

Aus der Abteilung Pathologie  
(Prof. Dr. med. H.-J. Radzun)  
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Epigenetische Beeinflussung der Proliferation, Expression von  
Matrix-Metalloproteinasen, Migration und Invasion von  
Harnblasenkarzinomzelllinien**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Magdalena Kosz  
aus  
Krakau / Polen

GÖTTINGEN 2010

**Dekan:** Prof. Dr. med. C. Frömmel

**I. Berichterstatter:** Priv.-Doz. Dr. med. Hemmerlein

**II. Berichterstatter/in:** Prof. Dr. rer. nat. Kube

**III. Berichterstatter/in:** Prof. Dr. med. Oppermann

**Tag der mündlichen Prüfung:** 01.06.2010

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Harnblasenkarzinome</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Allgemeines zu Harnblasenkarzinomen .....	1
1.1.2 Therapie der Harnblasenkarzinome .....	2
<b>1.2 Epigenetik</b> .....	<b>2</b>
1.2.1 Was ist Epigenetik? .....	2
1.2.2 DNA-Methylierung .....	3
1.2.3 Histon-Acetylierung und Histon-Deacetylierung.....	4
1.2.4 Epigenetische Modifikatoren .....	5
1.2.4.1 5-aza-2'-deoxycytidin.....	5
1.2.4.2 Trichostatin A.....	6
1.2.5 Epigenetische Veränderungen in Harnblasenkarzinomen.....	6
<b>1.3 Matrix-Metalloproteinasen und ihre spezifischen Inhibitoren</b> .....	<b>7</b>
1.3.1 Aufbau .....	7
1.3.2 Einteilung .....	8
1.3.3 Funktion .....	9
1.3.4 Regulation .....	9
<b>2 Ziele</b> .....	<b>11</b>
<b>3 Material &amp; Methoden</b> .....	<b>12</b>
<b>3.1 Labormaterialien</b> .....	<b>12</b>
3.1.1 Technische Geräte .....	12
3.1.2 Software .....	13
3.1.3 Kits .....	13
3.1.4 Lösungen, Reagenzien und anderes Zubehör.....	13
3.1.5 Weiteres Zubehör .....	16
3.1.6 Harnblasenkarzinom-Zelllinien.....	16
3.1.7 Antikörper-Immunzytochemie .....	16
3.1.8 Spezifische Primer für die Polymerase-Ketten-Reaktion.....	17
<b>3.2 Methoden</b> .....	<b>18</b>
3.2.1 Zellkultur und Behandlung der Zellen mit Trichostatin A und 5-aza-2'- deoxycytidin .....	18

3.2.2 Funktionelle Untersuchungen .....	18
3.2.2.1 Messung der Tumorverdopplungszeit .....	18
3.2.2.2 Proliferationsassay.....	18
3.2.2.3 Migrationsassay .....	20
3.2.2.4 Invasionsassay.....	21
3.2.3 mRNA-Expressionsanalyse.....	22
3.2.3.1 RNA-Extraktion .....	22
3.2.3.2 Agilent-Kontrolle der RNA.....	22
3.2.3.3 Reverse Transkription (RT).....	22
3.2.4 Immunzytochemie .....	22
3.2.4.1 Real Time PCR (RT-PCR).....	23
3.2.4.2 Anfertigung von Zytozentrifugenpräparaten.....	24
3.2.4.3 Anfärbung der Zytozentrifugenpräparate .....	25
<b>3.3 Statistik.....</b>	<b>25</b>
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>26</b>
<b>4.1 Proliferationsverhalten der Tumorzelllinien.....</b>	<b>26</b>
<b>4.2 Proliferationsverhalten der einzelnen Tumorzelllinien nach Behandlung mit 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A .....</b>	<b>27</b>
<b>4.3 Expression der Matrix-Metalloproteinasen und ihrer spezifischen Inhibitoren .....</b>	<b>30</b>
4.3.1 Expression der MMPs und TIMPs nach Behandlung mit 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A.....	30
4.3.2 Immunzytochemische Analyse der Proteinexpression.....	34
<b>4.4 Migrationsverhalten der Zelllinien unter dem Einfluss von 5-aza-2'-deoxycytidin, Trichostatin A .....</b>	<b>37</b>
<b>4.5 Invasionsverhalten der Zelllinien unter dem Einfluss von 5-aza-2'-deoxycytidin, Trichostatin A .....</b>	<b>39</b>
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>41</b>
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>48</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>49</b>

## Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms	1
Tabelle 2: Die MMP-Familie	8
Tabelle 3: Technische Geräte	12
Tabelle 4: Auflistung der benötigten Software	13
Tabelle 5: Auflistung der benötigten Kits	13
Tabelle 6: Auflistung aller benötigten Reagenzien, anderes Zubehör	13
Tabelle 7: Auflistung von weiterem Zubehör	16
Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Zelllinien	16
Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Antikörper	16
Tabelle 10: Auflistung der benötigten Primer für die Polymerase-Ketten-Reaktion	17
Tabelle 11: Behandlungsschema Proliferationsassay	19
Tabelle 12: Behandlungsschema Migrations- und Invasionsassay	20
Tabelle 13: Befüllungsschema Invasions- und Migrationsassay	20
Tabelle 14: Pipettieransatz Reverse Transkription	23
Tabelle 15: Standardmäßiger Pipettieransatz RT-PCR	23
Tabelle 16: Standardmäßiges Cycler Profil RT-PCR	24
Tabelle 17: Verdopplungszeit der einzelnen Zellreihen	27
Tabelle 18: Angaben der Ct-Werte in Bezug auf die Expressionsstärke	30
Tabelle 19: Überprüfung der MMP-Expressions-Modifikation auf statistische Signifikanz	34
Tabelle 20: Vergleich der MMP- und TIMP-Proteinexpression mit der genetischen MMP- und TIMP-Expression	36
Abbildung 1: Wachstumsverhalten der Tumorzelllinien RT-4, RT-112, VMCUB-1, T-24 nach 48 Stunden	26
Abbildung 2 A: Proliferationsverhalten der Zelllinie RT-4 unter Behandlung mit 5-aza-dc, TSA, 5-aza-dc und TSA	28
Abbildung 2 B: Proliferationsverhalten der Zelllinie RT-112 unter Behandlung mit 5-aza-dc, TSA, 5-aza-dc und TSA	28
Abbildung 2 C: Proliferationsverhalten der Zelllinie VMCUB-1 unter Behandlung mit 5-aza-dc, TSA, 5-aza-dc und TSA	29
Abbildung 2 D: Proliferationsverhalten der Zelllinie T-24 unter Behandlung mit 5-aza-dc, TSA, 5-aza-dc und TSA	29
Abbildung 3 A: Expressionsmuster der Zelllinie RT-4	31
Abbildung 3 B: Expressionsmuster der Zelllinie RT-112	32
Abbildung 3 C: Expressionsmuster der Zelllinie VMCUB-1	32
Abbildung 3 D: Expressionsmuster der Zelllinie T-24	33
Abbildung 3 E: Farbliche Darstellung des Schwellenwert-Zyklus (C <sub>t</sub> )	33
Abbildung 4: Darstellung der Zytozentrifugenpräparate einiger behandelter und unbehandelter Zelllinien	35
Abbildung 5: Darstellung des Migrationsverhaltens der einzelnen Tumorzelllinien, behandelt und unbehandelt	37
Abbildung 6: Darstellung der Migrationsfilter am Beispiel der Zelllinien RT-4 und VMCUB-1	38
Abbildung 7: Darstellung des Invasionsverhaltens der einzelnen Tumorzelllinien, behandelt und unbehandelt	39
Abbildung 8: Darstellung der Invasionsfilter am Beispiel der Zelllinien RT-4 und VMCUB-1	40

### Abkürzungsverzeichnis

5-aza	5-aza-2'-deoxycytidin
A	Adenin
ADP	Adenosindiphosphat
BCG	Bacillus Calmette-Guérin
BSA	Bovines Serum-Albumin
C	Cytosin
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
Ct	Threshold cycle (=Schwellenwert-Zyklus)
DBC1	Deleted in bladder cancer 1 locus
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
DNMTI	DNA-Methyltransferase-Inhibitor
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	fetal calf serum (=Fetales Kälberserum)
Fhit	fragile histidine triad
G	Guanosin
HATs	Histonacetyltransferasen
HDAC	Histondeacetylasen
HDACI	Histondeacetylaseinhibitor
MMP	Matrix-Metalloproteinase
MT-MMP	Membrane-type Matrix-Metalloproteinase
PBGD	Porphobilinogendeaminase
PCR	Polymerase Chain Reaction (=Polymeraskettenreaktion)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RT-PCR	Real-Time Polymerase Chain Reaction
siRNA	Small interfering RNA
T	Thymin
TIMP	Tissue Inhibitor of Matrix-Metalloproteinases
TNM	Tumor Nodes Metastasen
tPA	tissue-type plasminogen activator
TSA	Trichostatin A
TUR	Transurethrale Resektion
uPA	Urokinase-Typ Plasminogen Aktivator

# 1 Einleitung

## 1.1 Harnblasenkarzinome

### 1.1.1 Allgemeines zu Harnblasenkarzinomen

In Deutschland erkranken pro Jahr 15000 Menschen an einem Harnblasenkarzinom, weltweit sind es circa 260000 Menschen (Rübben 2007). Harnblasenkarzinome sind die vierthäufigsten malignen Tumore bei Männern, bei den Frauen stehen sie an neunter Stelle (Rosenberg und Hahn 2009). Bei 95% aller diagnostizierten Harnblasenkarzinome handelt es sich um Urothelkarzinome (Vom Dorp et al. 2007). Die Stadieneinteilung der Harnblasenkarzinome erfolgt nach der TNM-Klassifikation (Engeler et al. 2005).

Tabelle 1: TNM-Klassifikation des Harnblasenkarzinoms (Engeler et al. 2005, S.13).

<b>Primärtumor</b>	
Ta	Nichtinvasiv papillär
Tis	Carcinoma in situ
T1	Infiltriert subepitheliales Bindegewebe
T2	Infiltriert Muskulatur
T2a	- Innere Hälfte
T2b	- Äußere Hälfte
T3	Infiltriert perivesikales Fettgewebe
T3a	- Mikroskopisch
T3b	- Makroskopisch
T4	Infiltriert
T4a	- Prostata, Uterus, Vagina
T4b	- Beckenwand, Bauchdecke
<b>Lymphknoten</b>	
N1	Solitär bis 2cm
N2	Solitär > 2-5cm, multipel bis 5cm
N3	> 5cm
<b>Metastasen</b>	
M1	Fernmetastasen

Für die Prognose ist außerdem das Grading von Bedeutung. In allen Grading-Schemata gilt als generelle Klassifizierung: Alle Tumorzellen, welche noch eine deutliche Ähnlichkeit mit

einem normalen Urothel haben, also gut differenziert sind, werden als „low-grade“ bezeichnet. Zytologische Anaplasien, welche schwach differenziert sind, werden als „high-grade“ Harnblasenkarzinome bezeichnet (Reuter 2006).

### 1.1.2 Therapie der Harnblasenkarzinome

Die Therapie des Harnblasenkarzinoms erfolgt stadienorientiert. Oberflächliche Harnblasenkarzinome (Ta-T1) werden organerhaltend durch Abtragung mittels Transurethraler Resektion (TUR) behandelt (Vom Dorp et al. 2007). Zur Vermeidung von Rezidiven hat sich eine Frühinstillation mit Chemotherapeutika, wie Epirubicin und Mitomycin C, als sinnvoll erwiesen (Rosenberg und Hahn 2009).

Das Carcinoma in situ wird zunächst für 3 Monate mit BCG-Instillation (BCG = Bacillus Calmette Guérin) behandelt, falls es unter dieser Therapie zu keiner Remission kommt, wird eine radikale Zystektomie empfohlen (Goebell et al. 2006).

Bei muskelinvasiven Urothelkarzinomen der Harnblase gilt die radikale Zystektomie mit pelviner Lymphadenektomie immer noch als Therapie der 1. Wahl. Dabei werden bei Männern neben der Blase auch Prostata, Samenblasen sowie perivesikales Gewebe mitentfernt. Bei Frauen zusätzlich Uterus, Tuben und vordere Scheidenmanschette (Rosenberg und Hahn 2009).

## **1.2 Epigenetik**

### 1.2.1 Was ist Epigenetik?

Die genetische Information, welche durch eine bestimmte Reihenfolge der DNA-Moleküle entsteht, ist die eine Form von vererbbarer Information. Eine andere Form liefert uns die Epigenetik, in der durch bestimmte posttranskriptionelle Prozesse eine Veränderung der Genexpression erzielt werden kann, ohne dabei die Nukleinsäuresequenz zu ändern (Ballestar und Esteller 2005, Nephew und Huang 2002).

Epigenetische Mechanismen sind in allen eukaryotischen Zellen bekannt, wie zum Beispiel bei der Inaktivierung des X-Chromosoms in Säugetierzellen während der Entwicklung (Varga-Weisz 2005), oder bei der „Genomischen Prägung“ (Razin und Kantor 2005). Epigenetische Modifikation kann durch Manipulation von Histonen infolge chemischer Modifikation wie Phosphorylierung, Methylierung, Ribosylierung, Acetylierung (Smith et al. 2007) aber auch durch Methylierung beziehungsweise Demethylierung von DNA-



Nukleotiden erfolgen (Lübbert und Claus 2007). In dieser Arbeit spielen vor allem die Histon-Acetylierungen und Histon-Deacetylierungen sowie die DNA-Methylierungen und DNA-Demethylierungen eine Rolle. Durch diese Mechanismen kann es je nach Art der chemischen Modifikation entweder zu einer Genaktivierung oder zu einer Genstilllegung kommen (Jones und Laird 1999). Dadurch wird die Expression von für diese Zelle unnötigen Genen verhindert und eine gezielte Expression von gewebespezifischen Genprodukten ermöglicht (Lübbert und Claus 2007).

Durch die chemischen Modifikationen entsteht der „epigenetische Code“ einer Zelle, der in Genaktivierungen und Geninaktivierungen übersetzt wird. Dieser Code wird, wie auch die Nukleotidsequenz, auf die Tochterzellen vererbt (Smith et al. 2007).

Dieser Mechanismus spielt vor allem eine Rolle in Genen, welche Zellzyklus, Wachstum und Apoptose der einzelnen Zellen regulieren. Bei einer Stilllegung von Tumorsuppressorgenen oder aber auch bei einer übermäßigen Aktivierung von Onkogenen kann es zu einer malignen Entartung von Zellen kommen (Goffin und Eisenhauer 2002).

### 1.2.2 DNA-Methylierung

Die häufigste epigenetische Modifikation in Säuger-Genomen ist die DNA-Methylierung (Nephew und Huang 2002). Hierbei kommt es zum Anfügen eines Methylrestes an die 5'-Position des Pyrimidinringes von Cytosinmolekülen in CpG-Dinukleotiden (Yoo und Jones 2006).

Im Genom gibt es CpG-arme Regionen sowie CpG-reiche Regionen. Letztere bilden die sogenannten „CpG-Inseln“. CpG-Inseln sind Bereiche, welche sich über mehr als 500 Basenpaare erstrecken und einen GC-Gehalt von mehr als 55% aufweisen. Diese CpG-Inseln sind vermehrt in Promotorregionen in Nähe der 5'-Region anzutreffen. In gesunden Zellen finden sich mit wenigen Ausnahmen methylierte CpG-arme Bereiche sowie hypomethylierte CpG-Inseln. Eine Ausnahme liefert beispielsweise das inaktivierte X-Chromosom in weiblichen Säugerzellen. In diesem Fall kommt es zu einer umgekehrten Verteilung der Methylierungsmuster, nämlich zu hypermethylierten CpG-Inseln und hypomethylierten CpG-armen Regionen. Dieses Methylierungsmuster wurde ebenfalls vermehrt in Tumoren beobachtet und ist mit einer Stilllegung von Genen assoziiert (Branscombe-Miranda und Jones 2007). Besonders relevant sind Hypermethylierungen an CpG-Inseln von Tumorsuppressorgenen, welche zu deren Inaktivierung führen. Sie spielen eine zentrale Rolle in der Krebsentstehung (Shukeir et al. 2006).

Generell kann man sagen, dass eine hohe Methylierungsfrequenz stark mit einer Transkriptionsrepression assoziiert ist (Lehmann und Kreipe 2004). Viele Studien haben sich bereits mit diesem Phänomen beschäftigt und konnten einen Zusammenhang zwischen Methylierungsdichte von CpG-Inseln und Transkriptionsaktivität aufzeigen (Jones und Laird 1999).

In Säugerzellen wird der Methylierungsvorgang durch verschiedene DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert. Die DNA-Methyltransferasen lassen sich grundsätzlich in 2 Typen unterteilen: Die „de-novo“-Methyltransferasen (DNMT3a und DNMT3b), welche für die Einführung von DNA-Methylierungen während der embryonalen Entwicklung als auch für die Methylierung der CpG-Inseln zuständig sind, sowie die „maintenance“-Methyltransferasen (DNMT1) (=Erhaltungsmethyltransferasen), welche für die Erhaltung von Methylierungsmustern über Zellteilungen hinweg verantwortlich sind und auf diese Weise die Vererbung der Methylierungsmuster auf Tochterzellen sicherstellen (Oka et al. 2005).

Eine Transkriptionshemmung durch CpG-Methylierung kann auf zwei Wegen erfolgen: Zum einen über die direkte Interferenz mit Transkriptionsfaktoren, das Andocken derselben an die DNA wird verhindert (Bird und Wolffe 1999), und zum anderen indirekt über das Anheften eines Multiprotein-Repressionskomplexes, der wiederum zu der Entwicklung einer inaktiven Chromatinstruktur führt (Razin und Kantor 2005).

### 1.2.3 Histon-Acetylierung und Histon-Deacetylierung

Eine weitere wichtige Stellung in der Epigenetik nehmen Modifikationen an Histonen ein, welche vorwiegend an den N-terminalen, 25 Aminosäuren langen Regionen stattfinden. Diese Regionen werden als „Histon-Schwänze“ bezeichnet und ragen aus jedem Histon im Kern eines Nukleosoms heraus. An diesen Stellen können chemische Modifikationen, wie Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, ADP-Ribosylierung sowie Ubiquitinierung etc. ablaufen (Varga-Weisz 2005).

Histonacetylierungen, die in dieser Arbeit von Belang sind, werden durch Histonacetyltransferasen (HATs) katalysiert und finden überwiegend an Lysinresten der Histone H3 und H4 statt (Chen et al. 2006). Durch Hyper-Acetylierungen an den Lysinresten kommt es zu einer Neutralisation der positiven Histon-Ladung, folglich zu einer Affinitätsverminderung zwischen den positiv geladenen Histonen und der negativ geladenen DNA und somit zur Lockerung der Chromatinstruktur mit erhöhter Zugänglichkeit für Transkriptionsfaktoren und nachfolgender transkriptioneller Aktivierung bestimmter Gene (Ducasse und Brown 2006).

Die Entfernung der Acetylgruppen von den Lysinresten besorgen spezifische Histondeacetylasen (HDAC) und führen durch Deacetylierung und nachfolgende Chromatinkondensation wieder zu einer Genrepression (Ailenberg und Silverman 2002). Das dynamische Gleichgewicht zwischen Acetylierung und Deacetylierung an Histonen ermöglicht eine grundlegende Regulierung der transkriptionellen Aktivität verschiedenster Gene (Lübbert und Claus 2007). Ein Ungleichgewicht zwischen diesen Modifikationen führt zu einer deregulierten Genexpression und wird mit maligner Entartung assoziiert (Ducasse und Brown 2006). So zeigten Seligson et al. 2005, dass histonmodifizierende Enzyme eine veränderte Aktivität in Krebszellen aufweisen. Störungen des zellspezifischen Acetylierungsmusters können zu veränderter Genexpression mit verändertem Proliferationsverhalten und daraus folgender maligner Entartung führen.

#### 1.2.4 Epigenetische Modifikatoren

##### *1.2.4.1 5-aza-2'-deoxycytidin*

Eine Möglichkeit zur Reaktivierung dieser stillgelegten Gene, bieten Demethylierungsagenzien, wie 5-aza-2'-deoxycytidin (Bender et al. 1998). Bei 5-aza-2'-deoxycytidin handelt es sich um ein Cytosinanalogen, welches als Desoxyribonukleosid in neu synthetisierte DNA-Stränge inkorporiert wird. Die DNMT1, welche das Methylierungsmuster an die neu synthetisierten DNA-Stränge weitergibt, wird irreversibel an das Cytosinanalogen gebunden. Dadurch kommt es zu einem Verlust der DNMT1-Aktivität und somit zu einem passiven Methylierungsverlust in den nachfolgenden Zellteilungen mit nachfolgender Reexpression der betroffenen Gene (Christman 2002).

Dieses Prinzip wurde bereits vielfach dargelegt. Ferguson et al. beschrieben 1995 eine Hypermethylierung an CpG-Inseln in der 5' Region des Östrogen-Rezeptor-Gens in Östrogen-Rezeptor-negativen Brustkrebszellen. Nach einer Behandlung der Zellen mit 5-aza-2'-deoxycytidin kam es zu einer Reaktivierung des Gens und zu einer Expression des Östrogen-Rezeptors, was in diesem Fall auf eine Demethylierung der CpG-Inseln zurückgeführt wurde. Auf die gleiche Art können ebenfalls stillgelegte Tumorsuppressorgene reaktiviert werden, Bender et al. zeigten dies am Beispiel des Zellzyklus-regulierenden Gens p16, welches den Übergang von der G1- in die S-Phase im Zellzyklus reguliert, am Beispiel der Harnblasenkarzinomzelllinie T-24 (Bender et al. 1998).

#### 1.2.4.2 *Trichostatin A*

Ein neues therapeutisches Konzept in der Tumorbehandlung stellen die Histondeacetylaseinhibitoren (HDACIs), welche die enzymatische Aktivität der HDACs blockieren und so eine Transkriptionsreaktivierung von Tumorsuppressorgenen herbeiführen (Lübbert und Claus 2007). In diese Gruppe gehört auch Trichostatin A, ursprünglich ein antimykotisches Antibiotikum, welches spezifisch und reversibel das Enzym Histondeacetylase (HDAC) hemmt (Mukhopadhyay et al. 2006). Dadurch bleiben die Histone acetyliert, die Chromatinstruktur weiterhin relaxiert und für Transkriptionsfaktoren an den DNA-Promotorregionen zugänglich. Obwohl eine Chromatin-Dekondensation eine verstärkte Gentranskription bewirkt, kommt es durch Hemmung der HDACs nicht zu einer generellen Erhöhung der Transkriptionsrate aller Gene. Vielmehr werden Gene spezifisch aktiviert (Ailenberg und Silverman 2002). Es gab bereits einige Versuche das Tumorwachstum mittels Trichostatin A in verschiedenen Karzinomen zu hemmen.

Bei Vigushin et al. kam es 2001 unter Trichostatin-A-Behandlung zu einer Histon-Hyperacetylierung an Histonprotein H4 und dadurch zu einer Proliferationshemmung in Mammakarzinom-Zelllinien. Ailenberg und Silverman beschrieben 2002 eine Apoptoseinduktion in Tumorzellen nach Trichostatin-A-Behandlung, welche über die Beeinflussung von Zellzyklus-kontrollierenden Genen erfolgte.

#### 1.2.5 Epigenetische Veränderungen in Harnblasenkarzinomen

In diversen Studien wurden bisher direkte epigenetische Wirkungen auf bestimmte Blasenkarzinom-Gene demonstriert. Darunter befanden sich unter anderem Zellzyklus-kontrollierende-Gene, Invasionsassoziierte-Gene, DNA-Reparatur-Gene, Tumorsuppressor-sowie Apoptose-assoziierte-Gene (Enokida und Nakagawa 2008).

So wurde das Gen DBC1 (Deleted in Bladder Cancer 1 gene), auf Chromosom 9q33.1, als potentiell Tumorsuppressorgen identifiziert, welches in Harnblasenkarzinomen gehäuft hypermethyliert vorlag. Die CpG-Hypermethylierung des Genpromotors führte zu einer verminderten Expression von DBC1 und somit zu einer verminderten Proliferationshemmung (Jose-Eneriz et al. 2006).

Für das Harnblasenkarzinom fanden Habuchi et al. 1998 das Tumorsuppressorgen (DBCCR1) auf der chromosomalen Region 9q32-q33, welches gehäuft hypermethyliert und somit herunterreguliert in Harnblasenkarzinomen vorzufinden war. Zur Überprüfung wurden die

Tumorzellen mit dem demethylierenden Agens 5-aza-2'-deoxycytidin behandelt. Unter der Behandlung kam es zu einer Reexpression des Gens.

Alle bisherigen Untersuchungen erfolgten mittels methylierungsspezifischer Analyse und quantitativer methylierungsspezifischer Analyse (Enokida und Nakagawa 2008), nicht jedoch mittels funktioneller Analysen.

### **1.3 Matrix-Metalloproteinasen und ihre spezifischen Inhibitoren**

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) umfassen eine Gruppe sezernierter oder membranständiger Enzyme, die Komponenten der Extrazellulären Matrix spalten. Diese Proteinasen spielen eine zentrale Rolle in diversen physiologischen Prozessen, wie Embryogenese, Gewebeumbau, Wundheilung, aber auch in Erkrankungen wie Arthritis oder Malignomen (Visse und Nagase 2003). MMPs werden in einer inaktiven Form als pro-MMP sezerniert und erfordern eine Aktivierung durch Autokatalyse oder durch andere Proteinasen, bevor sie Teile der ECM spalten können (Snoek-van Beurden und Von den Hoff 2005).

#### 1.3.1 Aufbau

Matrix-Metalloproteinasen bilden eine Familie Calcium-abhängiger, Zink-enthaltender Endopeptidasen, welche strukturell und funktional verwandt sind.

Jede MMP besteht aus einer spezifischen Domänen-Sequenz. Diese Sequenz beinhaltet ein Signalpeptid, eine Propeptid-Domäne, eine katalytische Domäne, sowie die C-terminale Hämopexin-ähnliche Domäne, die in fast allen MMPs vorhanden ist. Viele MMPs besitzen zusätzliche Domänen, wie zum Beispiel eine Transmembran- oder eine Zytoplasma-Domäne (Snoek-van Beurden und Von den Hoff 2005).

### 1.3.2 Einteilung

Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) werden nach ihren bevorzugten Spaltprodukten und ihrer Struktur in verschiedene Untergruppen eingeteilt, wobei auch Überschneidungen bei den bevorzugten Substraten auftreten (Lemaître und D'Armiento 2006).

Tabelle 2: Die MMP-Familie (aus Snoek-van Beurden und Von den Hof 2005, S. 74)

<b>Die MMP-Familie</b>			
<b>Untergruppe</b>	<b>MMP</b>	<b>Name</b>	<b>Substrat</b>
1. Kollagenasen	MMP-1	Collagenase-1	Kollagen I, II, III, VII, VIII, X; Gelatin
	MMP-8	Collagenase-2	Kollagen I, II, III, VII, VIII, X; Aggrekan; Gelatin
	MMP-13	Collagenase-3	Kollagen I, II, III, IV, IX, X, XIV; Gelatin
2. Gelatinasen	MMP-2	Gelatinase A	Gelatin; Kollagen I, II, III, IV, VII, X
	MMP-9	Gelatinase B	Gelatin; Kollagen IV, V
3. Stromelysine	MMP-3	Stromelysin-1	Kollagen II, IV, IX, X, XI; Gelatin
	MMP-10	Stromelysin-2	Kollagen IV; Laminin; Fibronectin; Elastin
	MMP-11	Stromelysin-3	Kollagen IV, Fibronectin, Laminin, Aggrekan
4. Matrilysine	MMP-7	Matrilysin-1	Fibronectin; Laminin; Kollagen IV; Gelatin
	MMP-26	Matrilysin-2	Fibrinogen; Fibronectin; Gelatin
5. MT-MMP	MMP-14	MT-1-MMP	Gelatin; Fibronectin; Laminin
	MMP-15	MT-2-MMP	Gelatin; Fibronectin; Laminin
	MMP-16	MT-3-MMP	Gelatin; Fibronectin; Laminin
	MMP-17	MT-4-MMP	Fibrinogen; Fibrin
	MMP-24	MT-5-MMP	Gelatin; Fibronectin; Laminin
	MMP-25	MT-6-MMP	Gelatin
6. Andere MMPs	MMP-12	Makrophagen-metalloelastase	Elastin; Fibronectin; Kollagen IV
	MMP-19		Aggrekan; Elastin; Fibrillin; Kollagen IV; Gelatin
	MMP-20	Enamelysin	Aggrekan
	MMP-21	XMMP	Aggrekan
	MMP-23		Gelatin; Casein; Fibronectin
	MMP-27	CMMP	unbekannt
	MMP-28	Epilysin	unbekannt

### 1.3.3 Funktion

Unter physiologischen Bedingungen sind die MMPs am Ab- und Umbau der ECM beteiligt, der in Prozessen wie Gewebewachstum, Skelettentwicklung und Wundheilung eine wichtige Rolle spielt (Lemaître und D'Armiento 2006). MMPs werden jedoch auch mit Tumorentstehung, Tumormetastasierung und anderen Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis oder auch kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht (Snoek-van Beurden und Von den Hof 2005). So zeigen auch einige MMPs eine erhöhte Expression und Aktivität in Harnblasenkarzinomen (Wallard et al. 2006).

Bei der Metastasierung muss sich die Tumorzelle vom Zellverband lösen, die ECM und die Basalmembran durchschreiten, um in das Gefäßlumen penetrieren zu können. An einem anderen Gewebe angelangt, muss sie auch dort wieder die gleichen Schranken überwinden, um sich neu anzusiedeln. Bei all diesen Vorgängen sind ihr die MMPs behilflich (Stamenkovic 2003).

MMPs wurden schon häufiger in erhöhter Konzentration bei Tumorerkrankungen gemessen (Seargent et al. 2005), korrelierten mit fortgeschrittenem Tumorstadium, vermehrter Invasion und Metastasenbildung (Egeblad und Werb 2002). Durch ihre Fähigkeit zur Matrix-Degradation ermöglichen sie den Tumorzellen eine vereinfachte Migration und Invasion (Comoglio und Trusolino 2005). In gesunden Geweben werden die meisten MMPs nur schwach exprimiert, es sei denn, es ist ein Umbau der ECM nötig (Chakraborti et al. 2003).

### 1.3.4 Regulation

Die Aktivität der MMPs kann auf verschiedenen Ebenen reguliert werden:

1. Auf Transkriptionsebene durch Zytokine oder Wachstumsfaktoren, 2. Durch proteolytische Aktivierung der pro-MMP-Form, 3. Durch natürliche Aktivatoren und Inhibitoren. Als physiologische Aktivatoren gelten unter anderem Plasmin, Urokinase Type Plasminogen Activator (uPA) und Tissue-type Plasminogen Activator (tPA) (Chakraborti et al. 2003) sowie EMMPRIN (Guo et al. 2000). Eine wichtige inhibitorische Rolle spielen die sogenannten Tissue Inhibitors of Metalloproteinases (TIMPs), dies sind MMP-spezifische Inhibitoren, die MMPs im Verhältnis 1:1 binden. Bisher wurden 4 TIMPs (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3, TIMP-4) in Vertebraten beschrieben (Visse und Nagase 2003).

TIMPs haben jedoch kontroverse Wirkungen: Zum einen bremsen sie über die Hemmung von MMPs das Tumorwachstum inklusive Angiogenese und Metastasierung, zum anderen weisen

TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 einen anti-apoptotischen Effekt auf, wodurch sie Tumorzellen vor dem Untergang bewahren (Jiang et al. 2002).

Eine epigenetische Beeinflussung der MMP-Genexpression wurde ebenfalls postuliert. Couillard et al. zeigten 2006 in ihrer Arbeit, dass eine in-vitro-Methylierung des MMP-3-Promotors die transkriptionelle Aktivität des MMP-3-Gens (Stromelysin) hemmt. Auch Chicoine et al. zeigten 2002 eine inverse Korrelation zwischen dem Methylierungsgrad des MMP-9-Promotors und der MMP-9-Expression auf. Roach et al. konnten 2005 in ihrer Arbeit einen direkten Zusammenhang zwischen einem DNA-Methylierungs-Verlust in der Promotorregion und einer verstärkten Expression der MMPs -3, -9, -13 in Chondrozyten von Osteoarthritis-Patienten nachweisen.



## **2 Ziele**

Die epigenetische Modifikation der Genexpression beeinflusst eine Vielzahl unterschiedlichster Gene. Epigenetische Modifikationen stellen potenzielle therapeutische Optionen für die Behandlung maligner Tumore dar.

In dieser Studie wurden jeweils zwei biologisch unterschiedliche urotheliale Karzinomzelllinien verwendet. Hierbei handelte es sich um zwei „low-grade“ und zwei „high-grade“ Zelllinien.

Es sollte zum einen der Einfluss Gen-demethylierender sowie die Histon-Acetylierung-inhibierender Agenzien auf die Proliferation, Migration und Invasion von Harnblasenkarzinomzelllinien untersucht werden.

Zum anderen sollte der Einfluss auf die Expression von Matrix-Metalloproteinasen und ihrer speziellen Inhibitoren beschrieben werden.

### 3 Material & Methoden

#### 3.1 Labormaterialien

##### 3.1.1 Technische Geräte

Tabelle 3: Technische Geräte

<b>Gerätebezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Vortex genie 2	Bender & Hohbein AG, Zürich
Feinwaage und Oberschalenwaage	Sartorius, Göttingen
Kühl- und Gefrierkombination (+4°C und -20°C)	Liebherr, Deutschland
Comfort-Gefrierschrank (-20°C)	Liebherr, Deutschland
Gefrierschrank (-80°C)	GFL, Burgwedel
Echtzeitthermocycler iCycler®	Bio-Rad Laboratories, München
Tpersonal Thermocycler	Biometra, Göttingen
Biofuge stratos und fresco	Heraeus instruments, Düsseldorf
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
Eppendorf-Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
OV 5 (Wärmeschrank und Schüttler)	Biometra, Göttingen
Agilent Bioanalyzer 2100	Agilent Technologies, Böblingen
Zytozentrifuge Shandon Cytospin3	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Schüttelinkubator	Infors AG, Bottmingen (CH)
Sterilbank HERA Safe	Heraeus instruments, Düsseldorf
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Photometer Ultrospec 3000	Pharmacia Biotech, England
CO <sub>2</sub> -Inkubator	Sanyo Electric Co., Japan
ELISA Reader	Bio-Rad Laboratories, München
UV-Licht Bio Doc Analyze	Biometra, Göttingen
Mikroskop Eclipse E400	Nikon

### 3.1.2 Software

Tabelle 4: Auflistung der benötigten Software

<b>Softwarebezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Histolab, AlphaMetrix	Biotech, Rödermark
GraphPad Prism Version 4.0	GraphPad Software Inc.

### 3.1.3 Kits

Tabelle 5: Auflistung der benötigten Kits

<b>Anwendung</b>	<b>Kit</b>	<b>Hersteller</b>
DNA-Aufreinigung	DNA Clean & Concentrator	HISS Diagnostics
DNA-Klonierung	TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
In-vitro-Transkription	T-7 Megashortscript	Ambion
Messung der RNA-Quantität	Agilent RNA 6000 Pico Kit	Agilent
Reverse Transkription	Omniscript Reverse Transcriptase Kit	Quiagen
RNA-Extraktion	RNeasy Mini Kit	Quiagen
ELISA	Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)	Roche

### 3.1.4 Lösungen, Reagenzien und anderes Zubehör

Tabelle 6: Auflistung aller benötigten Reagenzien, anderes Zubehör

PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Hot Star Taq Master-Mix , Quiagen</li> <li>-RNase/DNase-freies Wasser, Sigma</li> <li>-1x PCR Puffer, Quiagen</li> <li>-SYBR-Green I<sup>®</sup> Supermix, BioRad</li> </ul>
Zellkultur	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Zellkulturflaschen Tissue Culture Flask 25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup>, (Sarstedt)</li> <li>-Nährmedium DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), (Sigma) mit folgenden Zusätzen: <i>50ml FCS, (PAA), 10ml Amino Acid Solution, (Sigma), 5ml Penicillin-</i></li> </ul>

	<p><i>Streptomycin, 5ml Glutamin, (PAA), 12,5ml HEPES Buffer-solution 1 M,(PAA)</i></p> <p>-Trypsin EDTA 0,5 %, (In Vitrogen Corporation, GIBCO)</p> <p>-Penicillin-Streptomycin:</p> <p><i>10.000 Units/ml Penicillin G,</i></p> <p><i>10.000 µl/ml Streptomycin Sulfat in 0,85 % Saline (In Vitrogen Corporation, GIBCO)</i></p> <p>-PBS-Puffer:</p> <p><i>Natriumdihydrogenphosphat x H<sub>2</sub>O, Merck</i></p> <p><i>Dinatriumhydrogenphosphat x 2 H<sub>2</sub>O, Merck</i></p> <p><i>NaCl, Merck</i></p> <p><i>ad 1000 ml A. dest.</i></p>
RNA-Extraktion	<p>-RLT-Lysispuffer, (Quiagen)</p> <p>-β-Mercaptoethanol, (Sigma)</p>
Zellkultur-Experimente	<p>- Medium 0,5%: <i>25 ml DMEM Medium, 0,5 ml Amino Acid Solution, 0,25 ml Penstreptolysin, 0,25 ml Glutamin, 0,625 ml HEPES, 0,125 ml FCS</i></p> <p>- Medium 20%: <i>25 ml DMEM, 0,5 ml Amino Acid Solution, 0,25 ml Penstreptolysin, 0,25 ml Glutamin, 0,625 ml HEPES, 5 ml FCS</i></p> <p>-Trichostatin A, (Sigma)</p> <p>-5-aza-2'-deoxycytidin, (Sigma)</p> <p>-Vitro-Clud, (Langenbrinck)</p> <p>-DMSO Dimethylsulphoxide steril, (Sigma)</p> <p>-Eisessig, DNase/RNase-freies Wasser (1:1)</p> <p>-May-Grünwald :</p> <p><i>400ml Stammlösung A [11,876g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck), gelöst in 1 l Aqua dest.] + 400 ml Stammlösung B [9,078g KHPO<sub>4</sub> (Merck)+ 3200 ml Aqua dest]; alles vermischen.</i></p> <p><i>Davon 400 ml verwerfen und mit 400 ml Giemsa (Merck) vermengen.</i></p> <p>-Giemsa (Merck, Darmstadt)</p>

Immunzyto- chemie	<p>-Aceton, (Merck)</p> <p>-Wasserstoffperoxyd <math>H_2O_2</math>, 30% , (Merck)</p> <p>-Entionisiertes Wasser</p> <p>-Tris-Buffered-Saline-TWEEN-Puffer (TBST), pH 7,4:</p> <p><i>Tris, <math>C_4H_{11}NO_3</math>, (Carl Roth, Karlsruhe) + Natriumchlorid, NaCl, (Merck) gelöst in 850 ml bidestilliertem Wasser. Die Lösung wurde mit Salzsäure, HCl, 1N, (Merck) titriert, mit bidestilliertem Wasser ad 1000 ml aufgefüllt und mit 500µl TWEEN<sup>®</sup>, 20 Detergent (Calbiochem<sup>®</sup>, Frankfurt) angereichert.</i></p> <p>-BSA V (Serum-Albumin vom Rind, Fraktion V), (Paesel &amp; Lorei, Hanau)</p> <p>-FCS (Fetales-Kälber-Serum), (PAA)</p> <p>-Envision-Peroxidase, (Dako) K5007</p> <p>-Diaminobenzidin, (Dako) Substrate Buffer DAI3 Chromogen</p> <p>-Hämalaun:</p> <p><i>1g Hämatoxylin <math>C_{16}H_{14}O_6</math> (Merck), 50g Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat <math>KAl(SO_4)_2 \times 12H_2O</math> (Merck), 0,2g Natriumjodat <math>NaJO_4</math> (Merck), 50g Chloralhydrat <math>C_2H_3Cl_3O_2</math> (Merck), 1g Zitronensäure-Monohydrat <math>C_6H_8O_7 \times H_2O</math> (Merck) wurden in 1l bidestilliertem Wasser der Reihe nach gelöst.</i></p>
----------------------	--

### 3.1.5 Weiteres Zubehör

Tabelle 7: Auflistung von weiterem Zubehör

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
24-well-Platte Cellstar	Greiner
96-well-Platte	NUNC
Nunc cell culture inserts	NUNC
BD Biocoat Growth Factor Reduced Matrigel Invasion Chamber	BD Biosciences
Cell Scraper	Sarstedt

### 3.1.6 Harnblasenkarzinom-Zelllinien

Tabelle 8: Auflistung der verwendeten Zelllinien

<b>Name</b>	<b>Zelltyp</b>	<b>Quelle</b>
RT-4	Urothelkarzinom (human) low grade	DSZM, Braunschweig
RT-112	Urothelkarzinom (human) low grade	DSZM, Braunschweig
VMCUB-1	Urothelkarzinom (human) high grade	DSZM, Braunschweig
T-24	Urothelkarzinom (human) high grade	DSZM, Braunschweig

### 3.1.7 Antikörper-Immunzytochemie

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Antikörper

<b>Antigen</b>	<b>Antikörpertyp</b>	<b>Hersteller</b>
MMP-1	polyklonal	Labvision
MMP-2	monoklonal	Oncogene
MMP-10	polyklonal	Labvision
MMP-13	polyklonal	Labvision
MMP-14	polyklonal	Labvision
MMP-17	monoklonal	Epitomics
MMP-23	polyklonal	Labvision
TIMP-1	monoklonal	Oncogene
TIMP-2	monoklonal	Oncogene
TIMP-3	polyklonal	Chemicon
TIMP-4	polyklonal	Labvision

### 3.1.8 Spezifische Primer für die Polymerase-Ketten-Reaktion

Tabelle 10: Auflistung der benötigten Primer für die Polymerase-Ketten-Reaktion

<b>MMP-Type</b>	<b>Sense Srimer</b>	<b>Antisense Primer</b>	<b>Temp.</b>
MMP-1	CTGGGAGCAAACACATCTGA	AAGGAGAGTTGTCCCGATGA	63°C
MMP-2	ACAGTGGACATGGCGGTCTCAG	AGCCAAGTGGTCCGTGTGAA	62°C
MMP-3	CCTTTTGATGGACCTGGAAA	TGAAAGAGACCCAGGGAGTG	56°C
MMP-7 Ex4/5	TGCTCACTTCGATGAGGATG	TGGGGATCTCCATTTCCATA	59°C
MMP-8	CTTTCAGGGAAACCAGCAAC	TCCACGGAGTGTGGTGATAG	56°C
MMP-9	GCCACTTGTCGGCGATAGG	CACTGTCCACCCCTCAGAGC	63°C
MMP-10	TGGGTTTTCTCCAACCATA	AGGCTCAACTCTGGAAAAGTC	59°C
MMP-11	TGTGACGCCACTCACCTTTA	ATCCCCTTCTCGGTGAGTCT	56°C
MMP-12	TTCCCTGAACAGCTCTACAAGCCTGGAAA	GATCCAGGTCCAAAAGCATGGGCTAGGATT	65°C
MMP-13	AACATCCAAAAACGCCAGAC	GGAAGTTCTGGCCAAAATGA	53°C
MMP-14	CGGTCATCATCGGGCAGCACAAAA	CGCTACGCCATCCAGGGTCTCAAA	63°C
MMP-15	GGAATTCCCCCTCATGTAT	GGGATCCCTTTCCAGACTGT	63°C
MMP-16	GGAATTCCCCCTCATGGTAT	GGGATCCCTTTCCAGACTGT	63°C
MMP-17	GTGTGCGGGAGTCTGTGTC	AAAGCTTCACCCCGGATCT	68°C
MMP-19	CACAATATGGGTACCTACAGAAGC	GATCCTCTAGGCCACAACGA	59°C
MMP-20	GCACGTGCAGCAAATAGATG	TCGATTTGGCCATTTACTCC	56°C
MMP-21Ex5/6	ATGGGGACCCTATCCAAATC	GGTCATAAAACGCCGTGTCT	59°C
MMP-23	GATCAACCACACGGACTGC	CGTGTTGTGAGTGCATCAGG	56°C
MMP-24	CCTATGACTCACGGGCATCT	GCCTCCACTTCTGTCCAGTC	59°C
MMP-25	CCCAAACCCCATATGACAAG	AGGGGCCTTTGAAGAAGAAA	56°C
MMP-26	GATATGAAGCCATCCGCAGT	AGGCATGGCCTAAGATACCA	63°C
MMP-27	GCCAGATTATCCCAAATCC	TTACCACTCTCTGCGGGAAC	59°C
MMP-28	GAGACCTGGGACTCCTACAGC	CTCTGAGACGTTGCCATCAG	61°C
TIMP-1	ACCAGACCACCTTATAACCAGCG	GGACTGGAAGCCCTTTTCAGAG	65°C
TIMP-2	ATGCAGATGTAGTGATCAGGGC	GATGAAGTCACAGAGGGTGATG	63°C
TIMP-3	GGGGAAGAAGCTGGTAAAG	AAGTCACAAAGCAAGGCAG	57°C
TIMP-4	CACCCTCAGCAGCACATCT	TTTGATTCATACCGGAGCA	59°C
EMMPRIN	CCGGCACAGTCTTCACTACC	TACTCTCCCCACTGGTCGTC	60°C

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur und Behandlung der Zellen mit Trichostatin A und 5-aza-2'-deoxycytidin

Alle Arbeiten mit den Zellkulturen wurden an sterilen Arbeitsplätzen durchgeführt. Die Zellen wurden im Inkubator bei feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre, 37°C und 5% CO<sub>2</sub> gehalten. Als Standard-Kulturmedium wurde, wenn nicht anders vermerkt, DMEM mit 10% FCS verwendet. Für die Zellkulturexperimente wurde teilweise DMEM mit 20% und 0,5% FCS verwendet (genaue Angaben siehe Versuchsabläufe).

Die Zellen wurden für die Versuche mit den beiden epigenetischen Modifikatoren 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A behandelt. In den Negativ-Kontrollen wurde für 5-aza-2'-deoxycytidin Eisessig 1:1 mit DNase/RNase-freiem Wasser verdünnt eingesetzt. Trichostatin A wurde zu gleichen Teilen durch steriles DMSO ersetzt.

### 3.2.2 Funktionelle Untersuchungen

#### *3.2.2.1 Messung der Tumorverdopplungszeit*

Zur Ermittlung der Tumorverdopplungszeit wurden die unbehandelten Zellen aus der vorbestehenden Kultur abtrypsiniert, mit PBS-Puffer gereinigt, in DMEM-Medium mit 10% FCS aufgenommen und in der Neubauer Zählkammer ausgezählt. Pro 25cm<sup>2</sup>-Flasche wurden je Zellreihe 100000 Zellen ausgesät. Von jeder Zellreihe wurden zwei Kulturflaschen angesetzt. Nach 24 Stunden erfolgte die erste Auszählung, zu der die Zellen erneut abtrypsiniert und mit PBS-Puffer gewaschen wurden. Nach 48 Stunden erfolgte die Auszählung der Zellen aus der zweiten Flasche nach dem gleichen Prinzip.

#### *3.2.2.2 Proliferationsassay*

Die Auswirkungen der Behandlung mit 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A auf die Proliferation der Tumorzellen wurden mittels BrdU-Proliferationsassay untersucht. In einer 96-Mikrotiter Platte wurden pro Napf 5000 Zellen jeder Zelllinie (RT-4, RT-112, VMCUB-1, T-24) in 3-fach-Bestimmung in 200µl DMEM-10%-FCS-Kultiviermedium ausgesät, 24 Stunden inkubiert und nach folgendem Schema weiterbehandelt:



Tabelle 11: Behandlungsschema Proliferationsassay

<b>Ansatz</b>	<b>Behandlung</b>	<b>Nach 24h Inkubation</b>	<b>Nach 48h Inkubation</b>
1	5-aza	Zugabe von 5-aza Konzentration 10µmol je Napf	-
2	5-aza, TSA	Zugabe von 5-aza, Konzentration 10µmol je Napf	Zugabe von TSA- Konzentration 200nmol je Napf
3	TSA	-	Zugabe von TSA- Konzentration 200nmol je Napf
4	Negativ-Kontrolle: Eisessig, DMSO	Zugabe Eisessig in gleicher Menge wie in 1	Zugabe gleicher Menge DMSO wie in 2
5	Negativ-Kontrolle PBS	Zugabe PBS-Puffer in gleicher Menge wie in 1	Zugabe PBS-Puffer in gleicher Menge wie in 2

Nach 72 Stunden folgte dann die Markierung der Zellen mit 1:1000 verdünntem BrdU mit anschließender Inkubation für 14 Stunden bei 37°C.

Nach Ablauf der Inkubation wurde das Medium abgeklopft und die 96-Mikrotiter-Platte in den Hybridisierungssofen gestellt. Nach Antrocknung der Zellen wurden diese mit 200µl Fixierungs-Denaturierungs-Lösung bedeckt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach Entfernen der Fixierungslösung wurden 200µl 2%-BSA auf die Zellen gegeben und der Ansatz dann 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert.

Nach BSA-Entfernung wurden die Zellen mit 200µl PBS-Puffer gewaschen und mit 100µl Anti-BrdU-Peroxidase (1:100 mit Diluent aus dem Kit) bedeckt, woraufhin eine 45 minütige Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln folgte. Nach Abklopfen der Antikörper folgten 3 aufeinanderfolgende Waschschriffe mit jeweils 200µl Waschlösung, wobei die Zellen auf den Schüttler gestellt wurden. Danach wurden 100µl Substratlösung auf die Zellen pipettiert und nachfolgend erneut 10 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Zum Abstoppen wurden 25µl 1-molare Schwefelsäure auf die Reaktion gegeben. Nun konnten die Proben bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Referenzwellenlänge von 655nm im ELISA Reader gemessen werden.

### 3.2.2.3 Migrationsassay

Um das Migrationsverhalten der Zelllinien zu untersuchen wurde ein Migrationsassay durchgeführt.

In eine sterile 24er Mikrotiterplatte wurde pro Napf ein Einsatz (Nunc Cell Culture Inserts®) mit 8µm großen Poren eingesetzt, durch welche die Tumorzellen migrieren konnten. Als Chemoattraktant wurde Zellkulturmedium mit 20% FCS verwendet. Die Zellen wurden in Zellkulturmedium mit 0,5% FCS innerhalb des Einsatzes ausplattiert und migrierten entlang des Serum-Konzentrationsgradienten unter dem Einfluß von 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A. Das Behandlungsschema ist in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Behandlungsschema Migrations- und Invasionsassay

<b>Zeitpunkt</b>	<b>Positiv-Kontrolle (5-aza, TSA)</b>	<b>Negativ-Kontrolle</b>
0	100000 Zellen pro 75cm <sup>2</sup> -Flasche	100000 Zellen pro 75cm <sup>2</sup> -Flasche
Nach 24 h	Ersatz alten Mediums durch 15ml Medium mit 10µMol 5-aza	Ersatz alten Mediums durch 15ml Medium mit gleicher Menge Eisessig
Nach 48 h	Zugabe von TSA in DMEM Endkonzentration TSA: 200nMol	Zugabe gleicher Menge steriles DMSO in DMEM
Nach 72 h	Zellen bereit für Experimente	Zellen bereit für Experimente

Sämtliche Behandlungsexperimente erfolgten als Triplikate, die Kontrollen als Einfachexperimente in drei unabhängigen Versuchsreihen.

Die Zellen wurden nach obiger Behandlung (siehe Tabelle 12) abtrypsinisiert, in Nährmedium aufgenommen, gewaschen und in DMEM mit 0,5% FCS resuspendiert und in einer Zelldichte, wie in Tabelle 13 gezeigt, innerhalb des Napfeinsatzes ausplattiert. Das untere Reservoir wurde mit 400µl DMEM mit 20% FCS befüllt.

Tabelle 13: Befüllungsschema Invasions- und Migrationsassay

<b>Zellreihe</b>	<b>Behandelt</b>	<b>Unbehandelt</b>
RT-4	200µl DMEM 0,5% FCS mit 20000 Zellen	200µl DMEM 0,5% FCS mit 20000 Zellen
RT-112	200µl DMEM 0,5% FCS mit 10000 Zellen	200µl DMEM 0,5% FCS mit 10000 Zellen
VMCUB-1	200µl DMEM 0,5% FCS mit 10000 Zellen	200µl DMEM 0,5% FCS mit 10000 Zellen
T-24	200µl DMEM 0,5% FCS mit 10000 Zellen	200µl DMEM 0,5% FCS mit 10000 Zellen

Nach 24 Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde die Migration durch Entnahme der Einsätze aus der 24-Mikrotiter-Platte gestoppt. Die Zellen auf der Membranoberfläche (Einsatzinnenseite) wurden vorsichtig mit einem Wattestäbchen abgewischt, so dass sich nur die tatsächlich migrierten Zellen auf der Unterseite der Membran (Einsatzaußenseite) befanden. Nach Trocknung bei 37°C folgte die Anfärbung der Präparate in einer Standard May-Grünwald-Giemsa-Färbung.

Färbeprotokoll:
130 Min. May-Grünwald
210 Min. Spülung in Aqua dest.
360 Min. Giemsa
410 Min. Spülung in Aqua dest.
530 Min. lufttrocknen lassen

Nachfolgend wurden die Membranen mit einem Skalpell vorsichtig ausgeschnitten und auf einem Objektträger mit Vitro-Clud® und einem Deckgläschen eingedeckt. Nun konnte die Zellauszählung mit Hilfe des semiautomatischen Bildanalyse-system erfolgen.

Da es unter der Behandlung gleichzeitig zu einer Beeinflussung der Proliferation kam, wurden alle Werte hinsichtlich der Proliferation nach folgender Formel korrigiert:

$$\frac{\text{Anzahl der migrierten (invadierten) Zellen}}{\text{(BrdU-Aufnahme der unbehandelten Zellen / BrdU-Aufnahme der behandelten Zellen)}}$$

BrdU-Aufnahme unbehandelt = Kontrollansatz mit Eisessig und DMSO  
BrdU-Aufnahme behandelt = Ansatz mit 5-aza, TSA behandelt

#### 3.2.2.4 Invasionsassay

Es sollte nun das Invasionsverhalten der behandelten und unbehandelten Tumorzellen untersucht werden. Das Prinzip, der Ablauf und die Behandlung der Zellen erfolgte wie im Migrationsassay mit dem Unterschied, dass pro Napf eine Matrigel Invasion Chamber® eingesetzt wurde. Die Matrigel-Invasions-Kammern besitzen eine Membran, welche Laminin, Kollagen Typ 4 und Proteoglykane enthält und so menschliches Gewebe nachahmt, sowie 8µm große Poren, durch welche die Zellen migrieren können. Um ein einfaches Durchwandern zu verhindern, befindet sich auf der Membran eine dünne Schicht einer

Wachstumsfaktor-reduzierten BD Matrigel Matrix®, eine Art Nachbildung einer menschlichen Basalmembran. Diese Matrigel Matrix okkludiert die Membranporen, so dass nicht-invasive Zellen die Membran nicht ungehindert passieren können. Invasive Zellen dagegen können nach Penetration die Proteinstruktur der Matrigel Matrix auflösen und durch die Poren gelangen.

Auch hier erfolgte die Korrektur gegen die Proliferation nach obiger Formel.

### 3.2.3 mRNA-Expressionsanalyse

#### *3.2.3.1 RNA-Extraktion*

Die Zellen wurden wie in Tabelle 12 beschrieben behandelt. Nach 72 Stunden folgte die Ernte der Zellen mittels Zellschaber, die Aufnahme in DMEM-Nährmedium, Zentrifugation und 2 Waschungen mit PBS-Puffer. Das Zellpellet wurde lysiert und die Gesamt-RNA anschließend mit dem RNeasy Mini Kit® nach Angaben des Herstellers isoliert. Die isolierte RNA wurde dann sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei – 80°C gelagert.

#### *3.2.3.2 Agilent-Kontrolle der RNA*

Mittels Kapillargelelektrophorese (Agilent 2100, Bioanalyzer) wurden die Qualität und Menge der Gesamt-RNA bestimmt (Agilent RNA 6000 Pico Kit). Hierzu wurden die Proben vorher photometrisch gemessen und verdünnt, um im optimalen Meßbereich (500-5000 pg/µl) des Assays zu messen.

#### *3.2.3.3 Reverse Transkription (RT)*

In allen Reverse-Transkriptase-Ansätzen wurde 500ng Gesamt-RNA in RNase/DNase-freiem Wasser eingesetzt. Die RNA wurde 5 Minuten bei 70°C denaturiert, danach sofort auf Eis gestellt und mit dem RT-Mastermix versetzt.

Tabelle 14: Pipettieransatz Reverse Transkription

RNA	13µl
Puffer	2µl
dNTPs	2µl
Hexaprimer-Gebrauchslösung	1µl
RNase-Inhibitor	1µl
Reverse Transkriptase	1µl
Gesamtvolumen	20µl

In einem Thermocycler wurde der Ansatz 60 Minuten bei 37°C inkubiert und die Reaktion anschließend 5 Minuten bei 95°C gestoppt. Als Produkt erhielten wir 20µl mit 25ng DNA pro µl. Im Anschluss folgte eine PCR für das „Housekeeping-Gen“ Porphobilinogendeaminase (PBGD) mit nachfolgender Gel-Elektrophorese zur Kontrolle.

#### 3.2.3.4 Real Time PCR (RT-PCR)

Die Real-Time-PCR wurde für alle MMPs, TIMPs und EMMPRIN durchgeführt. Es wurde DNA der Zellreihen RT-4, RT-112, VMCUB-1 und T-24 verwendet. Je Zellreihe und Experiment wurden jeweils die Positiv- sowie die Negativ-Kontrollen in zweifach-Bestimmung in die 96-Mikrotiter Platte aufgetragen. In den Negativ-Kontrollen wurde die cDNA durch die gleiche Menge an RNase/DNase-freiem Wasser ersetzt.

Als Fluoreszenzfarbstoff wurde SYBR<sup>®</sup> Green I verwendet. Da sich SYBR<sup>®</sup> Green I in doppelsträngige DNA einzulagern vermag, korreliert die gemessene Fluoreszenzzunahme mit der amplifizierten PCR-Produkt-Menge.

Tabelle 15: Standardmäßiger Pipettieransatz RT-PCR (Angaben pro Napf)

SYBR-Green-Super-Mix	10,00µl
MMP-Primer forward	0,15µl
MMP-Primer reverse	0,15µl
RNase/DNase-freies Wasser	4,70µl
cDNA der Tumorzellen	5,00µl

Tabelle 16: Standardmäßiges Cyclers Profil RT-PCR

1. 95°C	15 Minuten	Erst-Denaturierung	1 Zyklus
2. 95°C	30 Sekunden	Denaturierung	50 Zyklen
3. Annealing Temperatur	30 Sekunden	Primer-Anlagerung	
4. 72°C	30 Sekunden	Elongation	

Auf diese Weise konnte für jedes behandelte sowie unbehandelte Zielgen der Ct-Wert ermittelt werden. „Ct“ steht für den Threshold Cycle (=Schwellenwert-Zyklus), also für den Zyklus, an dem die Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt und die exponentielle Phase der DNA-Amplifikation beginnt.

Als interne Kontrolle wurde eine Real Time PCR des nicht beeinflussten „Housekeeping“-Gens Porphobilinogendeaminase (PBGD) durchgeführt.

Mittels des Ct-Wertes konnten nun die behandlungsinduzierten Veränderungen der Genexpression (Pfaffl 2004) bestimmt werden.

In einem ersten Schritt wurden hierfür die Werte mit dem Referenzgen PBGD normiert ( $\Delta Ct = Ct \text{ Zielgen} - Ct \text{ Referenzgen}$ ). In einem zweiten Schritt wurde vom  $\Delta Ct$ -Wert der experimentell behandelten Proben der  $\Delta Ct$  der Kontrolle abgezogen. Daraus ergab sich dann der  $\Delta\Delta Ct$ -Wert ( $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ behandelte Probe} - \Delta Ct \text{ unbehandelte Probe}$ ), der in einem dritten Schritt in folgende Gleichung eingesetzt wurde:

$$y = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

y = Modifikationsfaktor

Ct-Werte > 42 wurden mit 42 gleichgesetzt. Ebenso wurden Modifikationsfaktoren, die einen Wert > 100 erreichten mit 100 gleichgesetzt um die Statistik nicht zu verzerren.

Nach abgelaufener Amplifikation wurde eine Schmelzpunktanalyse durchgeführt (50 Schritte a 0,5°C Temperaturdifferenz von 70 bis 95°C), um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen. Die Schmelzpunktanalyse wurde für jedes Gen in einem 1,5%igen Agarosegel geprüft.

### 3.2.4 Immunzytochemie

#### *3.2.4.1 Anfertigung von Zytozentrifugenpräparaten*

Für die immunzytochemischen Untersuchungen wurden die Zellen, nach Schema Tabelle 12, behandelt und auf 150000 Zellen pro ml eingestellt. Je Präparat wurden 200µl Zellsuspension

verwendet, so dass circa 30000 Zellen pro Präparat bei 900 U/Min 7 Minuten zentrifugiert wurden.

#### *3.2.4.2 Anfärbung der Zytozentrifugenpräparate*

Zur Darstellung der MMP- und TIMP-Expression erfolgten Färbungen der zuvor hergestellten Zytozentrifugenpräparate. Dazu mussten die Primärantikörper 1:50 mit Tris-Buffered-Saline-TWEEN-Puffer verdünnt werden. Lediglich TIMP-2 wurde 1:100 verdünnt.

#### *Ablauf:*

Zunächst wurden die Zytozentrifugenpräparate in 4°C kalten Aceton 10 Minuten lang fixiert und anschließend luftgetrocknet. Zur Hemmung der endogenen Peroxidase wurden die Präparate mit einer 0,3% Wasserstoffperoxid-Lösung für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und danach mit entionisiertem Wasser gespült. Daraufhin folgte eine Spülung mit Tris-Buffered-Saline-TWEEN-Puffer (TBST-Puffer) 7,4 und im Anschluss eine Applikation von FCS und BSA für 20 Minuten zur Verhinderung unspezifischer Bindungen. Danach wurden die Objektträger mit dem primären Antikörper in entsprechender Verdünnung versetzt und 2 Stunden lang bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte erneut eine Spülung mit TBST-Puffer und eine Applikation des Sekundärantikörpers Dako Envision (Kaninchen/Maus) HRP (=Horseradish Peroxidase) für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Daran schloss sich eine erneute Spülung mit TBST an, mit anschließender Applikation des DAB Chromogens, (1:50 mit DAB-Substrat-Puffer verdünnt) für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Danach wurden die Zytozentrifugenpräparate erst mit TBST-Puffer und danach mit entionisiertem Wasser gespült. Nun folgte eine Gegenfärbung der Kerne mit Hämalaun für 2 Minuten, eine Fixierung in aufsteigender Alkoholreihe, sowie die Eindeckung der behandelten Zellen mit Xylol.

### **3.3 Statistik**

Die Experimente wurden statistisch hinsichtlich ihrer Signifikanz getestet. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt. Mittels des Statistikprogramms GraphPad Prism® Version 4.0 wurden der Kruskal-Wallis-Test und Bonferroni's Test für wiederholte Messungen (ANOVA „repeated measurements“) und t-Test angewendet, wie speziell im Ergebnisteil aufgeführt.

## 4 Ergebnisse

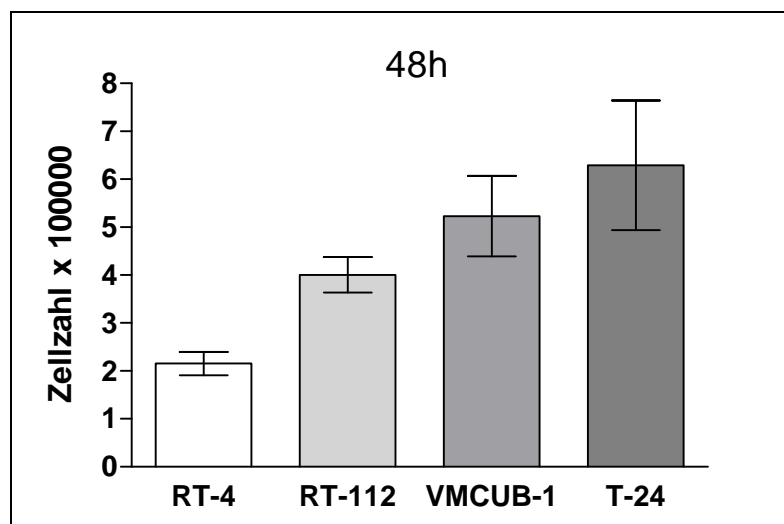
Die Proliferation, Migration und Invasion der Zellreihen RT-4, RT-112, VMCUB-1 und T-24 wurde auf ihre Beeinflussbarkeit mittels der beiden epigenetischen Modifikatoren 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A untersucht.

Alle statistischen Berechnungen des Migrations-, Invasions- sowie Proliferationsverhaltens der einzelnen Zelllinien erfolgten mittels t-Test unter Benutzung der GraphPad Prism® Version 4.00 für Windows.

### 4.1 Proliferationsverhalten der Tumorzelllinien

Zunächst wurde das natürliche Wachstumsverhalten der Zellen untersucht. Es ergaben sich nach 48 Stunden Wachstum, die in Abbildung 1 ersichtlichen Zellzahlen. Wie erwartet zeigten die „high-grade“ Tumorzelllinien VMCUB-1 und T-24 ein deutlich schnelleres Wachstum als die „low-grade“ Zelllinien RT-4 und RT-112.

Abbildung 1: Wachstumsverhalten der Tumorzelllinien RT-4, RT-112, VMCUB-1, T-24 nach 48 Stunden



Die Messung der Tumorverdopplungszeit erfolgte in der linearen Wachstumsphase der Harnblasenkarzinom-Zellen.



Tabelle 17: Verdopplungszeit der einzelnen Zellreihen

<b>Zellreihe</b>	<b>Stunden für Verdopplung</b>
RT-4	41.6
RT-112	15.9
VMCUB-1	11.3
T-24	9.0

## **4.2 Proliferationsverhalten der einzelnen Tumorzelllinien nach Behandlung mit 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A**

Im Folgenden wurden epigenetische Effekte auf die Zellproliferation urothelialer Tumorzelllinien analysiert. Dies erfolgte über die Messung der BrdU-Aufnahme unter Behandlung beziehungsweise Nichtbehandlung der Tumorzellen mit Trichostatin A und 5-aza-2'-deoxycytidin und anschließender Extinktionsmessung mittels ELISA. Die BrdU-Aufnahme verhielt sich dabei proportional zur Zellproliferationsrate.

Wie in den Abbildungen 2 A-D ersichtlich, führt eine Behandlung der Tumorzellen mit 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A zu einer Hemmung der BrdU-Aufnahme in den Zelllinien RT-4, RT-112, VMCUB-1 und T-24 und somit zu einer Abnahme des Proliferationstendenz. Bei allen Zelllinien mit Ausnahme von RT-4 kommt es unter kombinierter 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin-A-Behandlung zu einer signifikanten Proliferationsreduktion. Die Zelllinie RT-4 reagierte bereits sehr stark auf die Behandlung mit einem der beiden epigenetischen Modifikatoren, siehe Abbildung 2 A. Die Berechnung der statistischen Signifikanz erfolgte nach der Bonferroni-Methode mittels GraphPad Prism®.

Abbildungen 2 A-D: Darstellung des Proliferationsverhaltens der einzelnen Tumorzelllinien

Die Messung erfolgte mittels BrdU-ELISA. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte aus 3 Versuchsreihen mit je 3 Proben +/- Standardabweichung.

Abbildung 2 A: Proliferationsverhalten der Zelllinie RT-4 unter Behandlung mit 5-aza, TSA, 5-aza und TSA

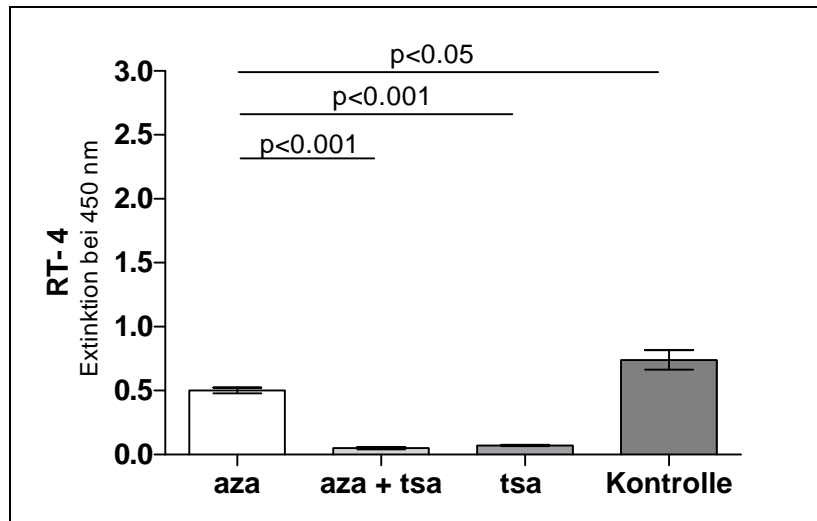


Abbildung 2 B: Proliferationsverhalten der Zelllinie RT-112 unter Behandlung mit 5-aza, TSA, 5-aza und TSA

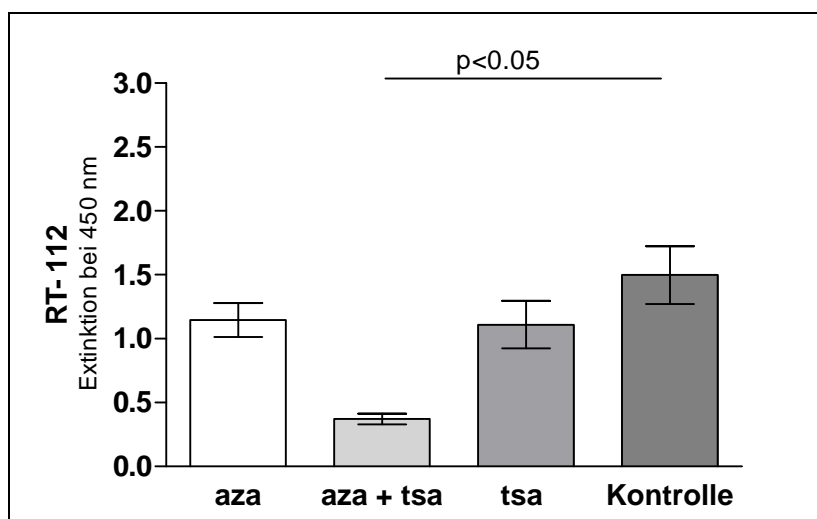


Abbildung 2 C: Proliferationsverhalten der Zelllinie VMCUB-1 unter Behandlung mit 5-aza, TSA, 5-aza und TSA

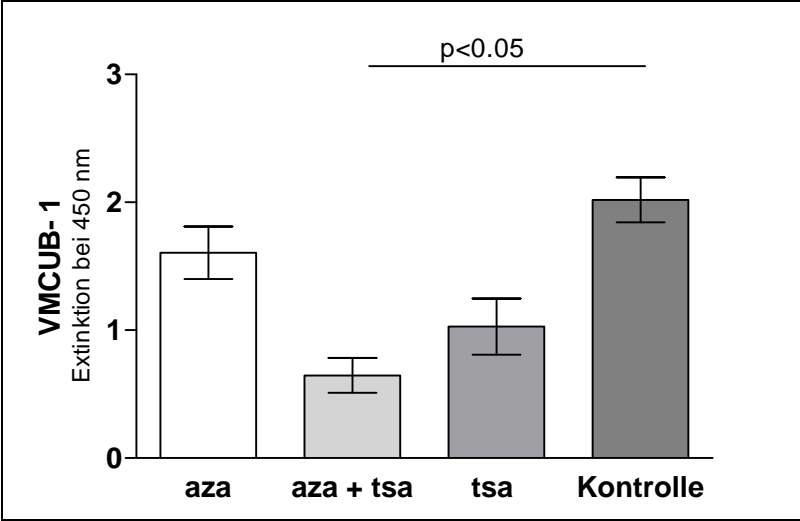
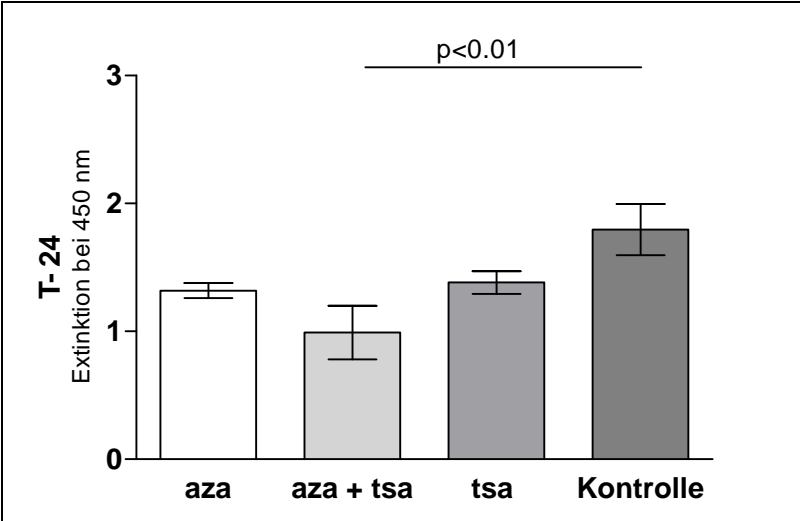


Abbildung 2 D: Proliferationsverhalten der Zelllinie T-24 unter Behandlung mit 5-aza, TSA, 5-aza und TSA



### 4.3 Expression der Matrix-Metalloproteinasen und ihrer spezifischen Inhibitoren

Die Ermittlung der Expression der MMPs, TIMPs und EMMPRIN in den mittels 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A behandelten bzw. unbehandelten Zelllinien erfolgte mit der Real-Time-PCR-Methode. In unseren Analysen zeigte sich für alle getesteten Zelllinien ein individuelles Muster der EMMPRIN-, MMP- sowie TIMP-Expression. Die Expressionsstärke der Protein-mRNA wurde mit dem Schwellenwert-Zyklus Ct bemessen. Hierfür wurden folgende Intervalle gewählt:

Tabelle 18: Angaben der Ct-Werte in Bezug auf die Expressionsstärke

<b>Expressionsniveau und vermutete biologische Relevanz</b>	<b>Ct-Mittelwert</b>
hoch	< 30
mittelgradig	30 - 36
gering	36 - 41
nicht relevant	>42

Die Mehrzahl der MMPs zeigte ein Expressionsniveau zwischen dem 26. und 36. Zyklusschwellenwert. Eine Expression im unteren Nachweisbereich zeigten dagegen MMP-20 und -25 (in den Zelllinien VMCUB-1, T-24), wogegen MMP-2 teils hoch (RT4, RT112), teils niedrig (T-24, VMCUB-1) exprimiert war. MMP-9 war in keiner Zelllinie nachweisbar. Die Untersuchung der TIMPs ergab durchgängig ein ausgeprägtes Expressionsmuster mit Schwellenwertzyklen von <30. (Abbildungen 3A-D, siehe auch Farbkodierung)

#### 4.3.1 Expression der MMPs und TIMPs nach Behandlung mit 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A

Die Behandlung der urothelialen Tumorzelllinien mit 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A stimulierte die mRNA-Expression der meisten MMPs, TIMPs und führte zu einer signifikanten Herunterregulation von MMP-14 in den Zellreihen RT-112, VMCUB-1 und T-24. In der Zelllinie RT-4 konnte keine MMP-14-Suppression ermittelt werden.

In Zelllinien, die unbehandelt keine MMP-mRNA-Expression zeigten, konnte durch die Behandlung die mRNA-Expression zum Teil induziert werden, dies gilt zum Beispiel für MMP-2 in den Zelllinien VMCUB-1 und T-24, sowie für die MMPs -20, -25 in der Zellreihe

RT-112. Die induktiven Effekte auf die MMPs wurden auf den Abbildungen 3 A-D graphisch dargestellt.

Bei EMMPRIN (CD 147) ließen sich im Gegensatz zu den starken Reaktionen bei den MMPs kaum Veränderungen in der mRNA Expression verzeichnen.

Alle TIMPs zeigten ein ausgeprägtes Expressionsmuster, jedoch eine schwache Beeinflussbarkeit mittels der epigenetischen Modifikatoren. Tendenziell zeigte sich bei allen TIMPs eine mRNA-Induktion. Der stärkste induktive Effekt auf die TIMPs ließ sich bei den schnell wachsenden „high-grade“ Zelllinien VMCUB-1 und T-24 für TIMP-3 beobachten. Deutliche Reaktionen zeigte auch TIMP-2 in der Zelllinie RT-4. Für TIMP-1 wurden keine relevanten Effekte beobachtet.

Der Grad der Beeinflussung der MMPs, TIMPs und von EMMPRIN durch die Behandlung wurde mit dem Modifikationsfaktor mittels relativer Quantifizierung nach der Formel  $y = 2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Pfaffl 2004), wie bereits aufgeführt, berechnet. Diese behandlungsinduzierten Veränderungen der Genexpression sind nachfolgend ersichtlich.

Abbildung 3A-D: Expressionsmuster der einzelnen Zelllinien. Ergebnisse der Real-Time-PCR. Als Maß für die Beeinflussung des Expressionsverhaltens für MMPs, TIMPs und EMMPRIN dient der berechnete Modifikationsfaktor. Modifikationsfaktoren > 100 wurden mit 100 gleichgesetzt. Die Farbe der Säulen gibt den Wert des Schwellenwertzyklus (=Threshold Cycle Ct) an. MMP-9 zeigte keinerlei Expression und wurde nicht dargestellt.

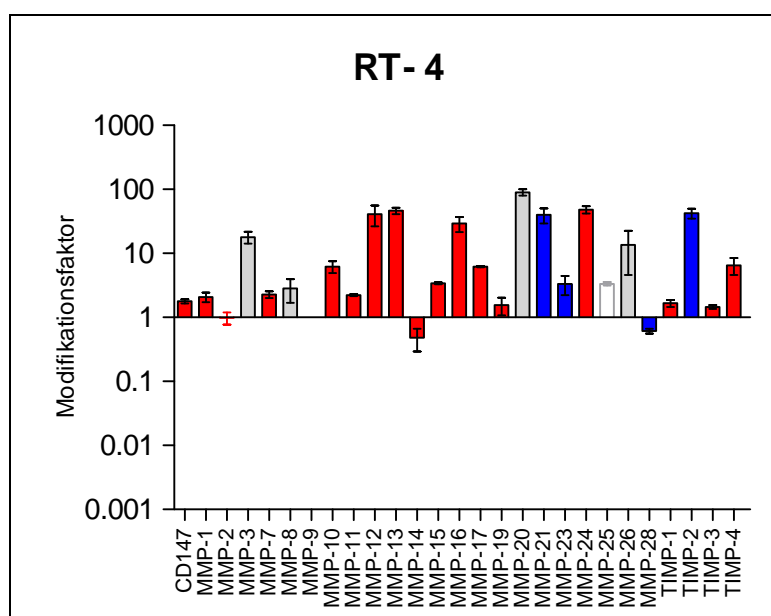


Abbildung 3 A: Expressionsmuster der Zelllinie RT-4

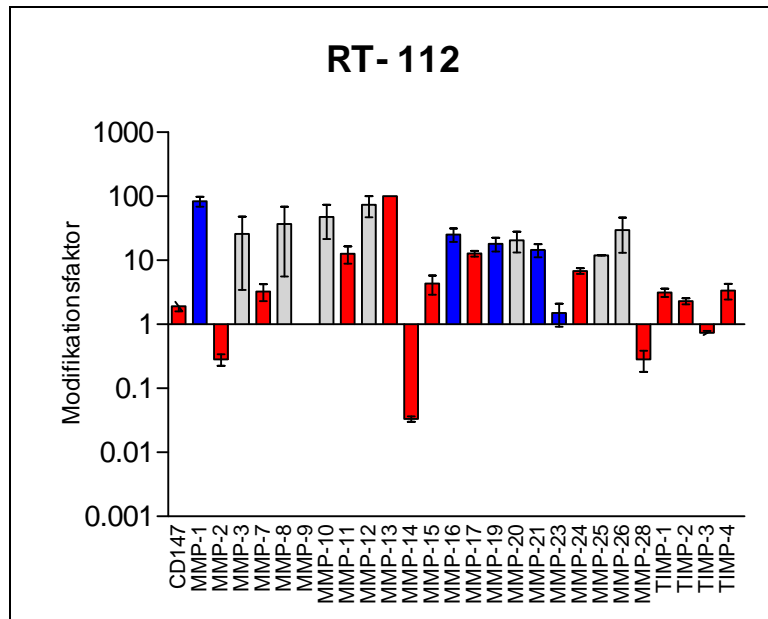


Abbildung 3 B: Expressionsmuster der Zelllinie RT-112

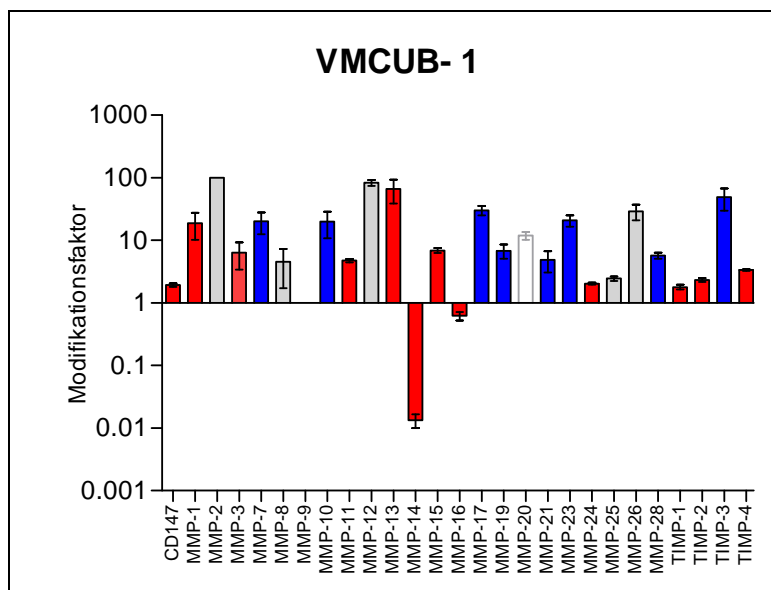


Abbildung 3 C: Expressionsmuster der Zelllinie VMCUB-1

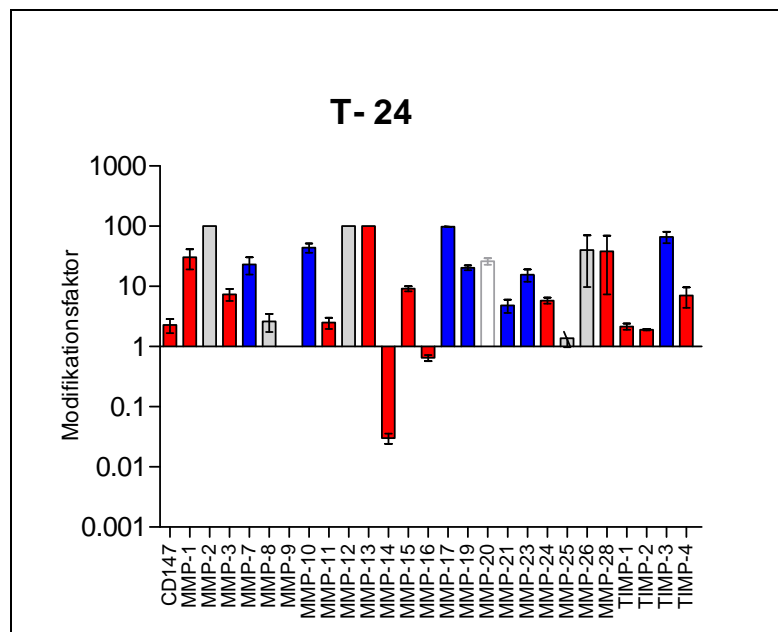
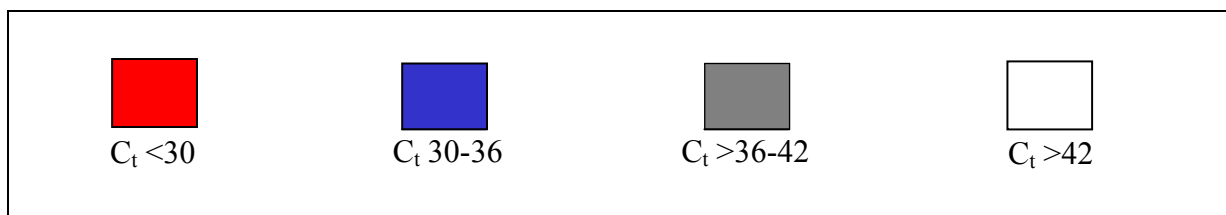


Abbildung 3 D: Expressionsmuster der Zelllinie T-24

Abbildung 3 E: Farbliche Darstellung des Schwellenwert-Zyklus ( $C_t$ )

Es erfolgte außerdem eine Überprüfung der MMP-Expressionsmodifikation nach Behandlung mit 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A auf statistische Signifikanz. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  festgelegt. Die Berechnung erfolgte mittels ungepaartem t-Test mit Hilfe des Statistikprogramms GraphPad Prism®.

Tabelle 19: Überprüfung der MMP-Expressions-Modifikation auf statistische Signifikanz

	<b>RT-4</b>	<b>RT-112</b>	<b>VMCUB-1</b>	<b>T-24</b>
<b>EMMPRIN</b>	p=0,0254	p=0,0193	p=0,0618	p=0,0518
<b>MMP-1</b>	p=0,0104	p=0,001	p=0,0199	p=0,0015
<b>MMP-2</b>	p=0,7801	p=0,0206	p=0,0002*	p<0,0001*
<b>MMP-3</b>	p=0,0001	p=0,1097*	p=0,3396	p=0,0006
<b>MMP-7</b>	p=0,0009	p=0,0123	p=0,0027	p=0,0004
<b>MMP-8</b>	p=0,0611	p=0,0879	p=0,1041	p=0,0566
<b>MMP-9</b>	**	**	**	**
<b>MMP-10</b>	p=0,0108	p=0,0076	p=0,0068	p=0,0015
<b>MMP-11</b>	p=0,0099	p=0,0274	p=0,0048	p=0,0602
<b>MMP-12</b>	p=0,0003	p=0,0036*	p=0,0023*	p<0,0001*
<b>MMP-13</b>	p<0,0001	p=0,0002	p=0,0017	p<0,0001
<b>MMP-14</b>	p=0,2083	p<0,0001	p=0,0005	p=0,0003
<b>MMP-15</b>	p<0,0001	p=0,0036	p=0,0004	p=0,0002
<b>MMP-16</b>	p=0,0011	p=0,0002	p=0,0201	p=0,0875
<b>MMP-17</b>	p<0,0001	p<0,0001	p<0,0001	p=0,0130
<b>MMP-19</b>	p=0,8661	p=0,0002	p=0,0011	p<0,0001
<b>MMP-20</b>	p<0,0001*	p=0,0035*	p=0,0008*	p=0,0065*
<b>MMP-21</b>	p<0,0001	p=0,0210	p=0,0127	p=0,0083
<b>MMP-23</b>	p=0,0534	p=0,6542	p=0,0009	p=0,0013
<b>MMP-24</b>	p<0,0001	p=0,0054	p=0,0014	p<0,0001
<b>MMP-25</b>	p<0,0001*	p<0,0001	p=0,0325*	p=0,6737*
<b>MMP-26</b>	p=0,1823	p=0,2333	p=0,1719	p=0,4009
<b>MMP-28</b>	p=0,0130	p=0,0307	p=0,0161	p=0,1305
<b>TIMP-1</b>	p=0,0506	p=0,0004	p=0,0026	p=0,1179
<b>TIMP-2</b>	p<0,0001	p=0,0051	p=0,0006	p=0,0025
<b>TIMP-3</b>	p=0,0106	p=0,1888	p=0,0002	p=0,0002
<b>TIMP-4</b>	p=0,0073	p=0,0797	p=0,0028	p=0,0094

\* Ct-Werte > 42 wurden gleich 42 gesetzt, \*\* Keine Expression

#### 4.3.2 Immunzytochemische Analyse der Proteinexpression

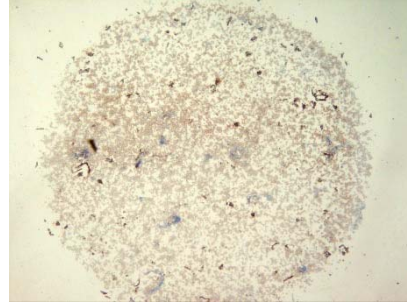
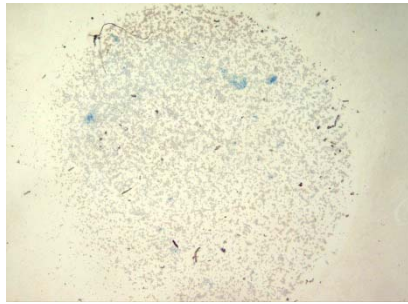
Zur Analyse der Protein-Expression von MMP-1, MMP-2, MMP-10, MMP-13, MMP-14, MMP-17, MMP-23, sowie TIMP-1 und TIMP-4 wurden Zytozentrifugenpräparate der behandelten und der unbehandelten Zelllinien zur Durchführung von Immunzytochemien mittels mono- und polyklonaler Antikörper angefertigt.

Bei der Auswertung der Färbungen wurden jeweils die Zytozentrifugen-Präparationen der behandelten Zellen denen der unbehandelten Zellen in Vergrößerung gegenübergestellt.

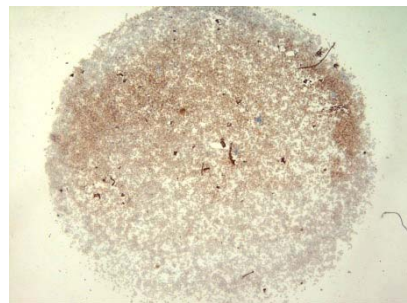
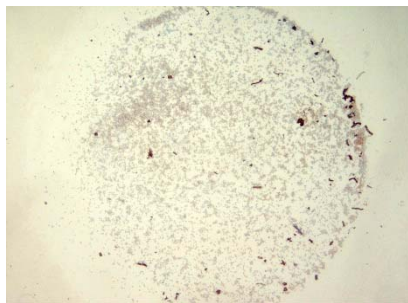
Die durchschnittliche zelluläre immunzytochemische Färbeintensität wurde semiquantitativ und die Differenz der Färbeintensitäten vor und nach Behandlung erfasst, entsprechend 0 für keinen Unterschied, + bzw. – 1 bis 3 für geringe, mäßige und hohe Unterschiede, wobei + eine Hochregulation und – eine Herabregulation beschreibt.



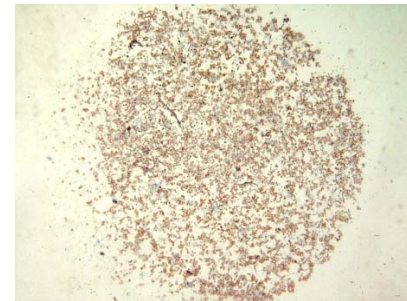
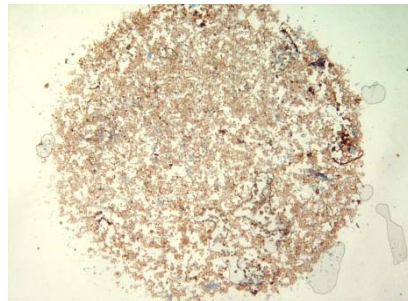
Abbildung 4: Darstellung der Zytozentrifugenpräparate einiger behandelter und unbehalteter Zelllinien



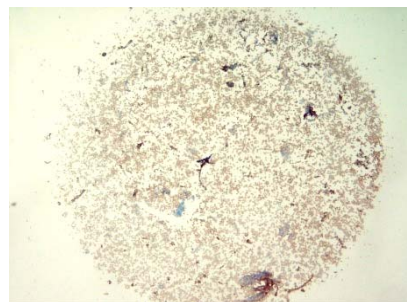
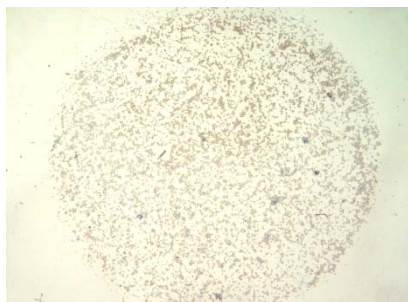
**T-24 MMP-10 unbehandelt / T-24 MMP-10 behandelt Score: +3**



**VMCUB-1 MMP-2 unbehandelt / VMCUB-1 MMP-2 behandelt Score: +3**



**RT-4 MMP-14 unbehandelt / RT-4 MMP-14 behandelt Score: 0**



**T-24 MMP-14 unbehandelt / T-24 MMP-14 behandelt Score: +1**

Um Proteinexpressionsveränderungen mit den Veränderungen auf mRNA-Ebene in einer Auswahl von Zielgenen und -Proteinen vergleichen zu können, wurden die mRNA-Expressionsdaten in einen semiquantitativen Score überführt. Modifikationsfaktor  $>10$  entsprechend 2 Punkten, Modifikationsfaktor  $<10$  entsprechend 1 Punkt, keine relevante Modifikation entsprechend 0 Punkten: - Modifikationsfaktor  $<0,1$  entsprechend -1 Punkt und Modifikationsfaktor  $>0,01$ , entsprechend -2 Punkten. Die mRNA-Score-Differenz wurde mit der Protein-Score-Differenz verglichen.

Tabelle 20: Vergleich der MMP- und TIMP-Proteinexpression mit der genetischen MMP- und TIMP-Expression

	<b>RT-4</b>		<b>RT-112</b>		<b>VMCUB-1</b>		<b>T-24</b>	
	Protein	RNA	Protein	RNA	Protein	RNA	Protein	RNA
<b>MMP-1</b>	1	1	2	2	0	2	2	2
<b>MMP-2</b>	2	0	0	-1	3	2	2	2
<b>MMP-10</b>	2	1	2	2	3	2	3	2
<b>MMP-13</b>	1	2	-3	2	1	2	0	2
<b>MMP-14</b>	0	-1	1	-2	0	-2	1	-2
<b>MMP-17</b>	0	1	0	2	0	2	0	2
<b>MMP-23</b>	2	1	0	1	1	2	2	2
<b>TIMP-3</b>	-1	1	-1	-1	0	2	0	2
<b>TIMP-4</b>	0	1	0	1	-2	1	1	2

Im Vergleich der Expressionsergebnisse für die MMPs und TIMPs mit den Proteinuntersuchungen zeigte sich lediglich für MMP-1, MMP-10 und MMP-23 eine Assoziation.

#### 4.4 Migrationsverhalten der Zelllinien unter dem Einfluss von 5-aza-2'-deoxycytidin, Trichostatin A

5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A inhibierten die Invasion und Migration urothelialer Karzinomzelllinien. Der Einfluss der 5-aza-2'-deoxycytidin- und Trichostatin-A-Behandlung auf die Tumorzellmigration wurde mit Hilfe von Migrationsfiltern untersucht. Die Auszählung der Zellen erfolgte semiautomatisch mit Hilfe der Histolab Software. Das unter der Behandlung gleichzeitig beeinflusste Proliferationsverhalten wurde herausgerechnet (siehe Material und Methoden 3.2.2.3 und 3.2.2.4). Die Migration der Zelllinien RT-4, RT-112, T-24 wurde signifikant gehemmt, das Migrationsverhalten der Zelllinie VMCUB-1 wurde tendenziell gehemmt. Die statistische Auswertung erfolgte mittels t-Test.

Abbildung 5: Darstellung des Migrationsverhaltens der einzelnen Tumorzelllinien, behandelt und unbehandelt. Die Auszählung erfolgte nach 24-stündiger Inkubation gegen einen Gradienten aus fetalem Kälberserum. Die Testgruppen wurden gegen die Zellzahl aufgetragen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus 3 Triplexexperimenten +/- Standardabweichung.

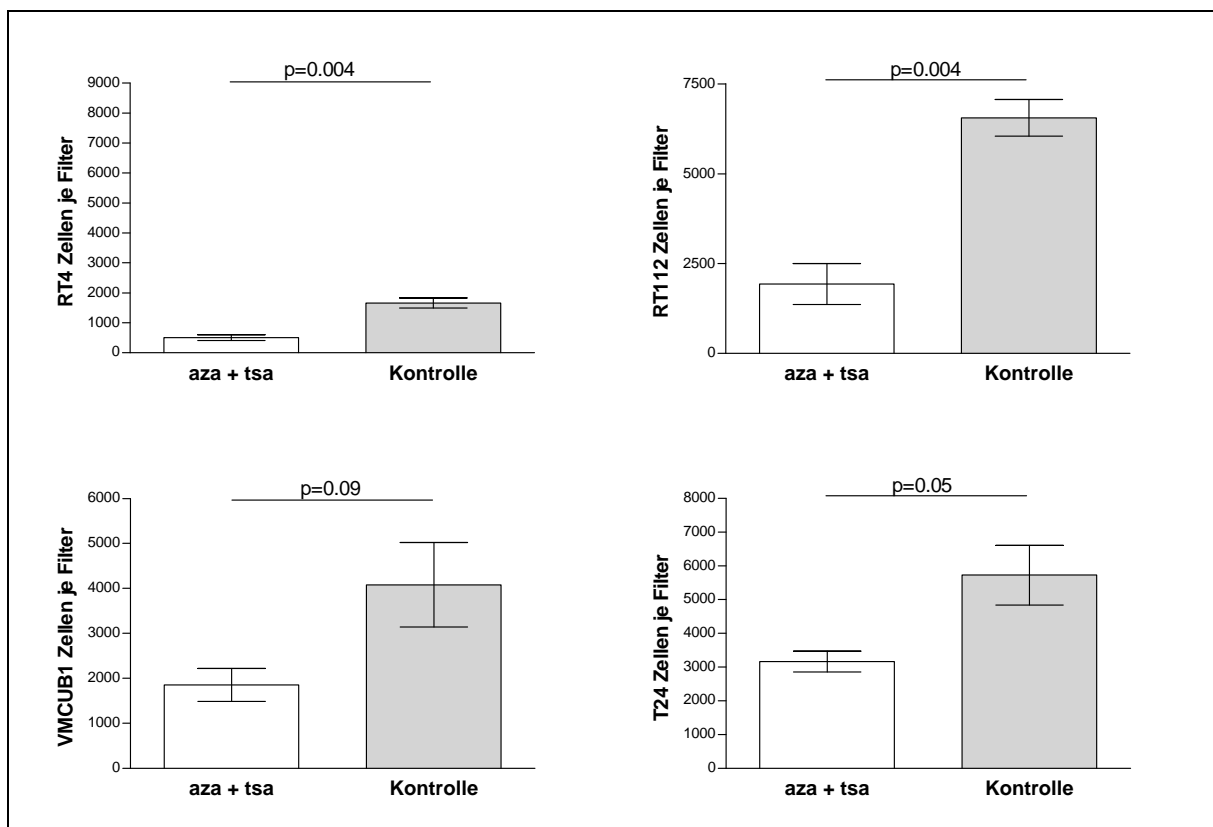
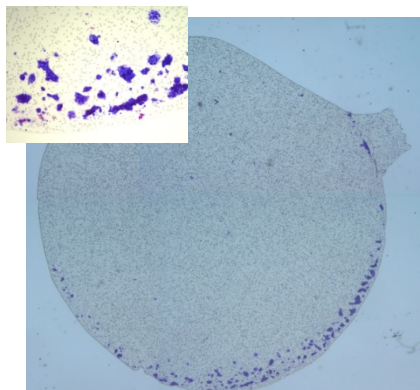


Abbildung 6: Darstellung der Migrationsfilter am Beispiel der Zelllinien RT-4 und RT-112

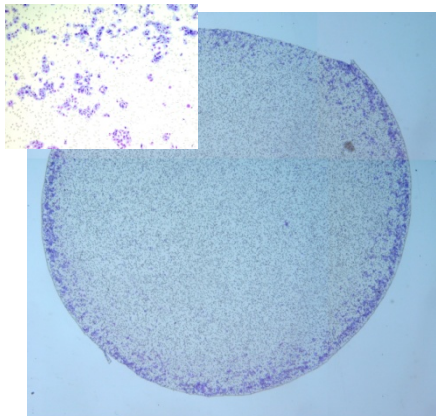
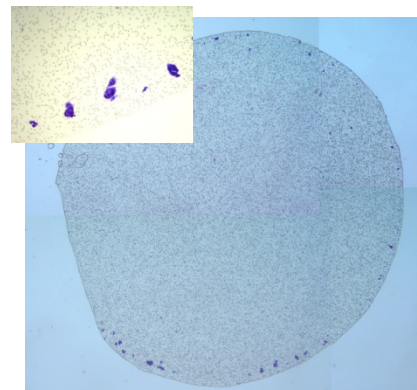
## Migration

Ohne 5-aza/TSA

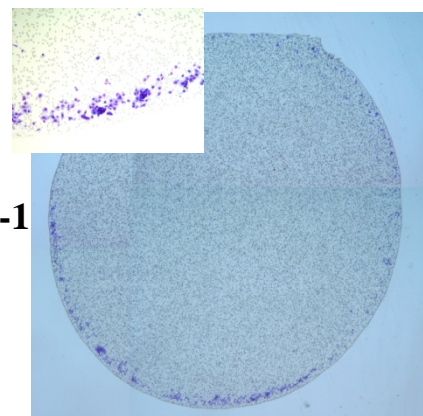
Mit 5-aza/TSA



RT-4



VMCUB-1



## 4.5 Invasionsverhalten der Zelllinien unter dem Einfluss von 5-aza-2'-deoxycytidin, Trichostatin A

In der Untersuchung des Invasionsverhaltens der Tumorzelllinien in Matrigel-Invasionskammern unter Behandlung mit 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A wurden korrespondierende Ergebnisse erzielt. Die Invasion der Zelllinien RT-4, RT-112, sowie T-24 wurde signifikant gehemmt. Die Hemmung der Zelllinie RT-4 stellte sich am stärksten dar. Die Beeinflussung der Zelllinie VMCUB-1 erreichte im Gegensatz dazu kein signifikantes Niveau.

Abbildung 7: Darstellung des Invasionsverhaltens der einzelnen Tumorzelllinien, behandelt und unbehandelt. Die Auszählung erfolgte nach 24-stündiger Inkubation gegen einen Gradienten aus fetalem Kälberserum. Die Testgruppen wurden gegen die Zellzahl aufgetragen. Dargestellt ist jeweils der Mittelwert aus 3 Triplexperimenten +/- Standardabweichung.

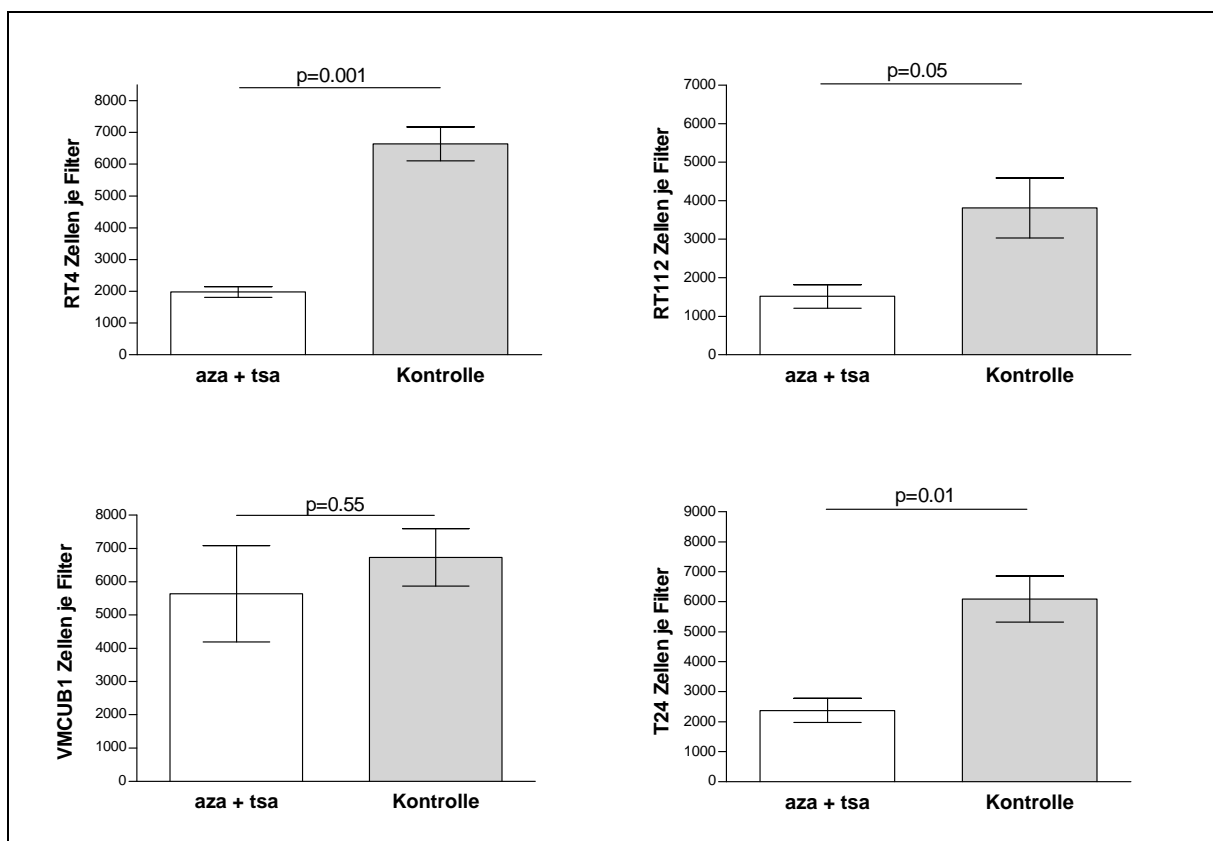
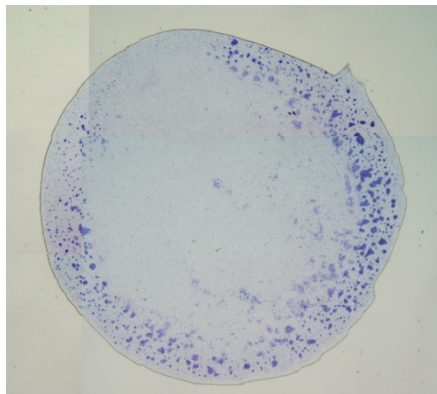


Abbildung 8: Darstellung der Invasionsfilter am Beispiel der Zelllinien RT-4 und VMCUB-1

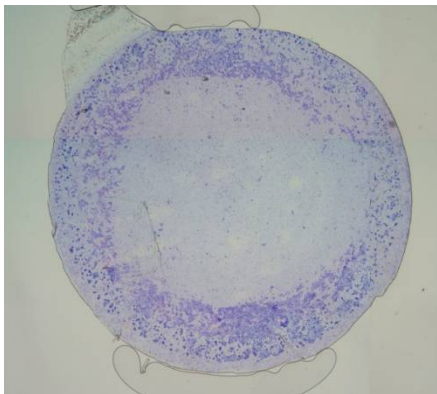
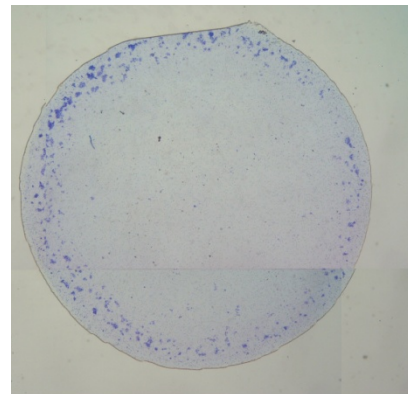
## Invasion

Ohne 5-aza/TSA

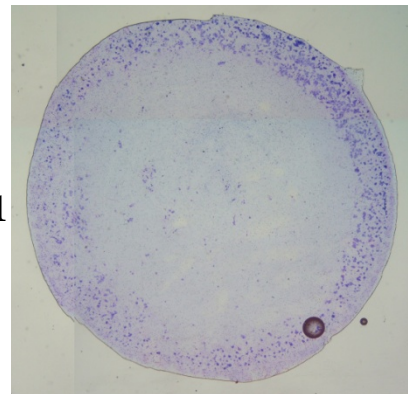
Mit 5-aza/TSA



RT-4



VMCUB-1





## 5 Diskussion

Epigenetische Genregulationen stellen neue Ansätze in der Therapie von Malignomen dar und befinden sich bereits im Einsatz. So sind an demethylierenden Agenzien 5-aza-2'-deoxycytidin, unter dem Namen Decitabine, sowie 5-azacitidine zur Therapie Myelodysplastischer Syndrome (MDS) zugelassen. Andere DNMTIs befinden sich bereits in Phase-II-Studien. Der HDACI SAHA ist als Behandlung für das kutane T-Zell-Lymphom zugelassen, andere, teils in Kombination befinden sich in klinischen Studien und werden erprobt für die Behandlung von hämatologischen und soliden Tumoren (Altucci und Minucci 2009).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirksamkeit des Histondeacetylaseinhibitors Trichostatin A und des DNA-Methyltransferaseinhibitors 5-aza-2'-deoxycytidin auf vier verschiedene urotheliale Karzinomzelllinien untersucht. Dies erfolgte im Hinblick auf die Expression von Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren, sowie auf das Verhalten der Tumorzelllinien im Hinblick auf Migration, Invasion und Proliferation.

### **5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A induzieren in allen Zelllinien eine Proliferationshemmung**

Mit der kombinierten Anwendung von 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A konnten die stärksten Effekte auf die Proliferationshemmung aller Zelllinien erzielt werden. Dies zeigte sich in der stark reduzierten BrdU-Aufnahme.

Auch Cecconi et al. beschrieben 2009 eine synergistische Wirkung von 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A auf die Inhibition der Proliferation bei endokrinen Pankreas malignom-Zelllinien. Karam et al. untersuchten 2007 in ihrer Studie die Auswirkungen der beiden epigenetischen Modifikatoren Trichostatin A und 5-aza-2'-deoxycytidin auf Zelllinien des Urothelkarzinoms und stellten ebenfalls eine synergistische Proliferationshemmung fest.

Die Ursache für die starke Wirkung in Kombination der beiden epigenetischen Modifikatoren könnte man durch einen synergistischen Effekt der beiden Substanzen erklären, da beide an verschiedenen Stellen des Nukleosoms angreifen. Durch deren Beeinflussung könnte es zu einer Reexpression von Zellzyklus-regulierenden Proteinen gekommen sein, welche wiederum einen Zellzyklus-Arrest der Zellen bewirken.

Eine andere Erklärung für die Hemmung der Zellproliferation könnte darin bestehen, dass durch die epigenetischen Effekte der oben genannten Substanzen eine Aktivierung von Schlüsselgenen der Apoptosekaskade mit nachfolgender Apoptoseinduktion erfolgt ist.

Cecconi et al. führten die antiproliferative Wirkung auf die Beeinflussung von Zellzyklus-regulierenden Proteinen, wie Proteasom-Untereinheiten, des p53 Proteins, sowie des RAS-Proteins zurück. Zusätzlich soll es zu einer Induktion des mitochondrialen apoptotischen Zelltodes gekommen sein.

Karam et al. deuteten ihre Beobachtungen mit einem G2/M-Zellzyklus-Arrest. Genauere Untersuchungen führte dieselbe Arbeitsgruppe an der auch von uns untersuchten Zelllinie T-24 durch. Sie fanden heraus, dass HDACIs wie Trichostatin A eine Induktion des Zellzyklus-regulierenden Proteins p21 bewirken, die unabhängig von p53 zu wirken scheint. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Li et al. 2006. Sie untersuchten die isolierte Wirkung von Trichostatin A auf Blasenkarzinomzelllinien und stellten dabei ebenfalls eine Proliferationshemmung in vitro fest. Diese führten sie auf einen Zellzyklusarrest in der G1 Phase sowie auf apoptotischen Zelltod zurück, beides bedingt durch das Zellzyklus-kontrollierende Protein p21<sup>WAF1</sup>, welches eine erhöhte mRNA Expression in den Zellen zeigte. Das Protein p53 war, wie auch schon von Karam et al. postuliert, nicht an den Reaktionen beteiligt.

Eine HDACI-Aktivierung des Zellzyklus-kontrollierenden Proteins p21<sup>WAF1</sup> durch vermehrte Acetylierung der mit dem p21<sup>WAF1</sup> Gen Promotor assoziierten Histone H3 und H4 bedingt, wurde bereits in früheren Studien (Richon et al. 2000, Gui et al. 2004) beobachtet. Das Protein p21<sup>WAF1</sup> könnte ebenfalls eine Rolle in der von uns beobachteten Proliferationshemmung spielen.

In unseren Untersuchungen stellten wir weiterhin fest, dass die Proliferationshemmung negativ mit der Tumorverdopplungszeit korreliert. Je kürzer also die Zeit für die Tumorverdopplung desto schwächer ist die Wirkung der epigenetischen Modifikatoren auf die Zelllinie. In der langsam wachsenden „low grade“ Zelllinie RT-4 hatte bereits die alleinige Behandlung mit Trichostatin A, sowie die alleinige Behandlung mit 5-aza-2'-deoxycytidin bezüglich der Proliferationshemmung einen signifikanten Effekt erzielt.

Dies liegt zum einen daran, dass die „low grade“- Zelllinien ohnehin eine geringere Grundproliferationsaktivität aufweisen, zum anderen scheint bei den „high-grade“ Zelllinien der Methylierungseffekt generell eine geringere Rolle zu spielen. Die Ursache hierfür könnte eine verminderte Methylierung und somit schlechtere Beeinflussbarkeit sein. Daneben könnten auch andere genetische Veränderungen hier stärker von Bedeutung sein, wie zum



Beispiel chromosomale Deletionen und Zugewinne im Tumorprogress bei insgesamt höherer genetischer Instabilität.

### **5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A beeinflussen das mRNA Expressionsmuster der Matrix-Metalloproteinasen und ihrer Inhibitoren**

In unseren Untersuchungen stellten wir fest, dass die kombinierte Behandlung mit 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A, in allen von uns untersuchten Tumorzelllinien, eine unterschiedlich hohe mRNA Expression von Matrix-Metalloproteinasen, sowie auch ihrer spezifischen Inhibitoren (TIMPs) induziert. Die mRNA Expression von MMP-14 (MT1-MMP) wurde dagegen in allen Zelllinien, mit Ausnahme von RT-4, supprimiert.

In diversen Studien zeigte sich bereits, dass viele MMPs zumindest teilweise einer epigenetischen Kontrolle unterliegen. Eine durch Gen-Methylierung bedingte Verminderung der MMP-2 Expression in hochinvasiven Zellreihen des Prostatakarzinoms konnten Shukeir et al. 2006 aufzeigen. Couillard et al. beobachteten 2006 eine verstärkte MMP-3 Expression in Kolonkarzinom-Zelllinien nach einer demethylierenden Behandlung mit 5-aza-2'-deoxycytidin, es zeigten sich jedoch keine Effekte auf die MMP-10 Expression. In Zellen des B-Zell Lymphoms zeigte sich dagegen genau das umgekehrte Muster, nämlich eine MMP-10 Induktion jedoch keine MMP-3-Induktion (Couillard et al. 2006). Chicoine et al. beobachteten 2002 ebenfalls eine erhöhte MMP-9 mRNA- und Proteinsekretion bei Hypomethylierung des MMP-9-Promotors in Lymphomzellen. Sato et al. fanden 2003 eine mRNA-Induktion der invasionsassoziierten MMPs-1, -2, -3, -7, -9, und -14, in Pankreaskarzinom-Zelllinien nach Demethylierung mit 5-aza-2'-deoxycytidin.

Induktive Effekte auf TIMPs wurden ebenfalls beschrieben: Pulukuri et al. beschäftigten sich 2007 in ihrer Studie mit metastasierten Prostatakarzinom-Zellen, die einen hypermethylierten TIMP-2 Promotor aufwiesen. Durch eine Behandlung mit 5-aza und TSA gelang es ihnen die Expression von TIMP-2 heraufzuregulieren und auf diese Weise die Invasivität der Tumorzellen zu senken. Galm et al. untersuchten 2005 den Methylierungsstatus von Non-Hodgkin-Lymphom-Zellen und fanden dabei hypermethylierte CpG-Inseln des TIMP-2 Gens. Nach Behandlung mit 5-aza-2'-deoxycytidin kam es zu einer Heraufregulation der TIMP-2-Expression mit reduzierter Invasions- und Angiogenesetendenz.

Nakamura et al. beobachteten 2005 einen hypermethylierten Promotorstatus von TIMP-3 in Glioblastomen und dadurch bedingter herabgesetzter TIMP-3-Expression. Die niedrige Expression wurde mit einer schlechten Prognose assoziiert.

All diese Untersuchungen verdeutlichen die Gewebsspezifität der epigenetischen Beeinflussung und lassen erkennen, dass es selbst innerhalb gleicher Gewebe bei verschiedenen Zelllinien der gleichen Ausgangsmatrix zu starken Unterschieden in der MMP-Expression kommen kann.

#### Die Bedeutung von MMP-14 in der Tumorentstehung

MMP-14 (MT1-MMP) spielt eine zentrale Rolle im Tumorwachstum, Invasion sowie in Neovaskularisationsprozessen (Noel et al. 2004, Devy et al. 2009). Eine hohe MMP-14 Expression ist mit Lymphknotenmetastasierung, Tumorinvasion, sowie großer Tumorgroße assoziiert (Tetu et al. 2006) und korreliert mit der Malignität verschiedener Tumortypen (Devy et al. 2009).

MMP-14 aktiviert neben der direkten Spaltung von Matrixproteinen, MMP-2. Dies wiederum führt zu einer vermehrten perizellulären proteolytischen Aktivität. Die Aktivität der beiden MMPs: MMP-2 und MMP-14 wird über TIMP-2 reguliert. Die Regulation der MMP-14/MMP-2 und TIMP-2-Achse ist ein wichtiger Faktor bezüglich der Kontrolle von Tumorzellinvasion und -migration und scheint mit Hilfe von epigenetischen Mechanismen zu erfolgen (Chernov et al. 2009).

Diverse Studien beschäftigten sich mit der selektiven Blockade von MMP-14. Devy et al. beispielsweise hemmten 2009 selektiv die Aktivität von MMP-14 mittels des hochselektiven menschlichen MMP-14-Antikörpers DX-2400. Dies führte zu einer Hemmung des Tumorwachstums, der Tumolvaskularisation, zu einer Blockade der pro-MMP-2 Aktivierung und zeigte eine anti-invasive Aktivität in vitro.

Saeb-Parsy et al. fanden 2008 heraus, dass eine spezifische Hemmung von MT1-MMP mittels siRNAs zu einer transkriptionellen Aktivierung des Tumorsuppressorgens Dickkopf-3 mit daraus resultierender Invasionsreduktion führt. All diese Studien verdeutlichen die wesentliche Bedeutung von MMP-14 in der Tumorinvasion.

Die Reduktion der MMP-14-mRNA-Expression kann durch die Reaktivierung eines Tumorsuppressorgens, wie zum Beispiel des Tumorsuppressors „Fhit“ erfolgt sein, das in einer anderen Studie nachweislich eine Transkriptionssuppression von MMP-14 bewirkte (Weiske et al. 2007). Eine andere Studie zeigt den Zusammenhang zwischen Methylierungsstatus des Fhit-Gens und dessen Expression in Urothelkarzinomen. Dort war bei erhöhtem Methylierungsstatus des Gens, keine Fhit Expression in Urothelkarzinomen nachweisbar. Eine epigenetische Beeinflussung ist somit auch hier gegeben (Iliopoulos et al.).

## **Die mRNA Expression und zelluläre Proteinexpression zeigen für die untersuchten Proteine kaum Korrelation**

Die Darstellung der MMP-Expression auf Proteinebene und mRNA-Ebene zeigte nur teilweise korrespondierende Ergebnisse.

Es kommen mehrere Erklärungen in Frage: 1. mRNA und Proteinexpression korrelieren, die Proteine werden jedoch in den Überstand sezerniert und sind im Zytoplasma der Zellen immunzytochemisch nicht mehr detektierbar. Der Überstand wurde in der aktuellen Untersuchung nicht analysiert. Die Hypothese ließe sich in neuen Versuchsansätzen an Kulturüberständen mittels Immunoblots oder Enzyme-linked-Immunosorbent-Assays (ELISA) überprüfen. 2. Die Translation in Proteine wird möglicherweise auch durch die epigenetische Modifikation beeinflusst. Hierzu ist bisher keine Untersuchung veröffentlicht worden.

## **5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A induzieren in allen Zelllinien eine Hemmung der Migration und Invasion**

Für alle Zelllinien mit Ausnahme von VMCUB-1 konnte eine signifikante Hemmung des Migrations- sowie des Invasionsverhaltens ermittelt werden. Bei der Zelllinie VMCUB-1 zeigte sich im Invasionsversuch lediglich eine tendenzielle Invasionsabschwächung.

Auch Chen et al. beschrieben 2006 in ihrer Studie eine starke Hemmung der Invasion in Harnblasenkarzinom-Zelllinien unter Behandlung mit dem HDACI Valproinsäure, jedoch keinerlei verändertes Invasionsverhalten bei Prostatakarzinom-Zelllinien. Eine Migrationshemmung wurde ebenfalls nicht beobachtet. Sato et al. fanden 2005 nach 5-aza-2'-deoxycytidin-Behandlung ein gesteigertes invasives Potential von Pankreas-Karzinomzellen, sowie eine Induktion der MMPs-1, -2, -3, -7, -9, -14. Diese verschiedenen, zum Teil gegensätzlichen Ergebnisse sprechen dafür, dass eine epigenetische Beeinflussung sich zell- bzw. gewebespezifisch auf das Invasions- und Migrationsverhalten der malignen Zellen auswirkt.

Das durch die Behandlung stark supprimierte invasive bzw. migrative Verhalten der Zelllinien steht nun im Gegensatz zu der stark erhöhten mRNA Expression der hier untersuchten Matrix-Metalloproteinasen. Würde man doch eine erhöhte Bereitschaft der Zellen bezüglich ECM-Degradation und somit Invasion und Migration erwarten.

Eine wahrscheinliche Ursache hierfür könnte die MMP-14-Hemmung darstellen. So konnten Studien, wie oben beschrieben, durch eine isolierte MMP-14 Hemmung eine deutliche Invasions- und Wachstumshemmung induzieren (Devy et al. 2009). Itoh und Seiki betonten 2006 die essentielle Rolle von MMP-14 bezüglich des Invasions- und Migrationsverhaltens von Tumorzellen. MMP-14 scheint neben den anderen kollagenolytischen MMPs, wie MMP-1, MMP-2, MMP-8 und MMP-13, die einzige MMP zu sein, welche die zelluläre Invasivität in die Kollagen I Matrix von Epithelzellen und Fibroblasten bewerkstelligt. Auch die Aktivierung von MMP-2 durch MMP-14 stellt einen kritischen Punkt in der Zellmigration dar, da MMP-2 für die Degradation von Typ IV Kollagen zuständig ist und somit für die Degradation der Basallamina. Die in unseren Versuchen induzierte Hemmung der MMP-14 Expression, könnte die herabgesetzte Invasions- und Migrationsbereitschaft erklären.

Als andere Ursache für die von uns ermittelte Invasions- und Migrationshemmung käme eine Suppression anderer invasionsassoziiierter Gene in Frage, welche unabhängig von den MMPs wirken, beispielsweise in Form zytoskelettaler Proteine. Dabei könnte es sich beispielsweise um die Deregulation des Actin-Systems handeln (Lambrechts et al. 2004). Eine Beeinflussung von interzellulären Adhäsionsmolekülen, wie den E-cadherinen, oder von Zellmatrix-Adhäsionsmolekülen, wie den Integrinen, welche Zelldifferenzierung, -proliferation, -migration, und -invasion regulieren (Buda und Pignatelli 2004) wäre ebenfalls denkbar. Neben den obigen Möglichkeiten, könnte auch die verstärkte TIMP-Expression einen modulatorischen Einfluss auf Invasion und Migration ausüben. Mögliche Folgen einer erniedrigten TIMP-Expression wurden bereits am Beispiel von TIMP-2 und TIMP-3 dargelegt.

Durch die Verschiebungen in der MMP- bzw. TIMP-Expression kommt es auch zu einer Verschiebung des MMP/TIMP-Verhältnisses, welches ebenfalls eine Rolle in der Migrations- und Invasionshemmung spielen könnte. Bei einem TIMP/MMP-Ungleichgewicht gelang es Cappabianca et al. 2003 in Neuroblastomzellen durch Behandlung mit 5-aza-2'-deoxycytidin isoliert die TIMP-2 Expression zu erhöhen und dadurch die Invasionsaktivität der MMPs in vitro zu senken. Rezidivrate und Progression von Harnblasenkarzinomen wurde ebenfalls bereits mit der MMP/TIMP-Ratio, sowie mit erhöhter proteolytischer Aktivität in Verbindung gebracht (Wallard et al. 2006).

Insgesamt gesehen scheint der hemmende Effekt auf die Motilität jedoch funktionell wichtiger zu sein als der stimulatorische Effekt auf die MMP-Expression.

## **Ausblick**

Im Gegensatz zu genetischen Veränderungen weisen epigenetische Veränderungen den fundamentalen Unterschied der potentiellen Reversibilität auf. Diese Tatsache bietet neue Möglichkeiten zur Entwicklung von therapeutischen Strategien (Altucci und Minucci 2009). So kann über eine Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen die normale Zellfunktion wiederhergestellt werden, oder es kann in Kombination mit anderen Therapien, wie anderen Chemotherapeutika, Immunotherapien oder Strahlentherapie eine höhere Therapieeffizienz erzielt werden.

In Zukunft kann vielleicht schon das epigenetische Muster aus einem Blutstropfen bestimmt und auf diese Weise etwaige „Epimutationen“ detektiert werden. Hierbei könnte es sich um potentielle Tumoren handeln, die durch epigenetische Pharmaka noch präventiv vor ihrer Entstehung behandelt werden könnten (Yoo und Jones 2006). Auch andere Körpersekrete, wie Urin kommen für die epigenetische Diagnosestellung in Frage (Phé et al. 2009).

Außerdem kann aktuell bereits noch vor Therapieeinleitung eine Chemotherapeutikaresistenz durch Untersuchung des epigenetischen Musters von Tumorzellen vorhergesagt werden (Lopez et al. 2009). So ist, laut Hegi et al., eine Hypermethylierung des DNA-Reparatur-Proteins MGMT der beste unabhängige Prädiktor für eine gute Antwort auf das Mittel Temozolomide in Patienten mit Glioblastom (Hegi et al. 2005).

Neuere Studien postulieren, dass es sich bei einer Chemotherapeutika-Resistenz um eine Akkumulation von epigenetischen Veränderungen handeln könnte (Glaspool et al. 2006). So zeigte bereits im Jahre 2000 eine Studie von Plumb et al., dass eine Behandlung mit demethylierenden Agenzien sogar eine Medikamentenresistenz in vitro beheben konnte.

In Zukunft stehen vielleicht schon Kartierungen von Methylierungsmustern sowie Histonacetylierungsmustern für gesunde und kranke Zellen zur Verfügung. Der „epigenetische Code“ wäre entschlüsselt und könnte Möglichkeiten zum Eingriff mit Histondeacetylaseinhibitoren sowie Demethylierungsagenzien bieten (Estellar 2007).

## 6 Zusammenfassung

Oberflächliche Harnblasenkarzinome werden organerhaltend durch Abtragung und in Abhängigkeit von Malignitätsgrad und Differenzierung durch eine lokale Chemotherapie bzw. immunmodulatorische Therapie behandelt. Epigenetische Therapieansätze mit nicht-methylierbaren Cytosinanaloga, wie 5-aza-2'-deoxycytidin und Histondeacetylaseinhibitoren wie Trichostatin A, stellen potenzielle therapeutische Optionen für die Behandlung maligner Tumoren dar. In dieser Studie wurde deren Wirkungsweise an vier biologisch unterschiedlichen urothelialen Karzinomzelllinien untersucht. Die epigenetische Modifikation der Tumorzellen mit 5-aza-2'-deoxycytidin und Trichostatin A induziert

- in allen Zelllinien eine Hemmung der Proliferation,
- in allen Zelllinien eine Hemmung der Migration,
- in allen Zelllinien mit Ausnahme von VMCUB-1 eine Hemmung der Invasion,
- in allen Zelllinien eine unterschiedlich hohe mRNA-Expression von Matrix-Metalloproteinasen, aber auch ihrer spezifischen Inhibitoren,
- in allen Zelllinien mit Ausnahme von RT-4 eine Suppression der MMP-14-mRNA-Expression.
- Die mRNA-Expression und zelluläre Proteinexpression zeigten für die untersuchten Proteine kaum Korrelation.

Die epigenetische Modifikation der Harnblasenkarzinomzelllinien beeinflusst deutlich deren Motilität und Invasivität. Der hemmende Effekt auf die Motilität scheint funktionell wichtiger zu sein als der stimulatorische Effekt auf die MMP-Expression. Die Suppression von MMP-14 und Induktion der MMP-Inhibitoren TIMP-1-4 scheinen die ursächlichen Faktoren für die invasionsinhibitorische Wirkung zu sein. Für die aggressiv wachsende Zelllinie VMCUB-1 ist trotz des migrationsblockierenden Effekts kein invasionsinhibitorischer Effekt nachweisbar, die Ursache hierfür ist unklar. Die epigenetische Modifikation der Genexpression beeinflusst eine Vielzahl unterschiedlichster Gene, so auch invasionsassoziierte Gene.

Sichere Rückschlüsse auf das potenzielle biologische Verhalten von Tumoren bzw. Tumorzelllinien auf der Basis von Gen- oder Proteinexpressionsanalysen sind nicht möglich, da epigenetische Modifikationen eine Vielzahl paralleler direkter und indirekter Effekte hervorrufen, die letztlich nur in Zellkultur- und Tierexperimenten abschätzbar sind, was für den Einsatz derart wirkender Substanzen in der Therapie solider Tumoren bedacht werden sollte.

## 7 Literaturverzeichnis

Ailenberg M, Silverman M (2002): Trichostatin A-histone deacetylase inhibitor with clinical therapeutic potential-is also a selective and potent inhibitor of gelatinase A expression. *Biochem Biophys Res Commun* 298, 110-115

Altucci L, Minucci S (2009): Epigenetic therapies in haematological malignancies: searching for true targets. *Eur J Cancer* 45, 1137-1145

Ballestar E, Esteller M (2005): The Epigenetic Breakdown of Cancer Cells: From DNA Methylation to Histone Modifications. *Prog Mol Subcell Biol* 38, 169-181

Bender CM, Pao MM, Jones PA (1998): Inhibition of DNA Methylation by 5-Aza-2'-deoxycytidine Suppresses the Growth of Human Tumor Cell Lines. *Cancer Res* 58, 95-101

Bird AP, Wolffe AP (1999): Methylation-Induced Repression-Belts, Braces, and Chromatin. *Cell* 99, 451-454

Branscombe Miranda T, Jones PA (2007): DNA Methylation: The Nuts and Bolts of Repression. *J Cell Physiol* 213, 384-390

Buda A, Pignatelli M (2004): Cytoskeletal network in colon cancer: from genes to clinical application. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 759-765

Cappabianca L, Farina AR, Tacconelli A, Mantovani R, Gulino A, Mackay AR (2003): Reconstitution of TIMP-2 expression in SH-SY5Y neuroblastoma cells by 5-azacytidine is mediated transcriptionally by NF-Y through an inverted CCAAT site. *Exp Cell Res* 286, 209-218

Cecconi d, Donadelli M, Pozza ED, Rinalducci S, Zolla L, Scupoli MT, Righetti PG, Scarpa A, Palmieri M (2009): Synergistic effect of trichostatin A and 5-aza-2'-deoxycytidine on growth inhibition of pancreatic endocrine tumour cell lines: A proteomic study. *Proteomics* 9, 1952-1966

Chakraborti S, Mandal M, Das D, Mandal A, Chakraborti T (2003): Regulation of matrix metalloproteinases : An overview. *Mol Cell Biochem* 253, 269-285

Chen C-L, Sung J, Cohen Michael, Chowdhury WH, Sachs MD, Li Y, Lakshmanan Y, Yung BYM, Lupold SE, Rodriguez R (2006): Valproic Acid Inhibits Invasiveness in Bladder Cancer but Not in Prostate Cancer Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 319, 533-542

Chernov AV, Sounni NE, Remacle AG, Strongin AY (2009): Epigenetic Control of the Invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 Axis in Cancer Cells. *J Biol Chem* 286, 12727-12734

Chicoine É, Estève PO, Robledo O, Van Themsche C, Potworowski EF, St-Pierre Y (2002): Evidence for the role of promotor methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 297, 765-772

Christman JK (2002): 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene* 21, 5483-5495

Comoglio P M, Trusolino L (2005): Cancer: the matrix is now in control. *Nat Med* 11, 1156-1159

Couillard J, Demers M, Lavoie G, St-Pierre Y (2006): The role of DNA hypomethylation in the control of stromelysin gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 342, 1233-1239

Devy L, Huang L, Naa L, Yanamandra N, Pieters H, Frans N, Chang E, Tao Q, Vanhove M, Lejeune A (2009): Selective Inhibition of Matrix Metalloproteinase-14 Blocks Tumor Growth, Invasion, and Angiogenesis. *Cancer Res* 69, 1517-1526

Ducasse M, Brown MA (2006): Epigenetic aberrations and cancer. *Mol Cancer*, 5:60

Egeblad M, Werb Z (2002): New Functions for the Matrix Metalloproteinases in Cancer Progression. *Nat Rev Cancer* 2, 161-174



Engeler D, Wyler S, Schmid H-P (2005): Das Harnblasenkarzinom (1) Ätiologie, Epidemiologie und Diagnostik. *Onkologie* 1, 12-14

Enokida H, Nakagawa M (2008): Epigenetics in bladder cancer. *Int J Clin Oncol* 13, 298-307

Esteller M (2007): Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8, 286-298

Ferguson AT, Lapidus RG, Baylin SB, Davidson NE (1995): Demethylation of the Estrogen Receptor Gene in Estrogen Receptor-negative Breast Cancer Cells Can Reactivate Estrogen Receptor Gene Expression. *Cancer Res* 55, 2279-2283

Galm O, Suzuki H, Akiyama Y, Esteller M, Brock MV, Osieka R, Baylin SB, Herman JG (2005): Inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene by promoter hypermethylation in lymphoid malignancies. *Oncogene* 24, 4799-4805

Glasspool RM, Teodoridis JM, Brown R (2006): Epigenetics as a mechanism driving polygenic clinical drug resistance. *Br J Cancer* 94, 1087-1092

Goebell PJ, Vom Dorp F, Rödel C, Frohneberg D, Thüroff JW, Jocham D, Stief C, Roth S, Knüchel R, Schmidt KW (2006): Nichtinvasives und invasives Harnblasenkarzinom. *Urologe* 45, 873-885

Goffin J, Eisenhauer E (2002): DNA methyltransferase inhibitors-state of the art. *Ann Oncol* 13, 1699-1716

Gui CY, Ngo L, Xu WS, Richon VM, Marks PA (2004): Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 1241-1246

Guo H, Li R, Zucker S, Toole BP (2000): EMMPRIN (CD147), an Inducer of Matrix Metalloproteinase Synthesis, Also Binds Interstitial Collagenase to the Tumor Cell Surface. *Cancer Res* 60, 888-891

Habuchi T, Luscombe M, Elder PA, Knowles MA (1998): Structure and Methylation-Based Silencing of a Gene (DBCCR1) within a Candidate Bladder Cancer Tumor Suppressor Region at 9q32-q33. *Genomics* 48, 277-288

Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L (2005): MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 352, 997-1003

Iliopoulos D, Guler G, Han S-Y, Johnston D, Druck T, McCorkell KA, Palazzo J, McCue PA, Baffa R, Huebner K (2005) : Fragile genes as biomarkers : epigenetic control of WWOX and FHIT in lung, breast and bladder cancer. *Oncogene* 24, 1625-1633

Itoh Y, Seiki M (2006): MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J Cell Physiol* 206, 1-8

Jiang Y, Goldberg ID, Shi YE (2002): Complex roles of tissue inhibitors of metalloproteinases in cancer. *Oncogene* 21, 2245-2252

Jones PA, Laird PW (1999): Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 21, 163-167

Jose-Eneriz ES, Agirre X, Roman-Gomez J, Cordeu L, Garate L, Jimenez-Velasco A, Vazquez I, Calasanz MJ, Heiniger A, Torres A (2006): Downregulation of DBC1 expression in acute lymphoblastic leukaemia is mediated by aberrant methylation of its promoter. *Br J Haematol* 134, 137-144

Karam JA, Fan J, Stanfield J, Richer E, Benaim EA, Frenkel E, Antich P, Sagalowsky AI, Mason RP, Hsieh J-T (2007): The use of histone deacetylase inhibitor FK228 and DNA hypomethylation agent 5-azacytidine in human bladder cancer therapy. *Int J Cancer* 120, 1795-1802

Lambrechts A, Van Troys M, Ampe C (2004): The actin cytoskeleton in normal and pathological cell motility. *Int J Biochem Cell Biol* 36, 1890-1909

Lehmann U, Kreipe H (2004): Real-Time PCR-Based Assay for Quantitative Determination of Methylation Status. *Methods Mol Biol* 287, 207-218

Lemaître V, D'Armiento J (2006): Matrix Metalloproteinases in Development and Disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78, 1-10

Li G-C, Zhang X, Pan T-J, Chen Z, Ye Z-Q (2006): Histone deacetylase inhibitor trichostatin A inhibits the growth of bladder cancer cells through induction of p21<sup>WAF1</sup> and G<sub>1</sub> cell cycle arrest. *Int J Urol* 13, 581-586

Lopez J, Percharde M, Coley HM, Webb A, Crook T (2009): The context and potential of epigenetics in oncology. *Br J Cancer* 100, 571-577

Lübbert M, Claus R (2007): Epigenetische Inaktivierung von Genexpression. *Onkologe* 13, 46-55

Mukhopadhyay NK, Weisberg E, Gilchrist D, Bueno R, Sugarbaker DJ, Jaklitsch MT (2006): Effectiveness of Trichostatin A as a Potential Candidate for Anticancer Therapy in Non – Small-Cell Lung Cancer. *Ann Thorac Surg* 81, 1034-1042.

Nakamura M, Ishida E, Shimada K, Kishi M, Nakase H, Sakaki T, Konishi N (2005): Frequent LOH on 22q12.3 and TIMP-3 inactivation occur in the progression to secondary glioblastomas. *Lab Invest* 85, 165-175

Nephew KP, Hui-Ming Huang T (2002): Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Lett* 190, 125-133

Noel A, Maillard C, Rocks N, Jost M, Chabottaux V, Sounni NE, Maquoi E, Catalso D, Foidart JM (2004): Membrane associated proteases and their inhibitors in tumor angiogenesis. *J Clin Pathol* 57, 577-584

Oka M, Rodic N, Graddy J, Chang L-J, Terada Naohiro (2005): CpG Sites Preferentially Methylated by Dnmt3a in Vivo. *J Biol Chem* 281, 9901-9908

Phé V, Cussenot O, Roupret M (2009): Interest of methylated genes as biomarkers in urothelial cell carcinomas of the urinary tract. *BJU Int* 104, 896-901

Pfaffl MW (2004): Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOSpektrum, Sonderausgabe PCR* 10, 92-95

Plumb JA, Strathdee G, Sludden J, Kaye SB, Brown R (2000): Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res* 60, 6039-6044

Pulukuri SM, Patibandla S, Patel J, Estes N, Rao JS (2007): Epigenetic inactivation of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) gene in human prostate tumors. *Oncogene* 26, 5229-5237

Razin A, Kantor B (2005): DNA Methylation in Epigenetic Control of Gene Expression. *Prog Mol Subcell Biol* 38, 151-167

Reuter VE (2006): The Pathology Of Bladder Cancer. *Urology* 67(3 Suppl 1), 11-17

Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA (2000): Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 10014-10019

Roach HI, Yamada N, Cheung KSC, Tilley S, Clarke NMP, Oreffo ROC, Kokubun S, Bronner F (2005): Association Between the Abnormal Expression of Matrix-Degrading Enzymes by Human Osteoarthritic Chondrocytes and Demethylation of Specific CpG Sites in the Promotor Regions. *Arthritis Rheum* 52, 3110-3124

Rosenberg JE, Hahn WC (2009): Bladder Cancer: modeling and translation. *Genes Dev* 23, 655-659

Rübber H (2007) Harnblasenkarzinom-Auftakt zur Artikel-Serie. *Dtsch Ärztebl* 104, 11, A 718

Saeb-Parsy K, Veerakumarasivam A, Wallard MJ, Thorne N, Kawano Y, Murphy G, Neal DE, Mills IG, Kelly JD (2008): MT1-MMP regulates urothelial cell invasion via transcriptional regulation of Dickkopf-3. *Br J Cancer* 99, 663-669

Sato N, Maehara N, Su GH, Goggins M (2003): Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine on Matrix Metalloproteinase Expression and Pancreatic Cancer Cell Invasiveness. *J Natl Cancer Inst* 95, 327-330

Seargent JM, Loadman PM, Martin SW, Naylor B, Bibby MC, Gill JH (2005) : Expression Of Matrix Metalloproteinase-10 In Human Bladder Transitional Cell Carcinoma. *Urology* 65, 815-820

Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, Kurdistani SK (2005): Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature* 435, 1262-1266

Shukeir N, Pakneshan P, Chen G, Szyf M, Rabbani SA (2006): Alteration of the Methylation Status of Tumor-Promoting Genes Decreases Prostate Cancer Cell Invasiveness and Tumorigenesis In vitro and In vivo. *Cancer Res* 66, 9202-9210

Smith LA, Otterson GA, Plass C (2007): Unraveling the epigenetic code of cancer for therapy. *Trends Genet* 23, 449-456.

Snoek van Beurden P A.M., Von den Hoff J W. (2005): Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 38, 73-83

Stamenkovic I (2003): Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J Pathol* 200, 448-464

Tetu B, Brisson J, Wang CS, Lapointe H, Beaudry G, Blanchette C, Trudel D (2006): The influence of MMP-14, TIMP-2 and MMP-2 expression on breast cancer prognosis. *Breast Cancer Res* 8(3):R28

Varga-Weisz P (2005): Chromatin Remodeling Factors and DNA Replication. *Prog Mol Subcell Biol* 38, 1-30

Vigushin DM, Ali S, Pace PE, Mirsaidi N, Ito K, Adcock I, Coombes RC (2001): Trichostatin A Is a Histone Deacetylase Inhibitor with Potent Antitumor Activity against Breast Cancer in Vivo. *Clin Cancer Res* 7, 971-976

Visse R, Nagase H (2003): Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases: Structure, Function, and Biochemistry. *Circ Res* 92, 827-839

Vom Dorp F, Kausch I, Jocham D (2007): Diagnostik und Therapie des nichtinvasiven Harnblasenkarzinoms. *Dtsch Arztebl* 104, 12, A797

Wallard MJ, Pennington CJ, Veerakumarasivam A, Burt G, Mills IG, Warren A, Leung HY, Murphy G, Edwards DR, Neal DE (2006): Comprehensive profiling and localisation of the matrix metalloproteinases in urothelial carcinoma. *Br J Cancer* 94, 569-577

Weiske J, Albring KF, Huber O (2007): The tumor suppressor Fhit acts as a repressor of  $\beta$ -catenin transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 104, 20344-20349

Yoo CB, Jones PA (2006): Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov* 5, 37-50

## **Danksagung**

Danken möchte ich Herrn PD Dr. Bernhard Hemmerlein für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit sowie für die geduldige Beantwortung meiner Fragen;

Dr. med. Tina Perske für die Überlassung des Themas und für die aufmunternden Worte;

der äußerst geduldigen Nicole Putzer für die aufgebrauchte Zeit und Geduld um mir die benötigten Methoden beizubringen;

sowie allen anderen TAs, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

## **Lebenslauf**

Geboren wurde ich am 28. April im Jahr 1982 in Krakau in Polen. Meine ersten vier Lebensjahre verbrachte ich in Krakau, danach ein Jahr in Australien und schließlich folgte im Jahre 1987 die Einreise nach Deutschland. In Bad Soden-Salmünster besuchte ich die Grundschule an der Salz, darauf folgte der Besuch der Henry-Harnischfeger-Gesamtschule im gleichen Ort und schließlich der Besuch der Oberstufe am Ulrich-von-Hutten-Gymnasium in Schlüchtern. Im Juni 2001 bestand ich mein Abitur und reiste danach für ein halbes Jahr nach Australien. Mein Medizinstudium begann ich im Sommersemester 2002 in Göttingen, wo ich bis zum Sommersemester 2008 studierte. Im Frühling 2006 begann ich mit den Laborarbeiten für die vorliegende Dissertation. Mein erstes Tertial des Praktischen Jahres absolvierte ich am Diakonie Krankenhaus in Bremen, die zwei folgenden Tertiale am St. Ansgar Krankenhaus in Höxter. Das Staatsexamen legte ich im Mai 2009 ab. Seit dem 01.10.09 bin ich am St. Johannis-Krankenhaus in Landstuhl in der Inneren Medizin als Ärztin in Weiterbildung tätig.