte Promotorfragment ist als Linie dargestellt. Die gefüllten schwarzen Kreise symbolisieren methylierte, die ungefüllten Kreise unmethylierte Cytosinbasen. Die CpG-Insel 34 aus dem Promotorbereich von LTBP4 ist in MCF7 Zellen schwach methyliert.

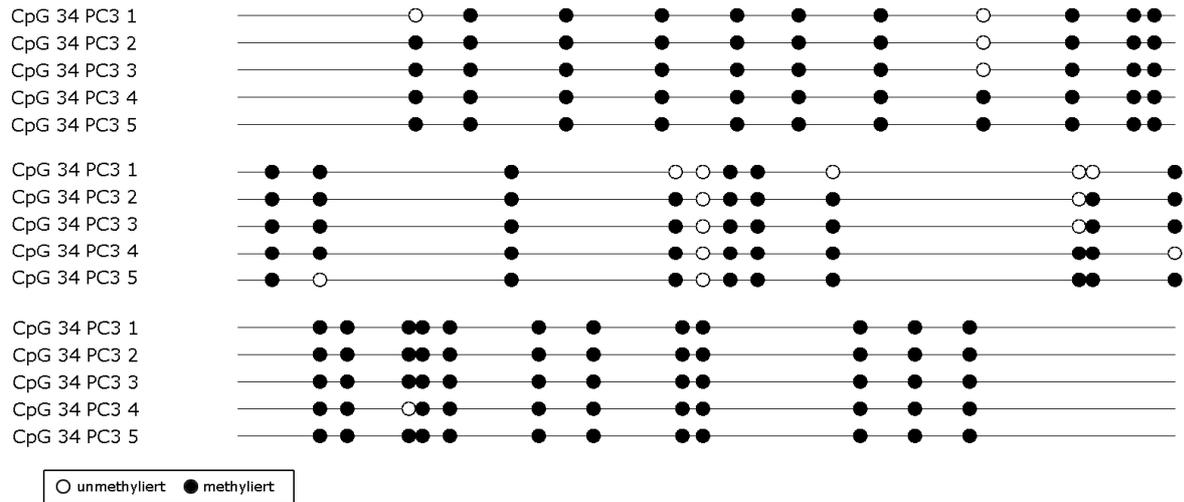


Abb. 4.37: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 34, in PC3 Zellen.

Das amplifizierte Promotorfragment ist als Linie dargestellt. Die gefüllten schwarzen Kreise symbolisieren methylierte, die ungefüllten Kreise unmethylierte Cytosinbasen. Die CpG-Insel 34 aus dem Promotorbereich von LTBP4 ist in PC3 Zellen stark methyliert.

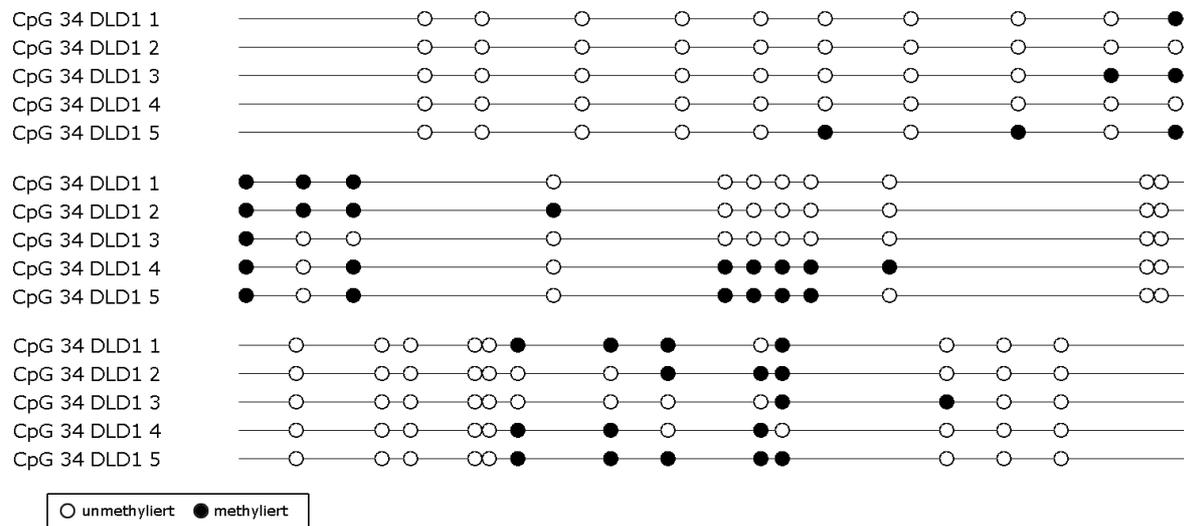


Abb. 4.38: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 34, in DLD1 Zellen.

Das amplifizierte Promotorfragment ist als Linie dargestellt. Die gefüllten schwarzen Kreise symbolisieren methylierte, die ungefüllten Kreise unmethylierte Cytosinbasen. Die CpG-Insel 34 aus dem Promotorbereich von LTBP4 ist in DLD1 Zellen schwach methyliert.

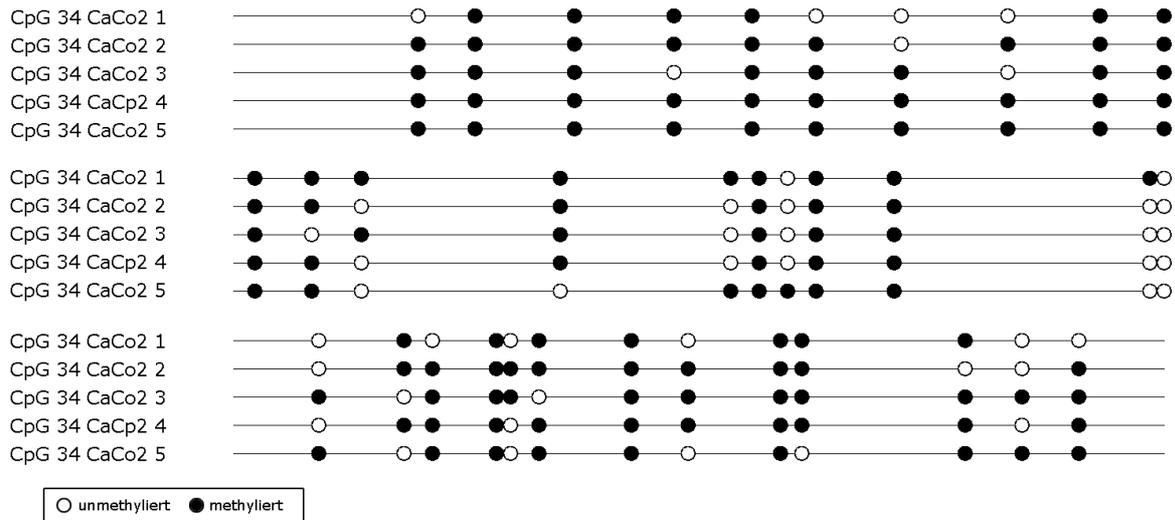


Abb. 4.39: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 34, in CaCo2 Zellen.

Das amplifizierte Promotorfragment ist als Linie dargestellt. Die gefüllten schwarzen Kreise symbolisieren methylierte, die ungefüllten Kreise unmethylierte Cytosinbasen. Die CpG-Insel 34 aus dem Promotorbereich von LTBP4 ist in CaCo2 Zellen stark methyliert.

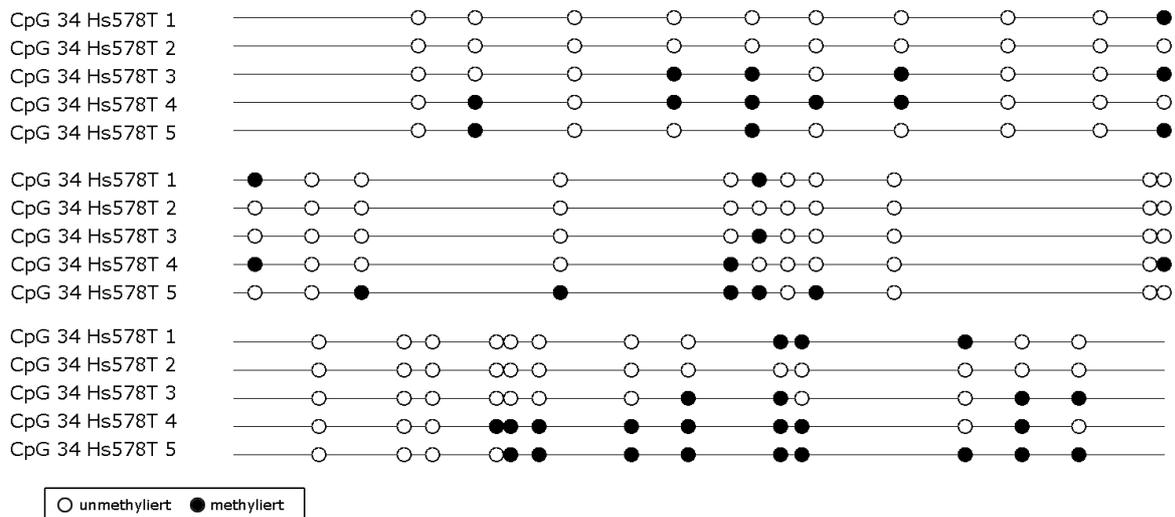


Abb. 4.40: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 34, in Hs578T Zellen.

Das amplifizierte Promotorfragment ist als Linie dargestellt. Die gefüllten schwarzen Kreise symbolisieren methylierte, die ungefüllten Kreise unmethylierte Cytosinbasen. Die CpG-Insel 34 aus dem Promotorbereich von LTBP4 ist in Hs578T Zellen schwach methyliert.

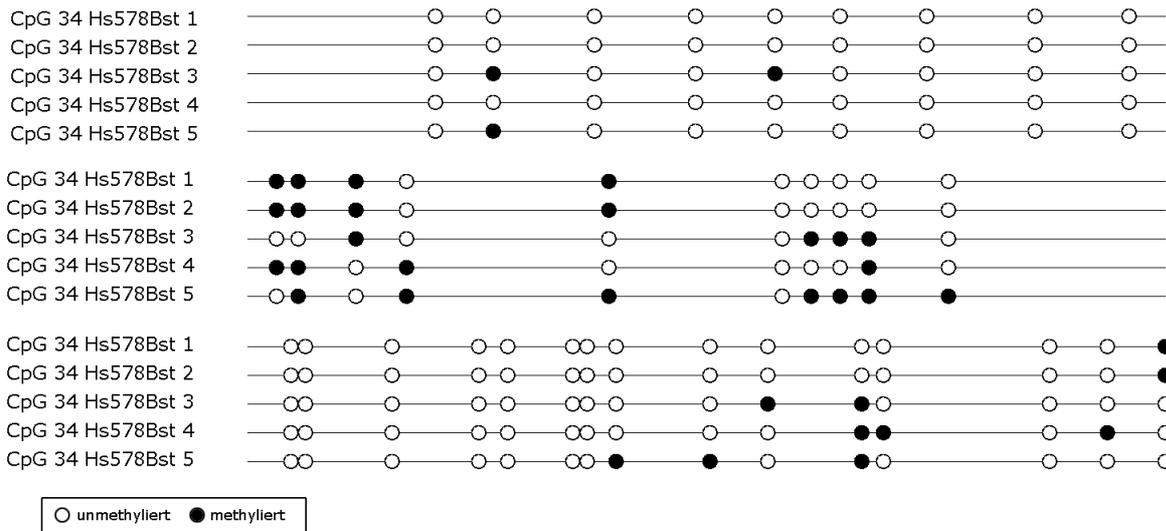


Abb. 4.41: Darstellung der Ergebnisse der Bisulfit-Sequenzierung des LTBP4 Promotors, CpG 34, in Hs578Bst Zellen.

Das amplifizierte Promotorfragment ist als Linie dargestellt. Die gefüllten schwarzen Kreise symbolisieren methylierte, die ungefüllten Kreise unmethylierte Cytosinbasen. Die CpG-Insel 34 aus dem Promotorbereich von LTBP4 ist in Hs578Bst Zellen schwach methyliert.

Um eine bessere Übersicht bezüglich der ermittelten Methylierungsgrade zu erhalten wurden sie in drei verschiedene Kategorien eingeteilt:

Hierbei repräsentiert der Wert „0“ keine DNA Methylierung innerhalb des untersuchten Promotorbereichs, während der Wert „1“ eine schwache und der Wert „2“ eine starke DNA Methylierung bezeichnet. In der Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse der Methylierungsanalysen deshalb in tabellarischer Form dargestellt.

Tabelle 4.1.: Zusammenfassung der Ergebnisse aus den Methylierungsanalysen mittels der Bisulfitreaktion.

Der Wert „0“ repräsentiert keine, der Wert „1“ eine schwache und der Wert „2“ eine starke DNA Methylierung im Promotorbereich von LTBP4. Untersucht wurden die CpG-Inseln CpG 25 und CpG 34 und die Zelllinien HEK293, MCF7, PC3, DLD1, CaCo2, Hs578T und Hs578Bst.

	CpG 25	CpG 34
HEK293	0	2
MCF7	0	1
PC3	0	2
DLD1	1	1
CaCo2	1	2
Hs578T	0	1
Hs578Bst	0	1

Im Falle der Zelllinien PC3, HEK293 und CaCo2, zeigte sich eine deutliche Methylierung in der CpG-Insel 34. Die Zelllinien MCF7, DLD1, HS578T und Hs578Bst waren in der CpG-Insel 34 schwach methyliert. Die beiden Kolonkarzinom-Zelllinien DLD1 und CaCo2 lagen in der CpG-Insel 25 schwach methyliert vor. Die Zelllinien HEK293, MCF7, PC3, Hs578T und Hs578Bst lagen in der CpG-Insel 25 nicht methyliert vor.

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurden zwei verschiedene Ansätze zur mechanistischen Untersuchung von LTBP4 überprüft. Zum einen wurden die potentiellen Promotorbereiche von LTBP4 identifiziert und, zusammen mit dem potentiellen Transkriptionsfaktor Sp1, auf ihre Funktionalität hinsichtlich der Aktivierung von LTBP4 anhand von Luciferase Assays getestet. Zum anderen wurde die Hypothese, dass LTBP4 als potentielles Tumorsuppressorgen in epithelialen Tumoren durch Promotorhypermethylierung herunterreguliert wird, mittels Methylierungsstudien überprüft. Diese Analysen könnten einen ersten Hinweis darauf geben, ob epigenetische Mechanismen die Expression von LTBP4 inaktivieren könnten. Im Folgenden werden Vorgehensweise und Ergebnisse dieser Dissertation eingehend beleuchtet und diskutiert.

5.1 Promotorstrukturanalysen von LTBP4

Die latenten TGF- β bindenden Proteine (LTBPs) gehören zur Familie der Fibrilline und sind wichtige Modulatoren der TGF- β Bioverfügbarkeit. Bislang sind vier strukturell und funktionell unterschiedliche LTBPs (LBP1-4) bekannt. LTBP4 besitzt mehrere Isoformen von denen sich zwei im N-terminalen Bereich unterscheiden (LTBP4S und LTBP4L) (SAHARINEN et al., 1998).

Zunächst wurden die potentiellen Promotorbereiche von LTBP4 definiert. Um eine größtmögliche Genauigkeit hierfür zu erlangen wurden die Ergebnisse der *in silico*-Analysen zweier verschiedener Programme mit den Ergebnissen einer Literaturrecherche kombiniert. Daraus resultierten L4Prom als potentieller Promotorbereich für LTBP4L und 2Prom bzw. 1Prom für LTBP4S. Das Vorhandensein zweier dualer Promotoren wurde schon von Kantola *et al.* (2010) postuliert. Auch die von dieser Arbeitsgruppe vorhergesagten Promotorbereiche deckten sich im Falle von L4Prom und 1Prom komplett (KANTOLA et al., 2010). 1Prom enthält, im Gegensatz zu den beiden anderen Promotorbereichen keine TATA-Box, was mit Angaben aus der Literatur übereinstimmt (KANTOLA et al., 2010). Es ist wahrscheinlich, dass Enhancer Elemente weiter entfernt vom proximalen Promotor eine signifikante Rolle in der Regulation der LTBP4 Transkription spielen (KANTOLA et al., 2010).

5.1.1 Identifizierung möglicher Transkriptionsfaktoren

Um mögliche Transkriptionsfaktoren für LTBP4 zu finden wurde erneut eine Kombination von Literaturrecherche und *in silico*-Analyse durchgeführt. Dies ergab eine

Vielzahl an putativen Transkriptionsfaktoren aus denen folgende Transkriptionsfaktoren am meisten hervorstachen.

Wichtig zu erwähnen wären z.B. die Smad 2 und 3 Bindungsstellen, die sowohl in der Literatur, als auch in der *in silico*-Analyse gefunden wurden (siehe Anhang) (KANTOLA et al., 2010). In der Literatur wurden Smads Bindungsstellen jedoch ausschließlich in der strangaufwärts Sequenz von LTBP4S postuliert (KANTOLA et al., 2010). Auch das würde darauf hindeuten (wie bei den Ergebnissen mit Sp1), dass LTBP4S unabhängig und durch andere Mechanismen bzw. Transkriptionsfaktoren als LTBP4L reguliert wird. Smad Proteine sind wichtige Regulatoren des TGF- β Signalweges. Smad 2 und 3 sind Rezeptor-regulierende Smads und bilden, nach Aktivierung, einen Komplex mit TGF- β und Smad 4 und transferieren so in den Zellkern (siehe Punkt 1.1.1). Eine Aktivierung von LTBP4 durch Smad 2 und 3 würde eine positive Rückkopplung im TGF- β Signalweg bedeuten. Die Tatsache das Sp1, welches einen Komplex mit R-Smads bildet, LTBP4 basal reguliert verstärkt die Vermutung, das Smad 2 und 3 Transkriptionsfaktoren von LTBP4 sein könnten, noch. So könnte durch die Smad Proteine, bei Bedarf mehr LTBP4 zum Transport von TGF- β aus der Zelle aktiviert werden. Dem entgegen steht die Tatsache, dass LTBP4S vorwiegend in freier Form und nicht im Komplex mit TGF- β sezerniert wird und in der Literatur Smad Bindungsstellen nur für LTBP4S gefunden wurden (siehe Punkt 1.1.1 und Punkt 1.1.3).

Des Weiteren ist eine Verbindung zwischen den LTBP's und den Östrogen Rezeptoren (ER) in Fischen beschrieben. Hierbei handelt es sich jedoch vorwiegend um LTBP 3, das als Zielgen für den ER Transkriptionsfaktor entschlüsselt wurde (ANDERSSON & EGGEN, 2006). Ein Zusammenhang zwischen ER Transkriptionsfaktoren und TGF- β ist jedoch mehrfach dokumentiert worden (ASHCROFT et al., 1997; MATSUDA et al., 2001; VEGETO et al., 2003). Die Computergestützte Suche nach Transkriptionsfaktoren hat ebenso Treffer für ER Bindungsstellen für LTBP4 geliefert (siehe Anhang).

Aber auch für andere Transkriptionsfaktoren wie die GATA Familie, AP-2 oder c-myb wurden Bindungsstellen vorhergesagt und es wäre interessant sie hinsichtlich ihrer Spezifität gegenüber LTBP4 zu testen.

Sowohl die Literaturrecherche, als auch die Computeranalyse ergaben viele mögliche Bindungsstellen für Sp1 bei beiden Isoformen von LTBP4. Darüber hinaus sind Sp1 Transkriptionsfaktoren dafür bekannt die basale Expression von vielen Genen

der Extrazellulären Matrix zu regulieren (KANTOLA et al., 2010). Ferner lässt sich ein direkter Zusammenhang zwischen Sp1 und dem TGF- β Signalweg aufzeigen. Sp1 interagiert mit endogenem Smad 3 und 4 im TGF- β -Rezeptor-Komplex und fungiert so als wichtiger Aktivator für die Transkription TGF- β abhängiger Gene. So ist Sp1 z.B. essentiell nötig für die TG- β induzierte Expression von $\alpha 2(1)$ Kollagen in humanen Mesangialzellen (PONCELET ANNE-CHRISTINE, 2000). Demnach sind sowohl LTBP4 als auch Sp1 wichtige Mediatoren der TGF- β Bioverfügbarkeit. Dieser Zusammenhang lässt auch eine direkte Verbindung zwischen Sp1 und LTBP4 vermuten und könnte als positive Rückkopplung im TG- β Signalweg dienen. Sp1 ist außerdem zuständig für die basale Transkription von Endoglin. Dieses Protein ist eine weitere Komponente des TGF- β Rezeptor-Komplexes und besitzt genau wie LTBP4S einen TATA-losen Promotor (BOTELLA LUISA M., 2000). Aufgrund dessen wurde Sp1 in der vorliegenden Dissertation mit Hilfe von Luciferase Assays auf seine Funktionalität getestet. Mit dieser Methode können nicht nur Aussagen über den Transkriptionsfaktor Sp1 getroffen, sondern auch Rückschlüsse auf die potentiellen Promotorbereiche gezogen werden. Luciferaseassays sind sehr sensitiv und bei verschiedenen Zelllinien durchführbar.

5.1.2 Sp1 als potentieller Transkriptionsfaktor von LTBP4

Die Promotorfragmente, L4Prom 1Prom und 2Prom, wurden, für die Durchführung der Luciferase Assays, in den pGL4.23 Luciferase Reporter Vektor kloniert. Um die Effizienz der Aktivierung von LTBP4 durch potentielle Transkriptionsfaktoren besser beurteilen zu können, wurde das pGL4.23-Promotor Konstrukt zusätzlich noch ohne den Minimalpromotor kloniert. Der Minimalpromotor hat die Aufgabe die Transkription der Luciferase unspezifisch zu verstärken. Wäre die Luciferase-Expression ohne Minimalpromotor genauso hoch wie mit, würde das auf die Spezifität des getesteten Transkriptionsfaktors Sp1 hindeuten. Unterschiedliche Konzentrationen von Sp1 wurden verwendet, um zu überprüfen ob der potentielle Transkriptionsfaktor eine mengenabhängige Expression initiieren kann. Anschließend wurden die pGL4-Promotorkonstrukte zusammen mit dem potentiellen Transkriptionsfaktor Sp1 in die embryonale Nierenzelllinie HEK23 transient transfiziert. Die Methode der transienten Transfektion ist zugleich einfach und schnell und deshalb gut geeignet in Situationen in denen ein funktioneller Effekt von Genen detektiert werden soll. Die hier verwendete Zelllinie HEK293 nimmt Fremd-DNA besonders effizient auf (THOMAS P., 2004).

Außerdem werden, wie von Kantola *et al.* (2010) postuliert, LTBP4S und LTBP4L in der Niere niedrig exprimiert wodurch es möglich ist ohne „Hintergrund“ zu arbeiten. Die Luciferase Assays zeigten eine deutliche Steigerung der LTBP4 Expression mit Minimalpromotor. LTBP4L konnte um ca. das zweifache, LTBP4S um das vier- bis fünffache gesteigert werden. Hierfür waren bei L4Prom Konzentrationen von 20 ng Sp1 nötig während bei 1 Prom und 2 Prom 10 ng Sp1 ausreichten. Eine weitere Steigerung der Sp1 Konzentration ergab keine relevante Erhöhung der Expression. Ohne Minimalpromotor konnte keinerlei Initiation der Expression festgestellt werden. Diese Ergebnisse lassen folgende Schlüsse zu. Zum einen kann postuliert werden, dass Sp1 die Transkription von LTBP4S und LTBP4L mit reguliert. Da es sich bei Sp1 um einen eher unspezifischen Transkriptionsfaktor, der sehr viele verschiedenen Gene in der Zelle reguliert, handelt, wäre es möglich, dass er als Teil eines Aktivator-Komplexes fungiert. Außerdem konnte Sp1 die Transkription des Plasmids ohne Minimalpromotor nicht steigern, was ebenfalls auf seine Unspezifität hindeutet. Abgesehen davon lässt sich noch eine Aussage zu den potentiellen Promotorbereichen treffen. 2Prom wurde so gewählt, dass es den Promotorbereich 1Prom vollständig enthält und darüber hinaus noch ein weiteres potentielles Promotorgebiet mit TATA-Box aufweist. Wäre dieser zusätzliche Bereich der Promotor von LTBP4S so müsste 2Prom die LTBP4 Expression deutlich stärker aktivieren als 1Prom. Da dies jedoch nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass 1Prom, wenn Sp1 ein tatsächlicher Transkriptionsfaktor von LTBP4 ist, der Promotor von LTBP4S sein könnte. Diese Hypothese wird von der Tatsache unterstützt, dass Kantola *et al.*(2010) ebenfalls den Bereich von 1Prom als potentiellen Promotorbereich für LTBP4S postulieren. Eine Aussage über die Funktionalität von L4Prom, ist mit der gewählten Methodik nicht möglich. Dennoch geben die Postulationen von Kantola *et al.* (2010) Grund zu der Annahme, dass L4Prom der Promotor von LTBP4L sein könnte. Eine Ursache für die unterschiedliche Expressionsaktivierung könnte sein, dass Sp1 eher die basale Transkription von LTBP4S reguliert als die von LTBP4L und das andere ubiquitäre Transkriptionsfaktoren für LTBP4L zuständig sein könnten. Es ist essentiell im Folgenden weitere potentielle Transkriptionsfaktoren für LTBP4 zu testen um tiefere Einblicke in die Funktion von LTBP4 zu gewinnen und potentielle Ansatzpunkte für eine Regulation zu erforschen. Hierfür stehen mehrere viel versprechende Faktoren zur Verfügung, die in Kapitel 5.1.1 näher beschrieben sind.

Zusammengefasst konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass LTBP4S und LTBP4L nicht nur von zwei unabhängigen Promotoren exprimiert werden, sondern auch, dass sie höchstwahrscheinlich auch unterschiedlich reguliert werden. Sp1 ist dabei ein potentieller Teil eines Aktivatorkomplexes für die Expression von LTBP4S und hat wahrscheinlich nur einen schwachen bis keinen Einfluss auf die Expression von LTBP4L. Im Vergleich der zwei möglichen Promotorfragmente 2Prom und 1Prom zeigte sich, dass 1Prom als TATA-less Promtor für die Expression von LTBP4S ausreichend ist. Ob L4Prom der Promtor von LTBP4L ist konnte in dieser Arbeit nicht endgültig geklärt werden, wobei es in der Literatur Hinweise gibt, die diese Hypothese unterstützen (KANTOLA et al., 2010). Grundlegend für ein profundes Verständnis der Funktion von LTBP4 ist es, weitere spezifische Transkriptionsfaktoren für dieses Glykoprotein, wie z.B. Smad 2 und 3 oder ER's, zu testen.

5.2 Methylierungsspezifische DNA-Analysen der LTBP4-Promotoren?

Epigenetische Veränderungen bewirken durch posttranskriptionale Regulierung des Genoms eine unterschiedliche phänotypische Ausprägung von Zellen trotz identischer genetischer Information. Sie zeichnen sich weiterhin durch Vererbbarkeit und Reversibilität aus (SHARMA et al., 2010). Am intensivsten erforscht bislang ist der epigenetische Mechanismus der DNA-Mehtylierung von Cytosinbasen. In der physiologischen Zelle liegen die meisten CpG-Dinukleotide methyliert vor, während die CpG-Inseln der Promotorregionen größtenteils nicht methyliert sind um eine aktive Transkription zu ermöglichen. In Tumoren jedoch, sind diese CpG-Inseln in der Promotorregion von Tumorsuppressorgenen methyliert und somit inaktiv. Noch ist nicht hinreichend geklärt, ob die Hypermethylierung der Promotorregion zu den tumorinitierenden Prozessen gezählt werden kann, oder ob die Methylierung ein sekundäres Event darstellt. Es ist jedoch anzunehmen, dass Promotormethylierung direkt zur Karzinogenese beiträgt, da sie schon sehr früh in der Tumorentstehung nachzuweisen ist und von einigen Autoren als ein entscheidender Schritt in der Tumorentwicklung bezeichnet wird (JONES & BAYLIN, 2002; SHARMA et al., 2010).

LTBP4 ist ein potentielles Tumorsuppressorgen und in epithelialen Tumoren vermindert exprimiert (STERNER-KOCK et al., 2002; KOLI et al., 2004; MAUEL et al., 2007; FORSTI et al., 2010; KRETSCHMER et al., 2011). LTBP4 hypomorphe Mäuse zeigen z.B. mit ca. 12 bis 14 Wochen rektale Adenome aus denen sich rektale Adeno-

karzinome entwickeln (STERNER-KOCK et al., 2002). Kolonkarzinome gehören zu den Tumoren mit der höchsten CpG-Insel Hypermethylierungsrate was eine direkte Verbindung zwischen LTBP4 und Methylierung aufzeigt (EHRlich, 2002). So zeigen 70-80 % der kolorektalen Tumore erhöhte Promotormethylierung bestimmter Gene, weshalb davon gesprochen werden kann, dass Hypermethylierung ein generelles Phänomen dieser Tumoren ist (OSTER et al., 2011). LTBP4 wird auch mit anderen epithelialen Neoplasien in Verbindung gebracht wie z.B. Mammakarzinomen (MAUEL et al., 2007; KRETSCHMER et al., 2011). Brusttumoren werden ebenfalls in vielen Fällen durch Promotorhypermethylierung reguliert (siehe Punkt 1.2.4.1.2). Noch ist unklar, ob der Zusammenhang zwischen LTBP4 und der Karzinogenese unabhängig ist von der Rolle von LTBP4 als Modulator der TGF- β Bioverfügbarkeit. Die Tatsache, dass LTBP4 eine Isoform besitzt die unfähig ist TGF- β zu binden, deutet jedoch stark auf eine TGF- β unabhängige Funktion hin (KOLI et al., 2004; KANTOLA et al., 2010). Zusätzlich wird LTBP4S vorwiegend in freier Form, also nicht im Komplex mit TGF- β sezerniert was ebenfalls auf eine von TGF- β autonome Rolle hinweisen könnte (KANTOLA et al., 2010). Auch wird dem Glykoprotein eine autonome Funktion im Aufbau elastischer Fasern zugesprochen und es ist essentiell für die Entwicklung der viszeralen Organe, inklusive Lunge, Darm und Urogenitaltrakt (STERNER-KOCK et al., 2002; KANTOLA AK, 2008; DABOVIC B, 2009; URBAN et al., 2009; KRETSCHMER et al., 2011). Ein LTBP4-Rezeptor an den das Gen binden kann um direkt mit Zielzellen zu interagieren ist bislang jedoch nicht identifiziert worden (MAUEL et al., 2007). LTBP4 ist auf Chromosom 19 lokalisiert, welches die höchste Gendichte aller humaner Chromosomen, große gebündelte Genfamilien und einen hohen GC-Gehalt besitzt. Dies lässt den Schluss auf eine erhebliche biologische und evolutionäre Signifikanz zu (GRIMWOOD J, 2004). Des Weiteren ist ein sehr hoher GC-Gehalt Voraussetzung für ein Vorhandensein von CpG-Inseln (BERG et al., 2010).

Als Hypothese wurde in dieser Arbeit deshalb davon ausgegangen, dass der Promotor von LTBP4 durch Hypermethylierung in epithelialen Tumoren herunterreguliert wird. Um die These zu überprüfen wurden die gewählten Zelllinien mit dem Demethylierungsreagenz 5'-Aza-2'-deoxycytidin behandelt und anschließend die Expression von LTBP4 mittels quantitativer real time RT-PCR überprüft. Um die gewonnenen Ergebnisse weiter zu untermauern wurden Methylierungsanalysen mit Hilfe der Bisul-

fitreaktion vorgenommen. Bislang gibt es noch keine Untersuchungen über den Methylierungsstatus des LTBP4 Promotors. Daher boten die experimentellen Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit die Möglichkeit völlig neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet zu gewinnen.

5.2.1 Analyse der Expressionsmuster von LTBP4 in verschiedenen epithelialen Tumor-Zelllinien

Die Untersuchungen auf molekularbiologischer und proteinbiochemischer Ebene wurden in dieser Arbeit ausschließlich *in vitro* an Zelllinien vorgenommen. Permanente Zelllinien stellen als homogene Zellpopulation mit homogenem genetischem Pool ein ideales Medium für explizite Aussagen über Genexpressionsprofile dar. Neoplasien weisen jedoch meist, ein sehr heterogenes Zellbild auf weshalb die Ergebnisse nicht das komplexe Zusammenspiel diverser Zellpopulationen im biologischen Organismus widerspiegeln und deshalb nur Modellcharakter besitzen. Folglich ist es unabdingbar die Ergebnisse im weiteren *in vivo* zu verifizieren. Es kamen folgende Zelllinien zur Anwendung: Die embryonale Nierenzelllinie HEK293, die Brustkarzinomzelllinie MCF7, die Prostatakarzinomzelllinie PC3 und die beiden Kolonkarzinomzelllinien CaCo2 und DLD1. Die HEK293 Zellen dienten der Kontrolle der Ergebnisse an physiologischen Zellen. Zusätzlich wurden zwei Kolontumorlinien unterschiedlicher Malignität gewählt um den Methylierungsstatus von LTBP4 zu überprüfen, da eine Hypermethylierung in Kolontumoren am wahrscheinlichsten ist (EHRlich, 2002). Die Prostata- und Mammatumorzelllinien sollen einen Überblick über die Methylierungssituation in unterschiedlichen epithelialen Tumorarten geben. In der Literatur ist eine verminderte Expression von LTBP4 in Mammatumoren beschrieben, was den Ergebnissen der real-time RT-PCR widerspricht (MAUEL et al., 2007; KRETSCHMER et al., 2011). Aufgrund dessen wurden zur Verifizierung der Methylierungsanalysen zwei weitere Zelllinien hinzugenommen: Die Brustzelllinie Hs578Bst und die Brustkarzinomzelllinie Hs578T. Beide Zelllinien werden für LTBP4 *in vivo* Tumorstudien in der Literatur beschrieben (MAUEL et al., 2007; KANTOLA et al., 2010). Sie stammen vom gleichen Patienten und bieten daher die Möglichkeit einen Vergleich zwischen malignen und benignen Zellen herzustellen.

In experimentellen Vorversuchen wurden die Zellen mit dem Demethylierungsreagenz 5'-Aza-2'-deoxycytidin behandelt. Aufgrund der Tatsache, dass dieses Chemotherapeutikum zytotoxische Nebenwirkungen besitzt, wurde die Vitalität der

behandelten Zellen mittels Western Blot überprüft um einen Apoptose-bedingten LTBP4 Anstieg ausschließen zu können. Der verwendete Antikörper PCNA ist hierfür besonders gut geeignet, da das Ringklemmprotein in geschädigten Zellen durch p53 inaktiviert wird wodurch die Replikation umgehend stoppt. In Punkt 4.2.1 ist deutlich zu sehen, dass die steigenden 5'-Aza-2'-deoxycytidin Konzentrationen keinen Einfluss auf die Expression von PCNA haben, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Vitalität der Zellen nicht maßgeblich durch die Behandlung mit dem Demethylierungsreagenz gestört ist.

Aus den behandelten Zellen wurde die RNA isoliert, die im Folgenden in cDNA umgewandelt wurde um die LTBP4 Expression semiquantitativ mittels PCR zu überprüfen. RNA ist eine besonders labile Molekülmasse, da sie durch ubiquitär vorkommende Nukleasen der ständigen Gefahr einer Degradierung ausgesetzt ist (BECKER C, 2009). Deshalb ist es essentiell bei der Arbeit mit RNA besondere Vorsichtsmaßnahmen zu ergreifen und Kontrollschritte einzubauen. In dieser Arbeit wurde die Qualität und Konzentration der isolierten RNA mit Hilfe einer RNA Elektrophorese überprüft und zusätzlich wurde die Konzentration als interne Kontrolle photometrisch bestimmt. Die Kapillar-Elektrophorese ist hervorragend geeignet um die Integrität und Quantität der RNA zu bestimmen indem die einzelnen Fraktionen der RNA der Größe nach aufgetrennt und visualisiert werden (BECKER C, 2009). Das verwendete Experiment-System (Biorad) generiert zusätzlich einen Zahlenwert (1-10) zur besseren Einstufung der RNA Integrität. Ein Wert von 10 repräsentiert dabei intakte, nicht degradierte und nicht fragmentierte RNA sehr hoher Qualität (SCHROEDER A, 2006). Für sämtliche Versuche dieser Doktorarbeit wurde deshalb ausschließlich RNA mit einem Wert von 9 oder 10 verwendet.

Die semiquantitative Analyse der LTBP4 Expression in HEK293 und MCF7 Zellen, ergab, im Falle der Brusttumorzellen (MCF7), eine deutliche Steigerung der Expression von LTBP4L und LTBP4S mit zunehmender 5'-Aza-2'-deoxycytidin Konzentration. Im Falle der HEK293 Zellen blieb die Expression gleich. LTBP4 ist in Mammakarzinomen herunterreguliert und eine Erhöhung der Expression nach Behandlung mit dem Demethylierungsreagenz deutet sehr stark auf eine potentielle Promotorhypermethylierung bei MCF7 Zellen hin (MAUEL et al., 2007; KRETSCHMER et al., 2011). In embryonalen Nierenzellen (HEK23) ist die Expression von LTBP4 nicht verändert und das 5'-Aza-2'-deoxycytidin bewirkt folglich keine Steigerung der Expression.

Insgesamt lassen die Ergebnisse der semiquantitativen Expressionsanalyse eine Regulierung von LTBP4 in epithelialen Tumoren durch Promotorhypermethylierung vermuten.

Im Anschluss daran wurden die erhaltenen Ergebnisse in einer real time RT-PCR an allen verwendeten Zelllinien überprüft. Die real time RT-PCR wurde in den vergangenen Jahren als *state of the art* Verfahren für die Erstellung von Expressionsprofilen einzelner Gene etabliert. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist, dass parallel zu einer relativen Quantifizierung auch ein qualitativer Nachweis spezifischer Zielgene erbracht werden kann. Aufgrund dieser Vorteile wurde die real time RT-PCR in der vorliegenden Arbeit zur Erstellung der LTBP4 Expressionsprofile gewählt. Zur Normalisierung der Daten aus diesen Experimenten wurden die Expressionsraten von Referenzgenen in die Auswertung einbezogen (siehe Punkt 4.2.3). Zahlreiche Untersuchungen haben ergeben, dass kein Gen als universell einsetzbares Referenzgen geeignet ist. Deshalb wurden zwei, in Vorversuchen experimentell ermittelte Referenzgene, angewendet, deren Expression in den verwendeten Zelllinien gleich bleibend stabil ist. Die statistische Auswertung der relativen Expression von LTBP4L und LTBP4S ergab für keine der getesteten Zelllinien ein signifikantes Ergebnis. Zusätzlich konnten, trotz vier- bis sechsfachen Wiederholungen, wegen einer großen Streuung der Resultate auch keine einheitlichen Tendenzen festgestellt werden. Diese Ergebnisse würden darauf hindeuten, dass Promotorhypermethylierung im Falle von LTBP4 in epithelialen Tumoren keine Rolle spielt und stehen im Kontrast zu den Resultaten der semiquantitativen Analysen. Diese gegensätzlichen Ergebnisse lassen mehrere Vermutungen zu. Zum einen könnte es sein, dass eine sehr viel größere Stichprobenzahl bei der Ermittlung der LTBP4 Expression mittels real time RT-PCR nötig ist um eine einheitliche Tendenz oder gar Signifikanz zu erzielen. Des weiteren wäre es möglich, dass die zytotoxischen Effekte von 5'-Aza-2'-deoxycytidin die Zellen doch stärker schädigen als angenommen und einen Anstieg der LTBP4 Expression bei behandelten Zellen so kaschieren. Dem Entgegen stehen jedoch die Ergebnisse des Western Blots und die semiquantitativen Resultate. Durch das Chemotherapeutikum wird der Methylierungsstatus sämtlicher Gene verändert, wodurch eine Auswertung der Ergebnisse bezüglich LTBP4 erschwert wird, vor allem wenn unter Umständen auch eine Inaktivierung von LTBP4 durch verschiedene Prozesse denkbar ist. Möglich wäre auch, dass die Expression von LTBP4 durch ein bislang unbe-

kanntes Gen gesteuert wird, welches in Tumoren durch Methylierung herunterreguliert ist. Dennoch müsste sich dadurch ebenfalls eine Steigerung in der quantitativen Analyse ergeben. Strangabwärts-Effekte der Gene laufen in physiologischen und karzinogenen Prozessen langsam und progressiv ab. Es wäre deshalb auch durchaus angängig, dass eine Regulation auf Gen- und Proteinebene ein größeres kinetisches Zeitfenster benötigt, als in der vorliegenden Studie methodisch berücksichtigt.

5.2.2 Wird LTBP4 in epithelialen Tumoren durch Promotorhypermethylierung herunterreguliert?

Um Aufschluss über den Methylierungsstatus des LTBP4 Promotors zu bekommen wurden im weiteren Methylierungsanalysen mit Hilfe der Bisulfitreaktion und anschließender methylierungsspezifischer PCR (MSP) durchgeführt. Auf eine Erhöhung der Stichprobenzahl bei der quantitativen RT-PCR wurde verzichtet, da unkalkulierbare Nebenwirkungen von 5'-Aza-2'-deoxycytidin nicht ausgeschlossen werden konnten. Die Methode der Bisulfitreaktion bietet eine hocheffiziente Konvertierung und Aufreinigung der DNA und die Analyse mittels MSP ist eine relativ kostengünstige und sichere Methode zur Untersuchung von CpG-Inseln (SCHOCK G, 2006). Eine Stichprobenmenge von 15-20 Klonen pro CpG-Insel und pro untersuchte Zelllinie garantiert eine große Aussagekraft der Ergebnisse. In dieser Arbeit wurden die CpG-Inseln 25 und 34 auf Methylierung überprüft. Weitere in LTBP4 vorhandene CpG-Inseln wurden nicht überprüft, da sie nicht in bzw. in der Nähe des potentiellen Promotorbereichs liegen oder, aufgrund ihrer Größe, nicht für eine Bisulfitanalyse in Frage kamen. Damit ist die Wahrscheinlichkeit, dass sie zur Regulation der Genexpression durch Methylierung beitragen könnten gering. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass eine vom Promotorbereich entfernt liegende und damit nicht getestete CpG-Insel essentiell ist für die Regulation der LTBP4 Expression. CpG 34 liegt vollständig im potentiellen Promotorbereich 2Prom sowie zu 65 % in 1Prom und ist damit ein idealer Kandidat zur Regulation durch Methylierung. CpG 25 liegt etwas weiter strangaufwärts des Transkriptionsstartpunktes und überschneidet sich marginal mit 2Prom.

Die CpG-Insel 25 ist in den Zelllinien HEK293, MCF7, PC3, Hs578T und HS578Bst nicht methyliert während die Zelllinien DLD1 und CaCo2 eine schwache Methylierung erkennen lassen. Dies könnte bedeuten, dass die CpG-Insel 25 in Kolontumoren einen Einfluss auf die Expressionsregulation haben könnte. In der CpG-Insel 34 lagen die Linien MCF7, DLD1, Hs578T und Hs578Bst schwach methyliert, die Zelllinien

HEK293, PC3 und CaCo2 stark methyliert vor. Studien am Epstein-Barr Virus haben ergeben, dass die Methylierung einer oder zweier CpG-Dinukleotide in einer CpG-Insel ausreichend ist für eine Inaktivierung des Promotors. In Experimenten mit Episomen konnte gezeigt werden, dass die Methylierung von nur 7 % der CpG-Dinukleotiden in einer CpG-Insel die Transkriptionsaktivierung effektiv unterdrücken kann (JONES, 1999). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das LTBP4 Gen in Kolon- und Prostatakarzinomen durch Promotorhypermethylierung inaktiviert sein könnte. Auch in Brustkarzinomen könnte die Methylierung eine Ursache für die Herunterregulierung von LTBP4 sein. Die Zelllinien HEK293 und Hs578Bst sollten als physiologische Brust- bzw. Nierenzellen eigentlich nicht methyliert vorliegen. Die Tatsache, dass sie sich in CpG-Insel 34 schwach bzw., im Falle der HEK293 Zellen stark methyliert darstellen könnte damit erklärt werden, dass permanente Zelllinien nach einigen Passagen immer bis zu einem gewissen Grade transformiert vorliegen. Daher sollte der Methylierungsstatus des LTBP4 Promotors *in vivo* an verschiedenen physiologischen und tumorösen Geweben untersucht werden um Aufschluss über die Methylierung zu erlangen. Weiterhin wäre es interessant zusätzliche epigenetische Mechanismen, wie z.B. kovalente Histonmodifikationen auf ihren Einfluss auf die LTBP4 Regulation in Tumoren zu testen, da die Tumorentstehung oft durch mehrere unterschiedliche Effekte bedingt ist.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Methylierungsanalyse die Ergebnisse der real-time RT-PCR nicht bzw. nur z.T. untermauert. Auch die Resultate der experimentellen Voruntersuchungen decken sich nicht vollständig mit denen der Methylierungsanalyse. Eine Ursache für diese Abweichung könnte sein, dass die Ergebnisse der real time RT-PCR durch viele unterschiedliche Faktoren beeinflusst wird und so zu einem ungenauen Ergebnis führen könnte. Ein fehlender Zusammenhang zwischen DNA-Methylierung und Genexpression könnte auch wie folgt erklärt werden.

Die Hypermethylierung von großen Regionen (typischerweise 1-2 Mb) ist ein vielbeobachtetes Phänomen in der Karzinogenese. Diese langen hypermethylierten Regionen können dazu führen, dass Gene die schon durch andere Mechanismen herunterreguliert sind als Nebeneffekt hypermethyliert werden. Dieser, als *long-range* epigenetische Inaktivierung bezeichnete, Mechanismus wird für kolorektale- und Prostata-tumore beschrieben (RODRIGUEZ J, 2006; COOLEN MW, 2010; OSTER et al., 2011). Da nur wenige CpG-Inseln untersucht wurden besteht auch die Möglichkeit,

dass die untersuchten Regionen nicht in die Regulation des Gens eingebunden sind. Alternative Transkriptionsstartpunkte könnten zusätzlich involviert sein. Nicht alle funktionell wichtigen DNA-Methylierungsvorgänge erfolgen in Promotorregionen. Bei dem *CpG-Island shore*-Phänomen z.B. finden die meisten Methylierungsänderungen bis zu 2 kb vom Zielgen entfernt statt (IRIZARRY RA, 2009).

Ob LTBP4 in epithelialen Tumoren durch Promotorhypermethylierung inaktiviert ist, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen. Da die Resultate der vorliegenden Arbeit vollkommen neue Erkenntnisse über die Methylierung des LTBP4 Promotors aufzeigen, ist es nötig diese in weiteren Studien zu verifizieren. Die Ergebnisse dieser Doktorarbeit lassen jedoch den Schluss zu, dass LTBP4 in bestimmten Tumoren durch Methylierung reguliert sein könnte. Fest steht, dass die CpG-Insel 34 in verschiedenen tumorösen Zelllinien in unterschiedlichem Grade Methylierung aufweist. Darüberhinaus liegt CpG 34 direkt im potentiellen Promotorbereich von LTBP4S was eine Beeinflussung der Expression von LTBP4 durch eben diese Hypermethylierung relevant erscheinen lässt. Eine epigenetische Stilllegung der Genexpression von LTBP4 könnte über verminderte TGF- β 1 Level oder über bislang unbekanntem direkten Wege die neoplastische Transformation beeinflussen und daher einen wichtigen Schritt bei der Tumorentstehung darstellen.

5.2.3 Ausblick

In kommenden Studien wäre es demnach anzuraten die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation mit folgenden weiterführenden Untersuchungen zu verifizieren bzw. zu vervollständigen.

Sp1 als Regulator der basalen Expression Teil ist höchstwahrscheinlich nicht alleine für die Transkriptionsaktivierung von LTBP4S zuständig. Deshalb ist eine Analyse weiterer potentieller Transkriptionsfaktoren wie z.B. Smad Proteine oder des Östrogen-Rezeptors (siehe Punkt 5.1.1) mittels Luciferase Assays notwendig um einen vollständigen Einblick in diesen Bereich zu erhalten. Für eine endgültige Klärung der Funktionalität der Promotorbereiche 1Prom und L4Prom ist es notwendig in ausgewählten Zelllinien die Aktivierung der Promotoren durch endogenes LTBP4S bzw. LTBP4L zu überprüfen.

Hinsichtlich der Inaktivierung von LTBP4 in epithelialen Tumoren wäre eine *in vivo* Überprüfung der Ergebnisse an Tumorgewebe von humanen Patienten denkbar. Ein Mausmodell, bei dem LTBP4 selektiv im z.B. Kolon ausgeschaltet ist, würde weitere Erkenntnisse über LTBP4 im Zusammenhang mit der Entstehung von Kolontumoren

liefern. Ebenfalls sinnvoll wäre eine Überprüfung der Ergebnisse der real time RT-PCR mit einer größeren Stichprobenzahl sowie eine Analyse weiterer CpG Inseln von LTBP4 hinsichtlich ihres Methylierungsstatus. Auch die Untersuchung auf eine Regulierung von LTBP4 durch zusätzliche epigenetische Mechanismen ist zu empfehlen.

Ein umfassendes Verständnis der Zusammenhänge und Regulationsmechanismen von LTBP4 in epithelialen Tumoren könnte zu möglichen Ansätzen in der Therapie dieser Krankheiten führen.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Dissertation war es, Dysregulationen von LTBP4 in epithelialen Tumoren, sowie die generelle Regulation von LTBP4 in physiologischen Zellen besser zu verstehen und ursächliche Mechanismen nachzuweisen. Hierfür wurden einerseits die potentiellen Promotorbereiche von LTBP4 sowie der potentielle Transkriptionsfaktor Sp1 auf ihre Funktionalität und Spezifität getestet. Andererseits wurde die Hypothese überprüft, ob LTBP4 in epithelialen Tumoren durch Promotorhypermethylierung inaktiviert ist.

Die Analyse des potentiellen Transkriptionsfaktors Sp1 mit Hilfe von Luciferase Assays ergab, dass er die basale Expression von LTBP4L um das zweifache und die von LTBP4S sogar um das vier- bis fünffache steigert. Wiederholt man die Versuche jedoch ohne den Minimalpromotor des Luciferasevektor so vermag Sp1 die Expression trotz steigender Konzentration nicht zu aktivieren. Daraus lässt sich schließen, dass Sp1 höchstwahrscheinlich für die basale Expression von LTBP4S zuständig ist, aber für sich alleine nicht ausreicht für eine effektive Aktivierung der Transkription. Dies wird unterstützt von der Tatsache, dass Sp1 eine Vielzahl an Genen der ECM basal reguliert. Sp1 könnte als Teil eines möglichen Aktivierungskomplexes an der Expression von LTBP4 beteiligt sein. Solche Komplexe bestehen aus mehreren Proteinen und Transkriptionsfaktoren und spielen z.B. bei Nuklearrezeptor-abhängigen Genen eine Rolle.

Darüber hinaus zeigten die Resultate der Luciferase Assays, wenn Sp1 als tatsächlicher Transkriptionsfaktor betrachtet wird, dass 1Prom der tatsächliche Promotor von LTBP4S ist und L4Prom der Promotor von LTBP4L sein könnte. 2Prom, von dem 1Prom ein Teil ist, aktiviert die LTBP4S Expression genauso stark wie 1Prom. Dies deutet darauf hin, dass die zusätzlich in 2Prom enthaltene TATA-Box kein Bestandteil des Promotors ist. Eine Literaturrecherche bezüglich der LTBP4 Promotoren unterstützt diese These (KANTOLA et al., 2010).

LTBP4, ein potentieller Tumorsuppressor liegt in epithelialen Tumoren vermindert exprimiert vor was durch Promotorhypermethylierung verursacht sein könnte. Die Ergebnisse der semiquantitativen Voruntersuchungen, bei denen sich die LTBP4 Expression durch das Demethylierungsreagenz 5'-Aza-2'-deoxycytidin in MCF7 Zellen steigern ließen bestärken diese Ansicht. Die Resultate der real time RT-PCR bei denen alle getesteten Zelllinien nicht reguliert erschienen standen in starkem Kontrast dazu. Ursächlich für die gegensätzlichen Ergebnisse könnte eine zu geringe Stich-

probenmenge sein. Um Klarheit über den Methylierungsstatus zu gewinnen wurde im Folgenden eine Methylierungsanalyse vorgenommen. Die Analyse der beiden sich im Promotorbereich befindlichen CpG-Inseln (25 und 34) ergab für die CpG-Insel 34 eine schwache bis starke Methylierung in allen Zelllinien. CpG-Insel 25 hingegen war bis auf zwei Ausnahmen deutlich nicht methyliert. Die Methylierung einer CpG-Insel im Promotorbereich reicht aus um für eine Inaktivierung des Gens verantwortlich sein zu können (JONES, 1999). Demnach ist eine Inaktivierung von LTBP4 in epithelialen Tumoren durch Promotorhypermethylierung möglich.

Zukünftig wäre es von Interesse, weitere Transkriptionsfaktoren wie z.B. Smad 2 und 3 in Luciferase Assays zu testen um für LTBP4 spezifische Transkriptionsfaktoren zu entdecken. Außerdem sollten die Ergebnisse der Methylierungsanalysen in *in vivo* Studien verifiziert werden, da *in vitro* Studien nur Modellcharakter besitzen. Auch die Überprüfung ob weitere epigenetische Mechanismen im Zusammenhang mit der Inaktivierung von LTBP4 in Tumoren stehen könnte Gegenstand weiterer Untersuchungen werden. Ein umfassendes Verständnis der Zusammenhänge und Regulationsmechanismen von LTBP4 in epithelialen Tumoren könnte zu möglichen Ansätzen in der Therapie dieser Krankheiten führen.

7 Summary

Mechanistic Analysis of the LTBP4 Dysregulation in Epithelial Tumors

The aim of this study was to gain functional and mechanistical insights into transformational processes of LTBP4 in physiological cells and during cancer development.

Therefore the identified potential LTBP4 promoter regions and the potential transcription factor Sp1 were analyzed for their functionality and specificity.

As a second approach, the DNA methylation status of LTBP4 promotor regions was analyzed, leading to evidence for a putative correlation between reduced LTBP4 expression and DNA methylation status in malignant epithelial cells.

The putative transcription factor Sp1 was analyzed for its potential to activate LTBP4 expression using luciferase assays. Sp1 doubled the LTBP4L expression and activated the LTBP4S expression up to fivefold. Without the minimal promoter of the luciferase-vector Sp1 was, despite higher concentrations, not able to effectively activate the LTBP4 expression. These results indicate a role of Sp1 as a basal activator of the LTBP4 transcription. Sp1 transcription factors are known to regulate the basal expression of many ECM genes. Sp1 could regulate, as part of an activation-complex, the basal transcription of LTBP4. These complexes contain various proteins and transcription factors and regulate for example nuclear receptor-dependent genes.

The results of the luciferase assays revealed also, that, if Sp1 is an actual transcription factor of LTBP4, 1Prom is probably the promoter region from LTBP4S while L4Prom might be the promoter region from LTBP4L. The TATA-box, present in 2Prom is most likely not part of the functional LTBP4S promoter. An *in silico* analysis about this topic verifies this hypothesis (KANTOLA et al., 2010).

LTBP4, a potential tumor suppressor gene, is downregulated in epithelial tumors. This might be caused by hypermethylation of the LTBP4 promotor. MCF7 cells treated with the demethylation agent 5'-Aza-2'-deoxycytidin demonstrated an upregulated expression, which supports this theory. In contrast, there was no significant upregulation found in real time RT-PCR. It is possible that a greater number of repeats is needed to reveal a definite tendency.

To investigate if potentially reduced expression levels of LTBP4 are due to DNA methylation events, methylation assays were performed. Both, CpG-island 25 and 34 are located in the potential promoter region. While CpG-island 34 shows light to heavy methylation in all tested cell lines, CpG-island 25 is not methylated aside from 2 ex-

ceptions. Methylation of one or two target sites is sufficient to strongly suppress the activity of a promoter (JONES, 1999). Therefore, an inactivation of LTBP4 in epithelial tumors due to promoter hypermethylation is possible.

Further investigations should concentrate on revealing more potential transcription factors for LTBP4, like Smad 2 or 3 in luciferase assays. *In vitro* studies only have model character, while *in vivo* studies could verify the results of the methylation analyses. To determine whether other epigenetic mechanism could be linked to the inactivation of LTBP4 in tumors could also be an interesting opportunity for the future.

A profound understanding of the LTBP4 regulatory mechanisms in epithelial neoplasms could lead to potential new strategies in tumor therapy.

8 Literaturverzeichnis

- Akhurst RJ DR. TGF-beta signaling in cancer-A double-edged sword. *Trends Cell Biol* 2001; 11: S44-S51.
- Ali M. MM, Booth A., Parry D.A., Jain P., Riazuddin S.A., Hejtmancik J.F., Khan S.N., Firasat S., Shires M. Null mutations in LTBP2 cause primary congenital glaucoma. *Am. J. Hum. Genet.* 2009;84:664–671. 2009;
- Andersson ML, Eggen RI. Transcription of the fish Latent TGFbeta-binding protein gene is controlled by estrogen receptor alpha. *Toxicol In Vitro* 2006; 20: 417-25.
- Antequera F, Bird A. CpG islands. *EXS* 1993; 64: 169-85.
- Ashcroft GS, Dodsworth J, van Boxtel E, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, Ferguson MW. Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF-beta1 levels. *Nat Med* 1997; 3: 1209-15.
- Bachman KE, Rountree MR, Baylin SB. Dnmt3a and Dnmt3b are transcriptional repressors that exhibit unique localization properties to heterochromatin. *J Biol Chem* 2001; 276: 32282-7.
- Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 687-92.
- Baylin SB, Ohm JE. Epigenetic gene silencing in cancer - a mechanism for early oncogenic pathway addiction? *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 107-16.
- Becker C RI, Pfaffl MW. . RNA-Qualitätskontrolle in der Genexpressionsanalytik. *BIOSpektrum* 2009;
- Berg M, Agesen TH, Thiis-Evensen E, Merok MA, Teixeira MR, Vatn MH, Nesbakken A, Skotheim RI, Lothe RA. Distinct high resolution genome profiles of early onset and late onset colorectal cancer integrated with gene expression data identify candidate susceptibility loci. *Mol Cancer* 2010; 9: 100.
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. The mammalian epigenome. *Cell* 2007; 128: 669-81.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 2002; 16: 6-21.
- Bock C, S. Reither, T. Mikeska, M. Paulsen, J. Walter and T. Lengauer. BiQ Analyzer: visualization and quality control for DNA methylation data from bisulfite sequencing. *Bioinformatics* 2005; 21(): 4067-8.
- Botella Luisa M. S-ET, Rius Carlos, Corbi´ Angel, and Bernabéu Carmelo. Identification of a Critical Sp1 Site within the Endoglin Promoter and Its Involvement in the Transforming Growth Factor-Stimulation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 2000; Vol. 276, No. 37: pp. 34486–94.
- Braiteh OS, Garcia-Manero, Hong, Johnson, De Padua Silva, Yang,Alexander, Wolff,Kurzrock. Phase I study of epigenetic modulation with 5-azacytidine and valproic acid in patients with advanced cancers. *Clin Cancer Res.* 2008; 2008 October 1
- Burgers WA, Fuks F, Kouzarides T. DNA methyltransferases get connected to chromatin. *Trends Genet* 2002; 18: 275-7.
- Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 1981; 112: 195-203.

- Butte AJ DV, Glueck SB. Further defining housekeeping, or "maintenance," genes Focus on "A compendium of gene expression in normal human tissues". *Physiol Genomics*. 2001; Dec 21: 7(2):95-6.
- Cartharius K, Frech K, Grote K, Klocke B, Haltmeier M, Klingenhoff A, Frisch M, Bayerlein M, Werner T. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* 2005; 21: 2933-42.
- Cedar H, Bergman Y. Linking DNA methylation and histone modification: patterns and paradigms. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 295-304.
- Chaudhry A OK, Gobl A, Heldin CH, Funa K. Expression of transforming growth factors beta 1, beta 2, beta 3 in neuroendocrine tumors of the digestive system. *Anticancer Res*; 14:2085-91 1994;
- Chiang PK, Gordon RK, Tal J, Zeng GC, Doctor BP, Pardhasaradhi K, McCann PP. S-Adenosylmethionine and methylation. *FASEB J* 1996; 10: 471-80.
- Chung D. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* 119:854-65 2000;
- Cihák A. Biological effects of 5-azacytidine in eukaryotes. *Oncology* 1974: 30(5):405-22.
- Contag CH BM. Advances in in vivo bioluminescence imaging of gene expression. *Annu Rev Biomed Eng*. 2002: 4:235-60.
- Coolen MW SC, Song JZ, Statham AL, Kassir Z, Moreno CS, Young AN, Varma V, Speed TP, Cowley M, Lacaze P, Kaplan W, Robinson MD, Clark SJ. Consolidation of the cancer genome into domains of repressive chromatin by long-range epigenetic silencing (LRES) reduces transcriptional plasticity. *Nat Cell Biol*. 2010; 2010 March: 12(3):235-46.
- Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, Wright FA, Feramisco JD, Peltomaki P, Lang JC, Schuller DE, Yu L, Bloomfield CD, Caligiuri MA, Yates A, Nishikawa R, Su Huang H, Petrelli NJ, Zhang X, O'Dorisio MS, Held WA, Cavenee WK, Plass C. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet* 2000; 24: 132-8.
- Coucke P.J WA, Wessels M.W, Callewaert B, Zoppi N, De Backer J, Fox J.E, Mancini G.M, Kambouris M, Gardella R, et al. Mutations in the facilitative glucose transporter GLUT10 alter angiogenesis and cause arterial tortuosity syndrome. *Nat. Genet*. 38: 452-457 2006;
- Csankovszki G, Nagy A, Jaenisch R. Synergism of Xist RNA, DNA methylation, and histone hypoacetylation in maintaining X chromosome inactivation. *J Cell Biol* 2001; 153: 773-84.
- Cui H, Cruz-Correa M, Giardiello FM, Hutcheon DF, Kafonek DR, Brandenburg S, Wu Y, He X, Powe NR, Feinberg AP. Loss of IGF2 imprinting: a potential marker of colorectal cancer risk. *Science* 2003; 299: 1753-5.
- Dabovic B CY, Choi J, Vassallo M, Dietz HC, Ramirez F, von Melchner H, Davis EC, Rifkin DB. Dual functions for LTBP in lung development: LTBP-4 independently modulates elastogenesis and TGF-beta activity. *J Cell Physiol* ; 219:14-22 2009;
- Dabovic B CY, Colarossi C, Obata H, Zambuto L, Perle M.A, Rifkin D.B. Bone abnormalities in latent TGF-(beta) binding protein (Ltbp)-3-null mice indicate a role for Ltbp-3 in modulating TGF-(beta) bioavailability. *Cell Biol.*; 156:227-232 2002a;
- Dallas SL P-SS, Miyazono K, Twardzik D, Mundy GR, Bonewald LF. Characterization and autoregulation of latent transforming growth factor beta (TGF beta) complexes in osteoblast-like cell lines. Production of latent complex lacking the latent TGF beta-binding protein *J Biol Chem* ; 269:6815-21 1994;

- Dietz H.C CGR, Pyeritz R.E, Maslen C.L, Sakai L.Y, Corson G.M, Puffenberger E.G, Hamosh A, Nanthakumar E-J, Curristin S.M et al. . Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature* 352: 337-339 1991;
- Dubois CM LM, Blanchette F, et al. Processing of transforming growth factor β 1 precursor by human furin convertase. . *J Biol Chem* ; 270: 10618–10624. 1995;
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004; 429: 457-63.
- Ehrlich M, Gama-Sosa MA, Huang LH, Midgett RM, Kuo KC, McCune RA, Gehrke C. Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells. *Nucleic Acids Res* 1982; 10: 2709-21.
- Ehrlich M. DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 2002; 21: 5400-13.
- Eisenberg E LE. Human housekeeping genes are compact. *Trends Genet.* 2003 Jul;19: (7):362-5.
- El-Osta A. DNMT cooperativity--the developing links between methylation, chromatin structure and cancer. *Bioessays* 2003; 25: 1071-84.
- Eppert K ea. MADR2 maps to 18q21 and encodes a TGFbeta-regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. . *Cell.* 1996;86:543–552. 1996;
- Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, Trojan J, Vaurs-Barriere C, Bignon YJ, Ramus S, Benitez J, Caldes T, Akiyama Y, Yuasa Y, Launonen V, Canal MJ, Rodriguez R, Capella G, Peinado MA, Borg A, Aaltonen LA, Ponder BA, Baylin SB, Herman JG. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic tumorigenesis. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 3001-7.
- Ettore Appellaa d, Irene T. Weberb and Francesco Blas. Structure and function of epidermal growth factor-like regions in proteins. Laboratory of Cell Biology, National Cancer Institute, Bethesda, MD 20892 1988;
- Fabbri M, Garzon R, Cimmino A, Liu Z, Zanesi N, Callegari E, Liu S, Alder H, Costinean S, Fernandez-Cymering C, Volinia S, Guler G, Morrison CD, Chan KK, Marcucci G, Calin GA, Huebner K, Croce CM. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 15805-10.
- Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 2006; 7: 21-33.
- Feinberg AP. Epigenetics at the epicenter of modern medicine. *JAMA* 2008; 299: 1345-50.
- Flavell RA SS, Wrzesinski SH, et al. The polarization of immune cells in the tumour environment by TGF β . . *Nature Rev Immunol* ; 10: 554–567. 2010;
- Forsti A, Li X, Wagner K, Tavelin B, Enquist K, Palmqvist R, Altieri A, Hallmans G, Hemminki K, Lenner P. Polymorphisms in the transforming growth factor beta 1 pathway in relation to colorectal cancer progression. *Genes Chromosomes Cancer* 2010; 49: 270-81.
- Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Perez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 2005; 37: 391-400.

- Friedman JM, Liang G, Liu CC, Wolff EM, Tsai YC, Ye W, Zhou X, Jones PA. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer Res* 2009; 69: 2623-9.
- Giltay R, Kostka G, Timpl R. Sequence and expression of a novel member (LTBP-4) of the family of latent transforming growth factor-beta binding proteins. *FEBS Lett* 1997; 411: 164-8.
- Gleizes PE, Beavis, R.C., Mazzieri, R., Shen, B., Rifkin, D.B. Identification and characterization of an eight-cystein repeat of the latent transforming growth factor-beta binding protein-1 that mediates bonding to the latent transforming growth factor beta 1. *J Biol Chem* ; 271, 29891-29896 1996;
- Goll MG, Bestor TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 481-514.
- Gowher H, Liebert K, Hermann A, Xu G, Jeltsch A. Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J Biol Chem* 2005; 280: 13341-8.
- Grady WM ea. Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. . *Cancer Res.* 1999;59:320–324. 1999;
- Grady WM MS. GENETIC AND EPIGENETIC ALTERATIONS IN COLON CANCER. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 3:101-28. 2002;
- Greer S HR, Geletu M, Arulanandam R, Raptis L. Housekeeping genes; expression levels may change with density of cultured cells. *J Immunol Methods.* 2010; Apr 15: 355(1-2):76-9.
- Greger V, Passarge E, Hopping W, Messmer E, Horsthemke B. Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Hum Genet* 1989; 83: 155-8.
- Grimwood J GL, Olsen A, Terry A, Schmutz J, Lamerdin J, Hellsten U, Goodstein D, Couronne O, Tran-Gyamfi M, Aerts A, Altherr M, Ashworth L, Bajorek E, Black S, Branscomb E, Caenepeel S, Carrano A, Caoile C, Chan Ym, Christensen M, Cleland CA, Copeland A, Dalin E, Dehal P, Denys M, Detter JC, Escobar J, Flowers D, Fotopulos D, et al. The DNA sequence and biology of human chromosome 19. *Nature*, 428:529-535 2004;
- Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 32-42.
- Hackett BP. Formation and malformation of the vertebrate left-right axis. *Curr. Mol. Med.* 2002; 2,39-66.
- Hahn SA ea. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. . *Science.* 1996;271:350–353. 1996;
- Hanahan D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 1983; 166: 557-80.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 522-31.
- Heinemeyer T, Wingender E, Reuter I, Hermjakob H, Kel AE, Kel OV, Ignatieva EV, Ananko EA, Podkolodnaya OA, Kolpakov FA, Podkolodny NL, Kolchanov NA. Databases on transcriptional regulation: TRANSFAC, TRRD and COMPEL. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 362-7.
- Henriksen R GA, Wilander E, Oberg K, Miyazono K, Funa K. Expression and prognostic significance of TGF-beta isoforms, latent TGF-beta 1 binding protein, TGF-beta type I and type II receptors, and endoglin in normal ovary and ovarian neoplasms. *Lab Invest*; 73:213-20 1995;

- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 2003; 349: 2042-54.
- Herman JG, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Sep 3; 93(18):9821-6.
- Hill C. Nucleocytoplasmic shuttling of Smad proteins. *Cell Res*; 2009; 19: 36–46.
- Hoege C, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S. RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* 2002 Sep 12; 419(6903):135-41.
- Howard G, Eiges R, Gaudet F, Jaenisch R, Eden A. Activation and transposition of endogenous retroviral elements in hypomethylation induced tumors in mice. *Oncogene* 2008; 27: 404-8.
- Ikushima H, Miyazawa M. Cellular context-dependent 'colors' of transforming growth factor- β signaling. *Cancer Sci* ; 101: 306–312. 2010;
- Irizarry RA, Ladd AC, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, Cui H, Gabo K, Rongione M, Webster M, Ji H, Potash JB, Sabunciyan S, Feinberg AP. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet*. 2009; 2009 Feb; 41(2):178-86.
- Isogai Z, Ushiro S, Keene DR, Chen Y, Mazziere R, Charbonneau NL, Reinhardt DP, Rifkin DB, Sakai LY. Latent transforming growth factor beta-binding protein 1 interacts with fibrillin and is a microfibril-associated protein. *J Biol Chem* ; 278:2750-2757 2003;
- Issa JP. CpG-island methylation in aging and cancer. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000; 249: 101-18.
- Itoh S, Miyazawa M. Negative regulation of TGF- β receptor/Smad signal transduction. *Curr Opin Cell Biol* ; 19: 176–184. 2007;
- Janssens K, Miyazawa M, et al. Transforming growth factor- β 1 to the bone. *Endocr Rev* ; 26: 743–774. 2005;
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001; 293: 1074-80.
- Jiang C, Pugh BF. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 161-72.
- Jin C, Felsenfeld G. Nucleosome stability mediated by histone variants H3.3 and H2A.Z. *Genes Dev* 2007; 21: 1519-29.
- Jones PA. The DNA methylation paradox. *Trends Genet* 1999; 15: 34-7.
- Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet* 2002; 3: 415-28.
- Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007; 128: 683-92.
- Kantola AK, Keski-Oja J, Koli K. Induction of human LTBP-3 promoter activity by TGF-beta1 is mediated by Smad3/4 and AP-1 binding elements. *Gene* 2005; 363: 142-50.
- Kantola AK, Ryyanen MJ, Lhota F, Keski-Oja J, Koli K. Independent regulation of short and long forms of latent TGF-beta binding protein (LTBP)-4 in cultured fibroblasts and human tissues. *J Cell Physiol* 2010; 223: 727-36.
- Kantola AK, Keski-Oja J, Koli K. Fibronectin and heparin binding domains of latent TGF-beta binding protein (LTBP)-4 mediate matrix targeting and cell adhesion. *Exp Cell Res* 314: 2488-2500 2008;
- Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res* 2002; 12: 996-1006.
- Keohane AM, O'Neill L P, Belyaev ND, Lavender JS, Turner BM. X-Inactivation and histone H4 acetylation in embryonic stem cells. *Dev Biol* 1996; 180: 618-30.

- Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *The FASEB Journal*, Vol 11, 51-59, Copyright © 1997 by The Federation of American Societies for Experimental Biology 1997;
- Kingsley DM. The TGF- β superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms
Genes and Development 1994;
- Knudson AG. Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 157-62.
- Koli K, Wempe F, Sterner-Kock A, Kantola A, Komor M, Hofmann WK, von Melchner H, Keski-Oja J. Disruption of LTBP-4 function reduces TGF- β activation and enhances BMP-4 signaling in the lung. *J Cell Biol* 2004; 167: 123-33.
- Koli K SJ, Hyytiäinen M, Penttinen C, Keski-Oja J. Latency, activation, and binding proteins of TGF- β . *Microsc. Res. Tech.* 52:354-362 2001a;
- Koli K SJ, Kärkkäinen M, Keski-Oja J. Novel non-TGF- β -binding splice variant of LTBP-4 in human cells and tissues provides means to decrease TGF- β deposition. *J Cell Sci* 114: 2869-2878 2001b;
- Koski C SJ, Keski-Oja J. Independent promoters regulate the expression of two amino terminally distinct forms of latent transforming growth factor- β binding protein-1 (LTBP-1) in a cell type-specific manner. *J Biol Chem* ; 274:32619-30 1999;
- Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128: 693-705.
- Kretschmer C, Conradi A, Kemmner W, Sterner-Kock A. Latent transforming growth factor binding protein 4 (LTBP4) is downregulated in mouse and human DCIS and mammary carcinomas. *Cell Oncol (Dordr)* 2011;
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- Laird PW, Jaenisch R. The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet* 1996; 30: 441-64.
- Lee B GM, Vitale E, Hori H, Mattei MG, Sarfarazi M, Tsipouras P, Ramirez F, Hollister DW. Linkage of Marfan syndrome and a phenotypically related disorder to two different fibrillin genes. *Nature* 352: 330-334 1991;
- Levy L HC. Alterations in components of the TGF- β superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* ; 17: 41-58. 2006;
- Li LC DR. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics*. 2002; Nov;18: (11):1427-31.
- Liang G, Chan MF, Tomigahara Y, Tsai YC, Gonzales FA, Li E, Laird PW, Jones PA. Cooperativity between DNA methyltransferases in the maintenance methylation of repetitive elements. *Mol Cell Biol* 2002; 22: 480-91.
- Lin JC, Jeong S, Liang G, Takai D, Fatemi M, Tsai YC, Egger G, Gal-Yam EN, Jones PA. Role of nucleosomal occupancy in the epigenetic silencing of the MLH1 CpG island. *Cancer Cell* 2007; 12: 432-44.
- Long C, Yin B, Lu Q, Zhou X, Hu J, Yang Y, Yu F, Yuan Y. Promoter hypermethylation of the RUNX3 gene in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Invest* 2007; 25: 685-90.
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; 435: 834-8.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 1997; 389: 251-60.

- Luo K SS, Wang W, et al. . The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF β signaling. *Genes Dev* ; 13: 2196–2206. 1999;
- Mann HBW, D. R. . On a Test of Whether one of Two Random Variables is Stochastically Larger than the Other. *Annals of Mathematical Statistics* 1947; 18 (1): 50–60.
- Markowitz S RA. Tumor supressor activity of the TGF- β pathway in human cancers. *Cytokine Growth Factor Rev* ; 7: 93-102 1996;
- Markowitz S WJ, Myeroff L, et al. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. . *Science* ; 268: 1336–1338. 1995;
- Massagué J. TGF- β signaling: receptors, transducers, and mad proteins. *Cell* 85:947-50 1996;
- Massagué J. TGF β in Cancer. *Cell* 2008; Jul 25: 134(2):215-30.
- Matsuda T, Yamamoto T, Muraguchi A, Saatcioglu F. Cross-talk between transforming growth factor-beta and estrogen receptor signaling through Smad3. *J Biol Chem* 2001; 276: 42908-14.
- Mauel S, Kruse B, Etschmann B, von der Schulenburg AG, Schaerig M, Stovesand K, Wilcken B, Sterner-Kock A. Latent transforming growth factor binding protein 4 (LTBP-4) is downregulated in human mammary adenocarcinomas in vitro and in vivo. *APMIS* 2007; 115: 687-700.
- Mavrich TN, Ioshikhes IP, Venters BJ, Jiang C, Tomsho LP, Qi J, Schuster SC, Albert I, Pugh BF. A barrier nucleosome model for statistical positioning of nucleosomes throughout the yeast genome. *Genome Res* 2008; 18: 1073-83.
- Meulmeester E, Ten Dijke P. The dynamic roles of TGF-beta in cancer. *J Pathol* 2011; 223: 205-18.
- Mikol YB, Hoover KL, Creasia D, Poirier LA. Hepatocarcinogenesis in rats fed methyl-deficient, amino acid-defined diets. *Carcinogenesis* 1983; 4: 1619-29.
- Miyazono K OA, Colosetti P, Heldin CH. A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *EMBO J.* 1991;10:1091–1101 1991;
- Moren A OA, Stenman G, Sahlin P, Kanzaki T, Claesson-Welsh L, ten Dijke P, Miyazono K, Heldin C.H Identification and characterization of LTBP-2, a novel latent transforming growth factor-beta-binding protein. *J Biol Chem* ; 269:32469-32478 1994;
- Neptune E.R FPA, Arking D.E, Myers L, Bunton T.E, Gayraud B, Ramirez F, Sakai L.Y, Dietz H.C. Dysregulation of TGF-beta activation contributes to pathogenesis in Marfan syndrome. *Nat. Genet.* 33:407-411 2003;
- Noor A. WC, Vitcu I., Orlic M., Rafiq M.A., Khalid M., Malik M.N., Ayub M., Alman B., Vincent J.B. Oligodontia is caused by mutation in LTBP3, the gene encoding latent TGF-beta binding protein 3. *Am. J. Hum. Genet.* 2009;84:519–523. 2009;
- Ogawa O, Eccles MR, Szeto J, McNoe LA, Yun K, Maw MA, Smith PJ, Reeve AE. Relaxation of insulin-like growth factor II gene imprinting implicated in Wilms' tumour. *Nature* 1993; 362: 749-51.
- Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 1999; 99: 247-57.
- Oklu R HR. The latent transforming growth factor beta binding protein (LTBP) family. *Biochem J*; 325 Pt 3:601-10 2000;
- Oster B, Thorsen K, Lamy P, Wojdacz TK, Hansen LL, Birkenkamp-Demtroder K, Sorensen KD, Laurberg S, Orntoft TF, Andersen CL. Identification and valida-

- tion of highly frequent CpG island hypermethylation in colorectal adenomas and carcinomas. *Int J Cancer* 2011;
- Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG, Belinsky SA. Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 2000; 60: 5954-8.
- Penttinen C SJ, Weikkolainen K, Hyytiainen M, Keski-Oja J. Secretion of human latent TGF-beta-binding protein-3 (LTBP-3) is dependent on co-expression of TGF-beta. *J. Cell Sci.* 115:3457-3468 2002;
- Pogribny IP, Beland FA. DNA hypomethylation in the origin and pathogenesis of human diseases. *Cell Mol Life Sci* 2009; 66: 2249-61.
- Poncelet Anne-Christine SHW. Sp1 and Smad Proteins Cooperate to Mediate Transforming Growth Factor-b1-induced $\alpha 2(I)$ Collagen Expression in Human Glomerular Mesangial Cells. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 2000; Vol. 276, No. 10: pp. 6983–92.
- Putnam EA ZH, Ramirez F, Milewicz DM. Fibrillin-2 (FBN2) mutations result in the Marfan-like disorder, congenital contractural arachnodactyly. *Nat. Genet.* 11:456-458 1995;
- Ramirez F RD. Extracellular microfibrils: Contextual platforms for TGF-beta and BMP signaling. *Curr Opin Cell Biol* ; 21:616-622 2009;
- Ren J, Singh BN, Huang Q, Li Z, Gao Y, Mishra P, Hwa YL, Li J, Dowdy SC, Jiang SW. DNA hypermethylation as a chemotherapy target. *Cell Signal* 2011;
- Rhee I, Jair KW, Yen RW, Lengauer C, Herman JG, Kinzler KW, Vogelstein B, Baylin SB, Schuebel KE. CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* 2000; 404: 1003-7.
- Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, Baylin SB, Vogelstein B. DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 2002; 416: 552-6.
- Rifkin DB. Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *J Biol Chem* ; 280: 7409-7412 2005;
- Roberts AB WL. The two faces of transforming growth factor β in carcinogenesis. . *Proc Natl Acad Sci U S A* ; 100: 8621–8623. 2003;
- Rodriguez J FJ, Vendrell E, Risques RA, Fraga MF, Morales C, Moreno V, Esteller M, Capellà G, Ribas M, Peinado MA. Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. *Cancer Res.* 2006; Sep 1: 66(17):8462-9468.
- Roth-Eichhorn S Heitmann B FP, Kubicka S, Trautwein C. Evidence for the decreased expression of the latent TGF-beta binding protein and its splice form in human liver tumours. *Scand J Gastroenterol*; 36:1204-10 2001;
- Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB. DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 2000; 25: 269-77.
- Saharinen J, Taipale J, Monni O, Keski-Oja J. Identification and characterization of a new latent transforming growth factor-beta-binding protein, LTBP-4. *J Biol Chem* 1998; 273: 18459-69.
- Saharinen J HM, Taipale J, Keski-Oja J. Latent transforming growth factor-beta binding proteins (LTBPs)--structural extracellular matrix proteins for targeting TGF-beta action. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999; Jun;10(2):: 99-117.
- Santenard A, Torres-Padilla ME. Epigenetic reprogramming in mammalian reproduction: contribution from histone variants. *Epigenetics* 2009; 4: 80-4.

- Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M, Zimmerman J, Eden E, Yakhini Z, Ben-Shushan E, Reubinoff BE, Bergman Y, Simon I, Cedar H. Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nat Genet* 2007; 39: 232-6.
- Schock G TT, Peist R, Rütjes T, Gildehaus N, Löffert D. Innovation bei Bisulfit-Konvertierung verhindert Fragmentierung der DNA. *BIOspektrum* 2006;
- Schones DE, Cui K, Cuddapah S, Roh TY, Barski A, Wang Z, Wei G, Zhao K. Dynamic regulation of nucleosome positioning in the human genome. *Cell* 2008; 132: 887-98.
- Schroeder A MO, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, Lightfoot S, Menzel W, Granzow M, Ragg T. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006; Jan 31: 7:3.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010; 31: 27-36.
- Shen L, Kondo Y, Guo Y, Zhang J, Zhang L, Ahmed S, Shu J, Chen X, Waterland RA, Issa JP. Genome-wide profiling of DNA methylation reveals a class of normally methylated CpG island promoters. *PLoS Genet* 2007; 3: 2023-36.
- Shi Y MJ. Mechanisms of TGF- β signaling from cell membrane to the nucleus. *Cell* ; 113: 685–700. 2003;
- Shiple J.M MRP, Maus E, Bonadio J, Rosenblom J, McCarthy R.T, Bauiro S.Dmann M.L, Frankfater C, Segade F, Shap. Developmental expression of latent transforming growth factor beta binding protein 2 and its requirement early in mouse development. *Mol. Cell Biol*; 20:4879-4887 2000;
- Shivaswamy S, Bhinge A, Zhao Y, Jones S, Hirst M, Iyer VR. Dynamic remodeling of individual nucleosomes across a eukaryotic genome in response to transcriptional perturbation. *PLoS Biol* 2008; 6: e65.
- Siegel PM MJ. Cytostatic and apoptotic actions of TGF-beta in homeostasis and cancer. *Nature Rev Cancer* 2003;
- Sterner-Kock A, Thorey IS, Koli K, Wempe F, Otte J, Bangsow T, Kuhlmeier K, Kirchner T, Jin S, Keski-Oja J, von Melchner H. Disruption of the gene encoding the latent transforming growth factor-beta binding protein 4 (LTBP-4) causes abnormal lung development, cardiomyopathy, and colorectal cancer. *Genes Dev* 2002; 16: 2264-73.
- .Stroschein SL WW, Zhou S, et al. Negative feedback regulation of TGF- β signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* 1999;
- Suzuki MM, Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat Rev Genet* 2008; 9: 465-76.
- Svotelis A, Gevry N, Gaudreau L. Regulation of gene expression and cellular proliferation by histone H2A.Z. *Biochem Cell Biol* 2009; 87: 179-88.
- Tahiri-Alaoui A, Matsuda D, Xu H, Panagiotis P, Burman L, Lambeth LS, Petherbridge L, James W, Mauro V, Nair V. The 5' leader of the mRNA encoding the marek's disease virus serotype 1 pp14 protein contains an intronic internal ribosome entry site with allosteric properties. *J Virol* 2009; 83: 12769-78.
- Takaku K ea. Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell.* 1998;92:645–656. 1998;
- Tang X, Khuri FR, Lee JJ, Kemp BL, Liu D, Hong WK, Mao L. Hypermethylation of the death-associated protein (DAP) kinase promoter and aggressiveness in stage I non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1511-6.
- ten Dijke P GM, Itoh F, et al. . Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol* ; 191: 1–16. 2002;

- Thomas P. ST. HEK293 cell line: A vehicle for the expression of recombinant proteins. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 2004; 51 (2005): 187–200.
- Tokusumi Y, Ma Y, Song X, Jacobson RH, Takada S. The new core promoter element XCPE1 (X Core Promoter Element 1) directs activator-, mediator-, and TATA-binding protein-dependent but TFIID-independent RNA polymerase II transcription from TATA-less promoters. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 1844-58.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979; 76: 4350-4.
- Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, Maruyama R, Imai K, Shinomura Y, Tokino T. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res* 2008; 68: 4123-32.
- Urban Z, Huchtagowder V, Schurmann N, Todorovic V, Zilberberg L, Choi J, Sens C, Brown CW, Clark RD, Holland KE, Marble M, Sakai LY, Dabovic B, Rifkin DB, Davis EC. Mutations in LTBP4 cause a syndrome of impaired pulmonary, gastrointestinal, genitourinary, musculoskeletal, and dermal development. *Am J Hum Genet* 2009; 85: 593-605.
- Vegeto E, Belcredito S, Etteri S, Ghisletti S, Brusadelli A, Meda C, Krust A, Dupont S, Ciana P, Chambon P, Maggi A. Estrogen receptor-alpha mediates the brain antiinflammatory activity of estradiol. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 9614-9.
- Vehviläinen P HM, Keski-Oja J. Latent transforming growth factor-beta-binding protein 2 is an adhesion protein for melanoma cells. *J Biol Chem.* 2003 2003; Jul 4: 278(27):24705-13.
- Waddington C (1942) The epigenotype. *Endeavour.* 1:18–20.
- Wahl NM-FaS. Transforming growth factor beta: a matter of life and death. *Journal of Leukocyte Biology*, Vol 55, Issue 3 401-409, Copyright © 1994 by Society for Leukocyte Biology 1994;
- Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, Weisenberger DJ, Campan M, Young J, Jacobs I, Laird PW. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet* 2007; 39: 157-8.
- Wilson AS, Power BE, Molloy PL. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1775: 138-62.
- Wolffe AP, Matzke MA. Epigenetics: regulation through repression. *Science* 1999; 286: 481-6.
- Wrana J PT. Signal transduction. Mad about SMADs. *Nature* 388:28-29 1997;
- Wutz A, Jaenisch R. A shift from reversible to irreversible X inactivation is triggered during ES cell differentiation. *Mol Cell* 2000; 5: 695-705.
- Xu GL BT, Bourc'his D, Hsieh CL, Tommerup N, Bugge M, Hulten M, Qu X, Russo JJ, Viegas-Péquignot E. Chromosome instability and immunodeficiency syndrome caused by mutations in a DNA methyltransferase gene. *Nature.* 1999; Nov 11: 402(6758):187-91.
- Yang YA DO, Tang B, et al. Lifetime exposure to a soluble TGF- β antagonist protects mice against metastasis without adverse side effects. *J Clin Invest* ; 109: 1607–1615. 2002;
- Yin W SE, Germiller J, Mecham R.P, Florer J.B, Wenstrup R.J, Bonadio J. Isolation of a novel latent transforming growth factor-beta binding protein gene (LTBP-3). *J Biol Chem* ; 270: 10147-10160 1995;

- Yoo CB, Jones PA. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 2006; 5: 37-50.
- Yoshinaga K, Obata H, Jurukovski V, Mazziere R, Chen Y, Zilberberg L, Huso D, Melamed J, Prijatelj P, Todorovic V, Dabovic B, Rifkin DB. Perturbation of transforming growth factor (TGF)-beta1 association with latent TGF-beta binding protein yields inflammation and tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 18758-63.
- Zhang B, Pan X, Anderson TA. MicroRNA: a new player in stem cells. *J Cell Physiol* 2006; 209: 266-9.
- Zhu Y RJ, Parada LF, Graff JM. . Smad3 mutant mice develop metastatic colorectal cancer. *Cell*. 1998;94:703–714 1998;
- Zilberman D, Coleman-Derr D, Ballinger T, Henikoff S. Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* 2008; 456: 125-9.

Anhang

Die Sequenzierung von 2Prom erfolgte mittels pGL4.23 mit Hilfe der Standard-Primerbindestellen. Im folgenden sind die Sequenzen aufgelistet.

```
2Prom      aagatctACCAGATGGCCTCATCCTCCACTCGGCCCCACCCACCTGAGAGGGGCCACGC
2Prom_Sp6  AAGATCTACCAGATGGCCTCATCCTCCACTCGGCCCCACCCACCTGAGAGGGGCCACGC
2Prom1     -----
2Prom2     -----
2Prom3     -----
2Prom4     -----
2Prom_T7rev -----
```

```
2Prom      GCTGGACACCCCCCTCTCTGCACCCCCCACTGCTCTCCTCTCGGGGTCTGGGCGCGCGC
2Prom_Sp6  GCTGGACACCCCCCTCTCTGCACCCCCCACTGCTCTCCTCTCGGGGTCTGGGCGCGCGC
2Prom1     -----
2Prom2     -----
2Prom3     -----
2Prom4     -----
2Prom_T7rev -----
```

```
2Prom      CCTCGTCTCTAGACCCCCCTTAGCCTGGGGATAATGGACTTGTCTGGGGGGCCCCCTTCATT
2Prom_Sp6  CCTCGTCTCTAGACCCCCCTTAGCCTGGGGATAATGGACTTGTCTGGGGGGCCCCCTTCATT
2Prom1     -----
2Prom2     -----
2Prom3     -----
2Prom4     -----
2Prom_T7rev -----
```

```
2Prom      GCGACGCACTTGAACCGGAGCTGGAAGCTCCGCCACTGAGACCCTCTGGGCTGGGAGATG
2Prom_Sp6  GCGACGCACTTGAACCGGAGCTGGAAGCTCCGCCACTGAGACCCTCTGGGCTGGGAGATG
2Prom1     -----
2Prom2     -----
2Prom3     -----
2Prom4     -----
2Prom_T7rev -----
```

```
2Prom      TCTGCAAGAACGGCACCTTTCTCCTGGTCAGGCGGGAAACTGAGGCCCAAAGACCAAGAA
2Prom_Sp6  TCTGCAAGAACGGCACCTTTCTCCTGGTCAGGCGGGAAACTGAGGCCCAAAGACCAAGAA
2Prom1     -----
2Prom2     -----
2Prom3     -----
2Prom4     -----
2Prom_T7rev -----
```

```
2Prom      ACGCTGGCTTCTGGACACACATCGTGGAAGGGCAAGAACGGGCTAGAACTCAGGCTCTGG
2Prom_Sp6  ACGCTGGCTTCTGGACACACATCGTGGAAGGGCAAGAACGGGCTAGAACTCAGGCTCTGG
2Prom1     -----
2Prom2     -----
2Prom3     -----
2Prom4     -----
2Prom_T7rev -----
```

```
2Prom      GATTCTCAGTCCTGGACTGTGACTCCCCGTTATCCCCCTCCACCTCAGCACCTTGCTGGAC
2Prom_Sp6  GATTCTCAGTCCTGGACTGTGACTCCCCGTTATCCCCCTCCACCTCAGCACCTTGCTGGAC
2Prom1     -----
2Prom2     -----
2Prom3     -----
2Prom4     -----
2Prom_T7rev -----
```

```

2Prom          CCACAGTCAGAGGGAAGAGCCTTCCCTCCCCAGCTGCCGAGGCCTGTGAAAATGGCGCCA
2Prom_Sp6     CCACAGTCAGAGGGAAGAGCCTTCCCTCCCCAGCTGCCGAGGCCTGTGAAAATGGCGCCA
2Prom1        -----
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        -----
2Prom_T7rev   -----

2Prom          CCTGTCGGCCAGGCTCAGGATGGCGTCTGAGTCCCGGACCGGGATGTGCGGGAGGGCGGG
2Prom_Sp6     CCTGTCGGCCAGGCTCAGGATGGCGTCTGAGTCCCGGACCGGGATGTGCGGGAGGGCGGG
2Prom1        -----
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        -----
2Prom_T7rev   -----

2Prom          GTTCTAGATTCCCAGACAGTGCGGGCTTAGAAATGCTCTTAGAAATCGAGTCTTTTGTTT
2Prom_Sp6     GTTCTAGATTCCCAGACAGTGCGGGCTTAGAAATGCTCTTAGAAATCGAGTCTTTTGTTT
2Prom1        -----TCGAGTCTTTTGTTT
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        -----
2Prom_T7rev   -----

2Prom          TTGTTTTTGTTTTTAATCACTTTTAAAAGGCTTTAAAATAACGTATTTTTTCAATAAAA
2Prom_Sp6     TTGTTTTTGTTTTTAATCACTTTTAAAAGGCTTTAAAATAACGTATTTTTTCAATAAAA
2Prom1        TTGTTTTTGTTTTTAATCACTTTTAAAAGGCTTTAAAATAACGTATTTTTTCAATAAAA
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        -----
2Prom_T7rev   -----

2Prom          TCGTACGCCAAAATCTCTTCATAAGACAAAAGTACGGTTTCTGTGCCCTTCAGCCCGAAG
2Prom_Sp6     TCGTACGCCAAAATCTCTTCATAAGACAAAAGTACGGTTTCTGTGCCCTTCAGCCCGAAG
2Prom1        TCGTACGCCAAAATCTCTTCATAAGACAAAAGTACGGTTTCTGTGCCCTTCAGCCCGAAG
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        -----
2Prom_T7rev   -----

2Prom          TCTAAGCCAATTTGCCTCCCATTGTACAGATGGAGAAACTGAGGCGTGGGGAGAAGAACC
2Prom_Sp6     TCTAAGCCAATTTGCCTCCCATTGTACAGATGGAGAAACTGAGGCGTGGGGAGAAGAACC
2Prom1        TCTAAGCCAATTTGCCTCCCATTGTACAGATGGAGAAACTGAGGCGTGGGGAGAAGAACC
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        -----
2Prom_T7rev   -----

2Prom          TCGTTAGTCATATACCTGTTTTCAAGCCCCCTCAGGATGCGTCTTGGTTTCCCCTCCCCGA
2Prom_Sp6     TCGTTAGTCATATACCTGTTTTCAAGCCCCCTCAGGATGCGTCTTGGTTTCCCCTCCCCGA
2Prom1        TCGTTAGTCATATACCTGTTTTCAAGCCCCCTCAGGATGCGTCTTGGTTTCCCCTCCCCGA
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        -----
2Prom_T7rev   -----

2Prom          TTGCCCTCCTTTGCAGAGTTCTGGGGTGTAGGGGCTGAGTGACTTCCACTCCACTATT
2Prom_Sp6     -----
2Prom1        TTGCCCTCCTTTGCAGAGTTCTGGGGTGTAGGGGCTGAGTGACTTCCACTCCACTATT
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        -----
2Prom_T7rev   -----

```

2Prom	TATAGCGTTGCTGTTTGTGCTGCTGCCCCGGGCCAGACGTCTAGGAGGAGCCGCTGCATC
2Prom_Sp6	-----
2Prom1	TATAGCGTTGCTGTTTGTGCTGCTGCCCCGGGCCAGACGTCTAGGAGGAGCCGCTGCATC
2Prom2	-----
2Prom3	-----
2Prom4	-----
2Prom_T7rev	-----
2Prom	CGAGGTGGGTTCTGGAAGATGGAGTATGAGTAGGGGGCAAAGGGAATAGGAGGAGAGGG
2Prom_Sp6	-----
2Prom1	CGAGGTGGGTTCTGGAAGATGGAGTATGAGTAGGGGGCAAAGGGAATAGGAGGAGAGGG
2Prom2	-----
2Prom3	-----
2Prom4	-----
2Prom_T7rev	-----
2Prom	GCAGGGAGCTCCCCATCCCTCCCCTCATCCCAGTGGGAGAGCTGGATGCATTTGGTAGAG
2Prom_Sp6	-----
2Prom1	GCAGGGAGCTCCCCATCCCTCCCCTCATCCCAGTGGGAGAGCTGGATGCATTTGGTAGAG
2Prom2	-----
2Prom3	-----
2Prom4	-----
2Prom_T7rev	-----
2Prom	AAGTACTTGGTCCCCTCCTTCCCCACTTAGTCCCTGGCTGTCTCCGAAGCCTTCTGCAGG
2Prom_Sp6	-----
2Prom1	AAGTACTTGGTCCCCTCCTTCCCCACTTAGTCCCTGGCTGTCTCCGAAGCCTTCTGCAGG
2Prom2	-----
2Prom3	-----
2Prom4	-----
2Prom_T7rev	-----
2Prom	GTCCGAAGCTGCCAGCCCCAAAAGTGTGCAGGCCCCCAGCGGTGCCTGAACCCAGTGCCT
2Prom_Sp6	-----
2Prom1	GTCCGAAGCTGCCAGCCCCAAAAGTGTGCAGGCCCCCAGCGGTGCCTGAACCCAGTGCCT
2Prom2	-----AAGTGTGCAGGCCCCCAGCGGTGCCTGAACCCAGTGCCT
2Prom3	-----
2Prom4	-----
2Prom_T7rev	-----
2Prom	GCAGTGCCAGTCCCAGCCCCAGCGTGAGGAAGAGACAGGTGTCCCTCAACTGGCAGCCA
2Prom_Sp6	-----
2Prom1	GCAGTGCCAGTCCCAGCCCCAGCGTGAGGAAGAGACAGGTGTCCCTCAACTGGCAGCCA
2Prom2	GCAGTGCCAGTCCCAGCCCCAGCGTGAGGAAGAGACAGGTGTCCCTCAACTGGCAGCCA
2Prom3	-----
2Prom4	-----
2Prom_T7rev	-----
2Prom	CTGACGTGAGTGGGCAGTCCCTCCCCTACCAAATCCTCCCTCAGGAACTCCTAGCTTTGC
2Prom_Sp6	-----
2Prom1	CTGACGTGAGTGGGCAGTCCCTCCCCTACCAA _g TCCCTCCCTCAGGAACTCCTAGCTTTGC
2Prom2	CTGACGTGAGTGGGCAGTCCCTCCCCTACCAAGTCCCTCCCTCAGGAACTCCTAGCTTTGC
2Prom3	-----
2Prom4	-----
2Prom_T7rev	-----
2Prom	CCCCGTTTCCGCTCCTCCTCCCTTCCCCTCTCCCTCTCTCTCCCCCTCCCTCCCCGGCT
2Prom_Sp6	-----
2Prom1	CCCCGTTTCCGCTCCTCCTCCCTTCCCCTCTCCCTCTCTCTCTCCCCCTCCCTCCCCGGCT
2Prom2	CCCCGTTTCCGCTCCTCCTCCCTTCCCCTCTCCCTCTCTCTCTCCCCCTCCCTCCCCGGCT
2Prom3	-----
2Prom4	-----
2Prom_T7rev	-----

2Prom	CTTTCTTTTGCTATCAGCCTGTCTGTCCGTTTCTATTTTCATCCCTTGCCTGCCTATCTCA
2Prom_Sp6	-----
2Prom1	CTTTCTTTTGCTATCAGCCTGTCTGTCCGTTTCTATTTTCATCCCTTGCCTGCCTATCTCA
2Prom2	CTTTCTTTTGCTATCAGCCTGTCTGTCCGTTTCTATTTTCATCCCTTGCCTGCCTATCTCA
2Prom3	-----
2Prom4	-----
2Prom_T7rev	-----
2Prom	GGCTCTTCCCATCTCTGCATTATTTCTGTCTCTTTCTGTTTCTTTCTAGTTACCTGTCTC
2Prom_Sp6	-----
2Prom1	GGCTCTTCCCATCTCTGCATTATTTCTGTCTCTTTCTGTTTCTTTCTAGTTACCTGTCTC
2Prom2	GGCTCTTCCCATCTCTGCATTATTTCTGTCTCTTTCTGTTTCTTTCTAGTTACCTGTCTC
2Prom3	-----
2Prom4	-----
2Prom_T7rev	-----
2Prom	TTTTCTCTCTCTCTTTTCTCCCTGTGTCTCACTGCCTGCCTCTATGTCTAAGTCTCTCTG
2Prom_Sp6	-----
2Prom1	TTTTCTCTCTCTCTTTTCTCCCTGTGTCTCACTGCCTGCCTCTATGTCTAAGTCTCTCTG
2Prom2	TTTTCTCTCTCTCTTTTCTCCCTGTGTCTCACTGCCTGCCTCTATGTCTAAGTCTCTCTG
2Prom3	-----
2Prom4	-----
2Prom_T7rev	-----
2Prom	CCCCTTCTCTCTTTTCTCTCCCCCAACCCCATCATCTCTCTTTTCTCTCAGGGTCTTTGTT
2Prom_Sp6	-----
2Prom1	CCCCTTCTCTCTTTTCTCTCCCCCAACCCCATCATCTCTCT-----
2Prom2	CCCCTTCTCTCTTTTCTCTCCCCCAACCCCATCATCTCTCTTTTCTCTCAGGGTCTTTGTT
2Prom3	-----
2Prom4	-----
2Prom_T7rev	-----
2Prom	TCTCTCCCACTAGAGGCCTGGTCCCCATAAAATAGGTGTTGTGGGGGAGGGTTGGGCAGA
2Prom_Sp6	-----
2Prom1	-----
2Prom2	TCTCTCCCACTAGAGGCCTGGTCCCCATAAAATAGGTGTTGTGGGGGAGGGTCGGGCAGA
2Prom3	-----
2Prom4	-----
2Prom_T7rev	-----
2Prom	GCCGCTACTGAAAGACATTTTCTGGCATGGAGGCCCTTTGGTGGGGAGGTCAGTTTAAC
2Prom_Sp6	-----
2Prom1	-----
2Prom2	GCCGCTACTGAAAGACATTTTCTGGCATGGAGGCCCTTTGGTGGGGAGGTCAGTTTAAC
2Prom3	-----
2Prom4	-----
2Prom_T7rev	-----
2Prom	CCGGTGACAGCAGCTTTTCCGTCTCTCCACCCAGGCTCCAGGAGGCCAGAGCTCTACT
2Prom_Sp6	-----
2Prom1	-----
2Prom2	CCGGTGACAGCAGCTTTTCCGTCTCTCCACCCAGGCTCCAGGAGGCCAGAGCTCTACT
2Prom3	-----CCGTCTCTCTCCACCCAGGCTCCAGGAGGCCAGAGCTCTACT
2Prom4	-----
2Prom_T7rev	-----
2Prom	GAAGCGGCGGCGGCCCGGGGGCCAGGGGGCCGGGGACTACTGAGAAGGAGGCCCCCCACA
2Prom_Sp6	-----
2Prom1	-----
2Prom2	GAAGCGGCGGCGGCCCGGGGGCCAGGGGGCCGGGGACTACTGAGAAGGAGGCCCCCCACA
2Prom3	GAAGCGGCGGCGGCCCGGGGGCCAGGGGGCCGGGGACTACTGAGAAGGAGGCCCCCCACA
2Prom4	-----
2Prom_T7rev	-----

```
2Prom      GCGTGCCCCCGCTGGCAAGGCCCCCGGGTAAGCACATCCGCCTTTCTCCTCCGCCTGGGGCGA
2Prom_Sp6  -----
2Prom1     -----
2Prom2     GCGTGCCCCCGCTGGCAAGGCCCCCGGGTAAGCACATCCGCCTTTCTCCTCCGCCTGGGGCGA
2Prom3     GCGTGCCCCCGCTGGCAAGGCCCCCGGGTAAGCACATCCGCCTTTCTCCTCCGCCTGGGGCGA
2Prom4     -----
2Prom_T7rev -----

2Prom      GGGGGGTTCCGGGCCAGATAAAGCCGTCTGGTTCCCACGGTCCAGCCGCCCTACCCGC
2Prom_Sp6  -----
2Prom1     -----
2Prom2     GGGGGGTTCCGGGCCAGATAAAGCCGTCTGGTTCCCACGGTCCAGCCGCCCTACCCGC
2Prom3     GGGGGGTTCCGGGCCAGATAAAGCCGTCTGGTTCCCACGGTCCAGCCGCCCTACCCGC
2Prom4     -----
2Prom_T7rev -----

2Prom      CCCCCGTTGTAGCTCAGCACCCACCCCCAGGACGAGGCCCCCTCTAGGGACCCCAGCGTC
2Prom_Sp6  -----
2Prom1     -----
2Prom2     CCCCCGTTGTAGCTCAGCACCCACCCCCAGGACGAGGCCCCCTCTAGGGACCCCAGCGTC
2Prom3     CCCCCGTTGTAGCTCAGCACCCACCCCCAGGACGAGGCCCCCTCTAGGGACCCCAGCGTC
2Prom4     -----
2Prom_T7rev -----

2Prom      CGGCCGTGCGAGGTGAGCCCGGGACAGGACCAGACACAGGCCAGAGGCACTGACCCGCGG
2Prom_Sp6  -----
2Prom1     -----
2Prom2     CGGCCGTGCGAGGTGAGCCCGGGACAGGACCAGACACAGGC-----
2Prom3     CGGCCGTGCGAGGTGAGCCCGGGACAGGACCAGACACAGGCCAGAGGCACTGACCCGCGG
2Prom4     -----
2Prom_T7rev -----

2Prom      GGGTGGGGCCGGGAAGCCAGGCGTCCGGGCTCCCCGCGGCCGAAGAGGGAGGGCGCTGGC
2Prom_Sp6  -----
2Prom1     -----
2Prom2     -----
2Prom3     GGGTGGGGCCGGGAAGCCAGGCGTCCGGGCTCCCCGCGGCCGAAGAGGGAGGGCGCTGGC
2Prom4     -----AAGCCAGGCGTCCGGGCTCCCCGCGGCCGAAGAGGGAGGGCGCTGGC
2Prom_T7rev -----

2Prom      CCGTTAGAAAGCTCCGCCGAACCAGCCCAGACAACAAAAGCGATTGTGCGGGTTGGCGCC
2Prom_Sp6  -----
2Prom1     -----
2Prom2     -----
2Prom3     CCGTTAGAAAGCTCCGCCGAACCAGCCCAGACAACAAAAGCGATTGTGCGGGTTGGCGCC
2Prom4     CCGTTAGAAAGCTCCGCCGAACCAGCCCAGACAACAAAAGCGATTGTGCGGGTTGGCGCC
2Prom_T7rev -----

2Prom      TGCCTGGGCACCAAATGCTCAAGATTGTGGGGCGGCTGGGGGCCAAAGGCCTCCTCCTGT
2Prom_Sp6  -----
2Prom1     -----
2Prom2     -----
2Prom3     TGCCTGGGCACCAAATGCTCAAG-----
2Prom4     TGCCTGGGCACCAAATGCTCAAGATTGTGGGGCGGCTGGGGGCCAAAGGCCTCCTCCTGT
2Prom_T7rev -----

2Prom      TTCCCGAATCTTCCCCCTGCCCTCCTCCCGCTCCAGCTCTTGACCCCTAGTCTAGAACAC
2Prom_Sp6  -----
2Prom1     -----
2Prom2     -----
2Prom3     -----
2Prom4     TTCCCGAATCTTCCCCCTGCCCTCCTCCCGCTCCAGCTCTTGACCCCTAGTCTAGAACAC
2Prom_T7rev -----
```

```
2Prom          CCCTCATCTCAAACACCCTCAAACCCCTCCTCTTGCTGTAGCCTTCAGCCAGATGTGAC
2Prom_Sp6     -----
2Prom1        -----
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        CCCTCATCTCAAACACCCTCAAACCCCTCCTCTTGCTGTAGCCTTCAGCCAGATGTGAC
2Prom_T7rev   -----

2Prom          CCCTCCCCCTAAAGTCTTCCAGATGTGAGCCTCGGGCCAGATGTTAGTACCCCGCCCAC
2Prom_Sp6     -----
2Prom1        -----
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        CCCTCCCCCTAAAGTCTTCCAGATGTGAGCCTCGGGCCAGATGTTAGTACCCCGCCCAC
2Prom_T7rev   -----

2Prom          AGCCTCCCTTTATCCATTGTGACTTCTCCCGCCAGGTGTGGCGTTCTGGCCAGATGTGGC
2Prom_Sp6     -----
2Prom1        -----
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        AGCCTCCCTTTATCCATTGTGACTTCTCCCGCCAGGTGTGGCGTTCTGGCCAGATGTGGC
2Prom_T7rev   -----

2Prom          TACATCTTCACATGTATCCCCCCCACCTCCAGCCTCCTGCCAGGATCTAGACGCCAAT
2Prom_Sp6     -----
2Prom1        -----
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        TACATCTTCACATGTATCCCCCCCACCTCCAGCCTCCTGCCAGGATCTAGACGCCAAT
2Prom_T7rev   -----

2Prom          TCCTTTATGTGCCAGGTGTAGCGACCCCTTCTCCCATCCCTCAGATGTCCCACCTGGCTG
2Prom_Sp6     -----
2Prom1        -----
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        TCCTTTATGTGCCAGGTGTAGCGACCCCTTCTCCCATCCCTCAGATGTCCCACCTGGCTG
2Prom_T7rev   -----AGGTGTAGCGACCCCTTCTCCCATCCCTCAGATGTCCCACCTGGCTG

2Prom          TCCAGATGTACCATGATAGCCCCCTATCAAGATGAAGCCCTTTCTCTGTGCCCCGGGCA
2Prom_Sp6     -----
2Prom1        -----
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        TCCAGATGTACCATGATAGCCCCCTATCAAGATGAAGCCCTTTCTCTGTGCCCCGGGCA
2Prom_T7rev   TCCAGATGTACCATGATAGCCCCCTATCAAGATGAAGCCCTTTCTCTGTGCCCCGGGCA

2Prom          GAAGAGGATCAACTCTTAGCTGTCTCCCCAAATGTGGCCCCCACTACTCTTAATGGATTT
2Prom_Sp6     -----
2Prom1        -----
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        GAAGAGGATCAACTCTTAGCTGTCTCCCCAAATGTGGCCCCCACTA-----
2Prom_T7rev   GAAGAGGATCAACTCTTAGCTGTCTCCCCAAATGTGGCCCCCACTACTCTTAATGGATTT

2Prom          CCTCTTTATGGATTCAGCTCTGTCTGGGGGAAACCCGCCCGCCCCACCTGTTCCCTTC
2Prom_Sp6     -----
2Prom1        -----
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        -----
2Prom_T7rev   CCTCTTTATGGATTCAGCTCTGTCTGGGGGAAACCCGCCCGCCCCACCTGTTCCCTTC
```

```
2Prom          CCCGCCGCTCCCCTACAGGCCCGGTCCACTTGTGGTGC GCGGATGGGGACAGAGGGGGC
2Prom_Sp6     -----
2Prom1        -----
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        -----
2Prom_T7rev   CCCGCCGCTCCCCTACAGGCCCGGTCCACTTGTGGTGC GCGGATGGGGACAGAGGGGGC

2Prom          GCCCCGCTCACCCCTGCGAGTCTAGCGCCCAGCCTGCGAGCCTCTGGCTAAGCGCCCAGC
2Prom_Sp6     -----
2Prom1        -----
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        -----
2Prom_T7rev   GCCCCGCTCACCCCTGCGAGTCTAGCGCCCAGCCTGCGAGCCTCTGGCTAAGCGCCCAGC

2Prom          CCCACGCGCCCCCGCGCGGCCCGGGGAGGGAGTGGTGAGGAGGGGGGGCCTGAGCGGG
2Prom_Sp6     -----
2Prom1        -----
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        -----
2Prom_T7rev   CCCACGCGCCCCCGCGCGGCCCGGGGAGGGAGTGGTGAGGAGGGGGGGCCTGAGCGGG

2Prom          GGCGCGGGCGACCTCCCCCGCGGGCGGGCGGGCGGGTGC GCGCCGGGCCCTCGGGCGGGC
2Prom_Sp6     -----
2Prom1        -----
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        -----
2Prom_T7rev   GGCGCGGGCGACCTCCCCCGCGGGCGGGCGGGCGGGTGC GCGCCGGGCCCTCGGGCGGGC

2Prom          TGGGGCGGCGGCGCGGCGGAGCGCGGCGCTGCAGCCATGGCGGGCGGCGTGCGGCTGCTC
2Prom_Sp6     -----
2Prom1        -----
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        -----
2Prom_T7rev   TGGGGCGGCGGCGCGGCGGAGCGCGGCGCTGCAGCCATGGCGGGCGGCGTGCGGCTGCTC

2Prom          TGGGTGTCGCTATTGGTGCTGCTGaagcttag
2Prom_Sp6     -----
2Prom1        -----
2Prom2        -----
2Prom3        -----
2Prom4        -----
2Prom_T7rev   TGGGTGTCGCTATTGGTGCTGCTGAAGCTTAG
```

Transkriptionsfaktoren für LTBP4L vorwärts Strang

Name	Strang	Lokalisation (5kb strang-aufwärts)
JCV_repeat_sequenc	-	668,74
JCV_repeat_sequenc	+	906
AP-2	-	693,761,838,913,917
AP-2	+	744,746
GCF	-	823
GCF	+	776
Y	+	810
CTF	+	812
UCE.2	+	816
NFI	-	818
junB-US2	-	819
TTR_inverted_repeat	-	827
Sp1	+	854,906,910,911,
Sp1	-	859,911,913
INF.1	+	891
UCE.2	-	903
KROX24	-	916
KROX24	+	908
T-Ag	+	911
EARLY-SEQ1	-	913
EGR-1	-	916
EGR-2	-	917

Transkriptionsfaktoren für LTBP4L rückwärts Strang

Name	Strang	Lokalisation (1144 bis 894 kb strangaufwärts)
JCV_repeat_sequenc	+	930
AP-2	-	1127, 943, 923
AP-2	+	1135, 1130, 966
GCF	+	932
UCE.2	-	1144, 1025, 903
NF-kB	+	1123
APRT-mouse_US	-	938
Sp1	+	1135, 1027, 969, 931, 930,929, 917, 916
Sp1	-	1140, 1034, 1032, 974, 937, 936, 935, 926
INF.1	+	891
UCE.2	+	1022, 936
KROX24	-	922
KROX24	+	914
T-Ag	-	1102
EARLY-SEQ1	-	937
EGR-1	-	922
EGR-2	-	923

Transkriptionsfaktoren für LTBP4S vorwärts Strang

Name	Strang	Lokalisation (515 bis 765 kb strangaufwärts)
JCV_repeat_sequenc	-	515, 596
JCV_repeat_sequenc	+	753
AP-2	-	540, 608, 685, 760, 764
AP-2	+	591, 593
GCF	-	670
GCF	+	623
Y	+	657
CTF	+	659
UCE.2	+	663
NFI	-	665
junB-US2	-	666
TTR_inverted_repeat	-	674
Sp1	+	701, 753, 757, 758
Sp1	-	706, 758, 760
INF.1	+	738
UCE.2	-	750
KROX24	-	763
KROX24	+	755
T-Ag	+	758
EARLY-SEQ1	-	760
EGR-1	-	763
EGR-2	-	764

Transkriptionsfaktoren für LTBP4S vorwärts Strang

Name	Strang	Lokalisation (1589 bis 1839kb strangaufwärts)
JCV_repeat_sequenc	-	1733
JCV_repeat_sequenc	+	1834
AP-2	-	1751, 1796, 1839
AP-2	+	1726, 1773
GCF	+	1748, 1836
E11aE-A	-	1680
CREB	-	1697
SIF	-	1699
PuF	-	1733
AP-1	-	1787
TTR_inverted_repeat	-	1832
Sp1	+	1740, 1829, 1832, 1833, 1834
Sp1	-	1745, 1834, 1839
UCE.2	-	1753
KROX24	-	1838
KROX24	+	1830
T-Ag	+	1663, 1833
EGR-1	-	1838
EGR-2	-	1839

Transkriptionsfaktoren für LTBP4L vorwärts Strang

Name	Strang	Lokalisation (4614 bis 4864kb strangaufwärts)
JCV_repeat_sequenc	-	
JCV_repeat_sequenc	+	4690
AP-2	-	4772,4774
AP-2	+	4700, 4724, 4839
GCF	-	4786
GCF	+	4783
UCE.2	+	4862
Sp1	+	4699, 4700
Sp1	-	4704, 4705, 4710,4711
KROX24	-	4859
KROX24	+	4851
T-Ag	+	4780
EGR-1	+	4851

Transkriptionsfaktoren für LTBP4L rückwärts Strang

Name	Strang	Lokalisation (4954 to 4704kb strangaufwärts)
JCV_repeat_sequenc	+	4870
AP-2	-	4931, 4872, 4774, 4772
AP-2	+	4951, 4922, 4918, 4854, 4724
GCF	-	4791
GCF	+	4858
UCE.2	+	4944, 4862
Sp1	+	4930, 4927, 4725, 4704
Sp1	-	4935, 4932, 4730, 4711, 4710, 4709
UCE.2	-	4947, 4865
KROX24	-	4908, 4859
KROX24	+	4906, 4851
T-Ag	-	4954, 4710
EARLY-SEQ1	-	4856
EGR-1	-	4914
EGR-1	+	4851

Transkriptionsfaktoren für LTBP4S rückwärts Strang

Name	Strang	Lokalisation (3788 to 3538 kb strangaufwärts)
JCV_repeat_sequenc	+	3566
AP-2	-	3740, 3580
AP-2	+	3718
JCV_repeated_sequenc	-	3678
GCF	+	3714
UCE.2	+	3733
PuF	-	3678

H4TF1	+	3567
UCE.2	-	3719
T-Ag	-	3788

Transkriptionsfaktoren für LTBP4S rückwärts Strang

Name	Strang	Lokalisation (1864 bis 1614 kb strangaufwärts)
JCV_repeat_sequenc	-	1733
AP-2	-	1841, 1839, 1751
AP-2	+	1773
GCF	+	1836, 1748
UCE.2	+	1840
APRT-mouse_US	-	1842
TTR_inverted_repeat	-	1832
Sp1	+	1834, 1832, 1833, 1787
Sp1	-	1841, 1839, 1792
PuF	-	1737
UCE.2	-	1753
KROX24	-	1838
KROX24	+	1830
T-Ag	-	1776
EARLY-SEQ1	-	1841
EGR-1	-	1838
EGR-2	-	1839

Transkriptionsfaktoren für LTBP4S rückwärts Strang

Name	Strang	Lokalisation (1034 bis 784kb strangaufwärts)
JCV_repeat_sequenc	-	1027
AP-2	-	974, 790
AP-2	+	982, 977, 813
GCF	+	
UCE.2	+	869
APRT-mouse_US	-	785
TTR_inverted_repeat	-	
Sp1	+	982, 874, 816
Sp1	-	987, 881, 879, 821, 784
PuF	-	
UCE.2	-	991, 872
KROX24	-	
KROX24	+	
T-Ag	-	1019, 943
EARLY-SEQ1	-	784
HC1	-	1011
NF-kB	+	970

Transkriptionsfaktoren für LTBP4 beide

Name	Strang	Lokalisation (1864 bis 1614 kb strangaufwärts)
ESR-1	-	800–818, 463–481, 520–538, 41–59, 285-303
ESR-1	+	463–481, 561–579, 90 – 108, 41-59
ESR-2	-	800–818, 463–481, 520–538, 41–59, 285-303
ESR-2	+	463–481, 561–579, 90–108, 41-59
MYC	-	371–383, 438–450, 489–501, 412–424, 504-516
MYC	+	271–283, 514–526, 37 – 382, 437–449, 488–500, 401–413, 284–296, 454–466, 525–537, 537–549, 503–515, 536–548, 92-104
Smad 2	-	221–229, 47-55
Smad 2	+	620–628, 262–270, 516–524, 105-113
Smad 3	+	620–628, 262–270, 516–524, 105-113
Smad 3	-	221–229, 47-55

Danksagung

Ganz herzlich möchte ich mich bei Frau Prof. Sterner-Kock für die Bereitstellung des Themas, ihre hilfreichen Anregungen, sowie die vielfältigen Möglichkeiten der wissenschaftlichen Arbeit bedanken, die mir durch eine Beschäftigung an ihrem Institut zuteil wurden. Ihre freundliche und kooperative Art das Institut und ihre Mitarbeiter zu leiten wird mir immer ein Vorbild bleiben.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Herrn Prof. Wolf, der es mir, durch seine Bereitschaft mich als externen Doktorand aufzunehmen, ermöglicht hat meine Arbeit an der Ludwig Maximilians Universität München einzureichen. Dadurch ist es mir möglich an der Universität zu promovieren an der ich sehr gerne studiert habe und darüber hinaus den Titel Dr. *med. vet.* zu tragen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Anne Conradi für die hervorragende Betreuung dieser Arbeit. Ihr Wille zur stetigen Hilfe und Unterstützung sowie ihre außerordentliche Fähigkeit positiv zu denken bleiben mir in herzlicher Erinnerung. Ebenfalls Danke ich ihr sehr für die, nicht immer ganz einfache, Korrektur meiner Schriftstücke.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Gunnar Sander für die Bereitstellung des Experiment Automated Electrophoresis System, die Einarbeitung in die RNA Elektrophorese-Messung, seine Hilfe bei der Durchführung und all die anregenden Gespräche und die nette Gesellschaft.

Ganz besonders bedanke ich mich

- bei Frau Petra Heid für die willkommene und kompetente Unterstützung im Labor
- bei Herrn Marco Hessler und Frau Andrea Elbers für ihre stete Bereitschaft mir tatkräftig zur Seite zu stehen
- dem gesamten Team der Experimentellen Medizin der Uniklinik Köln für eine schöne Zeit, viel Kuchen und eine harmonische Zusammenarbeit

Bei Herrn Dr. Florian Hofmaier bedanke ich mich sehr für seine kritische Durchsicht meiner Arbeit und die zahlreichen rettenden Tipps für das schreiben einer Doktorarbeit. Es war eine Freude mit ihm zusammenzuarbeiten!

Besonders herzlich bedanke ich mich bei meiner Mitdotorandin und Freundin Katharina Dinger, für viele Gespräche, die tolle Zusammenarbeit und ihre stete Bereitschaft zur Hilfe.

Meinen Eltern und meinen Schwestern, die mich seit Beginn des Studiums und während der Doktorarbeit zu jeder Zeit unterstützt und an mich geglaubt haben gilt mein größter Dank.

Erklärungen zur Promotionsordnung (§ 4 Abs. 1 Nr. 2 - 4)

1. Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbstständig angefertigt, mich außer den angegebenen keiner anderen Hilfsmittel bedient und alle Stellen, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen wurden, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

.....
(Unterschrift)

2. Ich erkläre, dass ich die vorliegende Dissertation nicht in gleicher oder annähernd ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt oder noch vorliegen habe.

.....
(Unterschrift)

3a) Ich habe bereits zu einem früheren Zeitpunkt eine Doktorprüfung bestanden/nicht bestanden.

Ort:

Zeitpunkt:

Thema:

.....
(Unterschrift)

3b) Trifft für mich nicht zu, daher entfällt die Frage 3a).

.....
(Unterschrift)

4. Ich habe bereits einmal ein Promotionsgesuch zurückgenommen.

ja/nein

Wenn die Frage mit Ja beantwortet wird, ist anzugeben, wo und wann dies der Fall war und welches Thema bearbeitet wurde.

.....

.....

.....

.....

(Ort, Datum)

(Unterschrift)