

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Sven Mahner

VERLUST DER EXPRESSION VON LDOC1 DURCH
PROMOTORMETHYLIERUNG IN ZERVIX- UND
OVARIALKARZINOMZELLEN

Dissertation

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

vorgelegt von

Marie-Luise Buchholtz
aus Hannover

2015

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München**

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Ioannis Mylonas

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Christian Schindlbeck

Priv. Doz. Dr. Sandra B. Hake

Mitbetreuung durch den promovierten

Mitarbeiter: Dr. rer. nat. Ansgar Brüning

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2015

In Dankbarkeit Dr. rer. nat. Ansgar Brüning, meiner Familie und Matthias Vallbracht

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1 Ziel dieser Studie
- 1.2 Zervixkarzinom und Ovarialkarzinom
 - 1.2.1 Zervixkarzinom
 - 1.2.2 Ovarialkarzinom
- 1.3 Karzinogenese
- 1.4 Leucine zipper downregulated in cancer 1 (LDOC1)
- 1.5 DNA-Methylierung
- 1.6 LDOC1-Promoter

2. Material und Methoden

- 2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien
 - 2.1.1 Geräte
 - 2.1.2 Verbrauchsmaterialien
- 2.2 Chemikalien und Biochemikalien
- 2.3 Verwendete Primer
- 2.4 Verwendete Puffer
- 2.5 Medikamente
- 2.6 Antikörper
 - 2.6.1 Verwendete Antikörper für den Western Blot
 - 2.6.2 Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz
- 2.7 Kommerziell erhältliche Komplettsysteme
- 2.8 Zellkultur und Zelllinien
 - 2.8.1 Verwendete Zelllinien
 - 2.8.2 Zellkultur
 - 2.8.3 Kryokonservierung der Zelllinien
 - 2.8.4 Untersuchung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop
 - 2.8.5 Gewinnung von Gewebeproben
 - 2.8.6 RNA-Präparation und cDNA-Synthese
 - 2.8.7 PCR und PCR-Bedingungen
 - 2.8.8 DNA-Isolierung aus Zellkulturen

- 2.8.9 CpG Bisulfit-Konvertierung der DNA
- 2.8.10 Behandlung der Zervixkarzinom- und Ovarialkarzinomzelllinien mit dem DNMTase Inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidin
- 2.8.11 Transfektion von LDOC1 Expressionsplasmiden
- 2.8.12 Immunoblot nach Laemmli (Western Blot)

3. Ergebnisse

- 3.1 Expression von LDOC1 in Zervixkarzinom- und Ovarialkarzinomzelllinien
- 3.2 Methylierungsanalyse des LDOC1-Promotors von Zervixkarzinom- und Ovarialkarzinomzelllinien
- 3.3 Reexpression von LDOC1 nach Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin
- 3.4 Expression von LDOC1 in Zervixkarzinom-Geweben
- 3.5 Überexpression von LDOC1 induziert Zelltod in Zervixkarzinomzelllinien

4. Diskussion

- 4.1 Ausblick

5. Zusammenfassung

6. Literaturverzeichnis

7. Abkürzungsverzeichnis

8. Abbildungsverzeichnis

9. Tabellenverzeichnis

10. Publikationen

11. Danksagung

1. Einleitung

1.1 Ziel dieser Studie

“One day, we imagine that cancer biology and treatment—at present, a patchwork quilt of cell biology, genetics, histopathology, biochemistry, immunology, and pharmacology—will become a science with a conceptual structure and logical coherence that rivals that of chemistry or physics.”

Hanahan D. and Weinberg RA. (2000) “The hallmarks of cancer.” (Hanahan, D. and R. A. Weinberg 2000. Cell 100(1):57-70)

Sowohl bei der Klassifikation des Zervix- als auch des Ovarialkarzinoms mangelt es an verlässlichen prognostischen Markern in Bezug auf die Progression des Tumors und das Ansprechen auf eine Chemotherapie.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression des Tumorsuppressor-Kandidaten LDOC1 untersucht. Bei LDOC1 handelt es sich um einen Transkriptionsfaktor. Dies ist ein Protein, welches Einfluss auf die Initiierung der Transkription nimmt, indem es an Promotoren der Gene bindet und diese damit sowohl aktivieren als auch reprimieren kann.

Ein Verlust der LDOC1 Expression wurde für verschiedene Tumoren beschrieben, jedoch noch nie an gynäkologischen Tumoren getestet. Bei den hier vorgestellten Arbeiten zeigt sich sowohl in einigen Zervix- als auch Ovarialkarzinomzelllinien ein Verlust der LDOC1-mRNA. Ebenso konnte das Fehlen der LDOC1-mRNA in tumorösen Gewebeproben der Cervix uteri nachgewiesen werden. Um den Mechanismus dieser LDOC1-Ausschaltung zu untersuchen, wurde die Expression und Regulation von LDOC1 auf transkriptioneller, genomischer und epigenomischer Ebene untersucht.

Ziel der Arbeit war somit die Erforschung der zugrunde liegenden Mechanismen der LDOC1-Ausschaltung, die Untersuchung der Funktion des Transkriptionsfaktors sowie die Reexpression des supprimierten Gens. Dies wurde durch Inhibierung eben des Mechanismus, der als ursächlich für die Ausschaltung identifiziert wurde, also der Promotormethylierung, erreicht. Darüber hinaus wurde im Rahmen dieser Arbeit eine quantitative real-time PCR etabliert, die es ermöglichte, mit methylierungsspezifischen Primern das Vorhandensein eines methylierten Promotors zu testen.

Zu Beginn soll ein Überblick über den derzeitigen Stand der Forschung bei dem Zervix- und Ovarialkarzinom gegeben werden, jene beiden Karzinome, an denen die LDOC1 Expression untersucht wurde.

1.2 Zervix- und Ovarialkarzinom

1.2.1 Zervixkarzinom

Das Zervixkarzinom ist der häufigste Tumor des weiblichen Genitalsystems. Im Jahr 2008 starben 275.000 Frauen am Zervixkarzinom, damit zählt der Gebärmutterhalskrebs zu dem viert-häufigsten Krebstod bei Frauen weltweit (Jemal, Bray et al. 2011). Geschätzt eine halbe Million neue Fälle wurden im Jahr 2012 diagnostiziert, das mittlere Alter bei Diagnosestellung betrug dabei 48 Jahre (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cervix.html>; http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). Für das Jahr 2012 wurden in den USA 12.170 neue Fälle von Gebärmutterhalskrebs berichtet (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cervix.html>). Besonders bei afroamerikanischen und hispanischen Frauen zeigte sich eine hohe Inzidenz (9,8 und 11,8 pro 100.000 Frauen im Vergleich zu 8,0 weißen Frauen der Vereinigten Staaten und 7,2 asiatisch-amerikanischen Frauen pro 100.000 Frauen). Dabei ist die Mortalität bei afroamerikanischen Frauen doppelt so hoch wie unter weißen Frauen (4,3 vs. 2,2 Todesfälle pro 100.000 Fälle) (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cervix.html>; June 2013). 87% aller Todesfälle durch das Zervixkarzinom entfallen dabei auf Frauen aus Entwicklungsländern. (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx). Diese Unterschiede spiegeln nicht nur wider, dass verschiedene genetische Faktoren eine Rolle spielen, sondern weisen auch auf einen Mangel an flächendeckenden Screening-Programmen in Entwicklungsländern, eine höhere Exposition gegenüber potenziellen Risikofaktoren, Unterschiede im Lebensstil und in der Ernährung hin (Siegel, Naishadham et al. 2012). Obwohl die Inzidenz des Zervixkarzinoms von 1975 bis 2008 gesunken ist, besteht immer noch der dringende Bedarf an Markern zur Diagnostizierung von Vorstufen maligner Entartungen.

Die Bedeutung der HPV-Infektion im Zusammenhang mit dem Zervixkarzinom wurde vor rund 35 Jahren identifiziert (Schiffman and Wentzensen 2013). Der Medizin-Nobelpreisträger Harald zur Hausen, der durch seine Forschung am humanen Papillomavirus bekannt wurde, beschreibt den Zusammenhang der Virusinfektion und der Entstehung von Krebs wie folgt:

„Today it is well established that this very heterogeneous virus family harbours important human carcinogens, causing not only the vast majority of cervical, but also a substantial proportion of other anogenital and head and neck cancers. In addition, specific types have been linked to certain cutaneous cancers.“ (zur Hausen 2009).

Die sexuell übertragbare Infektion mit dem humanen Papillomavirus ist eine nahezu obligate Bedingung für die Entstehung des Zervixkarzinoms (Schiffman and Wentzensen 2013; Zhang, He et al. 2014). Diese Behauptung konnte mittels epidemiologischer Fallstudien bekräftigt werden, bei denen fast 100% aller Zervixkarzinome HPV-positiv getestet wurden (Saslow, Solomon et al. 2012). Dabei stellen die Persistenz des Virus sowie das Vorliegen von high-risk HPV-Genotypen wichtige Parameter dar.

Gravierenden Einfluss auf die Inzidenz, Mortalität und Morbidität des Zervixkarzinoms haben seit der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts das zytologische Screening (Papanicolaou Test), Krebsfrüherkennungsprogramme sowie der technische Fortschritt und innovative Therapieansätze genommen. Einem Rückgang der Mortalitätsrate in den USA in den letzten Jahren steht eine Zunahme der Detektion von präinvasiven Läsionen gegenüber (Berman 2002). Einzigartig an der Entität des Zervixkarzinoms bleibt der uniforme, kausale Zusammenhang des Gebärmutterhalskrebs mit der HPV-Infektion (Schiffman and Wentzensen 2013).

Der Gebärmutterhals, die Cervix uteri, umfasst das untere Drittel des Uterus. Dabei kennzeichnet die Portio vaginalis uteri den Übergang des Gebärmutterhalses in die Vagina. Mit dem äußeren Gebärmuttermund im Zentrum ragt sie in die Scheide hinein. Ferner weist die Portio vaginalis uteri eine Besonderheit auf, die zervikale Transformationszone. Diese Zone besteht aus metaplastischem Gewebe und trennt das unverhornte Plattenepithel der Vagina vom hochprismatischen Zylinderepithel der Endozervix. Die Lage der Grenze zwischen den verschiedenen Epithelarten unterliegt hormonellen Einflüssen. Bei jungen Mädchen und Frauen im Klimakterium liegt die Grenze im Zervikalkanal und ist von außen nicht sichtbar. Bei geschlechtsreifen Frauen hingegen befindet sich die Transformationszone außen auf der Portio.

Das gesamte anogenitale Epithel kann von HPV infiziert werden, aber die Transformationszone, die vielfachen Umbauvorgängen unterliegt, ist besonders anfällig für epitheliale Atypien und damit für die Karzinogenese (Schiffman and Wentzensen 2013).

Die Stadien der Karzinogenese der Zervix umfassen die HPV-Infektion, die Persistenz des Virus und die Invasion. Die Integration der HPV-DNA ist als eine Form der persistierenden

Infektion anzusehen. Hierbei kann integriertes HPV länger persistieren als nicht integrierte Formen, wie z.B. episomales HPV (Zhang, He et al. 2014). Die HPV-Integration bewirkt in der Wirtszelle unter anderem den Verlust der Fähigkeit, die pathogenetische DNA von der eigenen zu unterscheiden und zu eliminieren. Ferner wird die infizierte Zelle zur Expression von Onkogenen und zur Umgehung des Zelltodes befähigt (Pett and Coleman 2007).

Die Vorläuferläsionen des Zervixkarzinoms können durch unterschiedliche Nomenklatur beschrieben werden, die auf histologischer oder zytologischer Kategorisierung basiert. Die Einteilung der zervikalen intraepithelialen Neoplasien (CIN) ist histologischer Art und beurteilt den Grad des Ersatzes der regelrechten Epithelschichtung durch mitotisch aktives Basalzellen-ähnliches Epithel. Die CIN-Einteilung beschreibt dabei eine stufenweise Progression von eher kleineren Läsionen bis hin zu Krebsvorstufen. Der Grad CIN1 umfasst den zytologischen Nachweis der HPV-Infektion (Koilozyten) und die milde Dysplasie. Mit CIN2 wird die moderate Dysplasie beschrieben. Die schwere Dysplasie und das Carcinoma in situ werden unter CIN3 zusammengefasst (Schiffman and Wentzensen 2013).

Im Verlauf der Forschung an HPV entstand ein differenzierteres Bild der Infektion der Cervix uteri. Dabei bedeutet der Nachweis der HPV-Infektion nicht unweigerlich eine Progression zum Zervixkarzinom. Vielfach konnte die transiente Natur der HPV-Infektion nachgewiesen werden (Zhang, He et al. 2014). In 90% der Fälle wird dabei eine spontane Regression der akuten HPV-Infektion beobachtet. Weniger als 10% gehen nach langer Zeit in eine zu therapierende Krebsvorstufe, die HSIL (High-grade Squamous Intraepithelial Lesion), oder ein invasives Karzinom über (Khan, Castle et al. 2005; Wentzensen and von Knebel Doeberitz 2007). Besonders bei jungen Frauen ist der natürliche Verlauf einer HPV-Infektion meist transienter Art. Korrespondierend dazu erweist sich der histologische Nachweis der CIN1 als schwer reproduzierbar und von unzureichender Sensitivität. Bei der eher als Krebsvorstufe zu bezeichnenden CIN3 beobachtet man weniger häufig spontane Regressionen als bei der CIN2, die als Grenzkategorie zwischen persistierender Infektion und akuter HPV-Infektion anzusehen ist (Schiffman and Wentzensen 2013).

Innerhalb von 30 Jahren ist mit einer Wahrscheinlichkeit von 30-50% mit dem Fortschreiten einer unbehandelten CIN3 Läsion zu einem invasiven Karzinom zu rechnen. Allerdings reduziert sich unter adäquater Behandlung die Rate der Progression auf 1% (Saslow, Solomon et al. 2012; Wentzensen, Walker et al. 2013).

Eine weitere Nomenklatur, die LAST (Lower Anogenital Squamous Terminology) Klassifikation besteht aus zwei Kategorien, der LSIL, welche die akute HPV-Infektion repräsentiert, und der HSIL, welche die zu therapierenden Krebsvorstufen beschreibt. Die Einteilung erfolgt anhand der Analyse der p16-Expression. P16 fungiert als ein Biomarker, der die Störung des Rb-Signalwegs durch das HPV-Virus anzeigt. Eine p16-positive CIN2 Läsion wird zusammen mit der CIN3 zur High-grade Squamous Intraepithelial Lesion (HSIL) zusammengefasst, die p16-negative CIN2-Läsion zusammen mit der CIN1 nennt sich Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion (LISL) (Schiffman and Wentzensen 2013).

Die HPV-Infektion wird in der Regel mit molekularen Assays (DNA, RNA) detektiert (Schiffman and Wentzensen 2013). Für den Übergang in eine HSIL ist die Persistenz des Virus eine notwendige Bedingung. Als Begleitfaktoren, die bei der Persistenz und Progression zur HSIL beobachtet werden, zählen der HPV-Genotyp, das individuelle Verhalten (orale Kontrazeptiva, Rauchen, Multiparität) und genetische Faktoren (Schiffman and Wentzensen 2013).

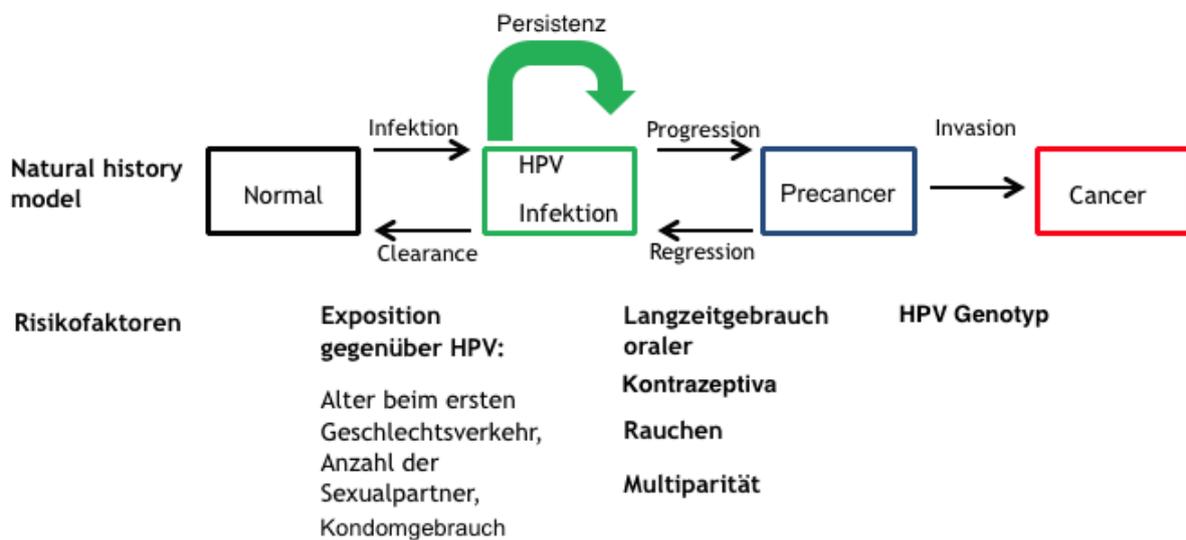


Abbildung 1: Modell der Entstehung des Zervixkarzinoms unter dem Einfluss der HPV Infektion (natural history model) und multiplen Risikofaktoren (Nach: Schiffman and Wentzensen 2013).

HPV16 ist als einzigartiger Genotyp anzusehen. Er zeichnet sich durch das höchste karzinogene Potential, das größte Risiko für die Progression zur CIN3 und zum Karzinom sowie die

höchste Assoziation zum Zervixkarzinom weltweit aus (Wentzensen, Walker et al. 2013; Saslow, Solomon et al. 2012). HPV 16 ist dabei für 20% aller Infektionen mit HPV, 40% aller HSIL und 50% aller Fälle von Zervixkarzinomen verantwortlich (Schiffman and Wentzensen 2013). Etablierte Risikofaktoren des Verhaltens verdoppeln das Risiko einer HSIL bei HPV-Infektion. Zu den Kofaktoren zählen weiterhin chronische Entzündung der Zervix und Immunsuppression, wie z.B. bei HIV (Cox 1995).

Infektion, Persistenz und Invasion, die drei natürlichen Schritte bei der Progression zum Zervixkarzinom, weisen charakteristische zeitliche Häufungen auf. Die HPV-Infektion zeigt Spitzenwerte im Jugendalter und jungen Erwachsenenalter, im Alter von 25-30 Jahren erreichen die HSIL Höchstwerte; das Zervixkarzinom tritt am häufigsten im Alter von 45-60 Jahren auf (Schiffman and Wentzensen 2013). Bei genauerer Betrachtung dieser Tatsachen wird deutlich, dass die Inzidenz der HPV-Infektion im Jugendalter zwar sehr hoch ist, ein Screening in dieser Altersgruppe jedoch nicht von Vorteil ist, denn das Risiko für ein Zervixkarzinom bei Jugendlichen ist gering (Schiffman and Wentzensen 2013). Der Beginn des zytologischen Screenings wurde auf ein Alter von 21 Jahren festgelegt, ein Ende auf das Alter von 65 Jahren, da neue Infektionen selten in fortgeschrittenem Alter auftreten und die Latenz bis zur Manifestation eines invasiven Karzinoms die Lebensspanne der Patientinnen überschreiten würde (Schiffman and Wentzensen 2013).

Ferner soll die Bedeutung von Biomarkern im Zusammenhang mit der Detektion von Entwicklungsstufen auf dem Weg zum Karzinom erläutert werden. Als einer der wichtigsten Biomarker ist die HPV-DNA zu nennen (Schiffman and Wentzensen 2013). DNA-Tests mittels PCR oder Hybridisierung dienen als Kernelement der Diagnostik und Prävention. Durch zusätzliche Bestimmung des HPV-Genotyps kann das Risiko für die Entwicklung einer HSIL abgeschätzt werden. Als weitere Biomarker gelten die HPV-mRNA, p16 sowie Marker der Proliferation wie Ki-67 und mcm-2. Ebenso fungieren die Analyse chromosomaler Instabilität und des Methylierungsstatus später HPV-Gene als Biomarker (Schiffman and Wentzensen 2013; Wentzensen and von Knebel Doeberitz 2007).

Die Schritte des Krebsfrüherkennungsprogrammes umfassen das zytologische Screening, klassischerweise den Pap-Test, die HPV-Testung, die Kolposkopie bei positivem HPV-Befund und abnormen zytologischen Ergebnissen, Biopsien aus Essig-weißen Läsionen und die Therapie mittels LEEP (loop electrical excision procedure) der Transformationszone im

Falle einer HSIL (Schiffman and Wentzensen 2013; Wentzensen and von Knebel Doeberitz 2007).

CIN III und Carcinoma in situ können ablativ und mittels Exzision therapiert werden. Bei den meisten Frauen mit einem Zervixkarzinom früher Stadien (Stadium I, IIA) gelingt die Heilung mittels alleiniger Operation (einfache Hysterektomie in frühen Stadien oder radikale Hysterektomie inklusive pelviner Lymphknotendissektion in fortgeschrittenen Stadien) oder Radiotherapie (Rosa, Medeiros et al. 2012).

Chirurgisch-pathologische Risikofaktoren des Zervixkarzinoms können in high-, intermediate- oder low-risk auf der Basis der histologischen Untersuchungen eingeteilt werden. Es wird angenommen, dass die Gruppe der Patientinnen mit hohem Risikoprofil von einer adjuvanten Therapie profitieren und eine Verbesserung im Hinblick auf das Überleben besteht (Matsuo, Mabuchi et al. 2014). Insofern kann das Vorliegen von Risikofaktoren bei Zustand nach radikaler Hysterektomie die Durchführung einer adjuvanten Radiatio rechtfertigen (Holtz and Dunton 2002; Berman 2002).

Bei Präsentation im Stadium einer Bulky Disease (Stadium IB2, IIA) wird die Radiochemotherapie als primäre Therapie oder nach Operation im Vergleich zu alleiniger Radiotherapie als effektiver bezüglich Überleben und Reduktion der Rezidivrate erachtet (Rosa, Medeiros et al. 2012).

Gemessen an der Tumorverkleinerung stellen Cisplatin-basierte Chemotherapie-Protokolle die effektivsten aller Protokolle dar (Rosa, Medeiros et al. 2012). Die Ansprechrate auf eine primäre Behandlung eines Karzinoms in einem frühen Stadium reicht von 70-90%. Das Überleben lässt sich durch adjuvante Therapien verbessern. Hier gilt es allerdings, die damit einhergehenden Nebenwirkungen und die Toxizität abzuwägen (Rosa, Medeiros et al. 2012).

Mit einer 5-Jahres-Überlebensrate von 80% lässt sich bei Stadien mit Begrenzung des Tumors auf die Zervix eine günstige Prognose erzielen. Weist ein Tumor allerdings high-risk Faktoren auf, so fallen die 5-Jahres-Überlebensraten auf 50-70% (Matsuo, Mabuchi et al. 2014).

In der Prävention des Zervixkarzinoms stehen besonders zwei entscheidende Maßnahmen zur Verfügung. Zum einen ist das oben genannte Screening von Bedeutung, zum anderen handelt es sich um die Impfung von Mädchen im Alter zwischen 9-14 Jahren, also vor Beginn sexueller Aktivität. Ein Zervixkarzinom im späteren Leben ist meist Folge einer HPV-Infektion im Jugendalter. Ziel der Impfung ist deshalb, den frühen Gipfel der HPV-Infektion zu verhindern. Zur Impfung stehen vor allem der bivalente Impfstoff (GSK) gegen die HPV Typen 16

und 18 sowie der quadrivalente Impfstoff (Merck) gegen zusätzlich HPV 6 und 11 zur Verfügung (Saslow, Solomon et al. 2012).

Der vielleicht größte Erfolg zur Reduktion der Inzidenz des Zervixkarzinoms könnte allerdings dadurch erzielt werden, dass der Zugang zu Screening-Programmen all jenen Frauen ermöglicht wird, die derzeit an keinem Krebsvorsorgeprogramm teilnehmen können oder dies nur in unregelmäßigen Abständen tun (Saslow, Solomon et al. 2012). Auch die Aufnahme des HPV-Tests in das Screening-Programm könnte die Inzidenz des Zervixkarzinoms senken, da dieser bei negativem Testergebnis größere Sicherheit bietet als die Zytologie (Saslow, Solomon et al. 2012).

1.2.2 Ovarialkarzinom

Mit 238.719 neuen Fällen und 151.917 Todesfällen pro Jahr ist das Ovarialkarzinom nach dem Zervixkarzinom die zweit-häufigste Todesursache unter Malignomen des weiblichen Genitalsystems (http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx). Die Inzidenz des Ovarialkarzinoms steigt proportional mit dem Alter. Dabei manifestiert sich das epitheliale Ovarialkarzinom bei den meisten Patientinnen in einem Alter zwischen 60-64 Jahren, während Keimzelltumoren der führende histologische Subtyp bei Frauen unter 20 Jahren sind. Da das Ovarialkarzinom mit unspezifischen Symptomen assoziiert ist, weisen 60% der Patientinnen bei Erstdiagnose bereits Metastasen auf, was einer 5-Jahres-Überlebensrate von 27,3% entspricht (<http://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>). Nur ca. 25% der epithelialen Ovarialkarzinome werden in einem frühen Stadium diagnostiziert.

Die Entwicklung des Ovarialkarzinoms ist Gegenstand vieler Publikationen und konnte bis heute noch nicht eindeutig geklärt werden. Es lässt sich jedoch festhalten, dass das Ovarialkarzinom der Gruppe der chronischen Erkrankungen zugerechnet werden kann. Auch nach über 10 Jahren eines kontrollierten, stabilen Stadiums können Rezidive innerhalb kurzer Zeit auftreten. Bei lokal fortgeschrittenen Karzinomen gelten die ersten zwei Jahre nach Diagnosestellung als die kritische Zeitspanne, welche die Prognose bezüglich des Überlebens und krankheitsfreien Überlebens beeinflusst (Vargas 2014).

In Anlehnung an die „Incessant ovulation theory“ wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Karzinogenese des Ovarialkarzinoms durch vermehrte Wundheilung und Entzündung im Zuge der Ovulation entsteht (Ness and Cottreau 1999). Diese Hypothese zählt somit zu dem tra-

ditionellen Modell zur Erklärung der Karzinogenese des Ovarialkarzinoms und sieht das Ovar im Fokus der Karzinomentstehung. Neuere Studien gehen davon aus, dass es mehrere Orte der Krebs-Initiierung auch außerhalb des Ovars geben muss. Es wurde gezeigt, dass das seröse high-grade Ovarialkarzinom von den sekretorischen Zellen der Tuba uterina ausgeht und man definierte das „serous tubal intraepithelial carcinoma“ als Vorläufer-Läsion des high-grade serösen Ovarialkarzinoms (Feranec and Moukova 2013; Perets, Wyant et al. 2013; Cho and Shih Ie 2009).

Im Falle des Ovarialkarzinoms sieht man sich vor allem mit drei Problemen konfrontiert: Das ist zum einen die späte Diagnosestellung, die auf eine unspezifische und vage Symptomatik des Ovarialkarzinoms zurückgeführt werden kann. Zum anderen ist es die hohe Rate an Rezidiven, wobei sich der Tumor bei Wiederauftreten nicht selten als Chemotherapie-resistent erweist (Cho 2009). Als drittes Problem sei das Fehlen von geeigneten Screening Verfahren zu betonen, die zur Detektion von frühen Stadien des Ovarialkarzinoms beitragen können.

Derzeit existiert kein generelles Screening bezüglich des Ovarialkarzinoms. Studien zu der Frage nach der Bedeutung eines Screenings mit transvaginalem Ultraschall und CA 125 Bestimmung wie das Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial konnten keinen eindeutigen Einfluss auf die Mortalität des Ovarialkarzinoms feststellen. Darüber hinaus befand sich die Mehrheit der durch das Screening detektierten Karzinome (80%) bereits im Stadium III oder darüber (Partridge, Greenlee et al. 2009).

1990 wurde von Jacobs ein Score entwickelt, um das Risiko für Malignität bei Vorhandensein eines ovariellen Tumors einzuschätzen. Dieser Score, der Risk of Malignancy Index for Ovarian Tumor (RMI), stellt ein geeignetes Mittel zur Abschätzung der Dignität vor einer geplanten Operation dar (Tingulstad, Hagen et al. 1999). Der RMI I und die überarbeiteten Formen, der RMI II und RMI III, stützen sich auf die Ergebnisse der CA 125 Untersuchung sowie der Ultraschalluntersuchung. Ferner fließt in den Index ein, ob eine Frau prä- oder postmenopausal ist. Dabei gilt es zu beachten, dass die Prävalenz falsch positiver CA 125 Konzentrationen bei prämenopausalen Frauen höher ist als bei postmenopausalen Frauen. Deshalb muss der menopausale Status in die Berechnung des Risikos miteinfließen (Jacobs, Oram et al. 1990).

Die Mutation des Tumorsuppressorgens BRCA1 auf Chromosom 17 oder BRCA2 auf Chromosom 13 ist als eine beispielhafte Veränderung bei hereditären Tumoren anzusehen (Vargas 2014). Bei einer BRCA1 Mutation beträgt das Risiko für die Entwicklung eines Ovarialkarzi-

noms 36-46%, bei Trägern einer BRCA2 Mutation liegt es bei 10-27%. Daher ist bei diesen Risikopatientinnen eine „risk-reducing salpingo-oophorectomy“ (RRSO) angeraten, sobald ein Kinderwunsch abgeschlossen ist (Rebeck, Kauff et al. 2009).

Ungefähr 10% aller Ovarialkarzinome sind auf genetische Faktoren zurückzuführen (Borges and Schmalfeldt 2011). Als hereditäre Risikofaktoren sind neben der BRCA1 und BRCA2 Keimbahnmutation außerdem das Li-Fraumeni-Syndrom und das Lynch-Syndrom zu nennen (Vargas 2014). Als weitere Risikofaktoren gelten das Alter und der menopausale Status, die Familienanamnese, ein hoher sozioökonomischer Status, Nulliparität, Infertilität, spätes Eintreten der Menopause, das Stein-Leventhal-Syndrom, Hormonersatztherapie, Rauchen, weiße Hautfarbe und Adipositas (Vargas 2014). Als protektive Faktoren haben sich das Vorhandensein von mehr als einer Schwangerschaft, der Gebrauch oraler Kontrazeptiva und Stillen etabliert (Roett and Evans 2009; La Vecchia 2001; La Vecchia and Franceschi 1999).

Die Symptomatik des Ovarialkarzinoms beginnt meist mit einer Zunahme des Bauchumfangs, begleitet von vagen Symptomen, die häufig die Diagnostik in Richtung gastrointestinaler Beschwerden wie Ulcera, Koliden oder Gallenblasenerkrankungen lenken. In diesem Zusammenhang auftretende Fehldiagnosen können dazu beitragen, dass die betroffenen Frauen zu 79% erst in fortgeschrittenen Stadien, die mit einer schlechten Prognose einhergehen, diagnostiziert werden (Vargas 2014). Je nach befallenem Organ entstehen ferner Unterleibschmerzen, Obstipation und Diarrhoe, eventuell auch vaginale Blutungen. Im Verlauf nimmt der Bauchumfang weiter zu, es kommt zu Aszites und in Folge der Beeinträchtigung der Entfaltung der Lungen zu Dyspnoe. Aufgrund des Aszites bleibt das Gewicht stabil oder es kann eine Gewichtszunahme festgestellt werden (Borges and Schmalfeldt 2011; Vargas 2014).

Als prognostische Faktoren mit Einfluss auf das Überleben gelten bei malignen Ovarialtumoren das Alter und der menopausale Status, die Tumorgröße, das Tumorstadium, das Tumorgrading, der histologische Subtyp, charakteristische Zeichen des Tumors in der Bildgebung, das Vorhandensein von Symptomen, Werte der Tumormarkermessung (CA 125, CA 19-9) und der einseitige oder beidseitige Befall. Ferner zählen die Menge an Aszites und die Größe eines Residualtumors nach Operation zu den prognostischen Faktoren (Borges and Schmalfeldt 2011; Vargas 2014).

An erster Stelle der diagnostischen Kaskade stehen die Anamnese, insbesondere bezüglich der Risikofaktoren, und die körperliche Untersuchung einschließlich digital-rektaler und vaginaler Tastung (Vargas 2014). Des Weiteren werden Laborbefunde bestimmt sowie bei Verdacht auf

einen malignen Ovarialtumor der Tumormarker CA 125. Unter allen bildgebenden Verfahren bei der Staging Untersuchung ist der transvaginale Ultraschall im Hinblick auf die Beurteilung, ob es sich um benigne oder maligne Läsionen handelt, als das sinnvollste Verfahren anzusehen (Burges and Schmalfeldt 2011). In Ergänzung mittels Farbdoppler kann eine Sensitivität von 93,5% und eine Spezifität von 91,5% erreicht werden. Die Serumspiegel von CA 125 können sowohl bei anderen malignen Tumoren wie Mamma-, Pankreas- und Kolonkarzinom als auch bei benignen Konditionen wie Endometriose oder Pelvic inflammatory disease, Hepatitis und Schwangerschaft erhöhte Werte zeigen. Ferner werden die Serumwerte des CA 125 nur in 50% aller early stage Ovarialkarzinome erhöht gemessen (Dodge, Covens et al. 2012). Außerdem ist die Bestimmung von CA 125 bei prämenopausalen Frauen nur begrenzt von Nutzen, da die Inzidenz maligner ovarieller Raumforderungen gegenüber benignen in dieser Altersgruppe geringer ist. Daher wird bei Vorliegen einer malignitätsverdächtigen Raumforderung am Ovar die alleinige Bestimmung von CA 125 zur Unterscheidung benignemaligne nicht empfohlen (Dodge, Covens et al. 2012).

Derzeit existiert keine diagnostische, nicht invasive Methode, die das chirurgische Staging des Ovarialkarzinoms ersetzen und eine verlässliche Vorhersage bezüglich der Operabilität machen könnte (Burges and Schmalfeldt 2011). Ein ausgedehntes operatives Staging mit Lymphadenektomie wird für Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom früher Stadien empfohlen. Dieses Vorgehen zeigte einen statistisch signifikanten Vorteil in den 5-Jahres-Überlebensraten und dem krankheitsfreien Überleben (Dodge, Covens et al. 2012). Im Anschluss an das Staging erfolgt standardmäßig eine first line Therapie, die aus einem chirurgischen Debulking und anschließender systemischer Chemotherapie besteht. Das Chemotherapieprotokoll ist zum einen Platin-basiert (Carboplatin oder Cisplatin), zum anderen enthält es Taxane (Paclitaxel oder Docetaxel) (Cho 2009).

Histopathologisch können die malignen Ovarialtumoren ihren Ursprung vom Epithel, von den Keimzellen sowie vom gonadalen Stroma nehmen. Die epithelialen Tumoren machen 45% aller malignen Neoplasien am Ovar aus und setzen sich aus serösen, muzinösen, endometrioiden, undifferenzierten, klarzelligen Karzinomen und dem Brenner Tumor zusammen. Darunter zeigen die klarzelligen Karzinome die schlechtesten Überlebensraten (Vargas 2014). Als Tumormarker sei hier vor allem der unspezifische Marker CA 125 genannt. In muzinösen Tumoren beobachtet man vor allem einen Anstieg des Tumormarkers CA 19-9 (Vargas 2014). Ferner hat die Untersuchung von WT1 seine Berechtigung, da es einen relativ spezifischen Marker für einen serösen Phänotyp darstellt (McCluggage 2011).

Wie auch andere Tumorarten entsteht das Ovarialkarzinom in Folge eines Mehrstufenprozesses, bei dem klonale Selektion auf Zellen mit somatischen Mutationen und veränderter Genexpression einwirkt (Cho 2009). Ein einheitlicher Mehrstufenprozess der Karzinogenese konnte bei dem sporadischen Ovarialkarzinom nicht beschrieben werden. Es ist somit davon auszugehen, dass jeder Tumor-Subtyp durch sein eigenes molekulares Muster charakterisiert wird (Dietl 2014). Im Bestreben um eine Klassifikation aller malignen ovariellen Tumoren mit Ursprung vom Oberflächenepithel wurde eine Einteilung in Typ I und Typ II anhand von morphologischen und molekularen Merkmalen vorgenommen. Durch die Kenntnis über die häufigsten den Typ I oder Typ II Tumoren zugrunde liegenden Mutationen ergibt sich die Möglichkeit, gezielte Therapiestrategien zu entwickeln (Lee, Kang et al. 2008; Cho and Shih 2009).

1.3 Karzinogenese

“...understanding how the parts relate to each other is a precondition to understanding process and understanding process is the precursor of uncovering principles.”

Zoologe und Wissenschaftsautor Sir Paul Patrick Gordon Bateson, 2006. Biol. Philos. 21 553–558 (Sonnenschein and Soto 2013).

Karzinogenese beschreibt den Prozess der Tumorentstehung, der Gegenstand lebhafter Diskussionen ist und dessen zugrunde liegende Frage „Welches sind die Markenzeichen von Krebs“ selbst mit den neusten technischen Errungenschaften bis heute nicht vollständig beantwortet werden kann. Wie Bateson in seinem Zitat beschreibt, beinhaltet das Herangehen an derartig komplexe Fragestellungen zuerst das Verständnis dafür, wie einzelne Teile zusammenwirken und zusammenhängen, was eine Voraussetzung für das Verständnis eines Prozesses ist, der zum Aufdecken und Verständnis von Prinzipien führt. Deshalb soll hier über die Grundlagen der Krebsentstehung berichtet werden, damit die Rolle des untersuchten Faktors LDOC1 in diesem Kontext anschaulich gemacht werden kann. In *The Hallmarks of cancer* (Hanahan and Weinberg 2000), einem vielfach zitierten, sog. „Meilensteinartikel“, werden einem mechanistischen Verständnis der Krebsentstehung zufolge acht Veränderungen postuliert, die für die Entstehung von Krebs in generell jeder Tumorart verantwortlich gemacht werden können und ihren Ursprung in genetischen Veränderungen haben.

Diese Veränderungen sind:

1. Die ausreichende Versorgung der Zellen mit Wachstumsfaktoren
2. Wachstumsinhibierenden Faktoren zu entgehen
3. Die Vermeidung des programmierten Zelltodes (Apoptose)
4. Das Potential zur unlimitierten Replikation
5. Das Aufrechterhalten der Angiogenese
6. Die Gewebsinvasion und Metastasierung

2011 wurden in einer zweiten Auflage *Hallmarks of cancer: the next generation* (Hanahan and Weinberg 2011) den bereits sechs anerkannten Hallmarks zwei weitere hinzugefügt:

7. Die Reprogrammierung des Energie-Metabolismus
8. Das Vermeiden einer Zerstörung durch das Immunsystem.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Protein LDOC1 (leucin zipper downregulated in cancer) untersucht, das tumorsuppressorartige Eigenschaften zeigt. Nach den oben beschriebenen *The Hallmarks of Cancer* kann die Ausschaltung eines Tumorsuppressorgens einen von vielen Schritten im Prozess der Entstehung von Krebs bedeuten.

1.4 Leucine zipper downregulated in cancer 1 (LDOC1)

1999 wurde das Gen LDOC1 durch Nagasaki et al. identifiziert (Nagasaki, Manabe et al. 1999). Mittels differentieller RNA-Darstellung konnte gezeigt werden, dass die Genexpression von LDOC1 in Pankreas- und Magenkarzinomzelllinien gegenüber normalem Gewebe herabgesetzt war. Die genaue Funktion dieses neu entdeckten Gens blieb zu diesem Zeitpunkt noch ungewiss. Auch heute existieren auffallenderweise nur wenige Studien über LDOC1 und seine spezielle Funktion.

Das LDOC1-Gen ist in der chromosomalen Xq27 Region lokalisiert, die verschiedene segmentale Duplikationen und die Tendenz zu genomischer Instabilität und Rekombination einschließlich Gendeletion, Genduplikation und Inversion aufweist. Bei dem Genprodukt LDOC1 handelt es sich um einen besonders kleinen Transkriptionsfaktor aus nur 146 Aminosäuren (17kDa). Er enthält ein leucine zipper DNA-Bindungsmotiv sowie eine Prolin-reiche Region (Nagasaki, Manabe et al. 1999). Diese umfasst außerdem eine SH3-bindende Konsensussequenz und C-terminal eine saure Region. Da sowohl das leucine zipper- als auch das SH3-bindende Motiv die Protein-Interaktion steuern, wird von LDOC1 angenommen, dass es

die Transkription durch Homo- oder Heterodimerisation reguliert (Duzkale, Schweighofer et al. 2011).

Mit leucine zipper wird eine bestimmte Struktur von Proteinen beschrieben, bei denen sich in einem Abschnitt mit α -helikaler Struktur regelmäßig Leucin-Reste befinden. Alle Leucine sowie ihre hydrophoben Reste weisen in die gleiche Richtung, was das charakteristische Bild dieser Struktur ausmacht. Die leucin zipper Domäne fungiert außerdem als Dimerisierungsdomäne, denn bei Aufeinandertreffen und Verzahnung zweier leucin zipper Einheiten entstehen Wechselwirkungen, sodass sich Homo- und Heterodimere bilden können. Eine weitere Besonderheit der leucin zipper Motive ist ihre DNA-Bindungsdomäne, die durch die Wechselwirkung basischer Aminosäuren wie Arginin und Lysin im Protein mit den Basen der DNA entsteht. Ebenfalls kann den leucin zipper Dimeren die Eigenschaft von Transkriptionsfaktoren zugeschrieben werden. Bilden die Dimerisierungsdomänen einen festen Zusammenhalt zwischen zwei leucin zipper Proteinen, bleiben die DNA-Bindedomänen frei für die Interaktion mit der zu transkribierenden Region der DNA. Durch die Übertragung von Phosphatgruppen auf Aminosäuren des Transkriptionsfaktors besitzt das leucin zipper Motiv die Fähigkeit, die Transkription zu steuern. Dies geschieht mittels der Transaktivierungsdomäne.

Die Untersuchung der LDOC1-mRNA Expression in vielen verschiedenen Gewebetypen führte zu dem Ergebnis, dass LDOC1 in normalem Gewebe exprimiert wird. In Tumorzelllinien zeigte sich eine LDOC1 Expression im Mammakarzinom, jedoch kaum in Pankreas- oder Magenkarzinomzelllinien. Aufgrund dieser Tatsachen schlussfolgerten Nagasaki et al., dass es sich bei LDOC1 um ein Tumorsuppressorgen handele (Nagasaki, Manabe et al. 1999; Duzkale, Schweighofer et al. 2011).

Die spezifische Funktion von LDOC1 ist allerdings immer noch unbekannt. Inoue et al. konnten jedoch nachweisen, dass die Überexpression von LDOC1 zu Veränderungen führte, die als charakteristisch für die frühe Phase der Apoptose gelten. Der Verlust des mitochondrialen Membranpotentials gilt dabei als auslösend für den Prozess der Apoptose, der sowohl Caspase-3-abhängig als auch -unabhängig abläuft. Außerdem konnte gezeigt werden, dass durch die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor MZF-1 die Apoptose-anstoßende Aktivität von LDOC1 verstärkt wurde (Inoue, Takahashi et al. 2005).

Herunterregulation und differentielle Expression von LDOC1 wurden ebenfalls in Gewebeproben vom Ösophaguskarzinom und verschiedenen Formen der Leukämie nachgewiesen. Im

Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle konnte die epigenetische Regulation von LDOC1 durch Promotormethylierung gezeigt werden (Lee, Wong et al. 2013).

In der vorliegenden Arbeit wurden die LDOC1 Expression und Regulation erstmals an Zervix- und Ovarialkarzinomzelllinien untersucht.

1.5 DNA-Methylierung

Die DNA-Methylierung ist neben der Histonmodifizierung als eine der wichtigsten epigenetischen Modifizierungsmechanismen im Genom höherer Eukaryoten zu erachten (Bogdanovic and Veenstra 2009). Post-synthetische Modifizierung der DNA durch Methylierung ist in vielen Organismen zu beobachten, von Prokaryoten bis hin zu den Säugetieren (Pradhan, Bacolla et al. 1999; Clouaire and Stancheva 2008).

Bei der DNA-Methylierung handelt es sich um eine kovalente Modifikation, die durch DNA-Methyltransferasen katalysiert wird. Die Methyl-Transfer-Reaktion erfolgt zuerst durch unspezifische Bindung des Enzyms an die DNA, die Erkennung des spezifischen Ziels auf der DNA und die Rekrutierung eines Methylgruppendonators, S-Adenosylmethionin (AdoMet), zur aktiven Stelle des Enzyms. DNA (cytosine-5) Methyltransferasen (m5C MTase) verknüpfen dann über eine kovalente Bindung eine Methylgruppe mit dem Kohlenstoff 5 des Ziel-Cytosins (Pradhan, Bacolla et al. 1999).

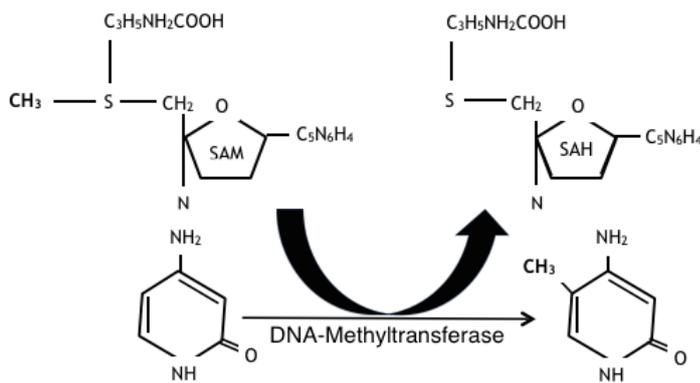


Abbildung 2: Umwandlung von Cytosin zu 5-Methylcytosin. Die DNA-Methyltransferase überträgt eine CH₃-Gruppe von dem Methylgruppendonator S-Adenosylmethionin (SAM) auf Cytosin. Als Reaktionsprodukte entstehen S-Adenosylhomocystein (SAH) und 5-Methylcytosin.

Im Genom der Vertebraten findet die Verknüpfung einer Methylgruppe mit dem Cytosin ausschließlich an solchen Cytosinbasen statt, die sich innerhalb eines CG-Dinukleotids befinden. Ungefähr 60-90% dieser CG-Dinukleotide sind modifiziert. Ausnahmen bilden CpG-Inseln. Das sind CpG-reiche Sequenzen, die vielfach in Promotorregionen vorkommen und im Allgemeinen nicht methyliert sind, auch wenn das ihnen assoziierte Gen nicht transkribiert wird (Antequera, Boyes et al. 1990; Bogdanovic and Veenstra 2009). 70% aller Promotoren in Säugetieren sind in die nicht methylierten CpG-Inseln eingebettet (Clouaire and Stancheva 2008). Die Faktoren, welche die CpG-Inseln vor der Verknüpfung mit einer Methylgruppe durch die DNMTs bewahren, sind derzeit nicht bekannt (Clouaire and Stancheva 2008). Während der Entwicklung wird eine kleine, aber signifikante Anzahl von CpG-Inseln methyliert, was dann mit stabiler Ausschaltung des Promotors assoziiert ist. Der Zustand des Chromatins könnte dabei der Auslöser zur DNA-Methylierung sein (Bird 2002). Die ATP-abhängige Modellierung von Nukleosomen wurde unter anderem als ursächlich für die „silence-related de novo methylation“ identifiziert (Ren 2015).

Es liegen verschiedene Hinweise vor, dass die DNA-Methylierung nicht etwa dem Zweck dient, aktive Promotoren auszuschalten, sondern auf solche Gene wirkt, die bereits nicht mehr transkribiert werden. Als Beispiel sei die Inaktivierung des X-Chromosoms im Säugetier-Embryo angeführt. Am X-Chromosom betrifft die Methylierung solche Gene, die bereits durch andere Mechanismen ausgeschaltet worden sind. Eine mögliche Interpretation dieser

Beobachtung wäre, dass die fehlende Transkription selbst Anstoß zur Methylierung gibt (Bird 2002).

Ein korrekt gesteuerter DNA-Methylierungsstatus ist als Voraussetzung für die normale Entwicklung anzusehen und spielt eine Rolle in vielfältigen Prozessen wie Genregulation, DNA-Replikation, Entwicklung des Embryos, Imprinting, X-Chromosom-Inaktivierung, Suppression repetitiver Genelemente, Karzinogenese und genetischen Krankheiten (Bogdanovic and Veenstra 2009).

Zu methylierter DNA werden Methyl-CpG binding domain proteins (MBDs) und verschiedene Methyl-CpG binding zinc-finger proteins rekrutiert. Von diesen Proteinen wird angenommen, dass sie mit Histon-Deacetylase-Aktivität assoziiert sind und eine Stilllegung des Chromatins bewirken (Bogdanovic and Veenstra 2009).

Das Genom der Vertebraten weist eine ausgeprägte Methylierung auf, die über das gesamte Genom verteilt ist und wegen dieses Musters als globale Methylierung bezeichnet werden kann (Bird 2002). Pilze wie *Neurospora crassa* und auch Pflanzen weisen methyliertes Cytosin außerhalb von CpG-Inseln auf. Spezies wie Hefe und viele Invertebraten, darunter der Nematode *C. elegans* und die Fliege *D. melanogaster*, enthalten entweder gar keine oder kaum detektierbare Mengen methylierten Cytosins, das mosaikartig und abwechselnd mit unmethylierter DNA im Genom verteilt ist (Bird 2002; Bogdanovic and Veenstra 2009; Clouaire and Stancheva 2008).

Die DNA-Methylierung bei Vertebraten erfolgt durch drei Mitglieder der Familie der DNA-Methyltransferasen (DNMT): DNMT1, DNMT3a und DNMT3b. DNMT3a und DNMT3b gehören zu den de novo Methyltransferasen, die zuvor nicht methylierte CpG-Sequenzen modifizieren. DNMT1 hingegen fungiert als eine Maintenance Methyltransferase, die den bei der Replikation neu gebildeten DNA-Strang an den am Original vormarkierten Stellen methyliert (Clouaire and Stancheva 2008; Bogdanovic and Veenstra 2009).

Während das Methylierungsmuster in somatischen Zellen gleichbleibend und vererbbar ist, erweist es sich im Verlauf der Ontogenese als dynamisch. Eine globale Umwandlung der DNA-Methylierung geschieht zum einen während der Gametogenese, wenn auch das Imprinting zurückgesetzt wird, zum anderen während der Präimplantation. Dabei ist der Zyklus der frühen embryonalen Demethylierung mit anschließender de novo Methylierung als ein wichtiger Schritt bei der Festlegung des DNA-Methylierungsmusters anzusehen (Bird 2002).

Es sind zwei verschiedene Mechanismen beschrieben, mit denen die DNA-Methylierung die Genexpression reprimiert. Zum einen handelt es sich um einen direkten Mechanismus, bei dem die Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren durch die modifizierte DNA gestört werden (Bogdanovic and Veenstra 2009; Bird 2002). So kann zum Beispiel eine methylierte Zielsequenz die Bindung der Transkriptionsfaktoren wie E2F oder CREB behindern und somit die Aktivierung der Transkription verhindern. Viele Gene, die bei der Kontrolle des Zellzyklus und der Zellproliferation eine Rolle spielen, werden durch Mitglieder der E2F Familie reguliert. Da methylierte CpG-Dinukleotide die E2F Funktionen beeinflussen, kann dieser Mechanismus zur Entstehung und Progression von Tumoren führen (Campanero, Armstrong et al. 2000). Der zweite, kompliziertere Mechanismus wird durch die Rekrutierung von Methyl-CpG binding proteins, die mit verschiedenen Modifikatoren der Chromatinstruktur assoziiert sind und somit eine reprimierte Chromatinumgebung schaffen, charakterisiert. Diese MBD lesen und interpretieren die epigenetischen Signale und liefern die Verbindung zwischen DNA-Methylierung und Chromatinstruktur. Weiterhin wurde gezeigt, dass das Methyl-CpG binding protein 2 (MeCP 2) mit Histon-Methylierung assoziiert ist und diese bahnt. Histon-Methylierung ist ein Schlüsselmechanismus in der epigenetischen Modifikation und führt zur Stilllegung von Genen. Daraus ergibt sich eine direkte Verbindung der Enzyme, die für die DNA-Methylierung verantwortlich sind und eben solchen für die Histon-Methylierung. Diese beiden bedeutenden epigenetischen Modifizierungsmechanismen führen somit im Zusammenspiel durch einen sich selbst verstärkenden Vorgang zu einer reprimierten Chromatinstruktur (Fuks, Hurd et al. 2003). Methylierte DNA in Chromatinstruktur bindet den Repressor MeCP 2, der sich zu einem Komplex mit Sin3 und Histondeacetylasen assembliert. Die durch MeCP 2 und methylierte DNA verursachte Ausschaltung der Genexpression kann durch Inhibition der Histondeacetylase aufgehoben werden, was auf einen kausalen Zusammenhang zwischen Ausschaltung durch DNA-Methylierung und der Chromatinstruktur hinweist (Jones, Veenstra et al. 1998).

MBD Proteine beeinflussen nicht nur die normale Entwicklung, sondern auch die Pathophysiologie mit vielfältigen Mechanismen (Bogdanovic and Veenstra 2009). Mutationen in der MBD-Familie, speziell des Methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2), sind als ursächlich für die Entstehung des Rett-Syndroms anzusehen. Des Weiteren zeigen auch andere Proteine der MBD-Familie eine Bindung an anomal hypermethylierte Promotoren in verschiedenen menschlichen Krebszelllinien (Bogdanovic and Veenstra 2009).

Epigenetische Veränderungen in Tumorzellen

Die Eigenschaften einer Zelle werden durch ihre einzelnen Proteine gebildet, die das Ergebnis spezifischer Muster der Genexpression sind. DNA-bindende Transkriptionsfaktoren führen zu gezielter transkriptionaler Aktivierung oder Repression von Genen, indem sie die Basensequenz der DNA im Promotor erkennen. Somit sind die Transkriptionsfaktoren als wichtige Determinanten des Genexpressions-Musters zu bezeichnen (Bird 2002). Die genomische Sequenz einer differenzierten Zelle wird in den meisten Fällen als identisch zu der Sequenz der Zygote erachtet. Die Merkmale der Entwicklungsgeschichte können nicht nur durch somatische Mutationen, sondern auch durch weniger endgültige Mechanismen hervorgerufen werden. Diese Mechanismen fallen unter den Oberbegriff der Epigenetik. Eine Definition der Epigenetik gibt V.E.A. Russo 1996: „The study of mitotically and/or meiotically heritable changes in gene function that cannot be explained by changes in the DNA sequence.“ (Bird 2002).

Die Epigenetik ist also als Veränderung der Genfunktion zu verstehen, die nicht durch Veränderungen in der DNA-Sequenz zu erklären ist.

Hochgradige Veränderungen des Methylierungsmusters und der Chromatinstruktur finden sich häufig in Karzinomen (Jones and Baylin 2002). Dazu zählen der genomweite Verlust und regionaler Zugewinn von DNA-Methylierung. Die Erkenntnisse darüber, welchen Einfluss die Chromatinstruktur auf die Gentranskription ausübt, verdeutlichen die Bedeutung der Epigenetik als Mechanismus in der Initiierung und Progression von Tumoren. Dass die Epigenetik einen entscheidenden und bereits gut etablierten Beitrag zur Karzinomentstehung liefert, wird auch daran deutlich, dass karzinogene Stoffe in Zellen epigenetische Veränderungen hervorrufen können - unabhängig von strukturellen Aberrationen an der DNA (Duenas-Gonzalez, Lizano et al. 2005). Damit wird die klassische Ansicht von genetischen Veränderungen wie Mutationen von Tumorsuppressorgenen und Onkogenen als alleinige Erklärung für die Karzinogenese insuffizient (Berdasco and Esteller 2010).

Ein anomaler Methylierungsstatus, in Form von Hyper- oder Hypomethylierung, ist entscheidend für die Karzinogenese, das Ausmaß ihres Einflusses auf die Krebsentstehung ist allerdings noch unzureichend geklärt (Duenas-Gonzalez, Lizano et al. 2005). Chromosomale Instabilität wird in diesem Zusammenhang mit globaler Hypomethylierung assoziiert, wohingegen die Inaktivierung von Genen in den Kontext von Hypermethylierung der CpG-Inseln in den Promotoren gestellt wird. CpG-Inseln befinden sich häufig in den Promotorregionen hu-

maner Gene und diese regulatorischen Elemente sind normalerweise nicht methyliert. Im Karzinom jedoch findet man die CpG-Inseln in den Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen meist methyliert vor. Zelluläre Signalwege, die durch CpG-Hypermethylierung betroffen sind, beinhalten den Zellzyklus, die Apoptose, die Zelladhäsion, die DNA-Reparatur sowie den Tumormetabolismus (Lopez-Serra and Esteller 2008).

Betroffen sind Tumorsuppressorgene wie p16, RB, hMLH1, BRCA1 (Ahuja and Issa 2000). CpG-Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen im Karzinom ist eine häufige und etablierte Tatsache, sodass Tumoren nach ihrem Methylierungsprofil eingeteilt werden können. Beispielhaft sei hier die Hypermethylierung von BRCA1 CpG-Inseln im Mamma- und Ovarialkarzinom zu nennen, ferner die Promotorhypermethylierung von hMLH1 im Kolon-, Magen- und Endometriumkarzinom (Lopez-Serra and Esteller 2008).

Im Zusammenhang mit der DNA-Hypermethylierung zeigt sich eine Fehlregulation der Transkription durch Bindung von MBD Proteinen an aberrant methylierte DNA. Die Besetzung von hypermethylierten Promotoren von Tumorsuppressorgenen mit MBD Proteinen konnte in vielen humanen Krebszelllinien nachgewiesen werden und zeigte eine Korrelation mit der Ausschaltung der entsprechenden Gene (Lopez-Serra and Esteller 2008). Dabei scheint der Typ des MBD Proteins sowohl tumor- als auch genspezifisch zu sein. Ferner fanden sich abnorm hohe Werte von MBD Proteinen in Karzinomzellen. Polymorphismen in der Sequenz von MBD Proteinen zeigten in einigen Fällen eine Assoziation zu erhöhtem oder erniedrigtem Krebsrisiko (Lopez-Serra and Esteller 2008).

Ahuja und Issa äußern in ihrem Artikel *Aging, Methylation and cancer* aus dem Jahr 2000 den Verdacht, dass Veränderungen im Methylierungsmuster in normalen Zellen als ein Resultat des Alterungsprozesses auftreten, aber während der Karzinogenese weiter fortschreiten können. Die altersbezogene Methylierung erweist sich als eine der frühesten Veränderungen, die mit dem Risiko für die Entwicklung einer Neoplasie einhergehen. Im Kolonkarzinom wurde das Muster der alters-assozierten Methylierung an verschiedenen Genen wie ER, IGF2, N33 und MyoD nachgewiesen. Eine Progression des Methylierungsgrades fand sich beim Adenom und bei der Neoplasie. Da alters-assozierte Methylierung in 50% aller hypermethylierten Gene im Kolonkarzinom gefunden werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass viele Karzinome als eine Folge eines Alterungsprozesses auftreten (Ahuja and Issa 2000).

1.6 LDOC1-Promotor

Auffällig bei der Betrachtung der CpG-Inseln ist deren Zusammentreffen mit den Promotorregionen von Genen.

Die Promotoren der Säugetiere können abhängig von Basenzusammensetzung und DNA-Methylierung in zwei Kategorien eingeteilt werden. Schätzungsweise weist die Hälfte aller Promotoren einen C+G-Inhalt und ein Methylierungsmuster auf, das kaum von dem Großteil der DNA zu unterscheiden ist (Cuadrado, Sacristan et al. 2001). Die andere Hälfte der Promotoren steht im Zusammenhang mit CpG-Inseln. Diese sind Regionen frei von DNA-Methylierung und mit einem höheren C+G-Anteil als durchschnittlich im Genom anzutreffen ist (Cuadrado, Sacristan et al. 2001).

Betrachtet man nun den LDOC1-Promotor, so sind die vielen CG-Dinukleotide besonders eindrücklich zu erkennen. Mit der folgenden Arbeit soll der Mechanismus der epigenetischen Modifizierung des Promotors durch Methylierung, die Auswirkungen auf die Genfunktion sowie auf die Zellen erläutert werden.

```
(-254)CTTTAACTGCC[CG][CG]AGAGACCTACCACAAGC[CG]GTGGTTCAG[CG]ACCCAG[CG]CATC  
CTTTTCCTGGCCA[CG]CCCTCTTTGTCTACACCCTTCCCATCC[CG]GCCA[CG]CCCCA[CG][CG][CG]  
[GCG]GCCCCCCTACTCCAGCCTAGCCA[CG]CCCCTCCCC[CG]TCGCG[CG]GCGCAC[CG]TCCGT  
C[CG]AATGGCCT[CG]TGGG[CG]GAGCTTG[CG]TAGCCTCC[CG]GACCC[CG]G[CG]CACAC[CG]CCCCC[CG]  
[G]CCCC[CG]CCC(+1)CTGGCCACCAAGCGCCTCCGTGGACACGCACTTCCTGCGAGGCCTCCGT  
GCGCACCTTGGCCGAGCCGAACCGAGCCGAGTCCTGTCTTCCAGGCCGTTTCGCAATGGTGGA  
TGAGTTGGTCAATGGTGGATGAGTTGGTGCTGCTGCTGCACGCGCTCCTGATGCGGCACCGCGC  
CCTGAGCATCGAGAACAGCCAGCTCATGGAACAGCTGCGGCTGCTGGTGTGCGAGAGGGCCAG  
CCTGCTGCGCCAGGTACGTCCGCCGAGCTGCCCGGTGCCCTTCCCCGAAACGTTTAATGGCGA  
GAGTCCCGGCTCCCCGAGTTTATCGTGCAGACGGCGTCTTACATGCTCGTGAACGAGAACCGA  
TTCTGCAACGACGCCATGAAGGTGGCATTCTAATCAGCCTCCTCACCGGGGAAGCCGAGGAGT  
GGGTGGTGCCCTACATCGAGATGGATAGCCCCATCCTAGGTGATTACCGGGCCTTCTCGATGA  
GATGAAACAGTGCTTTGGCTGGGATGACGACGAAGACGACGACGACGAAGAAGAGGAGGATGAT  
TATTAGGCC
```

Abbildung 3: LDOC1-Promotor. CG Dinukleotide im Promotor durch Kästchen markiert (GenBank, ID: 23641); schwarz = Promotor, rot = Exon, blau = Intron, Startcodon ATG unterstrichen.

2. Material und Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

2.1.1 Geräte

- Brutschrank, HERAcell 150i CO₂ Incubator (Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland)
- Elektrobloiting-Apparat, Mini Trans Blot® cell (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Elektrophoresestromquelle, Consort 1200V-500mA E815 (Consort, Parklaan Belgien)
- Filterpapier, Mini-Trans Blot® Filter Paper (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Gelkassettenhalter, Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Kühlschrank (LIEBHERR, Ochsenhausen, Deutschland)
- Mikroskop, Zeiss Axiophot Fluoreszenz Mikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland)
- Mini Gel Holder Cassette (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- PVDF Membran, Immobilon™ Transfer Membranes (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)
- Quantitatives PCR-Gerät (Applied Biosystems, Carlsstadt, Kalifornien, USA)
- Schüttler, Vibrax Serono Shaker (Serono, Rockland, USA)
- Standard PCR-Gerät (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Sterilbank, Laminar Air Flow Sterilbank HERA Safe (Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland)
- Stickstofftank (Linde, Unterschleißheim, Deutschland)
- Stromquelle (Consort, Parklaan, Belgien)

- Tischzentrifuge (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Zentrifuge, Heraeus Biofuge Stratos Centrifuge (Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland)

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

- 10x Blue Juice Gel Loading Buffer (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 96-Well-Platten (VWR, Ismaning, Deutschland)
- Deckgläser für Mikroskopie 24x24 mm (Menzelgläser, Gerhard Menzel, Braunschweig, Deutschland)
- DNA-Marker, pBR 328 Mix I (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- E-Gel with SYBR (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Gefriercontainer, 5100 Cryo 1°C Freezing Container "Mr. Frosty" (Nalgene®, Thermo Scientific, Roskilde, Dänemark)
- Gelkassetten, Mini-PROTEAN® TGX™ Long Shelf Precast Gels, 10-well comb. (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Kryoröhrchen (1,5 ml) (Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland)
- Kulturflaschen, IWAKI® 25cm² /canted neck tissue culture flask with vent cap (IWAKI brand Scitech Div. Asahi Techno Glass, Tokyo, Japan)
- Objektträger 76x26x1 mm (Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland)
- Objektträger, Lab-Tek II Chamber Slide™ System 4 Well Glass Slide (Thermo Fisher Scientific Inc., Dreieich, Deutschland)
- Petrischalen, Greiner Bio-One Cellstar tissue culture dishes (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland)
- Pipetten (1000 µl, 200 µl, 10 µl) (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Pipettenspitzen, SafeSeal Tips Premium (Biozym, Hessisch Oldendorf, Deutschland)

- Pistill (#P7339-901, Argos Technologies, Elgin, Illinois, USA)
- Röhrchen (15 ml, 50 ml), Falcon Blue Max (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Safe-Lock-Gefäß (1,5 ml) (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- Schwämme, Mini-Trans-Blot Fiber Pads (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml) (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA)
- Spritze (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland)
- Zellkulturgefäß, quadriPERM® (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

2.2 Chemikalien und Biochemikalien

- 10x Tris/Glycin-Puffer (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- 10x Tris/Glycin/SDS-Puffer (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Auftragspuffer, Roti Load-1 Auftragspuffer, reduzierend (4-fach Konz.) (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- BCIP/NBT Color Development Substrate (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland)
- Destilliertes Wasser (Noll, München, Deutschland)
- DMSO (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- HBSS mit Ca²⁺ und Mg²⁺ (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Kälberserum (PAA, Pasching, Österreich)
- Magnesiumchlorid-Hexahydrat, ≥ 99% Zellkulturqualität (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Methanol, ≥ 99,98% Ultra LC-MS Methylalkohol (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Milchpulver Blotting Grade (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Natriumazid (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

- Natriumchlorid zur Analyse (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland)
- PBS, Dulbecco's PBS (1x) without Ca & Mg (PAA, Pasching, Österreich)
- Penicillin/Streptomycin (100x) (PAA, Pasching, Österreich)
- Pferdeserum (PAA, Pasching, Österreich)
- Proteinmarker, peqGold Protein-Marker IV (PeqLab Biotechnology GmbH, Erlangen, Deutschland)
- RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Trypsin-EDTA (1x) (PAA, Pasching, Österreich)
- Tumorzellmedium, Quantum Tumor 263 for Tumor cells with L-Glutamine (PAA, Pasching, Österreich)
- Tween® 20 (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Tris PUFFERAN® ≥99,3%, Buffer Grade (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Lipofectamin 2000 transfection reagent (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- pcDNA3.1/V5-His-TOPO Expressions Vektor (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- TRIzol reagent (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- RNase-free water (Promega, Mannheim, Deutschland)
- MMVL-reverse transcriptase (Promega, Mannheim, Deutschland)
- PCR master mix (M7505, Promega, Mannheim, Deutschland)
- iTaq Fast Supermix with ROX (BioRad, München, Deutschland)
- VECTASHIELD® HardSet™ Mounting Medium (Axxora, Lörrach, Deutschland).

2.3 Verwendete Primer

Semiquantitative PCR

Primer Paar	5'→3'	5'→3'
LDOC1	CGCAATGGTGGATGAGTTGG	ATAATCATCCTCCTCTTCTTCGT CG
β-Aktin	GGAGAAGCTGTGCTACGTCG	CGCTCAGGAGGAGCAATGAT

Quantitative PCR

Primer Paar	5'→3'	5'→3'	FAM-5'→TAMRA-3'
LDOC1	GGGTGGTGCCCTACA TCGAG	ATAATCATCCTCCTCTTCTTC GTCG	TAGGTGATTACCGGGCCTTC
β-Aktin	GGAGAAGCTGTGCT ACGTCG	ATCATTGCTCCTCCTGAACG	CCTTCCTGGGCATGGAGTC
LDOC1- MSP	TGAGATCGGATTTAG CGTTC	CTAAATCGCTAAACCACCGA	GAGTTAGGGGAGTTTATTTTA G

MSP= methylierungsspezifische PCR, LDOC1-MSP nach Lee, Wong et al. 2013.

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Biomers (Biomers.net, Ulm, Deutschland) synthetisiert.

2.4 Verwendete Puffer

- Auftragspuffer, Roti Load-1 Auftragspuffer, reduzierend (4-fach Konz.) (Carl Roth GmbH und Co. KG, Karlsruhe, Deutschland)
- Blockingpuffer (4% Milchpulver in PBS mit 0,05% Azid und 0,01% Tween)
- Entwicklungspuffer (100mM Tris, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂ mit 50µl BCIP und 100µl NBT)
- Gelelektrophoresepuffer (10x Tris/Glycin/SDS Puffer in einer Konzentration von

1/10 in destilliertem Wasser verdünnt)

- RIPA-Puffer (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Transferpuffer (10% von 10x Tris/Glycin Puffer und 10% Methanol in destilliertem Wasser)

2.5 Medikamente

- 5-Aza-2'-Deoxycytidin, ein klinisch bewährter und erprobter Inhibitor der DNA-Methyltransferase

2.6 Antikörper

2.6.1 Verwendete Antikörper für den Western-Blot

Erstantikörper:

- Maus-anti-V5 tag Antikörper #9452 (AbD Serotec, Puchheim, Deutschland)
- Kaninchen-anti-MTA1 Antikörper (Bethyl, Montgomery, USA)
- Maus-anti-Aktin Antikörper (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)
- Ziege-anti-LDOC1 Antikörper (E-13) (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland)
- Kaninchen-anti-LDOC1 Antikörper (Sigma-Aldrich, München, Deutschland)

Zweitantikörper:

- Alkalische Phosphatase-konjugiertes-Ziegen-Anti-Maus-IgG (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland)

2.6.2 Verwendete Antikörper für die Immunfluoreszenz

Erstantikörper:

- Maus-Anti-V5 tag Antikörper #9452 (AbD Serotec, Puchheim, Deutschland)

Zweitantikörper:

- CyTM 3-konjugiertes-Ziegen-Anti-Maus IgG (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland)

2.7 Kommerziell erhältliche Komplettsysteme

- RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland)
- NucleoSpin Tissue DNA Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- Cells-to CpG Bisulfite Conversion Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, Kalifornien, USA)
- V5 Fusion TOPO TA Expression Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

2.8 Zellkultur und Zelllinien

2.8.1 Verwendete Zelllinien

Zervixkarzinomzelllinien

- Humane Zervixkarzinomzelllinie HeLa (American type culture collection (ATCC) CCL-2): es handelt sich um humane Epithelzellen eines Adenokarzinoms. Mit den HeLa- Zellen wurde die erste permanente Zellkultur etabliert.
- Humane Zervixkarzinomzelllinie Me180 (ATCC HTB-33, ATCC LGC Standards, Wesel, Deutschland); Epidermoidkarzinom
- Humane Zervixkarzinomzelllinie C33A (ATCC HTB31, ATCC LGC Standards, Wesel, Deutschland)
- Humane Zervixkarzinomzelllinie CaSki (ATCC CRL-1550, ATCC LGC Standards, Wesel, Deutschland); Epidermoidkarzinom
- Humane Zervixkarzinomzelllinie SW756 (ATCC CRL-10302, ATCC LGC Standards, Wesel, Deutschland); Plattenepithelkarzinom
- Humane Zervixkarzinomzelllinie SiHa (ATCC HTB-35, ATCC LGC Standards, Wesel, Deutschland); Plattenepithelkarzinom

Ovarialkarzinomzelllinien

- OV-MZ-6, OV-MZ-26, OV-MZ-30, OV-MZ-31, OV-MZ-33, OV-MZ-37, OV-MZ-38 (etabliert durch Prof. Dr. Volker Möbus, Frankfurt, Deutschland)

Sonstige

- Immortalisierte human foreskin fibroblasts (BJ6tert) (von Dr. Gabriele Saretzki, Newcastle, UK)
- Human peripheral mononuclear blood cells (PMBC)

2.8.2 Zellkultur

Die Zellkultur dient der Anzucht immortalisierter Zellen *in vitro* unter kontrollierten Bedingungen mit einem bestimmten Nährmedium, das Wachstum, Differenzierung und Proliferation ermöglicht. In der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine adhärente Zellkultur, bei der sich z.B. Epithelzellen im Verlauf ihrer Kultivierung an die beschichtete Oberfläche des Kulturgefäßes anheften.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien wurden ursprünglich direkt aus einem Tumor isoliert und als Zelllinie etabliert. In der Zellkultur wurden die Zellen bei 37°C in Quantum 263 Medium, dem L-Glutamin und Antibiotika zugesetzt sind, in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO₂ Zusatz kultiviert.

Die Arbeit mit den Zelllinien erfolgte stets unter der Sterilbank zur Vermeidung von Kontamination mit z.B. Pilzen.

Mediumwechsel

Abhängig von Wachstumsgeschwindigkeit, Metabolismus und Vitalität der Zellen wurde in regelmäßigen Abständen ein Mediumwechsel vorgenommen. Dadurch können die metabolisierten Inhaltsstoffe ersetzt und durch den Stoffwechsel angefallene Abbauprodukte entfernt werden.

Die Zellen wurden im Brutschrank in 25cm³ Kulturflaschen in 10ml Medium inkubiert und in regelmäßigen Abständen die Zelldichte im Mikroskop kontrolliert. Zeigte sich das Medium gelblich oder trüb oder waren die Zellen zu dicht, so wurde ein Mediumwechsel vorgenommen. Hierbei wurden die 10ml Quantum 263 durch frisches Nährmedium der gleichen Menge

ersetzt. Dies erfolgte durch Abgießen oder Pipettieren, wobei dafür Sorge getragen wurde, dass sich zur Vermeidung von Kontamination im Flaschenhals und Deckel der Kulturflaschen kein zellreiches Medium angesammelt hatte.

Subkultivierung

Adhärente Zelllinien bedürfen zur Subkultivierung zuerst einer enzymatischen oder mechanischen Loslösung von der Oberfläche (Detachment). Abhängig von Wachstumsgeschwindigkeit, Kontaktinhibierung und Metabolismus wurde die Subkultivierung in unterschiedlichen zeitlichen Abständen vorgenommen. Bei einer Konfluenz von 70-80% wurde in der Regel passagiert, da mit zunehmender Zelldichte das Nährstoffangebot und der pH-Wert sinken. Bei raschem Wachstum der Zellen, insbesondere der HeLa-Zellen, war nach 1-2 Tagen eine Ausdünnung der Zellen erforderlich, um weiterhin stabile Kulturbedingungen aufrecht zu erhalten. Dazu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und danach 1ml Trypsin zugegeben, sodass sich der gesamte Flaschenboden von Trypsin bedeckt zeigte. Es erfolgte die Inkubation im Brutschrank, je nach Zelltyp und Zelldichte von unterschiedlicher Dauer.

Im Phasenkontrastmikroskop wurde kontrolliert, ob sich die Zellverbände untereinander und die Adhärenz am Kulturflaschenboden gelöst hatten. Ein Indikator hierfür ist die Änderung ihrer Morphologie in Form von Abrundung. Durch Abschlagen der Kulturflaschen konnte die Loslösung beschleunigt werden (shake off).

Im nächsten Schritt wurde Trypsin abgegossen und wieder Medium zugegeben. Ein Teil des Mediums konnte nun in ein weiteres Gefäß (eine Flasche, eine Well-Platte, ein Chamber Slide zur Immunfluoreszenz) überführt oder ein Teil verworfen werden.

2.8.3 Kryokonservierung der Zellen

Die Kryokonservierung dient dem Einfrieren und der zeitlich unbefristeten Lagerung von Zellen unter -130°C .

Die Zellen wurden anfangs trypsinisiert und im Brutschrank inkubiert. Nachdem sich die Zellverbände untereinander und die Adhärenz am Flaschenboden gelöst hatten, wurde Medium hinzugegeben, um die Wirkung des Trypsins zu antagonisieren. 1ml der Suspension wurde darauf in ein Safe-Lock-Gefäß überführt. Es folgte die Zentrifugation mit der Handzentrifuge, anschließend wurde der Überstand abpipettiert.

Zum Pellet wurden 1,5ml Freezing Medium (ibidi, Martinsried, Deutschland) gegeben und das Pellet damit aufgelöst. Mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gewährleistete dabei eine gute Auflösung des Pellet. In einem sterilen Kryoröhrchen wurden die Zellen für einen Tag bei -80°C gelagert, bevor sie endgültig in flüssigem Stickstoff konserviert werden konnten. Die transiente Aufbewahrung in dem Kryogefriercontainer bei -80°C gewährleistet eine konstante und schockarme (-1°C/min) Abkühlung der Zellen.

2.8.4 Untersuchung der Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop

Die Fluoreszenzmikroskopie dient der selektiven und kontrastreichen Darstellung bestimmter Strukturen innerhalb und außerhalb der Zellen. In der Immunhistochemie bedient man sich Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelter Antikörper zur Darstellung und Detektion der entsprechenden Antigene.

Für die Immunfluoreszenz wurden die Zellen aus der Zellkultur trypsinisiert und als Suspension in sogenannte Chamber Slides pipettiert, wo sie unter Zellkulturbedingungen weiter anwachsen konnten.

Wurde eine ausreichende Zelldichte im Phasenkontrastmikroskop festgestellt, erfolgten zur Fixierung der Zellen auf der Slide die Entfernung des Mediums und die Zugabe von Ethanol. Es wurde anschließend 2-3x mit PBS gewaschen und dann ein erster Antikörper hinzugegeben. Es folgte die Inkubation der Zellen für 2 Stunden mit dem primären Antikörper. Nach 2 Stunden wurde der primäre Antikörper entfernt und der zweite Waschgang mit PBS (2-3x Waschen) schloss sich an. Der sekundäre Antikörper wurde zugegeben und die Zellen für weitere 45 Min. lichtgeschützt inkubiert.

Nach Entfernung des sekundären Antikörpers wurde im dritten Waschgang erneut 2-3x mit PBS gewaschen. Zuletzt erfolgte das Waschen mit H₂O, das keine Salzkristalle bilden und somit nicht bei der mikroskopischen Betrachtung stören kann. Nach Entfernung des Wassers wurden die Kammern von der Slide abmontiert und die Slides mit selbsthärtendem Einbettmedium fixiert (VECTASHIELD® HardSet™ Mounting Medium, Axxora, Lörrach, Deutschland).

2.8.5 Gewinnung von Gewebeproben

Gewebeproben der Zervix uteri wurden während der chirurgischen Eingriffe an der Klinik für Geburtshilfe und Frauenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität München in der Maiastraße gewonnen. Die Proben stammten entweder von einer Totalen Mesometrialen Resektion (TMMR), einer laparoskopisch assistierten radikalen vaginalen Hysterektomie (LAVRH) oder einer laparoskopischen radikalen Hysterektomie (LRH). In jedem Fall wurden jeweils zwei Proben makroskopisch gesunden Gewebes und zwei Proben von makroskopisch tumorösem Gewebe von der Portio vaginalis uteri entnommen. Die Studie wurde durch das Ethikkomitee des Universitätskrankenhauses München genehmigt (Studiennummer 204-12) und das Einverständnis der Patientinnen vor jeder Operation nach ausführlicher Aufklärung schriftlich festgehalten.

2.8.6 RNA-Präparation und cDNA-Synthese

Ribonukleinsäuren (RNAs) sind, anders als DNA, besonders instabil und anfällig für den Abbau durch RNAsen, die Phosphodiesterbindungen lösen und somit die RNA zerstören. RNAsen sind äußerst stabil und ubiquitär in der Umwelt vorhanden. Bei allen Verfahren zur Isolierung von RNA gilt es daher, bei dem ersten Schritt der Isolierung, dem Lysevorgang der Zellen, auch die RNAsen zu zerstören. Das Prinzip der RNA-Isolierung besteht aus drei Hauptschritten: der Zellyse, der Inaktivierung der RNAsen und der Isolierung der RNA. Die isolierte Gesamt-RNA setzt sich dabei aus ribosomaler RNA (rRNA), Transfer-RNA (tRNA), messenger RNA (mRNA) und weiteren zusammen. Die mRNA hat mit 2% einen verhältnismäßig geringen Anteil an der Gesamt-RNA.

RNA Präparation aus Zervix- und Ovarialkarzinom-Zellkulturen

Die Präparation von RNA aus Zervix- und Ovarialkarzinomzellen, die in einem Monolayer in der Zellkultur wachsen, erfolgte mit dem RNeasy Plus Mini Kit (Quiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben. Das Kit vereinfacht die RNA-Gewinnung mit Hilfe von gDNA eliminator spin columns. In drei Schritten wurde die Präparation der RNA aus Zellkulturzellen durchgeführt, wobei lysiert, filtriert und anschließend eluiert wird – alternierend mit mehreren Waschschrritten.

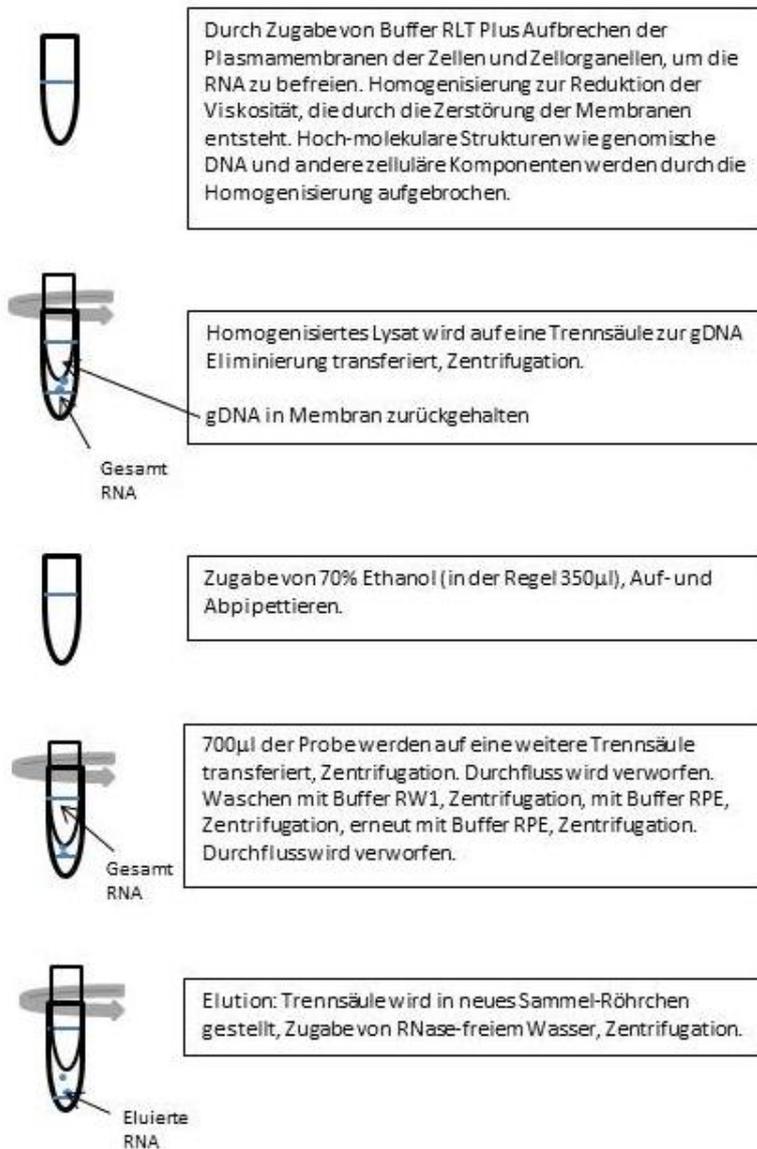


Abbildung 4: RNA Präparation mit Hilfe des RNeasy Plus Mini Kit.

Aufbereitung von Gewebeproben zur RNA-Gewinnung

Die Aufbereitung und Präparation der RNA aus Gewebeproben konnte aus technischen Gründen nicht mit dem „Kit“ durchgeführt werden, sondern erfolgte mit der TRIzol Methode basierend auf der single-step-Methode nach Chomczynski und Sacchi. TRIzol enthält Guanidiniumthiocyanat, das für die Denaturierung aller Proteine und Enzyme, so auch aller RNAsen und DNAsen verantwortlich ist. Phenol bewirkt die Lösung der RNA, Chloroform die Auftrennung in drei verschiedene Phasen. Die wässrige, obere Phase enthält die RNA, die untere,

organische Phase die Proteine und die dazwischenliegende Interphase enthält die DNA. Somit ermöglicht das TRIzol-Reagenz die Isolierung von sowohl DNA, RNA als auch Proteinen.

Aus jeweils zwei gesunden Kontrollproben und zwei Karzinom-Gewebeproben derselben Patientin wurden kleinere Stücke mit Hilfe eines Skalpells gewonnen. Diese wurden mit jeweils 1ml TRIzol in ein Safe-Lock-Gefäß gegeben und das Gewebe mit einer Pistill zerdrückt, bis es eine gummiartige Konsistenz aufwies. Es erfolgte die Zugabe von 200µl Chloroform. Danach wurde die Suspension energisch mit der Hand geschüttelt. Die Lösung nahm daraufhin eine rosige Farbe an. Es wurde für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss das Homogenisat für 15 Min. bei 4°C und 12.000xg zentrifugiert. Es zeigte sich eine Auftrennung in drei Phasen: eine untere, rötliche Phase, eine mittlere, weiße Phase und darüber eine wässrige Phase. Die obere Phase mit der RNA wurde vorsichtig und sauber abpipettiert, in ein frisches Safe-Lock-Röhrchen überführt und mit 500µl Isopropyl Alkohol gemischt. Für weitere 10 Min. wurde bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend bei 12.000xg für 10 Min. bei 4°C zentrifugiert. Daran schloss sich die Entfernung des Überstandes und das Waschen des RNA-Pellet einmalig mit 75% Ethanol an, es folgte Vortexen, anschließend die Zentrifugation für 5 Min. bei 7.500xg und 4°C.

Das Pellet wurde 5 Min. getrocknet und dann in 33µl RNase-freiem Wasser aufgelöst.

- a) 1ml TRIzol werden zu Gewebe in ein Safe-Lock-Gefäß gegeben und mit Pistill zerdrückt
- b) Zugabe von 200µl Chloroform und Inkubation für 2 Min. bei RT, Zentrifugation für 15 Min. bei 4°C und 12.000xg
- c) Obere Phase abpipettieren, in ein neues Safe-Lock-Gefäß transferieren und Zugabe von 500µl Isopropyl Alkohol
- d) 10 Min. Inkubation bei RT, Zentrifugation für 10 Min. bei 4°C und 12.000xg
- e) Entfernung des Überstandes, Waschen des RNA-Pellet mit 75% Ethanol
- f) Vortexen, Zentrifugation für 5 Min. bei 4°C und 7.500xg
- g) 5 Min. Trocknen des Pellet
- h) Auflösung in 33µl RNase- freiem Wasser

Tabelle 1: Vorgang der RNA-Gewinnung aus Gewebeproben mittels TRIzol-Methode.

cDNA-Synthese

Von der aus der Gewebepräparation gewonnenen RNA und der Ribonukleinsäure der Zelllinien aus der Zellkultur wurden jeweils 33µl RNA in cDNA umgeschrieben.

Zuerst wurde dazu oligo(dT) zu der RNA gegeben, das an eine mRNA-spezifische Sequenz, die Poly-A-Sequenz, bindet. Daraufhin erfolgte eine 5-minütige Inkubation bei 70°C, um Sekundärstränge zu lösen und die Anheftung der Oligonukleotide zu ermöglichen. Zur Verhinderung der Renaturierung wurden die Proben anschließend sofort auf Eis gestellt. Dann wurde zu der RNA ein Mastermix, der einen Puffer, dNTPs, einen RNase-Inhibitor und die Reverse Transkriptase enthält, gegeben. Im Anschluss fand die Inkubation in einem Thermocycler für eine Stunde bei 42°C statt. Währenddessen erfolgte die Synthese der cDNA mittels reverser Transkription.

Schritte der cDNA-Synthese

0.75µl einer Lösung von 100µM oligo(dT) werden zu 33µl RNA hinzugefügt, die man bei 2.8.6 gewonnen hat (ca. 2µg RNA)

Inkubation für 5 Min. bei 70°C, dann sofort Kühlung auf Eis und Hinzugabe von:

- a) 5µl M-MLV reverse transcriptase 5x reaction buffer (#M531A, Promega)
- b) 1.25µl recombinant RNasin ribonuclease inhibitor (#N2511, Promega)
- c) 1µl M-MLV reverse transcriptase (#M170B, Promega)

Inkubation für 60 Min. bei 42°C, dann sofort Kühlung auf Eis

Tabelle 2: Schritte der cDNA-Synthese.

2.8.7 PCR und PCR-Bedingungen

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion stellt ein Verfahren zur exponentiellen Amplifizierung von Nukleinsäuren dar. Durch vielfache Wiederholungen und Verwendung der bereits hergestellten Produkte entstehen durch exponentielle Vermehrung die Kopien der Ausgangssequenz von Interesse. Bei der PCR bedient man sich einer hitzestabilen DNA-Polymerase (Taq-Polymerase), welche die Synthese der zur template-DNA komplementären Stränge vor-

nimmt. Voraussetzung für die Arbeit ist ein freies 3'-OH-Ende, an dem dieses Enzym die Arbeit aufnehmen kann. Dieses OH-Ende liefert der vorher angelagerte Primer.

Der Vorgang der Polymerasekettenreaktion findet in einem Thermocycler statt, in dem die Reagenzien eine alternierende Abkühlung und Erhitzung durchlaufen. Diese Zyklen werden so oft wiederholt, bis ein Plateau erreicht ist, bei dem keine signifikante Amplifikation mehr stattfindet. Je nach Primer ist die Zyklenzahl unterschiedlich zu wählen (z.B. β -Aktin Primer \rightarrow 25 Zyklen).

Semiquantitative PCR

Der Standard-PCR bedient man sich bei Fragestellungen, welche die Anwesenheit oder Abwesenheit einer bestimmten Sequenz untersuchen.

Im ersten Schritt der Polymerase-Kettenreaktion erfolgt eine initiale Denaturierung bei 94°C, bei der die Doppelstränge durch Lösung von Wasserstoffbrückenbindungen voneinander getrennt werden. Anschließend setzt die Primerhybridisierung ein, das sogenannte Annealing, bei dem sich die Primer an die komplementären Basenpaare der DNA anlagern. Dies geschieht bei ca. 60°C für etwa eine Minute. Die Temperatur beim Annealing richtet sich nach der Länge und Art des Primers. Je niedriger die Temperatur, desto unspezifischer sind die eingegangenen Bindungen. Ist die Temperatur zu hoch gewählt, findet die Anlagerung des Primers an die DNA unter Umständen gar nicht statt. Die Elongation, die bei 72°C erfolgt, bezeichnet die Phase des Einbaus von Nukleinsäuren in 5' \rightarrow 3'-Richtung durch die Polymerase. Dabei startet diese am freien 3'-OH-Ende des angelagerten Primers und fügt fortschreitend komplementäre Basen an den sich verlängernden Doppelstrang an. Bei Beendigung der Zyklen kühlt der Thermozykler auf 4°C ab.

In ein steriles 100µl PCR-Röhrchen wurden folgende Komponenten gegeben (25µl Ansatz):

Reagenz	Volumen
cDNA, die man bei 2.8.6 gewonnen hat	1µl
Primer Mix (Primer wurden in einer Verdünnung von 1:10 eingesetzt; absolute Konzentration 100nM/ml)	1µl
2xPCR Master Mix (enthält Taq Polymerase und dNTP, #M750C, Promega)	12,5µl
H ₂ O	10,5µl
Ansatzmenge	25µl

Tabelle 3: Ansatz für die semiquantitative PCR.

Die Komponenten wurden auf Eis zusammenpipettiert, zuletzt wurde die cDNA zugegeben. Für mehrere PCR-Ansätze wurde ein Mastermix hergestellt.

Schritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	94°C	5min.
Denaturierung	94°C	1min.
23-36 Zyklen Quantifizierung		
Primerhybridisierung	57-63°C	1min.
Elongation	72°C	1min.
Abkühlung	4°C	10min.

Tabelle 4: Ablauf der semiquantitativen PCR.

Die Reaktionsansätze wurden nach Beendigung des Prozesses mit 10µl 10x Probenpuffer (Blue Juice) versetzt und mittels DNA-Gelelektrophorese analysiert.

Agarose Gelelektrophorese

Bei der Agarose Gelelektrophorese werden die DNA-Moleküle in horizontalen Agarosegelen ihrer Größe nach aufgetrennt, indem sie im elektrischen Feld ein mit Puffer getränktes Agaro-

segel durchlaufen. Zur Auftrennung der DNA-Fragmente wurde E-Gel 2% mit SYBR von Invitrogen verwendet. Je kleiner das Molekül, desto schneller seine Laufzeit durch das Gel und desto weiter der Abstand zu größeren Molekülen. Als Anfärbungsreagenz diente das hochsensitive SYBR® Safe DNA Gel Stain zur Visualisierung von DNA in Agarosegelen. Die angefärbte DNA konnte mit dem Molecular Imager Gel Doc XR+ von BioRad, das einen UV-Bereich zwischen 470nm und 530nm abdeckt, sichtbar gemacht und analysiert werden. Die Analyse erfolgte mit der Image Lab 2.0 Software.

Quantitative PCR

Die quantitative PCR kommt zum Einsatz, wenn die Menge der amplifizierten Sequenz in Echtzeit bestimmt werden soll. Die qPCR diente in der vorliegenden Studie dazu, die unterschiedliche Expression von LDOC1 und β -Aktin in den Gewebeproben zu bestimmen und eine Aussage darüber zu machen, wie stark die Expression eines Gens durch Behandlung mit bestimmten Stoffen im Vergleich zu einer unbehandelten Probe ansteigt.

Bei der qPCR wird ein Signal generiert, das proportional zur amplifizierten Menge an DNA ist. Dieses Signal wird detektiert und gemessen. Die PCR-Software misst dabei in der exponentiellen Phase des Amplifizierungsvorgangs, wobei man annähernd von einer Verdopplung der Ziel-DNA pro Zyklus ausgehen kann. Ein Plateau wird erreicht, wenn die Reagenzien zum limitierenden Faktor werden.

Die TaqMan-Methode ist die Methode der Wahl und wurde von Roche (Basel, Switzerland) und ABI (Foster City, USA) entwickelt. Dabei bindet eine Sonde komplementär an die zu vervielfältigende DNA-Sequenz. An ihrem 5'-Ende trägt die Sonde einen Farbstoff (FAM, TAMRA), an ihrem 3'-Ende einen sogenannten „Quencher“. Dabei sorgt der Quencher für eine Abdeckung des Reporterfarbstoffs. Bindet allerdings die Taq-Polymerase an die DNA und startet den Ablesevorgang, dann wird durch ihre 5'-3'-Exonuklease-Aktivität die Sonde bei der Synthese des Gegenstrangs abgebaut. Dadurch werden Reporterfarbstoff und Quencher voneinander getrennt und der freiwerdende Farbstoff wird am Ende jedes Zyklus detektiert.

Die Fluoreszenz dieses Farbstoffs wird nach Anregung mit einer Wellenlänge von 488nm gemessen. Da bei jedem neu synthetisierten Strang Farbstoff freigesetzt wird, ist das Fluoreszenzsignal der amplifizierten DNA-Menge proportional.

Das Software-Programm ermittelt aus dem detektierten Signal einen CT-Wert („Cyclus Threshold“). Dieser Wert gibt die Zykluszahl an, bei der das Fluoreszenzsignal erstmals exponentiell über eine definierte Schwelle steigt.

Folgende Komponenten wurden in eine spezielle 96-Well PCR Platte (VWR, Ismaning, Deutschland) pipettiert, dabei wurde sie auf Eis gekühlt, um einen verfrühten Reaktionsbeginn zu verhindern. Zur Verbesserung der Genauigkeit wurde bei mehreren Ansätzen zuvor ein Mastermix hergestellt.

Reagenz	Volumen
iTaq Fast Supermix with ROX	10µl
H ₂ O	8µl
Primer	1µl
cDNA	1µl
Ansatzmenge	20µl

Tabelle 5: Ansatz für die quantitative PCR.

2.8.8 DNA-Isolierung aus Zellkulturen

Die DNA-Isolierung erfolgte mit dem NucleoSpin Tissue DNA Purification Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) wie vom Hersteller empfohlen.

Das Kit erlaubt die Präparation genomischer DNA aus Zelllinien aus der Zellkultur und aus Gewebeproben. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses Kit zur Aufbereitung der Zervixkarzinomzelllinien (HeLa, CaSki, Sw756, Me180, SiHa, C33) und Ovarialkarzinomzelllinien (OV-MZ-6, OV-MZ-26, OV-MZ-30, OV-MZ-31, OV-MZ-33, OV-MZ-37, OV-MZ-38) verwendet. In einem ersten Schritt erfolgte die Zelllysis sowie Proteindenaturierung, daraufhin wurde die DNA mit Hilfe einer NucleoSpin Tissue Column gebunden und in einem letzten Schritt nach mehrfachem Waschen eluiert.

2.8.9 CpG Bisulfit-Konvertierung der DNA

Die Bisulfit-Konvertierung ist ein Verfahren, bei dem Cytosine in den CpG-Inseln der DNA durch Zugabe von Natriumhydrogensulfit (Bisulfit) zu Uracil deaminiert werden. Sequenziert man die konvertierte DNA, so finden sich an denjenigen Stellen der Sequenz, an denen sich ursprünglich ein Cytosin befunden hatte, ein Uracil/Thymidin. Für die epigenetische Analyse entscheidend ist, dass nur die nicht methylierten Cytosin-Basen mit Natriumhydrogensulfit konvertiert werden. Dies bietet die Möglichkeit, zwischen methylierter und nicht methylierter DNA-Sequenz zu unterscheiden. Dazu dient die methylierungsspezifische PCR (MSP), mit der selektiv der Methylierungsstatus der Region von Interesse untersucht werden kann, indem Primer zum Einsatz kommen, die komplementär zu methylierter DNA sind. Das Primer-Design spielt dabei eine entscheidende Rolle. MSP-Primer sollten ausreichend CpG-Sequenzen in der Bindungsstelle des Primers enthalten, um die maximale Diskrimination zwischen methylierter und nicht methylierter DNA zu ermöglichen. Ferner sollten die CpG-Stellen so nah wie möglich an dem 3'-Ende des Primers gelegen sein. Zusätzlich ist eine hohe Anzahl an von nicht-CpG abgeleiteten Thymidinen empfehlenswert, um eine ausreichende Spezifität der konvertierten DNA sicherzustellen (Hernandez, Tse et al. 2013).

Da die beiden DNA-Stränge nach Bisulfit-Konvertierung nicht mehr komplementär zueinander sind, können Primer sowohl für den Sense-, als auch für den Antisense-Strang hergestellt werden (Herman, Graff et al. 1996).

Durch Bisulfit-Konvertierung und anschließende Amplifikation mittels PCR weisen die Rückwärtsprimer der nicht methylierten DNA statt eines Guanin ein Adenin auf. Dieses bildet ein Basenpaar mit Thymidin/Uracil, dem durch Natriumhydrogensulfit konvertierten Cytosin. Vorwärtsprimer für die nicht methylierte Sequenz weisen statt eines Cytosins ein Thymidin in ihrer Sequenz auf.

Wird methylierte DNA untersucht, bleiben die Guanine in der Primersequenz erhalten. Ihnen ist das Cytosin einer methylierten ^{me}CpG-Insel komplementär, das nicht durch Natriumhydrogensulfit deaminiert wird.

Mit dem Cells-to-CpG Bisulfite Conversion Kit von Applied Biosystems wurde die DNA mit Bisulfit behandelt, sodass alle Cytosin-Basen in Uracil konvertiert wurden. Ziel dieser Konvertierung war es, den Methylierungsgrad des LDOC1-Promotors darzustellen. Nach der Behandlung mit Bisulfit erfolgte die Amplifikation der veränderten DNA mit sequenzspezifischen Primern.

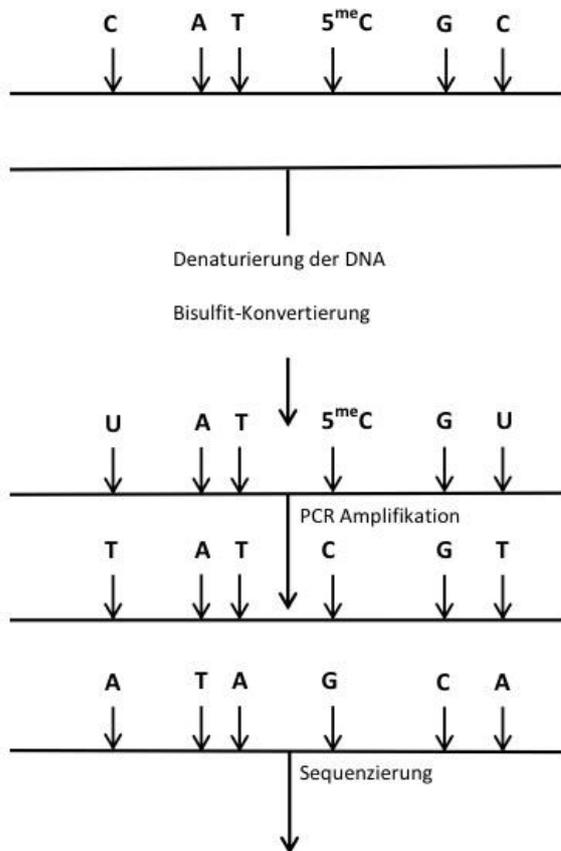


Abbildung 5: Illustration der Natriumhydrogensulfit-PCR Technik zur Identifikation von 5-Methylcytosin in der DNA-Sequenz (Nach: Ibrahim 2010).

Bisulfit-Konvertierung	
Denaturierung der genomischen DNA	10 Min. bei 50°C Inkubation
Konversion mit Bisulfit	30 Min. 65°C Inkubation
Entsalzen und Desulfonieren	Binden an eine Säule
Waschen und Zentrifugieren	
Eluieren der Bisulfit-konvertierten DNA von der Säule	

Tabelle 6: Ablauf der Bisulfit-Konvertierung.

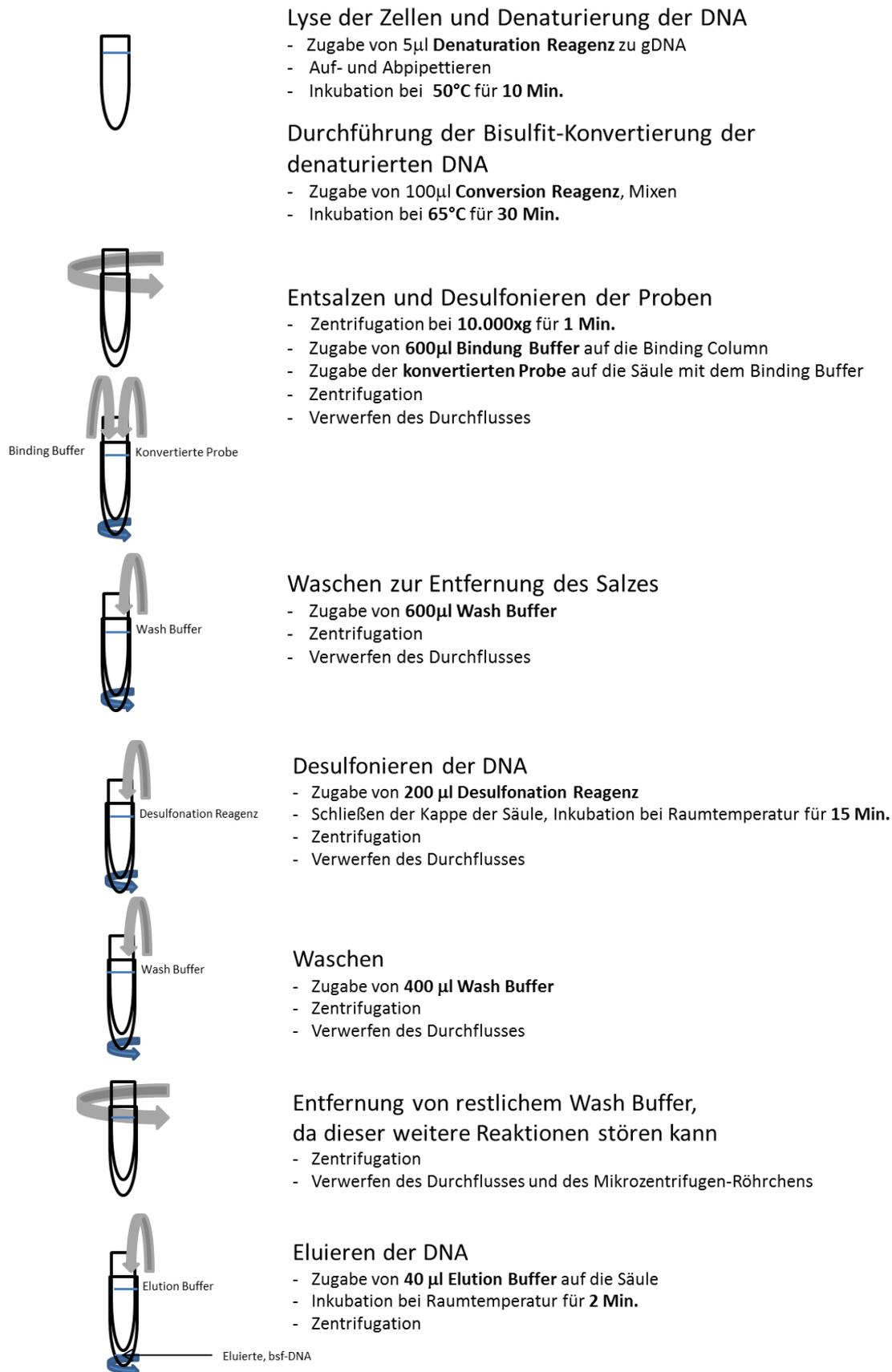


Abbildung 6: Ablauf der Bisulfit-Konvertierung mit dem Cells-to-CpG Bisulfite Conversion Kit.

2.8.10 Behandlung der Zervixkarzinom- und Ovarialkarzinomzelllinien mit dem DNMTase Inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidin

Bei 5-Aza-2'-deoxycytidin (Decitabin) handelt es sich um ein Cytidin-Analogon. Es wirkt als klinisch erprobter DNA-Methyltransferase(DNMT)-Inhibitor. Da durch Decitabin nicht direkt das bestehende Methylierungsmuster aufgehoben wird, sondern eine weitere Methylierung durch Enzyminhibierung verhindert wird, muss eine mehrfache Zellteilung abgewartet werden, ebenso wie eine spezifische Konzentration ermittelt werden, die genügend Zellzyklen mit inhibierter DNMT ermöglicht, aber noch kein Absterben der Zellen bewirkt.

Durch eine genomweite Hypomethylierung -induziert durch 5-Aza-2'-deoxycytidin- erfolgte die Untersuchung der Veränderung in der Expression spezifischer Gene.

In einer 6-Well-Platte wurde zu den Zelllinien Me180, SiHa (Zervixkarzinom) und den Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-30 und OV-MZ-37 Decitabin in jeweils einer Konzentration von 50µM und 25µM bzw. bei den Ovarialkarzinomzelllinien nur in einer Konzentration von 50µM zugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden erfolgten die Isolierung der RNA, die cDNA-Synthese sowie die PCR-basierte Analyse der LDOC1 Expression in den jeweiligen Kontrollzelllinien und den mit 5-Aza-2'-deoxycytidin behandelten Zelllinien.

2.8.11 Transfektion von LDOC1 Expressionsplasmiden

Da sich die Arbeit an dem Transkriptionsfaktor LDOC1 bisher nur auf die RNA-Ebene erstreckte, sollten die Ergebnisse um die Untersuchung von LDOC1 auf Proteinebene ergänzt werden.

In diesem Zusammenhang von mir getestete kommerziell erhältliche Antikörper gegen LDOC1 (Sigma-Aldrich, München, Deutschland; Santa Cruz Biotchnology, Heidelberg, Deutschland) hatten allerdings kein Signal sowohl in der Immunfluoreszenz als auch dem Western Blot erbracht. Bei (mRNA)-positiven HeLa und CaSki Zellen ergaben sich weder im Western Blot Banden im entsprechenden Molekulargewicht (ohne Abbildung), noch eine Färbung in der Immunfluoreszenz (ohne Abbildung). Um zumindest eine sichere Positivkontrolle zu haben, wurde in Zusammenarbeit mit unserem Labor ein V5-verknüpftes LDOC1 Expressionsplasmid generiert. Die LDOC1-cDNA von HeLa-Zellen wurde dabei mit Hilfe des PCR-Primer Paars 5'-CGCAATGGTGGATGAGTTGG-3' und 5'-

ATAATCATCCTCCTCTTCTTCGTCG-3' amplifiziert und das PCR-Produkt in den pcDNA3.1/V5-His-TOPO Expressionsvektor integriert. Die Plasmidklonierung, Selektion, und Sequenzierung wurden von Mitarbeitern des Labors parallel zu dieser Doktorarbeit durchgeführt.

Im Anschluss führte ich die Transfektion des LDOC1 Expressionsplasmids in HeLa Zellen durch, sodass die Antikörper gegen LDOC1 hier an einer Positivkontrolle getestet werden konnten bzw. zumindest über das V5 Epitop ein Nachweis der LDOC1 Transfektion erbracht werden konnte.

LDOC1-V5 und MTA1-V5 Expressionsplasmide (als im Labor etablierte Expressions- und Transfektionskontrolle) wurden mit Hilfe von Lipofectamin 2000 in HeLa Zellen transfiziert. Dies erfolgte auf Chamber Slides. Nach 48 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen mit eiskaltem Methanol fixiert, mit PBS gewaschen und für weitere 2 Stunden mit den LDOC1/MTA1 Antikörpern bzw. einem Maus-anti-V5 monoklonalen Antikörper inkubiert. Nach Entfernung des primären Antikörpers und erneutem Waschen mit PBS wurde der sekundäre Cy3-konjugierte Ziege-anti-Kaninchen bzw. anti-Maus-Antikörper zugegeben. Anschließend folgte die Analyse unter dem Fluoreszenzmikroskop.

2.8.12 Immunoblot nach Laemmli (Western Blot)

Herstellung von Zelllysaten

Zur Durchführung eines Western Blots wurden HeLa Zellen in einer 24-Well Platte kultiviert und mit Hilfe von Lipofectamin 2000 mit einem LDOC1-V5 und MTA1-V5 Expressionsplasmid transfiziert (1µg Plasmid/50µl serumfreies Medium gemischt mit 1µl Lipofectamin/50µl serumfreies Medium; Zugabe des Gemischs zu 400µl Zellkulturmedium pro 24-Well). Nach vorgeschriebener Transfektionszeit und ausreichend dichtem Zellrasen (70% Zellkonfluenz) wurden Zelllysate hergestellt. Dazu wurde das Medium abpipettiert und 100µl Ripa-Puffer hinzugegeben, sodass der gesamte Boden der Platte benetzt war. Die Zellen wurden für ca. 15 Min. eingefroren, damit die sich bildenden Eiskristalle die Zellmembranen besser aufbrachen.

Die so lysierten Zellen wurden aufgetaut und mit dem Puffer durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vom Boden der Schale gewaschen. Das Homogenisat wurde daraufhin in ein Safe-Lock-Gefäß überführt und für 2 Min. in der Tischzentrifuge zentrifugiert.

Der Überstand, der sich gebildet hatte, enthielt die für den Western Blot benötigten Proteine und wurde in ein neues Safe-Lock-Röhrchen überführt. Zu diesem wurden 20µl 4x Sample Buffer hinzugegeben.

Die so gewonnenen Proben konnten direkt für einen Western Blot verwendet oder für spätere Versuche eingefroren werden.

Methodik der Gelelektrophorese

Um Proteine mit spezifischen Antikörpern zu detektieren, wurden sie nach der SDS-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert.

Zuerst wurden dazu die Proteingemische mit Hilfe der Gelelektrophorese Technik dem Molekulargewicht nach aufgetrennt. Zwei Gelkassetten mit vorgefertigten Polyacrylamidgelen und mit jeweils zehn Kammern wurden mit 1x Tris/Glycin/SDS-Puffer in einer Konzentration von 1:10 in den dazugehörigen Kassettenhalter gebracht. Bevor die einzelnen Kammern mit den Proben befüllt werden konnten, wurden sie mit Hilfe einer Spritze gespült und Luftblasen entfernt. Danach erfolgte die langsame Gabe von jeweils 20µl des Proteingemisches in die Kammern, zwei weitere Kammern wurden mit jeweils 10µl Proteinmarker beladen. Es wurde für ca. 30 Min. eine Spannung von 200V angelegt und eine Stromstärke von 90mA eingestellt. Der sich während des Laufs sichtbar auftrennende Proteinmarker zeigte eine ausreichend lange Laufzeit an.

Methodik des Western Blots

Im nächsten Schritt wurden die Gele mit den negativ geladenen Proteinen aus der Gelkassette entnommen und im Sandwich-Verfahren (Schwamm, Filterpapier, PVDF-Membran, Gel, Filterpapier, Schwamm) in Transferpuffer (10% von 10x Tris/Glycin-Puffer und 10% Methanol in destilliertem Wasser) auf eine PVDF-Membran gelegt. Die PVDF-Membran war zuvor mit Methanol getränkt worden. Der in einer speziellen Kassette eingespannte „Sandwich“ wurde zusammen mit dem Transferpuffer und einem Eisblock in einen vorgesehenen Elektroblooming-Apparat eingebracht und bei 200mA für eine Stunde geblottet. Das Gel mit seinen negativ geladenen Proteinen war dabei kathodenwärts, die Membran in Richtung der Anode ausgerichtet. Nun erfolgte die Übertragung der Proteine vom Gel auf die Membran. Nach Beendigung des Transfers wurde die PVDF-Membran kurz mit PBS gewaschen.

Um die Bindung an unspezifische Bindungsstellen auf der Western Blot Membran zu verhindern, wurde diese über 2 Stunden mit Bloomingpuffer (4% Milchpulver in PBS mit 0,05% Azid

und 0,01% Tween) auf dem Schüttler blockiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (je 5 Min.) wurden die Blots über Nacht mit dem Erstantikörper in einer Konzentration von 1:1000 bei Raumtemperatur unter Schütteln inkubiert.

Am nächsten Tag wurde der Erstantikörper entfernt, nach Waschung mit PBS für 3x5 Min. erfolgte die Zugabe des sekundären Antikörpers in einer Konzentration von 1:1000. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur erfolgte die Entfernung des Zweitantikörpers, darauf wurde mit PBS für 3x5 Min. gewaschen. Nun folgte die Sichtbarmachung der Proteine auf der Membran mittels Farbreaktion.

Dazu wurde zu der PVDF-Membran 15ml Entwicklungspuffer (100mM Tris, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂) mit 50µl BCIP und 100µl NBT gegeben. Bei leichtem Schwenken wurden die Proteinbanden auf der Membran sichtbar. Es erfolgten ein letzter Waschgang mit destilliertem Wasser und ein Trocknen der entwickelten Membranen.

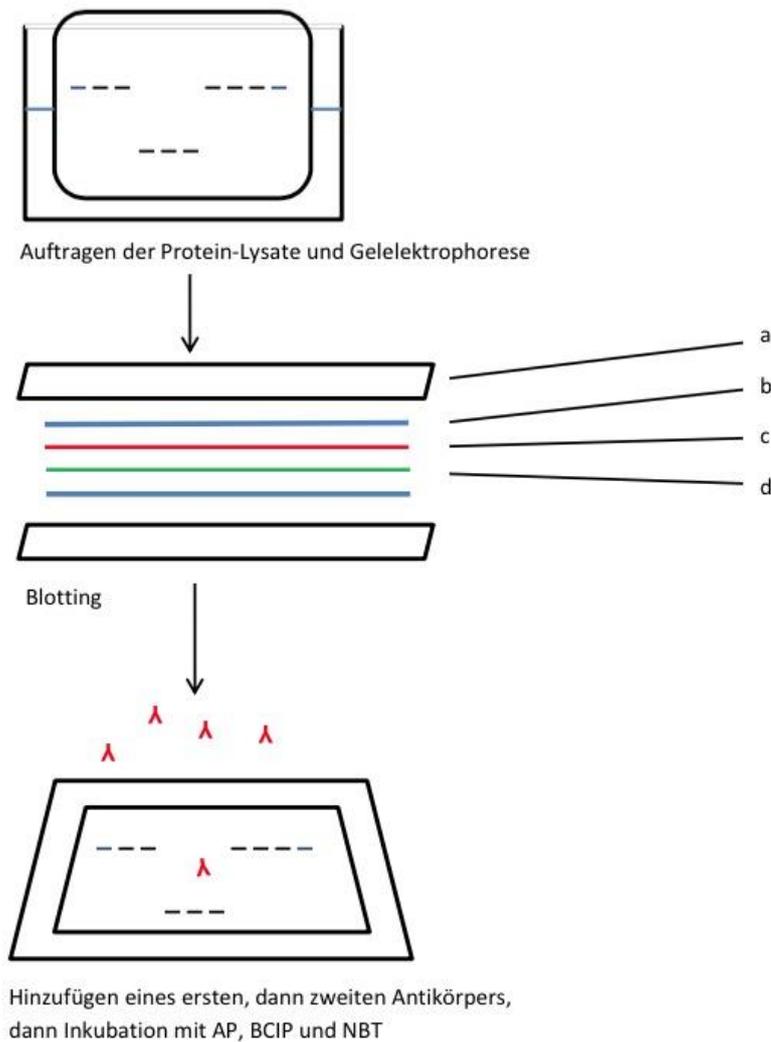


Abbildung 7: Darstellung des Immunoblot nach Laemmli. a, Schwamm; b, Filterpapier; c, Gel; d, PVDF Membran.

3. Ergebnisse

3.1 Expression von LDOC1 in Zervixkarzinom- und Ovarialkarzinomzelllinien

Um die Expression von LDOC1 in Zervix- und Ovarialkarzinomzelllinien zu untersuchen, wurde eine RT-PCR mit sechs etablierten Zervixkarzinomzelllinien und mit sieben Ovarialkarzinomzelllinien durchgeführt. In vier der sechs Zervixkarzinomzelllinien war die LDOC1-

mRNA nicht detektierbar (Abbildung 8). Die Analyse der Zervixkarzinomzelllinien wurde durch die quantitative real-time PCR ergänzt (Abbildung 8B) und erbrachte korrespondierende Ergebnisse zu Abbildung 8A. Mit der RT-PCR konnte außerdem gezeigt werden, dass LDOC1 in nicht malignen Zellen wie Fibroblasten und peripheren mononukleären Blutzellen (PMBC) exprimiert wird (Abbildung 8A).

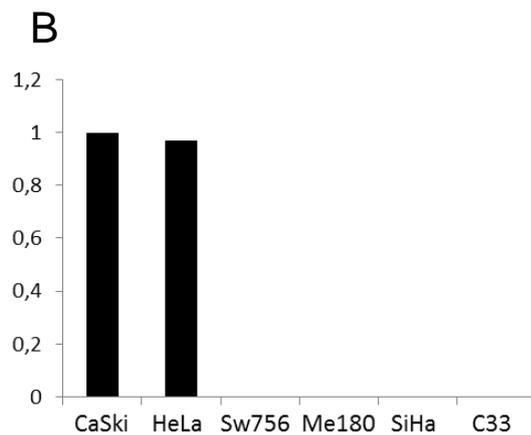
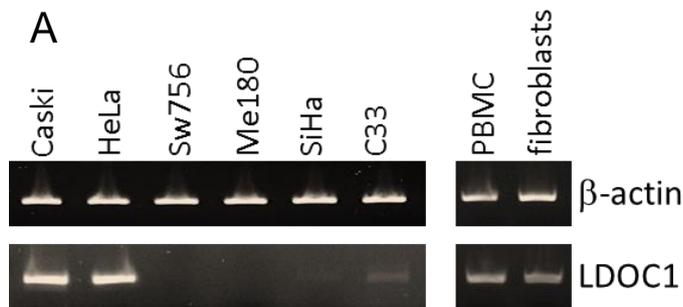


Abbildung 8: Expression von LDOC1 in Zervixkarzinomzelllinien. Sechs Zervixkarzinomzelllinien wurden mittels semiquantitativer RT-PCR auf die Expression von LDOC1 untersucht. Zervixkarzinomzellen aus (A) wurden zusätzlich durch quantitative real-time PCR Analyse auf die Expression von LDOC1 hin untersucht (B). Die Expression von β -Aktin wurde als cDNA Qualitätskontrolle bei der RT-PCR (A) verwendet. Als Referenz diente β -Aktin auch bei der Expressionsanalyse mittels real-time PCR und der $2^{-\Delta\Delta CT}$ Methode (B).

Bei drei der sieben Ovarialkarzinomzelllinien ließ sich mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR ebenfalls kein Signal feststellen (Abbildung 9).

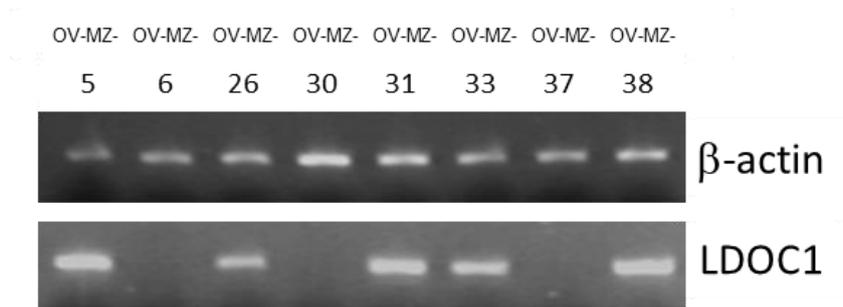


Abbildung 9: Expression von LDOC1 in Ovarialkarzinomzelllinien. Sieben Ovarialkarzinomzelllinien wurden mittels semiquantitativer RT-PCR auf die LDOC1 Expression untersucht. Die β -Aktin-Expression diente als cDNA-Qualitätskontrolle bei der RT-PCR Analyse.

Die Analyse der mRNA zeigte einen Expressionsverlust des Genprodukts LDOC1 bei vier Zervix- und drei Ovarialkarzinomzelllinien, dessen zugrunde liegender Mechanismus zu klären blieb. Ferner fiel auf, dass es sich nicht um eine differentielle Expression des zu untersuchenden Genprodukts LDOC1 handelt, sondern um einen vollständigen Verlust der Expression von LDOC1 bei den Zelllinien Sw756, Me180, SiHa und C33 sowie OV-MZ-6, OV-MZ-30 und OV-MZ-37.

3.2 Methylierungsanalyse des LDOC1-Promotors von Zervixkarzinom- und Ovarialkarzinomzelllinien

Die folgenden Untersuchungen sollten Informationen darüber liefern, durch welchen Mechanismus die LDOC1-Ausschaltung in Zervix- und Ovarialkarzinomzelllinien ausgelöst wird. Zu testende Hypothesen waren die Gendeletion, das Rearrangement von Genen und epigenetische Regulation. Zu diesem Zweck wurde an genomischer DNA („gDNA“) von Zervix- und Ovarialkarzinomzelllinien eine PCR Analyse durchgeführt und auf die Präsenz oder Absenz der kodierenden Region von LDOC1 getestet. In allen sechs getesteten Zervix- und allen sieben Ovarialkarzinomzelllinien konnte die volle kodierende Region von LDOC1 amplifiziert werden (Abbildung 10A, 10B). Dabei wurden die Primer so gewählt, dass sie das Start- und Stoppcodon mit einschlossen, sodass die gesamte kodierende Region in der PCR amplifiziert wurde. Eine Gendeletion war hiernach als Mechanismus der LDOC1-Ausschaltung auszuschließen.

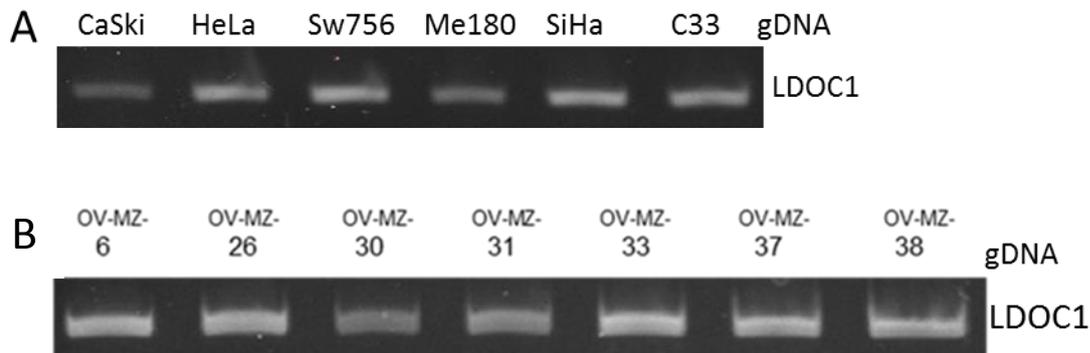


Abbildung 10: Qualitative PCR Analyse genomischer DNA von Zervix- und Ovarialkarzinomzelllinien. Die genomische DNA der Zervixkarzinomzelllinien (A) und der Ovarialkarzinomzelllinien (B) wurde mittels semiquantitativer PCR Analyse auf Anwesenheit der kodierenden Sequenz von LDOC1 untersucht.

Im nächsten Schritt erfolgte die Konversion der genomischen DNA der Zervix- und Ovarialkarzinomzelllinien mit Hilfe der Bisulfit-Reaktion sowie die Analyse der Promotorregion von LDOC1 mit methylierungsspezifischen Primern (Lee, Wong et al. 2013). Eine positive Reaktion auf Promotormethylierung ließ sich genau bei den vier Zervixkarzinomzelllinien nachweisen, die in der mRNA Analyse den Verlust der Expression des Genproduktes gezeigt hatten (SW756, Me180, SiHa, C33) (Abbildung 11A).

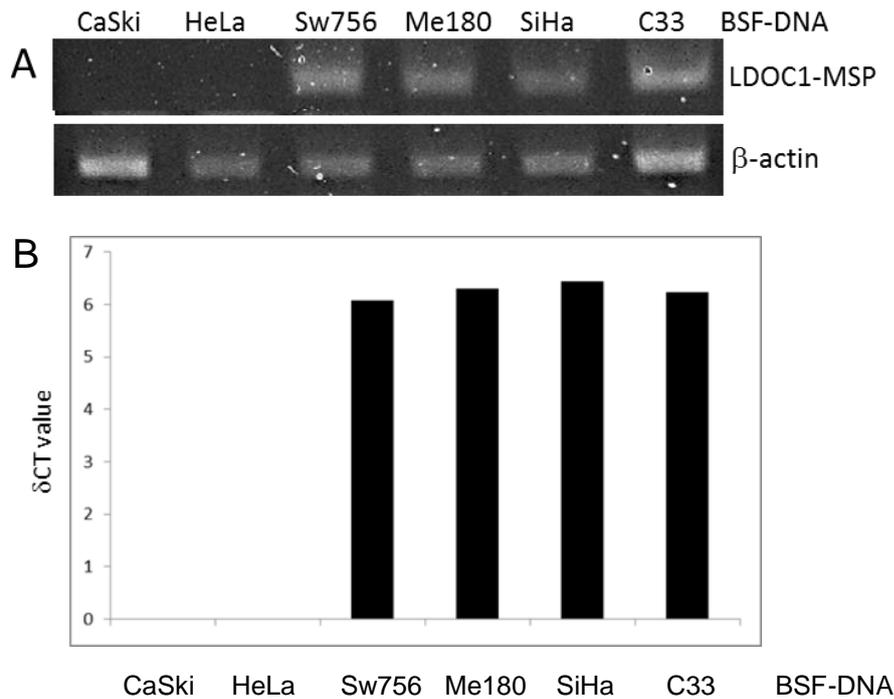


Abbildung 11: PCR Analyse Bisulfit-konvertierter DNA von Zervixkarzinomzelllinien. (A) PCR Analyse Bisulfit-konvertierter DNA von Zervixkarzinomzelllinien mit methylierungsspezifischen LDOC1-Primern (LDOC1-MSP) und genomischen β -Aktin Primern. (B) Die Proben aus (A) wurden zusätzlich durch eine methylierungsspezifische real-time PCR Analyse charakterisiert. Es konnte kein real-time PCR Signal (Ct-Wert= 40; $\delta\delta$ Ct-Wert =0) bei der DNA aus CaSki oder HeLa Zellen detektiert werden.

Ferner wurden die Proben aus Abbildung 11A durch eine methylierungsspezifische real-time PCR charakterisiert (Abbildung 11B), was die Ergebnisse der Standard-PCR noch einmal bestätigte. Das Fehlen eines Signals bei den Zelllinien CaSki und HeLa lässt den Schluss zu, dass bei den LDOC1-Promotoren dieser beiden Zelllinien keine Methylierung vorliegt. Methylierungsspezifische Primer für β -Aktin dienten dabei als Qualitätskontrolle der konvertierten DNA.

Auch bei den Ovarialkarzinomzelllinien ließ sich anhand der methylierungsspezifischen PCR ein Signal bei denjenigen Zelllinien OV-MZ-6, OVMZ-30 und OV-MZ-37 feststellen, die zuvor einen Verlust der LDOC1-mRNA gezeigt hatten. Auch hier indiziert ein Fehlen des Signals bei OV-MZ-26, OV-MZ-31, OV-MZ-33 und OV-MZ-38 in der MSP, dass die Promotoren dieser Zelllinien nicht methyliert sind (Abbildung 12).

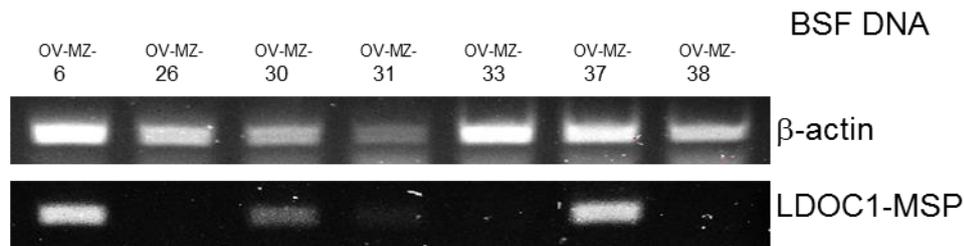


Abbildung 12: PCR Analyse Bisulfit-konvertierter DNA von Ovarialkarzinomzelllinien. Qualitative PCR Analyse von Bisulfit-konvertierter DNA von Ovarialkarzinomzelllinien mit genomischen β -Aktin Primern und mit methylierungsspezifischen LDOC1-Primern (LDOC1-MSP).

3.3 Reexpression von LDOC1 nach Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin

Um den Mechanismus der epigenetischen Regulierung für die LDOC1-Ausschaltung zu bestätigen, wurden die Zervixkarzinomzelllinien Me180 und SiHa und die Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-30 und OV-MZ-37 mit 5-Aza-2'-deoxycytidin behandelt (Decitabin). Bei Decitabin handelt es sich um einen klinisch erprobten DNA-Methyltransferase-Inhibitor. Über die Unterbindung weiterer Methylierung durch den DNMT-Inhibitor kommt es zur Reexpression von durch Methylierung ausgeschalteten Genen. Sowohl in der quantitativen als auch der semiquantitativen RT-PCR Analyse zeigte sich deutlich, dass die LDOC1 Expression in den Zelllinien Me180, SiHa, OV-MZ-30 und OV-MZ-37 durch 5-Aza-2'-deoxycytidin wiederhergestellt werden konnte (Abbildung 13, 14). Bei wiederholten Durchführungen des Versuches mit verschiedenen Konzentrationen von 5-Aza-2'-deoxycytidin konnte eine stärkere Reexpression von LDOC1 mit steigender Konzentration nachgewiesen werden. Dies galt allerdings nur bis zu einem bestimmten Wert, denn ab einer Konzentration von 50 μ M überwog der zytotoxische Effekt von Decitabin (Zellkulturbeobachtung).

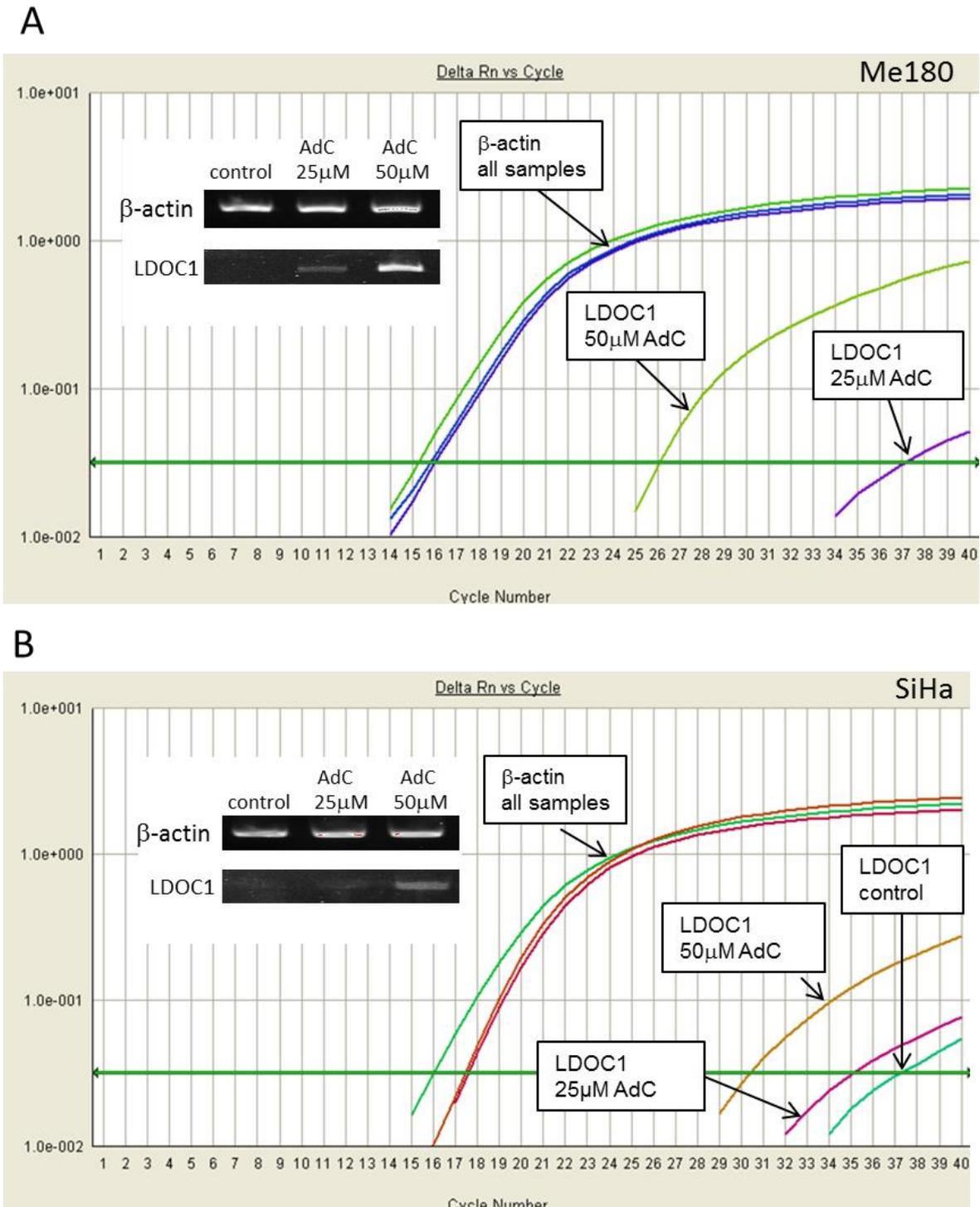
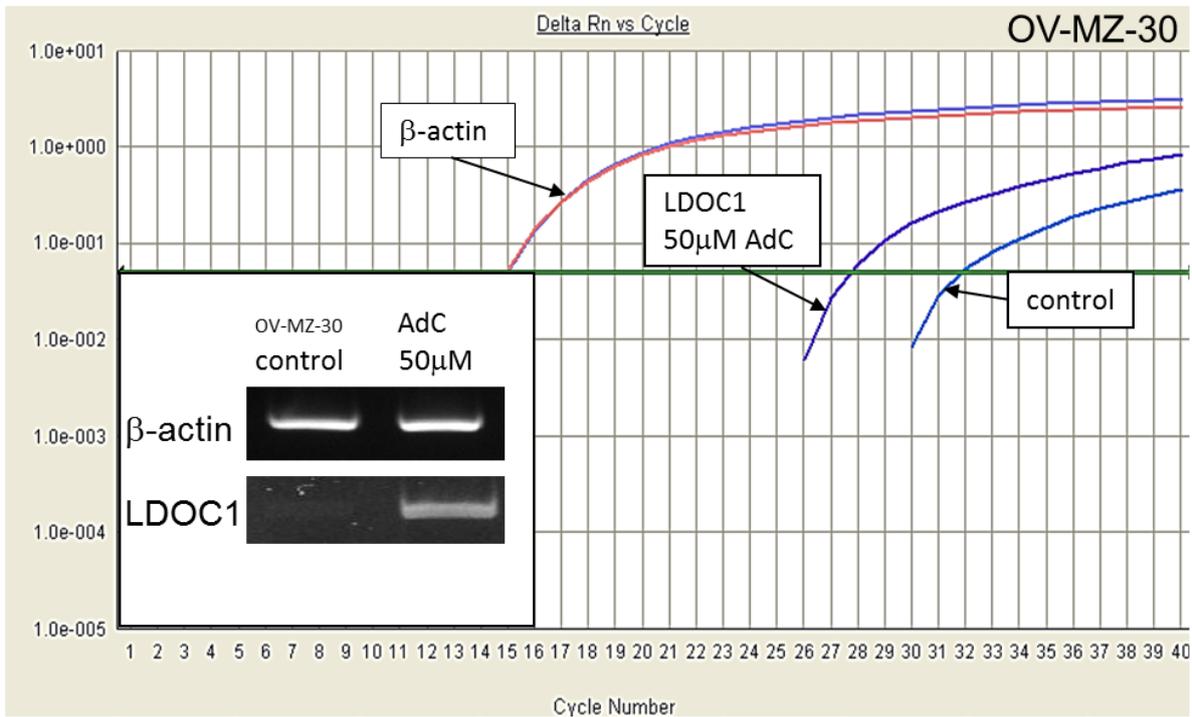


Abbildung 13: Reexpression von LDOC1 in Zervixkarzinomzelllinien durch die Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin. Me180 (A) und SiHa (B) Zervixkarzinomzelllinien wurden über 72h mit 5-Aza-2'-deoxycytidin inkubiert und darauf mittels real-time PCR und Agarose-basierter PCR (eingefügtes kleines Bild) im Hinblick auf die Expression von LDOC1 analysiert.

A



B

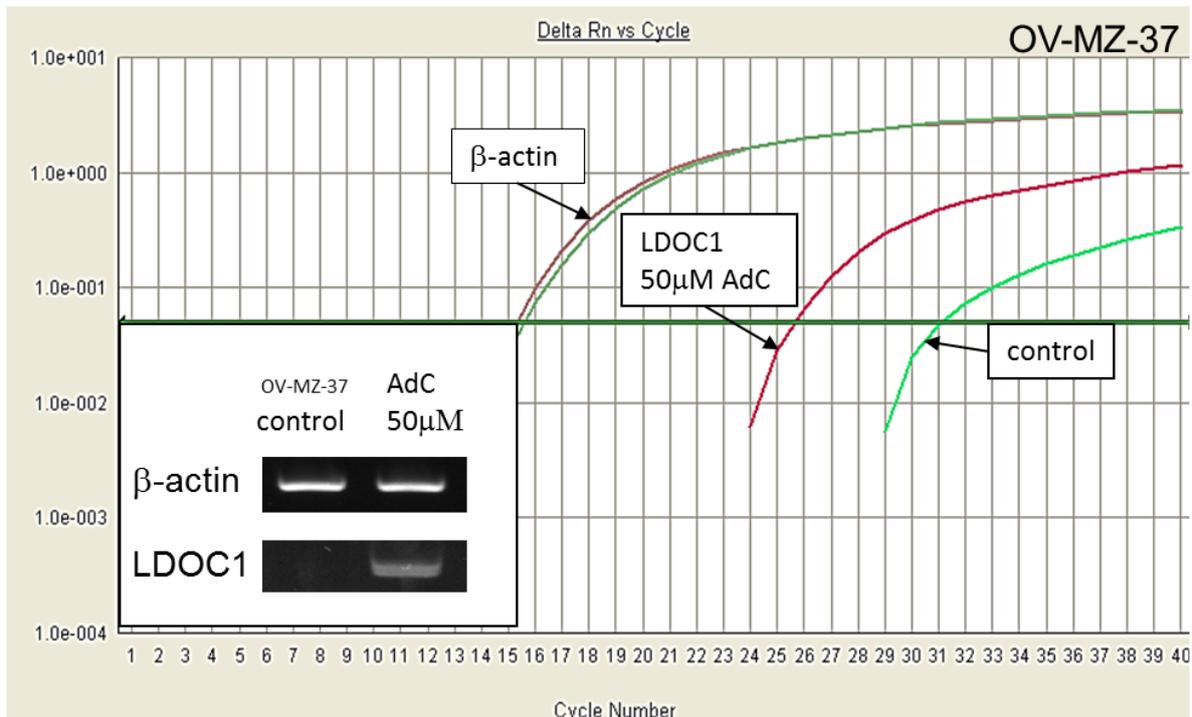


Abbildung 14: Reexpression von LDOC1 in Ovarialkarzinomzelllinien durch die Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin. OV-MZ-30 (A) und OV-MZ-37 (B) Ovarialkarzinomzelllinien wurden über 72h mit 50 μ M 5-Aza-2'-deoxycytidin inkubiert und anschließend mittels real-time PCR und

Agarose-basierter RT-PCR (eingefügtes kleines Bild) im Hinblick auf die Expression von LDOC1 analysiert.

3.4 Expression von LDOC1 in Zervixkarzinom-Geweben

Um die Expression von LDOC1 in Zervixkarzinom-Geweben zu untersuchen, wurde eine quantitative real-time PCR von Gewebeproben durchgeführt, die von neun Patientinnen während der Operation gewonnen worden waren. Eine deutliche Herunterregulierung der LDOC1-mRNA zeigte sich bei drei verschiedenen Proben (3, 4, 8). Eine Heraufregulierung der LDOC1-mRNA fand sich unerwartet ebenfalls bei drei Proben (1, 2, 5). Kein Unterschied in der LDOC1 Expression im Vergleich zu gesunden Gewebeproben der Cervix uteri der jeweils selben Patientin zeigte sich bei drei weiteren Proben (6, 7, 9) (Abbildung 15).

Mit den Ergebnissen der Proben 3, 4 und 8 konnten die in den Zellkulturexperimenten beobachteten LDOC1-Verluste somit auch in vivo beobachtet werden, d.h. in einer Subgruppe von Zervixkarzinomen bzw. Zellen kann es zu einem Verlust von LDOC1 kommen. Die Ergebnisse der Proben als Ganzes deuten jedoch darauf hin, dass es sich bei der LDOC1-Regulation in Einzelfällen auch um eine differentielle Über-Expression handeln kann.

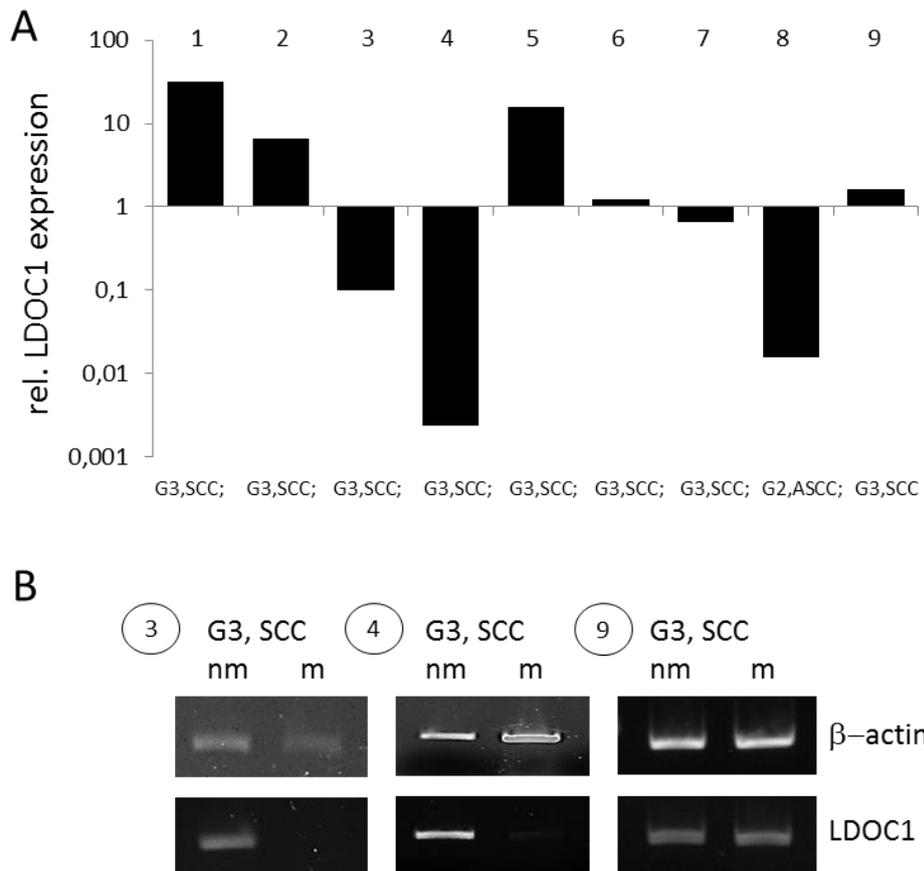


Abbildung 15: Analyse der LDOC1 Expression in Zervixkarzinom-Gewebeproben und nicht malignen Gewebeproben der Cervix uteri. Gewebebiopsien wurden von der Portio der Cervix uteri von jeweils Zervixkarzinom und nicht malignem Kontrollgewebe derselben Patientin gewonnen. Die LDOC1 Expression wurde mittels real-time PCR Analyse gemessen. Die relative LDOC1 Expression in malignen Zervixkarzinom-Gewebeproben ($LDOC1_{\text{tumor}}/\beta\text{-Aktin}_{\text{tumor}}$) wurde in Relation zur relativen LDOC1 Expression in nicht malignem Gewebe gesetzt ($LDOC1_{\text{control}}/\beta\text{-Aktin}_{\text{control}}$). (B) Semiquantitative RT-PCR Analyse von ausgewählten Gewebeproben aus (A). NM, nicht maligne Proben der Portio vaginalis uteri; M, maligne Proben, Zervixkarzinom; SCC, Plattenepithelkarzinom; ASCC, Adenokarzinom.

3.5 Überexpression von LDOC1 induziert Zelltod in Zervixkarzinomzelllinien

Um die Expression und Regulation von LDOC1 auch auf Proteinebene zu zeigen, wurden verschiedene kommerziell erhältliche Antikörper getestet. Leider zeigte keiner der von uns

gekauften Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland; Sigma-Aldrich, München, Deutschland), die von mir getestet wurden, eine positive Reaktion, weder im Western Blot noch in der Immunfluoreszenz (ohne Bild). Diese negative Erfahrung mit kommerziellen LDOC1 Antikörpern hatten jedoch auch schon andere Arbeitsgruppen gemacht (Duzkale, Schweighofer et al. 2011; Mizutani, Koike et al. 2005). Im Labor wurde darum von anderen Mitarbeitern parallel zu dieser Arbeit ein LDOC1 Expressionsplasmid generiert, um zumindest eine Positivkontrolle zu haben.

Bei dem zusätzlich anklonierten Epitop V5 handelt es sich um ein Fusionsprotein, das zum Nachweis von Proteinen herangezogen werden kann, für die kein geeigneter Antikörper zur Verfügung steht. Leider reagierten die kommerziellen Antikörper auch hier nicht gegen das überexprimierte Gen (meine Arbeiten; ohne Abbildung), obwohl sich eine deutliche Reaktion auf das V5 Epitop ergab, welches sich auch im Western Blot auf Höhe des zu erwartenden LDOC1-V5 Proteins (17 + 6 kDa) befand (Arbeiten der „Plasmidklonierungsgruppe“; Abbildung 16). Neben dem Expressionsnachweis ergaben sich aber auch noch weitere, morphologische Veränderungen bei den LDOC1 transfizierten Zelllinien, die sich bei Kontrolltransfektionen, wie etwa mit dem Transkriptionsfaktor MTA1 (metastasis-associated gene 1), nicht ergaben. Transiente Transfektion in HeLa Zellen resultierte in einer irregulären und apoptotischen Morphologie mit nukleärer und zytoplasmatischer Färbung für LDOC1 unter dem Fluoreszenzmikroskop (Abbildung 16A). HeLa Zellen wurden in diesem Versuch verwendet, da sie normalerweise eine hohe Transfektionseffizienz von 60-90% zeigen. Dennoch erschien die Effizienz der Transfektion von LDOC1-V5 nur schwach und auf eine kleine Anzahl von Zellen beschränkt. Dies war als Indiz dafür anzusehen, dass entweder andere zelluläre Mechanismen existieren, die mit der LDOC1-Proteinexpression und -Stabilisierung zusammenhängen oder dass viele der transfizierten und apoptotischen Zellen bereits schon abgestorben und abgelöst waren. Im Gegensatz zur LDOC1-Transfektion erschien die Transfektionseffizienz von dem Proonkogen MTA1, das hier zu Vergleichszwecken herangezogen wurde, in HeLa Zellen sehr viel höher. Dies konnte mit Hilfe der Immunfluoreszenz Analyse und der Western Blot Analyse anschaulich gemacht werden (Abbildung 16). Außerdem zeigten MTA1-überexprimierende Zellen keine morphologischen Zeichen von Apoptose.

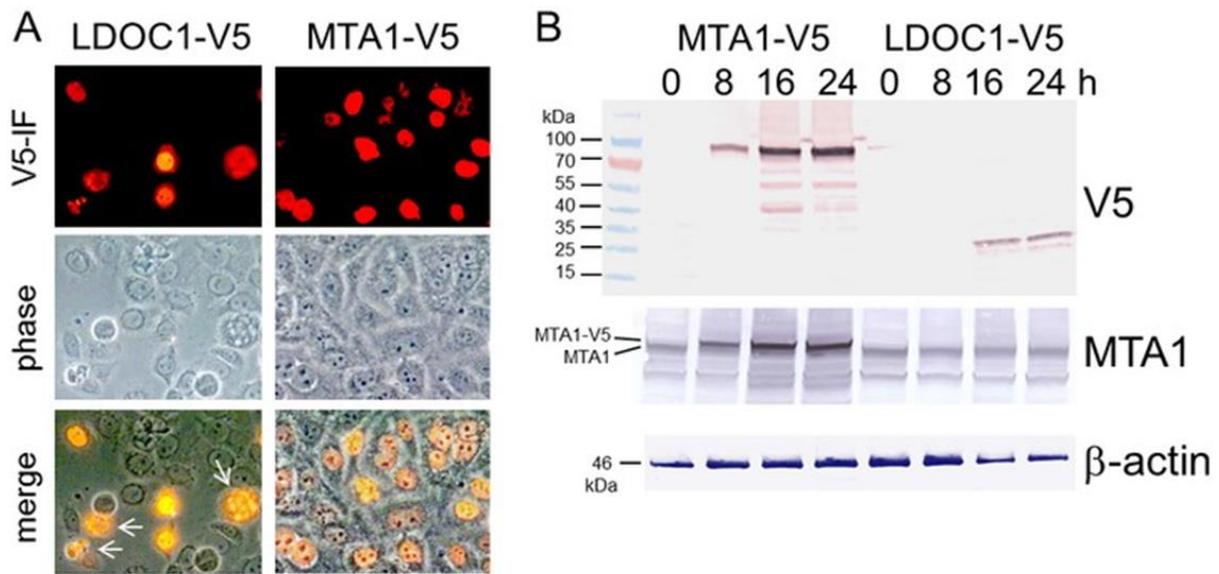


Abbildung 16: Ektopische Überexpression von LDOC1 induziert Apoptose in HeLa Zellen. (A) HeLa Zellen, die auf Deckgläsern gewachsen sind, wurden transient mit dem LDOC1-V5 oder MTA1-V5 Expressionsplasmid transfiziert und nach 48h Inkubation mittels indirekter Immunfluoreszenz mit einem monoklonalen anti-V5 Antikörper, gefolgt von einem Cy3-konjugierten sekundären Antikörper analysiert. Apoptotische Zellen sind mit einem Pfeil markiert. (B) In Zellkultur gewachsene HeLa Zellen wurden für verschiedene Zeitspannen mit einem LDOC1-V5 oder MTA1-V5 Expressionsplasmid transfiziert und mittels Western Blot Analyse untersucht. Marker: prestained marker IV (PeqLab, Erlangen, Deutschland). LDOC1 = 17 kDa (146 AA); MTA1 = 81 kDa (715 AA); V5-HIS tag = 45 zusätzliche (AA = Aminosäure; kDa = relatives Molekulargewicht).

Während alle in Abbildungen 8-15 gezeigten Experimente alleinige Arbeiten dieser Doktorarbeit sind, so handelt es sich bei den in dieser Abbildung 16 gezeigten Experimenten um Gemeinschaftsexperimente des Forschungslabors. Diese Gemeinschaftsarbeit ist unter Buchholtz et al. veröffentlicht. Die Präsentation dieser Experimente in Abbildung 16 ist jedoch wichtig zum Verständnis der folgenden Diskussion.

4. Diskussion

Diese Studie wurde durchgeführt, um die Expression von LDOC1 in Zervix-, Ovarialkarzinomzelllinien und in vivo aus Gewebe der Portio vaginalis uteri zu untersuchen. Anhand der durchgeführten Experimente konnte die epigenetische Modifizierung in Form der aberranten Promotormethylierung als Mechanismus der Gen-Ausschaltung identifiziert werden.

Die vorliegende Studie erbrachte das Ergebnis, dass die Promotormethylierung des vermuteten Tumorsuppressorgens LDOC1 ein häufiges Ereignis im Zervix- und Ovarialkarzinom darstellt.

Ursprünglich wurde LDOC1 durch dessen Herunterregulation in Pankreas- und Magenkarzinomzelllinien identifiziert (Nagasaki, Manabe et al. 1999). Weitere Untersuchungen zeigten ebenfalls die Herunterregulation von LDOC1 im Ösophaguskarzinom (Ogawa, Ishiguro et al. 2008), im hepatozellulären Karzinom (Riordan and Dupuy 2013), im oralen Plattenepithelkarzinom (Lee, Wong et al. 2013) und bei der CLL (Duzkale, Schweighofer et al. 2011). In derselben Studie von Duzkale et al. konnte aber auch nachgewiesen werden, dass die Hochregulierung von LDOC1 in einer Untergruppe von nicht mutierter CLL mit einer schlechten Prognose assoziiert war. Eine Überexpression der LDOC1-mRNA wurde außerdem in Blutzellen von Parkinsonpatienten mit Plattenepithelkarzinom der Haut und im Hals-, Kopfbereich nachgewiesen (Salemi, Giuffrida et al. 2012). In dieser Arbeitsgruppe unter Salemi et al. wurden ferner erhöhte Werte der LDOC1-mRNA in den Blutproben von Alzheimerpatienten detektiert. All jene Erkenntnisse führen laut Autoren zu der Annahme von LDOC1 als einem proapoptischen Faktor bei neurodegenerativen Erkrankungen. Ferner müssen also bei der Analyse von LDOC1 nicht nur die Ausschaltung des Gens, sondern auch die differentielle Expression berücksichtigt werden.

Auch bei der Untersuchung der Gewebeproben der Cervix uteri konnte insofern keine eindeutige Aussage über die LDOC1 Expression getroffen werden, als dass die Gewebeproben von drei Patientinnen erhöhte LDOC1-Werte aufwiesen, weitere drei verminderte Expression zeigten und wiederum Proben dreier Patientinnen in der Expression keinen Unterschied zum gesunden Gewebe zeigten. Eine größere Anzahl von Gewebeproben ist jedoch unbedingt erforderlich, um die LDOC1 Expression im Zervixkarzinom zu beschreiben. Die hier vorliegende Probenzahl ergab sich aus dem Zeitrahmen der Doktorarbeit, in dessen Zusammenhang die Sammlung von Zervixkarzinomgeweben für die DNA/RNA Analyse erst begonnen wurde und demnächst an der Klinik ausgebaut werden soll. Eine immunhistochemische Analyse an

asserviertem und paraffinisiertem Gewebe konnte aufgrund der schlechten Qualität der kommerziell erhältlichen Antikörper wie erwähnt leider nicht durchgeführt werden und alle bisherigen LDOC1 Publikationen beziehen sich auf die mRNA-Expression. Die schlechte Qualität der kommerziellen LDOC1 Antikörper wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen bemerkt und bemängelt (Duzkale, Schweighofer et al. 2011) und es bleibt zu hoffen, dass demnächst gegen bessere Epitope gerichtete und auch von den Firmen besser geprüfte LDOC1 Antikörper auf den Markt kommen.

Kritisch im Zusammenhang mit der Untersuchung der LDOC1 Expression in Gewebeproben ist die Tatsache, dass auch Blutzellen und Fibroblasten sowie nicht maligne Zellen normalerweise LDOC1 exprimieren (Duzkale, Schweighofer et al. 2011) und die Ergebnisse verfälschen können, wenn statt einer histochemischen Untersuchung eine Gesamt-mRNA Analyse vorgenommen wird. Es kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass erhöhte LDOC1-Werte in einigen unserer Tumorgewebeproben auf die Infiltration des Gewebes mit Immunzellen und Fibroblasten zurückzuführen sind. Das Screening auf die Expression von LDOC1-mRNA mittels real-time PCR erwies sich jedoch offensichtlich in mehreren Einzelfällen als praktikabel bei der Untersuchung von Tumorgewebe mit einer deutlichen Herunterregulierung von LDOC1. Um eine verlässliche Analyse bei differentieller LDOC1 Expression durchzuführen, mangelt es allerdings an ausreichender Spezifität. Die Lösung für dieses Problem liefert die Durchführung einer methylierungsspezifischen PCR (MSP) auf DNA Ebene. Denn hier kommt es zu keiner PCR-Reaktion in Gewebezellen, sondern ausschließlich in Tumorzellen mit methyliertem LDOC1-Promotor. Aufgrund der Sensitivität der real-time PCR können hier auch geringe Mengen an Zellen mit methyliertem Promotor nachgewiesen werden. So könnten mit Hilfe der MSP kleinere Untergruppen stärker undifferenzierter Krebszellen in CINs oder Krebszellpopulationen im Tumorgewebe identifiziert werden, die das Potential besitzen, sich zu fortgeschrittenen Stadien zu entwickeln (Buchholtz, Jückstock et al. 2014; Buchholtz, Brüning et al. 2013). Die Weiterentwicklung eines derartigen Nachweises ist zurzeit im Labor geplant.

Als klassische Methode für die Analyse des Epigenoms hat sich die Bisulfit-Modifikation der genomischen DNA, ursprünglich entwickelt von Frommer et al. (Frommer, McDonald et al. 1992), etabliert. Dabei gilt die Bisulfit-Sequenzierung als Goldstandard für die Auswertung der individuellen CpG-Dinukleotide (Balch, Fang et al. 2009). Vier Punkte sind entscheidend, um die Verlässlichkeit und Güte der Bisulfit-Konvertierung zu bestimmen. Dazu zählt die komplette Konversion von Cytosin zu Uracil, Methylcytosin bleibt dabei jedoch intakt. Ferner

sollte der Verlust der DNA während der Reaktion aufgrund nicht spezifischer Degradation so gering wie möglich gehalten werden. Darüber hinaus soll das Ergebnis unabhängig von der ausgewählten Primer-Sequenz sein (Grunau et al. 2001).

Die methylierungsspezifische PCR, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit angewendet wurde, dient der Untersuchung des Methylierungsstatus von Orten von Interesse auf der DNA durch die selektive Amplifikation von methylierten und nicht methylierten Allelen.

Der kritische Punkt für adäquate Resultate der MSP ist die Auswahl der methylierungsspezifischen Primer. Da die vorausgehende Behandlung mit Bisulfit die Komplexizität der DNA-Sequenz vermindert, neigen die MSP-Primer dazu, an multiple Zielsequenzen auf der konvertierten DNA zu binden. Dies gilt es bei der Analyse zu berücksichtigen (Hernandez, Tse et al. 2013). Während der Arbeiten zu der vorliegenden Studie erwies sich eben dieser Umstand als Herausforderung. Viele Primer mussten ausgetestet werden, da falsch positive Ergebnisse bei der PCR in die Irre führten. Als glücklicher Umstand erwies sich die Tatsache, dass während der Austestung verschiedener Primer im Laufe dieser Doktorarbeit eine Arbeit von Lee, Wong et al. veröffentlicht wurde, welche die Promotormethylierung von LDOC1 am oralen Plattenepithelkarzinom beschreibt (Lee, Wong et al. 2013). Mit Hilfe der dort aufgeführten MSP-Primer-Sequenzen gelang uns der Nachweis der Promotormethylierung auch am Zervix- und Ovarialkarzinom.

Um Fehlinterpretationen einer positiven Reaktion bei der Standard-PCR zu vermeiden, empfiehlt es sich, nicht methylierte, nicht Bisulfit-konvertierte DNA-Proben und solche Kontrollen ohne DNA-Vorlage in die PCR mit einzuschließen (Herman, Graff et al. 1996).

Ferner kann ein erheblicher Anteil der DNA durch Einzelstrangbrüche während der langen Inkubationszeiten beschädigt werden und während des Reinigungsvorgangs der Bisulfit-Reaktion verloren gehen. Die beiden Determinanten, die Einfluss auf die Effizienz der Deaminierung und den Grad degradiertes DNA nehmen, sind Inkubationszeit und die Temperatur bei Inkubation. In einer Studie von Grunau et al. konnten maximale Konversionsraten bei 55°C (4-18h) und 95°C (1h) gefunden werden, welches mit einer 84-96%igen Degradation der DNA einherging (Grunau et al. 2001).

Ein signifikanterer Verlust der DNA konnte während des Reinigungsvorgangs, bestehend aus Entfernung des Bisulfits und Desulfonierung, gefunden werden. Dieser scheint abhängig von der Konzentration der DNA, die zu Beginn verwendet wurde und resultiert aus einer Grö-

ßenselektivität, die von der Bindung der DNA an eine Matrix sowie nachfolgende Elution herrührt, welches für die anschließende PCR essentiell ist (Munson et al. 2007).

Herausforderungen bei der Durchführung der MSP bestehen außerdem in der Vermeidung schlechter DNA-Qualität und der Amplifikation von nicht konvertierter DNA mittels MSP-Primern, welche mit Abstrichen bei der Reproduzierbarkeit einhergehen können (Hernandez, Tse et al. 2013; Herman, Graff et al. 1996). Hilfreich bei der Durchführung der PCR-basierten DNA-Methylierungsanalyse können Computerprogramme zur Primer-Auswahl und Bisulfite conversion kits, die auch in unserer Studie verwendet wurden, sein.

Ist die Konversion der methylierten DNA mittels Bisulfit-Methode erfolgreich durchgeführt worden, kann die Untersuchung der DNA-Methylierung Vorteile gegenüber anderen Biomarkern bieten. Zum einen wird die Hypermethylierung der meisten Gene selten bei gesunden Individuen gefunden, auch wenn einige Veränderungen im Methylierungsmuster im Zuge der Alterung und ausgelöst durch umgebungsbedingte Stressoren auftreten können. Zum anderen vermeidet man mit der selektiven Darstellung des Methylierungsstatus Störfaktoren wie Gewebszellen, die zwar LDOC1 exprimieren können, aber deren Promotor in der Regel nicht methyliert ist. Chemische Stabilität, die Möglichkeit zur Amplifikation und die damit einhergehende Verbesserung der Sensitivität, vergleichsweise geringe Kosten und die Beschränkung auf bestimmte Regionen der DNA, die CpG-Inseln, tragen dazu bei, dass die Untersuchung der methylierten DNA unter optimalen Bedingungen ablaufen kann (Balch, Fang et al. 2009). Die MSP ermöglicht außerdem eine schnelle Analyse, die Detektion kleiner Zahlen methylierter Allele und die Untersuchung nur weniger Mengen an DNA.

Methylierungs-Assays können mit kleinen Gewebeproben aus der Routinediagnostik, an gefrorenen Proben oder solchen, die in Paraffin eingebettet sind, durchgeführt werden (Lopez, Percharde et al. 2009). Ferner gewährleistet die MSP die Untersuchung aller CpG-Stellen und nicht nur derer, deren Sequenzen von Restriktionsenzymen erkannt werden (Herman, Graff et al. 1996).

Auch die Methode der Methylierungs-sensitiven Restriktionsenzym-Analyse (MSRE) wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt. Hierbei erfolgt der Verdau der DNA mit Restriktionsenzymen, die an der dem jeweiligen Enzym spezifischen Erkennungssequenz schneiden. Methylierte DNA bleibt davon unberührt. Da es in der nachfolgenden PCR bei nicht methylierter, geschnittener DNA zum Abbruch der Amplifikation kommt, ergibt sich eine Möglichkeit, den Methylierungsstatus anhand der Anwesenheit oder des Fehlens von Banden in der semiquanti-

tativen PCR zu bestimmen. Aufgrund unzureichender Ergebnisse (nicht gezeigt) wurde diese Methode zugunsten der Bisulfit-Konvertierung von uns verlassen.

Mit der Untersuchung des Methylierungsstatus der DNA eröffnet sich ferner eine weitere Möglichkeit der Tumordiagnostik - zusätzlich zur Untersuchung von Gewebe: Nämlich zirkulierende Tumor-DNA in Körperflüssigkeiten als Biomarker zu verwenden. Der Ursprung der DNA im Serum wird auf nekrotische Tumorzellen zurückgeführt. Dabei zeigte die methylierte DNA aus dem Serum von Krebspatienten eine gute Korrelation zu dem Grad an Methylierung, der im Tumorgewebe detektiert werden konnte (Balch, Fang et al. 2009). Durch die Weiterentwicklung der Methylierungsanalyse von Zellen aus Körperflüssigkeiten bestünde eine nicht invasive Methode des Tumorscreenings, könnte auf die Biopsie von schwer erreichbaren Organen verzichtet werden und könnten in Zukunft durch Analyse eines tumorspezifischen Methylierungsmusters Aussagen zu Therapie und Prognose getroffen werden (Lopez, Percharde et al. 2009).

Einschränkend ist anzumerken, dass die Untersuchung der Methylierung von LDOC1 als Biomarker im Serum für den klinischen Alltag insofern als problematisch anzusehen ist, als dass ein positives Ergebnis keinen Rückschluss auf den Ursprung des methylierten LDOC1-Gens zulässt. Es müsste dafür das Methylierungsmuster vieler verschiedener Gene eines Gewebes analysiert werden, das für einen bestimmten Tumor charakteristisch ist.

Da der Mechanismus der LDOC1-Ausschaltung durch Promotormethylierung mittels gDNA-Analyse und Bisulfit-Konvertierung identifiziert werden konnte, sollte auch der Umkehrschluss - die Reexpression von LDOC1 durch Aufhebung der Methylierung - getestet werden. Pharmakologische Inhibitoren der Methylierung wie 5-Aza-2'-deoxycytidin (Decitabin) führten zur Hemmung der DNA-Methyltransferasen und bewirkten die Reexpression von LDOC1 im oralen Plattenepithelkarzinom (Lee, Wong et al. 2013). In der vorliegenden Arbeit zeigte die Behandlung der Zervixkarzinomzelllinien Me180 und SiHa sowie der Ovarialkarzinomzelllinien OV-MZ-30 und OV-MZ-37, die zuvor nicht LDOC1exprimiert hatten, nach Behandlung mit Decitabin eine deutliche Reaktivierung der LDOC1 Expression. Die Reversibilität der LDOC1-Ausschaltung bietet insofern ein mögliches Ziel für die Antitumor-Therapie, dass antiproliferative und proapoptotische Gene reexprimiert werden können (Buchholtz, Jückstock et al. 2014; Buchholtz, Brüning et al. 2013).

Die Behandlung mit demethylierenden Substanzen wie Decitabin erwies sich auch bei anderen methylierten und ausgeschalteten Genen als effektiv, um die Expression dieser Genpro-

dukte zu reaktivieren (Glasspool, Teodoridis et al. 2006). Der klinische Einsatz von Decitabin als Einzelsubstanz erfolgt bereits bei dem MDS, der AML und CML. Studien an soliden Tumoren mit Decitabin zeigten bisher keinen Erfolg. Dennoch kann die Behandlung mit demethylierenden Substanzen in der Tumorthherapie von Nutzen sein, indem es zur Reexpression von Genen kommt, die Einfluss auf die Chemosensitivität haben (Glasspool, Teodoridis et al. 2006; Plumb, Strathdee et al. 2000).

Dass die Resistenz gegenüber Chemotherapeutika unter anderem auf epigenetische Veränderungen zurückgeführt werden kann, lässt sich aus den Ergebnissen vieler Studien folgern. Eine wichtige Rolle in Bezug auf das Ansprechen auf die Tumorthherapie könnte die veränderte Expression von Genen spielen, die bei der Apoptose und Reparatur von DNA involviert sind. Die Methylierung verschiedener Gene kann auch gegensätzliche Effekte auf die Sensitivität gegenüber Medikamenten haben, wie folgendes Beispiel zeigt: Die Methylierung der DNA von Reparaturgenen wie MGMT kann zur Inaktivierung der DNA-Reparatur führen und damit ein Ansprechen auf Chemotherapeutika bewirken. Allerdings führt die epigenetische Ausschaltung von proapoptotischen Genen wie z.B. hMLH1 zu Chemoresistenz (Glasspool, Teodoridis et al. 2006).

In vitro bestand bei der Behandlung von Fibroblasten in Kultur mit Decitabin ein sehr schmaler Wirkungsbereich. Ein Wirkungsverlust bei hohen Dosen von Decitabin ist als Resultat der Zytotoxizität dieser Substanz anzusehen (Glasspool, Teodoridis et al. 2006; Brown and Plumb 2004). Demethylierende Substanzen sollten daher in Konzentrationen unterhalb der maximal tolerierbaren Dosis liegen, aber trotzdem hoch genug gewählt sein, um eine Reexpression durch Inhibierung der DNMT zu bewirken. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Dosierungen getestet. Optimale Werte ergaben sich bei Dosierungen in mittleren bis hohen Bereichen. Ab einer Konzentration von über 50 μ M Decitabin starben die Zellen in der Zellkultur ab. Vereinbar damit erwiesen sich niedrig dosierte Protokolle in der Studie an hämatologischen Malignomen als effektiver im Vergleich zu Hochdosis-Protokollen (Issa, Garcia-Manero et al. 2004). Außerdem ließe sich durch niedriger dosierte Protokolle die Knochenmarkstoxizität reduzieren, was insbesondere dann von großer Bedeutung ist, wenn Decitabin als Kombinationstherapie mit anderen Chemotherapeutika eingesetzt werden soll (Glasspool, Teodoridis et al. 2006).

Diese Beobachtungen zusammen mit der Bedeutung der epigenetischen Modifizierung für die Zellbiologie wie Zellwachstum, Zellzyklus-Kontrolle, Differenzierung, DNA-Reparatur und

Zelltod lassen die Inhibierung der Methylierung als einen vielversprechenden Mechanismus für die effektive Behandlung von Tumoren erscheinen.

Ferner wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit die Funktion von LDOC1 untersucht. Eine Überexpression des zu untersuchenden Gens induzierte in verschiedenen transfizierten Zelltypen die Apoptose. Diese wurde in einer vorherigen Studie durch den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials angestoßen und sowohl durch den Caspase-3-abhängigen und -unabhängigen Weg eingeleitet (Inoue, Takahashi et al. 2005). Ferner konnte in der Studie von Inoue et al. gezeigt werden, dass die durch LDOC1-induzierte Apoptose von einem Anstieg der p53 Protein Werte begleitet wird, nicht jedoch der p53 Transkription. Daraus schlussfolgerten Mizutani et al., dass LDOC1 die Degradation von p53 verhindert (Mizutani, Koike et al. 2005). Darüber hinaus erkannte man, dass WAVE3, das zur Wiskott-Aldrich Syndrom Protein-Familie gehört, die Translokation von LDOC1 aus dem Nukleus ins Zytoplasma bewirkt. Dies führte zur Inhibierung des durch LDOC1 induzierten Zelltodes (Mizutani, Koike et al. 2005). Interessanterweise waren die HeLas die einzigen der in den genannten Studien getesteten Zervixkarzinomzelllinien, die nach Überexpression von LDOC1 im Verlauf der 16-stündigen Transfektion nicht in die Apoptose eintraten (Inoue, Takahashi et al. 2005). Ähnlich wie in den genannten Arbeiten konnten auch in der vorliegenden Studie keine deutlichen apoptotischen Veränderungen nach Kurzzeit-Expression von LDOC1 in den HeLa Zellen registriert werden. Allerdings induzierten längere Inkubationszeiten nach LDOC1-Transfektion die Apoptose in den untersuchten HeLa Zellen (Buchholtz, Brüning et al. 2013). Dies ist als Indiz dafür anzusehen, dass es sich bei LDOC1 nicht um einen unmittelbaren apoptotischen Faktor handelt, sondern dass dieses Genprodukt zuerst die Zellphysiologie moduliert und verändert, was zur Entstehung eines proapoptotischen Phänotyps führt (Buchholtz, Brüning et al. 2013). Ferner erscheint es sinnvoll, einen Schwellenwert der LDOC1 Expression zu definieren, denn Zelllinien wie HeLa und CasKi weisen bereits endogene LDOC1 Expression auf.

In zukünftigen Studien gilt es zu erforschen, ob erhöhte LDOC1 Expression auf Proteinebene (durch posttranskriptionale oder posttranslationale Modifizierungen ausgelöst durch apoptotische Stimulation) eine Stabilisierung oder eine Aktivierung des LDOC1 Proteins unter apoptotischen Bedingungen bewirkt (Buchholtz, Brüning et al. 2013). Eine Herausforderung bezüglich der Forschung an LDOC1 besteht darin, dass derzeit kein kommerziell erhältlicher LDOC1-Antikörper existiert, der zur Färbung und Lokalisation der Proteinexpression geeignet wäre. Die bereits oben erwähnte Forschungsgruppe unter Mizutani umging dieses Hinder-

nis durch den Gebrauch eines myc-markierten LDOC1 Expressionsvektors und konnte damit zeigen, dass LDOC1 in Interaktion mit WAVE3 vom Nukleus ausgeschlossen werden kann (Mizutani, Koike et al. 2005).

Darüber hinaus wird über LDOC1 angenommen, dass es sich um einen nukleären Transkriptionsfaktor handelt, welcher der Familie der leucine zipper transcription factor family angehört. Mitglieder dieser Familie fungieren als Modulatoren der Transkription, sie können durch die Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren transkriptionale Aktivität fördern oder unterdrücken (Chih, Park et al. 2004).

Von besonderer Bedeutung ist die Interaktion von LDOC1 mit dem NF- κ B Transkriptionsfaktor-Komplex und die daraus resultierende Reduktion der transkriptionalen Aktivität von NF- κ B. Dabei beeinflusst LDOC1 allerdings nicht p53, Ap1 und die CRE-abhängige Reporter-Gen-Expression. In Abhängigkeit von der Dosis konnte die Inhibierung der Aktivierung von NF- κ B durch die TNF α -Liganden-induzierte Stimulierung oder durch PAM (phorbol 12-myristate 13-acetate) bei transienter Expression von LDOC1 registriert werden (Nagasaki, Schem et al. 2003). In ihrer Arbeit zum oralen Plattenepithelkarzinom konnten Lee et al. bei der Reexpression von BEX1 und LDOC1 ebenfalls eine Supprimierung des NF- κ B-Signalwegs demonstrieren, das einen der am häufigsten überaktiven Signalwege im OSCC darstellt. Diese Ergebnisse deuten an, dass es sich bei der Ausschaltung von BEX1 und LDOC1 durch Promotorhypermethylierung um ein kritisches Ereignis in der molekularen Pathogenese des OSCC handelt (Lee, Wong et al. 2013). In Übereinstimmung mit dieser Studie und in Anbetracht der Interaktion von NF- κ B mit LDOC1 kann auch im Zervix- und Ovarialkarzinom von der epigenetischen Ausschaltung von LDOC1 durch Methylierung als einem Mechanismus auf dem Weg der Karzinogenese gesprochen werden.

Bei dem NF- κ B Transkriptionsfaktor-Komplex handelt es sich um eine Familie bestehend aus fünf verschiedenen Transkriptionsfaktoren wie p65 (RelA), RelB, c-Rel, p50 (p105/NF κ B1) und p52 (p100/NF κ B2) (Hayden and Ghosh 2004). Jeder Transkriptionsfaktor der NF- κ B-Familie kann Homo- oder Heterodimere ausbilden, die an den Promotor von κ B-Stellen binden und die Transkription abhängiger Gene regulieren (Chang and Vancurova 2013). NF- κ B ist für seine Bedeutung bei der Inflammation und angeborenen Immunantwort bekannt (Prasad, Ravindran et al. 2010) und hat eine Schlüsselfunktion in der Regulation der Onkogenese inne. Durch Förderung von Proliferation und Inhibierung der Apoptose stört NF- κ B das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose zugunsten eines malignen Wachstums von Tumorzellen (Lin and Karin 2003).

Die Aktivität von NF- κ B wird über zwei verschiedene Wege reguliert. Im Zuge des kanonischen Signalwegs werden die Dimere, p50/RelA and p50/c-Rel, im Zytoplasma durch spezifische Inhibitoren, die Inhibitors of κ B (I κ B) zurückgehalten. Durch Stimuli wie mikrobielle und virale Infektionen sowie die Exposition gegenüber proinflammatorischen Zytokinen wird die I κ B-Kinase (IKK) aktiviert, die den an NF- κ B gebundenen I κ B phosphoryliert. Daraufhin erfolgt die Ubiquitin-abhängige Degradierung von I κ B und die NF- κ B-Dimere gelangen in den Nukleus (Prasad, Ravindran et al. 2010). Um seinen Einfluss auf die Apoptose zu beschreiben, sei auf die pro- als auch antiapoptotischen Effekte von NF- κ B verwiesen. Ein Beispiel in diesem Zusammenhang ist die Induktion von Autophagie durch IKK. Autophagie beschreibt eine metabolische Reaktion der Zelle zum Erhalt des Zellüberlebens, kann jedoch auch zum Zelltod führen (Baldwin 2012). Häufiger jedoch beobachtet man antiapoptotische Auswirkungen von NF- κ B auf die Zelle. Die Verhinderung der Apoptose geschieht durch NF- κ B-induzierte Expression von antiapoptotischen und antioxidativen Proteinen (Luo, Kamata et al. 2005). In vielen Karzinomen fungiert NF- κ B als Suppressor des Zelltodes, was als „Hallmark of Cancer“ anzusehen ist (Baldwin 2012). Zusätzlich kontrolliert aktiviertes NF- κ B Zellzyklusproteine und die Interaktion mit zellulären Komponenten wie p53, welche die Apoptose einleiten können (Prasad, Ravindran et al. 2010).

Die Suppression von bei der Karzinogenese involvierten Genen durch die Inhibition von NF- κ B stellt einen vielversprechenden Ansatz in der Therapie vieler Malignome dar.

Ein bedeutender Vorteil der IKK/NF- κ B-Inhibitoren gegenüber konventionellen Therapien stellt die Tatsache dar, dass auch die IKK/NF- κ B-Aktivierung in infiltrierenden Immunzellen blockiert werden kann. Diese werden als eine wichtige Quelle für Tumorwachstum und Überlebensfaktoren angesehen (Mantovani, Allavena et al. 2008). Eine Inhibierung von NF- κ B verhindert somit auch das durch Inflammation stimulierte Tumorwachstum (Luo, Kamata et al. 2005). Dennoch sollte auch die Tatsache berücksichtigt werden, dass NF- κ B eine wichtige Rolle bei der angeborenen und erworbenen Immunabwehr innehat. In Bezug auf die IKK/NF- κ B-Inhibition ist die Spezifität der Substanzen kritisch zu betrachten. Denn viele Schritte, die zur Aktivierung von NF- κ B führen, sind auch für andere zelluläre Signalwege von entscheidender Bedeutung (Chang and Vancurova 2013). Es ist nicht auszuschließen, dass es bei einer Langzeittherapie mit IKK/NF- κ B-Inhibitoren zu einer Immundefizienz kommen kann (Luo, Kamata et al. 2005). Daher sollten alternative Ansätze in Betracht gezogen werden. Die Inter-

aktion von LDOC1 mit NF- κ B und die daraus folgende Reduktion der transkriptionalen Aktivität von NF- κ B könnten einen Ansatzpunkt für alternative Therapiestrategien darstellen.

4.1 Ausblick

Die vorliegende Arbeit führte zu der Erkenntnis, dass die Überexpression von LDOC1 in Zervixkarzinomzelllinien zu einem proapoptotischen Phänotyp führt. Die Herunterregulierung durch epigenetische Modifikation mittels Promotormethylierung im Zervix- und Ovarialkarzinom könnte somit einen Überlebensvorteil für Karzinomzellen bedeuten, sowohl während der Progression des Malignoms als auch der chemotherapeutischen Therapie. Zur Charakterisierung und Klassifizierung des Zervix- und Ovarialkarzinoms fehlen prädiktive epigenetische Marker, die ein Ansprechen auf chemotherapeutische Protokolle anzuzeigen vermögen. Die Analyse der Expression und Promotormethylierung von LDOC1 könnte einen neuen Biomarker nicht nur für die Detektion von zervikalen und ovariellen Neoplasien darstellen, sondern auch dazu dienen, die Ansprechbarkeit auf die jeweilige Antitumor-Therapie zu evaluieren. Die Detektion von methylierter DNA als Biomarker in Körperflüssigkeiten bietet hier die Möglichkeit, das Ansprechen auf bestimmte Therapieprotokolle auf nicht invasive Weise regelmäßig zu überprüfen (Balch, Fang et al. 2009).

Limitierend erwies sich in der vorliegenden Arbeit der Umstand, dass mit der Untersuchung der Methylierung von LDOC1 im Serum die Zuordnung zu einem spezifischen Karzinom nicht möglich ist. Aus der Krebsforschung weiß man, dass ein einzelnes Gen nicht ausreicht, um eine präzise Aussage bezüglich Diagnose oder Prognose zu machen. Dies hat zur Testung multipler Gene und der Einführung von Techniken wie Massenspektrometrie sowie Multigen-Analyse-Systemen geführt. Eine verlässliche Methode zur Bisulfit-Konvertierung mit optimalen Konversionsergebnissen und minimalen Verlusten an zu untersuchender DNA ist dabei zu fordern (Munson et al. 2007).

Ferner erbrachten die Untersuchungen bezüglich der LDOC1 Expression an den Gewebeproben in unserer Studie kein eindeutiges Ergebnis. Ob die Herunterregulation von LDOC1 tatsächlich prognostischen und therapeutischen Wert hat, ist mittels einer größeren Anzahl von Gewebeproben zu reevaluieren.

Dennoch sollen aufgrund der vielversprechenden Ergebnisse die Bedeutung und die Möglichkeiten, welche die Untersuchung von hypermethylierten Promotoren bieten, betont werden.

Sowohl Screening-Verfahren als auch individuelle Therapiestrategien und Aussagen über die Prognose ließen sich in Zukunft durch die Analyse von spezifischen Methylierungsmustern verwirklichen.

In solchen Situationen, in denen die Gewinnung von Biopsiematerial nur unter äußerst schwierigen und riskanten Bedingungen zu verwirklichen ist, wäre die Kenntnis über das dem individuellen Tumor spezifische Methylierungsmuster, seine „Signatur“, für das weitere klinische Procedere von großem Nutzen. Beispiele hierfür sind das Ovarialkarzinom oder Situationen, wo sich Prognose und Therapie bei unklarem Primärtumor stark zwischen möglichen Tumortypen unterscheiden (Lopez, Percharde et al. 2009).

Das Vorhandensein von methylierter genomischer DNA in einigen Körperflüssigkeiten bietet ferner die Möglichkeit eines nicht invasiven molekularen Screenings auf viele verschiedene Malignome. Die Herausforderung besteht allerdings darin, die nötige Sensitivität und Spezifität mit diesem Ansatz zu erreichen (Lopez, Percharde et al. 2009).

Zur Ermittlung der Prognose und Bestimmung des Metastasierungsrisikos wurden bereits Studien durchgeführt, welche die Signatur eines Tumors, sein spezifisches Methylierungsmuster, mit klinischen Parametern in Zusammenhang setzten. In Zukunft könnten therapeutische Entscheidungen in der Klinik anhand der Analyse des Methylierungsmusters und der daraus resultierenden Charakterisierung des vorliegenden Tumors individuell getroffen werden (Lopez, Percharde et al. 2009).

Abschließend soll auf den möglichen Nutzen und die Einsetzbarkeit von DNA-Methylierungsinhibitoren verwiesen werden. Deren adäquater Einsatz gilt es zu evaluieren, um die antitumoröse Therapie durch Reexpression von Tumorsuppressorgenen wie LDOC1 zu unterstützen. Einschränkend muss hier allerdings erwähnt werden, dass der DNMT-Inhibitor, Decitabin, bisher keine klinische Anwendung zur Therapie solider Tumoren gefunden hat. Auch in der vorliegenden Arbeit zeigte sich die therapeutische Breite dieses Methylierungsinhibitors äußerst gering, sodass eventuell die Knochenmarkstoxizität einen limitierenden Parameter bei einer Kombinationstherapie mit konventionellen Chemotherapeutika darstellen könnte.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Studie wurde die Expression und Regulation des Transkriptionsfaktors und Tumorsuppressors LDOC1 in Zervix- und Ovarialkarzinomzelllinien untersucht.

Mit Hilfe der Bisulfit-Konvertierung konnte die epigenetische Modifikation in Form der Promotormethylierung als ursächlich für die Ausschaltung des Genprodukts LDOC1 in mehreren gynäkologischen Tumorzelllinien *in vitro* identifiziert werden. Die Reexpression von LDOC1 nach Behandlung mit Decitabin konnte die Annahme einer epigenetischen Regulierung stützen.

Ferner wurden Untersuchungen an Gewebeproben der Portio vaginalis uteri durchgeführt, die im Rahmen der Operation auf Basis makroskopischer Einschätzung entnommen worden waren. In einzelnen Fällen konnte auch hier ein Verlust der LDOC1-Genexpression in dem Tumorgewebe, nicht aber in dem Normalgewebe nachgewiesen werden. Aufgrund einer zu geringen Probenzahl konnten jedoch keine Verallgemeinerungen oder statistische Untersuchungen dieser Beobachtungen vorgenommen werden. Aufgrund der ersten Ergebnisse ist die LDOC1 Expression im Zervixkarzinom in Folgearbeiten auf jeden Fall an einer größeren Anzahl von – noch zu generierenden – Proben zu evaluieren, um eventuell Assoziationen mit klinischen Parametern wie Patientenüberleben oder Chemotherapieansprechen zu erkennen.

Mittels eines LDOC1 Expressionsplasmids konnte außerdem der Einfluss einer Überexpression von LDOC1 auf die Zellen veranschaulicht werden. Der resultierende proapoptotische Phänotyp deutet auf die tumorsuppressiven Eigenschaften von LDOC1 hin.

Nach Durchführung der genannten Studie gilt es, die Funktion der LDOC1 Expression im Zervix- und Ovarialkarzinom für zukünftige Forschung genauer zu beleuchten. Erst dann lässt sich die Untersuchung des methylierten Promotors von LDOC1 klinisch für diagnostische, prognostische und therapeutische Zwecke verwenden. Ferner wird es für die Charakterisierung eines Tumors nicht genügen, ein einzelnes methyliertes Gen zu analysieren. Es erfordert vielmehr die Untersuchung spezifischer Methylierungsmuster, wovon LDOC1 in Zukunft eventuell ein Element darstellen könnte.

6. Literaturverzeichnis

- **Ahuja, N. and J. P. Issa** (2000). "Aging, methylation and cancer." Histol Histopathol **15**(3): 835-842.
- **Antequera, F., J. Boyes and A. Bird** (1990). "High levels of de novo methylation and altered chromatin structure at CpG islands in cell lines." Cell **62**(3): 503-514.
- **Balch, C., F. Fang, D. E. Matei, T. H. Huang and K. P. Nephew** (2009). "Minireview: epigenetic changes in ovarian cancer." Endocrinology **150**(9): 4003-4011.
- **Baldwin, A. S.** (2012). "Regulation of cell death and autophagy by IKK and NF-kappaB: critical mechanisms in immune function and cancer." Immunol Rev **246**(1): 327-345.
- **Berdasco, M. and M. Esteller** (2010). "Aberrant epigenetic landscape in cancer: how cellular identity goes awry." Dev Cell **19**(5): 698-711.
- **Berman, M. L.** (2002). "Advances in cervical cancer management from North American cooperative group clinical trials." Yonsei Med J **43**(6): 729-736.
- **Bird, A.** (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes Dev **16**(1): 6-21.
- **Bogdanovic, O. and G. J. Veenstra** (2009). "DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function." Chromosoma **118**(5): 549-565.
- **Brown, R. and J. A. Plumb** (2004). "Demethylation of DNA by decitabine in cancer chemotherapy." Expert Rev Anticancer Ther **4**(4): 501-510.
- **Buchholtz, M. L., A. Brüning, I. Mylonas and J. Jückstock** (2014). "Epigenetic silencing of the LDOC1 tumor suppressor gene in ovarian cancer cells." Arch Gynecol Obstet.
- **Buchholtz, M. L., J. Jückstock, E. Weber, I. Mylonas, D. Dian and A. Brüning** (2013). "Loss of LDOC1 expression by promoter methylation in cervical cancer cells." Cancer Invest **31**(9): 571-577.
- **Burges, A. and B. Schmalfeldt** (2011). "Ovarian cancer: diagnosis and treatment." Dtsch Arztebl Int **108**(38): 635-641.
- **Campanero, M. R., M. I. Armstrong and E. K. Flemington** (2000). "CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6481-6486.
- **Chang, T. P. and I. Vancurova** (2013). "NFkappaB function and regulation in cutaneous T-cell lymphoma." Am J Cancer Res **3**(5): 433-445.
- **Chih, D. Y., D. J. Park, M. Gross, G. Idos, P. T. Vuong, T. Hirama, A. M. Chumakov, J. Said and H. P. Koeffler** (2004). "Protein partners of C/EBPepsilon." Exp Hematol **32**(12): 1173-1181.
- **Cho, K. R.** (2009). "Ovarian cancer update: lessons from morphology, molecules, and mice." Arch Pathol Lab Med **133**(11): 1775-1781.
- **Cho, K. R. and M. Shih Ie** (2009). "Ovarian cancer." Annu Rev Pathol **4**: 287-313.
- **Clouaire, T. and I. Stancheva** (2008). "Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin?" Cell Mol Life Sci **65**(10): 1509-1522.
- **Cox, J. T.** (1995). "Epidemiology of cervical intraepithelial neoplasia: the role of human papillomavirus." Baillieres Clin Obstet Gynaecol **9**(1): 1-37.

- **Cuadrado, M., M. Sacristan and F. Antequera** (2001). "Species-specific organization of CpG island promoters at mammalian homologous genes." EMBO Rep **2**(7): 586-592.
- **Dietl, J.** (2014). "Revisiting the pathogenesis of ovarian cancer: the central role of the fallopian tube." Arch Gynecol Obstet **289**(2): 241-246.
- **Dodge, J. E., A. L. Covens, C. Lacchetti, L. M. Elit, T. Le, M. Devries-Aboud, M. Fung-**
- **Dong, S. M., H. S. Kim, S. H. Rha and D. Sidransky** (2001). "Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix." Clin Cancer Res **7**(7): 1982-1986.
- **Duenas-Gonzalez, A., M. Lizano, M. Candelaria, L. Cetina, C. Arce and E. Cervera** (2005). "Epigenetics of cervical cancer. An overview and therapeutic perspectives." Mol Cancer **4**: 38.
- **Duzkale, H., C. D. Schweighofer, K. R. Coombes, L. L. Barron, A. Ferrajoli, S. O'Brien, W. G. Wierda, J. Pfeifer, T. Majewski, B. A. Czerniak, J. L. Jorgensen, L. J. Medeiros, E. J. Freireich, M. J. Keating and L. V. Abruzzo** (2011). "LDOC1 mRNA is differentially expressed in chronic lymphocytic leukemia and predicts overall survival in untreated patients." Blood **117**(15): 4076-4084.
- **Feranec, R. and L. Moukova** (2013). "[Preinvasive lesions in gynaecology - ovary]." Klin Onkol **26** Suppl: S54-55.
- **Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Molloy, P. L., Paul, C. L.** (1992). "A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(5): 1827-31.
- **Fuks, F., P. J. Hurd, D. Wolf, X. Nan, A. P. Bird and T. Kouzarides** (2003). "The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation." J Biol Chem **278**(6): 4035-4040.
- **Gifford, G., J. Paul, P. A. Vasey, S. B. Kaye and R. Brown** (2004). "The acquisition of hMLH1 methylation in plasma DNA after chemotherapy predicts poor survival for ovarian cancer patients." Clin Cancer Res **10**(13): 4420-4426.
- **Glasspool, R. M., J. M. Teodoridis and R. Brown** (2006). "Epigenetics as a mechanism driving polygenic clinical drug resistance." Br J Cancer **94**(8): 1087-1092.
- **Grunau C., Clark SJ., Rosenthal A.** (2001). "Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters." Nucleic Acids Res **29**(13):E65-5.
- **Hanahan, D. and R. A. Weinberg** (2000). "The Hallmarks of cancer." Cell **100**(1):57-70.
- **Hanahan, D. and R. A. Weinberg** (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- **Hashimoto, K., Kokubun, S., Itoi, E., Roach, H. I.** (2007). "Improved quantification of DNA methylation using methylation-sensitive restriction enzymes and real-time PCR." Epigenetics **2**(2): 86-91.
- **Hayden, M. S. and S. Ghosh** (2004). "Signaling to NF-kappaB." Genes Dev **18**(18): 2195-2224.
- **Herman, J. G., J. R. Graff, S. Myohanen, B. D. Nelkin and S. B. Baylin** (1996). "Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(18): 9821-9826.

- **Hernandez, H. G., M. Y. Tse, S. C. Pang, H. Arboleda and D. A. Forero** (2013). "Optimizing methodologies for PCR-based DNA methylation analysis." *Biotechniques* **55**(4): 181-197.
- **Holtz, D. O. and C. Dunton** (2002). "Traditional management of invasive cervical cancer." *Obstet Gynecol Clin North Am* **29**(4): 645-657.
- **Inoue, M., K. Takahashi, O. Niide, M. Shibata, M. Fukuzawa and C. Ra** (2005). "LDOC1, a novel MZF-1-interacting protein, induces apoptosis." *FEBS Lett* **579**(3): 604-608.
- **Issa, J. P., G. Garcia-Manero, F. J. Giles, R. Mannari, D. Thomas, S. Faderl, E. Bayar, J. Lyons, C. S. Rosenfeld, J. Cortes and H. M. Kantarjian** (2004). "Phase 1 study of low-dose prolonged exposure schedules of the hypomethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine) in hematopoietic malignancies." *Blood* **103**(5): 1635-1640.
- **Jacobs, I., D. Oram, J. Fairbanks, J. Turner, C. Frost and J. G. Grudzinskas** (1990). "A risk of malignancy index incorporating CA 125, ultrasound and menopausal status for the accurate preoperative diagnosis of ovarian cancer." *Br J Obstet Gynaecol* **97**(10): 922-929.
- **Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman** (2011). "Global cancer statistics." *CA Cancer J Clin* **61**(2): 69-90.
- **Jones, P. A. and S. B. Baylin** (2002). "The fundamental role of epigenetic events in cancer." *Nat Rev Genet* **3**(6): 415-428.
- **Jones, P. L., G. J. Veenstra, P. A. Wade, D. Vermaak, S. U. Kass, N. Landsberger, J.**
- **Khan, M. J., P. E. Castle, A. T. Lorincz, S. Wacholder, M. Sherman, D. R. Scott, B. B.**
- **La Vecchia, C.** (2001). "Epidemiology of ovarian cancer: a summary review." *Eur J Cancer Prev* **10**(2): 125-129.
- **La Vecchia, C. and S. Franceschi** (1999). "Oral contraceptives and ovarian cancer." *Eur J Cancer Prev* **8**(4): 297-304.
- **Lee, C. H., T. S. Wong, J. Y. Chan, S. C. Lu, P. Lin, A. J. Cheng, Y. J. Chen, J. S. Chang, S. H. Hsiao, Y. W. Leu, C. I. Li, J. R. Hsiao and J. Y. Chang** (2013). "Epigenetic regulation of the X-linked tumour suppressors BEX1 and LDOC1 in oral squamous cell carcinoma." *J Pathol* **230**(3): 298-309.
- **Lee, K. W., N. J. Kang, Y. S. Heo, E. A. Rogozin, A. Pugliese, M. K. Hwang, G. T. Bowden, A. M. Bode, H. J. Lee and Z. Dong** (2008). "Raf and MEK protein kinases are direct molecular targets for the chemopreventive effect of quercetin, a major flavonol in red wine." *Cancer Res* **68**(3): 946-955.
- **Lin, A. and M. Karin** (2003). "NF-kappaB in cancer: a marked target." *Semin Cancer Biol* **13**(2): 107-114.
- **Lopez-Serra, L. and M. Esteller** (2008). "Proteins that bind methylated DNA and human cancer: reading the wrong words." *Br J Cancer* **98**(12): 1881-1885.
- **Lopez, J., M. Percharde, H. M. Coley, A. Webb and T. Crook** (2009). "The context and potential of epigenetics in oncology." *Br J Cancer* **100**(4): 571-577.
- **Luo, J. L., H. Kamata and M. Karin** (2005). "The anti-death machinery in IKK/NF-kappaB signaling." *J Clin Immunol* **25**(6): 541-550.
- **Luo, J. L., H. Kamata and M. Karin** (2005). "IKK/NF-kappaB signaling: balancing life and death--a new approach to cancer therapy." *J Clin Invest* **115**(10): 2625-2632.
- **Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica and F. Balkwill** (2008). "Cancer-related inflammation." *Nature* **454**(7203): 436-444.

- **Matsuo, K., S. Mabuchi, M. Okazawa, M. Kawano, H. Kuroda, S. Kamiura and T. Kimura** (2014). "Clinical implication of surgically treated early-stage cervical cancer with multiple high-risk factors." J Gynecol Oncol.
- **McCluggage, W. G.** (2011). "Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis." Pathology **43**(5): 420-432.
- **Mizutani, K., D. Koike, S. Suetsugu and T. Takenawa** (2005). "WAVE3 functions as a negative regulator of LDOC1." J Biochem **138**(5): 639-646.
- **Munson, K., Clark, J., Lamparska-Kupsik, K., Smith, S. S.** (2007). "Recovery of bisulfite-converted genomic sequences in the methylation-sensitive QPCR." Nucleic Acids Res **35**(9): 2893-2903.
- **Nagasaki, K., T. Manabe, H. Hanzawa, N. Maass, T. Tsukada and K. Yamaguchi** (1999). "Identification of a novel gene, LDOC1, down-regulated in cancer cell lines." Cancer Lett **140**(1-2): 227-234.
- **Nagasaki, K., C. Schem, C. von Kaisenberg, M. Biallek, F. Rosel, W. Jonat and N. Maass** (2003). "Leucine-zipper protein, LDOC1, inhibits NF-kappaB activation and sensitizes pancreatic cancer cells to apoptosis." Int J Cancer **105**(4): 454-458.
- **Ness, R. B. and C. Cottreau** (1999). "Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer." J Natl Cancer Inst **91**(17): 1459-1467.
- **Ogawa, R., H. Ishiguro, Y. Kuwabara, M. Kimura, A. Mitsui, Y. Mori, R. Mori, K.**
- **Partridge, E., Greenlee, R.T., Xu, J-L., PhD, Kreimer, A.R., Williams, C., Riley, T.,**
- **Perets, R., G. A. Wyant, K. W. Muto, J. G. Bijron, B. B. Poole, K. T. Chin, J. Y. Chen, A. W. Ohman, C. D. Stepule, S. Kwak, A. M. Karst, M. S. Hirsch, S. R. Setlur, C. P. Crum, D. M. Dinulescu and R. Drapkin** (2013). "Transformation of the fallopian tube secretory epithelium leads to high-grade serous ovarian cancer in Brca;Tp53;Pten models." Cancer Cell **24**(6): 751-765.
- **Pett, M. and N. Coleman** (2007). "Integration of high-risk human papillomavirus: a key event in cervical carcinogenesis?" J Pathol **212**(4): 356-367.
- **Plumb, J. A., G. Strathdee, J. Sludden, S. B. Kaye and R. Brown** (2000). "Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter." Cancer Res **60**(21): 6039-6044.
- **Pradhan, S., A. Bacolla, R. D. Wells and R. J. Roberts** (1999). "Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation." J Biol Chem **274**(46): 33002-33010.
- **Prasad, S., J. Ravindran and B. B. Aggarwal** (2010). "NF-kappaB and cancer: how intimate is this relationship." Mol Cell Biochem **336**(1-2): 25-37.
- **Rebeck, T. R., N. D. Kauff and S. M. Domchek** (2009). "Meta-analysis of risk reduction estimates associated with risk-reducing salpingo-oophorectomy in BRCA1 or BRCA2 mutation carriers." J Natl Cancer Inst **101**(2): 80-87.
- **Riordan, J. D., Dupuy, A. J.**(2013). "Domesticated transposable element gene products in human cancer." Mob Genet Elements **3**(5): e26693.
- **Roett, M. A. and P. Evans** (2009). "Ovarian cancer: an overview." Am Fam Physician **80**(6): 609-616.
- **Rosa, D. D., L. R. Medeiros, M. I. Edelweiss, P. R. Pohlmann and A. T. Stein** (2012). "Adjuvant platinum-based chemotherapy for early stage cervical cancer." Cochrane Database Syst Rev **6**: CD005342.

- **Salemi, M., D. Giuffrida, M. C. Giuffrida, P. F. Soma, A. Rolfo, L. Cimino, R. A. Condorelli, R. Castiglione, S. La Vignera and A. E. Calogero** (2012). "LDOC1 gene expression in two patients with head and neck squamous cell carcinomas and Parkinson's disease." *Tumori* **98**(3): 86e-88e.
- **Saslow, D., D. Solomon, H. W. Lawson, M. Killackey, S. L. Kulasingam, J. Cain, F. A. Garcia, A. T. Moriarty, A. G. Waxman, D. C. Wilbur, N. Wentzensen, L. S. Downs, Jr., M. Spitzer, A. B. Moscicki, E. L. Franco, M. H. Stoler, M. Schiffman, P. E. Castle, E. R. Myers and A.-A.-A. C. C. G. Committee** (2012). "American Cancer Society, American Society for Colposcopy and Cervical Pathology, and American Society for Clinical Pathology screening guidelines for the prevention and early detection of cervical cancer." *CA Cancer J Clin* **62**(3): 147-172.
- **Schiffman, M. and N. Wentzensen** (2013). "Human papillomavirus infection and the multistage carcinogenesis of cervical cancer." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **22**(4): 553-560.
- **Siegel, R., D. Naishadham and A. Jemal** (2012). "Cancer statistics for Hispanics/Latinos, 2012." *CA Cancer J Clin* **62**(5): 283-298.
- **Sonnenschein, C. and A. M. Soto** (2013). "The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: a critique." *J Biosci* **38**(3): 651-663.
- **Tingulstad, S., B. Hagen, F. E. Skjeldestad, T. Halvorsen, K. Nustad and M. Onsrud** (1999). "The risk-of-malignancy index to evaluate potential ovarian cancers in local hospitals." *Obstet Gynecol* **93**(3): 448-452.
- **Vargas, A. N.** (2014). "Natural history of ovarian cancer." *Ecancermedicalsecience* **8**: 465.
- **Wentzensen, N., von Knebel Doeberitz, M.** (2007). "Biomarkers in cervical cancer screening." *Dis Markers* **23**(4): 315-330.
- **Wentzensen, N., J. Walker, M. Schiffman, H. P. Yang, R. E. Zuna, S. T. Dunn, R. A. Allen, R. Zhang, M. Sherman, M. A. Gold and S. S. Wang** (2013). "Heterogeneity of high-grade cervical intraepithelial neoplasia related to HPV16: implications for natural history and management." *Int J Cancer* **132**(1): 148-154.
- **Zhang, R., Y. F. He, M. Chen, C. M. Chen, Q. J. Zhu, H. Lu, Z. H. Wei, F. Li, X. X. Zhang, C. J. Xu and L. Yu** (2014). "Diagnosis of 25 genotypes of human papillomaviruses for their physical statuses in cervical precancerous/cancerous lesions: a comparison of E2/E6E7 ratio-based vs. multiple E1-L1/E6E7 ratio-based detection techniques." *J Transl Med* **12**(1): 282.
- **zur Hausen, H.** (2009). "Papillomaviruses in the causation of human cancers - a brief historical account." *Virology* **384**(2): 260-5.

Quellen

- WHO - International Agency for Research on Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, in:
http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx, zuletzt aufgerufen am 19.04.2015
- WHO - International Agency for Research on Cancer: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012, in:

http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx, zuletzt aufgerufen am 19.04.2015

- National Cancer Institute: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, in: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/cervix.html>, zuletzt aufgerufen am 19.04.2015
- National Cancer Institute: Surveillance, Epidemiology, and End Results Program, in: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>, zuletzt aufgerufen am 19.04.2015

7. Abkürzungsverzeichnis

AdoMet	S-Adenosylmethionin
AFP	Alpha-1-Fetoprotein
AML	Akute lymphatische Leukämie
AP	Alkalische Phosphatase
Ap-1	Activator protein 1
Bcl-2	B-cell lymphoma-2
BEX1	brain-expressed X-linked protein 1
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BRCA 1, 2	Breast Cancer Gene 1, 2
CA 125	Cancer Antigen 125
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CEA	Carcinoembryonales Antigen
CIN	Zervikale intraepitheliale Neoplasie
CLL	Chronisch lymphatische Leukämie
CML	Chronisch myeloische Leukämie
CRE	Cre Recombinase
CREB	cAMP response element-binding protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
β-HCG	Beta Humanes Choriongonadotropin
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
hMLH1	Human mutL homolog 1
HPV	Humanes Papillomvirus
HSIL	High-grade Squamous Intraepithelial Lesion

IGF1	Insulin-like growth factor 1
IκB	Inhibitor of κB
IKK	IκB Kinase
LDOC1-MSP	methylierungsspezifischer LDOC1-Primer
Ki-67	Antigen KI-67, MKI67 (Ki - Kiel)
LAST	Lower Anogenital Squamous Terminology
LAVRH	Laparoscopic assisted vaginal radical hysterectomy
LDOC1	Leucine zipper downregulated in ovarian cancer 1
LEEP	Loop electrical excision procedure
LRH	Laparoscopic radical hysterectomy
LSIL	Low-grade Squamous Intraepithelial Lesion
MBD	Methyl-CpG binding domain protein
mcm-2	mini-chromosome maintenance protein 2
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MeCP 2	Methyl-CpG binding protein 2
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
MSP	Methylierungsspezifische PCR
MyoD	Myogener Faktor 3
NaCl	Natriumchlorid
NBT	Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NIK	NF-κB induzierende Kinase
OSCC	Oral squamous cell carcinoma

p53	Transkriptionsfaktor, Name aufgrund der scheinbaren Molekularmasse von 53 kDa auf einem SDS-PAGE Gel
PAM	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLCO	Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer Screening Trial
PVDF	Polyvinylidenfluorid
Rb	Retinoblastom-Protein (pRb)
RMI	Risk of malignancy index for ovarian tumor
RNA	Ribonukleinsäure
RRSO	Risk-reducing salpingo-oophorectomy
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SAM	S-Adenosylmethionin
SAH	S-Adenosylhomocystein
TMMR	Total mesometrial resection
TNF	Tumor necrosis factor
TP53	Tumorsuppressorgen
WAVE3	Wiskott-Aldrich Syndrom Protein
WT1	Wilms tumor 1

8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - Modell der Entstehung des Zervixkarzinoms unter dem Einfluss der HPV Infektion (natural history model) und multiplen Risikofaktoren. (Nach: Schiffman and Wentzensen 2013)

Abbildung 2 - Umwandlung von Cytosin zu 5-Methylcytosin

Abbildung 3 – LDOC1-Promotor

Abbildung 4 - RNA-Präparation mit Hilfe des RNeasy Plus Mini Kit

Abbildung 5 - Illustration der Natriumhydrogensulfit-PCR Technik zur Identifikation von 5-Methylcytosin in der DNA-Sequenz (Nach Ibrahim 2010).

Abbildung 6 - Ablauf der Bisulfit-Konvertierung mit dem Cells-to-CpG Bisulfite Conversion Kit

Abbildung 7 - Darstellung des Immunoblot nach Laemmli

Abbildung 8 - Expression von LDOC1 in Zervixkarzinomzelllinien

Abbildung 9 - Expression von LDOC1 in Ovarialkarzinomzelllinien

Abbildung 10 - Qualitative PCR Analyse genomischer DNA von Zervix- und Ovarialkarzinomzelllinien

Abbildung 11 - PCR Analyse Bisulfit-konvertierter DNA von Zervixkarzinomzelllinien

Abbildung 12 - PCR Analyse Bisulfit-konvertierter DNA von Ovarialkarzinomzelllinien

Abbildung 13 - Reexpression von LDOC1 in Zervixkarzinomzelllinien durch die Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin

Abbildung 14 - Reexpression von LDOC1 in Ovarialkarzinomzelllinien durch die Behandlung mit 5-Aza-2'-deoxycytidin

Abbildung 15 - Analyse der LDOC1 Expression in Zervixkarzinom-Gewebeproben und nicht malignen Gewebeproben der Cervix uteri

Abbildung 16 - Ektopische Überexpression von LDOC1 induziert Apoptose in HeLa Zellen

9. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 - Vorgang der RNA-Gewinnung aus Gewebeproben mittels TRIzol-Methode

Tabelle 2 - Schritte der cDNA-Synthese

Tabelle 3 - Ansatz für die semiquantitative PCR

Tabelle 4 - Ablauf der semiquantitativen PCR

Tabelle 5 - Ansatz für die quantitative PCR

Tabelle 6 - Ablauf der Bisulfit-Konvertierung

10. Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in folgender Originalarbeit veröffentlicht:

Buchholtz, M. L., A. Brüning, I. Mylonas and J. Jückstock (2014). „Epigenetic silencing of the LDOC1 tumor suppressor gene in ovarian cancer cells." Arch Gynecol Obstet.

Buchholtz, M. L., J. Jückstock, E. Weber, I. Mylonas, D. Dian and A. Brüning (2013). „Loss of LDOC1 expression by promoter methylation in cervical cancer cells." Cancer Invest 31(9): 571-577.

Posterpräsentation:

Buchholtz, M. L., J. Jückstock, I. Mylonas, K. Friese, D. Dian, A. Brüning

„LDOC1 expression by promoter methylation in cervical cancer.“

55th Symposium of the Society for Histochemistry - Intermediate Filaments in Health and Disease (Juni 11 – 14, 2013)

11.Danksagung

Für die Möglichkeit, meine Dissertation in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität München erstellen zu dürfen, danke ich dem Direktor, Herrn Professor Dr. med. Klaus Friese.

Meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. med. Dr. hc. Ioannis Mylonas, danke ich ganz besonders für die Motivation, eine experimentelle Doktorarbeit zu beginnen, für seine uneingeschränkte Unterstützung, die über den Rahmen der Doktorarbeit hinausging, und sein Wohlwollen und Interesse uns Doktoranden gegenüber.

Ganz besonders möchte ich meinen Betreuer, Herrn Dr. rer. nat. Ansgar Brüning, erwähnen, dem ich für seine selbstlose Unterstützung und seinen Einsatz in meinem Interesse zu großem Dank verpflichtet bin. Er hat mich nicht nur die Fähigkeiten für die Laborarbeit gelehrt, sondern auch den adäquaten Umgang mit den „Aufs und Abs“ bei einer experimentellen Arbeit und nicht zuletzt, was „beherztes Kürzen“ bedeutet. Seine Sicht auf das Leben bleibt unvergessen.

Ohne meine Betreuerin, Frau Dr. Julia Jückstock, hätte ich diese Doktorarbeit nicht begonnen, denn sie war es, die mich Herrn Professor Mylonas und Herrn Dr. Brüning vorstellte. In freundschaftlicher Zusammenarbeit haben wir das Paper über LDOC1 am Ovar verfasst. Für Ihre anregende Unterstützung bin ich sehr dankbar.

Meinen Eltern, meiner Schwester Dr. Gabriele Buchholtz und Matthias Vallbracht gebührt außerdem großer Dank, da sie mich nicht nur bei dieser Arbeit begleitet und unterstützt haben, sondern in jeder Lebenslage wahre Felsen für mich sind.

Eidesstattliche Versicherung

Buchholtz, Marie-Luise

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

VERLUST DER EXPRESSION VON LDOC1 DURCH PROMOTORMETHYLIERUNG IN ZERVIX- UND OVARIALKARZINOMZELLEN

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand