

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Biochemie

Epigenetisch relevante Proteine und ihre therapeutische Bedeutung für das Magenkarzinom

Kathrin I. A. Mutze

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ.-Prof. Dr. S. Weinkauff

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. A. Bacher, i.R.
2. apl. Prof. Dr. G. Keller
3. Univ.-Prof. Dr. M. Groll

Die Dissertation wurde am 25.01.2011 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 16.06.2011 angenommen.

Für meine Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	1
1 Einleitung	3
1.1 Das Magenkarzinom	3
1.1.1 Epidemiologie	3
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren	4
1.1.3 Pathologie und Klassifikation	5
1.1.4 Molekulare und genetische Alterationen	6
1.1.5 Multimodale Therapiekonzepte	8
1.2 Epigenetische Alterationen und ihre Rolle in der Tumorentstehung und Tumorprogression	12
1.2.1 Epigenetische Regulation und ihre physiologische Bedeutung	12
1.2.2 Epigenetische Veränderungen in malignen Zellen	15
1.2.3 Wichtige Effektoren der epigenetischen Regulation	18
1.2.3.1 DNA-Methyltransferasen	18
1.2.3.2 Histondeacetylasen	20
1.2.3.3 Polycombproteine	21
1.2.3.3.1 BMI-1	21
1.2.3.3.2 EZH2	21
1.2.4 Epigenetisch aktive Therapeutika	22
1.2.4.1 DNA-Methyltransferase-Inhibitoren	23
1.2.4.2 HDAC-Inhibitoren	24
1.3 Zielsetzung der Arbeit	26
2 Material	27
2.1 Tumormaterial	27
2.1.1 Gewebe	27
2.1.2 Präoperative Chemotherapie	28
2.1.3 Beurteilung des Therapieansprechens	28
2.1.4 Bestimmung des Gesamtüberlebens und der Nachbeobachtungszeit	28
2.2 Magenkarzinomzelllinien	29
2.3 Antikörper	32
2.3.1 Primärantikörper	32
2.3.2 Sekundärantikörper	33
2.4 Enzyme	33
2.5 Primer und Sonden	33
2.6 Größenstandards	35
2.7 Kommerzielle Analysesysteme und vorgefertigte Lösungen	35
2.8 Medien für die Zellkultur	36

2.9	Chemikalien	36
2.10	Zytostatika-Stocklösungen	38
2.11	Allgemeine Puffer und Lösungen	38
2.12	Verbrauchsmaterial	40
2.13	Geräte	41
2.14	Software	42
3	Methoden	44
3.1	Immunhistochemie	44
3.1.1	Durchführung der Färbung	44
3.1.2	Evaluierung der Färbung	46
3.2	Arbeiten mit Magenkarzinomzelllinien	47
3.2.1	Kultivierung und Passagieren von Zelllinien	47
3.2.2	Einfrieren und Auftauen von Zelllinien	48
3.2.3	Test auf Kontamination mit Mycoplasmen	48
3.2.4	Herstellung von Zellpellets	50
3.2.5	Chemosensitivitätsanalyse	51
3.2.5.1	Viabilitätsassay	51
3.2.5.1.1	Dosis-Wirkungs-Kurven und Bestimmung der IC ₅₀	51
3.2.5.1.2	Kombinationsbehandlung	53
3.2.5.1.3	Synergismus-Analyse der Kombinationsbehandlung	54
3.2.5.2	Koloniebildungstest	54
3.3	Molekularbiologische Methoden	55
3.3.1	Isolation von Nukleinsäuren	55
3.3.1.1	DNA Isolation	55
3.3.1.2	Aufreinigung von DNA	56
3.3.1.3	Isolation von RNA	56
3.3.2	cDNA Synthese aus Gesamt-RNA (Reverse Transkription)	57
3.3.3	Quantitative Real-Time PCR	59
3.3.3.1	Grundlagen der quantitativen Real-Time PCR mit <i>TaqMan</i> [®] -Sonden	59
3.3.3.2	Durchführung der Quantitativen Real-Time PCR	61
3.3.4	Methylierungsanalyse und Bestimmung von Kopienzahlveränderungen	63
3.3.4.1	Grundlagen der MS-MLPA Technik	63
3.3.4.2	Durchführung des MS-MLPA-Tests	67
3.3.5	Direkte Sequenzierung von DNA	68
3.4	Proteinbiochemische Methoden	68
3.4.1	Zellaufschluss zur Herstellung von Protein-Lysaten	68
3.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	69
3.4.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)	70
3.4.4	Übertragung von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blot)	71
3.4.5	Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen	71

3.5	Statistische Analyse	72
4	Ergebnisse	73
4.1	Prognostische und prädiktive Bedeutung der Expression epigenetisch relevanter Proteine in Magenkarzinomen	73
4.1.1	Klinisch-pathologische Charakteristika des Patientenkollektivs	73
4.1.2	Expression der Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2	75
4.1.2.1	Häufigkeiten und Assoziation der Expression mit klinisch-pathologischen Parametern	75
4.1.2.2	Assoziation der Expression mit dem Therapieansprechen	78
4.1.2.3	Assoziation der Expression mit dem Überleben	78
4.1.2.4	Kombination der HDAC1- und HDAC2-Expressionsdaten	80
4.1.2.5	HDAC1-Expression in korrespondierenden Resektaten	81
4.1.3	Expression der DNA-Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3b	82
4.1.3.1	Häufigkeiten und Assoziation der Expression mit klinisch-pathologischen Parametern	82
4.1.3.2	Assoziation der Expression mit dem Therapieansprechen	85
4.1.3.3	Assoziation der Expression mit dem Überleben	86
4.1.3.4	Assoziation der DNMT-Expression mit dem Methylierungsstatus	88
4.1.3.5	Kombination der DNMT1- und DNMT3-Expressionsdaten	89
4.1.4	Expression der Polycombproteine BMI1 und EZH2	89
4.1.4.1	Häufigkeiten der Expression und Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern	90
4.1.4.2	Assoziation der Expression mit dem Ansprechen	92
4.1.4.3	Assoziation mit dem Überleben	92
4.2	<i>In vitro</i> Untersuchung der prädiktiven Bedeutung der HDAC- und DNMT-Expression und Evaluation epigenetischer Therapiekonzepte für das Magenkarzinom	94
4.2.1	Charakterisierung von Magenkarzinomzelllinien	94
4.2.1.1	Proliferationsverhalten der Magenkarzinomzelllinien	94
4.2.1.2	Ermittlung des Methylierungsstatus und der Kopienzahlveränderungen der Magenkarzinomzelllinien	95
4.2.1.3	Chemosensitivität der Magenkarzinomzelllinien gegenüber den Chemotherapeutika Cisplatin und 5-FU	98
4.2.2	Chemosensitivität der Magenkarzinomzelllinien gegenüber epigenetisch aktiven Chemotherapeutika	100
4.2.2.1	Chemosensitivität gegenüber den HDAC-Inhibitoren SAHA und VPA	100
4.2.2.1.1	HDAC-Inhibitoren als Einzelsubstanzen	100
4.2.2.1.2	Kombination von Cisplatin mit dem HDAC-Inhibitor SAHA	102
4.2.2.1.3	Assoziation von Chemosensitivität und HDAC-Expression	104
4.2.2.2	Chemosensitivität gegenüber den DNMT-Inhibitoren DAC und Zebularin	105
4.2.2.2.1	DNMT-Inhibitoren als Einzelsubstanzen	105
4.2.2.2.2	Kombination von Cisplatin mit dem DNMT-Inhibitor DAC	107
4.2.2.2.3	Assoziation von Chemosensitivität und DNMT-Expression	108

4.2.2.2.4	Einfluss von DNMT-Inhibitoren auf die Methylierungsrate der Zelllinien MKN28 und AGS	111
4.2.2.2.5	Einfluss von DAC auf die Expression von DNMT1	116
4.2.3	Herabregulation der DNMT1-Expression in der Magenkarzinomzelllinie AGS	117
4.2.3.1	Einfluss der DNMT1-Herabregulation auf die Proliferation von AGS Zellen	119
4.2.3.2	Einfluss der DNMT1-Herabregulation auf die Chemosensitivität von AGS Zellen	120
4.2.3.2.1	Chemosensitivität gegenüber einzelnen Chemotherapeutika	120
4.2.3.2.2	Kombination von Cisplatin mit dem DNMT-Inhibitor DAC	122
4.2.3.2.3	Methylierungsrate nach DAC Behandlung in Zellen mit herabregulierter DNMT1-Expression	124
5	Diskussion	125
5.1	DNA-Methyltransferasen	125
5.1.1	Bedeutung von DNMT1 und DNMT3b als prädiktive und prognostische Biomarker	125
5.1.2	Potentielle Integration von DNMT-Inhibitoren in die Behandlung von Magenkarzinompatienten	133
5.2	Histondeacetylasen	136
5.2.1	Bedeutung von HDAC1 und HDAC2 als prädiktive und prognostische Biomarker	136
5.2.2	Potentielle Integration von HDAC-Inhibitoren in die Behandlung von Magenkarzinompatienten	138
5.3	Polycombproteine	141
5.4	Ausblick	143
6	Literaturverzeichnis	145
	Abkürzungsverzeichnis	167
	Abbildungsverzeichnis	170
	Tabellenverzeichnis	172
	Publikationen	174
	Danksagung	175

ZUSAMMENFASSUNG

Das Magenkarzinom ist durch eine hohe Mortalitätsrate gekennzeichnet. Durch den Einsatz einer neoadjuvanten (präoperativen) Behandlung, basierend auf den Chemotherapeutika Cisplatin und 5-Fluorouracil (5-FU), kann eine signifikante Verbesserung der Überlebensraten erzielt werden, wobei jedoch eine relativ geringe Ansprechrate der Patienten beobachtet wird. Daher ist es von größter Bedeutung Biomarker zu identifizieren, die das Ansprechen auf die Therapie vorhersagen können, und darüber hinaus alternative Therapiestrategien zu entwickeln.

Epigenetische Alterationen, die DNA-Methylierung und Histonmodifikationen betreffen, sind eng mit der humanen Karzinogenese verbunden. Sie verändern die Chromatinstruktur und damit die Transkription und können den Effekt DNA-schädigender Chemotherapeutika beeinflussen.

Daher war es Ziel dieser Arbeit, anhand von prätherapeutischen Tumorproben, die prognostische und prädiktive Bedeutung der Expression epigenetischer Effektorproteine wie DNA-Methyltransferasen (DNMTs), Histondeacetylasen (HDACs) und Polycombproteine für neoadjuvant chemotherapierte Magenkarzinome zu untersuchen. Auffällige Proteine sollten anschließend in einem *in vitro* Modell auf einen funktionellen Zusammenhang mit der Chemosensitivität überprüfen werden. Darüber hinaus sollte an Magenkarzinomzelllinien die potentielle Anwendbarkeit von epigenetisch aktiven Chemotherapeutika wie DNA-Methyltransferase-Inhibitoren und Histondeacetylase-Inhibitoren als alternative Therapieoptionen für Magenkarzinompatienten analysiert werden.

In der tumorspezifischen Analyse wurde in 83 % (105/127) der untersuchten prätherapeutischen Tumorbiopsien eine hohe Expression von DNMT1 und in 62 % (79/127) eine hohe Expression von DNMT3b festgestellt. Patienten mit niedriger DNMT1-Expression zeigten ein signifikant besseres Überleben ($P = 0,001$) und Therapieansprechen sowohl basierend auf einer histopathologischen ($P = 0,037$) als auch auf einer klinischen ($P = 0,008$) Evaluation. Die Expressionsanalyse von DNMT3b lieferte keine Hinweise auf eine prognostische oder prädiktive Bedeutung des Proteins.

Im *in vitro* Modell resultiert eine shRNA vermittelte Herabregulation der DNMT1-Expression in der Magenkarzinomzelllinie AGS in einer signifikanten Reduktion der Koloniebildungskapazität nach Cisplatin-Behandlung sowie einer signifikant reduzierten Zellviabilität durch Cisplatin in Gegenwart einer geringen Menge des DNMT-Inhibitors DAC (5-Aza-2'-deoxycytidin). Dies weist auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen DNMT1-Expression und Chemosensitivität hin. Eine Kombinationsbehandlung der Cisplatin-resistenten Zelllinie AGS mit beiden Substanzen führte zu einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität, basierend auf einem synergistischen Effekt. Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, dass DNMT1 als prognostischer und prädiktiver Biomarker von Bedeutung ist und darüber hinaus auch eine vielversprechende therapeutische Zielstruktur darstellen könnte.

Bezüglich der Histondeacetylasen wurde eine hohe Expression von HDAC1 und HDAC2 in 54 % (69/127) bzw. 85 % (108/127) der Tumoren detektiert. Diese war nicht mit dem Überleben und dem Ansprechen auf die Chemotherapie assoziiert. Es zeigte sich jedoch eine signifikante Assoziation einer hohen HDAC1-Expression mit einem schlechteren Überleben ($P = 0,005$) in der Subgruppe der auf die Therapie ansprechenden Patienten. Die Bestimmung der HDAC1-Expression könnte daher für die Risikobewertung in dieser Patientengruppe von Interesse sein. *In vitro* führte eine sequenzielle Behandlung von Magenkarzinomzelllinien mit dem HDAC-Inhibitor SAHA (Suberoylanilide-Hydroxamsäure) und Cisplatin, unabhängig von der ursprünglichen Cisplatin-Sensitivität, zu einer synergistischen Reduktion der Zellviabilität. Aus diesem Grund erscheint es sinnvoll auch eine Integration von HDAC-Inhibitoren in neue Chemotherapieschemata für die Behandlung von Magenkarzinompatienten in Erwägung zu ziehen.

Für die Expression der Polycombproteine BMI-1 und EZH2 wurde in dieser Arbeit keine prognostische oder prädiktive Wertigkeit nachgewiesen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass eine verstärkte Expression epigenetisch relevanter Proteine häufig in Magenkarzinomen zu beobachten ist. In der hier vorgelegten Arbeit konnte DNMT1 sowohl als potentieller prognostischer und prädiktiver Biomarker als auch als vielversprechende Zielstruktur für die Behandlung von Magenkarzinomen identifiziert werden. Die Ergebnisse unterstützen eine weiterführende Evaluation von DNMT1 in präklinischen und klinischen Studien.

1 EINLEITUNG

1.1 Das Magenkarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Magenkarzinom gehört weltweit zu einer der häufigsten Tumorerkrankungen. Betrachtet man die Inzidenz unabhängig des Geschlechts, so ist es mit weltweit 989.000 Neuerkrankungen im Jahr 2008, was 8,7 % aller Krebsneuerkrankungen entspricht, die vierthäufigste Tumorentität nach Lungen-, Mamma-, und Kolorektalkarzinomen. Dabei befindet sich das Magenkarzinom bei Männern auf Platz drei hinter Lungen- und Prostatakarzinomen und bei Frauen auf Platz fünf hinter Mamma-, Kolorektal-, Cervix-, und Lungenkarzinomen (Ferlay *et al.*, 2010). Die altersstandardisierten Inzidenzraten zeigen, dass Männer ca. doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen. Das Erkrankungsalter liegt bei den meisten Patienten zwischen 50 und 70 Jahren (Vogiatzi *et al.*, 2007). Geographisch ist die Verteilung des Magenkarzinoms durch große Variabilität gekennzeichnet. Als Hochrisikogebiete gelten Ostasien (China, Japan), Osteuropa und Teile Zentral- und Südamerikas, wohingegen in Südasien, Nord- und Ostafrika, Nordamerika, Australien und Neuseeland die Inzidenzraten sehr niedrig sind (Ferlay *et al.*, 2010). Diese Unterschiede in den Inzidenzraten haben eine starke umweltbedingte Komponente. Dies zeigt sich daran, dass Migranten, die aus Hochrisikogebieten in Gebiete mit niedrigem Risiko umsiedeln, in Abhängigkeit ihres Alters, mit einer verminderten Wahrscheinlichkeit ein Magenkarzinom entwickeln (Parkin *et al.*, 2005). Meist wird das Magenkarzinom aufgrund seines zunächst asymptomatischen Verlaufes erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, wodurch nur noch begrenzte Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung stehen (Catalano *et al.*, 2009; Correa, 2004). Dies führt zu der hohen Mortalitätsrate, durch die das Magenkarzinom gekennzeichnet ist. Jährlich sind 738.000 Todesfälle auf diese Tumorentität zurückzuführen, wodurch das Magenkarzinom in der Gesamtbevölkerung die zweithäufigste Ursache für einen

tumorbedingten Todesfall darstellt (Ferlay *et al.*, 2010). Die 5-Jahres-Überlebensrate liegt weltweit bei nur ca. 25 % (Kamangar *et al.*, 2006).

1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Zu den exogenen Faktoren, welche die Entstehung eines Magenkarzinoms begünstigen, gehören Ernährungsgewohnheiten, wie der Genuss von salz- und nitrithaltigen Lebensmitteln (Palli, 2000; Wang *et al.*, 2009b). Auch Alkohol- und Tabakkonsum sowie Fettleibigkeit, vor allem jedoch eine chronische Infektion mit dem gram-negativen Bakterium *Helicobacter pylori*, zählen zu den Risikofaktoren (Catalano *et al.*, 2009; Crew *et al.*, 2006; Forman *et al.*, 2006; Kelley *et al.*, 2003). Obwohl die große Mehrheit der Magenkarzinome sporadisch auftritt lässt sich bei ca. 10 % der Fälle eine familiäre Anhäufung feststellen (Vogiatzi *et al.*, 2007). Dabei wird angenommen, dass 1-3 % auf das *hereditary diffuse gastric cancer syndrome* (HDGC) zurückzuführen sind (Fitzgerald *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2005). Dieses Syndrom ist durch das Auftreten von Magenkarzinomen des diffusen Typs gekennzeichnet und zusätzlich mit einem erhöhten Risiko für die Erkrankung an einem lobulären Mammakarzinom verbunden (Becker *et al.*, 2010). Als molekulare Ursache dieser Erkrankung wurde eine Keimbahnmutation des Zelladhäsionsmoleküls *CDH1* (E-Cadherin) zum ersten Mal in drei Maori-Familien festgestellt (Guilford *et al.*, 1998). Nach heutigem Erkenntnisstand liegt die Wahrscheinlichkeit an einem Magenkarzinom zu erkranken sowohl für weibliche als auch für männliche Träger dieser Keimbahnmutation bei ca. 80 % (Fitzgerald *et al.*, 2010). Das Magenkarzinom ist jedoch auch als eine Manifestation verschiedener anderer hereditärer Krebs-Syndrome bekannt, wie beispielsweise dem hereditären nicht-polypösen kolorektalen Karzinom (HNPCC), dem Li-Fraumeni Syndrom, oder der familiären adenomatösen Polyposis (FAP) (Becker *et al.*, 2010; OMIM-Datenbank; Vogiatzi *et al.*, 2007).

Die Inzidenz des Magenkarzinoms hat sich in den letzten Jahrzehnten verringert (Bertuccio *et al.*, 2009). Die Gründe für diesen Rückgang sind noch nicht völlig aufgeklärt, aber der verringerte Verzehr von salz- und nitrithaltigen Lebensmitteln, die größere Verfügbarkeit von frischen Früchten und Gemüse, aber auch die Reduktion der Fälle von chronischer *H. pylori* Infektion aufgrund von verbesserten Hygiene-

bedingungen und der Verfügbarkeit von Antibiotika scheinen eine tragende Rolle zu spielen (Crew *et al.*, 2006; Jemal *et al.*, 2010).

1.1.3 Pathologie und Klassifikation

Bei ca. 90 % der bösartigen Tumoren des Magens handelt es sich um Adenokarzinome, also um Tumoren, die aus dem Drüsenepithel der Magenschleimhaut hervorgehen (Milne *et al.*, 2007). Sie entstehen durch sukzessive Veränderungen der normalen Mukosa und können in unterschiedlichen histologischen Erscheinungsformen auftreten. Für die histopathologische Klassifikation der Adenokarzinome des Magens wurden verschiedene Systeme vorgeschlagen, wobei die am häufigsten angewendeten Systeme die Klassifikation nach Lauren und die Klassifikation der WHO (*World Health Organisation*) darstellen.

Die Lauren-Klassifikation beruht auf der mikroskopischen Morphologie der Tumoren (Lauren, 1965). Dabei wird zwischen Tumoren des intestinalen und des diffusen Typs unterschieden, wobei sich beide histologischen Typen ebenfalls durch unterschiedliche klinische und epidemiologische Charakteristika auszeichnen (Satoh *et al.*, 2007). Die Veränderungen, die zum besser differenzierten intestinalen Typ führen, der in einer drüsigen, meist gut abgegrenzten Form in das Magenlumen hineinwächst, sind dabei bisher besser verstanden. Hierbei führt eine atrophische Gastritis zur Entstehung einer intestinalen Metaplasie, wobei sich das Risiko der Weiterentwicklung zu einer intraepithelialen Neoplasie und zuletzt zu einem Karzinom proportional zur Fläche der von der intestinalen Metaplasie betroffenen Magenschleimhaut verhält (Catalano *et al.*, 2009; Stemmermann, 1994). Der diffuse Typ hingegen besteht aus nicht-kohäsiven Zellen, die infiltrativ in die Magenwand wachsen, wodurch ein schlecht abgegrenzter und undifferenzierter Tumor entsteht (Lauren, 1965). Neben den rein intestinalen oder diffusen Adenokarzinomen wird auch das Auftreten von Mischformen beobachtet, die Tumorzellen beider histologischer Typen beinhalten.

Gemäß der WHO werden Adenokarzinomen des Magens aufgrund ihres histologischen Wachstumsmusters in vier unterschiedliche Subgruppen eingeteilt. Es wird dabei zwischen tubulären, papillären und muzinösen Adenokarzinomen sowie dem Siegelringzellkarzinom unterschieden (Hamilton *et al.*, 2000).

Die Stadieneinteilung der Tumoren erfolgt durch die TNM-Klassifikation, bei der die Ausdehnung des Primärtumors (T) und das Fehlen oder Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen (N) und Fernmetastasen (M) bestimmt wird.

1.1.4 Molekulare und genetische Alterationen

Ca. 90 % der Magenkarzinome treten sporadisch, aufgrund von umweltbedingten Faktoren auf. Bei der Entstehung handelt es sich um einen mehrstufigen Prozess, bei dem multiple genetische Alterationen von Onkogenen und Tumorsuppressorgenen zur Entstehung und Progression beitragen. Dabei sind unter anderem Gene der Zell-Zyklus-Kontrolle, der DNA-Reparatur, der Zelladhäsion und der Differenzierung betroffen, sowie auch Gene, die für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren kodieren (Tahara, 2004; Yasui *et al.*, 2000). Auch genetische Instabilität und die Aktivierung des Telomerasegens tragen zum Prozess der Tumorentstehung im Magen bei (Panani, 2008). Es lässt sich feststellen, dass besondere Kombinationen dieser genetischen Alterationen in den beiden, gemäß der Lauren-Klassifikation definierten, histologischen Subtypen (siehe 1.1.3) des Magenkarzinoms variieren (Becker *et al.*, 2010; Keller *et al.*, 2005; Tahara, 2004).

Das Auftreten einer Mikrosatelliten-Instabilität (MSI) wird allgemein als eine der frühesten Veränderungen in der Karzinogenese betrachtet. Bei der MSI kommt es nach spontanen DNA-Replikationsfehlern zu Längenveränderungen von Nukleotid-Wiederholungen unter anderem in den codierenden Regionen tumorrelevanter Gene. Ein Beispiel hierfür ist die Längenveränderung einer Mononukleotid-Wiederholung bei *TGF- β 2* (*transforming growth factor β Receptor 2*), der in der Vermittlung von wachstumseinschränkenden Signalen und Apoptose eine Rolle spielt (Pinto *et al.*, 2003). Die Entstehung der MSI ist dabei auf den Verlust der Expression der Mismatch-Reparatur-Gene *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* oder *PMS2* zurückzuführen und ist bei ca. 20 % der Magenkarzinome zu finden, wobei sie deutlich öfter bei Tumoren des intestinalen Typs vorkommt (Becker *et al.*, 2010; Buonsanti *et al.*, 1997; dos Santos *et al.*, 1996; Keller *et al.*, 1995).

Zu den mit Magenkarzinomen assoziierten Onkogenen gehört das *c-met* Gen, das für den transmembranen Tyrosinkinase-Rezeptor für HGF (*hepatocyte growth factor*) kodiert,

sowohl in diffusen als auch intestinalen Tumoren amplifiziert ist und mit der Anwesenheit von Lymphknotenmetastasen und der Tiefe der Tumorinvasion korreliert (Arkenau, 2009; Kuniyasu *et al.*, 1993). Spezifisch für den diffusen Typ scheint die Amplifikation des Onkogens *K-sam* (*KATO-III cell derived stomach cancer amplified gen*) zu sein (Hattori *et al.*, 1990). Eine Amplifikation des Onkogens *c-erbB2* hingegen, welches für die Rezeptortyrosinkinase HER2/neu (*human epidermal growth factor receptor 2*) kodiert und einen Marker für Invasion und Lymphknotenbefall darstellt, ist in intestinalen, nicht aber in diffusen Magenkarzinomen zu finden (Kim *et al.*, 2007; Yonemura *et al.*, 1991).

Auch Allelverluste (LOH; *loss of heterozygosity*) in den chromosomalen Regionen 1p, 5q, 7q, 11p, 13q, 17p und 18q werden in einer Vielzahl von Magenkarzinomen festgestellt, wodurch es zum Verlust von verschiedenen Tumorsuppressorgenen kommt (Panani, 2008; Vogiatzi *et al.*, 2007). Ein Beispiel hierfür ist das vermutlich bekannteste Tumorsuppressorgen *TP53*, welches häufig durch LOH oder Mutationen innerhalb des Gens inaktiviert ist, wodurch die wichtige Funktion des Proteins p53 als Zellzyklusregulator und „Wächter des Genoms“ verloren geht (Wu *et al.*, 2010). Mutationen des Zelladhäsionsmoleküls E-Cadherin spielen auch in sporadischen Magenkarzinomen eine Rolle. In ca. 40-50 % der sporadischen Magenkarzinome des diffusen Typs werden E-Cadherin Mutationen detektiert, in Tumoren des intestinalen Typs sind diese jedoch nicht zu finden.

Neben dem Verlust oder der Mutation verschiedener Tumorsuppressorgene ist aber auch die epigenetische Inaktivierung solcher Gene beschrieben, worauf in Abschnitt 1.2 genauer eingegangen wird.

In Abb. 1.1 sind, geordnet nach ihrem Auftreten in bestimmten Tumorstadien, verschiedene molekulare Veränderungen des intestinalen und diffusen Magenkarzinoms zusammengefasst.

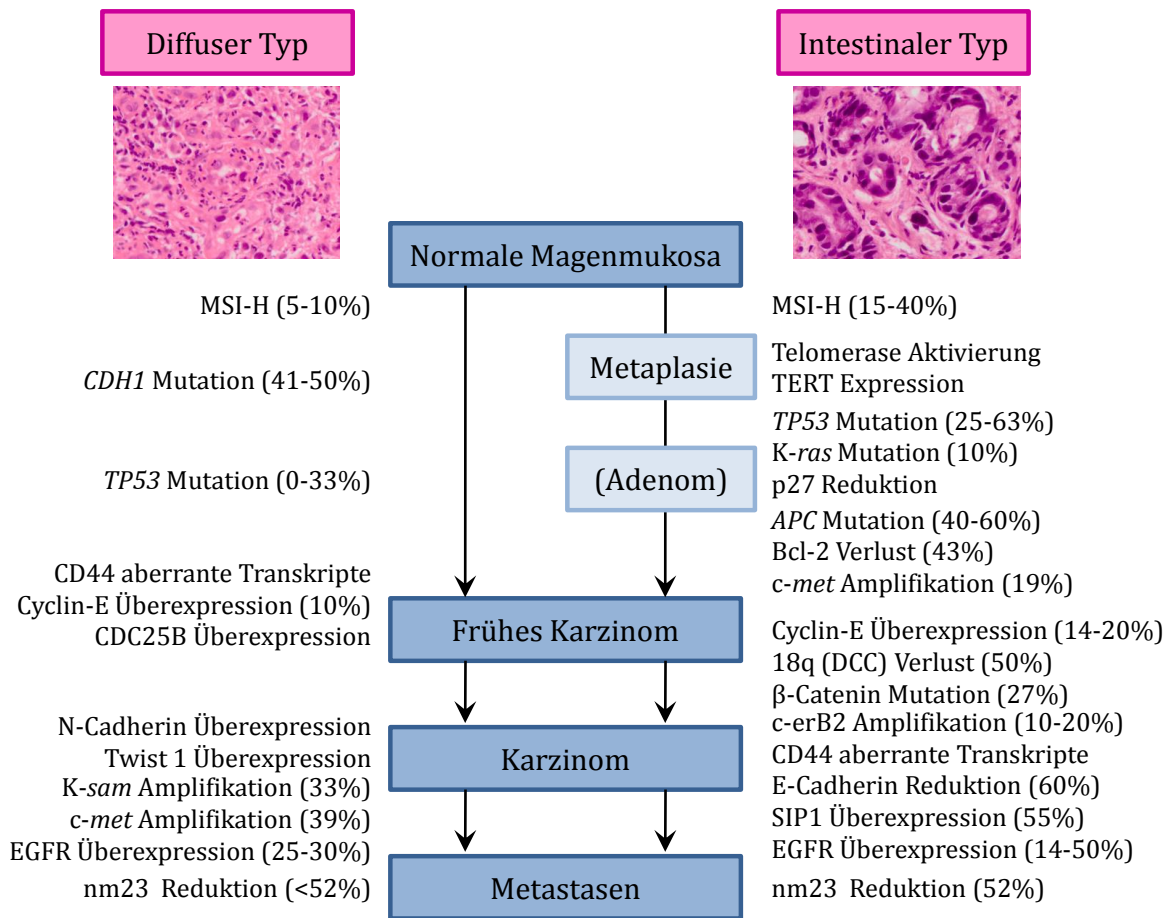


Abb. 1.1: Genetische Alterationen des Magenkarzinoms. Die molekularen Veränderungen unterscheiden sich zwischen den beiden histologischen Typen des Magenkarzinoms. Die Veränderungen (Mutation, Überexpression, Amplifikation) sind nach ihrem Auftreten in bestimmten Stadien der Tumorentwicklung geordnet. Der Prozentsatz in Klammern stellt die beobachtete Häufigkeit der Alterationen dar. Abkürzungen: APC, adenomatous polyposis coli; Bcl-2, B-cell CLL/lymphoma 2; CD44, CD44 antigen; CDC25B, cell division cycle 25B; CDH1, E-Cadherin; c-erbB2, v-erb-b2 erythroblastic leukaemia viral Onkogene homologue 2; c-met, met proto-Onkogene (hepatocyte growth factor receptor); DCC, deleted in colon cancer; EGFR, epidermal growth factor receptor; K-ras, v-Kiras2 Kirsten rat sarcoma viral Onkogene homologue; K-sam, encodes fibroblast growth factor receptor 2; MSI-H, microsatellite instability-high; nm23, nonmetastatic cells 1 (protein, NM23, expressed in); p53, tumour protein p53 (Li-Fraumeni syndrome); SIP1, SMAD-interacting protein 1; TERT, telomerase reverse transcriptase; TWIST1, twist homologue 1. Modifiziert nach Keller et al., 2005.

1.1.5 Multimodale Therapiekonzepte

In den westlichen Ländern der Welt wird das Magenkarzinom bei einem Großteil der Patienten erst in einem lokal fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert. Sogar nach der chirurgischen Entfernung des kompletten Tumors (R0 Resektion) tritt bei ca. einem Drittel der Patienten nach 2 bis 3 Jahren ein Rezidiv auf und die 5-Jahres Überlebensrate beträgt nur ca. 25 % (Catalano et al., 2009; Ott et al., 2003a). Um die Prognose der

Patienten mit lokal fortgeschrittenem Magenkarzinom zu verbessern, wurden in den letzten Jahren verstärkt präoperative Therapiestrategien entwickelt. Dabei wurde in verschiedenen Phase-II und -III Studien die Wirkung einer neoadjuvanten (präoperativen) Chemotherapie untersucht, wobei gezeigt werden konnte, dass diese Behandlung mit einer akzeptablen Toxizität für die Patienten einhergeht und keine erhöhte postoperative Sterberate zur Folge hatte. Zudem konnte die Rate der Komplettresektionen durch die Verkleinerung der Tumoren (*down-staging*) erhöht werden (Ajani *et al.*, 1991; Kelsen, 1996; Lordick *et al.*, 2005). Es wurde festgestellt, dass durch die Anwendung eines Behandlungsschemas, basierend auf den Chemotherapeutika Cisplatin und 5-Fluorouracil (5-FU), eine signifikante Verbesserung der Überlebensraten erzielt werden kann (Cunningham *et al.*, 2006). Daher wird diese Therapie häufig bei lokal fortgeschrittenen Magenkarzinomen eingesetzt, wobei jedoch eine relativ geringe Ansprechrate zwischen 20 und 40 % beobachtet wird. (Cunningham *et al.*, 2006; Lowy *et al.*, 1999; Ott *et al.*, 2003a; Schuhmacher *et al.*, 2001).

Cisplatin, eines der ältesten in der Behandlung von Krebserkrankungen eingesetzten Chemotherapeutika, wird intravenös verabreicht und wird sowohl durch passive Diffusion (Gately *et al.*, 1993) als auch durch aktiven Transport in Zellen aufgenommen (Ishida *et al.*, 2002). Durch die im Vergleich zum Blutstrom in der Zelle geringere Salzkonzentration werden die Chlorliganden von Cisplatin durch H₂O ersetzt (Hydrolyse), wodurch ein reaktives, positiv geladenes Molekül entsteht. Dies bewirkt durch die präferentielle Interaktion mit der nukleophilen N7 Position der Purinbasen die Entstehung von hauptsächlich DNA-intra-Strang-Addukten zwischen zwei Guaninbasen (Crul *et al.*, 2002). Zusätzlich kann Cisplatin auch die Quervernetzungen der DNA mit Proteinen verursachen. Die Schädigung der DNA wird dabei in der Zelle unter Beteiligung verschiedener Proteine registriert, die an der Nukleotid-Exzisions-Reparatur (NER) und der Mismatch-Reparatur (MMR) beteiligt sind. Auch DNA abhängige Kinasen und die Gruppe der HMG-Proteine (*high mobility group proteins*) spielen eine Rolle und sind letztendlich an der Induktion von Apoptose beteiligt (Eastman, 1990; Siddik, 2003). Der andere Hauptbestandteil der neoadjuvanten Chemotherapie ist 5-FU, ein Nukleosidanalogen aus der Klasse der Antimetabolite, welches ebenfalls schon lange in der Krebstherapie eingesetzt wird. Dabei wird 5-FU nach der Aufnahme in die Zelle in das aktive Metabolit 5-Fluoro-2-desoxyuridin-

Monophosphat (FdUMP) umgewandelt welches einen Suizidinhibitor der Thymidylatsynthase (TS) darstellt. Die TS katalysiert die Umwandlung von Desoxyuridin-Monophosphat (dUMP) zu Desoxythimidin-Monophosphat (dTMP), was einen entscheidenden Schritt in der Nukleinsäurebiosynthese darstellt. In Anwesenheit von FdUMP entsteht ein stabiler Komplex zwischen der TS und dem aktiven 5-FU Metaboliten, was zu Inhibierung der TS und damit der *de novo* Synthese von Pyrimidinen führt. Dadurch kommt es zur Hemmung der DNA-Synthese und DNA-Reparatur und anschließend zur Einleitung der Apoptose (Longley *et al.*, 2003; Mader *et al.*, 1998; Pinedo *et al.*, 1988). In Abb. 1.2 sind die Strukturformeln der beiden Zytostatika Cisplatin und 5-FU gezeigt.

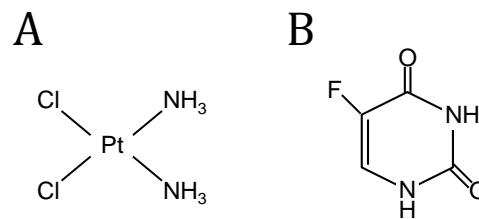


Abb. 1.2: Strukturformeln der in der neoadjuvanten Chemotherapie des Magenkarzinoms eingesetzten Zytostatika Cisplatin (A) und 5-FU (B).

Aufgrund der relativ geringen Ansprechrate auf die neoadjuvante auf Cisplatin und 5-FU basierende Chemotherapie ist die Identifikation von Biomarkern, die das Ansprechen vorhersagen können von großer Bedeutung. Verschiedene Studien haben sich bereits mit dieser Problematik auseinandergesetzt, wobei Marker untersucht wurden, die mit der Wirkung der Chemotherapeutika in Zusammenhang stehen. Es wird beispielsweise angenommen, dass eine niedrige intrinsische Expression der an der NER beteiligten Gene *ERCC1*, *ERCC2* und *ERCC4* wichtig für die optimale Wirkung von Cisplatin ist und damit eine Sensitivität gegenüber diesem Therapeutikum vorhersagen kann. Allerdings sind die Daten zur Vorhersagekraft in einem neoadjuvanten Therapieschema bisher inkonsistent (Fareed *et al.*, 2009; Keller *et al.*, 2008). Für *GADD45*, ein Gen, welches an der Kontrolle des Zellzyklusarrest durch Cisplatin induzierte DNA-Schäden beteiligt ist, konnten in einer Studie Hinweise für eine Assoziation von niedriger Expression mit einem besseren Ansprechen auf die Therapie gezeigt werden. Auch zur Expression von Genen, welche am 5-FU-Stoffwechsel beteiligt sind, wie die Thymidylatsynthase (TS), die Dihydropyrimidin-Dehydrogenase (DPD) und die Thymidin-Phosphorylase (TP), sind

verschiedene Studien in der Literatur vorhanden. Dabei stellt die TS das am besten untersuchte Gen im 5-FU-Stoffwechsel dar. Es konnte in der Mehrzahl der Studien gezeigt werden, dass eine niedrige Expression des Proteins bzw. das Vorhandensein eines zu einer niedrigen Expression führenden Genpolymorphismus mit einem besseren Ansprechen auf die Chemotherapie assoziiert ist (Fareed *et al.*, 2009; Keller *et al.*, 2008). Interessanterweise konnte auch eine erhöhte LOH-Rate, die auf genetische Instabilität hinweist, in neoadjuvant behandelten Magenkarzinompatienten mit einem besseren Ansprechen auf die Therapie assoziiert werden (Keller *et al.*, 2008). Bisher wird allerdings keiner dieser Marker aufgrund der teils inkonsistenten Daten und der fehlenden Standardisierung der Analysen in der klinischen Praxis eingesetzt.

Neben der neoadjuvanten chemotherapeutischen Behandlung von Magenkarzinompatienten wird auch eine neoadjuvante Radiotherapie in verschiedenen Studien untersucht, wobei hier bisher aufgrund von limitierten Daten noch keine Aussage über die eindeutige Wirksamkeit getroffen werden kann (Rajdev, 2010).

Für die Behandlung von fortgeschrittenen, metastasierten Magenkarzinomen, die nicht mehr resezierbar sind, werden ebenfalls verschiedene chemotherapeutische Behandlungsstrategien angewendet. Außerdem werden neuartige Therapiestrategien entwickelt, die gezielt auf spezielle Veränderungen in den jeweiligen Tumoren einwirken sollen und als *targeted therapy* bezeichnet werden (Kim *et al.*, 2010). Die Integration des monoklonalen Antikörpers *Trastuzumab (Herceptin)* in das Chemotherapieschema für die Behandlung fortgeschrittener, metastasierter Magenkarzinome ist die erste und bisher einzige Anwendung einer gezielten Tumorthherapie beim Magenkarzinom. Mit dem Antikörper, der gegen die Rezeptortyrosinkinase HER2 gerichtet ist, werden Patienten behandelt, bei denen eine Proteinüberexpression oder eine Genamplifikation von HER2 nachgewiesen werden konnte. Bisher wurde das Medikament nur zur Behandlung metastasierter Mammakarzinome eingesetzt, es konnte aber in einer internationalen randomisierten Phase-III Studie (*ToGA-Studie*) auch eine Verbesserung der Prognose von bereits Metastasen aufweisenden Magenkarzinompatienten nachgewiesen werden, was anschließend zur Zulassung in der klinischen Praxis geführt hat (Bang *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010). Auch die Beeinflussung des EGFR-Signalwegs in metastasierten Magenkarzinomen durch die Kombination der chemotherapeutischen Behandlung mit dem monoklonalen Antikörper *Cetuximab* wird

momentan in verschiedenen Phase-II und Phase-III Studien untersucht (Arkenau, 2009; Kim *et al.*, 2010; Lordick *et al.*, 2010).

1.2 Epigenetische Alterationen und ihre Rolle in der Tumor-entstehung und Tumorprogression

In den letzten Jahrzehnten hat sich die Tatsache etabliert, dass das Genom aus zwei Arten der Information besteht. Zum einen aus der genetischen Information, die durch die Abfolge der Basen in der DNA bestimmt wird und zum anderen aus der epigenetischen Information. Der Begriff Epigenetik definiert dabei alle vererbba- ren Veränderungen der Genexpression, die nicht auf eine Veränderung der DNA-Sequenz zurückzuführen sind (Holliday, 1987). Die epigenetische Information ist ein der DNA-Sequenz übergeordneter Regulationsmechanismus der Genexpression, der teils auf der Methylierung von DNA und teils auf posttranslationalen Modifikationen der DNA- assoziierten Histonproteine beruht.

1.2.1 Epigenetische Regulation und ihre physiologische Bedeutung

Während der Entwicklung und Differenzierung eines Organismus sind dessen Zellen morphologischen und funktionellen Veränderungen unterworfen, ohne dass eine Veränderung der DNA-Sequenz stattfindet. Erste Hinweise über die Regulation dieser Prozesse lieferte die Beobachtung, dass die Aktivität von Genen mit dem Methylierungs- status der betreffenden Promotorregion korreliert (Schapira, 1983). Dabei war eine verstärkte Methylierung mit einer verminderten Expression verbunden. DNA- Methylierung, die eine Ebene der epigenetischen Regulation darstellt, ist eine postreplikative, kovalente Modifikation der DNA mit einer Methylgruppe (CH₃), die in Eukaryonten ausschließlich an der C5 Position von Cytosinen vorkommt und dabei überwiegend bei Cytosinen, auf die eine Guaninbase folgt (Bird, 2002). Diese werden als CpG-Dinukleotide bezeichnet und kommen nicht zufällig über das Genom verteilt vor, sondern treten gehäuft als sogenannte CpG-Inseln in den Promotorregionen von 40- 60 % aller humaner Gene auf (Craig *et al.*, 1994; Herman *et al.*, 2003; Weber *et al.*, 2007). Die Übertragung der Methylgruppe auf das Cytosin erfolgt durch DNA-Methyl-

transferasen (DNMTs) unter der Verwendung von S-Adenosylmethionin (SAM) als Methylgruppen-Donor (Holliday, 1990) (siehe Abb. 1.3). Verglichen mit den CpG-Dinukleotiden des Großteils der genomischen DNA, die stark methyliert vorliegen, sind die CpG-Dinukleotide der CpG-Inseln meist unmethyliert, wodurch die Expression dieser Gene stattfinden kann (Baylin, 2005; Bird, 2002). Ausnahmen sind dabei einige gewebespezifische Gene und Gene die nur während der Embryogenese oder in Keimzellen aktiv sind. Von Bedeutung ist die Methylierung aber auch für die Stabilisierung der Chromosomen, für das genomische *Imprinting* (Prägung) und die Stilllegung des zweiten X-Chromosoms der Frau (Esteller, 2008; Feinberg *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2007; Luczak *et al.*, 2006; Lund *et al.*, 2004; Reik *et al.*, 2005). Zusätzlich wird die Integrität des gesamten Genoms durch die Verhinderung der Transkription und Translokation von repetitiven Elementen wie LINES (*long interspersed elements*) und Alu-Sequenzen durch Methylierung dieser Abschnitte gewährleistet (Bird, 1992; Walsh *et al.*, 1998).

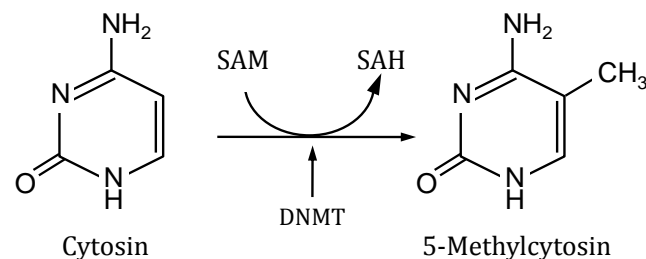


Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Umwandlung von Cytosin in 5-Methylcytosin durch eine DNA-Methyltransferase. SAM, S-Adenosylmethionin; SAH, S-Adenosyl-Homocystein; DNMT, DNA-Methyltransferase.

Im Zusammenhang mit der Methylierung von DNA treten auch chemischen Modifikationen der DNA-assoziierten Histonproteine auf, welche eine eng verknüpfte weitere Ebene der epigenetischen Kontrolle darstellen. Die Histonproteine liegen als Bestandteil des Chromatins zu Nukleosomen organisiert im Zellkern vor. Dabei besteht ein Nukleosom aus ca. 146 bp DNA, die in zweifacher Windung um ein Histon-Oktamer aus jeweils zwei Untereinheiten der Histone H2A, H2B, H3 und H4 geschlungen sind (Khorasanizadeh, 2004; Luger *et al.*, 1997). Die N-terminalen Enden der Histone können mit verschiedenen posttranslationalen Modifikationen versehen sein. Neben der Acetylierung von Lysinresten, kommt auch die Methylierung von Arginin- und Lysinresten, die Phosphorylierung von Serin- und Threoninresten und die

Ubiquitinierung sowie Sumoylierung von Lysinresten vor. Die Entdeckung der vielfältigen Modifikationsmöglichkeiten der Histonproteine führte in Anlehnung an den Begriff des „genetischen Codes“ zur Prägung des Ausdrucks „Histon Code“ (Jenuwein *et al.*, 2001). Die unterschiedlichen Modifikationen der Histone beeinflussen die Transkription verschiedener Gene durch die Veränderung der Chromatinstruktur. Chromatin kann sowohl in einer offenen als auch einer geschlossenen Konformation vorliegen, die als Euchromatin bzw. Heterochromatin bezeichnet wird. Die geschlossene Konformation ist assoziiert mit einer transkriptionellen Inaktivität der Chromatinregion. Dabei ist die Acetylierung der Lysinreste, die durch Histonacetyltransferasen (HATs) und ihre Gegenspieler die Histondeacetylasen (HDACs) reguliert wird, mit einer offenen Chromatinstruktur assoziiert. Sie führt zu Neutralisierung der positiven Ladung der Histone, was die Lockerung der Interaktion mit der negativ geladenen DNA zu Folge hat. Die dadurch entstandene lockerere Chromatinstruktur ist nun zugänglich für die an der Transkription beteiligten Faktoren. (Esteller, 2008; Gregory *et al.*, 2001). Die funktionelle Auswirkung einer Histon-Methylierung allerdings ist abhängig von der Position, so ist eine Methylierung des Histons H3 am Lysinrest 4 (K4) mit einer transkriptionellen Aktivierung assoziiert, wohingegen eine Methylierung von H3 an Lysinrest 9 (K9), Lysin 27 (K27) oder an Histon H4 an Lysin 20 (K20) mit transkriptioneller Repression verbunden ist (Esteller, 2008).

Es wurden verschiedene Mechanismen vorgeschlagen, um die Funktionsweise der transkriptionellen Repression durch DNA-Methylierung zu erklären. Zum einen ein Mechanismus, bei dem die Methylierung der CpG-Dinukleotide selbst direkt die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren an ihre Bindestellen in der Promotorsequenz verhindert, wie es beispielsweise für die Transkriptionsfaktoren AP-2, E2F und NF κ B beschrieben ist (Tate *et al.*, 1993). Es ist allerdings unwahrscheinlich, dass dieser Mechanismus sehr weit verbreitet ist, da die meisten Bindestellen für Transkriptionsfaktoren keine CpG-Dinukleotide in ihrer Sequenz beinhalten. Der alternative Mechanismus ist dabei weitaus komplizierter und involviert eine Gruppe von Proteinen, die selektiv an methylierte DNA binden und daher als MBD-(*methyl binding domain*) Proteine bezeichnet werden. Einige dieser Proteine wie beispielsweise MBD1, MBD2 und MeCP2 sind mit Repressor-Protein-Komplexen assoziiert, die Histondeacetylasen wie HDAC1 und HDAC2 enthalten. Durch die katalytische Aktivität der Histon-

deacetylasen kommt es zur Entfernung von Acetylresten der Histonproteine und damit zur Kondensation der Chromatinstruktur (Luczak *et al.*, 2006; Robertson, 2001). Abb. 1.4 stellt schematisch das Zusammenspiel zwischen DNA-Methyltransferasen, methylbindenden Proteinen und Histondeacetylasen dar, welches zur Chromatin-kondensation und damit zur transkriptionellen Stilllegung von Genen führt (Rice *et al.*, 2001).

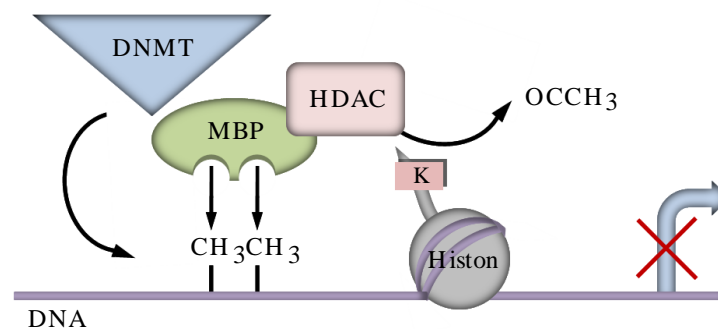


Abb. 1.4: Methylierungsassoziiertes Modell der Genstilllegung. Cytosin-Nukleotide werden durch eine DNA-Methyltransferase (DNMT) methyliert, was die Affinität von methylbindenden Proteinen (MBP) für DNA erhöht. Diese Proteine sind mit Repressor-Protein-Komplexen assoziiert, die Histondeacetylasen (HDAC) enthalten, welche die Acetylgruppen von den Lysinresten (K) der Histonproteine entfernt. Dies führt zur Kondensierung der Chromatinstruktur und zur transkriptionellen Stilllegung der betroffenen Gene. Modifiziert nach Rice *et al.*, 2001.

1.2.2 Epigenetische Veränderungen in malignen Zellen

In Gegensatz zum epigenetischen Status in normalen Zellen, ist das Gleichgewicht der Methylierung in einer Vielzahl von Tumoren gestört. Die erste Veränderung, die in humanen Tumoren entdeckt wurde, war eine globale Hypomethylierung des Genoms (Feinberg *et al.*, 1983). Diese betrifft dabei verstärkt repetitive DNA Sequenzen, wodurch es zu einer vermehrten Chromosomeninstabilität und zur Aktivierung von Transposons kommt. Neben dem Verlust des genomischen *Imprintings* werden auch verschiedene, normalerweise stillgelegte Onkogene, wie beispielsweise das *PAX2*-Gen aktiviert, welches für einen Transkriptionsfaktor kodiert und unter anderem an der Zellproliferation beteiligt ist (Esteller, 2007; Esteller, 2008; Wu *et al.*, 2005).

Neben der globalen Hypomethylierung ist die Hypermethylierung von CpG-Inseln in den Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen ein bedeutender Vorgang in der Entstehung vieler Tumorentitäten. Die ersten Gene, bei denen diese Art der

Inaktivierung identifiziert werden konnte, waren Tumorsuppressorgene wie das Retinoblastom-Gen (*Rb1*) und das von Hippel Lindau (*VHL*) Gen (Herman *et al.*, 1994; Sakai *et al.*, 1991). Inzwischen ist die Liste der Gene, die in den verschiedensten Tumorentitäten durch Promotorhypermethylierung inaktiviert vorliegen können, sehr umfangreich. Betroffen sind unter anderem Gene des Zellzyklus, der DNA-Reparatur, des Zellstoffwechsels, der Zell-Zell-Interaktionen, der Angiogenese und der Apoptose. Dabei kann der Vorgang der epigenetischen Stilllegung, auch als Epimutation bezeichnet, im Zusammenspiel mit einer Mutation oder einem LOH, sowohl den ersten als auch den zweiten Schritt der Inaktivierung im Sinne der *Two-Hit-Hypothese* von Knudson darstellen. Sogar beide Allele können gemeinsam von einer Hypermethylierung betroffen sein. Auch in der Tumorentität des Magenkarzinoms sind epigenetische Veränderungen ein häufig auftretendes Phänomen. So ist die Hypermethylierung einer ganzen Reihe von Genen wie *p14^{ARF}*, *hMLH1*, *CDH1*, *APC*, *DCC*, *PTEN*, *CHFR*, *COX2*, *GATA4*, *RAR β* , *RUNX3*, *GSTP1*, *RASSF1A* und *TIMP-3* für das Magenkarzinom belegt (Esteller, 2007; Panani, 2008; Tamura, 2006; Vogiatzi *et al.*, 2007). Auch die gleichzeitige tumorspezifische Hypermethylierung der CpG-Inseln multipler Gene, bezeichnet als „*CpG island methylator phenotype*“ (CIMP), wurde für 30-40 % der Magenkarzinome beschrieben (An *et al.*, 2005; Etoh *et al.*, 2004; Toyota *et al.*, 1999). Zusätzlich ergaben sich in einer vorangegangenen Studie, bei welcher der Methylierungsstatus sechs verschiedener Gene in einem neoadjuvant chemotherapierten Patientenkollektiv untersucht worden war, Hinweise sowohl auf ein schlechteres Überleben der Patienten, die eine höhere Methylierungsrate in den Tumoren aufwiesen, als auch auf eine Assoziation einer stärkeren Methylierungsrate mit einem Nicht-Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie (Napieralski *et al.*, 2007).

Die Hypermethylierung von CpG-Inseln von Tumorsuppressorgenen ist in Tumorzellen mit besonderen Kombinationen von Histonmodifikationen assoziiert. Es kommt in genreichen Regionen, die Tumorsuppressorgene enthalten, zu einem Verlust der mit aktiver Transkription assoziierten Histonmodifikationen, wie der Acetylierung der Histone H3 und H4. Zusätzlich kommt es zu einem Zugewinn an Modifikationen, die mit einem repressiven Chromatinstatus einhergehen, wie beispielsweise der Dreifachmethylierung des Histons H3 an Lysinrest 27. In Bereichen des Genoms, die beispielsweise repetitive DNA-Sequenzen und wenige Genen enthalten, kommt es in

Gegensatz dazu zum Verlust repressiver und dem Zugewinn aktivierender Modifikationen (siehe Abb. 1.5).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass im Verlauf der Tumorprogression neben der Akkumulation genetischer Defekte auch Veränderungen auf epigenetischer Ebene stattfinden. Es kommt zur Abnahme des Gesamtgehalts an methylierten Cytosinbasen, jedoch zu einer ansteigenden Methylierung von CpG-Inseln. Auch die Veränderungen des Histonmodifikations-Musters nehmen im Laufe der Tumorprogression zu (Esteller, 2007).

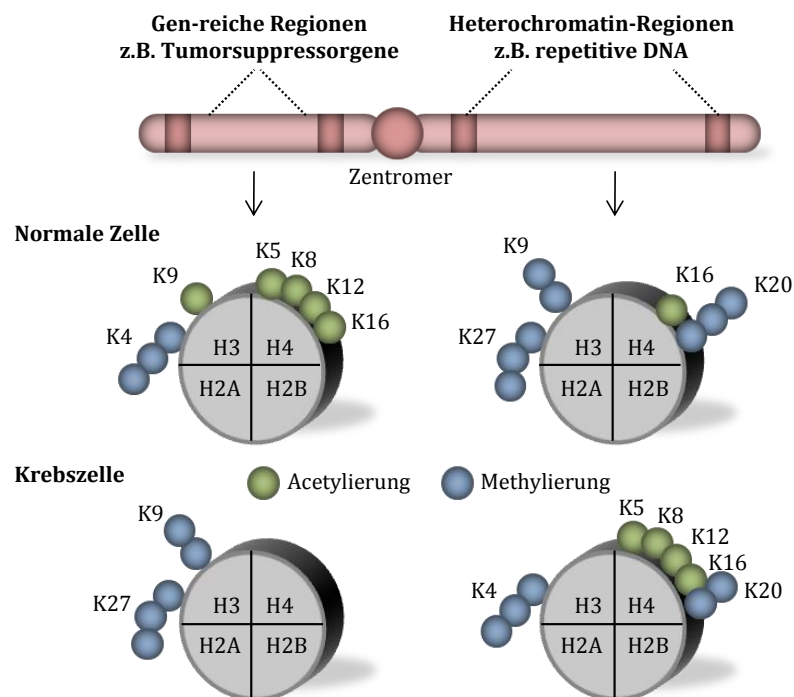


Abb. 1.5: Histonmodifikationen in normalen Zellen und Tumorzellen. Oktamere aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 werden durch graue Zylinder dargestellt. Das gezeigte Chromatid stellt die Beziehung zur jeweiligen chromosomalen Region der dargestellten Histonoktamere dar. Es ist die Acetylierung (grüne Kugeln) und die Di- bzw. Trimethylierung (blaue Kugeln) von Lysinresten (K) der Histone gezeigt. In normalen Zellen sind genomische Regionen, die Promotoren von Tumorsuppressoren beinhalten, angereichert mit Histonmodifikationen die mit aktiver Transkription assoziiert sind, wie die Acetylierung von H3- und H4-Lysinresten (z.B. K5, K8, K9, K12, K16) und Trimethylierung von K4 des H3. In derselben Zelle sind heterochromatische Regionen wie beispielsweise repetitive DNA Sequenzen durch Trimethylierung von K27 und Dimethylierung von K9 des H3 und der Trimethylierung von K20 des H4 charakterisiert, die als repressive Modifikationen fungieren. In Tumorzellen kommt es zum Verlust der aktivierenden Histonmodifikationen in den Regionen der Tumorsuppressorgene und zum Verlust repressiver Histonmodifikationen in Regionen mit repetitiven DNA-Sequenzen und umgekehrt. Modifiziert nach Esteller, 2007.

1.2.3 Wichtige Effektoren der epigenetischen Regulation

1.2.3.1 DNA-Methyltransferasen

Das Muster der globalen Cytosin-Methylierung wird durch ein komplexes Zusammenspiel von mindestens drei unabhängig voneinander im Genom codierten DNA-Methyltransferasen (DNMTs) sichergestellt: DNMT1, DNMT3a und DNMT3b (Robertson, 2001). Dabei gelangt das zu modifizierende Cytosin in das aktive Zentrum des Enzyms, woraufhin eine Methylgruppe von S-Adenosylmethionin (SAM) auf die C5 Position des Cytosins übertragen wird (Goll *et al.*, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass DNMT1 eine ca. 10- bis 40-fach höhere Präferenz für hemimethylierte DNA aufweist (Pradhan *et al.*, 1999) und an den Replikationsgabeln mit PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), dem Prozessivitätsfaktor der DNA Polymerase δ interagiert. Demzufolge wird angenommen, dass DNMT1 hauptsächlich für die Aufrechterhaltung der Methylierungsmuster über die Zellteilungen hinweg zuständig ist und wird daher als *maintenance* DNA-Methyltransferase bezeichnet. Im Gegensatz dazu wird vermutet, dass DNMT3a und DNMT3b für die *de novo* Methylierung, also die Methylierung von zuvor unmethylierten CpG Dinukleotiden verantwortlich sind (Okano *et al.*, 1999). Es wurden jedoch auch überlappende Funktionen der Proteine beschrieben (Rhee *et al.*, 2000; Rhee *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2000). Für eine weitere DNA-Methyltransferase, DNMT2, wurde bisher *in vitro* nur eine sehr geringe Fähigkeit zur Methylierung von DNA nachgewiesen, sie scheint allerdings in die Methylierung von tRNA involviert zu sein (Gibney *et al.*, 2010; Goll *et al.*, 2005). In der Maus konnte unter Verwendung eines homozygoten Knockout-Modells gezeigt werden, dass DNMT1, DNMT3a und DNMT3b für die normale embryonale Entwicklung notwendig sind.

DNA-Methyltransferasen enthalten eine C-terminale katalytische Domäne, die sich durch die Anwesenheit von 5 konservierten Aminosäuremotiven (I, IV, VI, IX, X) auszeichnet und sowohl für die DNA-Bindung als auch die SAM-Bindung zuständig ist. Die N-terminale regulatorische Domäne von DNMT1 beinhaltet eine Bindestelle für PCNA (PBD), ein NLS (*nuclear localisation signal*), ein cysteinreiches Zink-Finger DNA-Bindemotif (ATRX) und eine Domäne für die Interaktion mit den Replikations-Foci

(Robertson, 2001). In Abb. 1.6 ist der strukturelle Aufbau der DNA-Methyltransferasen dargestellt.

In welcher Weise die DNMTs zur veränderten Methylierung in Tumoren beitragen ist bisher noch nicht vollständig geklärt, aber eine Überexpression der DNA-Methyltransferasen konnte bereits in verschiedene Tumorentitäten einschließlich dem Magenkarzinom nachgewiesen werden (Amara *et al.*, 2010; Etoh *et al.*, 2004; Girault *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003; Peng *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2003).

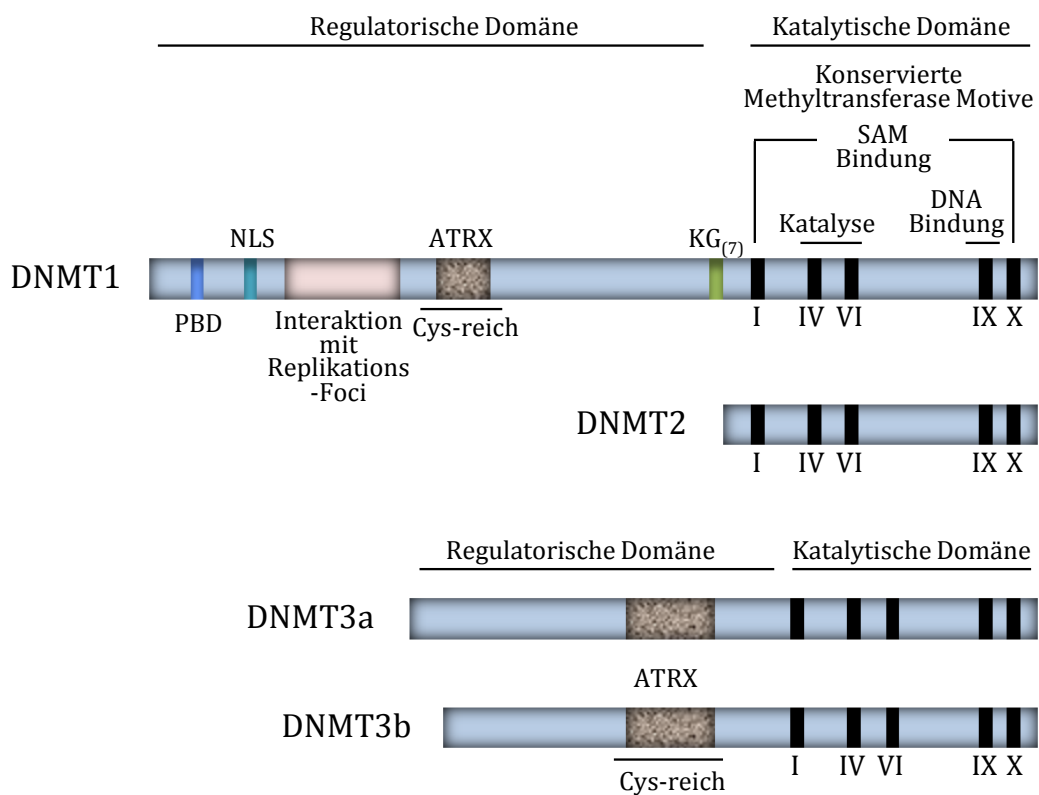


Abb. 1.6: Struktur der humanen DNA-Methyltransferasen (DNMTs). DNMT1, 3a und 3b zeigen eine regulatorische und eine katalytische Domäne. Konservierte Motive, die an der Katalyse beteiligt sind, sind durch schwarze Rechtecke gekennzeichnet (römische Ziffern). KG₍₇₎: Verknüpfung der Domänen durch sieben Lysin-Glycin Wiederholungen. Die N-terminale regulatorische Domäne von DNMT1 beinhaltet eine Bindestelle für PCNA (PBD), ein NLS (nuclear localisation signal) ein cysteinereiches Zink-Finger DNA-Bindemotif (ATRX) und eine Domäne für die Interaktion mit den Replikations-Foci. Modifiziert nach Robertson, 2001.

1.2.3.2 Histondeacetylasen

Die Histondeacetylasen (HDACs) regulieren gemeinsam mit ihren Gegenspielern den Histonacetyltransferasen (HATs) den Acetylierungsstatus von Lysinresten der Histonproteine. Die Familie der Histondeacetylasen besteht aus 18 Genen, die basierend auf der Homologie zu ihren entsprechenden Orthologen in der Hefe, in vier verschiedene Gruppen (Klasse I-IV) eingeteilt werden (de Ruijter *et al.*, 2003; Kristensen *et al.*, 2009). Die Klasse I, bestehend aus HDAC1, 2, 3 und 8, ist mit Ausnahme von HDAC3 primär im Zellkern lokalisiert. HDACs der Klasse II (HDAC4; 5, 6, 7, 9, 10) sind in der Lage zwischen Nukleus und Zytoplasma zu pendeln (Witt *et al.*, 2009). Die Klasse III besteht aus SIRT1 bis SIRT7 und wird in verschiedenen Zellkompartimenten gefunden. Die Klasse IV besteht aus nur einem Vertreter (HDAC11) und weist Eigenschaften sowohl der Klasse I als auch der Klasse II HDACs auf. Als Kofaktor für ihre Aktivität benötigen die Klassen I, II und IV ein Zink-Ion (Zn^{2+}), wohingegen die Klasse III, die Sirtuine, NAD^+ als Kofaktor benötigt. Das aktive Zentrum der Klassen I, II und IV besteht aus einer zylindrischen Tasche, die ein Zink-Ion und ein einzelnes Wassermolekül beinhaltet und mit dem zu modifizierende Lysinrest bei der Deacetylierung interagiert (Wang *et al.*, 2005). Neben ihrer Funktion bei der Acetylierung von Histonproteinen, zeigen immer mehr Studien, dass HDACs auch an der Acetylierung der Lysinresten von nicht-Histonproteinen wie beispielsweise p53, c-Myc, $NF\kappa B$ und HSP90 beteiligt sind (Chen *et al.*, 2001; Gu *et al.*, 1997; Kovacs *et al.*, 2005; Patel *et al.*, 2004).

Die am besten charakterisierten HDAC-Isoformen sind HDAC1 und HDAC2. Untersuchungen von Knockout-Maus-Modellen zeigen, dass die Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2 eine wichtige Rolle in der Differenzierung spielen, da die genetische Deletion der Gene im embryonalen oder aber perinatalen Stadium zum Tode führt (Lane *et al.*, 2009). HDAC1 und HDAC2 werden in normalem Gewebe ubiquitär exprimiert, aber eine verstärkte Expression wurde in Magenkarzinomen und in verschiedenen anderen Tumorentitäten festgestellt und war zum Teil auch mit einer schlechten Prognose für die Patienten assoziiert (Choi *et al.*, 2001; Fritzsche *et al.*, 2008; Nakagawa *et al.*, 2007; Suzuki *et al.*, 2009; Weichert *et al.*, 2008a; Weichert *et al.*, 2008b; Weichert *et al.*, 2008c; Weichert *et al.*, 2008d).

1.2.3.3 Polycombproteine

Die Familie der Polycombproteine (PcG) stellt eine weitere Gruppe der epigenetischen Regulatoren dar, die als Multikomponentenkomplexe vorliegen und wie auch die DNA-Methyltransferasen und Histondeacetylasen an der transkriptionellen Stilllegung von Genen beteiligt sind. Die Forschung der letzten zehn Jahre hat dabei zwei Hauptkomplexe der Polycombproteine identifiziert, die als PCR1 (*polycomb repressive complex 1*) und PCR2 (*polycomb repressive complex 2*) bezeichnet werden. Obwohl die Polycombproteine hauptsächlich für ihre Rolle bei der Regulation der *Hox* Gene in *Drosophila melanogaster* und damit bei der Ausbildung der Anterior-Posterior-Achse dieser Tiere bekannt waren, konnte einige Vertreter der Polycombproteine in Säugetieren mit der Kontrolle der Zellproliferation und der Entstehung von Neoplasien in Zusammenhang gebracht werden (Simon *et al.*, 2009; Sparmann *et al.*, 2006; Valk-Lingbeek *et al.*, 2004).

1.2.3.3.1 BMI-1

Eine Hauptkomponente des PCR1, BMI-1 (*B-cell-specific molony murine leukemia virus integration site 1*) wurde als Onkogen identifiziert, das mit *MYC* bei der Initiierung von Lymphomen kooperiert (Haupt *et al.*, 1991). Inzwischen ist bekannt, dass BMI-1 an einer Vielzahl von biologischen Prozessen wie Embryonalentwicklung, Organbildung, Selbsterneuerung von Stammzellen, Differenzierung und eben auch der Tumorentstehung beteiligt ist (Dimri *et al.*, 2002; Godlewski *et al.*, 2008; Jiang *et al.*, 2009). Außerdem konnte in verschiedenen Tumorentitäten bereits eine Überexpression von BMI-1 nachgewiesen werden (Kim *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2006; Vonlanthen *et al.*, 2001).

1.2.3.3.2 EZH2

Ein weiteres den Polycombproteinen zugehöriges Protein ist EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*), die katalytische Untereinheit und damit Hauptkomponente des PCR2. EZH2 fungiert als Histonmethyltransferase, deren Zielstruktur der Lysinrest 27 des Histons H3 darstellt (Simon *et al.*, 2008). Wie in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, ist diese Art der Histonmodifikation in malignen Zellen in der Promotorregion von Tumorsuppressorgenen zu finden und ist mit einer repressiven Chromatinstruktur assoziiert. Außerdem

konnte für EZH2 eine direkte Interaktion mit allen drei funktionellen DNA-Methyltransferasen (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) gezeigt werden, wodurch diese an EZH2-Zielpromotoren rekrutiert werden, was in der Folge zur Stilllegung der Zielgene führt (Vire *et al.*, 2006). Auch eine Überexpression von EZH2 konnte in verschiedenen Tumoren gezeigt werden (Kleer *et al.*, 2003; Raman *et al.*, 2005; Varambally *et al.*, 2002). Im Gegensatz dazu konnten in Patienten mit Myelodysplastischem Syndrom somatische Mutationen von EZH2 detektiert werden, die vermutlich zu einem Funktionsverlust des Proteins führen (Nikoloski *et al.*, 2010). Gemeinsam mit der Beobachtung, dass andere Komponenten der PCR1 und PCR2 Komplexe in der Lage sind eine Stilllegung der mitogenen JAK-STAT- und Notch-Signalwege zu vermitteln, liefert dies Hinweise darauf, dass EZH2 ebenso als Tumorsuppressor fungieren kann (Classen *et al.*, 2009; Martinez *et al.*, 2009).

1.2.4 Epigenetisch aktive Therapeutika

Epigenetische Mechanismen wie die Methylierung von DNA und die Modifikation von Histonproteinen sind in der Lage die Chromatinstruktur zu regulieren und letztendlich die Expression genetischer Information zu steuern. Die kovalenten Modifikationen der DNA und der Lysinreste der Histone ist dabei so stabil, dass sie über die Zellteilungen hinweg von Zelle zu Zelle weitergegeben werden. Anders als bei Mutationen, die passiv durch die Replikation der DNA weitergegeben werden, müssen jedoch Modifikationen wie DNA-Methylierung oder Histonmodifikationen aktiv aufrechterhalten werden und sind potentiell reversibel (Bird, 2002). Die Reversibilität der epigenetischen Information macht diese aus klinischer Sicht zu einem höchst attraktiven Ziel für eine therapeutische Intervention (Lyko *et al.*, 2005). Dies führte zu einer intensiven Suche nach neuen Medikamenten mit der Fähigkeit fehlerhafte Modifikationen pharmakologisch zu korrigieren und dadurch in Tumoren die Reexpression von Proteinen zu ermöglichen, die sowohl Apoptose und Differenzierung induzieren als auch die Zellproliferation inhibieren (Kristensen *et al.*, 2009).

1.2.4.1 DNA-Methyltransferase-Inhibitoren

Einen wichtigen Angriffspunkt für die epigenetische Intervention stellen die DNA-Methyltransferasen dar. Das epigenetisch aktive Therapeutikum Decitabin (5-Aza-2'-deoxycytidin, DAC; Abb. 1.7 A), ein Nukleosidanalogen, inhibiert DNA-Methyltransferasen und befindet sich bereits in der klinischen Anwendung. Decitabin ist von der FDA (*US Food and Drug Administration*) für die Behandlung des Myelodysplastischen Syndroms zugelassen (Warlick *et al.*, 2007).

Die antineoplastische Wirkung von Decitabin beruht auf dessen Einbau in neu synthetisierte DNA-Stränge, weswegen Decitabin auch als S-Phasen-spezifisches Agens bezeichnet wird (Momparler, 2005). Alle drei aktiven DNA-Methyltransferasen (DNMT1, DNMT3a, DNMT3b) binden während des Methylierungsvorgangs kovalent mit ihrem aktiven Zentrum an das als Triphosphat in die DNA eingebaute Decitabin, wodurch es zu einer irreversiblen Hemmung der DNMT-Aktivität kommt. Dabei hat Decitabin einen dualen Wirkmechanismus: Die Verabreichung von hohen Dosen Decitabin wirkt zytotoxisch. Es kommt zu einer großen Anzahl von DNA-DNMT-Addukten, was zu einer Inhibierung der DNA-Synthese führt und damit den Tod der betroffenen Zelle zur Folge hat (Issa *et al.*, 2009; Lyko *et al.*, 2005). Niedrigere Dosen führen dazu, dass die DNA-DNMT-Addukte aus der DNA ausgeschnitten und im Proteasom degradiert werden (Ghoshal *et al.*, 2005; Issa *et al.*, 2009). Dies resultiert in einer Verringerung der zur Verfügung stehenden DNA-Methyltransferasen und führt somit zur Hypomethylierung der neusynthetisierten DNA.

Sowohl die Hypomethylierung der DNA als auch die Reexpression verschiedener Gene konnte bereits *in vitro* und *in vivo* als Konsequenz einer Decitabin-Behandlung nachgewiesen werden (Bender *et al.*, 1998; Daskalakis *et al.*, 2002; Issa *et al.*, 2005; Jabbour *et al.*, 2008). Ein Problem bei der Anwendung von Decitabin ist seine chemische Instabilität in Wasser und die geringe Halbwertszeit, was die Verabreichung in vielen Zyklen nötig macht um den gewünschten Effekt zu erzielen. Ein weiteres Problem stellen auch Nebenwirkungen dar, wie etwa eine starke Neutropenie, die bei der Anwendung von Decitabin beobachtet wird (Issa *et al.*, 2009).

Ein anderer DNMT-Inhibitor mit dem Namen Zebularin (1-[β -D-ribofuranosyl]-1,2-dihydropyrimidin-2-1, Abb. 1.7 B), der auch ein Nukleosidanalogen darstellt, befindet

sich noch in der präklinischen Erprobung (Kristensen *et al.*, 2009). Im Vergleich zu Decitabin ist er stabiler in wässrigen Lösungen und weist eine deutlich längere Halbwertszeit auf, was den Einsatz als oral verabreichtes Therapeutikum möglich machen könnte (Yoo *et al.*, 2004). Die Fähigkeit zur Demethylierung von DNA und zur Reexpression verschiedener Gene, einhergehend mit einer geringeren Toxizität, konnte für Zebularin sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden (Holleran *et al.*, 2005). Für Zebularin ist neben der Wirkung als Inhibitor der DNA-Methyltransferasen auch eine Wirkung als Inhibitor der Cytidin-Deaminase beschrieben, was möglicherweise auf ein anderes Wirkungsspektrum dieses Inhibitors hinweist (Yoo *et al.*, 2004).

Sowohl für Decitabin als auch für Zebularin zeigen sich *in vitro* Hinweise auf eine synergistische Wirkung mit klassischen Chemotherapeutika wie beispielsweise Cisplatin, was die Möglichkeit der Anwendung von kombinierten Therapieschemata nahelegt (Qiu *et al.*, 2005; Suzuki *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006b).

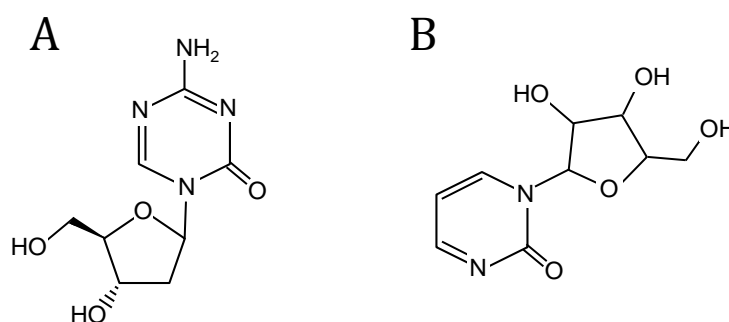


Abb. 1.7: DNA-Methyltransferase-Inhibitoren. Strukturformeln von Decitabin (A) und Zebularin (B)

1.2.4.2 HDAC-Inhibitoren

Die pharmakologische Manipulation der Histondeacetylasen ist eine weitere Möglichkeit auf epigenetische Modifikationen Einfluss zu nehmen. Im Moment befinden sich HDAC-Inhibitoren, unter anderem aus den Stoffklassen der kurzketteigen Fettsäuren, der Hydroxaminsäuren und der Benzamide, in verschiedenen Stadien der präklinischen und klinischen Erprobung (Kristensen *et al.*, 2009). SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*, Vorinostat, Abb. 1.8 A) ist der bisher einzige von der FDA für die Behandlung einer Tumorerkrankung zugelassene Histondeacetylase-Inhibitor und wird in der Therapie des kutanen T-Zell-Lymphoms eingesetzt (Mann *et al.*, 2007).

Die meisten HDAC-Inhibitoren so wie auch SAHA wurden so synthetisiert, dass sie mit der katalytischen Domäne der Histondeacetylasen interferieren. SAHA wird als Pan-HDAC-Inhibitor bezeichnet, weil er, wie auch die anderen HDAC-Inhibitoren aus der Gruppe der Hydroxaminsäuren durch die Bindung des Zink-Ions, das für die katalytische Funktion des Proteins notwendig ist, alle Zink-abhängigen HDACs und somit die Klassen I, II und IV inhibiert (Kristensen *et al.*, 2009). Die kurzkettige Fettsäure Valproinsäure (VPA, Abb. 1.8 B), die in der klinischen Praxis seit längerem bei Epilepsie und manisch-depressiven Erkrankungen eingesetzt wird, wurde erst deutlich später als HDAC-Inhibitor identifiziert (Gottlicher *et al.*, 2001). Seit dieser Entdeckung zeigen verschiedene Untersuchungen eine starke antineoplastischen Wirkung von VPA sowohl in präklinischen als auch in klinischen Studien (Duenas-Gonzalez *et al.*, 2008).

Die Wirkung der HDAC-Inhibitoren ist in beiden Fällen vielfältiger Natur. Es kommt zu einem Anstieg der Histonacetylierung in der Zelle auf globaler aber auch auf genspezifische Ebene (Li *et al.*, 2005). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* konnte für die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren eine antiproliferative Wirkung wie auch eine differenzierende Wirkung nachgewiesen werden (Butler *et al.*, 2000; Minucci *et al.*, 2006). Außerdem zeigten verschiedene Untersuchungen eine tumorspezifische Induktion von proapoptotischen Signalwegen (Insinga *et al.*, 2005). Neben der Wirkung auf Histone, werden durch HDAC-Inhibitoren auch Nicht-Histon-Proteine beeinflusst. Eine Hyperacetylierung von p53 beispielsweise, trägt zu dessen Stabilisierung bei, wodurch ein Zellzyklus-Arrest eingeleitet wird. Ein weiteres Beispiel ist das proangiogenetische Molekül HIF-1 α , dessen Acetylierung die Degradation des Proteins zu Folge hat (Lane *et al.*, 2009).

Wie für die DNMT-Inhibitoren bereits beschrieben, konnte *in vitro* auch für die HDAC-Inhibitoren gezeigt werden, dass Zellen mit ihrer Hilfe für die Behandlung mit anderen Chemotherapeutika sensitiviert werden können, was die Grundlage für die Entwicklung von kombinatorischen Therapieschemata darstellt (Kim *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2008).

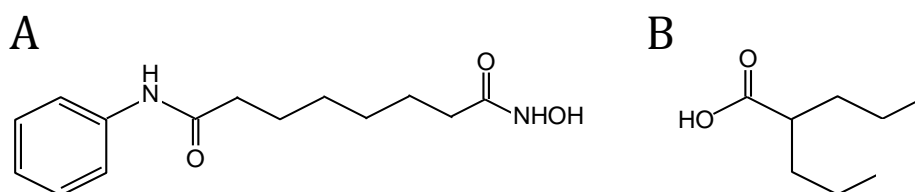


Abb. 1.8: Histondeacetylase-Inhibitoren. Strukturformeln von SAHA (A) und VPA (B).

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Lokal fortgeschrittene Magenkarzinome werden häufig mit einer auf Cisplatin und 5-FU basierenden Chemotherapie behandelt, wobei die Ansprechrate relativ gering ist. Epigenetische Alterationen, die DNA-Methylierung und Histonmodifikationen betreffen, sind eng mit der humanen Karzinogenese verbunden. Sie verändern die Chromatinstruktur und Transkription und können den Effekt DNA-schädigender Chemotherapeutika beeinflussen.

Ziel dieser Arbeit war es,

1. die prognostische und prädiktive Bedeutung der Expression epigenetischer Effektorproteine wie der DNA-Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3b, der Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2 und der Polycombproteine BMI-1 und EZH2 für neoadjuvant chemotherapierte Magenkarzinome anhand von prätherapeutischen Biopsien zu untersuchen.
2. spezifische Gene, die in der Tumoranalyse eine Assoziation mit dem Therapieansprechen zeigten, *in vitro* auf einen funktionellen Zusammenhang mit der Chemosensitivität zu überprüfen.
3. die potentielle Anwendbarkeit von epigenetisch aktiven Chemotherapeutika wie den DNA-Methyltransferase-Inhibitoren DAC und Zebularin und den Histondeacetylase-Inhibitoren SAHA und VPA als alternative Therapieoptionen für Magenkarzinompatienten anhand von Untersuchungen an Magenkarzinomzelllinien zu evaluieren.

2 MATERIAL

2.1 Tumormaterial

2.1.1 Gewebe

Für die retrospektive, explorative Analyse zur prognostischen und prädiktiven Bedeutung von epigenetisch relevanten Proteinen für das Magenkarzinom standen 127 prätherapeutische Biopsien von Magenkarzinompatienten zur Verfügung, die im Zeitraum zwischen 1994 und 2006 am Klinikum rechts der Isar der Technischen Universität München mit einer neoadjuvanten, auf Cisplatin und 5-FU basierenden Chemotherapie behandelt worden sind. Die Biopsien wurden unter standardisierten Bedingungen im Routinebetrieb des Institutes für allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie in Formalin fixiert, in Paraffinblöcke eingegossen und archiviert. Die Verwendung des Gewebes wurde vom lokalen Ethik-Komitee des Institutes genehmigt. Für die Untersuchungen wurden Biopsieblöcke von Patienten ausgewählt, die bestimmte Einschlusskriterien erfüllen. Es wurden Patienten mit lokal fortgeschrittenen Magenkarzinomen (Tumor-Kategorie cT3 und cT4) eingeschlossen, die mehr als 50 % der vorgesehenen Chemotherapie-Dosis von zwei Therapiezyklen erhalten haben. Ein zusätzliches Einschlusskriterium war die Verfügbarkeit einer ausreichenden Menge Gewebe für die Analyse. Bei den eingeschlossenen Patienten handelt es sich um ein gut charakterisiertes Kollektiv, bei dem die klinischen Daten ausführlich erfasst und dokumentiert sind. Um zu zeigen, dass die ausgewählten Fälle einen repräsentativen Querschnitt aus allen 347 im beschriebenen Zeitraum behandelten Patienten darstellen, wurde die Verteilung der klinischen und histopathologischen Parameter verglichen, wobei keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden.

2.1.2 Präoperative Chemotherapie

Das Behandlungsprotokoll von 120 Patienten bestand aus Cisplatin (50 mg/m² Körperoberfläche) in Woche 1, 3 und 5, Leucovorin (500 mg/m² Körperoberfläche) und 5-FU (2000 mg/m² Körperoberfläche) in Woche 1, 2, 3, 4, 5 und 6. Zwei Patienten erhielten zusätzlich Epirubicin (30 mg/m² Körperoberfläche) in Woche 2, 4 und 6. Bei fünf Patienten wurde Cisplatin durch Oxaliplatin (85 mg/m² Körperoberfläche) ersetzt.

2.1.3 Beurteilung des Therapieansprechens

Ein Endpunkt der Untersuchung war das Ansprechen (Respons) der Patienten auf die neoadjuvante chemotherapeutische Behandlung. Für alle Patienten lagen Daten zum Therapieansprechen vor, die sowohl basierend auf einer histopathologischen als auch einer klinischen Evaluation unter standardisierten Bedingungen erhoben wurden (Becker *et al.*, 2003; Ott *et al.*, 2003b). Gemäß der histopathologischen Responsbeurteilung wurden alle Patienten, deren Resektat weniger als 10 % residuale Tumorzellen enthielt, was dem Regressionsgrad 1 nach Becker entspricht, als histopathologische Responder klassifiziert. Der Prozentsatz der residualen Tumorzellen bezieht sich dabei auf die Ausdehnung des Tumorbetts. Patienten die einen Regressionsgrad 2 (10-50 % residuale Tumorzellen) oder Regressionsgrad 3 (> 50 % residuale Tumorzellen) aufwiesen oder deren Tumor sich während der Behandlung vergrößerte, wurden als Nonresponder eingestuft. Für die Beurteilung des klinischen Ansprechens wurden Daten aus computertomographischen und endoskopischen Untersuchungen zugrundegelegt. Patienten, die eine Reduktion des Primärtumors um mindestens 50 % aufwiesen, wurden als klinische Responder eingestuft, alle übrigen Patienten als klinische Nonresponder.

2.1.4 Bestimmung des Gesamtüberlebens und der Nachbeobachtungszeit

Neben dem Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie stellt das Gesamtüberleben der Patienten einen weiteren Endpunkt der Untersuchung dar. Dabei wurde das Gesamtüberleben definiert als der Zeitraum zwischen dem ersten Tag der

chemotherapeutischen Behandlung und dem Tod bzw. dem letzten Nachsorgetermin. Das mediane Überleben der Kollektivs wurde mit Hilfe der Kaplan-Meier Überlebensanalyse bestimmt. Der Nachbeobachtungszeitraum wurde definiert als der Zeitraum zwischen dem ersten Tag der Chemotherapie dem letzten Nachsorgetermin. Die mediane Nachbeobachtungszeit des Patientenkollektivs wurde mit Hilfe der reversen Kaplan-Meier-Analyse berechnet.

2.2 Magenkarzinomzelllinien

Die Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und KATOIII wurden aufgrund ihres publizierten unterschiedlichen Methylierungsstatus ausgesucht (Yamashita *et al.*, 2006).

MKN28

Herkunft	Dr. Wacheck, Fachbereich für klinische Pharmakologie (Medizinische Universität Wien)
Ursprung	Lymphknotenmetastase eines intestinales Magenkarzinoms einer 70-jährigen Frau
histologischer Subtyp des Primärtumors	moderat differenziertes, tubuläres Adenokarzinom
Morphologie	epithelial; adhärent; pflastersteinartig; bildet dichte, scharf abgegrenzte Kolonien
überprüfte Mutationen	<i>TP53</i> Mutation in Exon 7 (c.751A>C; p.I251L) (Yokozaki, 2000)

MKN45

Herkunft	Prof. Ebert, II. Medizinische Abteilung, Klinikum rechts der Isar, München
Ursprung	Lebermetastase eines diffusen Magenkarzinoms einer 62- jährigen japanischen Frau
histologischer Subtyp des Primärtumors	schlecht differenziertes Adenokarzinom
Morphologie	epithelial; wächst adhärent; kugelig bis spindelförmig; bildet lockere, traubenartige Kolonien
überprüfte Mutationen	<i>CDH1</i> Mutation in Exon 6 (c.821_832del12; p.G273_P276del) (Oda <i>et al.</i> , 1994; Yokozaki, 2000)

AGS

Herkunft	European Collection of Cell Culture (ECACC, Port Down, UK)
Ursprung	Primärtumor eines diffusen Magenkarzinoms einer 54-jährigen kaukasischen Frau
histologischer Subtyp des Primärtumors	schlecht differenziertes Adenokarzinom
Morphologie	epithelial; adhärent; eckig; bildet enge Kolonien ohne scharfe Abgrenzung
überprüfte Mutationen	<i>K-RAS</i> Mutation in Exon 2 (c.35G>A, p.G12D) <i>CTNNB1</i> Mutation in Exon 3 (c.101G>A; p.G34E) <i>CDH1</i> Mutation in Exon 12 (c.1733_1734insC; p.G579fs*9) (Bamford <i>et al.</i> , 2004)

KATOIII

Herkunft	European Collection of Cell Culture (ECACC, Port Down, UK)
Ursprung	Pleuraerguss eines diffusen Magenkarzinoms eines 55-jährigen asiatischen Mannes
histologischer Subtyp des Primärtumors	schlecht differenziert; Siegelringzellkarzinom
Morphologie	sphärisch; ca. 70% adhärent, 30% in Suspension; kugelig; bildet lockere Gruppen
überprüfte Mutationen	<i>CDH1</i> Mutation in Exon 7 (c.1008G>A; p.E336E) (Oda <i>et al.</i> , 1994; Yokozaki, 2000)

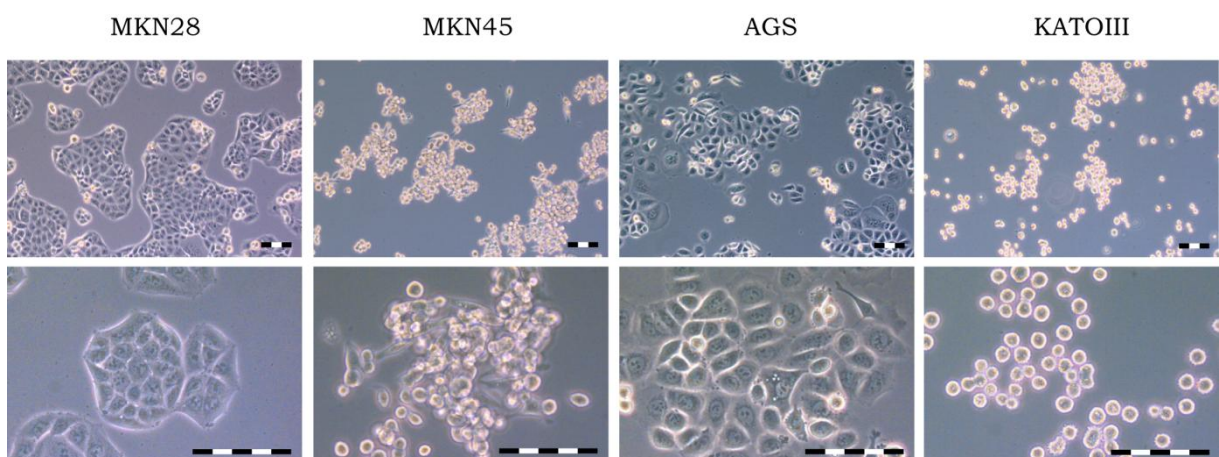


Abb. 2.1: Morphologie der Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und KATOIII. Gezeigt sind phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen der Zelllinien unter den üblichen Kultivierungsbedingungen unter Verwendung des Mikroskops Axiovert 135 und eines 10 x Objektivs (oberes Panel) bzw. eines 32 x Objektivs (unteres Panel). Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm.

Lentiviral transduzierte AGS

Die Zelllinie AGS wurde von der Firma Sirion Biotech (Martinsried) lentiviral mit drei verschiedenen shRNA-Konstrukten transduziert, von denen eine zur mRNA von DNMT1 komplementäre shRNA generiert wird (sh1, sh2, sh3). Außerdem wurde als Kontrolle ein Konstrukt transduziert, welches eine Sequenz beinhaltet, die zu keiner bekannten menschlichen mRNA-Sequenz komplementär ist (C). Für die Herstellung der transduzierten AGS Zellen wurden lentivirale Transduktionspartikel von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) mit den folgenden Identifikationsnummern verwendet: SHC002V (C), NM_001379.1-1577s1c1 (sh1), NM_001379.1-1687s1c1 (sh2) und NM_001379.1-3168s1c1 (sh3). Zellen, welche die shRNA Konstrukte stabil exprimieren, wurden durch eine dreitägige Selektion in 2,5 µg/ml puromycinhaltigem Medium generiert.

In der folgenden Abbildung ist die Vektorkarte der Konstrukte ohne das spezifische Insert gezeigt:

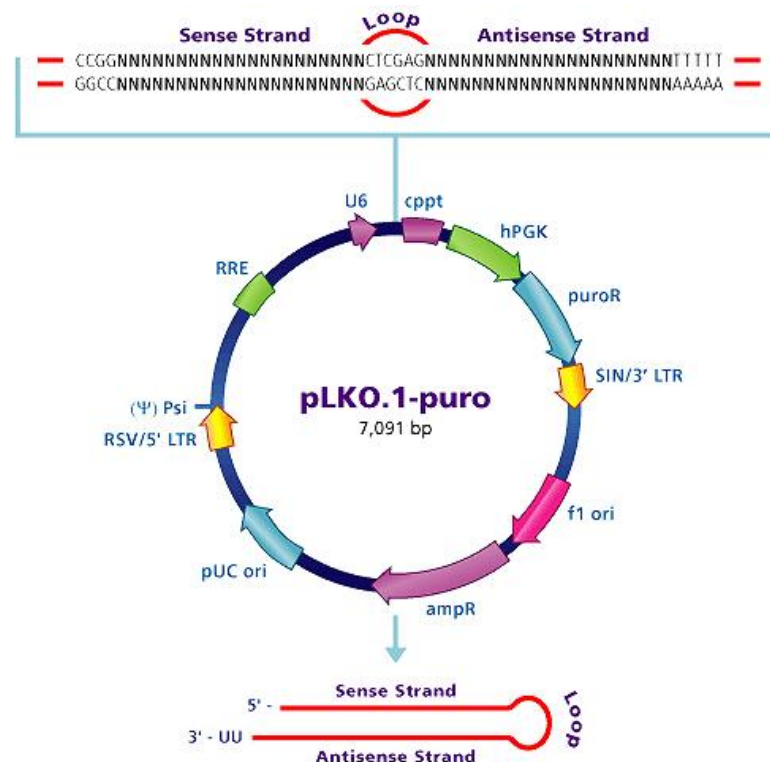


Abb. 2.2: Karte des Vektorgrundgerüsts pLKO.1-puro von Sigma Aldrich. cppt: Zentraler Polyuridin Abschnitt; hPGK: Humaner Phosphoglyceratkinasepromoter; puroR: Puromycin-Resistenzgen für die Selektion in Mammaliazellen; SIN/LTR: 3' sich selbst inaktivierendes LTR (long terminal repeat); f1 ori: f1 Replikationsursprung; ampR: Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion in Bakterien; pUC ori: pUC Replikationsursprung; 5' LTR: 5' long terminal repeat; Psi: RNA Pack-Signal; RRE: Rev Respons Element.

Die jeweiligen in die transduzierten Konstrukte integrierten Sequenzen sind in Tab. 2.1 aufgeführt.

Tab. 2.1: Sequenzen der verwendeten shRNA Inserts

Identifikationsnummer	Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
SHC002V	C	CCG GCA ACA AGA TGA AGA GCA CCA ACT CGA GTT GGT GCT CTT CAT CTT GTT GTT TTT
NM_001379.1-1577s1c1	sh1	CCG GCG TCT CTT GAA GGT GGT GTT ACT CGA GTA ACA CCA CCT TCA AGA GAC GTT TTT
NM_001379.1-1687s1c1	sh2	CCG GGC CGA ATA CAT TCT GAT GGA TCT CGA GAT CCA TCA GAA TGT ATT CGG CTT TTT
NM_001379.1-3168s1c1	sh3	CCG GCG ACT ACA TCA AAG GCA GCA ACT CGA GTT GCT GCC TTT GAT GTA GTC GTT TTT

2.3 Antikörper

2.3.1 Primärantikörper

polyklonaler AK Ziege-Anti-DNMT1 # sc-10219	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
monoklonaler AK Maus-Anti-DNMT3b Klon 52A1018 # IMG-184A	Imgenex (San Diego, USA)
polyklonaler AK Kaninchen-Anti-HDAC1 # ab15316	Abcam (Cambridge, UK)
monoklonaler AK Maus-Anti-HDAC2 # ab12169	Abcam (Cambridge, UK)
monoklonaler AK Maus-Anti-BMI1 Klon F6 # 05-637	Upstate/Millipore (Billerica, USA)
polyklonaler AK Kaninchen-Anti-EZH2 # 36-6300	Zymed/Invitrogen (Carlsbad, USA)
monoklonaler AK Maus-Anti- β -Aktin Klon AC-15 # A5441	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.3.2 Sekundärantikörper

Ziege-Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt # 7074	Cell Signaling (Davers, USA)
Schaf-Anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt # NA931	Amersham (Braunschweig)
Kaninchen-Anti-Ziege IgG, HRP-gekoppelt # ab6741	Abcam (Cambridge, UK)

2.4 Enzyme

AmpliTaq Gold®	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Proteinase K	New England Biolabs (Frankfurt a.M.)
RNase Inhibitor RNaseOUT™	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Restriktionsenzym <i>Hha</i> I	Roche Diagnostics (Mannheim)
Reverse Transkriptase Superscript II™	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Thrombin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

2.5 Primer und Sonden

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden im Helmholtz-Zentrum München (München-Neuherberg) mit einem Applied Biosystems 394 DNA/RNA-Synthesizer hergestellt oder stammen von Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) und wurden in nukleasefreiem Chromatographiewasser (Merck, Darmstadt) gelöst und verdünnt. Die Stammlösung sowie eine 20 pmol/µl Gebrauchslösung wurden bei -20 °C gelagert. Primer/Sondenmischungen für die real-time PCR wurden gebrauchsfertig von Applied Biosystems (Foster City, USA) bezogen und ebenfalls bei -20 °C gelagert.

Tab. 2.2: Sequenzen der Primer für den Nachweis von Mycoplasmen (Uemori et al. 1992)

Primerbezeichnung	Sequenz 5'→3'
Myco-Fw1	ACA CCA TGG GAG CTG GTA AT
Myco-Fw1t	ACA CCA TGG GAG TTG GTA AT
Myco-Rev1	CTT CAT CGA CTT TCA GAC CCA AGG CAT
Myco-Rev1tt	CTT CTT CGA CTT TCA GAC CCA AGG CAT
Myco-Rev1cat	CCT CAT CGA CTT TCA GAC CCA AGG CAT
Myco-Rev1ac	CTT CAT CGA CTT CCA GAC CCA AGG CAT
Myco-Fw2	GTT CTT TGA AAA CTG AAT
Myco-Fw2a	ATT CTT TGA AAA CTG AAT
Myco-Fw2cc	GCT CTT TCA AAA CTG AAT
Myco-Rev2	GCA TCC ACC AAA AAC TCT
Myco-Rev2ca	GCA TCC ACC ACA AAC TCT
Myco-Rev2at	GCA TCC ACC AAA TAC TCT

Tab. 2.3: Sequenzen der Primer für den Nachweis PDHB (Grillo et al., 1990)

Primerbezeichnung	Sequenz 5'→3'
PDHB-Fw	CTT CCA CAG CCC TCG ACT AA
PDHB-Rev	GGT ATG GAT GAG GAC CTG GA

Tab. 2.4: Primer und Sonden für die quantitative Real Time PCR

Gen		Sequenz 5'→3' oder Assay ID	Markierung
18s rRNA	18s-Fw	CCC TGT AAT TGG AAT GAG TCC AC	
	18s-Rev	GCT GGA ATT ACC GCG GCT	
	18s-Sonde	TGC TGG CAC CAG ACT TGC CCT C	5' 6-FAM ^a 3' TAMRA ^b
DNMT1	20x Primer/Sonden-Mix	TaqMan® Gene Expression Assay Hs00945900_g1	5' 6-FAM ^a 3' NFQ ^c
DNMT3b	20x Primer/Sonden-Mix	TaqMan® Gene Expression Assay Hs01003405_m1	5' 6-FAM ^a 3' NFQ ^c

^a 6-FAM-Phosphoradmit; ^b 6-Carboxyl-Tetramethylrhodamin; ^c non-fluorescent quencher

Tab. 2.5: Primer für die direkte Sequenzierung

Gen	Exon	Primer	Sequenz 5'→3'
CDH1	6	Fw	CTT CCT CAT CAG AGC TCA AGT CAC
		Rev	TGG GTC CAA AGA ACC TAA GAG TC
	7	Fw	AGC TTG TCT AAA CCT TCA TC
		Rev	GCT TAG ACC ATC ACT GTA TT
	12	Fw	TGG GGA TTC ATT ACT GTT GC
		Rev	GCA TGG CAG TTG GAG CAA AG
CTNNB1	3	Fw	CTA ATG CTA ATA CTG TTT CG
		Rev	TGA CTT TTA GTA AGG CAA TC

Gen	Exon	Primer	Sequenz 5'→3'
K-RAS	2	Fw	GGT GGA GTA TTT GAT AGT GTA TTA ACC
		Rev	CCT CTA TTG GAT CAT ATT CG
TP53	7	Fw	CCA AGG CGC ACT GGC CTC ATC
		Rev	CAG AGG CTG GGG CAC AGC AGG

2.6 Größenstandards

DNA Marker HAE III	Fermentas (St. Leon-Roth)
Dual Color Precision Plus Protein™ Standard	Bio-Rad (Hercules, USA)

2.7 Kommerzielle Analysensysteme und vorgefertigte Lösungen

Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories (Burlingame, USA)
CASYton®	Innovatis (Reutlingen)
Cell Proliferation Kit II (XTT)	Roche Diagnostics (Mannheim)
Dako REAL™ Detection System, Peroxidase/ DAB ⁺ , Rabbit/ Mouse	Dako (Glostrup/ Dänemark)
Diff-Quik Färbeset	Siemens Healthcare Diagnostics (Deerfield, USA)
Gene Scan – 500 ROX size Standard	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Natriumpyruvatlösung	Gibco/Invitrogen (Carlsbad, USA)
Penicillin/Streptomycin-Lösung	PAA (Pasching, Österreich)
Phase Lock Gel™ (light)	Eppendorf (Hamburg)
Proteaseinhibitor Tabletten Complete Mini	Roche Diagnostics (Mannheim)
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad (Hercules, USA)
Protein-Standard II (1,48 mg BSA/ml)	Bio-Rad (Hercules, USA)
QIAquick® PCR Purification Kit	Qiagen (Hilden)
qPCR Core Kit	Eurogentec (Köln)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen (Hilden)
T-Per® Proteinextraktionspuffer	ThermoScientific (Surrey, UK)
Trypsin/EDTA	PAA (Pasching, Österreich)
SALSA® MS-MLPA® Kit Me001B Tumor suppressor-1	MRC Holland (Amsterdam, Niederlande)

2.8 Medien für die Zellkultur

Zellkulturmedium RPMI-1640	Gibco/Invitrogen (Carlsbad, USA)
Zellkulturmedium DMEM/F12	Gibco/Invitrogen (Carlsbad, USA)

2.9 Chemikalien

5-Aza-2'-deoxycytidin (DAC)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
5-Fluorouracil (5-FU)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Aceton	Roth (Karlsruhe)
Acrylamid/Bis Lösung, 40% (37,5:1)	Bio-Rad (Hercules, USA)
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck (Darmstadt)
Ammoniumacetat	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Aqua Spüllösung	Delta Select (Pfullingen)
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Casein	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Chromatographiewasser	Merck (Darmstadt)
Cisplatin	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
p-Coumarinsäure	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Citronensäuremonohydrat	Roth (Karlsruhe)
Dako REAL Antibody Diluent	Dako (Glostrup, Dänemark)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Serva (Heidelberg)
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen (Carlsbad, USA)
Dulbeccos's PBS	PAA (Pasching, Österreich)
Essigsäure (100%, 96%)	Merck (Darmstadt)
Ethanol (70 %, 96 %)	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Eurobio (Les Ullis, Frankreich)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Fötales Kälberserum (FCS), Sera Plus	PAN (Aidenbach)
Fibrinogen	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Formamid	Merck (Darmstadt)
Glycin	Merck (Darmstadt)

Glyzerin	Merck (Darmstadt)
Glyzerin-Gelatine	Merck (Darmstadt)
Glykogen	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Hämatoxylinlösung	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
L-Glutamin (200 mM)	Gibco/Invitrogen (Carlsbad, USA)
Low-Melting-Agarose NuSieve GTG Agarose	BMA (Rockland, USA)
Luminol	Alexis Biochemicals (Lörrach)
Magermilchpulver	Bio-Rad (Hercules, USA)
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	Merck (Darmstadt)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Natronlauge (2N)	Roth (Karlsruhe)
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Nonidet P40	Roche Diagnostics (Mannheim)
Nukleotid-Mix (dATP, dGTP, dCTP, dTTP 1:1:1:1; je 1,25 mM)	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Penicillin-Streptomycin (100x)	PAA (Pasching, Österreich)
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth (Karlsruhe)
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween-20)	Sigma (Deisenhofen)
POP-7	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Puromycin	Sigma (Deisenhofen)
Random Hexamere	Fermentas (St. Leon-Roth)
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma (Deisenhofen)
Salzsäure (25 %, 37 %)	Roth (Karlsruhe)
Suberoylanilid-Hydroxamsäure (SAHA)	Alexis Biochemicals (Lörrach)
Seakem LE Agarose	Cambrex (Rockland, USA)
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma (Deisenhofen)
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck (Darmstadt)
Triton-x	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)

Valproinsäure	Alexis Biochemicals (Lörrach)
Wasserstoffperoxid 30%	Merck (Darmstadt)
Xylol	Merck (Darmstadt)
Zebularin	Merck (Darmstadt)
Ziegen-Serum	Dako (Glostrup, Dänemark)

2.10 Zytostatika-Stocklösungen

Tab. 2.6: Übersicht über die verwendeten Zytostatika-Stocklösungen

Zytostatikum	Konzentration	Lösungsmittel
Cisplatin	2,5 mM	H ₂ O
5-FU	5 mM	DMSO
DAC	5 mM	H ₂ O
Zebularin	50 mM	DMSO
SAHA	10 mM	DMSO
VPA	1 M	H ₂ O

2.11 Allgemeine Puffer und Lösungen

APS 10 %

Ammoniumpersulfat	5 g
H ₂ O	50 ml

Aliquots bei -20°C gelagert

Blockierungslösung 0,5 % Casein in TBS

Tris Base	20 mM
NaCl	137 mM
Casein	0,5 % (w/v)

mit 1N HCl auf pH 7,4 einstellen

Blockierungslösung 5 % Magermilchpulver in TBST

Magermilchpulver	2,5 g
TBST	50 ml

Citratpuffer (pH 6)

Citronensäuremonohydrat	10 mM
-------------------------	-------

mit 2 N NaOH auf pH 6 einstellen

DNA-Ladepuffer für Gelelektrophorese (10x)

Formamid	80 % (v/v)
Bromphenolblau	0,5 % (w/v)
Xylencyanol	0,5 % (v/v)

Chemilumineszenz-Substrat (ECL)

Lösung 1:

Luminol	2,5 mM
p-Coumarinsäure	400 µM
Tris-HCl pH 8,6	100 mM

Lösung 2:

H ₂ O ₂	0,15 % (v/v)
Tris-HCl pH 8,6	100 mM

bei 4°C lagern, direkt vor Gebrauch Lsg. 1 und Lsg. 2 im Verhältnis 1:1 mischen

Laufpuffer für SDS-PAGE

Tris Base	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)

Laemmli-Puffer (5x)

Tris-HCl, pH 6,8	312,5 mM
Glycerin	50 % (v/v)
β-Mercaptoethanol	25 % (v/v)
SDS	10 % (w/v)
Bromphenolblau	0,05 % (v/v)

Lysepuffer für Proteinlysate

T-Per® Extraktionspuffer	10 ml
Proteaseinhibitor Tabletten	1 Stück
Complete Mini	

PCR Puffer (10 x)

Tris-HCl pH 8,3	100 mM
KCl	500 mM
Gelatine	0,1 % (w/v)
MgCl ₂	15 mM

PK Puffer (pH 8)

Tris-HCl	50 mM
EDTA	1 mM
Tween	0,5 % (v/v)

RLN Puffer (pH 8)

Tris-HCl	50 mM
NaCl	140 mM
MgCl ₂	1,5 mM
Nonident P-40	0,5 % (v/v)

TBST

Tris Base	20 mM
NaCl	137 mM
Tween20	0,1 % (v/v)

TE Puffer (pH 8)

Tris-HCl	10 mM
EDTA	1 mM

Transferpuffer

Tris Base	25 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Methanol	20 % (v/v)

Tris Puffer für Immunhistochemie (pH 7,6)

Tris Base	50 mM
NaCl	150 mM

2.12 Verbrauchsmaterial

96-Well Platten, 6-Well Platten	Biochrom (Berlin)
Absolute QPCR Seal	ThermoScientific (Surrey, UK)
Cryovial PK/100 Cryocaps	Roth (Karlsruhe)
Deckgläser	ThermoScientific (Surrey, UK)
Discadit II 20 ml Plastikspritze	BD (Franklin Lakes, USA)
Einmal-Filterhalter 0,2 µm	Hartenstein (Würzburg)
Hyperfilm ECL	Amersham (Braunschweig)
Küvetten	Hartenstein (Würzburg)
Nitrozellulosemembran BA85	Schleicher & Schuell (Dassel)
Objektträger	ThermoScientific (Surrey, UK)
Objektträger Superfrost	ThermoScientific (Surrey, UK)

Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Company (Chicago, USA)
Pasteurpipetten	Hartenstein (Würzburg)
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml, 0,2 ml)	Biozym (Oldendorf)
Pipettenspitzen	Fisher Scientific (Schwerte)
Pipettenspitzen, gestopft	Biozym (Oldendorf)
Reaktionsgefäße (1,5, 2,0 ml)	Eppendorf (Hamburg)
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25, 50 ml)	BD (Franklin Lakes, USA)
Skalpellklingen	Sapphire (Pocasset, USA)
Thermo-Fast 96 well Plates	ABgene (Epsom, UK)
Whatman-Filterpapier	Schleicher & Schuell (Dassel)
Zellkulturflaschen (25, 75 cm ²)	Biochrom (Berlin)
Zellkulturschalen (100, 150 mm Ø)	Biochrom (Berlin)
Zellschaber	Biochrom (Berlin)
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht)

2.13 Geräte

Eismaschine	Scotsman Ice (Vernon Hills, USA)
Entwicklermaschine SRx-101A	Konica Minolta (Langenhagen)
Expert Plus Photometer	Asys (Eugendorf, Österreich)
Gelelektrophoresekammer WVV Mini Sub Cell	Bio-Rad (Hercules, USA)
Kapillarelektrophoresegerät 3130 Genetic Analyser	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Kippschüttler 3D Rocking Plattform	Stuard Scientific (Oregon, USA)
Kühltruhe Ultra Low Freezer	Sanyo (München)
Kühlzentrifuge 4K15	Sigma-Aldrich (St. Louis, USA)
Laborwaage	Sartorius (Göttingen)
Lichtmikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss AG (Jena)
Lichtmikroskop Labovert FS	Leitz (Wetzlar)
Mini PROTEAN® 3 Cell System	Bio-Rad (Hercules, USA)
Mini Trans-Blot Cell System	Bio-Rad (Hercules, USA)

MS1 Minishaker	IKA Works (Willmington, USA)
PCR-Gerät 2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems (Foster City, USA)
PCR-Gerät GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems (Foster City, USA)
PCR-Gerät Mastercycler Gradient	Eppendorf (Hamburg)
PCR-Gerät Primus 96 ^{Plus}	MWG-Biotech (Ebersberg)
Phasenkontrastmikroskop Axivoert 135	Carl Zeiss AG (Jena)
Photosystem Eagle Eye II	Stratagene (La Jolla, USA)
pH-Meter (pH 211)	HANNA instruments Inc. (Woonsocket, USA)
Pipetten Eppendorf Research (10, 100, 1000 µl)	Eppendorf (Hamburg)
Pipette Pipetman (20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson (Middleton, USA)
Pipetus-akku Pipetierhilfe	Hirschmann Laborgeräte (Eberstadt)
Spannungsquelle Power Pac 300	Bio-Rad (Hercules, USA)
Spektralphotometer Nano Drop 1000	ThermoScientific (Waltham, USA)
Sterilwerkbank Hera Safe Zellkulturhaube	Kendro (Hanau)
TaqMan PCR-Gerät ABI Prism 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
UV-Spektrometer Ultraspec 200	Amersham (Braunschweig)
UV/Vis Spektrophotometer DU® 530	Beckman (Fullerton, USA)
Wasserbad	GFL (Burgwedel)
Zellinkubator Heracell 240i	ThermoScientific (Waltham, USA)
Zellzählgerät Casy1 TT	Schärfe Systems (Reutlingen)
Zentrifuge 5415D	Eppendorf (Hamburg)
Zentrifuge 5417R	Eppendorf (Hamburg)

2.14 Software

3/30 Genetic Analyser Data Collection Software V 3.0	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Adobe Photoshop	Adobe Systems (San Jose, USA)
Adobe Illustrator	Adobe Systems (San Jose, USA)

Coffalyser V 7	MRC Holland (Amsterdam, Niederlande)
Connect Plus	Asys (Eugendorf, Österreich)
Gene Mapper V 3.7	Applied Biosystems (Foster City, USA)
ImageJ 14.2q	National Institutes of Health (Bethesda)
Microsoft Office 2007	Microsoft (Redmond, USA)
OriginPro 7.5	OriginLab (Northhampton, USA)
Scion Image Software	Scion Corporation (Frederick, USA)
Sequence Detector V 1.7	Perkin Elmer (Waltham, USA)
SPSS Statistics 17.0/18.0	SPSS Inc. (Chicago, USA)

3 METHODEN

3.1 Immunhistochemie

3.1.1 Durchführung der Färbung

Um die Expression der verschiedenen Proteine im Paraffinmaterial von Magenkarzinomen zu untersuchen, wurden zunächst 2 µm dicke Schnitte vom jeweiligen Tumorblock angefertigt und auf einen Objektträger aufgebracht. Eine Inkubation über Nacht bei 56°C stellte die Anhaftung der Schnitte sicher. Anschließend wurden die Schnitte 20 min in Xylol getaucht, um die vollständige Entfernung des Paraffins zu gewährleisten. Nach dem Rehydrieren des Gewebes in einer absteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte zunächst in destilliertem Wasser und später in frischem 10 mM Tris-Puffer (pH 7,6) gespült. Zur Antigendemaskierung wurden die Schnitte in Abhängigkeit des nachzuweisenden Antigens entsprechend vorbehandelt. Eine Behandlung der Schnitte mit 3 %igem H₂O₂ wurde zur Blockierung der endogenen Peroxidase durchgeführt. Die Detektion des Antigens erfolgte durch Inkubation mit dem spezifischen Antikörper in einer feuchten Kammer. Sowohl die jeweiligen Vorbehandlungsbedingungen als auch die verwendeten Antikörperverdünnungen für den spezifischen Nachweis sind in Tab. 3.1 dargestellt.

Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Schnitte dreimal mit 10 mM Tris Puffer (pH 7,6) gespült und für 30 min bei RT mit einem Biotin-markierten Sekundärantikörper (Lösung A des Dako REAL™ Detection System) inkubiert. Nach drei weiteren Waschschritten erfolgte die Inkubation mit dem Streptavidin-Peroxidase-Komplex (Lösung B des Dako REAL™ Detection System) für 30 min bei RT, wodurch das Streptavidin mit seinen je vier Bindungsstellen für Biotin an den Sekundärantikörper gebunden wird. Der kolorimetrische Nachweis erfolgte anschließend durch eine Inkubation der Schnitte mit dem Substrat Diaminobenzidin (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; Lösung C des Dako REAL™ Detection System) für 5 min, wobei das Substrat von der Peroxidase in einen braunen Farbstoff umgesetzt wurde. Die Farb-

reaktion wurde durch das Waschen der Schnitte in destilliertem Wasser abgestoppt, die Schnitte zur Gegenfärbung der Zellkerne für 30 s in Hämatoxylin getaucht und für 5 min unter Spülen mit Leitungswasser gebläut. Nach der Dehydrierung des Gewebes in einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte mit Glycerin-Gelatine bedeckt und mit Deckgläsern versehen. Bei jeder Färbung wurden geeignete Positiv- und Negativ-Kontrollen mitgeführt.

Tab. 3.1: Übersicht über die optimalen Bedingungen für den immunhistochemischen Antigen-nachweis

Antikörper	Kontrolle	Vorbehandlung	Verdünnung	Inkubation
DNMT1	Magenmukosa	Dampfkochtopf 7 min Citratpuffer pH = 6	1:500	60 min RT
DNMT3b	Magenmukosa	Dampfkochtopf 7 min Citratpuffer pH = 6	1:200	4°C ÜN
HDAC1	Magenmukosa	Dampfkochtopf 7 min Citratpuffer pH = 6	1:10	60 min RT
HDAC2	Magenmukosa	Dampfkochtopf 7 min Citratpuffer pH = 6	1:200.000	4°C ÜN
BMI-1	Tonsille	Mikrowelle 2x 10 min Citratpuffer pH = 6	1:50	90 min RT
EZH2	Tonsille	Dampfkochtopf 7 min Citratpuffer pH = 6	1:400	60 min RT

RT: bei Raumtemperatur; ÜN: über Nacht

3.1.2 Evaluierung der Färbung

In Abhängigkeit des spezifischen Färbemusters der Antikörper wurden der Prozentsatz positiver Tumorzellen und die Intensität der Färbung bewertet. Die Kategorien für den Prozentsatz an positiven Tumorzellen wurden dabei in Anlehnung an verschiedene Publikationen ausgewählt (Collett *et al.*, 2006; Etoh *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2008; Weichert *et al.*, 2008a).

Die Bewertung wurde von zwei unabhängigen Personen (Kathrin Mutze, Dr. med. Rupert Langer) durchgeführt und nicht übereinstimmende Bewertungen wurden an einem Diskussionsmikroskop nochmals diskutiert bis ein Konsens gefunden wurde. Durch die Multiplikation der Wertung für den Prozentsatz an positiven Tumorzellen und der Wertung für die Intensität wurde ein Index ermittelt, der beide Kriterien der Beurteilung zusammenfasst und als SI (*staining index*) bezeichnet wurde.

In der nachfolgenden Tabelle sind die verschiedenen möglichen Wertungen für die einzelnen Proteine aufgeführt:

Tab. 3.2: Übersicht über die möglichen Wertungen zur Bestimmung des Staining Index

Wertung	positive Tumorzellen (%)						Intensität ^a
	DNMT1	DNMT3b	HDAC1	HDAC2	BMI-1	EZH2	
0	0	0	0	0	0	0	negativ
1	<30	<30	<10	<10	<10	<10	schwach
2	30-50	30-50	10-50	10-50	10-50	10-50	moderat
3	>50	>50	51-80	51-80	>50	>50	stark
4	-	-	>80	>80	-	-	-

^a Intensität der Immunfärbung

Um die untersuchten Biopsien in hoch und niedrig exprimierende Tumore (d.h. zwei Kategorien) einteilen zu können, wurden verschiedene Grenzwerte getestet, die sich zum einen nur auf den Prozentsatz an positiven Tumorzellen und zum anderen auf den SI beziehen. Anschließend wurde der Grenzwert ermittelt, bei dem sich bezüglich des Gesamtüberlebens der Patienten die beste Trennung der beiden Gruppen (hohe versus niedrige Expression) ergab. Die ermittelten Trennwerte sind zum Teil auch in der Literatur wiederzufinden (Etoh *et al.*, 2004; Weichert *et al.*, 2008a). In Tab. 3.3 sind die Definitionen von hoher und niedriger Expression dargestellt, die sich aus der Grenzwertbestimmung für die einzelnen Proteine ergeben haben und die der statistischen Auswertung zugrunde liegen.

Tab. 3.3: Definition von hoher und niedriger Proteinexpression für die immunhistochemische Färbung von Tumorproben

Expression	Protein					
	DNMT1	DNMT3b	HDAC1	HDAC2	BMI-1	EZH2
	positive Tumorzellen (%)		SI ^a			
niedrig	< 30	< 50	0 - 6	0 - 6	0 - 4	0 - 6
hoch	≥ 30	≥ 50	8 - 12	8 - 12	6 - 9	9

^a Staining Index = Produkt aus Wertung für den Prozentsatz an positiven Tumorzellen und der Wertung für die Intensität der Immunfärbung

3.2 Arbeiten mit Magenkarzinomzelllinien

3.2.1 Kultivierung und Passagieren von Zelllinien

Die Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und KATOIII wurden in RPMI 1640 Medium mit 10 % (v/v) steril filtriertem Serum, 2 mM Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Lentiviral transduzierte AGS wurden in DMEM/F12 Medium mit 10 % steril filtriertem Serum, 2 mM Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin, 1 mM Natriumpyruvat und 1 µg/ml Puromycin kultiviert. Die Kultivierung aller Zelllinien erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Das Zellkulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Alle Arbeiten mit Zellen wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Bei Erreichen einer 80-90 %igen Konfluenz, wurden die Zellen im Verhältnis 1:5 bis 1:10 passagiert. Dafür wurde das Medium abgesaugt, der Zellrasen mit auf 37°C vorgewärmtem PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und mit Trypsin/EDTA überschichtet und die Kulturflasche für ca. 5 min bei 37°C inkubiert. Durch den in der Lösung enthaltenen Chelatkomplexbildner EDTA werden zweiwertige Ionen wie Mg²⁺ und Ca²⁺ komplexiert, welche für die Aufrechterhaltung der Zelladhäsion durch Membranproteine notwendig sind. Das Trypsin zerstört zusätzlich verbleibende Zelladhäsionsmoleküle durch seine proteolytische Wirkung. Durch leichtes Klopfen wurden die Zellen vom Boden der Flasche abgelöst. Anschließend wurde ein Teil der Suspension in eine neue Kulturflasche überführt und in frischem Medium resuspendiert. Sollte eine Bestimmung der Zellzahl erfolgen, wurde ein Aliquot der mit Medium versetzten Zellsuspension entnommen und mit dem Zellzähler CASY1 gezählt.

3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zelllinien

Um den Alterungsprozess von Zelllinien und die damit verbundenen möglichen Veränderungen der Zelllinien unter Dauerkultur zu minimieren, wurden die Zelllinien nach 25 Passagen verworfen und frische Zellen in Kultur genommen. Damit jedoch ein ausreichend großer Vorrat an frischen Zellen gewährleistet werden konnte, wurden von allen Zelllinien bei möglichst geringer Passagenzahl Kryokulturen hergestellt. Für die Kryokonservierung wurden die Zellen in Zellkulturschalen (\emptyset 15 cm) ausgelegt und bis zu einer Konfluenz von 90 % kultiviert. Die Zellen wurden anschließend abgelöst, in 10 ml Medium resuspendiert und 5 min bei 300 x g sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 4 ml gekühltem Zellkulturmedium mit 15 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO aufgenommen und auf vier 2 ml Kryoröhrchen aufgeteilt. Da der Einfriervorgang möglichst langsam erfolgen soll um das Auskristallisieren der Zellflüssigkeiten zu verhindern, wurden die Röhrchen zunächst für 1 h bei -20°C , anschließend über Nacht bei -80°C inkubiert, am darauffolgenden Tag in flüssigen Stickstoff (-186°C) überführt und dort gelagert.

Im Gegensatz zum Einfrieren soll der Auftauvorgang schnell erfolgen. Die Einfrierröhrchen mit den kryokonservierten Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C fast vollständig aufgetaut, so dass nur noch ein kleiner Eiskern vorhanden war. In einem 10 ml Zentrifugen-Röhrchen wurde 5 ml im Wasserbad vorgewärmtes Kulturmedium vorgelegt, in das die aufgetaute Zellsuspension tropfenweise überführt wurde. Die Zellen wurden 5 min bei 300 x g sedimentiert, in frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche passender Größe gegeben.

3.2.3 Test auf Kontamination mit Mycoplasmen

Die Zellkultur ist trotz der Verwendung von Antibiotika anfällig für Kontaminationen mit Mycoplasmen, einer sehr kleinen und damit schlecht unter dem Mikroskop sichtbaren extrazellulär parasitierenden Bakterienart. Die Kontamination der Zelllinien mit Mycoplasmen kann Einfluss auf verschiedenste Stoffwechselaktivitäten der Zellen haben und damit Versuchsergebnisse verfälschen. Aus diesem Grund wurden frisch aufgetaute Zellen unter Verwendung einer nested-PCR, mit der gleichzeitig verschiedene

Mycoplasmenstämme identifiziert werden können, auf eine Kontamination getestet (Uemori *et al.*, 1992). Dazu wurden die Zellen bis zu einer 90 %igen Konfluenz kultiviert, 100 µl des Zellkulturüberstandes abgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert. Die Probe wurde anschließend 5 s bei 13.000 rpm zentrifugiert und 5 µl des Überstandes in die erste PCR eingesetzt. Tab. 3.4 zeigt den verwendeten PCR-Ansatz.

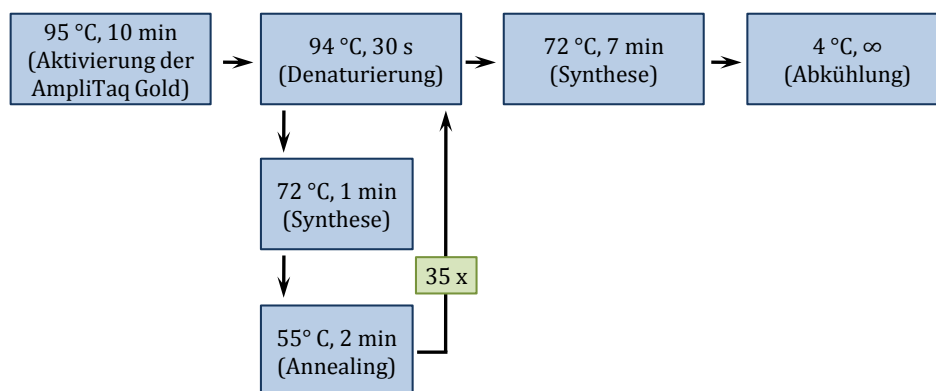
Tab. 3.4: Ansatz für die PCR 1 zum Nachweis von Mycoplasmen

	Menge pro Reaktion ^a in µl	Endkonzentration in der PCR
H ₂ O	12,25	
Tris-HCl pH 8,3 (100 mM)	} 10x PCR Puffer	10 mM
KCl (500 mM)		50 mM
Gelatine (0,1%)		0,01 %
MgCl ₂ (15 mM)		1,5 mM
dNTPs (je 1,25 mM)	4	je 200 µM
Primer-Supermix 1 ^b	1	0,8 µM
Taq-Polymerase (5000 U/ml)	0,25	1,25 U
Probe	5	

^a 25 µl Ansatz

^b bestehend aus je zwei Teilen Myco-Fw1 und Myco-Fw1t und je einem Teil Myco-Rev1, Myco-Rev1tt, Myco-Rev1cat und Myco-Rev1ac, Sequenzen siehe Tab. 2.2.

Mögliche Mycoplasmen-DNA-Fragmente wurden anschließend unter Verwendung des folgenden PCR-Programms amplifiziert.



In die zweite PCR wurden anschließend 0,5 µl des PCR-Produkts der ersten PCR als Template eingesetzt. Dabei wurde der gleiche PCR-Ansatz verwendet, es wurde jedoch der Primer-Supermix 2 (bestehend aus je einem Teil Myco-Fw2, Myco-Fw2a, Myco-

Fw2cc, Myco-Rev2, Myco-Rev2ca und Myco-Rev2at, Sequenzen siehe Tab. 2.2.) eingesetzt.

Die Amplifikation erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie die erste PCR, allerdings wurden nur 30 Zyklen verwendet. In beiden Reaktionen wurden eine Negativ-Kontrolle (H₂O) und eine Positiv-Kontrolle (auf -20°C gelagerter Kulturüberstand mycoplasmenkontaminierter Zellen) mitgeführt. 4 µl der Produkte der zweiten PCR wurden anschließend mit 1 µl 5 x Auftragspuffer gemischt, gemeinsam mit einem DNA-Größenstandard (HAE III) auf einem 2 %igen Agarosegel mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid bei 120 V für 30 min aufgetrennt, mit Hilfe des Photosystems Eagle Eye II unter UV Licht sichtbar gemacht und für die Dokumentation fotografiert. In der folgenden Tabelle sind die Fragmentlängen für die verschiedenen detektierbaren Mycoplasmenstämme zusammengefasst.

Tab. 3.5: Übersicht über die Produktlängen beim Nachweis verschiedener Mycoplasmenstämme

Mycoplasmenstamm	Produktlänge der nested PCR (bp)
<i>M. hyopneumoniae</i>	237
<i>M. neurolyticum</i>	196
<i>M. fermentans</i>	195
<i>M. hyorhinis</i>	211
<i>M. orale</i>	179
<i>M. arthritidis</i>	157
<i>M. salivarium</i>	151
<i>M. hominis</i>	147, 148
<i>M. arginini</i>	145

3.2.4 Herstellung von Zellpellets

Für die Herstellung von Formalin-fixierten in Paraffin eingebetteten Zellpellets wurden 4 Zellkulturschalen (Ø 15 cm, 90 % konfluent) 3 x mit PBS (4°C, mit Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen, die Zellen mit einem Zellschaber in je 2 ml PBS abgeschabt und in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach der Sedimentation der Zellen für 5 min bei 4°C und 300 x g wurde das Pellet in 10 % Formalin resuspendiert und für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen in PBS gewaschen. Das Pellet wurde während einer Inkubation auf Eis mit 150 µl Thrombin (100 U/ml), 750 µl Casein (10 mg/ml) und 600 µl Fibrinogen (25 mg/ml) gemischt und auf zwei Eppendorfgefäße aufgeteilt. Anschließend wurden diese für 2 h bei 4°C inkubiert und die festgewordenen Pellets in einem Einbettautomaten in

Paraffinblöcke eingebettet. Von den entstandenen Blöcken wurden, wie in Kapitel 3.1.1 beschrieben, Schnitte angefertigt und für immunhistochemische Untersuchungen verwendet.

3.2.5 Chemosensitivitätsanalyse

3.2.5.1 Viabilitätsassay

Um den Einfluss verschiedener Chemotherapeutika auf die Viabilität der Magenkarzinomzelllinien zu untersuchen wurde der XTT-Assay verwendet, bei dem die jeweilige metabolische Aktivität (Surrogatmarker für Viabilität) der untersuchten Zellen mittels eines kolorimetrischen Verfahrens in 96-Well-Platten bestimmt werden kann. Der Assay basiert auf der Spaltung des gelben Tetrazoliums Salzes XTT (2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid), welche unter Zugabe eines Elektronenkopplungsreagenzes (N-methyl-dibenzopyrazin-Methylsulfat, PMS), durch eine mitochondriale Dehydrogenase unter Beteiligung des Koenzyms NADH bewirkt wird. Die Spaltung hat die Entstehung eines orangefarbenen wasserlöslichen Formazans zur Folge, welches anschließend in einem Multiwell-Spektralphotometer (ELISA-Platten-Lesegerät) bei einer Wellenlänge von 492 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm über die Ermittlung der Optische Dichte (OD) quantifiziert werden kann. Da die Umsetzung des Tetrazoliums Salzes nur in lebenden Zellen stattfindet und sich proportional zu Menge an lebenden Zellen verhält, kann somit die Zellproliferation oder Viabilität der untersuchten Zellen bestimmt werden.

3.2.5.1.1 Dosis-Wirkungs-Kurven und Bestimmung der IC_{50}

Der Einfluss der verschiedenen Chemotherapeutika auf die Viabilität wurde zunächst durch die Erstellung von Dosis-Wirkungs-Kurven ermittelt. Dazu wurden, angelehnt an das Protokoll des *US National Cancer Institute* (<http://dtp.nci.nih.gov/branches/btb/ivclsp.html>), parallel in zwei verschiedenen 96-Well-Platten Zellen in einer definierten Zellzahl (je nach Zelllinie zwischen $0,5 \times 10^3$ und 2×10^3) in 75 μ l Zellkulturmedium ausgelegt und im Brutschrank für 24 h inkubiert um die Anheftung zu ermöglichen. Nach Zugabe von 25 μ l Medium zu jedem Well der ersten Platte wurde

durch Zugabe von 50 µl eines frisch angesetzten XTT/PMS Gemischs (50:1) und einer Inkubation für 2 h bei 37°C die metabolische Aktivität der Zelllinien als Ausgangswert zum Zeitpunkt 0 (Tz) bestimmt. Den Zellen der zweiten 96-Well-Platte wurden unterschiedliche Konzentrationen der zu testenden Zytostatika in einem Volumen von 25 µl zugesetzt. Als Kontrolle wurden Zellen mitgeführt, die nur mit dem Lösungsmittel des jeweiligen Zytostatikums behandelt wurden. Zusätzlich wurden Leerwertproben eingeschlossen die nur das Zellkulturmedium, jedoch keine Zellen enthielten. Je nach Zytostatikum erfolgte die Inkubation für weitere 48 oder 96 h bevor der abschließende XTT-Test durchgeführt wurde. Bei der Verwendung des 96-stündigen Zeitschemas wurde das Zytostatikum-haltige Medium nach 48 h erneuert. In der folgenden Tabelle sind die Inkubationszeiten und verwendeten Endkonzentrationen der verschiedenen Zytostatika dargestellt.

Tab. 3.6: Inkubationszeiten und Zytostatika-Konzentrationen der Dosis-Wirkungs-Kurven

Zytostatikum	eingesetzte Endkonzentrationen	Inkubationszeit
Cisplatin	µM 1; 2,5; 5; 10; 25; 50	48 h
5-FU	µM 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50	48 h
DAC	µM 0,01; 0,1; 0,5; 1; 10; 50	96 h
Zebularin	µM 1; 50; 100; 250; 500; 750	96 h
SAHA	µM 1; 2; 3; 5; 10; 25	48 h
VPA	mM 0,3; 0,5; 1; 5; 10; 50	48 h

Die aus den XTT-Tests stammenden Daten der OD unter verschiedenen Versuchsbedingungen (unterschiedliche Zytostatika-Konzentrationen) können nun, korrigiert um die OD der Leerwertproben, unter Anwendung der nachfolgenden Formeln für die Berechnung der metabolischen Aktivität herangezogen werden:

Für $T_i \geq T_z$ gilt:

$$\left(\frac{T_i - T_z}{C - T_z}\right) \times 100 = \text{metabolische Aktivität [\%]}$$

Für $T_i < T_z$ gilt:

$$\left(\frac{T_i - T_z}{T_z}\right) \times 100 = \text{metabolische Aktivität [\%]}$$

In den angegebenen Formeln steht T_i für den OD-Wert des XTT-Tests nach der Behandlung mit dem jeweiligen Zytostatikum, T_z ist als OD-Wert des XTT-Tests zum Zeitpunkt 0 (24 h nach dem Auslegen der Zellen) definiert und C steht für den OD-Wert

des XTT-Tests der Kontrollzellen die nur mit dem Lösungsmittel und nicht dem Zytostatikum behandelt wurden.

Der Prozentsatz der metabolischen Aktivität kann nun gegen die jeweils verwendete Konzentration aufgetragen werden, woraus sich die Dosis-Wirkungskurve ergibt. Erhält man einen Wert von 100 % für die Behandlung mit einer bestimmten Zytostatika-Konzentration, so bedeutet dies, dass sich kein Einfluss auf die Proliferation oder Viabilität ergibt, die Zellen also in gleichem Maße aktiv sind wie Zellen, die nur mit dem Lösungsmittel behandelt wurden. Ein Wert von 0 % zeigt demnach an, dass die Zellzahl verglichen mit dem Ausgangszeitpunkt gleich geblieben ist. Ein Wert von -100 % sagt aus, dass alle Zellen während der Behandlung abgestorben sind. Um eine gewisse Aussage über die Sensitivität einer Zelllinie gegenüber einer getesteten Substanz treffen zu können, kann unter Verwendung der Dosis-Wirkungskurve anhand der Formel

$$((T_i - T_z) / (C - T_z)) \times 100 = 50$$

die Konzentration der Substanzen bestimmt werden, die eine Reduktion der metabolischen Aktivität um 50 % zur Folge hat. Diese Konzentration wird als IC₅₀ (Median Inhibitory Concentration) bezeichnet und kann zum Vergleich der Sensitivität verschiedener Zelllinien herangezogen werden. Je nach Fragestellung kann durch die Berechnung der Dosis-Wirkungskurve auch eine Konzentration für eine Substanz berechnet werden, die eine geringere Reduktion (z.B. IC₂₀) oder eine stärkere Reduktion (z.B. IC₇₀) der metabolischen Aktivität bewirkt. Zur Erstellung der Dosis-Wirkungskurven wurde für jeden Einzelwert eine Vierfachbestimmung durchgeführt und jeder Versuch mindestens dreimal unabhängig wiederholt.

3.2.5.1.2 Kombinationsbehandlung

Für die Kombination von Cisplatin (CP) mit den epigenetisch aktiven Zytostatika DAC und SAHA wurden verschiedene Kombinationsschemata verwendet. Dabei wurden sowohl für Cisplatin als auch für DAC und SAHA klinisch relevante Konzentrationen eingesetzt (Appleton *et al.*, 2007; Gyorffy *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2003; Stresemann *et al.*, 2006). Damit konnte die Wirkung der verschiedenen Kombination auf die Viabilität der Zelllinien jeweils mit der Wirkung der Einzelsubstanzen verglichen werden. Als Kontrollen wurden wiederum Zellen mitgeführt die lediglich mit dem Lösungsmittel der

jeweiligen Substanz behandelt wurden. In der folgenden Tabelle sind die verschiedenen Kombinationsschemata aufgeführt:

Tab. 3.7: Kombinationsschemata für eine Kombination von Cisplatin mit DAC bzw. SAHA

Kombination	Inkubationschema
DAC → CP ^a	1 µM DAC für 48 h, gefolgt von 2 µM Cisplatin für 48 h;
DAC → CP ^a /DAC	1 µM DAC für 48 h, gefolgt von 2 µM Cisplatin und 1 µM DAC für 48 h
CP ^a /SAHA	2 µM Cisplatin und 1,5 µM SAHA für 48 h
CP ^a → SAHA	2 µM Cisplatin für 24 h, gefolgt von 1,5 µM SAHA für 24 h
SAHA → CP ^a	1,5 µM SAHA für 24 h, gefolgt von 2 µM Cisplatin für 24 h

^a Cisplatin

Die Bestimmung der Viabilität der Zellen nach der Kombinationsbehandlung erfolgte ebenfalls mit dem XTT-Assay unter Verwendung der Formeln aus Abschnitt 3.2.5.1.1.

3.2.5.1.3 Synergismus-Analyse der Kombinationsbehandlung

Die Synergismus-Analyse wurde basierend auf der Methode von Chou und Talalay für die Kombinationen durchgeführt, die eine signifikante Reduktion der Zellviabilität zur Folge hatten. Mit dieser Methode wird ein Kombinations-Index (CI) berechnet, der durch die folgende Gleichung beschrieben werden kann:

$$CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 + (D)_1 \times (D)_2 / (D_x)_1 \times (D_x)_2$$

In dieser Gleichung repräsentieren $(D)_1$ und $(D)_2$ die Konzentration der Substanzen eins und zwei, die in der Kombination verwendet wurden und den Effekt X erzielen. $(D_x)_1$ und $(D_x)_2$ entsprechen den Konzentrationen der Substanzen eins und zwei, die den gleichen Effekt X erzielen, wenn sie einzeln angewendet werden. Dabei liefert der CI eine qualitative Information über die Art der Interaktion der beiden Substanzen. Dabei weist ein $CI < 1$ auf eine synergistische, ein $CI = 1$ auf eine additive und ein $CI > 1$ auf eine antagonistische Wirkung der beiden Substanzen hin (Chou *et al.*, 1984).

3.2.5.2 Koloniebildungstest

Für die Untersuchung des Einflusses der Chemotherapeutika auf die Fähigkeit der Zellen nach bzw. während einer Behandlung Kolonien zu bilden wurde der Koloniebildungstest

verwendet. Dafür wurden je 5×10^3 Zellen in 6-Well-Platten in 2 ml Zellkulturmedium ausgelegt und für 24 h bei 37°C inkubiert, um die Anheftung der Zellen zu ermöglichen. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 2 ml Zellkulturmedium ersetzt, welches die jeweilige Konzentration des verwendeten Zytostatikums (Cisplatin bzw. 5-FU) enthielt. Nach einer Inkubation von weiteren 48 h wurde das Medium erneut entfernt, die Zellen 2 x mit PBS gewaschen und mit frischem Zytostatika-freien Medium versehen. Nach einer anschließenden Inkubation der Platten für weitere 5 Tage wurden die entstandenen Kolonien unter Verwendung des *Diff-Quik* Färbesets gemäß den Angaben des Herstellers fixiert und durch Anfärben mit Eosin und Thiazin sichtbar gemacht. Die 6-Well-Platten wurden eingescannt und die Anzahl an gebildeten Kolonien mit Hilfe der Software ImageJ 14.2q bestimmt. Alle Versuche wurden in Triplikaten durchgeführt und mindesten dreimal unabhängig voneinander wiederholt.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Isolation von Nukleinsäuren

3.3.1.1 DNA Isolation

Zur Isolation genomischer DNA aus Magenkarzinomzelllinien wurden zwischen 5×10^5 und 1×10^6 Zellen aus ca. 80-90 % konfluenten Kulturen geerntet, für 5 min bei 300 x g und 4°C sedimentiert und 2 x mit kaltem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen wiederum sedimentiert und in 200 µl PK-Puffer resuspendiert. Nach der Zugabe von 2 µl Proteinase K (Endkonzentration 200µg/ml) wurden die Proben über Nacht in einem Thermoschüttler bei 55°C inkubiert. War die Lyse nicht ganz vollständig, wurden die Proben nochmals mit 2 µl Proteinase K versetzt und weitere 3 h inkubiert. Anschließend wurde die Proteinase K durch eine Inkubation bei 95°C für 10 min inaktiviert. Die DNA-haltige Lösung wurde nun bei -20°C eingefroren oder zur weiteren Aufarbeitung bei 4°C gelagert.

3.3.1.2 Aufreinigung von DNA

Da für verschiedene Anwendungen wie zum Beispiel für eine Methylierungsanalyse DNA von sehr guter Qualität benötigt wird, wurde diese durch eine Phenol-Chloroform-Fällung aufgereinigt. Dafür wurden *Phase Lock Gele™* in 1,5 ml Eppendorfgefäßen verwendet, die zunächst für 30 s zentrifugiert wurden (alle Zentrifugationsschritte wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei 13.000 rpm und RT durchgeführt). Anschließend wurde die DNA-Lösung aus dem Proteinase K Verdau (200 µl) auf das Gel gegeben. Nach der Zugabe von 200 µl einer 25:24:1 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Mischung wurden die Gefäße kräftig geschüttelt und für 5 min zentrifugiert. Der Überstand, der sich nun über dem Gel befand (wässrige, DNA-haltige Phase) wurde in ein neues Phase-Lock-Gefäß überführt und der Vorgang wurde wiederholt. Der verbliebene Überstand wurde anschließend mit 100 µl 7,5 M Ammoniumacetat, 750 µl eiskaltem Ethanol (100 %) und 1 µl einer 5 mg/ml Glycogenlösung gemischt und über Nacht bei -20°C inkubiert um die DNA zu fällen. Anschließend wurden die Proben für 3 h bei 4°C bei 13.000 rpm sedimentiert und das entstandene Pellet nach zweimaligem Waschen mit 70 %igem Ethanol in 30 µl H₂O aufgenommen. Vor dem Einfrieren der DNA bei -20°C zur Lagerung, erfolgte die Bestimmung der DNA-Konzentration mit dem Spektrophotometer *NanoDrop*.

3.3.1.3 Isolation von RNA

Die Isolation von Gesamt-RNA aus den Magenkarzinomzelllinien wurde mit Hilfe des *RNeasy®-Mini-Kit* durchgeführt. Zunächst wurden 1×10^6 Zellen aus 80 % konfluenten Kulturen geerntet für 5 min bei 300 g und 4°C sedimentiert und 2 x mit kaltem PBS gewaschen, in 1 ml kaltem PBS aufgenommen, in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß überführt und 1 min bei 4°C und 13.000 rpm sedimentiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 175 µl (nicht im *RNeasy®-Mini-Kit* enthaltenen) RLN-Puffer (siehe Abschnitt 2.11) resuspendiert, für 5 min auf Eis inkubiert und für 2 min bei 4°C und 13.000 rpm sedimentiert. Der Überstand wurde in eine neues Gefäß überführt und mit 600 µl RLT Puffer versetzt. Nach dem Mischen der Lösung auf dem Vortexer, wurden 430 µl 96 %iges Ethanol zugegeben, die Lösung durch pipettieren gemischt und

nacheinander je 600 µl der Mischung auf die Extraktionssäule gegeben und jeweils für 30 s bei RT und 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen und durch die Zugabe von 700 µl RW1 Puffer, erneuter Zentrifugation und zweimaliger Zugabe von 500 µl RPE-Puffer wurde die an der Säule haftende RNA gereinigt. Nach einem Trocken-zentrifugationsschritt wurde 50 µl RNase-freies Wasser auf die Säule gegeben und 5 min bei RT inkubiert. Durch einen Zentrifugationsschritt von 1 min bei 13.000 rpm wurde die RNA eluiert. Vor dem Einfrieren der RNA bei -80°C zur Lagerung, erfolgte die Bestimmung der Konzentration mit dem Spektrophotometer *NanoDrop*.

3.3.2 cDNA Synthese aus Gesamt-RNA (Reverse Transkription)

Das Umschreiben von Gesamt-RNA in cDNA ist die Grundvoraussetzung für die Bestimmung der Menge eines spezifischen Transkripts in einer Probe und wird als Reverse Transkription bezeichnet. Bei dieser Reaktion wird eine virale reverse Transkriptase verwendet, welche aus RNA mit Hilfe von kurzen Oligonukleotiden mit freien 3'OH Enden (Random Hexamere) unter Verwendung von dNTPs einen komplementären cDNA Strang synthetisieren kann. Dafür wurde zunächst 1 µg RNA mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 17,5 µl gebracht, 1 µl Random Hexamere (200 ng/µl) hinzugegeben und der Ansatz für 5 min bei 70°C in einem Thermoblock inkubiert um die Anlagerung der Hexamere zu ermöglichen. Anschließend wurde der Ansatz für ca. 5 min auf Raumtemperatur abgekühlt und diesem 6 µl RT Puffer, 3 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTPs, 0,5 µl *RNaseOUTTM* und 1 µl reverse Transkriptase (200 U *SuperscriptTM II*) zugesetzt. Die Reverse Transkription wurde dann für 1 h bei 42°C auf einem Thermolock durchgeführt und die cDNA bei -20°C gelagert.

Zur Kontrolle der reversen Transkription und zum Ausschluss einer Verunreinigung mit genomischer DNA wurde anschließend an die cDNA-Synthese eine PCR durchgeführt, bei der das Transkript der Untereinheit B der Pyruvat-Dehydrogenase (PDHB) amplifiziert wurde. Die dafür eingesetzten Primer sind so ausgewählt, dass sich bei der Amplifikation von cDNA ein Produkt von 103 bp ergibt, bei der Amplifikation von genomischer DNA aber ein Produkt von 185 bp. Nach einer gelelektrophoretischen Auftrennung des PCR-Produkts kann daher eine Verunreinigung mit genomischer DNA

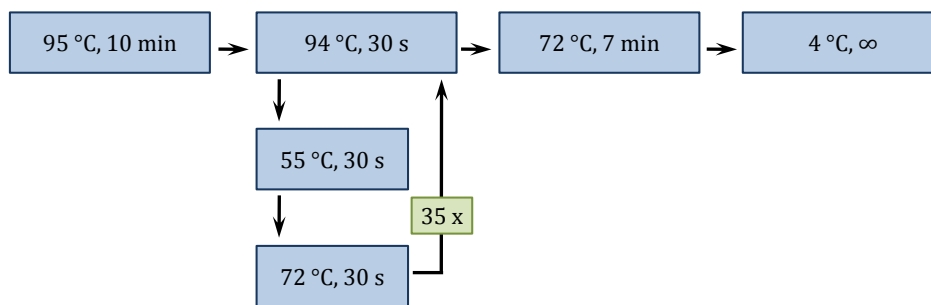
durch das Auftreten einer Bande bei 185 bp erkannt werden. Tab. 3.8 zeigt den verwendeten PCR Ansatz.

Tab. 3.8: PCR Ansatz zu Überprüfung der cDNA-Synthese

	Menge pro Reaktion ^a in µl	Endkonzentration in der PCR
H ₂ O	15,25	
Tris-HCl pH 8,3 (100 mM)	} 10x PCR Puffer	10 mM
KCl (500 mM)		50 mM
Gelatine (0,1%)		0,01 %
MgCl ₂ (15 mM)		1,5 mM
dNTPs (je 1,25 mM)	4	je 200 µM
Primer PDHB-Fw ^b (20 pmol/µl)	0,5	0,4 µM
Primer PDHB-Rev ^b (20 pmol/µl)	0,5	0,4 µM
Taq-Polymerase (5000 U/ml)	0,25	1,25 U
Probe	2	

^a 25 µl Ansatz; ^b Sequenz siehe Tab. 2.3

Die Amplifikation wurde unter Verwendung des folgenden Programms durchgeführt:



Anschließend wurden 4 µl des PCR Produkts mit 1 µl 5x Auftragspuffer gemischt, gemeinsam mit einem DNA-Größenstandard (HAE III) auf einem 2 %igen Agarosegel mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid bei 120 V für 30 min aufgetrennt, mithilfe des Photosystems Eagle Eye II unter UV-Licht sichtbar gemacht und für die Dokumentation fotografiert.

3.3.3 Quantitative Real-Time PCR

3.3.3.1 Grundlagen der quantitativen Real-Time PCR mit *TaqMan*[®]-Sonden

Zur Untersuchung möglicher unterschiedlicher Expressionsstärken der DNA-Methyltransferasen in den Magenkarzinomzelllinien auf mRNA Ebene wurde die Methode der quantitativen Real-Time PCR unter Verwendung von *TaqMan*[®]-Sonden durchgeführt. Mit dieser Methode kann cDNA in einer PCR amplifiziert werden, wobei die Amplifikatmenge nach jedem PCR-Zyklus bestimmt wird (*real time*). Die Detektion des PCR-Produktes erfolgt dabei über eine fluoreszenzmarkierte Sonde, die spezifisch an die Zielsequenz bindet. Die *TaqMan*[®]-Sonden zeichnen sich durch die Markierung mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff an einem Ende der Sonde und der Markierung mit einem *Quencher* („Löcher“) auf der anderen Seite aus. Basierend auf dem Prinzip des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) wird dabei die durch Anregung bei einer bestimmten Wellenlänge entstehende Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes (Donor), vom *Quencher* (Akzeptor) unterdrückt, wenn sich die beiden in ausreichender Nähe befinden (Didenko, 2001). Geht diese Nähe aufgrund der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase, die zur Hydrolyse der Sonde bei der Primerverlängerung führt, verloren, so kann das Fluoreszenzsignal des Reporters abgestrahlt und gemessen werden. Dabei verdoppelt sich idealerweise bei jedem PCR-Zyklus die messbare Fluoreszenzintensität, die sich proportional zur zu Beginn der Reaktion in der Probe befindlichen Zielsequenz verhält. In Abb. 3.1 ist die Funktionsweise der *TaqMan*[®]-Sonden schematisch dargestellt:

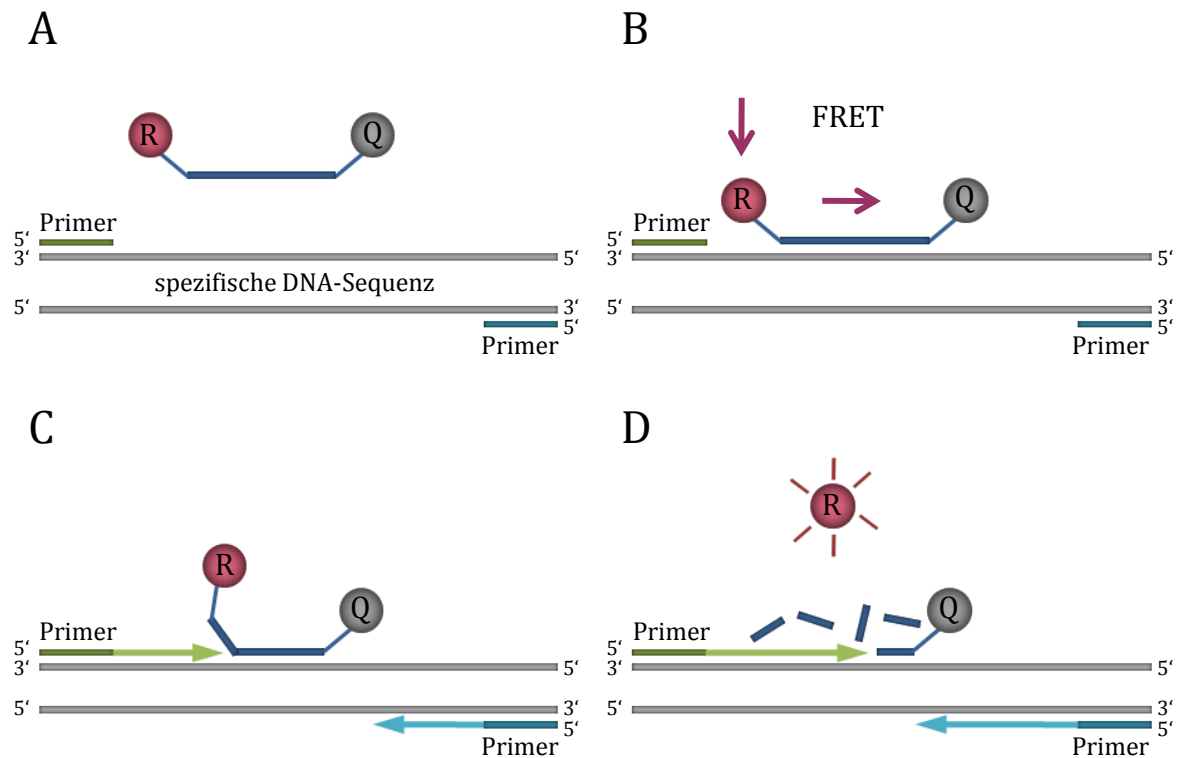


Abb. 3.1: Funktionsweise von TaqMan®-Sonden: (A) Für die Real-Time PCR können TaqMan®-Sonden verwendet werden, die mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (R) und einem Quencher (Q) markiert sind. (B) Die TaqMan®-Sonde bindet bei ihrer optimalen Annealingtemperatur an die spezifische DNA-Sequenz, wobei die Fluoreszenz des Reporters aufgrund des Förster-Resonanzenergietransfers (FRET) durch den Quencher unterdrückt wird. (C) Während der PCR werden die Primer verlängert und die Sonde wird teilweise vom DNA-Strang abgelöst. (D) Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase wird die Sonde abgebaut und die Fluoreszenz des Reporters kann aufgrund der fehlenden Nähe zum Quencher nicht mehr unterdrückt werden, was zu einem messbaren Fluoreszenzsignal führt.

Für die Quantifizierung der Amplifikatmenge muss die Fluoreszenz in der exponentiellen Phase der PCR gemessen werden. Dafür wird der Ct-Wert (*cycle threshold*) bestimmt, der den Zyklus der PCR angibt, bei dem das Fluoreszenzsignal zum ersten Mal über den Grenzwert der Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Je größer dabei die Ausgangsmenge der spezifische cDNA in einer Probe ist, desto weniger PCR-Zyklen werden benötigt um die Hintergrundfluoreszenz zu übersteigen (siehe Abb. 3.2.).

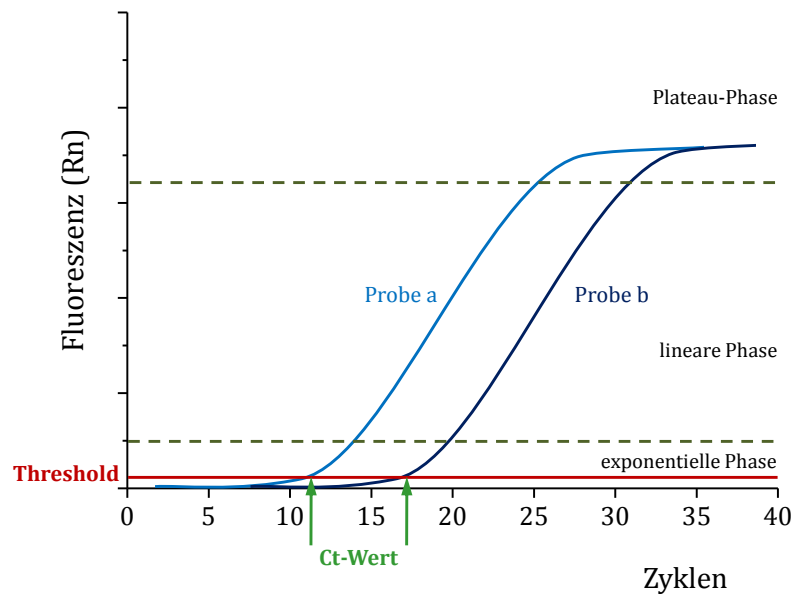


Abb. 3.2: Schematische Darstellung der Quantifizierung spezifischer cDNA durch die Ermittlung des Ct-Wertes. In der Grafik ist die Fluoreszenzintensität gegen den PCR-Zyklus aufgetragen. Die Kurven stellen die ansteigende Fluoreszenzintensität der Proben a und b dar, die in der Real-Time PCR amplifiziert werden. Der Ct-Wert gibt den PCR-Zyklus an, bei dem die gemessene Fluoreszenz zum ersten Mal die Hintergrundfluoreszenz übersteigt.

3.3.3.2 Durchführung der Quantitativen Real-Time PCR

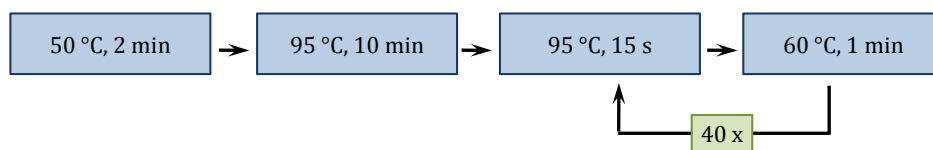
Sowohl für die Expressionsanalyse von DNMT1 als auch DNMT3b wurden vorgefertigte Expressions-Assays eingesetzt (siehe Tab. 2.1), wobei bei der Auswahl darauf geachtet wurde, dass die Primer Intron-Grenzen überspannen, um eine Amplifikation von genomischer DNA zu vermeiden. Für die Amplifikation von cDNA in der Real-Time PCR wurde das *qPCR Core Kit* von Eurogentec eingesetzt. Alle Reaktionen wurden auf dem *ABI Prism 7700 Sequence Detector* (Applied Biosystems) durchgeführt und liefen in 96-Well-Platten in Triplikaten ab. In jedem Versuch wurde eine Kontrolle mitgeführt, die keine cDNA enthielt, um Kontaminationen in den Reaktionen ausschließen zu können. Die aus den Zelllinien stammende cDNA wurde unverdünnt eingesetzt. Um Schwankungen aufgrund von Unterschieden in der eingesetzten RNA-Menge und der Effektivität der cDNA-Synthese zu eliminieren wurde die Expressionsdaten der Zielgene auf die Expression des *Housekeeping*-Gens 18s rRNA normalisiert, wobei hier die cDNA in einer 1:100 Verdünnung eingesetzt wurde. Die Vergleichbarkeit unterschiedlicher Läufe wurde durch das Mitführen einer cDNA Lösung mit bekannter 18s rRNA-Konzentration als Kalibrator gewährleistet. Die Quantifizierung der Expression wurde

unter Verwendung der Standardkurven-Methode durchgeführt. Dafür wurde zunächst mittels cDNA aus der Zelllinie MKN28 ein PCR Produkt von DNMT1 und DNMT3b generiert, welches mit dem *QIAquick PCR Purification Kit* von Qiagen gemäß den Angaben des Herstellers aufgereinigt wurde. Nach der Bestimmung der Konzentration des PCR-Produkts wurden unter Verwendung der Formel

$$1 \mu\text{g einer } 1000 \text{ bps DNA} = 9,1 \times 10^{11} \text{ Kopien}$$

serielle Verdünnungen hergestellt (1×10^6 bis 1×10^2 Kopien) und in der Real Time PCR eingesetzt. Dabei wurden für einen 22 μl Ansatz 2,2 μl 10 x Reaktionspuffer, 2,2 μl 50 mM MgCl_2 , 0,9 μl 5mM dNTPs, 1,1 μl 20x Primer/Sonden-Mix, 0,1 μl *HotGoldStar Polymerase*, 13,5 μl H_2O und 2 μl der Probe in die Reaktion eingesetzt. Dabei entsprach die Endkonzentration der Primer je 900 nM und die der Sonde 250 nM.

Die Amplifikation erfolgte unter Verwendung des folgenden PCR-Programms.



Die Erstellung der Standardkurven erfolgte anschließend durch das Auftragen der Ct-Werte gegen die Kopienzahl und der Verwendung einer Trendkurve zur Ermittlung der Geradengleichung. In den folgenden Abbildungen sind die Standardkurven für DNMT1 und DNMT3b dargestellt:

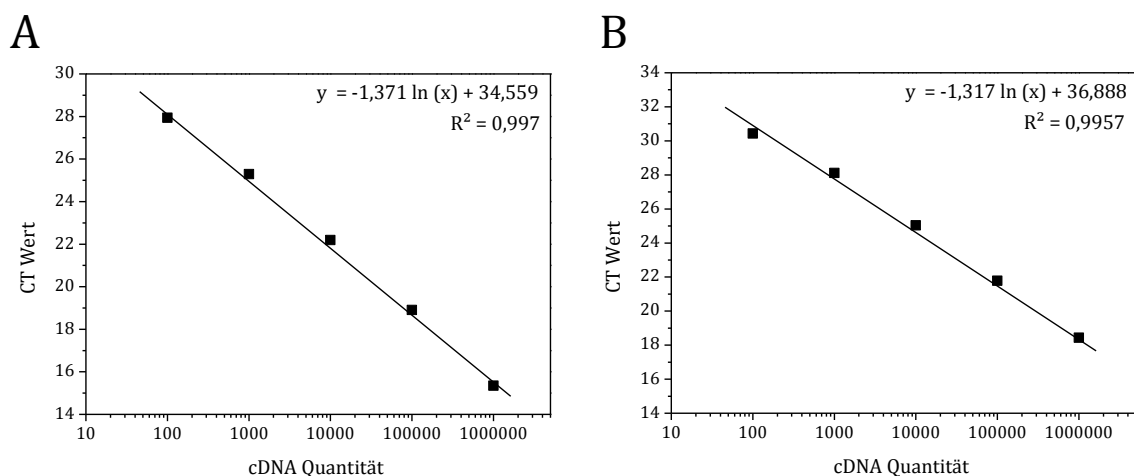


Abb. 3.3: Standardkurven für DNMT1 und DNMT3b zur Quantifizierung in der Real-Time PCR.

Das PCR-Protokoll zur Bestimmung der DNMT1 und 3b Expression in den Zelllinien wurde analog zum Versuchsansatz für die Herstellung der Standardkurven durchgeführt. Anschließend wurden die ermittelten Ct-Werte in die nach x aufgelöste Geradengleichung eingesetzt und dadurch die Kopienzahl (Quantität) bestimmt. Durch die Normalisierung auf die Quantität der 18s rRNA konnte die relative mRNA Menge des jeweiligen Zielgens bestimmt werden.

3.3.4 Methylierungsanalyse und Bestimmung von Kopienzahlveränderungen

3.3.4.1 Grundlagen der MS-MLPA (*methylation specific multiplex ligation-dependent probe amplification*) Technik

Um den Methylierungsstatus und mögliche Veränderungen der Kopienzahlen verschiedener Gene in den Zelllinien zu untersuchen wurde die MS-MLPA-Technik eingesetzt. Es handelt sich dabei um eine PCR-basierte Methode, die es erlaubt in vier aufeinander folgenden Teilschritten sowohl den Methylierungsstatus von CpG-Inseln, die sich im Promotorbereich verschiedener Tumorsuppressorgene befinden, zu bestimmen, als auch die vorhandene Kopienzahl dieser Gene zu untersuchen. Dabei kann in einem Reaktionsgefäß der Methylierungsstatus von 24 Genen und die Kopienzahl von 39 Genen einer DNA-Probe untersucht werden (Nygren *et al.*, 2005). Die vier Teilschritte bestehen aus einem Denaturierungs- und Hybridisierung-Schritt, einem Ligations- und Verdau-Schritt, einer PCR und einer anschließenden Fragmentanalyse. Zunächst wird die DNA der Proben denaturiert und mit den SONDENSEQUENZEN DES MS-MLPA-KITS (*SALSA® MS-MLPA® KIT ME001-B Tumor suppressor-1*; MCR-Holland) hybridisiert (Abb. 3.4 A). Diese setzen sich aus zwei Teilstücken mit jeweils einer spezifischen Sequenz für das zu untersuchende Gen und einer Universal-Primer-Sequenz zusammen. Ein Teilstück enthält zusätzlich eine Füllsequenz, die für jedes untersuchte Gen eine unterschiedliche Länge aufweist, um die einzelnen, nach Teilschritt drei entstandenen PCR-Produkte ihrer Größe nach unterscheiden zu können. Im zweiten Teilschritt wird die denaturierte und hybridisierte Probe aufgeteilt, die eine Hälfte mit einer Ligase und einem methylierungssensitiven Restriktionsenzym versehen,

die zweite Hälfte nur mit Ligase. Die Ligase-Aktivität führt in beiden Probenhälften zu einer Ligation der Teilstücke der Sondensequenz. Das Restriktionsenzym sorgt dafür, dass DNA und Sonde wieder zerschnitten werden, wenn das spezifische CpG-Dinukleotid nicht methyliert ist (Abb. 3.4 B). Dies führt dazu, dass in der dritten Reaktion, der PCR, nur die methylierten Proben amplifiziert werden können (Abb. 3.4 C). Vergleicht man nun die Teilprobe mit und ohne Restriktionsverdau durch eine Fragmentanalyse, lässt sich für jede Probe eine Aussage über den Methylierungsstatus der verschiedenen CpG-Dinukleotide treffen (Abb. 3.4 D).

Für die Bestimmung der Kopienzahl der verschiedenen Gene jeder Probe werden nur die ungeschnittenen Teilproben verwendet, die mit einer Kontroll-DNA verglichen werden um eine Amplifikation oder den Verlust eines Genes zu detektieren. Zur Auswertung der Daten der Fragmentanalyse wurde die Software Coffalyser V 7 verwendet. Für die Auswertung des Methylierungsstatus wird hierbei für jedes Gen das Verhältnis zwischen der geschnittenen und der ungeschnittenen Teilprobe errechnet. Dabei wurde ein Gen bei einem Verhältnis (Ratio) von 0 bis 0,19 als unmethyliert, bei einem Verhältnis von 0,2 bis 0,69 als mittelstark methyliert, und bei einem Verhältnis $> 0,69$ als stark methyliert definiert (Worsham *et al.*, 2006). Die Auswertung der Kopienzahl erfolgt durch die Berechnung des Signal-Verhältnisses zwischen den ungeschnittenen Teilproben und einer Kontroll-DNA, die jeweils zwei Kopien der betreffenden Gene besitzt. Hier wurde ein Verhältnis von 0 als homozygoter Allelverlust und ein Verhältnis von 0,1 bis 0,69 als Verlust eines Allels gewertet. Ein Wert von 0,7 bis 1,3 zeigte das Vorhandensein von zwei Kopien an, ein Wert von $> 1,3$ wurde als eine Amplifikation gewertet (Worsham *et al.*, 2006). Tab. 3.9 gibt eine Übersicht über die im verwendeten SALSA® MS-MLPA® KIT ME001-B *Tumor suppressor-1* enthaltenen Sonden.

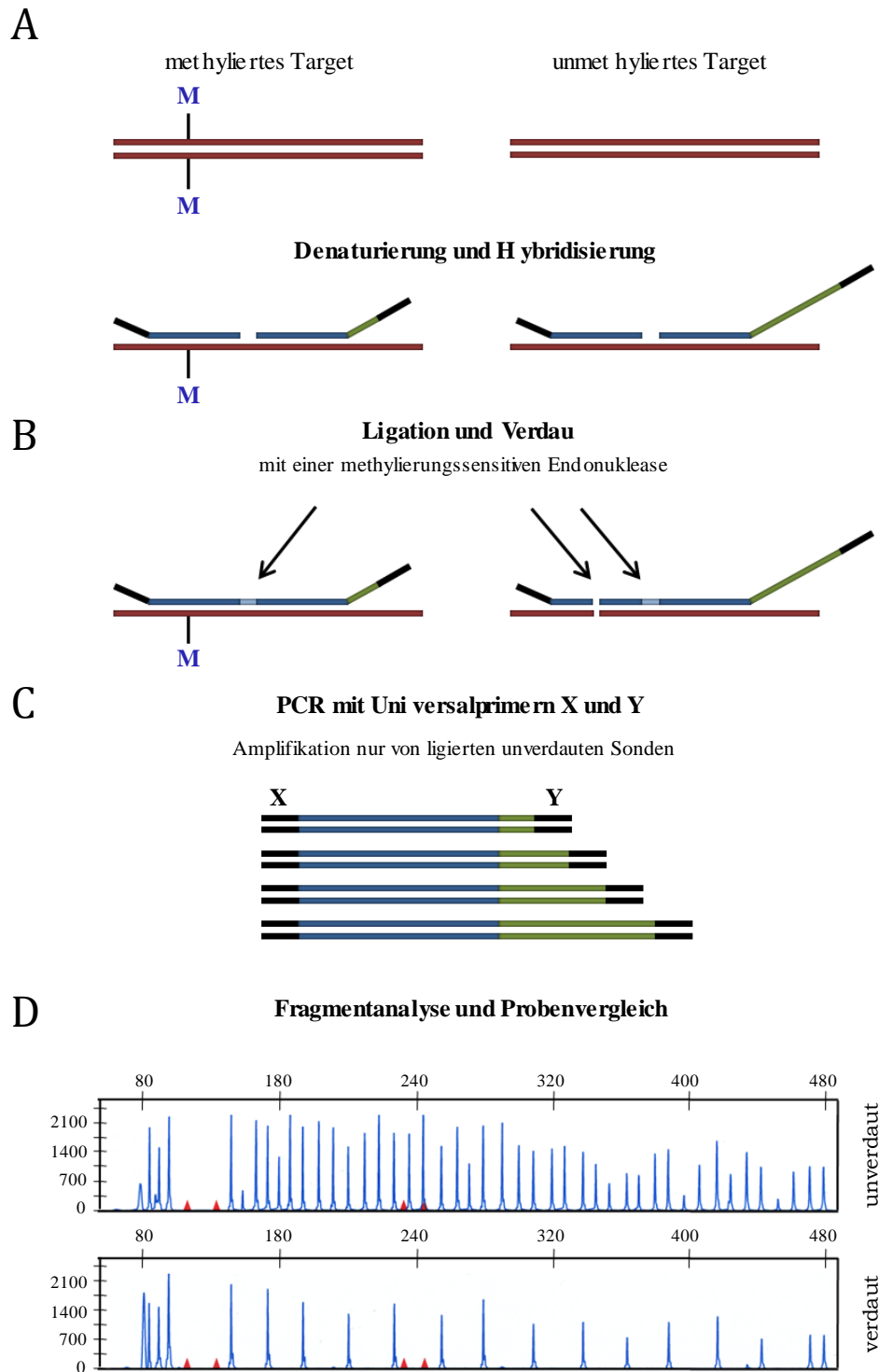


Abb. 3.4: Schematische Darstellung des MS-MLPA-Tests. (A) Die DNA wird denaturiert und mit den Sonden des MS-MLPA-Kits, bestehend aus zwei Teilen und gekoppelt an eine Füll-Sequenz und die Primersequenzen X und Y, hybridisiert. (B) Durch Inkubation einer Hälfte der Probe mit einer Ligase und einer methylierungssensitiven Nuklease werden die beiden Teile der Sonde ligiert und nicht methylierte DNA zerschnitten. Die andere Hälfte der Probe wird nur ligiert. (C) Beide Teilproben werden in eine PCR eingesetzt bei der nur DNA amplifiziert wird, die methyliert vorliegt. (D) Der Vergleich der Teilproben in einer Fragmentanalyse erlaubt die Bestimmung von methylierten und nicht methylierten CpG-Dinukleotiden. Modifiziert nach Nygren et al., 2005.

Tab. 3.9: Übersicht über die im SALSA® MS-MLPA® KIT enthaltenen Sonden

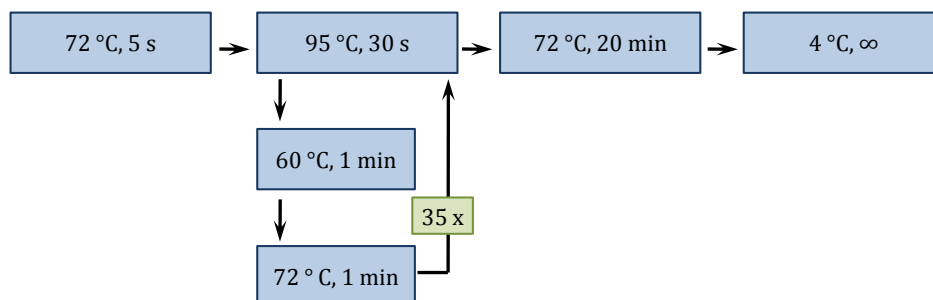
Gen	Sonden ID	Chromosomale Position	Länge des PCR Produkts (bp)
TP73	4050-L1263 ^M	01p36	400
CASP8	2761-L2210 ^M	02q33-q34	265
VHL	3810-L1211 ^M	03p26-p25	355
RARB	4040-L1698 ^M	03p24	193
MLH1	1686-L1266 ^M	03p21.3	166
MLH1	2260-L1747 ^M	03p21.3	463
RASSF1	2248-L1734 ^M	03p21.3	328
RASSF1	3807-L2159 ^M	03p21.3	382
FHIT	2201-L1699 ^M	03p14.2	409
APC	2065-L1586 ^M	05q21	148
ESR1	2202-L1700 ^M	06q25.1	373
CDKN2A	1524-L1744 ^M	09p21	160
CDKN2B	0607-L0591 ^M	09p21	211
DAPK1	1677-L1257 ^M	09q34.1	346
PTEN	2203-L1701 ^M	10q23.31	292
CD44	3817-L1731 ^M	11p13	319
GSTP1	1638-L1176 ^M	11q13	454
ATM	4044-L3849 ^M	11q22.3	184
IGSF4	3819-L3848 ^M	11q23	427
CDKN1B	7949-L7730 ^M	12p13.1	274
CHFR	3813-L3753 ^M	12q24.33	238
BRCA2	4042-L3755 ^M	13q12	301
CDH13	7946-L7727 ^M	16q24.2	436
HIC1	3804-L0949 ^M	17p13.3	220
BRCA1	5162-L4543 ^M	17q21	247
TIMP3	2255-L3752 ^M	22q12.3	142
CTNNB1	3984-L3251 ^C	03p22	472
CASR	2683-L2148 ^C	03q13.3-q21	481
PARK2	3366-L2750 ^C	06q25.2-q27	154
CDK6	3184-L2523 ^C	07q21.3	310
CREM	0981-L0566 ^C	10p12.1	136
AI651963	1234-L0781 ^C	10p14	364
TNFRSF1A	0554-L01c23 ^C	12p13	175
TNFRSF7	0678-L0124 ^C	12p13	445
PAH	2334-L1820 ^C	12q23	229
BRCA2	1617-L1199 ^C	13q12.3	418
MLH3	1245-L0793 ^C	14q24.3	202
TSC2	1832-L1397 ^C	16p13.3	283
CDH1	2416-L1862 ^C	16q22.1	337
BCL2	0587-L0382 ^C	18q21.3	256
KLK3	0713-L0108 ^C	19q13	391

^M Sonden mit Hha1 Schnittstelle für die Methylierungsanalyse und die Bestimmung der Kopienzahl

^C Sonden ohne Hha1 Schnittstelle, fungieren in der Methylierungsanalyse als Kontrollen und werden für die Bestimmung der Kopienzahl verwendet

3.3.4.2 Durchführung des MS-MLPA-Tests

Die Durchführung des MS-MLPA Tests erfolgte mit DNA, die durch Proteinase K Verdau und Phenol-Chloroform-Fällung aus den Magenkarzinomzelllinien gewonnen wurde. Als Kontrolle wurde eine aus Lymphozyten extrahierte DNA einer gesunden Person mitgeführt. Alle Versuche wurden in 0,2 µl Eppendorf-Gefäßen im PCR-Gerät 2720 *Thermal Cycler* durchgeführt. Zunächst wurde die DNA auf 80 ng/µl eingestellt und davon 5 µl (400 ng) im PCR-Gerät für 10 min auf 98°C erhitzt (Denaturierung). Nach dem Abkühlen wurden 1,5 µl SALSA-Sonden-Mix und 1,5 µl MLPA Puffer zugegeben und sorgfältig gemischt. Der Ansatz aus DNA und SALSA-Sonden wurde für 1 min bei 95°C erhitzt und anschließend für 16-18 h im PCR-Gerät bei 60°C inkubiert (Hybridisierung). Nach Zugabe von 3 µl Ligase-Puffer A und 10 µl H₂O (Merck) wurden 10 µl des Ansatzes in ein neues Gefäß überführt. Beide Ansätze wurden nun für mindestens 1 min bei 49°C inkubiert und anschließend wurde ein Ansatz im PCR-Gerät bei einer Temperatur von 49°C mit 1,5 µl Ligase-65-Puffer, 8,25 µl H₂O und 0,25 µl Ligase-65 gemischt. Der andere Ansatz wurde, ebenfalls im Gerät, mit 1,5 µl Ligase-65-Puffer, 7,85 µl H₂O, 0,25 µl Ligase-65 und 0,4 µl Restriktionsenzym HhaI gemischt. Beide Ansätze wurden nun für 30 min bei 49°C und anschließend für 5 min bei 98°C inkubiert (Ligation und Verdau). Für die nachfolgende PCR wurden in einem neuen Reaktionsgefäß 15,75 µl H₂O, 2 µl SALSA PCR-Puffer, 1 µl SALSA PCR-Primer 1 µl SALSA Enzym Verdünnungspuffer und 0,25 µl SALSA Polymerase gemischt, 5 µl des Verdaus bzw. der Ligation zugegeben und in das auf 72°C vorgeheizten PCR-Gerät gestellt. Die PCR wurde unter Verwendung des folgenden Protokolls durchgeführt:



Die Fragmentanalyse der in der PCR generierten Produkte wurde mit dem *3130 Genetic Analyser* (Applied Biosystems) durchgeführt. Dafür wurden 5 µl der PCR-Produkte mit 15 µl Formamid und 0,5 µl ROX 500 Größenstandard in 96-Well Platten vorgelegt, 2 min bei 95 °C inkubiert und nach den Angaben des Herstellers analysiert. Die Analyse ergibt dabei quantitative Werte für die Intensitäten der einzelnen Signale der amplifizierten Fragmente. Die Auswertung der Messergebnisse erfolgte mit der von MCR-Holland bereitgestellten Software Coffalyser V 7. Dabei wurde für die Methylierungs-Analyse nach einer Normalisierung mit den Kontrollproben das Verhältnis der Intensitäten der einzelnen Signale zwischen den korrespondierenden verdauten und unverdauten Proben gebildet. Für die Kopienzahlanalyse wurden nur die unverdauten Proben verwendet und mit der mitgeführten Kontroll-DNA verglichen.

3.3.5 Direkte Sequenzierung von DNA

Um die Identität der verwendeten Magenkarzinomzelllinien zu bestätigen wurde für jede Zelllinien mindestens eine bekannte Mutation überprüft. Dies wurde mit einem im Rahmen der molekularpathologischen Diagnostik des Instituts etablierten Protokoll mittels direkter DNA-Sequenzierung durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte unter Verwendung einer Cycle-PCR mit fluoreszenzmarkierten *BigDye*-Terminatoren und anschließender Auftrennung mit dem Genetic Analyzer 3100. Die Primersequenzen für die jeweiligen Exons der Gene *CDH1*, *CTNNB1*, *K-RAS* und *TP53* sind in Tab. 2.5 verzeichnet. Die jeweiligen Mutationen sind in Abschnitt 2.2 aufgeführt.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Zellaufschluss zur Herstellung von Protein-Lysaten

Zur Herstellung von Proteinlysaten wurden die Zellen bis zu 90 %iger Konfluenz in Zellkulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm kultiviert. Zum Zeitpunkt der Lyse wurden die Schalen auf Eis gestellt, das Medium entfernt und der Zellrasen zweimal mit kaltem PBS gewaschen. Unter Verwendung eines Zellschabers wurden ca. 5×10^6 Zellen von der Schale in 150 µl *T-Per* Puffer (supplementiert mit Proteinaseinhibitor-

Tabletten) abgelöst und für 20 min unter gelegentlichem Mischen auf dem Vortexer auf Eis inkubiert. Die Proben wurden anschließend für 20 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert. Die proteinhaltigen Überstände wurden abgenommen und bei -80°C eingefroren. Ein Aliquot von 5 µl wurde für die Bestimmung der Proteinkonzentration verwendet.

3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration der hergestellten Proteinlysate wurde mit der Methode nach Bradford (1967) durchgeführt. Grundlage dieser Methode ist die Bindung des Farbstoffes *Coomassie Brilliant Blue G-250* an positiv geladene Reste der Proteine im sauren Milieu. Das Absorptionsmaximum des Farbstoffes verschiebt sich durch die Bindung an Proteine von 465 nm nach 595 nm wodurch ein Farbumschlag von rötlich-braun nach blau erfolgt, der sich proportional zur Proteinmenge verhält (Bradford, 1976). Der Farbumschlag kann somit in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 595 nm quantifiziert werden. Dafür wurde zunächst das Bradford-Reagenz (*Protein Assay Dye Reagent Concentrate*) im Verhältnis 1:5, eine Proteinlösung (*Bio Rad Protein-Standard II*) mit bekannter Proteinkonzentration (1,48 mg BSA/ml) im Verhältnis 1:10 mit H₂O bidest. verdünnt und eine Standardkurve erstellt (siehe Tab. 3.10).

Tab. 3.10: Standardkurve für die Proteinbestimmung nach Bradford

<i>Protein Assay Dye Reagent Concentrate</i> (1:5)	<i>Protein Standard II</i> (1,48 mg BSA/ml) (1:10)	Proteinkonzentration in µg/ml
990 µl	10 µl	1,48
970 µl	30 µl	4,44
950 µl	50 µl	7,40
930 µl	70 µl	10,36

Um die Proteinbestimmung der Proben durchzuführen, wurden 995 µl des verdünnten Bradford-Reagenz mit 5 µl Probe gemischt und alle Ansätze für 5 min bei RT inkubiert. Die Bestimmung der Optischen Dichte der Proben wurde in 1 ml Plastikkuvetten mit dem *UV/Vis Spectrophotometer DU® 530* bei einer Wellenlänge von 595 nm durchgeführt. Auf der Grundlage des Lambert-Beer'schen Gesetzes wurde mit Hilfe der Standardkurve die Proteinkonzentration der Proben berechnet.

3.4.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinen (SDS-PAGE)

Die denaturierten Proteine wurden durch vertikale, diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) elektrophoretisch aufgetrennt (Laemmli, 1970). Proteine können entsprechend ihrer jeweiligen Aminosäure-Zusammensetzung entweder positiv oder negativ geladen sein. Das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich an das gesamte Protein an, linearisiert es und verleiht ihm eine negative Ladung. Dies ermöglicht die Auftrennung von Proteinen entsprechend ihres Molekulargewichts, da diese im elektrischen Feld unabhängig von ihrer Eigenladung zur Anode wandern. Unter Verwendung des *Mini-PROTEAN® 3 Cell Systems* wurden Gele mit Glasplatten und Abstandhaltern von 1,5 mm Dicke gegossen. Es wurde ein 10 %iges Trenngel und ein 5 %iges Sammelgel verwendet (siehe Tab. 3.11). Die Auftragstaschen wurden durch einen Kamm geformt, der nach vollständiger Polymerisierung des Sammelgels entfernt wurde. Die Proben wurden mit 5 x Laemmli-Puffer (siehe Abschnitt 2.11) versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Pro Geltasche wurden in der Regel zwischen 30 bis 50 µg Proteinlysate aufgetragen. Als Größenstandard wurden 5 µl des vorgefärbte Proteinmarker *Dual Color Precision Plus Protein™ Standard* von Biorad verwendet. Um gleiche Salzkonzentrationen in jeder Spur zu gewährleisten wurden unbenutzte Geltaschen mit 5-10 µl 5 x Laemmli-Puffer beladen.

Die Elektrophorese erfolgte bei 120 V für ca. 75 min mit dem Laufpuffer für SDS-PAGE (siehe Abschnitt 2.11). Anschließend wurden die Proteine im Western Blot (siehe Abschnitt 3.4.4) auf Nitrozellulosemembranen übertragen.

Tab. 3.11: Schema zu Herstellung von Trenn- und Sammelgelen

Lösung	Sammelgel (5%)	Trenngel (10%)
H ₂ O	3,05 ml	7,33 ml
0,5 M Tris, pH 6,8	1,25 ml	-
1 M Tris, pH 8,8	-	3,75 ml
40 % Acrylamid/Bis	630 µl	3,75 ml
20 % SDS	25 µl	75 µl
10 % APS	40 µl	90 µl
TEMED	4 µl	9 µl

3.4.4 Übertragung von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran (Western Blot)

Für den immunologischen Nachweis der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine durch Antikörper wurden diese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Towbin *et al.*, 1992). Für den Transfer wurde die *Mini Trans-Blot Cell System* Nassblot-Apparatur von Biorad verwendet. Zunächst wurde mit Bleistift die Rückseite der Nitrozellulosemembran markiert. Schwämme, Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran wurden 5 min in Transfer-Puffer (siehe Abschnitt 2.11) eingeweicht. Zwischen die Transfer-Halterung wurden im „Sandwich-Verfahren“ Schwamm, Filterpapier, Acrylamidgel, Nitrozellulosemembran, ein weiteres Filterpapier und ein zweiter Schwamm gelegt. Eventuelle Luftblasen zwischen Nitrozellulosemembran und Acrylamidgel wurden vorsichtig entfernt. Anschließend wurde die Halterung so in die Blot-Apparatur gehängt, dass sich die Nitrozellulosemembran auf der zur Anode gewandten Seite des Acrylamidgels befand. Nachdem die Blot-Apparatur mit Transferpuffer aufgefüllt wurde fand der Transfer für 90 min bei 100 V unter Eiskühlung statt. Die Membran wurde anschließend in TBST (siehe Abschnitt 2.11) gewaschen.

3.4.5 Immundetektion von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen

Nach dem Transfer auf die Nitrozellulosemembranen erfolgte die Proteindetektion durch Antikörper. Um unspezifische Bindestellen auf der Membran zu blocken, wurde diese zunächst in der für den jeweiligen Antikörper etablierten Blockierungslösung für mindestens eine Stunde inkubiert. Anschließend wurde die Nitrozellulosemembran ÜN bei 4°C mit dem in der Blockierungslösung verdünnten primären Antikörper auf einem Schüttler inkubiert (siehe Tab. 3.12). Es folgten drei Waschschrte à 10 min in TBST auf dem Schüttler. Danach wurde die Membran auf gleiche Weise für 1 h bei RT mit dem zweiten, Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper inkubiert und erneut dreimal mit TBST für je 10 min gewaschen. Die Membran wurde nun kurz auf einem Papiertuch abgetrocknet und zur Detektion 5 min in einer Chemilumineszenz-Substratlösung, welche durch Mischen von 4 ml Lösung-1 (Luminol) mit 4 ml Lösung-2 (Wasserstoffperoxidlösung) hergestellt wurde (siehe Abschnitt 2.11), inkubiert. Anschließend wurde

die Membran kurz auf einem Papiertuch abgetrocknet. Die an den zweiten Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase löst die Chemilumineszenzreaktion aus. Dabei wird das Luminol oxidiert und geht in den angeregten Zustand über. Beim Zurückfallen in den Grundzustand erfolgt die Freisetzung von Energie in Form von Licht, welches mittels eines Röntgenfilms über Autoradiographie detektiert werden kann. Die Membran wurde dazu luftblasenfrei zwischen eine Klarsichtfolie gelegt und in einer Filmkassette platziert. Der Film wurde in der Dunkelkammer auf die Membran gelegt, und die Kassette lichtundurchlässig verschlossen. Die Belichtungszeiten betragen je nach Signalstärke zwischen 10 Sekunden und 10 Minuten. Anschließend wurde der Film im Filmentwicklergerät SRx-101A entwickelt. Eine densitometrische Auswertung der Bandenintensitäten erfolgte mit der Software Scion Image.

Tab. 3.12: Übersicht über die Bedingungen des Antikörpergebrauchs beim Western Blot

Antikörper	Blockierung- bzw. Verdünnungslösung	Verdünnung
Anti-DNMT1	0,5 % Casein	1:2000
Anti-HDAC1	5 % MP	1:30
Anti- β -Aktin	5 % MP	1:15 000
Anti-Kaninchen	5 % MP	1:10 000
Anti-Maus	5 % MP	1:10 000
Anti-Ziege	5 % MP	1:5000

3.5 Statistische Analyse

Alle statistischen Analysen wurden mithilfe von zweiseitigen Tests mit der Software *SPSS Statistics 17.0* durchgeführt. Es wurde ein Signifikanzlevel von 0,05 festgesetzt. Für den Vergleich von qualitativen Merkmalen zwischen verschiedenen Patientengruppen wurden der χ^2 -Test nach Pearson, der Fisher Exakt Test oder der Freeman-Halton Test angewendet. In der univariaten Überlebensanalyse wurden die Überlebensraten anhand von Kaplan-Meier-Kurven berechnet und mittels des Log-Rank-Tests verglichen. Zusätzlich wurde das relative Risiko der Patientengruppen berechnet indem die Hazard Ratios (HRs) auf der Grundlage von Cox-Regressionsmodellen bestimmt wurden. In der multivariaten Überlebensanalyse erfolgte eine schrittweise Auswahl der kategorialen Variablen basierend auf Wahrscheinlichkeitstests. Das relative Risiko der Gruppen wurde wie bereits beschrieben berechnet. Unterschiede in quantitativen Merkmalen wurden mit Hilfe des Student-T-Tests berechnet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Prognostische und prädiktive Bedeutung der Expression epigenetisch relevanter Proteine in Magenkarzinomen

4.1.1 Klinisch-pathologische Charakteristika des Patientenkollektivs

Die Patientencharakteristika des untersuchten Kollektivs sind in Tab. 4.1 zusammengefasst. Die Assoziation der klinisch-pathologischen Parameter sowohl mit dem Gesamtüberleben der Patienten als auch mit dem histopathologischen bzw. dem klinischen Ansprechen ist durch die Angabe des *P*-Wertes dargestellt. Das mediane Gesamtüberleben des Kollektivs betrug 50,6 Monate (Zeitspanne: 3,9-112,3 Monate; 95 % Konfidenzintervall [CI]: 24,6-76,6 Monate) die mediane Nachbeobachtungszeit betrug 52,8 Monate (Zeitspanne: 7,0-112,3 Monate; 95 % CI: 40,9-64,7 Monate). Für alle Patienten lagen vollständige Nachsorgedaten vor.

Basierend auf der histopathologischen Responsebeurteilung bestand das Kollektiv aus 27 % (34/127) Respondern und 73 % (93/127) Nonrespondern. Legt man die klinische Responsebeurteilung zugrunde handelte es sich um 35 % (44/127) Responder und 65 % (83/127) Nonresponder (siehe Abschnitt 2.1.3). Dabei korrelierten das histopathologische und das klinische Ansprechen hoch signifikant ($P < 0,001$).

Sowohl das histopathologische als auch das klinische Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie sind in diesem Kollektiv signifikant mit einem besseren Überleben assoziiert ($P < 0,001$). Abb. 4.1 zeigt das Gesamtüberleben der Patientengruppen der Responder und Nonresponder unter Verwendung von Kaplan-Meier-Kurven. Neben dem Ansprechen auf die Chemotherapie sind erwartungsgemäß auch der Resektionsstatus R0 (komplette Resektion des Tumors) und niedrige ypTNM Stadien (pathologische Beurteilung der Ausdehnung des Primärtumors, des Lymphknotenstatus und des Metastasestatus nach Chemotherapie) mit einem signifikant besseren Überleben assoziiert. Sowohl das histopathologische als auch das klinische Ansprechen

auf die neoadjuvante Chemotherapie war mit einem besseren Differenzierungsgrad der Tumors, einer Komplettresektion und niedrigeren ypTNM Stadien korreliert.

Tab. 4.1: Übersicht über die Patientencharakteristika des Kollektivs

	Anzahl Patienten	%	P^a		P^b	
			Überleben	Ansprechen	histopath.	klinisch
Präoperative Charakteristika						
Gesamt	127	100				
Alter, Jahre						
mittleres Alter	60					
Altersspanne	39,2 - 77,6					
< 60	55	43	< 0,001	0,185	0,190	
≥ 60	72	57				
Geschlecht						
weiblich	33	26	0,515	0,703	0,275	
männlich	94	74				
Lokalisation						
proximales Drittel	92	72	0,264	0,092	0,067	
mittleres Drittel	18	14				
distales Drittel	12	10				
Linitis	5	4				
Laurén Klassifikation						
intestinal	53	42	0,444	0,121	0,079	
nicht intestinal	74	58				
Differenzierungsgrad						
G1/2	20	16	0,202	< 0,001	0,009	
G3/4	107	84				
Ansprechen						
histopath. Responder	34	27	< 0,001			
histopath. Nonresponder	93	73				
klinische Responder	44	35	< 0,0001			
klinische Nonresponder	83	65				
Postoperative Charakteristika						
Resektion	124/127	98				
Resektionskategorie						
R0	101/124	81	< 0,0001	0,006	0,044	
R1/2	23/124	19				
ypT-Kategorie ^c						
ypT0/1	17/124	14	0,009	< 0,0001	< 0,0001	
ypT2/3/4	107/124	86				
ypN-Kategorie ^c						
ypN0	51/124	41	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	
ypN1/2/3	73/124	59				
ypM-Kategorie ^c						
ypM0	98/124	79	< 0,0001	0,011	0,004	
ypM1	26/124	21				

^a Log-Rank-Test; ^b Chi-Quadrat-Test; ^c UICC 2002

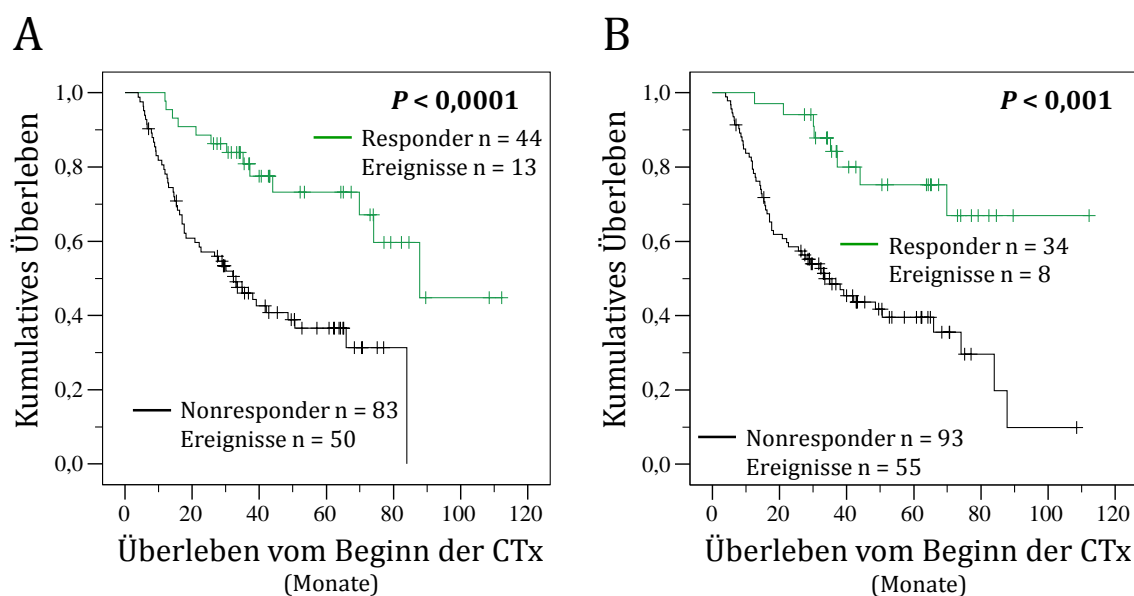


Abb. 4.1: Kaplan-Meier Überlebenskurven des Patientenkollektivs. Gezeigt ist das Gesamtüberleben bezüglich des histopathologischen (A) bzw. des klinischen (B) Ansprechens. Den angegebenen P-Werten liegt der Log-Rank-Test zugrunde.

4.1.2 Expression der Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2

4.1.2.1 Häufigkeiten und Assoziation der Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

Die Untersuchung der HDAC-Expression ergab eine hohe HDAC1-Expression (SI = 0-6) in 54 % (69/127) und eine niedrige Expression (SI = 8-12) in 46 % (58/127) der untersuchten Fälle. Bezüglich HDAC2 zeigten 85 % (108/127) der Tumoren eine hohe (SI = 0-6) und 15 % (19/127) eine niedrige (SI = 8-12) Expression (siehe Abb. 4.2). Für HDAC1 konnte eine signifikante Assoziation von hoher Expression mit einem höheren Alter der Patienten nachgewiesen werden ($P = 0,011$). Es ergab sich keine Korrelation der HDAC1-Expression mit dem Geschlecht, der Tumorlokalisation, der histopathologische Klassifikation oder dem Differenzierungsgrad der Tumoren. Eine hohe Expression von HDAC2 zeigte eine signifikante Assoziation mit schlechterer Tumordifferenzierung und einem nicht intestinalem Tumortyp. In Bezug auf Alter, Geschlecht und Tumorlokalisation ergab sich keine Assoziation (Tab. 4.2).

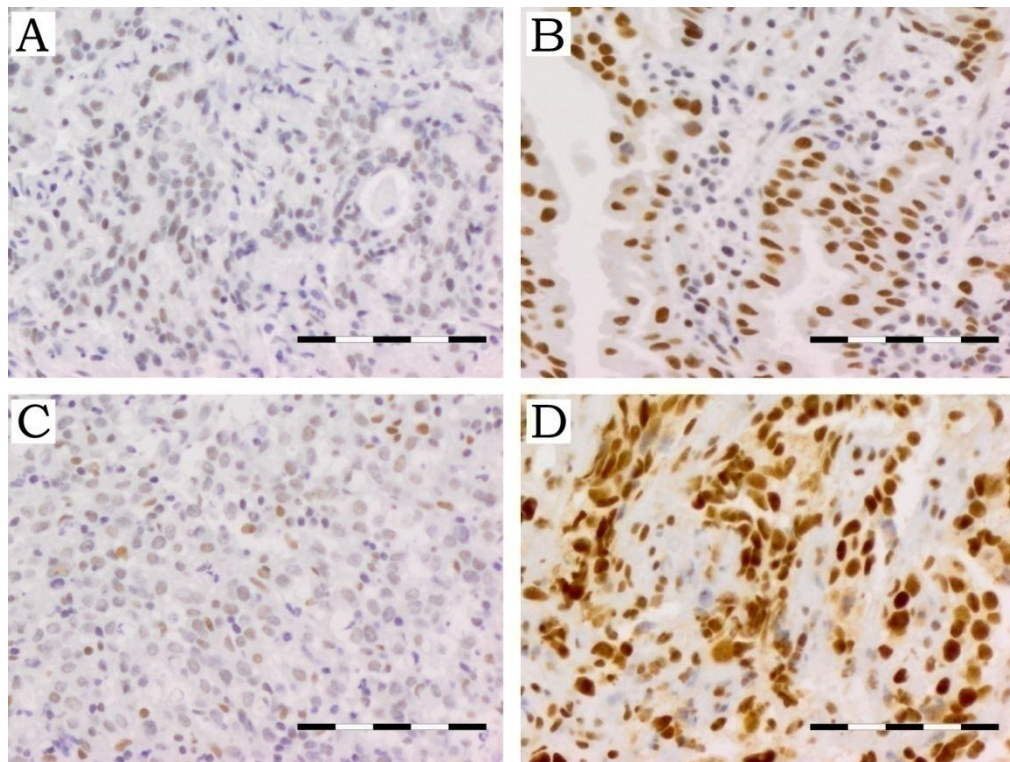


Abb. 4.2: Expression der Histondeacetylasen 1 und 2 in Magenkarzinombiopsien. Gezeigt sind immunhistochemisch gefärbte Schnitte von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten prätherapeutischen Adenokarzinombiopsien des Magens, die **(A)** eine niedrige HDAC1-, **(B)** hohe HDAC1-, **(C)** niedrige HDAC2- bzw. **(D)** hohe HDAC2-Expression aufweisen. Positive Zellen zeigen ein nukleäres Färbemuster. Verdünnung der verwendeten Primärantikörper: HDAC1 → 1:10; HDAC2 → 1:200000. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ M.

Tab. 4.2: Übersicht über die Assoziation von klinisch-pathologischen Parametern mit der HDAC1- und HDAC2-Expression

	Anzahl Patienten n (%)	HDAC1-Expression			HDAC2-Expression		
		n ↓ ^a	n ↑ ^b	P	n ↓ ^a	n ↑ ^b	P
Präoperative Charakteristika							
Gesamt	127 (100)	58	69		19	108	
Alter, Jahre							
mittleres Alter, 60 Jahre							
< 60	55 (43)	32	23	0,013 ^c	6	49	0,263 ^c
≥ 60	72 (57)	26	46		13	59	
Geschlecht							
weiblich	33 (26)	17	16	0,433 ^c	6	27	0,575 ^e
männlich	94 (74)	41	53		13	81	
Lokalisation							
proximales Drittel	92 (72)	38	54	0,275 ^d	15	77	0,836 ^d
mittleres Drittel	18 (14)	10	8		2	16	
distales Drittel	12 (10)	6	6		1	11	
Linitis	5 (4)	4	1		1	4	
Laurén Klassifikation							
intestinal	53 (42)	26	27	0,517 ^c	12	41	0,040 ^c
nicht intestinal	74 (58)	32	42		7	67	
Grading							
G1/2	20 (16)	9	11	0,948 ^c	7	13	0,013 ^e
G3/4	107 (84)	49	58		12	95	
Postoperative Charakteristika							
Resektion	124/127 (98)						
R-Kategorie							
R0	101/124 (81)	47	54		11	90	0,008 ^e
R1/2	23/124 (19)	9	14		8	15	
ypT-Kategorie ^f							
ypT0/1	17/124 (14)	11	6	0,081 ^c	4	13	0,294 ^e
ypT2/3/4	107/124 (86)	45	62		15	92	
ypN-Kategorie ^f							
ypN0	51/124 (41)	23	28	0,991 ^c	10	41	0,268 ^c
ypN1/2/3	73/124 (59)	33	40		9	64	
ypM-Kategorie ^f							
ypM0	98/124 (79)	47	51	0,224 ^c	12	86	0,074 ^e
ypM1	26/124 (21)	9	17		7	19	

^a niedrige Expression; ^b hohe Expression; ^c Chi-Quadrat-Test nach Pearson; ^d Freeman-Halton Test; ^e Exakter Test nach Fisher; ^f UICC 2002

4.1.2.2 Assoziation der Expression mit dem Therapieansprechen

Die Expression der Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2 zeigte keine signifikante Assoziation mit dem Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie (siehe Tab. 4.3).

Tab. 4.3: Verteilung der Responder und Nonresponder in den Patientengruppen mit hoher und niedriger HDAC1- bzw. HDAC2-Expression

	Gesamt		HDAC1				<i>P</i> ^c	HDAC2				
	n	(%)	↓ ^a n	(%)	↑ ^b n	(%)		↓ ^a n	(%)	↑ ^b n	(%)	<i>P</i> ^c
Gesamt	127	(100)	58	(46)	69	(54)		19	(15)	108	(85)	
Histopath. Ansprechen												
Responder	34	(27)	17	(29)	17	(25)	0,554	6	(32)	28	(26)	0,608
Nonresponder	93	(73)	41	(71)	52	(75)		13	(68)	80	(74)	
Klinisches Ansprechen												
Responder	44	(35)	22	(38)	22	(32)	0,476	8	(42)	36	(33)	0,459
Nonresponder	83	(65)	36	(62)	47	(68)		11	(58)	72	(67)	

^a niedrige Expression; ^b hohe Expression; ^c Chi-Quadrat-Test

4.1.2.3 Assoziation der Expression mit dem Überleben

Es ergab sich keine signifikante Assoziation der HDAC1- oder HDAC2-Expression mit dem Gesamtüberleben der Patienten (*P* = 0,145 und *P* = 0,581), obwohl eine erheblich kürzeres Überleben der Patienten mit hoher HDAC1-Expression verglichen mit den Patienten mit niedriger Expression festgestellt werden konnte (medianes Überleben: 44,0 versus 74,1 Monate) (siehe Tab. 4.4 und Abb. 4.4).

Tab. 4.4: Medianes Überleben und relatives Risiko der Patienten mit niedriger und hoher HDAC1- bzw. HDAC2-Expression

	Kaplan-Meier Analyse			Cox-Regression		
	Medianes Überleben (Monate)	95 % CI ^a	<i>P</i> ^b	HR ^c	95 % CI ^a	<i>P</i>
HDAC1						
↓ ^d	74,1	40,3 - 107,9	0,145	1	0,9 - 2,5	0,147
↑ ^e	44,0	26,8 - 61,2		1,5		
HDAC2						
↓ ^d	42,1	0,0 - 96,6	0,982	1	0,5 - 2,0	0,982
↑ ^e	50,6	24,1 - 77,0		1,1		

^a Konfidenzintervall; ^b Log-rank-Test; ^c Hazard Ratio; ^d niedrige Expression; ^e hohe Expression; ^f nicht erreicht. Berechnung der Überlebenszeiten mit der Kaplan-Meier Analyse und Bestimmung der relativen Risiken mit der Cox-Regressions-Analyse.

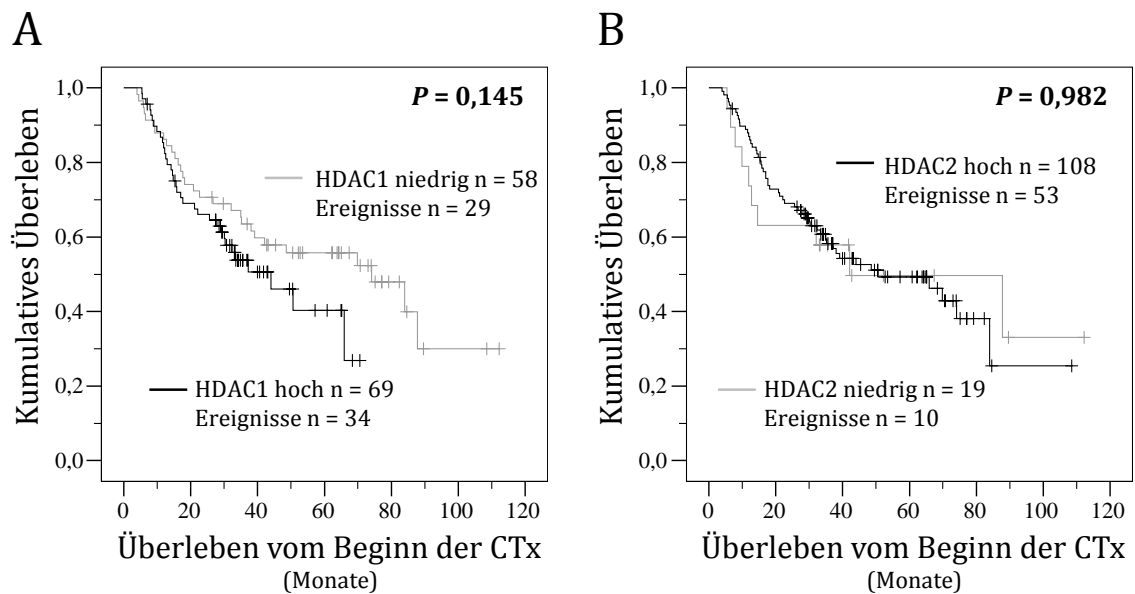


Abb. 4.3: Kaplan-Meier Analyse für die Expression der Histondeacetylasen. Die Abbildungen zeigen das kumulative Überleben (Y-Achse) vom Beginn der neoadjuvanten Chemotherapie in Monaten (X-Achse) für die Gruppen der **(A)** HDAC1 und **(B)** HDAC2 hoch und niedrig exprimierenden Patienten.

Betrachtet man die Subgruppe der histopathologisch bzw. klinisch ansprechenden Patienten getrennt von den nicht ansprechenden Patienten, so zeigt sich eine signifikante Assoziation von hoher HDAC1-Expression mit reduzierter Überlebenszeit ($P = 0,005$ bzw. $P < 0,001$). In der Subgruppe der nicht ansprechenden Patienten war diese Assoziation nicht vorhanden ($P = 0,788$ bzw. $P = 0,581$) (siehe Abb. 4.4). Im Hinblick auf die HDAC2-Expression ergab sich in den histopathologischen und klinischen Respondern ebenfalls eine Assoziation von hoher Expression und schlechterem Überleben, die jedoch keine statistische Signifikanz erreichte ($P = 0,138$ bzw. $P = 0,098$) In der Gruppe der Nonresponder zeigten Patienten mit hoher HDAC2-Expression ein besseres Überleben ($P = 0,021$).

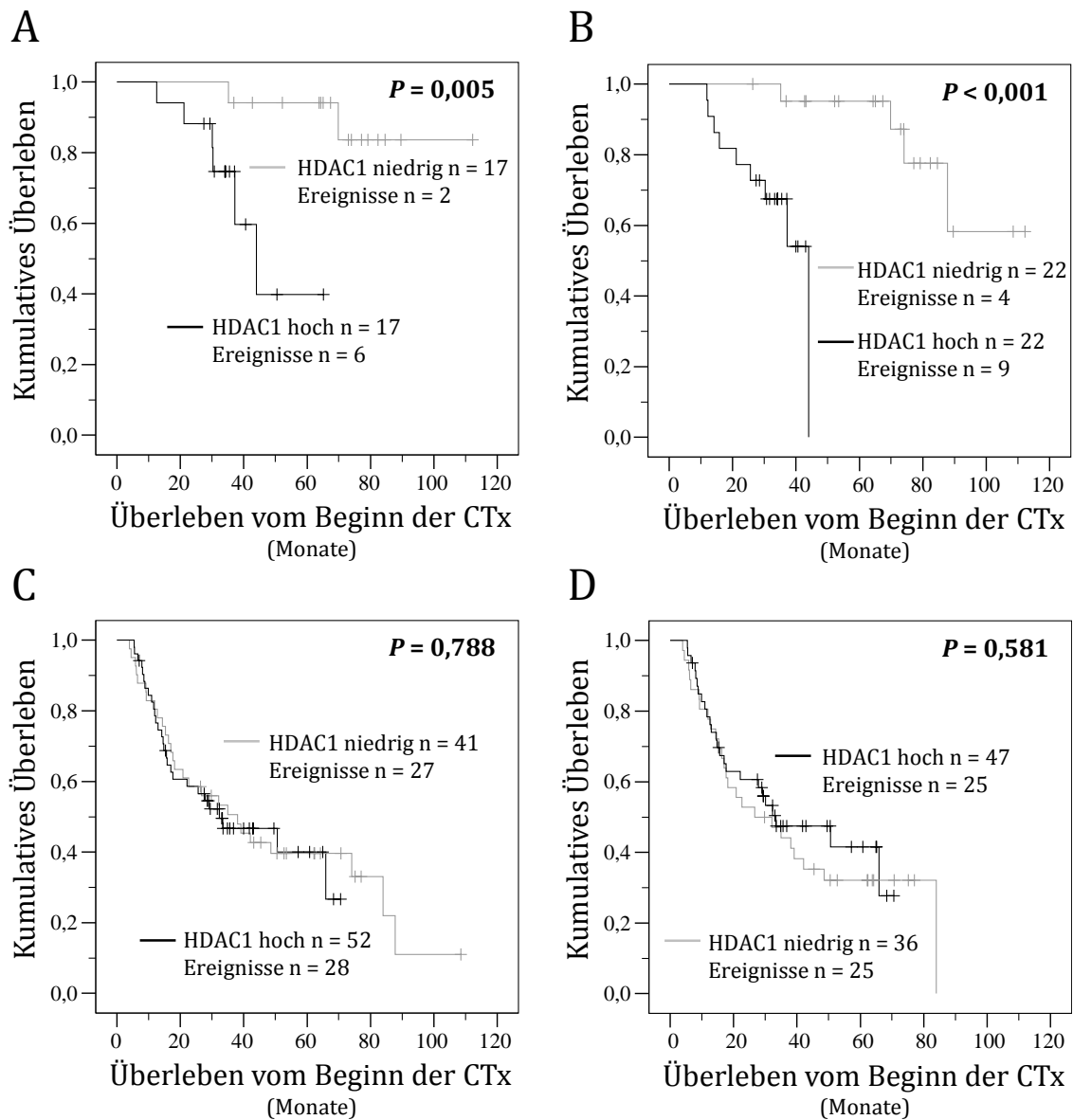


Abb. 4.4: Kaplan-Meier Analyse für die Expression von HDAC1 in den Subgruppen der Responder und Nonresponder: Die Abbildungen zeigen das kumulative Überleben (Y-Achse) vom Beginn der neoadjuvanten Chemotherapie in Monaten (X-Achse) für die Subgruppen der **(A)** histopathologischen bzw. **(B)** klinischen Responder und **(C)** histopathologischen bzw. **(D)** klinischen Nonresponder in Abhängigkeit der HDAC1-Expression.

4.1.2.4 Kombination der HDAC1- und HDAC2-Expressionsdaten

Zusätzlich zur separaten Auswertung der Expressionsdaten von HDAC1 und HDAC2 wurde auch eine Kombinationsauswertung beider Histondeacetylasen gemeinsam durchgeführt. Dafür wurden 3 verschiedene Expressionsgruppen unterschieden: Zunächst Patienten mit einer a) sowohl hohen HDAC1- als auch HDAC2-Expression, b)

Patienten mit einer sowohl HDAC1 als auch HDAC2 niedrigen Expression und Patienten, die eine c) hohe Expression von HDAC1 oder HDAC2 aufwiesen.

Durch die Kombination der Expressionsdaten wurde keine signifikante Assoziation mit dem Überleben der Patienten oder dem Ansprechen auf die Therapie festgestellt.

4.1.2.5 HDAC1-Expression in korrespondierenden Resektaten

Da die Expression der Histondeacetylase 1 in prätherapeutischen Biopsien nur im Zusammenhang mit einer erfolgreichen neoadjuvante Chemotherapie, also einem beträchtlichen Schrumpfen des Tumors, eine prognostische Relevanz zeigte, stellte sich die Frage nach der Expression in den korrespondierenden resezierten Tumoren. Gemäß der Krebsstammzellhypothese repräsentieren die Tumorzellen, die nach einer Chemotherapie zurückbleiben eine Subpopulation, die vermehrt Stammzell-ähnliche Eigenschaften, wie zum Beispiel eine intrinsische Chemoresistenz, besitzen können. Da epigenetische Veränderungen als frühe Ereignisse bei der Entwicklung von Tumorstammzellen diskutiert werden, wurden 12 Resektate von Patienten mit Regressionsgrad 1b (1-10 % residuale Tumorzellen) und 12 Resektate von Patienten mit Regressionsgrad 3 (> 50 % residuale Tumorzellen) auf ihre HDAC1-Expression untersucht. Die Expression wurde anschließend mit der in den korrespondierenden Biopsien detektierten Expression verglichen. In der Gruppe der Patienten mit Regressionsgrad 1b zeigten über 50 % der Resektate eine Reduktion der Expression im Vergleich zur Biopsie. In der Gruppe der Patienten mit Regressionsgrad 3 konnte in ca. 65 % eine gleiche oder reduzierte HDAC1-Expression festgestellt werden (siehe Abb. 4.5). Auch wenn es sich bei dieser Analyse um eine geringe Patientenzahl handelt, lässt sich doch feststellen, dass die Zellen die im Tumorbett verbleiben nicht notwendigerweise diejenigen sind, die verstärkt HDAC1 exprimieren.

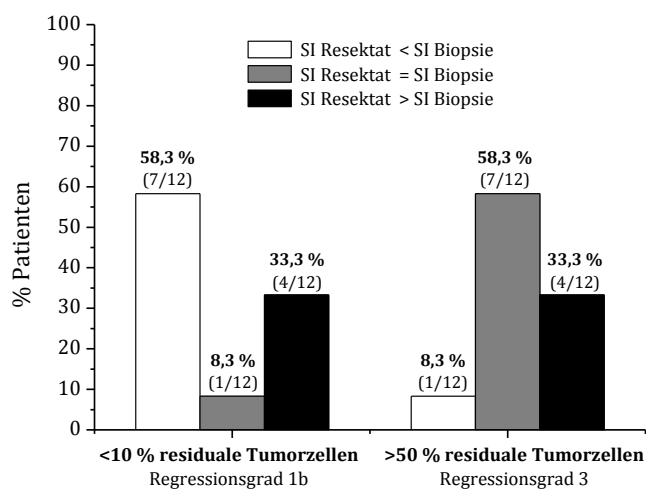


Abb. 4.5: HDAC1-Expression in Resektaten bezogen auf die Expression in den korrespondierenden Biopsien. Dargestellt ist der prozentuale Anteil an Resektaten, die bezogen auf die korrespondierende Biopsie einen niedrigeren, gleichen oder höheren SI aufweisen.

4.1.3 Expression der DNA-Methyltransferasen DNMT1 und DNMT3b

4.1.3.1 Häufigkeiten und Assoziation der Expression mit klinisch-pathologischen Parametern

Eine hohe nukleäre Expression von DNMT1 ($\geq 30\%$ positive Tumorzellen) konnte in 83 % (105/127) der Magenkarzinombiopsien festgestellt werden, wohingegen 17 % (22/127) der Fälle eine niedrige Expression ($< 30\%$ positive Tumorzellen) zeigten. Bezüglich DNMT3b wurden 62 % (79/127) hoch exprimierende ($\geq 50\%$ positive Tumorzellen) und 48 (38 %) niedrig exprimierende ($< 50\%$ positive Tumorzellen) Tumoren detektiert (siehe Abb. 4.6). Dabei zeigte sich für eine hohe DNMT1-Expression eine signifikante Assoziation mit einem schlechteren Differenzierungsgrad der Tumoren ($P = 0,008$), sowie einem höherem ypT- ($P = 0,013$), ypN- ($P = 0,004$) und ypM- ($P = 0,007$) Stadium. Eine hohe Expression der DNA-Methyltransferase 3b war mit proximaler Tumorlokalisation assoziiert ($P = 0,048$) und es zeigte sich ein Trend für eine Assoziation mit einem intestinalem Tumortyp ($P = 0,062$). Es wurde keine Korrelation mit dem Alter oder dem Geschlecht der Patienten festgestellt (siehe Tab. 4.5).

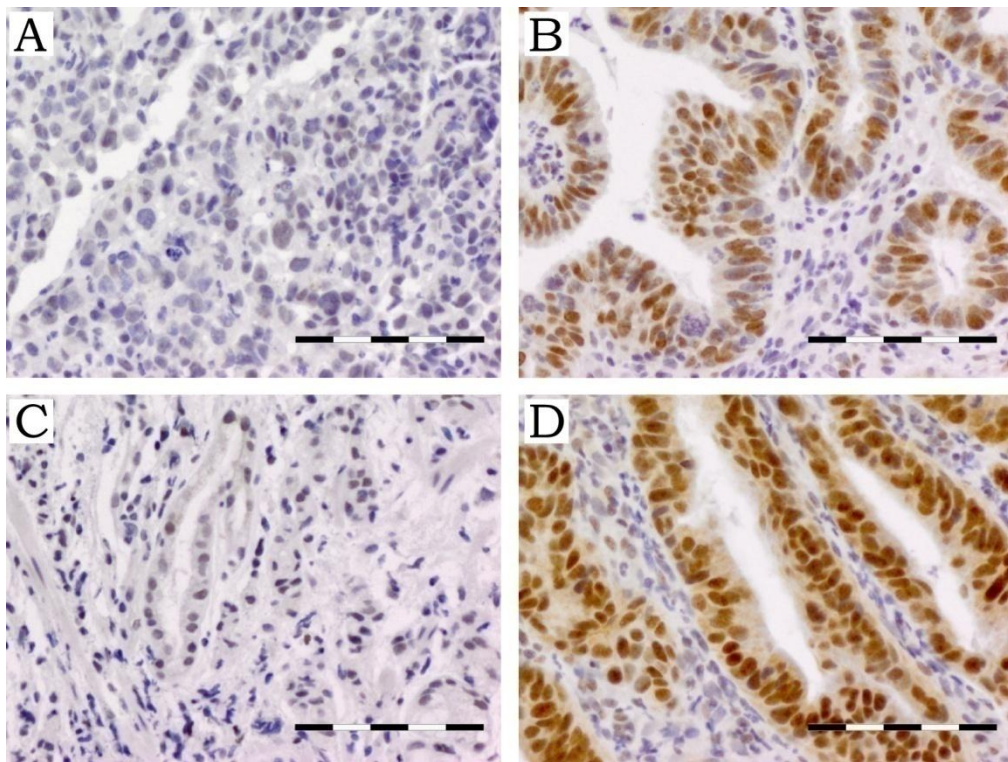


Abb. 4.6: Expression der DNA-Methyltransferasen 1 und 3b in Magenkarzinombiopsien. Gezeigt sind immunhistochemisch gefärbte Schnitte von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten prätherapeutischen Adenokarzinombiopsien des Magens, die eine **(A)** niedrige DNMT1-, **(B)** hohe DNMT1-, **(C)** niedrige DNMT3b- bzw. **(D)** hohe DNMT3b-Expression aufweisen. Positive Zellen zeigen ein nukleäres Färbemuster. Verdünnung der verwendeten Primärantikörper: DNMT1 → 1:500; DNMT3b → 1:200. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µM.

Tab. 4.5: Übersicht über die Assoziation von klinisch-pathologischen Parametern mit der DNMT1- und DNMT3b-Expression

	Anzahl Patienten n (%)	DNMT1-Expression			DNMT3b-Expression		
		n ↓ ^a	n ↑ ^b	P	n ↓ ^a	n ↑ ^b	P
Präoperative Charakteristika							
Gesamt	127 (100)	22	105		48	79	
Alter, Jahre							
mittleres Alter, 60 Jahre							
< 60	55 (43)	10	45	0,823 ^c	21	34	0,937 ^c
≥ 60	72 (57)	12	60		27	45	
Geschlecht							
weiblich	33 (26)	4	29	0,359 ^c	16	17	0,141 ^c
männlich	94 (74)	18	76		32	62	
Lokalisation							
proximales Drittel	92 (72)	18	74	0,709 ^d	29	63	0,048 ^d
mittleres Drittel	18 (14)	2	16		10	8	
distales Drittel	12 (10)	1	11		5	7	
Linitis	5 (4)	1	4		4	1	
Laurén Klassifikation							
intestinal	53 (42)	11	42	0,387 ^c	15	38	0,062 ^c
nicht intestinal	74 (58)	11	63		33	41	
Grading							
G1/2	20 (16)	8	12	0,008 ^e	5	15	0,199 ^c
G3/4	107 (84)	14	93		43	64	
Postoperative Charakteristika							
Resektion	124/127 (98)						
R-Kategorie							
R0	101/124 (81)	20	81	0,363 ^e	35	66	0,238 ^c
R1/2	23/124 (19)	2	21		11	12	
ypT-Kategorie ^f							
ypT0/1	17/124 (14)	7	10	0,013 ^e	7	10	0,708 ^c
ypT2/3/4	107/124 (86)	15	92		39	68	
ypN-Kategorie ^f							
ypN0	51/124 (41)	15	36	0,004 ^c	22	29	0,244 ^c
ypN1/2/3	73/124 (59)	7	66		24	49	
ypM-Kategorie ^f							
ypM0	98/124 (79)	22	76	0,007 ^e	35	63	0,536 ^c
ypM1	26/124 (21)	0	26		11	15	

^a niedrige Expression; ^b hohe Expression ^c Chi-Quadrat-Test nach Pearson; ^d Freeman-Halton Test; ^e Exakter Test nach Fisher; ^f UICC 2002

4.1.3.2 Assoziation der Expression mit dem Therapieansprechen

Bezüglich des Ansprechens ergab sich eine signifikante Korrelation von hoher Expression mit schlechterem histopathologischen ($P = 0,03$) bzw. klinischen ($P = 0,008$) Ansprechen auf die Chemotherapie für DNMT1 nicht aber für DNMT3b ($P = 0,239$ und $P = 0,531$). Es zeigte sich, dass in der Gruppe der DNMT1 niedrig exprimierenden Patienten eine relativ gleichmäßige Verteilung von Respondern (45 %) und Nonrespondern (55 %) gegeben war, wohingegen in der Gruppe der Patienten mit hoher DNMT1-Expression der Anteil an Nonrespondern mit 77 % deutlich höher lag. Tab. 4.6 gibt einen Überblick über die Verteilung von Respondern und Nonrespondern in den Patientengruppen mit niedriger und hoher DNMT1 bzw. DNMT3 Expression. Abb. 4.7 zeigt die Assoziation von hoher DNMT1-Expression mit schlechterem histopathologischen bzw. klinischen Ansprechen.

Tab. 4.6: Verteilung der Responder und Nonresponder in den Patientengruppen mit hoher und niedriger DNMT1 bzw. DNMT3b-Expression

	Gesamt		DNMT1				P^c	DNMT3b				P^c
	n	(%)	↓ ^a	(%)	↑ ^b	(%)		↓ ^a	(%)	↑ ^b	(%)	
Gesamt	127	(100)	22	(17)	105	(83)		48	(38)	79	(62)	
Histopath. Ansprechen												
Responder	34	(27)	10	(45)	24	(23)	0,030	10	(21)	24	(30)	0,239
Nonresponder	93	(73)	12	(55)	81	(77)		38	(79)	55	(70)	
Klinisches Ansprechen												
Responder	44	(35)	13	(59)	31	(30)	0,008	15	(31)	29	(37)	0,531
Nonresponder	83	(65)	9	(41)	74	(70)		33	(69)	50	(63)	

^a niedrige Expression; ^b hohe Expression ^c Chi-Quadrat-Test

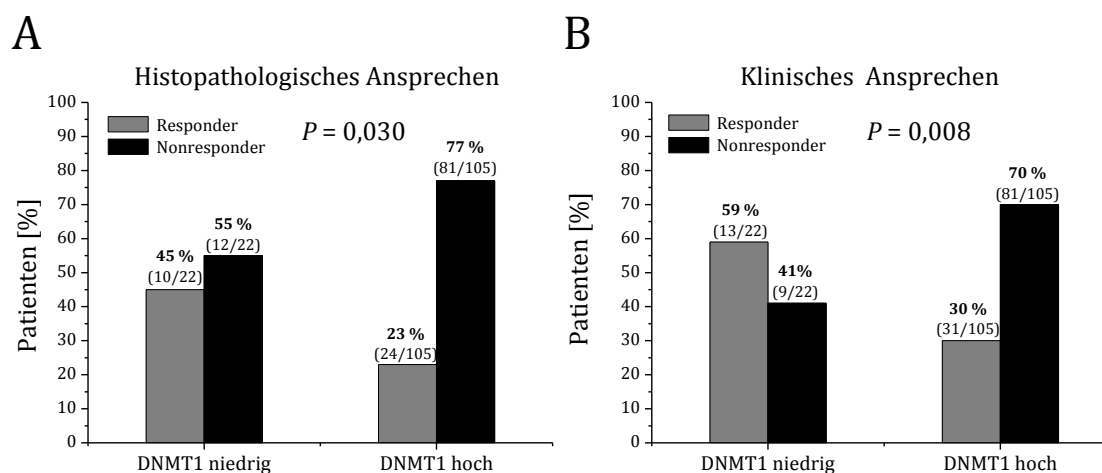


Abb. 4.7: Graphische Darstellung der Assoziation von hoher DNMT1-Expression mit schlechterem histopathologischem (A) und klinischen (B) Ansprechen. Auf der Y-Achse ist der Prozentsatz der Patienten dargestellt, die X-Achse zeigt die hohe bzw. niedrige DNMT1-Expression an. Die angegebenen P-Werte beruhen auf dem Chi-Quadrat Test nach Pearson.

4.1.3.3 Assoziation der Expression mit dem Überleben

Um die Gesamtüberlebensraten der Patienten in Abhängigkeit der DNMT1-Expression zu untersuchen, wurde zunächst eine univariate Analyse unter Verwendung von Kaplan-Meier Überlebenskurven durchgeführt. Vergleicht man das Gesamtüberleben der Patienten mit hoher DNMT1-Expression, so zeigen diese ein medianes Überleben von 39,1 Monaten (95 % CI 25,3 – 52,9 Monate), wohingegen das mediane Überleben der Patienten mit niedriger DNMT1-Expression nicht erreicht wurde. Von den Patienten der DNMT1 niedrig exprimierenden Gruppe verstarben im Verlauf des Beobachtungszeitraums nur 23 % (5/22), in der Gruppe der hoch exprimierenden Patienten jedoch 55 % (58/105). Zusammenfassend lässt sich also ein signifikant reduziertes Überleben der DNMT1 hoch exprimierenden Patienten feststellen ($P_{\text{Log-Rank}} = 0,001$). Aus der Überlebenszeitanalyse basierend auf der Cox-Regression ergab sich für diese Patienten ein ca. vierfach erhöhtes Risiko zu versterben (HR 4,1; 95 % CI 1,6-10,3; $P = 0,003$). Die Expression von DNMT3b ergab keine Korrelation mit dem Überleben ($P_{\text{Log-Rank}} = 0,670$). Es ergab sich eine relative Risikorate von 0,9 für Patienten mit hoher DNMT3b-Expression verglichen mit Patienten mit niedriger Expression (95 % CI 0,5-1,5; $P = 0,607$) (siehe Tab. 4.7). Abb. 4.8 zeigt die Überlebenskurven der Kaplan-Meier-Analyse.

Tab. 4.7: Medianes Überleben und relatives Risiko der Patienten mit niedriger und hoher DNMT1- bzw. DNMT3b-Expression

	Kaplan-Meier Analyse			Cox-Regressions-Analyse		
	Medianes Überleben (Monate)	95 % CI ^a	P ^b	HR ^c	95 % CI ^a	P
DNMT1						
↓ ^d	n. e. ^f	n. e. ^f	0,001	1	1,6 – 10,3	0,003
↑ ^e	39,1	25,3 - 52,9		4,1		
DNMT3b						
↓ ^d	48,5	13,9 - 83,1	0,670	1	0,5 - 1,5	0,670
↑ ^e	65,9	36,5 - 95,3		0,9		

^a Konfidenzintervall; ^b Log-rank-Test; ^c Hazard Ratio; ^d niedrige Expression; ^e hohe Expression; ^f nicht erreicht. Berechnung der Überlebenszeiten mit der Kaplan-Meier Analyse und Bestimmung der relativen Risiken mit der Cox-Regressions-Analyse.

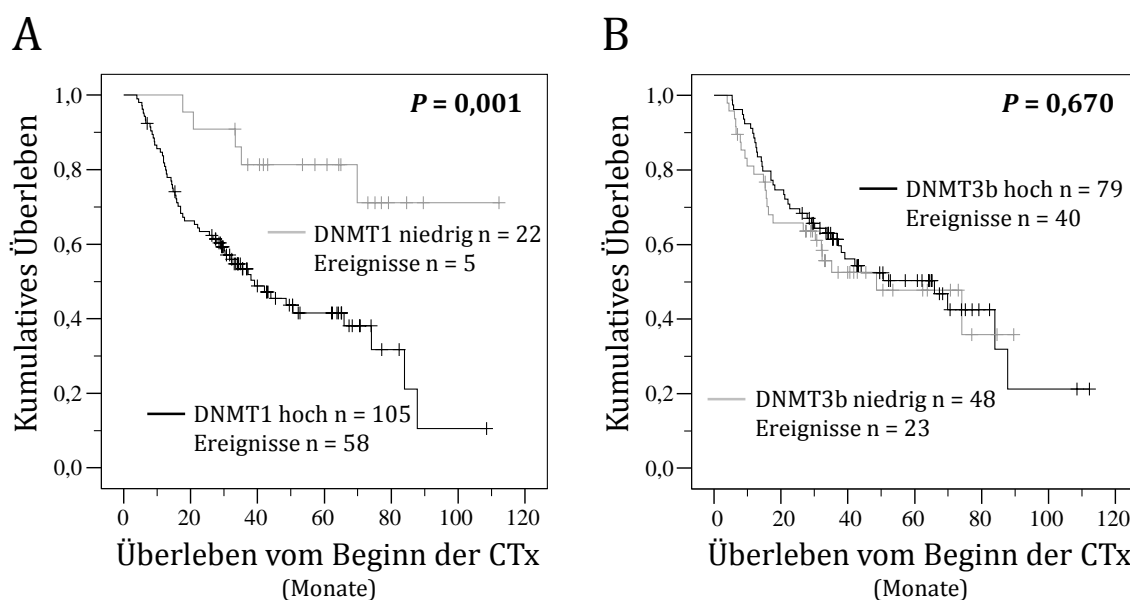


Abb. 4.8: Kaplan-Meier Analyse für die Expression der DNA-Methyltransferasen. Die Abbildungen zeigen das kumulative Überleben (Y-Achse) vom Beginn der neoadjuvanten Chemotherapie in Monaten (X-Achse) für die Gruppen der (A) DNMT1 und (B) DNMT3b hoch und niedrig exprimierenden Patientengruppen.

Aufgrund der signifikanten Assoziation von hoher Expression mit schlechterem Überleben in der univariaten Kaplan-Meier-Analyse, wurde für die DNMT1-Expression zusätzlich eine multivariate Analyse basierend auf der Cox-Regressions-Analyse durchgeführt, um zu überprüfen ob die DNMT1-Expression einen unabhängigen prognostischen Faktor darstellt. In die multivariate Analyse wurden alle Faktoren eingeschlossen, die schon in der univariaten Analyse eine signifikante Assoziation mit dem Überleben zeigten: Histopathologisches Ansprechen, klinisches Ansprechen,

Resektionsstatus, ypT-, ypN-, ypM-Status und DNMT1-Expression. In Tab. 4.8 sind die Ergebnisse der multivariaten Analyse zusammengestellt. Es zeigt sich als stärkster prognostischer Faktor der Resektionsstatus mit einem 6,2-fach höheren Risiko zu versterben für Patienten, bei denen keine Komplettresektion möglich war ($P < 0,0001$), gefolgt vom klinischen Ansprechen mit einem relativen Risiko von 3 für nicht ansprechende Patienten ($P = 0,001$). Als dritter unabhängiger prognostischer Faktor ergibt sich aus der multivariaten Analyse die Expression von DNMT1 mit einem 3,3-fach höheren Risiko zu versterben wenn eine starke Expression vorliegt ($P = 0,012$).

Tab. 4.8: Multivariate Analyse der signifikant mit dem Überleben assoziierten Parameter unter Verwendung der Cox-Regression

Faktor	Gesamtüberleben (n = 127)		
	HR ^a	95% CI ^b	P
Resektionsstatus			
R0	1		
R1/2	6,2	3,5 - 10,8	< 0,0001
Klinisches Ansprechen			
Responder	1		
Nonresponder	3,0	1,5 - 5,7	0,001
DNMT1-Expression			
↓ ^c	1		
↑ ^d	3,3	1,3 - 8,2	0,012

^a Hazard Ratio; ^b Konfidenzintervall; ^c niedrige Expression; ^d hohe Expression

Angegeben ist das jeweilige relative Risiko mit 95 % Konfidenzintervall und dem zugehörigen P-Wert. In die Analyse eingeschlossen wurden histopathologisches bzw. klinisches Ansprechen, Resektionsstatus, ypT-, ypN-, ypM-Kategorie und DNMT1-Expression

4.1.3.4 Assoziation der DNMT-Expression mit dem Methylierungsstatus

Da aus vorangegangenen Untersuchungen (Napieralski *et al.*, 2007) für einen Teil der Tumoren (n = 53) Informationen zum Methylierungsstatus von 6 verschiedenen Genen vorhanden waren, konnte eine Analyse zur Assoziation der DNMT-Expression mit dem Methylierungsstatus der Tumoren durchgeführt werden. Für die Gene 14-3-3 σ , E-Cadherin, HPP1, LOX, MGMT und p16 wurde die Promotormethylierung mittels *MethylLight* Technologie untersucht und sowohl der Methylierungsstatus der einzelnen Gene als auch ein Gesamtmethylierungsstatus mit zwei unterschiedlichen Grenzwerten ermittelt. In der Korrelationsanalyse zeigte sich eine signifikante Assoziation von hoher DNMT1-Expression und der Promotormethylierung der einzelnen Gene 14-3-3 σ

($P = 0,043$) und LOX ($P = 0,026$). Bezüglich des Gesamtmethylierungsstatus ergab sich ein Trend für eine Korrelation zwischen hoher DNMT1-Expression und der Methylierung von mehr als einem Gen ($P = 0,097$) und eine signifikante Korrelation zwischen hoher Expression und der Promotormethylierung von mehr als 4 der 6 untersuchten Gene ($P = 0,031$). Für die Expression von DNMT3b konnte keinerlei Assoziation zum Methylierungsstatus gezeigt werden. In der nachfolgenden Tab. 4.9 sind die P -Werte der Analyse zusammengefasst.

Tab. 4.9: Übersichtstabelle zu Assoziation der DNMT-Expression mit dem Methylierungsstatus in prätherapeutischen Biopsien

Methylierungsstatus (n = 53)	P^a	
	DNMT1	DNMT3b
einzelne Gene		
14-3-3 σ	0,043	0,199
E-Cadherin	1	0,736
HPP1	0,235	1
LOX	0,026	0,611
MGMT	0,168	0,319
p16	0,123	0,524
Gesamt ^b		
METSTAT 1 ^c	0,097	1
METSTAT 2 ^d	0,031	0,524

^a Chi-Quadrat-Test; ^b Gesamtmethylierungsstatus der sechs getesteten Gene; ^c 0 bis 1 Gen methyliert versus > 1 Gen methyliert; ^d < 4 Gene methyliert versus \geq 4 Gene methyliert

4.1.3.5 Kombination der DNMT1- und DNMT3-Expressionsdaten

Analog zu den Histondeacetylasen wurde auch für die DNA-Methyltransferasen eine Kombinationsauswertung durchgeführt. Es wurde jedoch durch die Kombination der Expressionsdaten keine signifikante Assoziation mit dem Überleben der Patienten festgestellt, welche die prognostische und prädiktive Signifikanz der DNMT1-Expression verbesserte.

4.1.4 Expression der Polycombproteine BMI-1 und EZH2

Die Expression der Polycombproteine BMI-1 und EZH2 wurde im Gegensatz zur Expression der DNA-Methyltransferasen und der Histondeacetylasen nur an 71 prätherapeutischen Biopsien durchgeführt.

4.1.4.1 Häufigkeiten der Expression und Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern

Eine hohe Expression von BMI-1 (SI = 6-9) konnte in 30/71 (42 %) der Magenkarzinombiopsien festgestellt werden, wohingegen 41/71 Fälle (58 %) eine niedrige Expression (SI = 0-4) aufwiesen. Bezüglich EZH2 ergaben sich 33/71 (46 %) hoch exprimierende (SI = 9) und 38/71 (54 %) niedrig exprimierende (SI = 0-6) Proben (siehe Abb. 4.9). Die Expression der Polycombproteine BMI-1 und EZH2 ergab keine Assoziation mit klinisch-pathologischen Parametern (siehe Tab. 4.10).

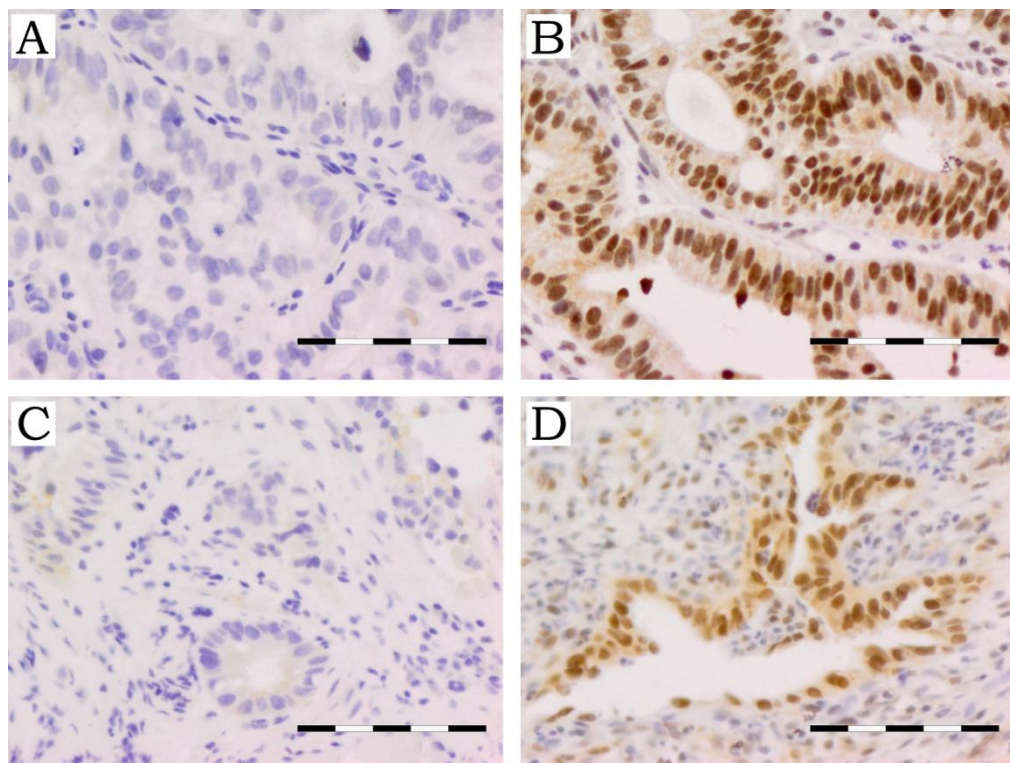


Abb. 4.9: Expression der Polycombproteine BMI-1 und EZH2 in Magenkarzinombiopsien. Gezeigt sind immunhistochemisch gefärbte Schnitte von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten prätherapeutischen Adenokarzinombiopsien des Magens, die eine **(A)** niedrige BMI-1-, **(B)** hohe BMI-1-, **(C)** niedrige EZH2- bzw. **(D)** hohe EZH2-Expression aufweisen. Positive Zellen zeigen ein nukleäres Färbemuster. Verdünnung der verwendeten Primärantikörper: BMI1 → 1:50; EZH2 → 1:400. Der Maßstabsbalken entspricht 100 μ M.

Tab. 4.10: Übersicht über die Assoziation von klinisch-pathologischen Parametern mit der BMI-1 und EZH2-Expression

	Anzahl Patienten n (%)	BMI1 Expression			EZH2-Expression		
		n ↓ ^a	n ↑ ^b	P	n ↓ ^a	n ↑ ^b	P
<u>Präoperative Charakteristika</u>							
Gesamt	71 (100)	41	30		38	33	
Alter, Jahre							
< 60	37(52)	21	16	0,860 ^c	21	16	0,569 ^c
≥ 60	34 (48)	20	14		17	17	
Geschlecht							
weiblich	16 (23)	11	5	0,311 ^c	11	5	0,165 ^c
männlich	55 (77)	30	25		27	28	
Lokalisation							
proximales Drittel	52 (73)	25	27	0,089 ^d	27	25	0,581 ^d
mittleres Drittel	11 (16)	9	2		5	6	
distales Drittel	5 (7)	5	0		4	1	
Linitis	3 (4)	2	1		2	1	
Laurén Klassifikation							
intestinal	34 (48)	18	16	0,432 ^c	19	15	0,702 ^c
nicht intestinal	37 (52)	23	14		19	18	
Grading							
G1/2	12 (17)	5	7	0,216 ^c	7	5	0,714 ^c
G3/4	59 (83)	36	23		31	28	
<u>Postoperative Charakteristika</u>							
Resektion	68/71 (96)						
R-Kategorie							
R0	57/68 (84)	31	26	0,108 ^e	32	25	0,515 ^c
R1/2	11/68 (16)	9	2		5	6	
ypT-Kategorie ^f							
ypT0/1	13/68 (19)	8	5	0,825 ^c	9	4	0,233 ^c
ypT2/3/4	55/68 (81)	32	23		28	27	
ypN-Kategorie ^f							
ypN0	27/68 (40)	14	13	0,343 ^c	15	12	0,878 ^c
ypN1/2/3	41/68 (60)	26	15		22	19	
ypM-Kategorie ^f							
ypM0	54/68 (79)	29	25	0,092 ^c	30	24	0,710 ^c
ypM1	14/68 (21)	11	3		7	7	

^a niedrige Expression; ^b hohe Expression; ^c Chi-Quadrat-Test nach Pearson; ^d Freeman-Halton Test; ^e Exakter Test nach Fisher; ^f UICC 2002

4.1.4.2 Assoziation der Expression mit dem Ansprechen

Auch in Bezug auf das Ansprechen ergab sich keinerlei Korrelation der BMI-1- bzw. EZH2-Expression (siehe Tab. 4.11).

Tab. 4.11: Verteilung der Responder und Nonresponder in den Patientengruppen mit hoher und niedriger BMI-1 bzw. EZH2-Expression

	Gesamt		BMI-1				EZH2					
	n	(%)	↓ ^a		↑ ^b		P ^c	↓ ^a		↑ ^b		P ^c
			n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	
Gesamt	71	(100)	41	(58)	30	(42)		38	(54)	33	(46)	
Histopath. Ansprechen												
Responder	23	(32)	11	(27)	12	(40)	0,241	12	(32)	11	(33)	0,875
Nonresponder	48	(68)	30	(73)	18	(60)		26	(68)	22	(67)	
Klinisches Ansprechen												
Responder	22	(31)	11	(27)	11	(37)	0,376	13	(34)	9	(27)	0,528
Nonresponder	49	(69)	30	(73)	19	(63)		25	(66)	24	(73)	

^a niedrige Expression; ^b hohe Expression; ^c Chi-Quadrat-Test

4.1.4.3 Assoziation mit dem Überleben

Es konnte keine Korrelation der Expression von BMI-1 und EZH2 mit dem Überleben festgestellt werden. Tab. 4.12 fasst die Überlebensdaten zusammen. Die zugehörigen Kaplan-Meier Kurven sind Abb. 4.10 zu entnehmen.

Auch die Kombination der Expressionsdaten von BMI-1 und EZH2 ergab keine Assoziation mit dem Überleben.

Tab. 4.12: Medianes Überleben und relatives Risiko der Patienten mit niedriger und hoher BMI-1- bzw. EZH2-Expression

	Kaplan-Meier Analyse			Cox-Regression		
	Medianes Überleben (Monate)	95 % CI ^a	P ^b	HR ^c	95 % CI ^a	P
BMI-1						
↓ ^d	50,6	14,7 - 86,5	0,251	1	0,3 - 1,3	0,254
↑ ^e	83,9	58,8 - 109,1		0,7		
EZH2						
↓ ^d	69,8	31,9 - 107,7	0,468	1	0,4 - 1,5	0,469
↑ ^e	n.e. ^f	n.e. ^f		0,8		

^a Konfidenzintervall; ^b Log-rank-Test; ^c Hazard Ratio; ^d niedrige Expression; ^e hohe Expression; ^f nicht erreicht. Berechnung der Überlebenszeiten mit der Kaplan-Meier Analyse und Bestimmung der relativen Risiken mit der Cox-Regressions-Analyse.

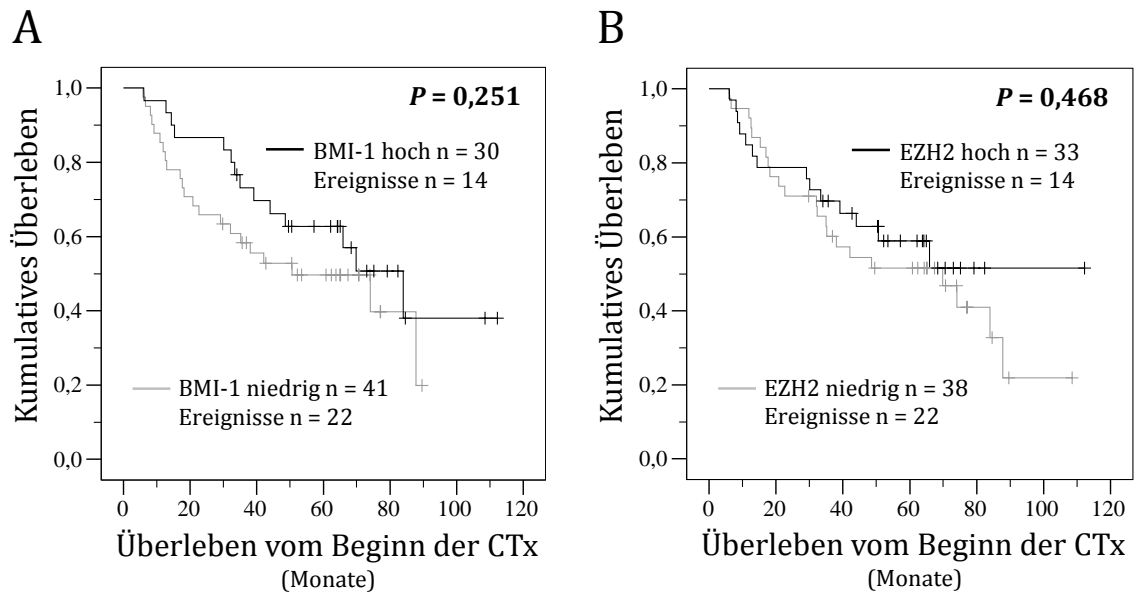


Abb. 4.10: Kaplan-Meier Analyse für die Expression der Polycombproteine. Die Abbildungen zeigen das kumulative Überleben (Y-Achse) vom Zeitpunkt des Beginns der neoadjuvanten Chemotherapie in Monaten (X-Achse) für die Gruppen der BMI-1 (**A**) und EZH2 (**B**) hoch und niedrig exprimierender Patientengruppen.

4.2 *In vitro* Untersuchung der prädiktiven Bedeutung der HDAC- und DNMT-Expression und Evaluation epigenetischer Therapiekonzepte für das Magenkarzinom

4.2.1 Charakterisierung von Magenkarzinomzelllinien

Um die Ergebnisse, die sich aus der Untersuchung von Patientenmaterial ergeben haben, in einem Modellsystem genauer untersuchen zu können, wurden die Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und KATOIII aufgrund ihres in der Literatur beschriebenen unterschiedlichen Methylierungsstatus ausgewählt (Yamashita *et al.*, 2006). Zunächst wurden die Zelllinien bezüglich ihres Proliferationsverhaltens, ihres Methylierungsstatus und ihrer Sensitivität gegenüber den Standardchemotherapeutika Cisplatin und 5-FU charakterisiert.

4.2.1.1 Proliferationsverhalten der Magenkarzinomzelllinien

Als Grundcharakterisierung wurde die Verdopplungszeit der Zelllinien unter Verwendung des XTT-Assays bestimmt. Dafür wurde die Zellviabilität zu verschiedenen Zeitpunkten (siehe Abb. 4.11) bestimmt und die Verdopplungszeit berechnet. Es zeigt sich ein unterschiedliches Proliferationsverhalten der verschiedenen Magenkarzinomzelllinien. Mit einer Verdopplungszeit von ca. 25 bzw. 27 Stunden weisen die Zelllinien AGS und MKN28 eine höhere Proliferationsrate auf als die Zelllinien MKN45 und KATOIII mit ca. 37 und 42 Stunden.

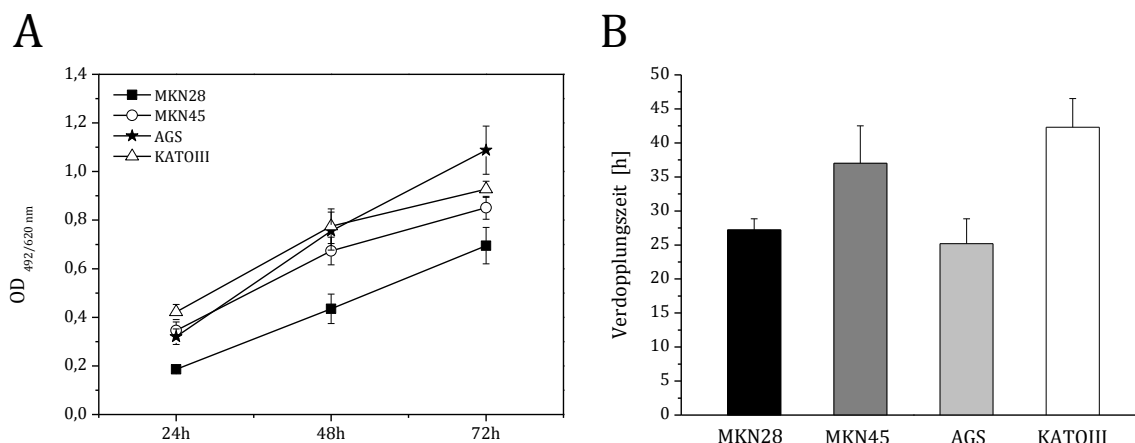


Abb. 4.11: Proliferation der Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und KATOIII. (A) Die X-Achse zeigt die Inkubationszeiten der Zellen nach dem Ausplattieren bis zum Zeitpunkt des XTT-Tests. Auf der Y-Achse sind die OD-Werte bei einer Wellenlänge von 492 nm nach Abzug des Leerwertes angegeben. Die Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichungen beruht auf drei unabhängigen Versuchen mit 4-fach-Bestimmung. (B) Angegeben sind die aus den Proliferationskurven der Abbildung A errechneten Verdopplungszeiten (Y-Achse) der verschiedenen Magenkarzinomzelllinien.

4.2.1.2 Ermittlung des Methylierungsstatus und der Kopienzahlveränderungen der Magenkarzinomzelllinien

Da sich in einem vorangegangenen Projekt (Napieralski *et al.*, 2007) in neoadjuvant chemotherapierten Magenkarzinomen Hinweise für eine Assoziation von verstärkter Promotormethylierung mit einem schlechteren Überleben und Therapieansprechen ergaben und zusätzlich in der hier vorgelegten Studie in Magentumoren zum einen eine signifikante Assoziation von hoher DNMT1-Expression mit schlechterem Überleben und Ansprechen und zum anderen mit einem höheren Methylierungsstatus gezeigt werden konnte (siehe Abschnitt 4.1.3.2, 4.1.3.3 und 4.1.3.4) wurde der Methylierungsstatus der Zelllinien untersucht. Für die Methylierungsanalyse wurde der MS-MLPA-Test eingesetzt (siehe Abschnitt 3.3.4), mit dem zusätzlich auch Kopienzahlveränderungen nachgewiesen werden können.

Die Untersuchung zeigte, dass sich die verschiedenen Magenkarzinomzelllinien im Ausmaß der detektierten Veränderungen unterscheiden, wobei eine inverse Korrelation zwischen Methylierungs- und Kopienzahlveränderungen beobachtet werden konnte. Die Zelllinien AGS und KATOIII wiesen mit 13/24 und 10/24 methylierten Genen eine stärkere Methylierung als die Zelllinien MKN28 und MKN45 mit 7/24 und 5/24 methylierten Genen auf, jedoch geringere Veränderungen bezüglich der Kopienzahl.

Es zeigte sich in der Analyse, dass die Gene *APC*, *ESR1*, *CDH13* und *TIMP3* in allen 4 Magenkarzinomzelllinien methyliert vorliegen. In drei Zelllinien ist *IGSF4* methyliert und in je zwei Zelllinien findet sich die Methylierung der Gene *RASSF1*, *FHIT*, *CD44*, *TP73*, *CDKN2A* und *CHFR*. Betrachtet man die Kopienzahlveränderungen, so tritt in den Zelllinien häufiger ein Allelverlust als eine Amplifikation auf, wobei die Zelllinie KATOIII mit zwei Allelverlusten und sechs Amplifikationen eine Ausnahme darstellt. Auffällig sind Allelverluste von *TIMP3* und *BCL2* und eine Amplifikation von *GSTP1*, da diese in jeweils drei der vier untersuchten Zelllinien nachzuweisen waren. Außerdem war in den Zelllinien MKN28 und MKN45 deutlich zu erkennen, dass einige Gene sowohl von einer Methylierung als auch von einem Allelverlust betroffen sein können, wie es beispielsweise bei *RASSF1*, *FHIT*, *CDH13* und *TIMP3* der Fall war. Weiterhin war in den Zelllinien MKN28 und MKN45 die Deletion der Gene *CDKN2A* und *CDKN2B* auffällig, die für wichtige Inhibitoren des Zellzyklus kodieren.

Zusammenfassend ist in Abb. 4.12 der Prozentsatz an Veränderung der Methylierung und der Kopienzahl in den Magenkarzinomzellen im Vergleich zur DNA eines gesunden Individuums dargestellt. In Tab. 4.13 sind die jeweils veränderten Gene der Zelllinien bezüglich Methylierung, Allelverlust und Genamplifikation zusammengestellt.

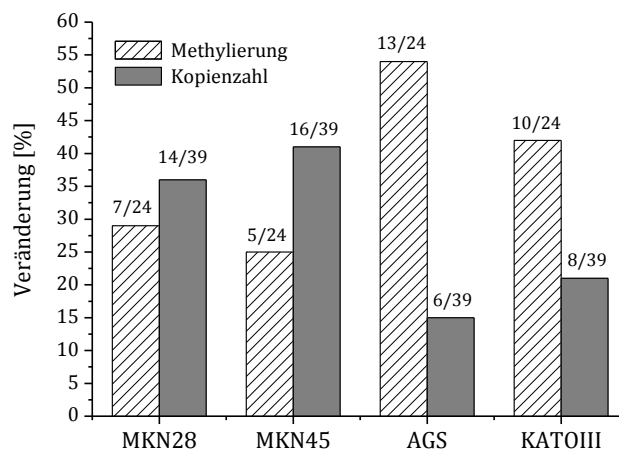


Abb. 4.12: Prozentualer Anteil an Veränderungen der Methylierung und der Kopienzahl in Magenkarzinomzelllinien. Nachweis der Veränderungen mittels MS-MLPA Assays unter Verwendung von DNA aus Magenkarzinomzellen. Dargestellt ist das Ergebnis aus drei unabhängigen Versuchen. Eine Veränderung wurde als solche gewertet wenn diese in allen Versuchen zu detektieren war.

Tab. 4.13: Übersicht über die mit dem MS-MLPA Test ermittelten Veränderungen der Methylierung (n=24) und der Kopienzahl (n=39) der getesteten Gene in Magenkarzinomzelllinien

Veränderung	Zelllinien			
	MKN28	MKN45	AGS	KATOIII
Methylierung	<i>RASSF1</i>	<i>APC</i>	<i>TP73</i>	<i>TP73</i>
	<i>FHIT</i>	<i>ESR1</i>	<i>RARB</i>	<i>FHIT</i>
	<i>APC</i>	<i>IGSF4</i>	<i>RASSF1</i>	<i>APC</i>
	<i>ESR1</i>	<i>CDH13</i>	<i>APC</i>	<i>ESR1</i>
	<i>CD44</i>	<i>TIMP3</i>	<i>ESR1</i>	<i>CDKN2A</i>
	<i>CDH13</i>		<i>CDKN2A</i>	<i>IGSF4</i>
	<i>TIMP3</i>		<i>DAPK1</i>	<i>CHFR</i>
			<i>CD44</i>	<i>CDH13</i>
			<i>GSTP1</i>	<i>HIC1</i>
			<i>IGSF4</i>	<i>TIMP3</i>
			<i>CHFR</i>	
			<i>CDH13</i>	
			<i>TIMP3</i>	
Allelverlust	<i>RASSF1</i>	<i>CASP8</i>	<i>TIMP3</i>	<i>TP73</i>
	<i>FHIT</i>	<i>ESR1</i>	<i>CDH1</i>	<i>CHFR</i>
	<i>CDKN2A</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>BCL2</i>	
	<i>CDKN2B</i>	<i>CDKN2B</i>		
	<i>CD44</i>	<i>DAPK1</i>		
	<i>TIMP3</i>	<i>ATM</i>		
	<i>TSC2</i>	<i>CDH13</i>		
	<i>BCL2</i>	<i>TIMP3</i>		
		<i>PARK2</i>		
		<i>PAH</i>		
	<i>TSC2</i>			
	<i>BCL2</i>			
Amplifikation	<i>TP73</i>	<i>GSTP1</i>	<i>BRCA2</i>	<i>GSTP1</i>
	<i>DAPK1</i>	<i>CREM</i>	<i>MLH3</i>	<i>ATM</i>
	<i>GSTP1</i>	<i>TNFRSF1A</i>	<i>KLK3</i>	<i>IGSF4</i>
	<i>ATM</i>	<i>TNFRSF7</i>		<i>BRCA1</i>
	<i>IGSF4</i>			<i>CTNNB1</i>
	<i>CHFR</i>			<i>CDK6</i>

Die Analyse zu Grundstatus der Zelllinien wurde im Rahmen einer Masterarbeit von Felix Schuhmacher durchgeführt

4.2.1.3 Chemosensitivität der Magenkarzinomzelllinien gegenüber den Chemotherapeutika Cisplatin und 5-FU

Als Maß für die Chemosensitivität der Zelllinien gegenüber verschiedenen Chemotherapeutika wurde anhand von Dosis-Wirkungskurven jeweils die IC_{50} bestimmt, also die Konzentration einer Substanz, welche die Proliferationsrate um 50 % reduziert. Zunächst wurden die Dosis-Wirkungskurven und die IC_{50} für die konventionellen Zytostatika Cisplatin und 5-FU ermittelt, welche die Basis der neoadjuvanten Chemotherapie beim Magenkarzinom darstellen. Dies bietet die Grundlage, um die Expression der Proteine, die an Patientenmaterial untersucht wurden ebenfalls in den Magenkarzinomzelllinien mit dem Ansprechen der Zelllinien auf Cisplatin und 5-FU zu vergleichen. In Bezug auf Cisplatin ließen sich für die Zelllinien AGS (18,5 μM) und KATOIII (10,6 μM) deutlich höhere IC_{50} Werte feststellen, als für die Zelllinien MKN28 (8,5 μM) und MKN45 (7,1 μM). Die IC_{50} Werte, die für die Behandlung der Zelllinien mit 5-FU ermittelt wurden, zeigten die stärkste Sensitivität bei der Zelllinie KATOIII (0,5 μM), gefolgt von MKN45 (1,8 μM) und AGS (2,4 μM). Die geringste Sensitivität bezüglich 5-FU wies die Zelllinie MKN28 (4,3 μM) auf.

In der folgenden Abbildung sind die Dosis-Wirkungskurven für Cisplatin (Abb. 4.13 A) und 5-FU (Abb. 4.13 B) sowie die IC_{50} (Abb. 4.13 C) der beiden Agenzien für die verschiedenen Magenkarzinomzelllinien dargestellt.

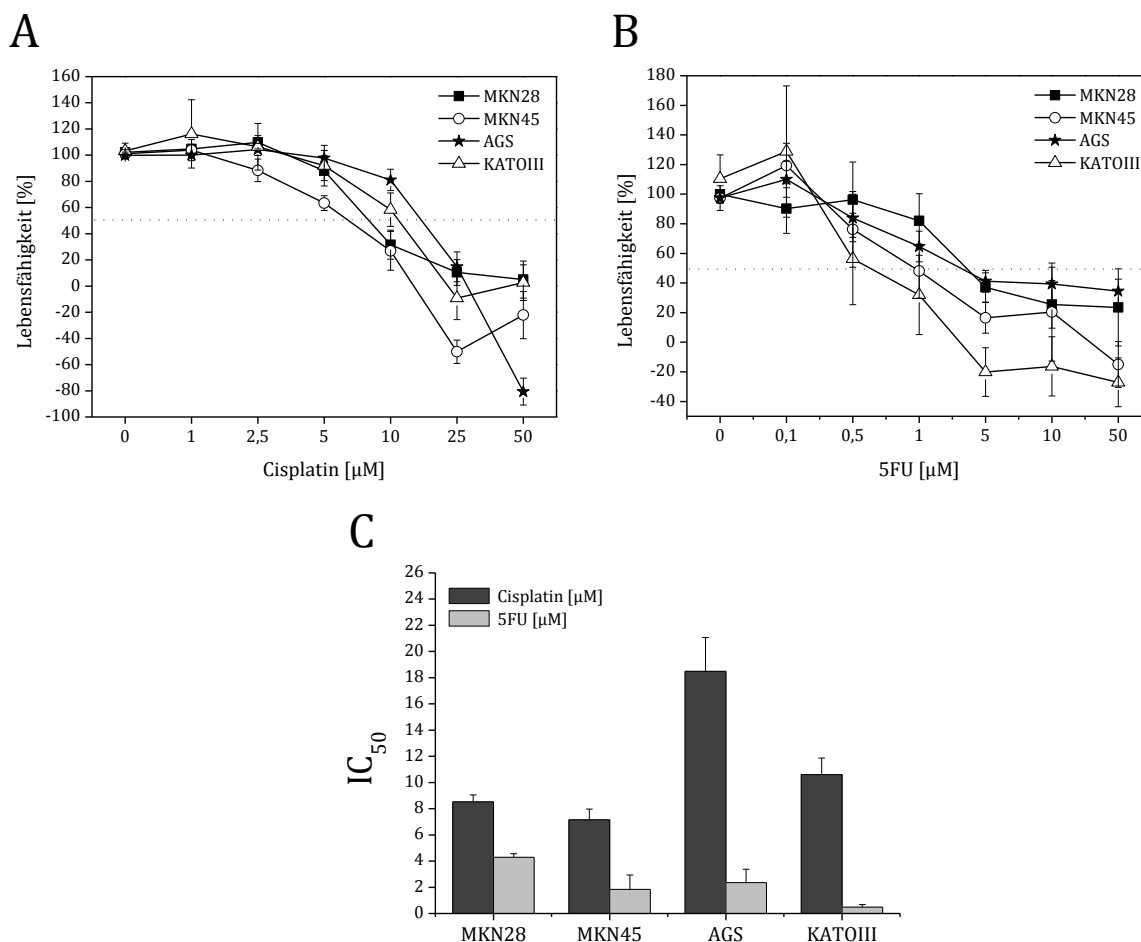


Abb. 4.13: Dosis-Wirkungskurven und IC_{50} für Cisplatin und 5-FU. Dargestellt ist die auf die unbehandelte Kontrolle bezogene prozentuale Lebensfähigkeit (Y-Achse) der Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und KATOIII als Funktion der (A) Cisplatin- bzw. der (B) 5-FU- Konzentration nach einem Behandlungszeitraum von 48h. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit 4-fach-Bestimmung. Die grau gestrichelten Linien markieren die Reduktion der Viabilität um 50 %. (C) Dargestellt ist die IC_{50} für Cisplatin und 5-FU, die sich aus den Dosis-Wirkungskurven berechnen lässt.

Tab. 4.14: Übersicht über die IC_{50} Werte für Cisplatin und 5-FU

Zelllinie	IC_{50}	
	Cisplatin [μM]	5-FU* [μM]
MKN28	$8,51 \pm 0,53$	$4,29 \pm 0,28$
MKN45	$7,15 \pm 0,82$	$1,84 \pm 1,10$
AGS	$18,48 \pm 2,59$	$2,36 \pm 1,02$
KATOIII	$10,60 \pm 1,27$	$0,48 \pm 0,20$

*die Daten zu 5-FU wurden im Rahmen einer Masterarbeit von Felix Schuhmacher erhoben. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit 4-fach-Bestimmung.

Ein Vergleich der Chemosensitivität der Zelllinien gegenüber Cisplatin mit ihrem Methylierungsstatus ergab für die Zelllinie AGS, welche den höchsten Methylierungsstatus (54 %) aufwies, die höchste IC_{50} für Cisplatin (18,5 μ M). Die Zelllinie KATOIII mit der nächsthöheren IC_{50} (10,6 μ M) für Cisplatin zeigte auch den zweithöchsten Methylierungsstatus (42 %). Die beiden sensitiveren Zelllinien MKN28 und MKN45 (IC_{50} Cisplatin: 8,5 μ M bzw. 7,1 μ M) wiesen jedoch einen niedrigeren Methylierungsstatus (29% bzw. 21%) auf (Vergleiche Abb. 4.13 C und Abb. 4.12). Bezüglich der Sensitivität gegenüber 5-FU ließ sich diese Assoziation nicht feststellen. Hier zeigte die Zelllinie MKN28, die zu den sensitiveren in Bezug auf Cisplatin gehörte und einen eher niedrigen Methylierungsstatus aufwies, die geringste Sensitivität. Die gegenüber Cisplatin insensitivere und eher stärker methylierte Zelllinie KATOIII hingegen reagierte am sensitivsten auf 5-FU (IC_{50} 5-FU: 0,48 μ M).

4.2.2 Chemosensitivität der Magenkarzinomzelllinien gegenüber epigenetisch aktiven Chemotherapeutika

Um zu untersuchen ob die Behandlung mit epigenetisch aktiven Therapeutika wie den Histondeacetylase-Inhibitoren SAHA und VPA oder den DNA-Methyltransferase-Inhibitoren DAC und Zebularin in einem präklinischen *in vitro* Modell Hinweise auf eine Eignung dieser Substanzen als alternative Behandlungsstrategien für Magenkarzinompatienten liefern können, wurden für diese Substanzen ebenfalls Dosis-Wirkungskurven erstellt und deren IC_{50} berechnet.

4.2.2.1 Chemosensitivität gegenüber den HDAC-Inhibitoren SAHA und VPA

4.2.2.1.1 HDAC-Inhibitoren als Einzelsubstanzen

Die Zelllinien KATOIII und AGS, welche die höchsten IC_{50} Werte für Cisplatin aufwiesen, zeigten bezüglich der HDAC-Inhibitoren SAHA (2,7 μ M und 3,3 μ M) und VPA (beide 2,8 mM) die stärkste Sensitivität. Allerdings lagen die IC_{50} Werte der beiden anderen Zelllinien MKN28 und MKN45 für SAHA (4,5 μ M und 3,9 μ M) und VPA (3,6 mM und 4,3 mM) nur geringfügig höher. Sowohl die Dosis-Wirkungskurven für SAHA und VPA als auch die daraus berechneten IC_{50} Werte sind in Abb. 4.14 dargestellt.

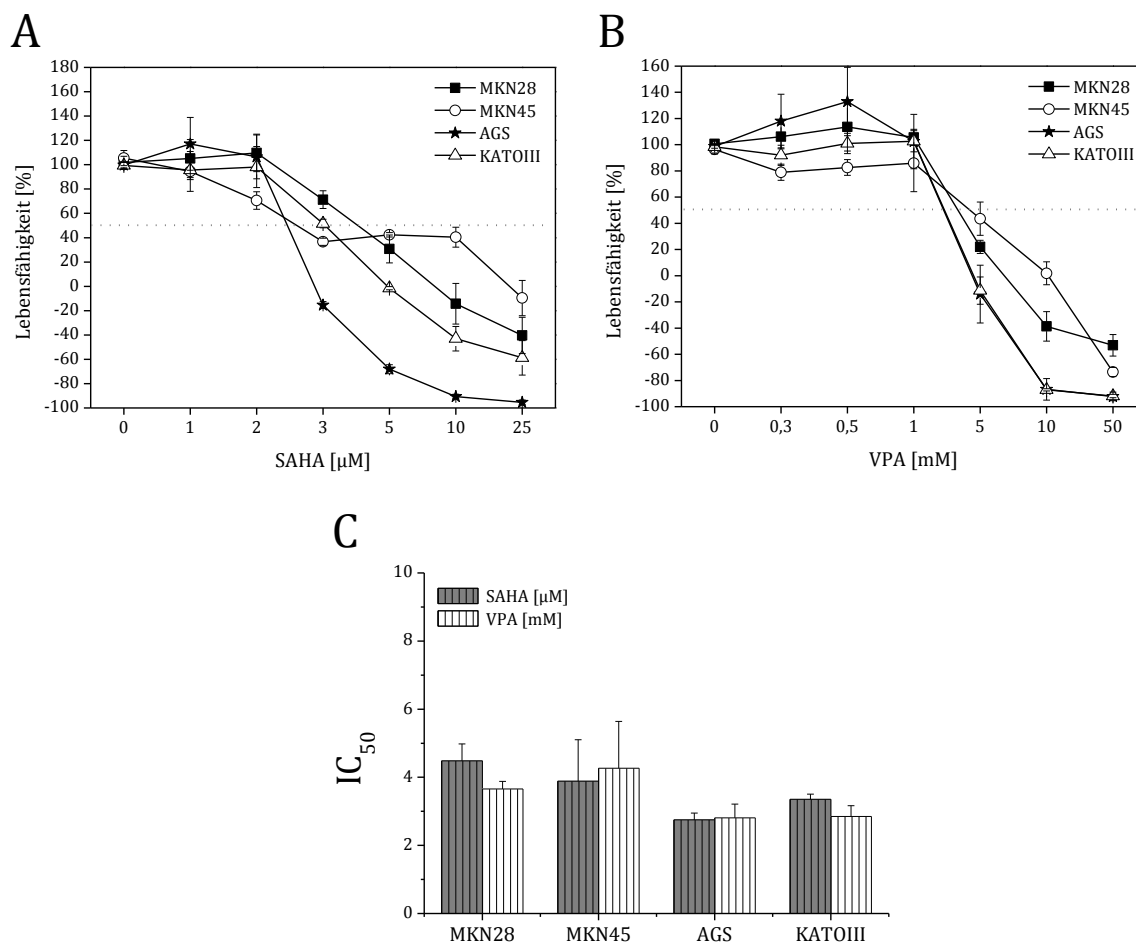


Abb. 4.14: Dosis-Wirkungskurven und IC₅₀ für die HDAC-Inhibitoren SAHA und VPA. Dargestellt ist die auf die unbehandelte Kontrolle bezogene prozentuale Lebensfähigkeit (Y-Achse) der Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und KATOIII als Funktion der (A) SAHA bzw. der (B) VPA Konzentration nach einem Behandlungszeitraum von 48h. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit 4-fach-Bestimmung. Die grau gestrichelten Linien markieren die Reduktion der Viabilität um 50 %. (C) Dargestellt ist die IC₅₀ für SAHA und VPA, die sich aus den Dosis-Wirkungskurven berechnen lässt.

Tab. 4.15: Übersicht über die IC₅₀ Werte für die HDAC-Inhibitoren

Zelllinie	IC ₅₀	
	SAHA [μ M]	VPA* [mM]
MKN28	4,48 ± 0,50	3,66 ± 0,22
MKN45	3,88 ± 1,22	4,26 ± 1,38
AGS	2,75 ± 0,20	2,80 ± 0,41
KATOIII	3,36 ± 0,15	2,85 ± 0,31

*die Daten zu VPA wurden im Rahmen einer Masterarbeit von Felix Schuhmacher erhoben. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit 4-fach-Bestimmung.

4.2.2.1.2 Kombination von Cisplatin mit dem HDAC-Inhibitor SAHA

Im Hinblick auf die Möglichkeit, dass eine Kombinationstherapie bestehend aus konventionellen und epigenetisch aktiven Substanzen eine weitere alternative Behandlungsstrategie für Magenkarzinompatienten darstellen könnte, wurden Kombinationen der verschiedenen Therapeutika getestet. Aufgrund der Tatsache, dass in einigen Publikationen für die Kombination von Cisplatin mit HDAC-Inhibitoren bereits synergistische Wirkungsweisen in *in vitro* Modellen nachgewiesen werden konnten, stellte sich die Frage ob sich im hier verwendeten Zellkulturmodell mit einer Kombination von klinisch relevanten Konzentrationen der Agenzien Cisplatin (2 μM) und SAHA (1,5 μM) eine verstärkte Reduktion der Zellviabilität erreichen lässt. Für diese Untersuchungen wurden die Zelllinien MKN28 und AGS ausgesucht, da sie sich bezüglich ihrer Sensitivität gegenüber Cisplatin und SAHA gegenläufig verhalten, und eine ähnliche Proliferationszeit aufweisen.

Die Kombination von Cisplatin mit SAHA wurde unter Verwendung von drei verschiedenen Kombinationsschemata durchgeführt. Zum einen erfolgte eine gleichzeitige Inkubation mit Cisplatin und SAHA, zum anderen zwei sequenzielle Behandlungen bei denen einmal die Cisplatin-Behandlung auf die Behandlung mit SAHA folgte und umgekehrt. Die Vorbehandlung der Zellen mit SAHA mit anschließender Cisplatin-Inkubation resultierte in beiden Zelllinien in einer statistisch signifikanten Reduktion der Zellviabilität verglichen mit der Behandlung der Zellen mit Cisplatin (AGS: $P = 0,004$; MKN28 $P = 0,008$) oder SAHA (AGS: $P = 0,022$; MKN28 $P = 0,01$) alleine. Durch eine gleichzeitige Behandlung mit beiden Agenzien konnte nur bei der Cisplatin-resistenteren Zelllinie AGS ($P = 0,003$ und $P = 0,02$ verglichen mit Cisplatin bzw. SAHA als Einzelagenzien) nicht aber bei der Zelllinie MKN28 ($P = 0,095$ und $P = 0,93$ verglichen mit Cisplatin bzw. SAHA alleine) eine signifikante Reduktion der Zellviabilität erreicht werden. Abb. 4.15 fasst die Ergebnisse der Kombination zwischen Cisplatin und SAHA zusammen:

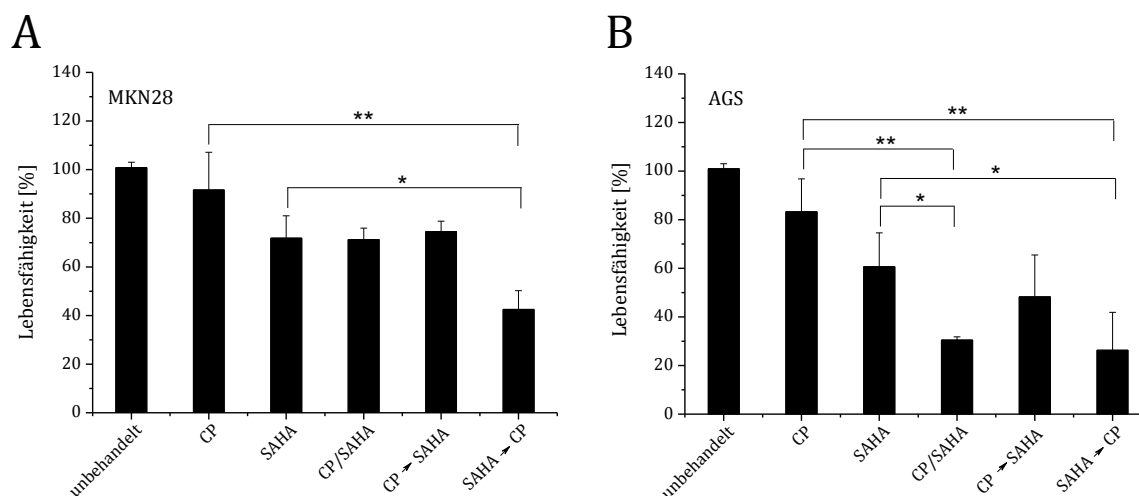


Abb. 4.15: Zellviabilität nach Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und SAHA. Dargestellt ist die auf die unbehandelte Kontrolle bezogene prozentuale Lebensfähigkeit (Y-Achse) der Magenkarzinomzelllinien **(A)** MKN28 und **(B)** AGS nach Behandlung mit drei unterschiedlichen Kombinationsschemata verglichen mit Cisplatin (CP) und SAHA alleine (CP/SAHA: 2 µM CP und 1,5 µM SAHA für 48 h; CP→SAHA: 2 µM CP für 24 h gefolgt von 1,5 µM SAHA für 24 h; SAHA→CP: 1,5 µM SAHA für 24 h gefolgt von 2 µM CP für 24 h). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit 4-fach-Bestimmung. Die P-Werte wurden mit dem Student-T-Test berechnet: * P < 0,05; ** P < 0,01.

Für die Kombination von Cisplatin mit SAHA wurde der Kombinations-Index berechnet um einen möglichen Synergismus der beiden Substanzen nachzuweisen (siehe Abschnitt 3.2.5.1.3). Die nachfolgende Tab. 4.16 zeigt deutlich, dass die Reduktion der Viabilität durch die Kombination von Cisplatin und SAHA in beiden Zelllinien auf einer synergistischen Wirkungsweise beruht, da die Berechnung des jeweiligen CI einen Wert < 1 ergab.

Tab. 4.16: Berechnung des Kombinations-Index (CI) für die Kombination von Cisplatin und SAHA

Zelllinie	Kombination	% Lebensfähigkeit	Konzentration in µM				CI ^a
			(D) _{1(CP)}	(D) _{2(SAHA)}	(D _x) _{1(CP)}	(D _x) _{2(SAHA)}	
AGS	CP/SAHA	30,51	2	1,5	22,18	2,81	0,67
	CP → SAHA	48,24	2	1,5	18,84	2,73	0,71
	SAHA → CP	26,34	2	1,5	22,92	2,83	0,66
MKN28	SAHA → CP	42,48	2	1,5	8,99	4,06	0,67

^a Combination Index : $CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 + (D)_1 (D)_2 / (D_x)_1 (D_x)_2$

4.2.2.1.3 Assoziation von Chemosensitivität und HDAC-Expression

Die Expression der Histondeacetylasen HDAC1 und HDAC2 wurde in den Zelllinien ermittelt, um eine mögliche Korrelation mit der Chemosensitivität gegenüber Standardchemotherapeutika aber auch gegenüber den HDAC-Inhibitoren zu untersuchen. Die in Abb. 4.16 dargestellte Analyse der Proteinexpression ergab eine schwache Expression von HDAC1 in den Zelllinien AGS und KATOIII, eine mittlere Expression in der Zelllinie MKN28 und eine starke Expression bei MKN45. Dabei zeigten die Untersuchungen mittels Western Blot und die Immunhistochemie von Zellpellets übereinstimmende Ergebnisse. Vergleicht man die HDAC1-Expression mit der Sensitivität der Zelllinien gegenüber Cisplatin und den HDAC-Inhibitoren, lässt sich erkennen, dass die Zelllinien AGS und KATOIII, welche die niedrigste Expression zeigen, die höchsten IC_{50} Werte für Cisplatin und die niedrigsten für SAHA und VPA aufweisen. In Bezug auf die HDAC2-Expression, ermittelt an Zellpellets, ergaben sich nur geringfügige Unterschiede zwischen den Zelllinien (Abb. 4.16 D). Die Zelllinie MKN28, die sich am unempfindlichsten gegen SAHA und VPA zeigte, wies verglichen mit den anderen Zelllinien, die eine mittlere Expression zeigten, eine geringfügig höhere HDAC2-Expression auf.

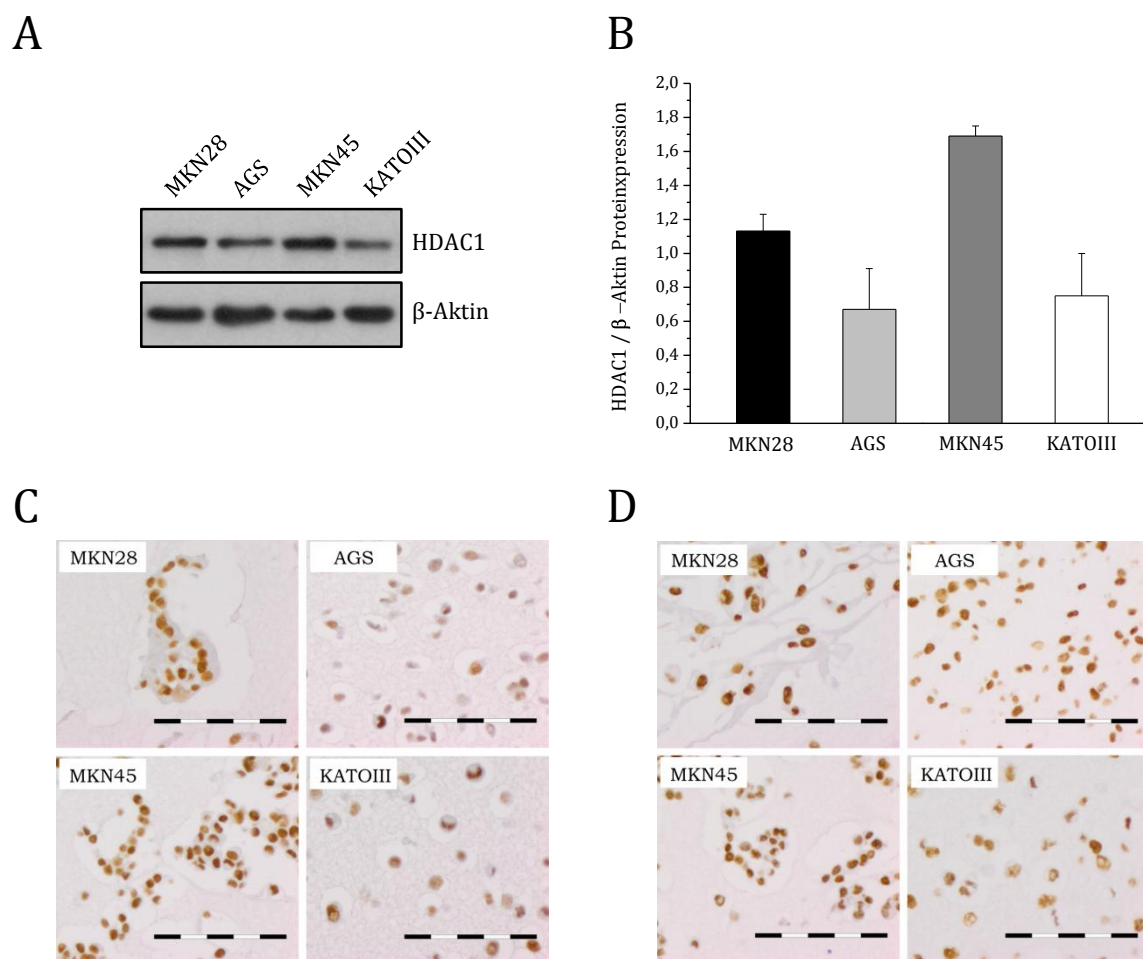


Abb. 4.16: Expression von HDAC1 und HDAC2 in Magenkarzinomzelllinien: Dargestellt ist **(A)** ein repräsentativer Western Blot zur Proteinexpression von HDAC1 in Zelllysaten der angegebenen Magenkarzinomzelllinien. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. **(B)** Densitometrische Quantifizierung der HDAC1 Proteinexpression normalisiert auf die Expression von β -Aktin. Mittelwerte mit Standardabweichung aus drei unabhängigen Western Blot Analysen sind gezeigt. **(C)** Immunhistochemischer Nachweis der HDAC1 Proteinexpression an Schnitten von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Zellpellets. **(D)** Immunhistochemischer Nachweis der HDAC2 Proteinexpression an Schnitten von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Zellpellets.

4.2.2.2 Chemosensitivität gegenüber den DNMT-Inhibitoren DAC und Zebularin

4.2.2.2.1 DNMT-Inhibitoren als Einzelsubstanzen

Die Sensitivität der untersuchten Zelllinien unterscheidet sich in Abhängigkeit des verwendeten Inhibitors. Die beiden Cisplatin-resistenteren Zelllinien AGS und KATOIII zeigten eine deutlich geringere IC_{50} für DAC ($0,9 \mu M$ und $0,5 \mu M$) als die Cisplatin-sensitivere Zelllinien MKN28, die eine höhere IC_{50} von $33,9 \mu M$ für DAC aufwies. Allein die Zelllinie MKN45 zeigte sowohl für Cisplatin als auch für DAC ($IC_{50} 0,1 \mu M$) eine

vergleichsweise niedrigen IC_{50} . Das Ansprechen der Zelllinien auf den anderen DNMT-Inhibitor Zebularin lässt sich nicht mit dem Ansprechen auf DAC vergleichen. Zebularin wies erst in deutlich höherer Konzentration (IC_{50} 87 bis 423 μ M) als DAC eine antiproliferative Wirkung auf. Was weiterhin auffällt, ist dass die Zelllinien AGS, KATOIII und MKN45, die eine gute Sensitivität bezüglich DAC zeigten, sich als die resistantesten in Bezug auf Zebularin erwiesen. Abb. 4.17 zeigt die Dosis-Wirkungskurven und IC_{50} -Wert der DNMT-Inhibitoren.

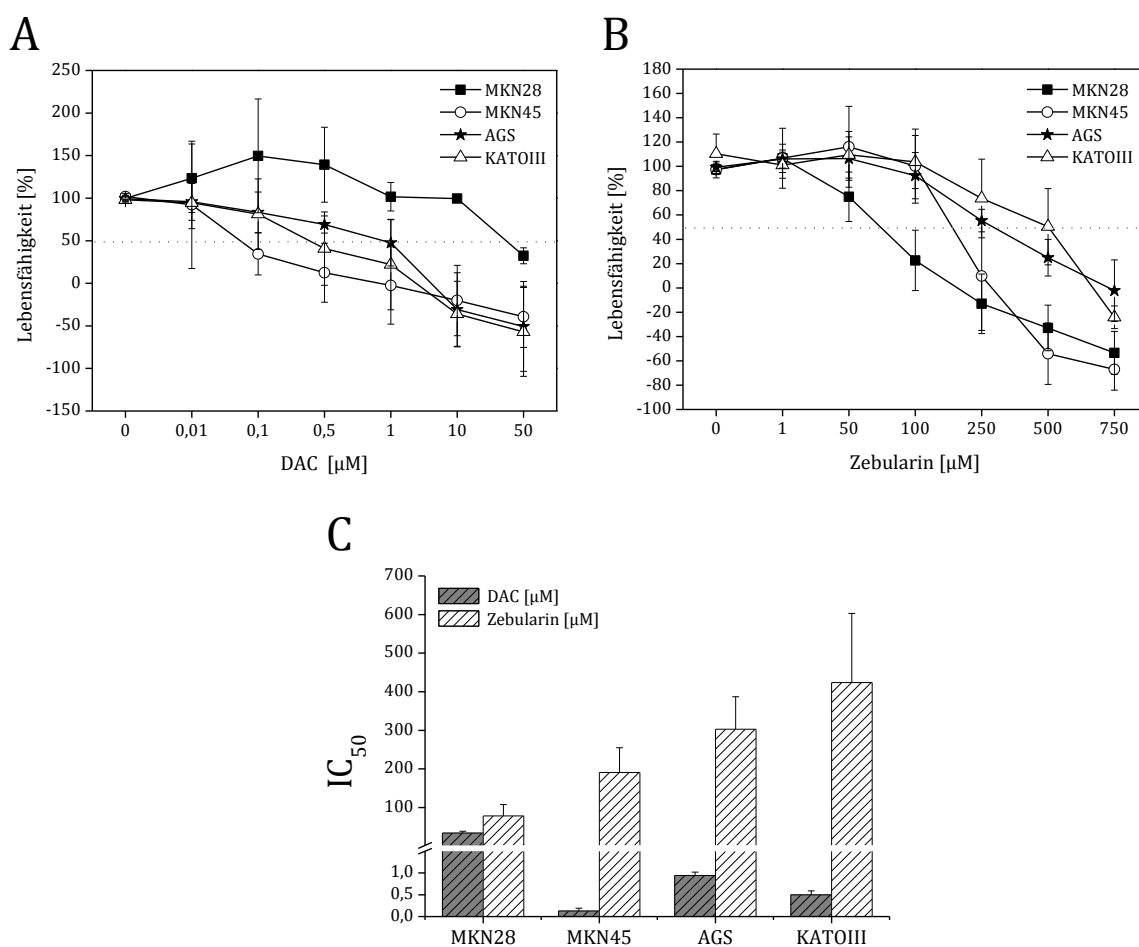


Abb. 4.17: Dosis-Wirkungskurven und IC_{50} für die DNMT-Inhibitoren DAC und Zebularin. Dargestellt ist die auf die unbehandelte Kontrolle bezogene prozentuale Lebensfähigkeit (Y-Achse) der Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und KATOIII als Funktion der (A) DAC- bzw. der (B) Zebularin-Konzentration nach einem Behandlungszeitraum von 96h. Angegeben sind Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit 4-fach-Bestimmung. Die grau gestrichelten Linien markieren die Reduktion der Viabilität um 50 %. (C) Dargestellt ist die IC_{50} für DAC und Zebularin, die sich aus den Dosis-Wirkungskurven berechnen lässt.

Tab. 4.17: Übersicht über die IC_{50} Werte für die DNMT-Inhibitoren

Zelllinie	IC_{50}	
	DAC* [μ M]	Zebularin [μ M]
MKN28	33,94 \pm 0,47	78,45 \pm 29,62
MKN45	0,13 \pm 0,06	191,10 \pm 63,96
AGS	0,94 \pm 0,08	303,12 \pm 84,05
KATOIII	0,50 \pm 0,09	423,73 \pm 179,41

*die Daten zu DAC wurden zum Teil im Rahmen einer Masterarbeit von Felix Schuhmacher erhoben. Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit 4-fach-Bestimmung.

4.2.2.2 Kombination von Cisplatin mit dem DNMT-Inhibitor DAC

Wie der HDAC-Inhibitor SAHA wurde auch der DNMT-Inhibitor DAC in der Kombination mit Cisplatin getestet, wobei auch hier wieder klinisch relevante Konzentrationen der beiden Agenzien (2 μ M Cisplatin und 1 μ M DAC) und die Zelllinien MKN28 und AGS verwendet wurden (Gyorffy *et al.*, 2006; Stresemann *et al.*, 2006; Appleton *et al.*, 2007). Für die Kombination wurden zwei unterschiedliche Kombinationsschemata eingesetzt. Zum einen eine Inkubation mit DAC gefolgt von einer Inkubation mit Cisplatin und zum anderen eine Inkubation der Zellen mit DAC und anschließende Behandlung mit Cisplatin und DAC gleichzeitig. Wie aus Abb. 4.18 zu entnehmen ist, resultierte keine der Kombinationen der Agenzien Cisplatin und DAC in der Zelllinie MKN28 in einer signifikanten Reduktion der Zellviabilität (siehe Abb. 4.18 A).

Die Behandlung mit DAC gefolgt von Cisplatin führte allerdings in der Cisplatin-resistenteren Zelllinie AGS zu einer signifikanten Reduktion der Viabilität im Vergleich zur Behandlung mit Cisplatin als Einzelsubstanz ($P = 0,047$). Eine signifikante Reduktion der Viabilität verglichen mit beiden Agenzien alleine konnte auch durch die gleichzeitige Behandlung mit DAC und Cisplatin beobachtet werden ($P = 0,039$ im Vergleich zu DAC alleine und $P = 0,009$ im Vergleich zu Cisplatin als Einzelsubstanz) (siehe Abb. 4.18 B).

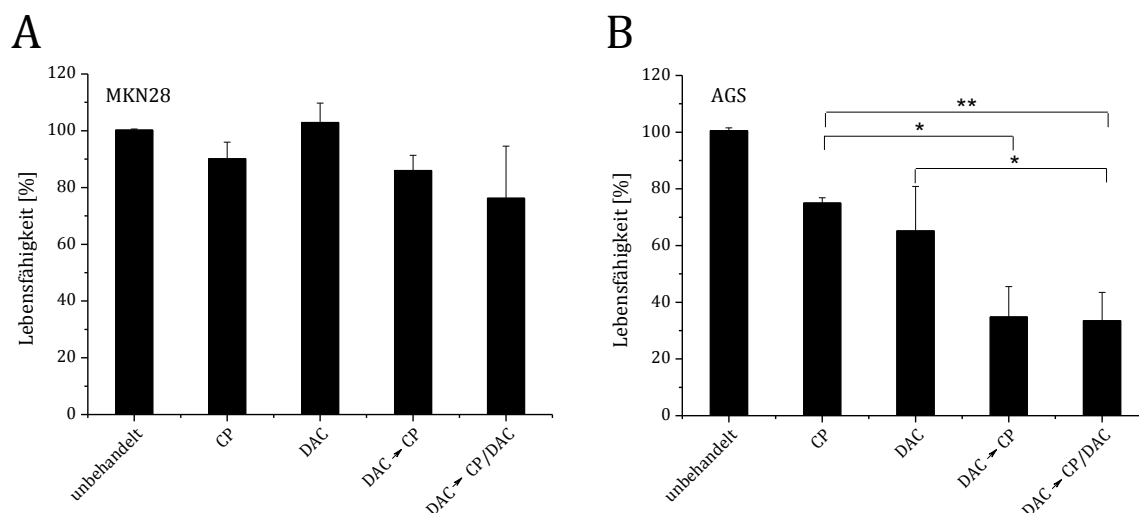


Abb. 4.18: Zellviabilität nach Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und DAC. Dargestellt ist die auf die unbehandelte Kontrolle bezogene prozentuale Lebensfähigkeit (Y-Achse) der Magenkarzinomzelllinien **(A)** MKN28 und **(B)** AGS nach Behandlung mit zwei unterschiedlichen Kombinationsschemata verglichen mit Cisplatin (CP) und DAC alleine. (DAC→CP: 1 µM DAC für 48 h gefolgt von 2 µM CP für 48 h; DAC→CP/DAC: 1 µM DAC für 48 h gefolgt von 2 µM CP und 1 µM DAC für 48 h). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit 4-fach-Bestimmung. Die P-Werte wurden mit dem Student-T-Test berechnet: * P < 0,05.

Die Berechnung der Kombinations-Indices für die Kombination von Cisplatin mit DAC weist auf ein synergistisches Zusammenspiel der Agenzien hin, wie sich aus Tab. 4.18 ersehen lässt.

Tab. 4.18: Berechnung des Kombinations-Index (CI) für die Kombination von Cisplatin und DAC

Zelllinie	Kombination	% Lebensfähigkeit	Konzentration in µM				CI ^a
			(D) ₁ (CP)	(D) ₂ (DAC)	(D _x) ₁ (CP)	(D _x) ₂ (DAC)	
AGS	DAC → CP	34,82	2	1	21,39	1,36	0,90
	DAC → CP/DAC	33,54	2	1	21,02	1,40	0,88

^a Combination Index : $CI = (D)_1 / (D_x)_1 + (D)_2 / (D_x)_2 + (D)_1 (D)_2 / (D_x)_1 (D_x)_2$

4.2.2.2.3 Assoziation von Chemosensitivität und DNMT-Expression

Da die Expression der DNA-Methyltransferase 1 in den prätherapeutischen Biopsien neoadjuvant behandelter Magenkarzinompatienten eine signifikante Assoziation mit dem Überleben und dem Therapieansprechen zeigte, stellte sich die Frage, ob diese Assoziation auch im Modellsystem der Magenkarzinomzelllinien wiederzufinden ist. Außerdem könnte die Expression der DNA-Methyltransferasen auch im Zusammenhang mit der Sensitivität der Zelllinien für DNMT₁-Inhibitoren stehen. Aus diesem Grund

wurden Expressionsanalysen sowohl auf RNA Ebene (DNMT1 und 3b, quantitative Real-Time PCR) als auch auf Proteinebene (IHC an Zellpellets für DNMT1 und 3b; Western Blot für DNMT1) durchgeführt. Bezüglich der mRNA Expression von DNMT1 zeigte sich folgendes Bild: Die Zelllinie MKN28 wies deutlich die höchste Expression auf, wohingegen die Zelllinien AGS, MKN45 und KATOIII eine um mindestens 50 % niedrigere Expression zeigten (Abb. 4.19 A). Betrachtet man die Proteinexpression mittels Western Blot (Abb. 4.19 B und C) so lässt sich feststellen, dass die Proteinexpression der DNMT1 außer für die Zelllinie MKN45 (niedrigere mRNA Expression im Vergleich zu Proteinexpression) relativ gut mit der mRNA Expression übereinstimmte. Auch hier zeigt sich die Zelllinie MKN28 als diejenige mit der stärksten DNMT1-Expression. Vergleichbare Ergebnisse zur DNMT1-Expression konnten durch Immunhistochemie an Zellpellets nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.19 D). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass zumindest für die begrenzte Anzahl der untersuchten Zelllinien keine Assoziation zwischen hoher DNMT1-Expression und schlechterem Ansprechen auf Cisplatin gezeigt werden konnte. Auch eine Assoziation zwischen Methylierungsstatus und DNMT1-Expression ließ sich in den Zelllinien nicht nachweisen (Vergleiche Abb. 4.12).

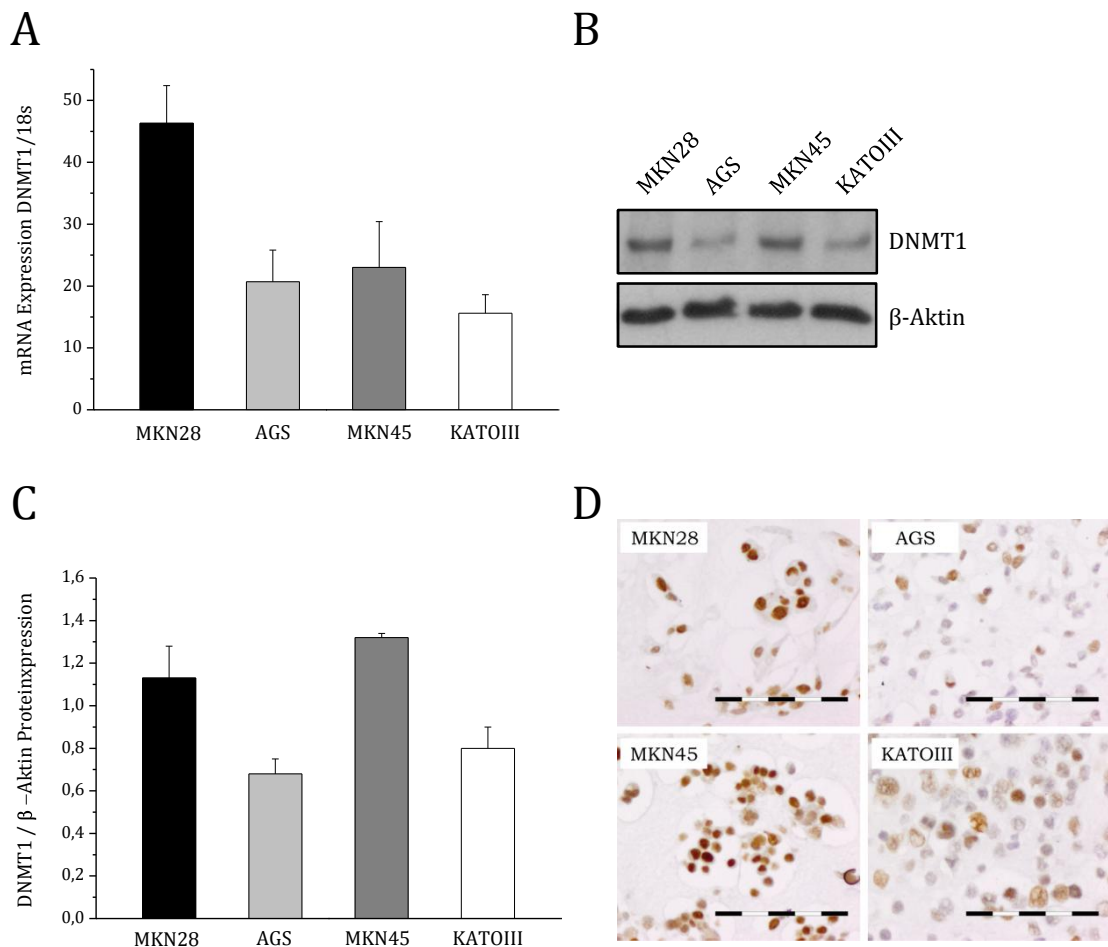


Abb. 4.19: Expression von DNMT1 in Magenkarzinomzelllinien. Dargestellt ist die **(A)** relative DNMT1 mRNA Expression der Zelllinien MKN28, AGS, MKN45 und KATOIII, normalisiert auf die 18s rRNA Expression. Mittelwerte und Standardabweichungen basieren auf drei unabhängigen Versuchen. **(B)** Repräsentativer Western Blot zur Proteinexpression von DNMT1 in Zelllysaten der angegebenen Magenkarzinomzelllinien. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. **(C)** Densitometrische Quantifizierung der DNMT1 Proteinexpression normalisiert auf die Expression von β -Aktin. Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Western Blot Analysen sind angegeben. **(D)** Immunhistochemischer Nachweis der DNMT1 Proteinexpression an Schnitten von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Zellpellets.

Die Expressionsanalyse für DNMT3b zeigte deutliche Unterschiede zwischen mRNA und Proteinexpression. Bezüglich der mRNA wies die Zelllinie AGS die höchste Expression auf, die Zelllinie MKN28 eine mittlere und MKN45 und KATOIII eine vergleichsweise niedrige Abb. 4.20 A). Auf Proteinebene wies DNMT3b, (Immunhistochemie an Zellpellets, Abb. 4.20 B) eine starke Expression in den Zelllinien MKN28, MKN45 und AGS auf. Lediglich die Zelllinie KATOIII zeigte im Vergleich zu den anderen eine geringfügig niedrigere Expression.

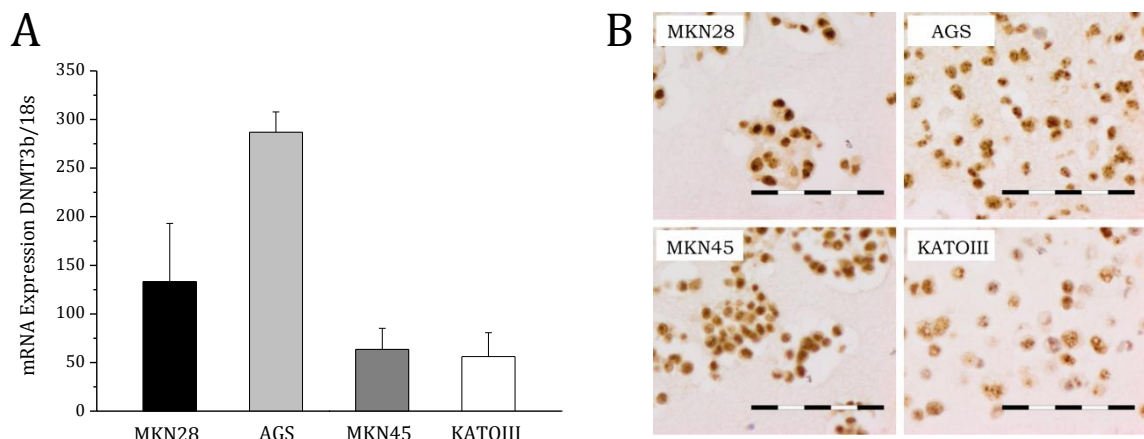


Abb. 4.20: Expression von DNMT3b in Magenkarzinomzelllinien: Dargestellt ist die **(A)** relative DNMT3b mRNA Expression der Zelllinien MKN28, AGS, MKN45 und KATOIII, normalisiert auf die 18s rRNA Expression. Mittelwerte und Standardabweichungen basieren auf drei unabhängigen Versuchen. **(B)** Immunhistochemischer Nachweis der DNMT3b Proteinexpression an Schnitten von Formalin-fixierten, Paraffin-eingebetteten Zellpellets, bestimmt mittels

4.2.2.2.4 Einfluss von DNMT-Inhibitoren auf die Methylierungsrate der Zelllinien MKN28 und AGS

Ob der Einsatz von DNA-Methyltransferase-Inhibitoren wie DAC und Zebularin in den verwendeten Zelllinien effektiv die Demethylierung verschiedener Gene bewirken kann, wurde anhand der Zelllinien MKN28 und AGS mit dem MS-MLPA Assay analysiert. Die folgenden Tabellen zeigen die Methylierungsrate der Zelllinien MKN28 und AGS nach einer 96-stündigen Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen der DNMT-Inhibitoren DAC und Zebularin. Dafür wurden sowohl Konzentrationen verwendet, die der jeweiligen inhibitorischen Wirkung auf die Viabilität entsprechen (jeweilige IC_{20} und IC_{50} für MKN28 und AGS) als auch die Konzentrationen $1 \mu\text{M}$ für DAC, welche in den Kombinationsversuchen eingesetzt wurde und $100 \mu\text{M}$ für Zebularin.

Die nachfolgenden Tabellen stellen den Einfluss der Behandlung auf die Methylierung der einzelnen Gene und der Gesamtmethylierungsrate dar.

Tab. 4.19: Methylierungsrate der Zelllinie MKN28 nach der Behandlung mit DAC

Gen	Methylierungsrate von MKN28 nach DAC-Behandlung			
	unbehandelt	IC ₂₀	IC ₅₀	1 µM
<i>TP73</i>	0,01	0,2	0,11	0,14
<i>CASP8</i>	0	0,03	0	0
<i>VHL</i>	0	0	0	0
<i>RARB</i>	0,14	0,1	0,12	0,07
<i>MLH1 (Locus 1)</i>	0	0,06	0,04	0,03
<i>MLH1 (Locus 2)</i>	0	0	0	0
<i>RASSF1 (Locus 1)</i>	0,83	0,29	0,34	0,38
<i>RASSF1 (Locus 2)</i>	0,89	0,72	0,75	0,49
<i>FHIT</i>	1	0,72	0,34	0,31
<i>APC</i>	0,88	0,64	0,66	0,52
<i>ESR1</i>	0,81	0,48	0,48	0,53
<i>CDKN2A</i>	0	0,09	0,28	0,09
<i>CDKN2B</i>	0	0	0	0
<i>DAPK1</i>	0	0,06	0	0
<i>PTEN</i>	0,04	0,2	0,18	0,11
<i>CD44</i>	0,93	0,7	0,47	0,68
<i>GSTP1</i>	0,13	0,53	0,38	0,37
<i>ATM</i>	0	0,08	0,05	0,04
<i>IGSF4</i>	0	0,09	0,08	0
<i>CDKN1B</i>	0	0	0	0
<i>CHFR</i>	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	0	0,11	0,1	0,05
<i>CDH13</i>	0,58	0,52	0,34	0,28
<i>HIC1</i>	0	0,25	0,09	0,08
<i>BRCA1</i>	0,01	0,03	0,03	0,02
<i>TIMP3</i>	0,7	0,54	0,34	0,53
% Methyl^a	27	25	20	18
unmethyliert (0-0,19)	med. methyl. (0,2-0,69)		stark methyl. (> 0,69)	

^a % Methylierungsrate, Verhältnis zwischen HhaI verdauten und unverdauten Teilproben, bezogen auf alle getesteten Loci. Angegeben ist die Methylierungsrate der Zelllinie nach der Behandlung mit unterschiedlichen DAC-Konzentrationen. Die Zellen wurden 96 h behandelt, die DNA extrahiert, aufgereinigt und in den MS-MLPA-Test eingesetzt.

Tab. 4.20: Methylierungsrate der Zelllinie MKN28 nach der Behandlung mit Zebularin

Gen	Methylierungsrate von MKN28 nach Zebularin Behandlung			
	unbehandelt	IC ₂₀	IC ₅₀	100 µM
<i>TP73</i>	0,01	0,07	0,05	0,02
<i>CASP8</i>	0	0	0	0
<i>VHL</i>	0	0	0	0
<i>RARB</i>	0,14	0,13	0,12	0,12
<i>MLH1 (Locus 1)</i>	0	0	0	0
<i>MLH1 (Locus 2)</i>	0	0	0	0
<i>RASSF1 (Locus 1)</i>	0,83	1,06	0,87	0,83
<i>RASSF1 (Locus 2)</i>	0,89	1,24	1,41	1,21
<i>FHIT</i>	1	0,76	0,88	1
<i>APC</i>	0,88	0,96	1,13	1,09
<i>ESR1</i>	0,81	0,99	1,07	0,92
<i>CDKN2A</i>	0	0	0	0
<i>CDKN2B</i>	0	0	0	0
<i>DAPK1</i>	0	0	0	0
<i>PTEN</i>	0,04	0,03	0,04	0,05
<i>CD44</i>	0,93	0,94	0,95	0,91
<i>GSTP1</i>	0,13	0,12	0,22	0,11
<i>ATM</i>	0	0	0	0
<i>IGSF4</i>	0	0	0	0
<i>CDKN1B</i>	0	0	0	0
<i>CHFR</i>	0	0	0	0
<i>BRCA2</i>	0	0	0	0
<i>CDH13</i>	0,58	0,81	0,66	0,68
<i>HIC1</i>	0	0	0	0
<i>BRCA1</i>	0,01	0	0	0
<i>TIMP3</i>	0,7	0,57	0,65	0,44
% Methyl^a	27	30	31	28
unmethyliert (0-0,19)	med. methyl. (0,2-0,69)		stark methyl. (> 0,69)	

^a % Methylierungsrate, Verhältnis zwischen HhaI verdauten und unverdauten Teilproben, bezogen auf alle getesteten Loci. Angegeben ist die Methylierungsrate der Zelllinie nach der Behandlung mit unterschiedlichen Zebularin-Konzentrationen. Die Zellen wurden 96 h behandelt, die DNA extrahiert, aufgereinigt und in den MS-MLPA-Test eingesetzt.

Tab. 4.21: Methylierungsrate der Zelllinie AGS nach der Behandlung mit DAC

Gen	Methylierungsrate von AGS nach DAC Behandlung			
	unbehandelt	IC ₂₀	IC ₅₀	1 µM
<i>TP73</i>	0,67	0,56	0,61	0,55
<i>CASP8</i>	0	0	0,02	0
<i>VHL</i>	0	0	0	0
<i>RARB</i>	1,05	0,58	0,46	0,55
<i>MLH1 (Locus 1)</i>	0	0	0	0,02
<i>MLH1 (Locus 2)</i>	0	0	0	0
<i>RASSF1 (Locus 1)</i>	0,91	0,69	0,37	0,45
<i>RASSF1 (Locus 2)</i>	1,32	0,67	0,39	0,67
<i>FHIT</i>	0	0	0	0
<i>APC</i>	1,17	0,67	0,54	0,61
<i>ESR1</i>	1,02	0,73	0,45	0,43
<i>CDKN2A</i>	1,77	1,29	0,86	0,88
<i>CDKN2B</i>	0	0	0	0
<i>DAPK1</i>	0,94	0,71	0,46	0,55
<i>PTEN</i>	0,05	0,06	0,06	0,06
<i>CD44</i>	0,53	0,43	0,28	0,33
<i>GSTP1</i>	1,18	0,99	1,04	1,5
<i>ATM</i>	0	0	0	0,02
<i>IGSF4</i>	0,82	0,43	0,3	0,4
<i>CDKN1B</i>	0	0	0	0
<i>CHFR</i>	1,43	0,7	0,48	0,59
<i>BRCA2</i>	0	0	0,02	0,02
<i>CDH13</i>	1	0,68	0,51	0,53
<i>HIC1</i>	0,08	0,04	0,05	0,06
<i>BRCA1</i>	0	0	0,02	0
<i>TIMP3</i>	0,54	0,48	0,48	0,34
% Methyl^a	56	37	28	31
unmethyliert (0-0,19)	med. methyl. (0,2-0,69)		stark methyl. (> 0,69)	

^a % Methylierungsrate, Verhältnis zwischen Hhal verdauten und unverdauten Teilproben, bezogen auf alle getesteten Loci. Angegeben ist die Methylierungsrate der Zelllinie nach der Behandlung mit unterschiedlichen DAC-Konzentrationen. Die Zellen wurden 96 h behandelt, die DNA extrahiert, aufgereinigt und in den MS-MLPA-Test eingesetzt.

Tab. 4.22: Methylierungsrate der Zelllinie AGS nach der Behandlung mit Zebularin

Gen	Methylierungsrate von AGS nach Zebularin Behandlung			
	unbehandelt	IC ₂₀	IC ₅₀	100 µM
<i>TP73</i>	0,67	0,84	0,52	1,36
<i>CASP8</i>	0	0	0	0
<i>VHL</i>	0	0	0	0
<i>RARB</i>	1,05	0,76	0,71	1,02
<i>MLH1 (Locus 1)</i>	0	0	0	0
<i>MLH1 (Locus 2)</i>	0	0	0	0
<i>RASSF1 (Locus 1)</i>	0,91	0,77	0,68	0,86
<i>RASSF1 (Locus 2)</i>	1,32	1,16	1,14	1,45
<i>FHIT</i>	0	0	0	0
<i>APC</i>	1,17	0,79	1,11	0,91
<i>ESR1</i>	1,02	0,81	0,79	0,9
<i>CDKN2A</i>	1,77	1,28	1,53	1,49
<i>CDKN2B</i>	0	0	0	0
<i>DAPK1</i>	0,94	0,8	0,54	0,87
<i>PTEN</i>	0,05	0,04	0,06	0,08
<i>CD44</i>	0,53	0,5	0,41	0,56
<i>GSTP1</i>	1,18	1,95	0,84	1,31
<i>ATM</i>	0	0	0	0
<i>IGSF4</i>	0,82	0,51	0,46	0,58
<i>CDKN1B</i>	0	0	0	0
<i>CHFR</i>	1,43	0,81	0,97	1,02
<i>BRCA2</i>	0	0	0	0
<i>CDH13</i>	1	0,86	0,81	0,97
<i>HIC1</i>	0,08	0,04	0,04	0,03
<i>BRCA1</i>	0	0	0	0
<i>TIMP3</i>	0,54	0,7	0,34	0,71
% Methyl^a	56	49	42	54
unmethyliert (0-0,19)	med. methyl. (0,2-0,69)		stark methyl. (> 0,69)	

^a % Methylierungsrate, Verhältnis zwischen HhaI verdauten und unverdauten Teilproben, bezogen auf alle getesteten Loci. Angegeben ist die Methylierungsrate der Zelllinie nach der Behandlung mit unterschiedlichen Zebularin-Konzentrationen. Die Zellen wurden 96 h behandelt, die DNA extrahiert, aufgereinigt und in den MS-MLPA-Test eingesetzt.

Betrachten man die Tabellen für die Zelllinie MKN28, so zeigt sich für die unbehandelten Zellen die Methylierung von 7 der 24 untersuchten Gene, was einem Prozentsatz von 29 entspricht. Berechnet man die Methylierungsrate, indem die Verhältnisse mit HhaI verdauten und unverdauten Teilproben des MS-MLPA Assays für die einzelnen Gene addiert und auf die 26 getesteten Loci bezogen werden, so ergibt sich eine Methylierungsrate von 27 %. Für die Zelllinie AGS liegt die Anzahl an methylierten Genen bei 54% (13 von 24), die Methylierungsrate bei 56 %.

Auch der Einfluss der DNMT-Inhibitoren auf die Methylierungsrate der Zelllinien ist aus den Tabellen abzulesen. So zeigte sich bei MKN28 für keine der getesteten Zebularin-Konzentrationen eine Reduktion der Methylierungsrate nach einer 96-stündigen Behandlung, für AGS ließ sich eine leichte Reduktion bei der Behandlung mit der IC₂₀ und IC₅₀ feststellen. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach der Behandlung mit DAC bei beiden Zelllinien eine Reduktion der Methylierungsrate ab der IC₂₀. Diese Reduktion fiel für die Zelllinie AGS stärker aus als für MKN28. Allerdings zeigte sich für keine der Zelllinien eine komplette Demethylierung einzelner Gene. In Abb. 4.21 A und B sind die Methylierungsraten für beide Zelllinien nach der Behandlung mit Zebularin bzw. DAC dargestellt.

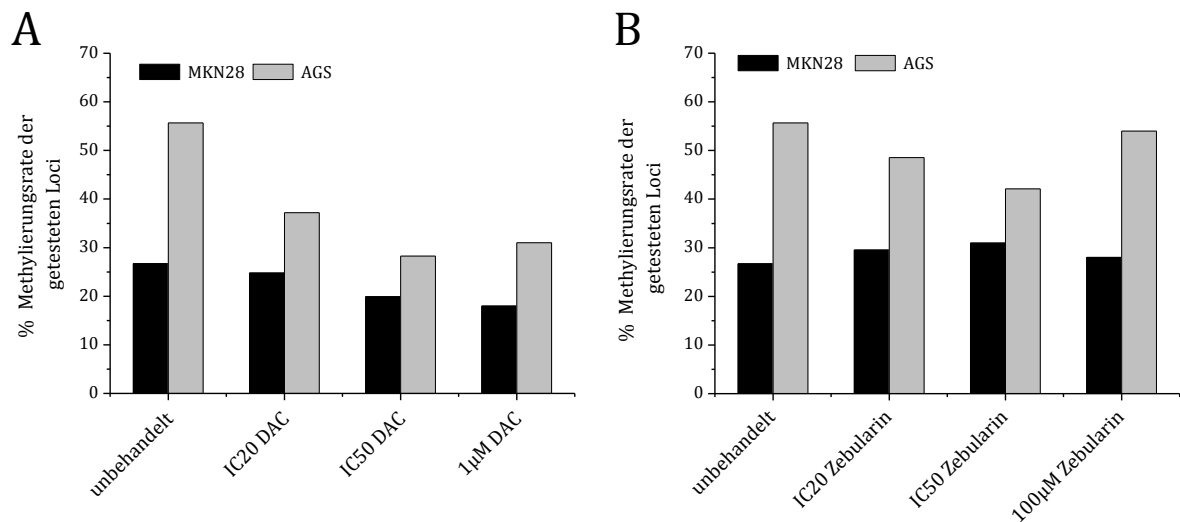


Abb. 4.21: Einfluss der Behandlung mit DNMT-Inhibitoren auf die Methylierungsrate. Die X-Achse zeigt den Prozentsatz der Methylierungsrate bezogen auf alle getesteten Loci (n=26) für die Behandlung mit (A) DAC und (B) Zebularin in den Zelllinien MKN28 und AGS.

4.2.2.2.5 Einfluss von DAC auf die Expression von DNMT1

Da in der Literatur die Abnahme der DNMT1-Expression als der primäre und die Reduktion der Methylierung als der sekundäre Effekt einer Behandlung mit DAC beschrieben ist (Issa *et al.*, 2009) und in Abschnitt 4.2.2.2.4 bereits der Einfluss einer Behandlung mit dem DNMT-Inhibitor DAC auf den Methylierungsstatus der Zelllinien MKN28 und AGS gezeigt werden konnte, sollte nun auch der Einfluss auf die Proteinexpression von DNMT1 untersucht werden. Dafür wurden MKN28 und AGS Zellen für 48 h mit verschiedenen DAC Konzentrationen behandelt und die aus diesen

Zellen gewonnenen Proteinlysate mittels Western Blot Analyse untersucht. Wie sich in Abb. 4.22 A zeigt, konnte für beide Zelllinien eine Verminderung der DNMT1-Expression erzielt werden. Eine Quantifizierung der DNMT1-Expression nach DAC-Behandlung in drei unabhängigen Versuchen ergab für beide Zelllinien eine Reduktion von ca. 50 % nach der Behandlung mit 1 μ M DAC. Die Behandlung mit einer höheren Dosis (2 μ M DAC) schien diesen Effekt nur geringfügig zu verstärken (Abb. 4.22 B). Bezüglich der Reduktion der Methylierungsrate nach DAC-Behandlung in Abschnitt 4.2.2.2.4 zeigte sich für die Zelllinie AGS eine stärkere Wirkung.

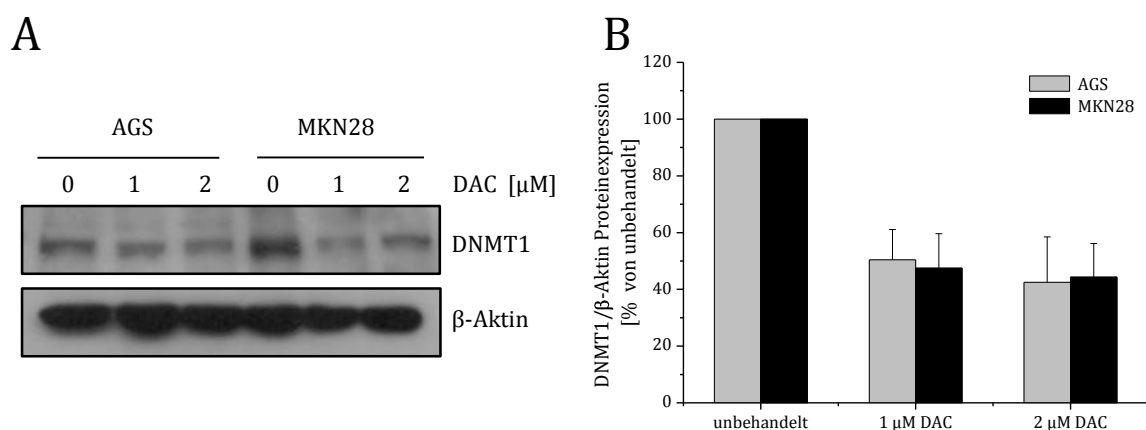


Abb. 4.22: DNMT1 Proteinexpression nach der Behandlung mit dem DNMT-Inhibitor DAC. (A) Gezeigt ist ein Western Blot zur Proteinexpression von DNMT1 in Zellysaten von AGS und MKN28. Die Zellen wurden vor der Lyse für 48 h mit den angegebenen DAC-Konzentrationen behandelt. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. **(B)** Densitometrische Quantifizierung der DNMT1 Proteinexpression normalisiert auf die Expression von β -Aktin. Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Western Blot Analysen sind angegeben.

4.2.3 Herabregulation der DNMT1-Expression in der Magenkarzinomzelllinie AGS

Die Assoziation einer hohen Expression von DNMT1 mit einer höheren Promotormethylierung, schlechterem Überleben und einem schlechteren Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie ließen sich im Zellkulturmodell unter Verwendung von vier Magenkarzinomzelllinien nicht direkt bestätigen.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Zelllinie AGS, die am schlechtesten auf eine Behandlung mit Cisplatin ansprach (höchste IC_{50} für Cisplatin) und die stärkste Methylierungsrate der Zelllinien besaß, eine deutlich niedrigere Expression von DNMT1

aufwies als beispielsweise die Zelllinie MKN28, die deutlich sensitiver auf Cisplatin reagierte und einen niedrigeren Methylierungsstatus zeigte. Da sich die *in vitro* Daten allerdings auf eine geringe Anzahl von Zelllinien beziehen und diese einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund aufweisen (siehe Abschnitt 4.2.1.2), war es Ziel der folgenden Untersuchungen in einem isogenen Modellsystem einen möglichen Zusammenhang zwischen DNMT1-Expression und Chemosensitivität bezüglich Cisplatin und 5-FU zu prüfen.

Es wurde die relativ Cisplatin-unempfindliche und stark methylierte Zelllinien AGS ausgesucht, um in dieser selektiv unter Verwendung von drei verschiedenen lentiviral transduzierten shRNA-Konstrukten die Expression von DNMT1 herabzuregulieren (siehe Abschnitt 2.2).

Zunächst wurde die Expression von DNMT1 auf mRNA und Proteinebene überprüft. Es zeigte sich, dass die Transduktion des Konstrukts sh1 bezogen auf die Kontrolle C zu einer Reduktion der DNMT1 mRNA auf 51 % führt. Für die Konstrukte sh2 und sh3 war eine Reduktion auf 40 % bzw. 23 % der Kontrolle festzustellen. In Abb. 4.23 A ist die Reduktion der DNMT1 mRNA durch die verschiedenen Konstrukte zu verschiedenen Zeitpunkten dargestellt. Zwischen Tag 0 und Tag 7 wurde dem Kulturmedium kein Puromycin zugefügt, um zu überprüfen, ob die Herabregulation auch ohne den Selektionsdruck des Puromycins über einen gewissen Zeitraum stabil bleibt. Auf Proteinebene, ermittelt durch Western Blot-Analysen, zeigt sich ebenfalls eine Reduktion der DNMT1-Expression. Die Quantifizierung der Expression in drei unabhängigen Versuchen zeigte leichte Abweichungen im Vergleich zur mRNA-Ebene.

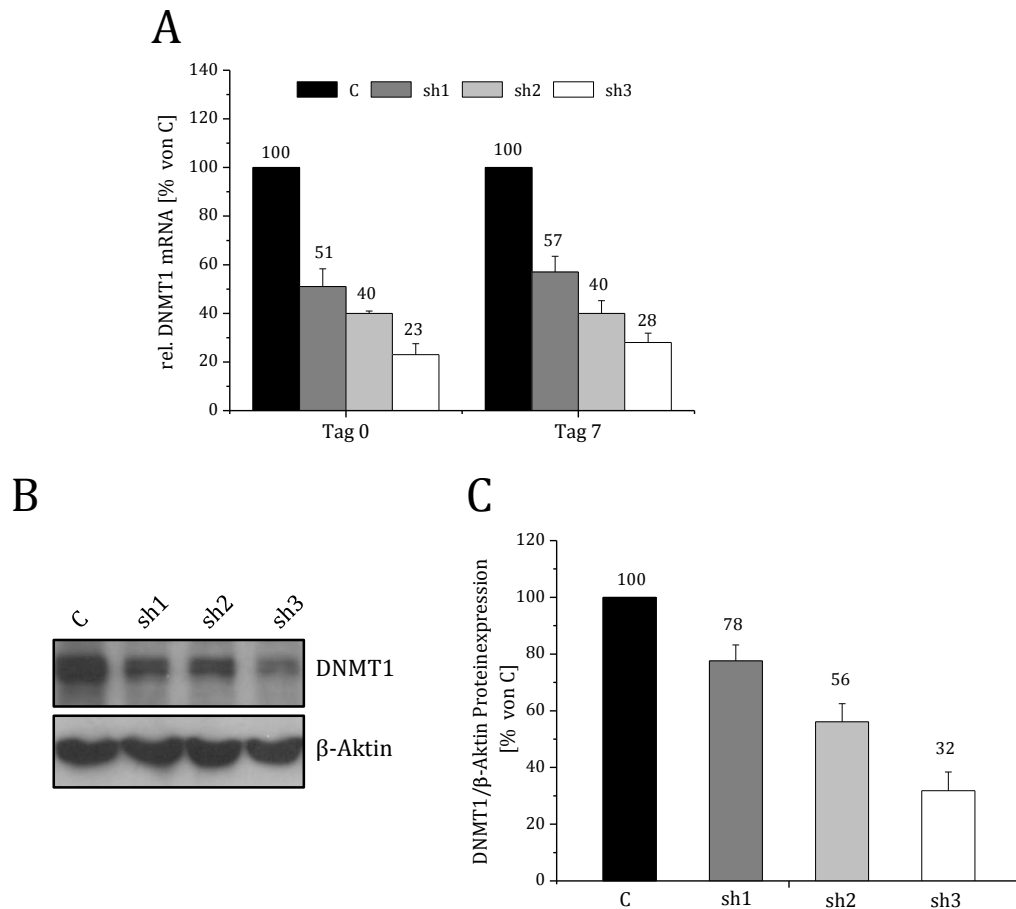


Abb. 4.23: Expression von DNMT1 nach Herabregulation in AGS Zellen. (A) gezeigt ist die relative DNMT1 mRNA Expression in der mit verschiedenen DNMT1 herabregulierenden Konstrukten transduzierten Zelllinie AGS. Die DNMT1-Expression wurde auf die 18S rRNA Expression normalisiert und auf die Expression der Kontrolle C bezogen. Mittelwerte und Standardabweichungen basieren auf drei unabhängigen Versuchen. (B) Repräsentativer Western Blot zur Proteinexpression von DNMT1 in Zelllysaten der angegebenen Zellen. Als Ladekontrolle wurde β -Aktin verwendet. (C) Densitometrische Quantifizierung der DNMT1 Proteinexpression normalisiert auf die Expression von β -Aktin. Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Western Blot Analysen sind gezeigt.

4.2.3.1 Einfluss der DNMT1-Herabregulation auf die Proliferation von AGS Zellen

Da in verschiedenen Publikationen eine Reduktion der Proliferationsrate bei Zellen mit reduzierter DNMT1-Expression beschrieben worden ist, wurde eine Proliferationskurve der Zellen erstellt. Wie der Abb. 4.24 zu entnehmen ist, war in diesem Versuchsaufbau eines XTT-Assays über den Verlauf von 96 h unabhängig von der Stärke der DNMT1-Herabregulation keine Verringerung der Proliferation zu erkennen. Der Verlauf der Proliferationskurven und die daraus errechneten Verdopplungszeiten der unterschiedlich transduzierten Zellen zeigten keine Abweichungen.

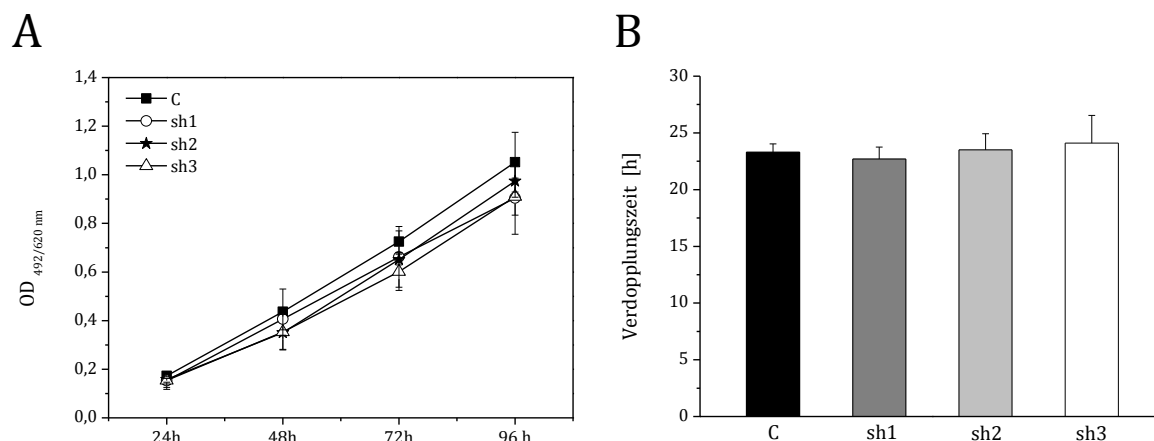


Abb. 4.24: Proliferation der DNMT1-Knockdownzellen C, sh1, sh2 und sh3. (A) Die X-Achse zeigt die Inkubationszeiten der Zellen nach dem Ausplattieren bis zum Zeitpunkt des XTT-Tests. Auf der Y-Achse sind die OD-Werte bei einer Wellenlänge von 492 nm nach Abzug des Plattenhintergrunds angegeben. Die Berechnung des Mittelwerts und der Standardabweichung beruht auf drei unabhängigen Versuchen mit 4-fach-Bestimmung. **(B)** Angegeben sind die aus den Proliferationskurven der Abbildung A errechneten Verdopplungszeiten (Y-Achse) der verschiedenen Zellen.

4.2.3.2 Einfluss der DNMT1-Herabregulation auf die Chemosensitivität von AGS Zellen

4.2.3.2.1 Chemosensitivität gegenüber einzelnen Chemotherapeutika

Äquivalent zum Versuchsaufbau in Abschnitt 4.2.1.3 wurde die Chemosensitivität der AGS Zellen mit verminderter DNMT1-Expression gegenüber Cisplatin unter Verwendung des XTT-Tests untersucht.

Wie in Abb. 4.25 A am Verlauf der Proliferationskurve und in Abb. 4.25 B an der errechneten IC_{50} zu sehen ist, zeigten die C-, sh1, sh2- und sh3-Zellen in diesem Test keine Unterschiede in der Chemosensitivität. Der Versuch wurde auch unter Verlängerung der Inkubationszeit mit Cisplatin von 48 auf 96 h wiederholt (Daten nicht gezeigt), wodurch allerdings ebenfalls keine Unterschiede erkennbar waren. Anders verhielt es sich bei der Verwendung eines Koloniebildungsassays. In Abb. 4.25 C ist zu sehen, dass die sh3-Zellen mit der stärksten DNMT1-Herabregulation bei der Behandlung mit 2 μ m Cisplatin eine signifikant geringere Anzahl von Kolonien bildeten als die Kontrollzellen C.

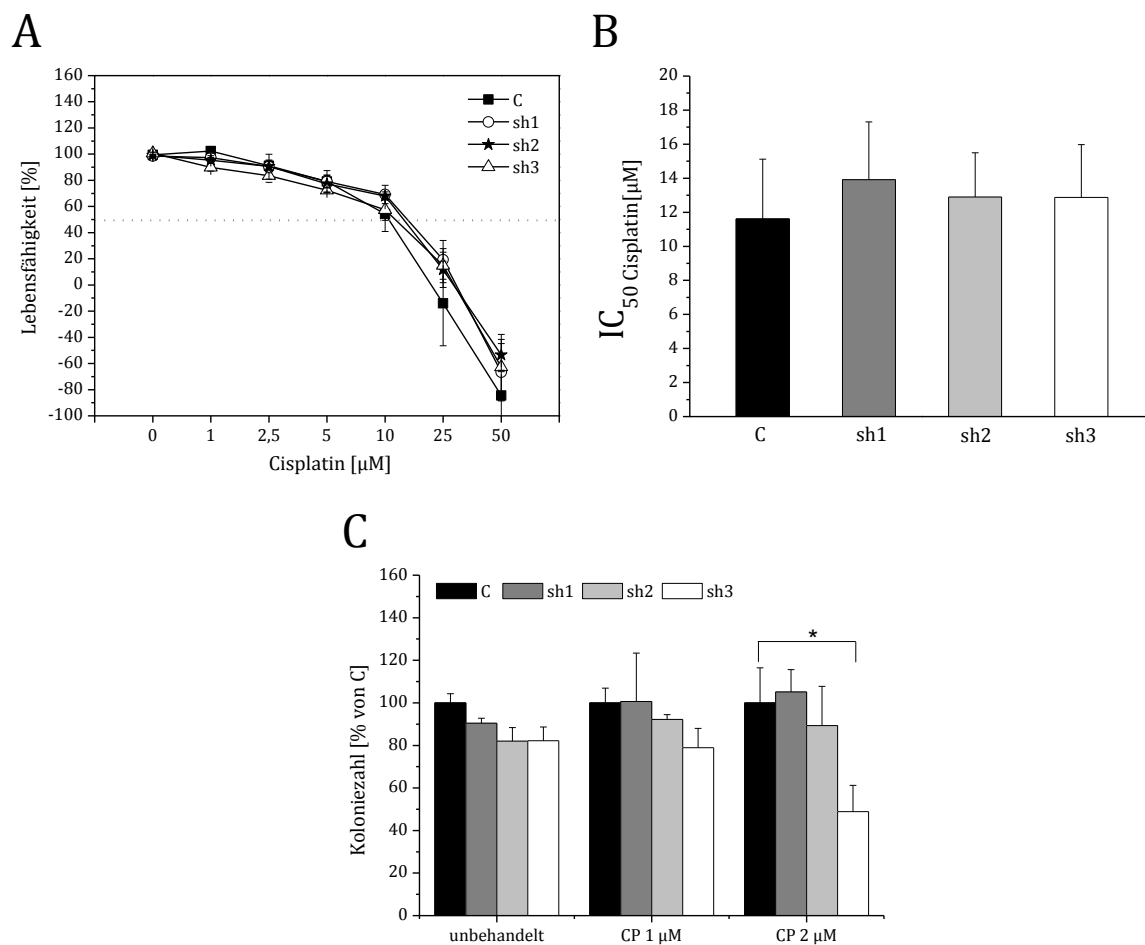


Abb. 4.25: Einfluss der DNMT1-Herabregulation auf die Chemosensitivität gegenüber Cisplatin. (A) Dargestellt ist die auf die unbehandelte Kontrolle bezogene prozentuale Lebensfähigkeit (Y-Achse) der DNMT1-Knockdownzellen nach einer 48-stündigen Behandlung mit unterschiedlichen Cisplatin-Konzentrationen. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit 4-fach-Bestimmung. Die grau gestrichelte Linie markiert die Reduktion der Viabilität um 50 %. (B) Dargestellt ist die IC_{50} für Cisplatin, die sich aus den Dosis-Wirkungskurven errechnen lässt. (C) Gezeigt ist der Prozentsatz der Anzahl an Kolonien bezogen auf die Kontrolle C, die sich nach einer 48-stündigen Behandlung mit unterschiedlichen Cisplatin-Konzentrationen bilden. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit 3-fach-Bestimmung. Die Berechnung der Signifikanz beruht auf dem Student-T-Test: * $P < 0,05$.

Neben der Untersuchung des Einflusses der DNMT1-Herabregulation auf die Cisplatin-Sensitivität wurde auch die Sensitivität gegenüber 5-FU unter Verwendung der gleichen Versuchsansätze getestet. Der folgenden Abbildung, die sowohl einen XTT Test als auch einen Koloniebildungsassay beinhaltet, ist zu entnehmen, dass die Herabregulation der DNA-Methyltransferase 1, zumindest in dem Ausmaß, wie er in der Zelllinie AGS erreicht werden konnte, unter den verwendeten Versuchsbedingungen keinen Einfluss auf die 5-FU-Sensitivität zu haben scheint.

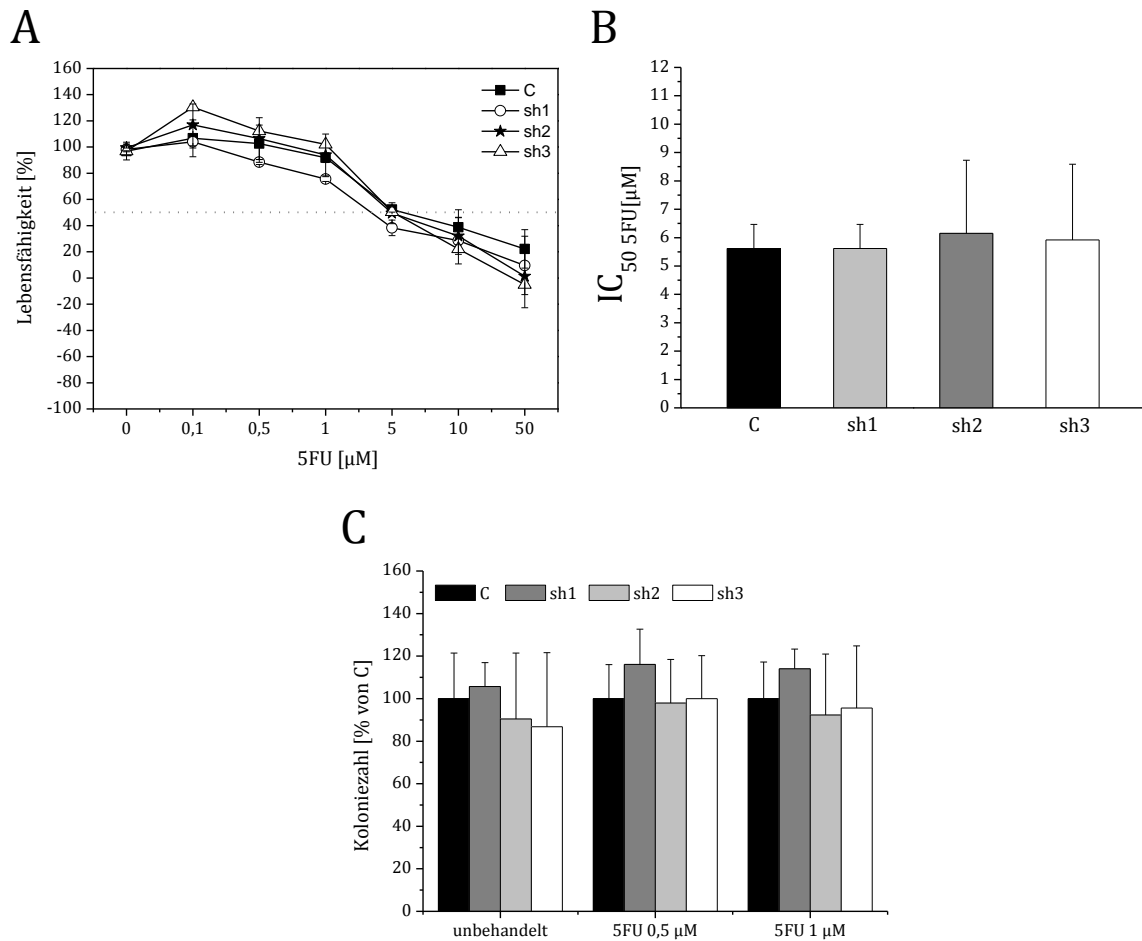


Abb. 4.26: Einfluss der DNMT1-Herabregulation auf die Chemosensitivität gegenüber 5-FU. (A) Dargestellt ist die auf die unbehandelte Kontrolle bezogene prozentuale Lebensfähigkeit (Y-Achse) der DNMT1-Knockdownzellen nach einer 48-stündigen Behandlung mit unterschiedlichen 5-FU-Konzentrationen. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit 4-fach-Bestimmung. Die grau gestrichelte Linie markiert die Reduktion der Viabilität um 50 %. (B) Dargestellt ist die IC₅₀ für 5-FU, die sich aus den Dosis-Wirkungskurven errechnen lässt. (C) Gezeigt ist der Prozentsatz der Anzahl an Kolonien bezogen auf die Kontrolle C, die sich nach einer 48-stündigen Behandlung mit unterschiedlichen 5-FU-Konzentrationen bilden. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit 3-fach-Bestimmung.

4.2.3.2.2 Kombination von Cisplatin mit dem DNMT-Inhibitor DAC

Da möglicherweise die verbleibende Expression von DNMT1 in den lentiviral transduzierten AGS Zellen dazu führt, dass im XTT-Assay keine Unterschiede zwischen den Zellen mit verschieden starker DNMT1-Herabregulation zu erkennen war, war es das Ziel der folgenden Versuche, durch die Zugabe des DNMT1-Inhibitors DAC die verbliebene DNMT1-Expression zu vermindern um möglicherweise einen Effekt beobachten zu können. Dafür wurden die Zellen C, sh1, sh2 und sh3 in einem XTT Assay

mit Cisplatin und DAC als Einzelagenzien und in Kombination behandelt. Wie in Abb. 4.27 A zu sehen, zeigte sich bei einer Behandlung mit 2 μM Cisplatin und 0,1 μM DAC kein Unterschied zwischen den verschiedenen Zellen. Die Kombination mit 0,5 μM DAC (Abb. 4.27 B) bewirkte eine geringe Reduktion der Viabilität in den sh3-Zellen im Vergleich zur Kontrolle C, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Bei Verwendung von 1 μM DAC (Abb. 4.27 C) in der Kombination kam es zu einer signifikanten Reduktion der Lebensfähigkeit von sh3-Zellen im Vergleich zu Kontrolle C.

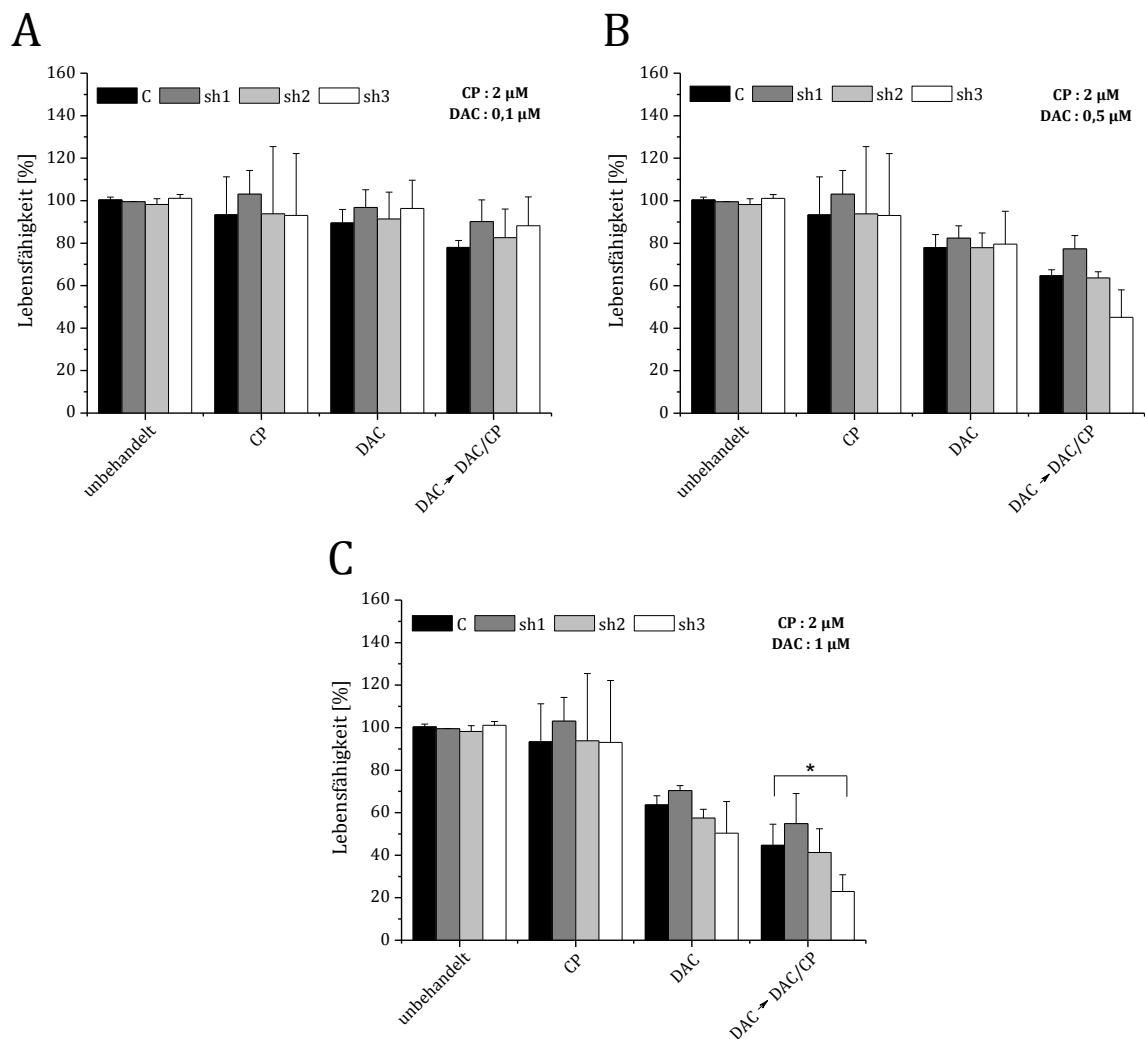


Abb. 4.27: Zellviabilität nach Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und DAC in Zellen mit herabregulierter DNMT1-Expression. Dargestellt ist die auf die unbehandelte Kontrolle bezogene prozentuale Lebensfähigkeit (Y-Achse) der DNMT1-Knockdown-Zellen nach einer Behandlung mit Cisplatin (CP), DAC und einer Kombination aus beiden. (DAC \rightarrow DAC/CP: **(A)** 0,1 μM DAC für 48 h gefolgt von 2 μM CP und 0,1 μM DAC für 48 h; **(B)** 0,5 μM DAC für 48 h gefolgt von 2 μM CP und 0,5 μM DAC für 48 h; **(C)** 1 μM DAC für 48 h gefolgt von 2 μM CP und 1 μM DAC für 48 h;). Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit 4-fach-Bestimmung. Der P-Wert wurde mit dem Student-T-Test berechnet: * P < 0,05.

4.2.3.2.3 Methylierungsrate nach DAC Behandlung in Zellen mit herab regulierter DNMT1-Expression

Um zu untersuchen, ob die erhöhte Chemosensitivität gegenüber Cisplatin in den Zellen mit der stärksten DNMT1-Herabregulation möglicherweise auf eine verringerte Methylierung verschiedener Tumorsuppressorgene zurückzuführen ist, wurde die Methylierungsrate der Zellen bestimmt. Für den Versuch wurde sowohl DNA von unbehandelten Zellen als auch DNA von DAC behandelten Zellen eingesetzt. Es zeigte sich für die unbehandelten Zellen eine Reduktion der Methylierungsrate von 50 % (C) auf ca. 40 % in den Zellen mit der stärksten DNMT1-Herabregulation (sh3). Nach der Behandlung mit verschiedenen DAC-Konzentrationen ergab sich eine deutliche Reduktion der Methylierungsrate für alle Zellen unabhängig von ihrer DNMT1-Expression. Die Unterschiede zwischen den Zellen mit verschiedener DNMT1-Expression sind nach der Behandlung mit 0,5 μ M und 1 μ M gering und nach der Behandlung mit 2 μ M lassen sich keine Unterschiede mehr feststellen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine verringerte Methylierung der untersuchten Tumorsuppressorgene nicht den primären Grund für die erhöhte Chemosensitivität der sh3-Zellen darstellt.

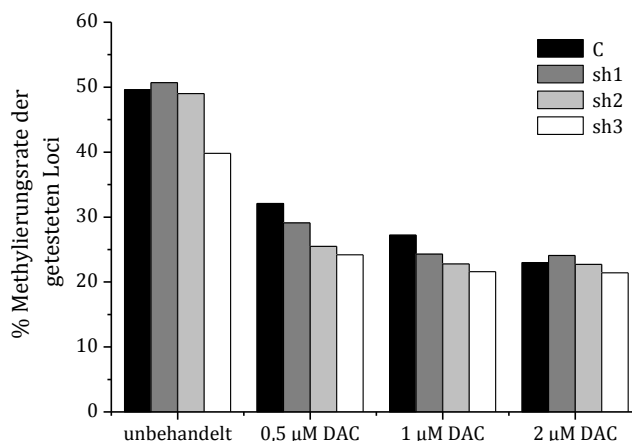


Abb. 4.28: Einfluss einer DAC-Behandlung auf die Methylierungsrate in Zellen mit herab regulierter DNMT1-Expression. Die X-Achse zeigt den Prozentsatz der Methylierungsrate bezogen auf alle getesteten Loci ($n=26$) für die Behandlung mit unterschiedlichen Konzentrationen an DAC in AGS Zellen mit unterschiedlich starker DNMT1-Expression.

5 DISKUSSION

Unter Berücksichtigung der relativ niedrigen Ansprechrate auf die üblicherweise bei Patienten mit lokal fortgeschrittenem Magenkarzinom eingesetzte neoadjuvante Chemotherapie, ist es unbedingt notwendig Biomarker zu identifizieren, die ein Ansprechen auf die Therapie und damit den Nutzen für die betreffenden Patienten vorhersagen können. Außerdem ist es zwingend erforderlich alternative Therapieoptionen zu entwickeln, um die Überlebensrate der Patienten zu verbessern, die nicht von der konventionellen neoadjuvanten, auf einem Platinderivat und 5-FU basierenden Chemotherapie profitieren.

5.1 DNA-Methyltransferasen

5.1.1 Bedeutung von DNMT1 und DNMT3b als prädiktive und prognostische Biomarker

In der hier vorgelegten Arbeit wurde zum ersten Mal eine signifikante Assoziation der Expression der DNA-Methyltransferase 1 mit dem Ansprechen auf eine Chemotherapie bei Magenkarzinomen und generell bei soliden Tumoren gezeigt. Eine niedrige DNMT1-Expression in prätherapeutischen Biopsien korrelierte signifikant mit einem besseren Ansprechen und einem längeren Überleben der Patienten nach einer Platin/5-FU basierten neoadjuvanten Chemotherapie. Zusätzlich konnte in einer multivariaten Analyse die Expression von DNMT1 als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert werden. In die gleiche Richtung weisen Ergebnisse anderer Studien, die eine prognostische Relevanz der DNMT1-Expression in verschiedenen Tumorentitäten wie beispielsweise dem Pankreas-, Lungen- und Leberzellkarzinom zeigen (Lin *et al.*, 2007; Peng *et al.*, 2005; Saito *et al.*, 2003). Diese sind jedoch nicht direkt vergleichbar, da die in die betreffenden Studien eingeschlossenen Patienten keine chemotherapeutische Behandlung erhalten haben.

Neben der Assoziation mit dem Ansprechen und der Prognose wurde auch eine signifikante Korrelation der DNMT1-Expression mit dem Differenzierungsgrad der Tumoren festgestellt. Dies bekräftigt Resultate, die eine Assoziation zwischen geringer Tumordifferenzierung und hoher DNMT1-Expression in Magen-, Leberzell-, Pankreaskarzinomen und dem Retinoblastom nachweisen und deutet auf einen Zusammenhang der DNMT1-Expression mit der Aggressivität der Tumoren hin (Etoh *et al.*, 2004; Qu *et al.*, 2010; Saito *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2009a).

In der hier vorgelegten Arbeit wurde, ebenso wie in einer anderen Studie, keine Assoziation zwischen der Expressionsstärke von DNMT1 und dem histologischen Phänotyp festgestellt (Etoh *et al.*, 2004). Diese Beobachtung legt nahe, dass die Überexpression von DNMT1 generell mit der Karzinogenese im Magen assoziiert ist und sich unabhängig vom histologischen Subtyp verhält.

Eine hohe Proteinexpression von DNMT1 wurde in 83 % (105/127) der untersuchten prätherapeutischen Tumoren detektiert. In einer Studie, in der eine vergleichbare Anzahl an primär resezierten Magenkarzinomen untersucht wurde, liegt der Prozentsatz von hochexprimierenden Tumoren mit 72 % etwas niedriger (Etoh *et al.*, 2004). In verschiedenen Publikation wurde ein Anstieg der DNMT1-Expression im Verlauf der Tumorprogression gezeigt (Peng *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2006; Saito *et al.*, 2001). Da aufgrund der Einschlusskriterien für die Behandlung mit einer neoadjuvante Chemotherapie in der hier vorgelegten Arbeit nur Patienten mit lokal fortgeschrittenen Magenkarzinomen (T3, T4) untersucht wurden, liegt der höhere Prozentsatz an DNMT1 hoch exprimierenden Tumoren möglicherweise in der unterschiedlichen Zusammensetzung der untersuchten Kollektive begründet.

Für einen Teil der untersuchten Tumoren lagen aus einem vorangegangenen Projekt Daten zur Promotormethylierung verschiedener Genen vor (Napieralski *et al.*, 2007). In diesem Projekt ergaben sich Hinweise auf eine Assoziation von verstärkter Promotormethylierung mit einem schlechterem Überleben und Therapieansprechen der Patienten. Aufgrund der vorliegenden Daten konnte für eine begrenzte Anzahl von Tumoren eine Assoziation zwischen der Proteinexpression von DNMT1 und dem Methylierungsstatus untersucht werden. Dabei wurde festgestellt, dass Tumoren mit einer hohen Expression von DNMT1 signifikant häufiger eine Promotormethylierung mehrerer Gene aufwiesen als Tumoren mit niedriger Expression. In der Literatur finden

sich bezüglich einer Assoziation der DNMT1-Expression mit dem Methylierungsstatus inkonsistente Daten. Untersuchungen, die auf einer immunhistochemischen Analyse der Proteinexpression von DNMT1 beruhen, zeigen meist eine signifikante Assoziation mit der gleichzeitigen Methylierung verschiedener CpG Inseln (Etoh *et al.*, 2004; Nakagawa *et al.*, 2005; Peng *et al.*, 2006), wohingegen in anderen Studien, größtenteils basierend auf der Analyse der mRNA, keine Korrelation gezeigt wurde (Eads *et al.*, 1999; Kim *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006). Einen möglichen Grund für diese Kontroverse könnten Unterschiede in den verwendeten Grenzwerten darstellen, auf denen die Einteilung der Tumoren in eine hoch- bzw. niedrig-exprimierende Gruppe beruht. Darüber hinaus ist bekannt, dass die Expressionsstärke verschiedener Gene auf mRNA-Ebene nicht notwendigerweise mit der Expression auf Proteinebene korreliert (de Sousa Abreu *et al.*, 2009).

Um die Resultate der hier vorgelegten retrospektiven, an prätherapeutischen Biopsien durchgeführten Analyse zu stützen und einen möglichen funktionellen Zusammenhang zwischen Chemosensitivität und DNMT1-Expression zu überprüfen, wurden *in vitro* Untersuchungen durchgeführt, bei denen die DNMT1-Expression mittels drei verschiedener lentiviral transduzierter shRNA-Konstrukte herab reguliert wurde. Da DNMT1 durch die Regulation der DNA-Methylierung in der Lage ist Einfluss auf die Chromatinstruktur zu nehmen, die wiederum die Zugänglichkeit der DNA für DNA-schädigende Substanzen wie Cisplatin beeinflussen könnte, wurde für diese Untersuchungen die Cisplatin-resistente Zelllinie AGS verwendet (Davies *et al.*, 2000; Kristensen *et al.*, 2009).

Eine Analyse der Koloniebildungskapazität zeigte, dass die Herabregulation der DNMT1-Expression auf ca. 25 % (mRNA) bzw. 32 % (Protein) der ursprünglichen Expression in einer signifikant erhöhten Chemosensitivität gegenüber Cisplatin resultiert. Die Beobachtung, dass eine schwächere Herabregulation diesen Effekt nicht herbeiführen konnte, weist darauf hin, dass ein gewisser Schwellenwert unterschritten werden muss um die Chemosensitivität gegenüber Cisplatin zu erhöhen. Bei der Untersuchung der Zellviabilität nach einer Behandlung mit Cisplatin konnte kein Einfluss auf die Chemosensitivität gezeigt werden. Unter Verwendung des Koloniebildungsassays lässt sich untersuchen, welcher Anteil einer Zellpopulation nach der Behandlung mit einem Chemotherapeutikum noch in der Lage ist sich zu teilen und eine klonale Kolonie zu

bilden. Die Bestimmung der Zellviabilität hingegen beruht auf der Messung der metabolischen Aktivität der Zellen, wobei keine Aussage darüber getroffen werden kann, ob eine verringerte Viabilität durch Apoptoseinduktion oder möglicherweise durch einen Zellzyklusarrest bedingt ist. Die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen der unterschiedlichen Ansätze liegt daher möglicherweise in der Messung unterschiedlicher Parameter begründet. Für die Messung der Effekte von zytotoxischen Substanzen wird der Koloniebildungsassays als Goldstandard betrachtet (Katz *et al.*, 2008). Jedoch ist dieser Assay sehr zeitaufwendig und im verwendeten 6-Well-Format nicht für große Ansätze geeignet, sodass als Screening-Methode die Messung der metabolischen Aktivität eingesetzt wurde.

Durch den Zusatz einer geringen Menge des DNA-Methyltransferase-Inhibitors DAC zur Verstärkung der nicht vollständigen Herabregulation der DNMT1-Expression allerdings zeigte sich eine erhöhte Sensitivität auch im Viabilitätsassay.

Im Gegensatz zur Wirkung auf die Sensitivität gegenüber Cisplatin konnte durch die Herabregulation der DNMT1 bezüglich 5-FU kein Effekt festgestellt werden. Dies könnte auf die unterschiedlichen Wirkmechanismen von Cisplatin und 5-FU zurückzuführen sein. Die Ausbildung von Cisplatin-DNA-Addukten ist möglicherweise durch die Zugänglichkeit der DNA aufgrund der Beschaffenheit der Chromatinstruktur beeinflussbar, wohingegen der Haupteffekt von 5-FU auf der Inhibierung der Thymidylat-Synthase beruht und damit eher unabhängig von der Chromatinstruktur ist (Kristensen *et al.*, 2009; Longley *et al.*, 2003).

Die *in vitro* Resultate stimmen dabei im Wesentlichen mit einer Studie überein, in der gezeigt wurde, dass eine Kolonkarzinomzelllinie, bei der beide Allele von DNMT1 durch homologe Rekombination deletiert worden waren, eine erhöhte Chemosensitivität gegenüber Cisplatin aufwies (Mishra *et al.*, 2008). Zusätzlich konnten Mishra *et al.* nachweisen, dass die Überexpression von DNMT1 in einer Rattenfibroblastenzelllinie zu einem gegenüber Cisplatin resistenteren Phänotyp führte. Um allerdings festzustellen, ob die erhöhte Chemosensitivität in der hier vorgelegten Arbeit auf eine veränderte Transkription verschiedener Gene zurückzuführen ist, die für die Wirkung von Cisplatin notwendig sind, oder auf eine offenere Chromatinstruktur, die eine verstärkte Zugänglichkeit der DNA für Cisplatin bewirken könnte, sind weitere Studien nötig. In der hier vorgelegten Arbeit wurde unter Verwendung des MS-MLPA-Tests in AGS-Zellen, die

eine durch shRNA vermittelte reduziertere DNMT1 Expression aufwiesen, kein deutlicher Unterschied in der Methylierungsrate im Vergleich zu den Kontrollzellen festgestellt. Dies weist darauf hin, dass eine verstärkte Demethylierung, zumindest der untersuchten Gene im verwendeten Testsystem, nicht den primären Mechanismus darstellt, welcher der erhöhten Chemosensitivität im Koloniebildungstest zugrundeliegt. Der Einfluss einer Herabregulation oder einer homozygoten Deletion von DNMT1 auf den Methylierungsstatus von CpG Inseln wird im Allgemeinen kontrovers diskutiert. So finden sich sowohl Publikationen, die zeigen, dass die DNMT1-Expression für die Aufrechterhaltung aberranter Methylierung von CpG-Inseln notwendig ist, als auch andere, die belegen, dass ungeachtet einer DNMT1-Herabregulation oder einer homozygoten Deletion die Hypermethylierung von CpG-Inseln aufrechterhalten wird (Chen *et al.*, 2007; Rhee *et al.*, 2000; Robert *et al.*, 2003; Ting *et al.*, 2004). In einer Arbeit von Tan *et al.* wurde gezeigt, dass der Zellzyklusregulator p21^{WAF1}, welcher durch das Auftreten von DNA-Schäden induziert werden kann, in der Lage ist, die Expression der DNA-Methyltransferase 1 auf transkriptioneller Ebene zu vermindern (Tan *et al.*, 2009). Auch scheint DNMT1 in die zelluläre Antwort auf DNA-Schädigung involviert zu sein (Palii *et al.*, 2008), was zusätzlich zum synergistischen Effekt zwischen DNMT1-Herabregulation und einer Cisplatin-Behandlung beitragen könnte.

Um einen Hinweis auf eine unterschiedliche Genregulation in den untersuchten Zellen mit herab regulierter DNMT1-Expression zu erhalten, wurde ein im Rahmen eines anderen Projekts etablierter Microarray verwendet, mit dem die mRNA-Expression verschiedener ausgewählter stammzellassoziierter Gene untersucht werden kann. Die Analyse lieferte präliminäre Hinweise darauf, dass möglicherweise Gene des Wnt- und des Hedgehog-Signalwegs unterschiedlich reguliert sein könnten.

Zusammenfassend weisen die Daten auf einen funktionellen Zusammenhang zwischen DNMT1-Expression und einer Chemosensitivität gegenüber Cisplatin hin und bestärken die Ergebnisse aus prätherapeutischem Tumorgewebe, in dem eine Assoziation zwischen niedriger DNMT1-Expression und dem Ansprechen der Patienten auf eine neoadjuvante Chemotherapie gezeigt werden konnte. Um diese Ergebnisse weiter zu stützen und eine generelle Gültigkeit der vorgefundenen Assoziation zu überprüfen, ist es notwendig und sinnvoll den gezeigten Zusammenhang in zusätzlichen Patientenkollektiven zu validieren.

Ein Vergleich der DNMT1-Expression mit der Cisplatinempfindlichkeit zeigte in den vier untersuchten Magenkarzinomzelllinien keine Assoziation. Da neben der Expression von DNMT1 auch eine unterschiedliche Enzymaktivität von Bedeutung sein könnte, wurde diese unter Verwendung eines ELISA-basierten, kommerziell erhältlichen DNMT-Aktivitätsassays untersucht, der jedoch auch nach verschiedenen Optimierungsschritten keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferte. Daher kann zur DNMT-Aktivität keine Aussage gemacht werden.

Auch der Methylierungsstatus der Zelllinien zeigte keine Korrelation mit der DNMT1-Expression. Für die Zelllinien AGS und KATOIII, die eine geringere DNMT1-Expression, jedoch einen eher hohen Methylierungsstatus aufweisen, ist im Vergleich zu anderen Magenkarzinomzelllinien eine reduzierte Genauigkeit bei der Replikation von Methylierungsmustern beschrieben worden, wobei das Kopieren der Methylierung eines einzelnen CpG Dinukleotids zur Methylierung ganzer CpG-Inseln führen kann (Ushijima *et al.*, 2005; Watanabe *et al.*, 2006). Diese Ungenauigkeit könnte möglicherweise Einfluss auf den Methylierungsstatus nehmen und nicht direkt mit der Expression von DNMT1 in Verbindung stehen. Obwohl in den Zelllinien kein Zusammenhang der DNMT1-Expression mit dem Methylierungsstatus und der Sensitivität gegenüber Cisplatin gezeigt werden konnte, lassen diese Beobachtungen allerdings aufgrund der geringen Anzahl der untersuchten Zelllinien, die demnach nicht die große Heterogenität der Magenkarzinome abbilden können, keine generelle Schlussfolgerung zu.

Eine erhöhte Expression der DNA-Methyltransferase 1 wurde bereits in verschiedensten Tumorentitäten beschrieben (Amara *et al.*, 2010; Etoh *et al.*, 2004; Peng *et al.*, 2005; Qu *et al.*, 2010). Da DNMT1 *in vitro* eine Präferenz für hemimethylierte DNA aufweist (Pradhan *et al.*, 1999) und während der S-Phase der DNA-Replikation an PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*), dem Prozessivitätsfaktor der DNA Polymerase δ , bindet (Chuang *et al.*, 1997) wird sie als *maintanance* DNMT betrachtet, die Methylierungsmuster auf neu synthetisierte DNA-Stränge überträgt. Aus diesem Grund besteht eine anhaltende Diskussion darüber, ob eine erhöhte Expression von DNMT1 nicht lediglich einen sekundären Effekt einer verstärkten Proliferationsrate in Tumorgewebe darstellt. Um auf diese Fragestellung einzugehen, wurde in verschiedenen Tumorentitäten, in denen eine Überexpression der DNMT1 gezeigt werden konnte, auch die Expression des Proliferationsmarkers PCNA bestimmt. Dabei

wurde in Nierenzell-, Lungen- und Blasen Tumoren festgestellt, dass die Expression von DNMT1 nicht mit der Expression von PCNA und damit mit der Teilungsrate in den untersuchten Tumoren korrelierte (Arai *et al.*, 2006; Nakagawa *et al.*, 2003; Sawada *et al.*, 2007). Vor allem aber konnte dies auch in einer Studie an 134 Magenkarzinomen gezeigt werden, bei der dieselbe Methode zur Bestimmung der DNMT1-Expression eingesetzt wurde, die auch in der hier vorgelegten Arbeit verwendet wurde. Dies deutet darauf hin, dass der Überexpression von DNMT1 andere Ursachen als eine verstärkte Proliferationsrate zugrundeliegen (Etoh *et al.*, 2004). Zusätzlich weist die Assoziation der DNMT1-Expression mit einer verstärkten Promotormethylierung sowohl in der erwähnten Studie als auch in der hier vorgelegten Arbeit auf eine Beteiligung von DNMT1 an der Entstehung aberranter Methylierungsmuster hin (Etoh *et al.*, 2004).

Die Auffassung, dass DNMT1 ausschließlich für das Kopieren von Methylierungsmustern auf den neusynthetisierten DNA-Strang verantwortlich ist, hat sich durch Erkenntnisse aus verschiedenen Studien verändert. Es wurde gezeigt, dass DNMT1 und DNMT3b bei der Stilllegung von Genen kooperieren können und dass DNMT1 unabhängig von der Anwesenheit von DNMT3a und 3b eine starke Fähigkeit zu *de novo* Methylierung zuvor unmethylierter CpG Inseln besitzt (Jair *et al.*, 2006; Rhee *et al.*, 2000). Weitere Hinweise auf eine bedeutende Rolle von DNMT1 bei der Methylierung von CpG Dinukleotiden in den Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen in Tumoren, ergaben sich durch eine Studie, in der mit Hilfe eines Chromatin-Immunopräzipitations-PCR Assays (*ChIP-PCR Assays*) die physikalische Bindung der DNMT1 an hypermethylierte Promotorregionen von Tumorsuppressorgenen in Tumorgewebe nachgewiesen werden konnte (Lin *et al.*, 2007).

Neben der Expression von DNMT1 wurde in der hier vorgelegten Arbeit auch die DNMT3b-Expression in den prätherapeutischen Biopsien untersucht und mit den Überlebensdaten und dem klinischen sowie histopathologischen Ansprechen der Patienten auf eine neoadjuvante Chemotherapie korreliert. Dabei wurde eine hohe Expression von DNMT3b in 62 % (79/127) der Tumoren detektiert. Die bisher einzige Publikation zur Proteinexpression von DNMT3b in Magenkarzinomen dokumentiert eine hohe Expression in 68 % der untersuchten Tumoren (Ding *et al.*, 2008). Für die DNA-Methyltransferase 3b, die eine nukleäre Lokalisation in der Zelle aufweist (Jurkowska *et al.*, 2010), wird in dieser Veröffentlichung allerdings ausschließlich eine

zytoplasmatische Expression beschrieben. Dies weckt Zweifel an der Spezifität des verwendeten Antikörpers, wodurch ein Vergleich der Ergebnisse nicht aussagekräftig ist. Auf mRNA Ebene konnte eine Überexpression von DNMT3b in 85 % der untersuchten Magenkarzinome detektiert werden (Kanai *et al.*, 2001), wobei wiederum mRNA- und Proteinebene nicht notwendigerweise direkt vergleichbar sind.

Bezüglich des Überlebens und des Ansprechens auf die neoadjuvante Chemotherapie wurde in der hier vorgelegten Arbeit keine Assoziation mit DNMT3b gefunden. Auch ein Vergleich der Methylierungsdaten eines Teils der Tumoren mit der Expression von DNMT3b zeigte keine Korrelation. Dies deutet auf eine vorwiegende Bedeutung von DNMT1 für das Ansprechen und Überleben in dem untersuchten Patientenkollektiv hin. Für andere Tumorentitäten, wie beispielsweise für das B-Zell-Lymphom und das Leberzellkarzinom, wurde die Expression von DNMT3b allerdings bereits mit der Prognose in Verbindung gebracht (Amara *et al.*, 2010; Oh *et al.*, 2007). Auch wurde in Mammakarzinomzelllinien ein Zusammenhang zwischen hoher DNMT3b-Expression und den CIMP-Phänotyp nachgewiesen. Zusätzlich wurde ein Polymorphismus im DNMT3b Promotor beschrieben, der mit einer höheren Promotoraktivität und einem erhöhten Risiko für mehrere Tumorentitäten assoziiert ist, jedoch in Magenkarzinomen keine Rolle zu spielen scheint (Hu *et al.*, 2010; Jones *et al.*, 2006; Montgomery *et al.*, 2004; Shen *et al.*, 2002). Dies legt die Vermutung nahe, dass eine verstärkte Expression verschiedener DNA-Methyltransferasen und die daraus resultierende Konsequenz, in Abhängigkeit der Tumorentität variieren können. Möglicherweise spielt bei der Entstehung und Progression von Tumoren nicht notwendigerweise die generelle DNMT3b-Expression die entscheidende Rolle, sondern die differenzielle Expression verschiedener Splicevarianten des Proteins, die eine unterschiedliche Aktivität aufweisen können, wie in verschiedenen Publikationen vermutet wird (Ostler *et al.*, 2007; Su *et al.*, 2010).

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Assoziation einer Überexpression von DNMT1 mit einem geringeren Ansprechen auf eine neoadjuvante chemotherapeutische Behandlung legt die Möglichkeit nahe, dass DNMT1 für Magenkarzinompatienten, neben der potentiellen Verwendung als prädiktiver und prognostischer Marker, auch eine geeignete molekulare Zielstruktur für eine alternative Behandlungsstrategie darstellen könnte.

5.1.2 Potentielle Integration von DNMT-Inhibitoren in die Behandlung von Magenkarzinompatienten

DNA-Methyltransferase-Inhibitoren wie Azacitidin und Decitabin (DAC) sind bereits von der FDA (*US Food and Drug Administration*) für die Behandlung des myelodysplastischen Syndroms zugelassen und zusätzliche DNMT-Inhibitoren werden gegenwärtig in klinischen Studien getestet (Kristensen *et al.*, 2009). Außerdem legt der in der hier vorgelegten Arbeit gezeigte Zusammenhang zwischen der Herabregulation von DNMT1 und einer erhöhten Chemosensitivität gegenüber Cisplatin, eine potentielle Anwendbarkeit von DNMT-Inhibitoren nahe. Die Untersuchung der Sensitivität von Magenkarzinomzelllinien gegenüber den DNMT-Inhibitoren DAC und Zebularin zeigt eine gewisse Variabilität in Abhängigkeit der Zelllinie und des DNMT-Inhibitors. Generell lag die Konzentration von Zebularin, die benötigt wurde um eine 50 %ige Reduktion der Zellviabilität zu erreichen deutlich höher als die von DAC. Diese Beobachtung stimmt mit *in vitro* Studien überein, in denen eine geringere Toxizität von Zebularin im Vergleich zu DAC nachgewiesen wurde (Cheng *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2007). Die Tatsache, dass beispielsweise die Zelllinie KATOIII unter den untersuchten Zelllinien die höchste IC_{50} für Zebularin aufweist, jedoch zu den sensitivsten bezüglich DAC gehört, legt die Vermutung nahe, dass den beiden Inhibitoren ein anderer Wirkmechanismus zugrunde liegt. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass in die DNA eingebautes Zebularin die Methylierungsreaktion verhindert, die mit den DNA-Methyltransferasen gebildeten kovalenten Komplexe jedoch reversibel sind, was bei einer Komplexbildung der DNMTs mit DAC nicht der Fall ist (Champion *et al.*, 2010). Für Zebularin ist neben der Wirkung als DNA-Methyltransferase-Inhibitor auch eine hemmende Wirkung auf die Cytidin-Deaminase beschrieben, was ebenfalls eine unterschiedliche Sensitivität der Zelllinien gegenüber DAC und Zebularin bedingen könnte (Stresemann *et al.*, 2006; Yoo *et al.*, 2006).

In einer Untersuchung der Auswirkungen einer DAC bzw. Zebularin-Behandlung auf die Methylierung von CpG-Dinukleotiden in verschiedenen Genpromotoren in den Zelllinien AGS und MKN28 konnte eine unterschiedliche Effektivität in der demethylierenden Wirkung der beiden Substanzen festgestellt werden. Die Behandlung der Magenkarzinomzelllinien mit DAC führte zu einer offensichtlichen Reduktion der

Methylierungsrate. Die demethylierende Wirkung von Zebularin jedoch fiel deutlich schwächer aus, oder war, wie im Falle der Zelllinie MKN28, nicht detektierbar. Dies lässt darauf schließen, dass der antiproliferative Effekt der Zebularin-Behandlung in den untersuchten Zelllinien eher auf einen von der Methylierung unabhängigen Mechanismus zurückzuführen ist. Eine demethylierende Wirkung von Zebularin und auch eine daraus resultierende Reexpression verschiedener Gene wurde in mehreren Publikationen nachgewiesen, allerdings scheint diese schwächer als die von DAC zu sein (Billam *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2003; Marquez *et al.*, 2005; Scott *et al.*, 2007; Stresemann *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2002). Auch für DAC konnte in der hier vorgelegten Arbeit in einem Konzentrationsbereich zwischen der jeweiligen IC₂₀ und IC₅₀ der Zelllinien MKN28 und AGS sowie für die Behandlung mit der klinisch relevanten Konzentration von 1 µM keine komplette Demethylierung einzelner Gene festgestellt werden. Es muss allerdings berücksichtigt werden, dass DNA-Methylierung einen graduellen Prozess darstellt und auch die Verringerung der Methylierung schon zu einer Reexpression von Genen führen kann (Issa *et al.*, 2009; Jung *et al.*, 2007). Da es durch die DAC-Behandlung zu einer deutlichen Reduktion, nicht jedoch nicht zu einer vollständigen Inhibierung der DNMT1-Expression kam, ist es möglich, dass die Restaktivität von DNMT1 ausreicht, um einen gewissen Methylierungsstatus aufrechtzuerhalten. Daher ist möglicherweise eine längere DAC-Exposition notwendig, um eine stärkere Demethylierung zu erreichen.

Im Gegensatz zu den klaren Erfolgen, die bei der Behandlung von hämatologischen Krebserkrankungen durch den Einsatz von DAC erzielt wurden, fielen Studien an Patienten mit soliden Tumoren, die mit einer DAC-Monotherapie behandelt wurden, bisher aufgrund der hoher Toxizität der Behandlung in Form von starker Myelosuppression und einer geringen Ansprechrate enttäuschend aus (Aparicio *et al.*, 2002; Samlowski *et al.*, 2005; Schrump *et al.*, 2006). In diesen Studien wurde DAC allerdings in sehr hohen Dosen eingesetzt und inzwischen ist bekannt, dass eine Behandlung mit DAC je nach Dosis variierende Effekte haben kann. So können hohe DAC-Konzentrationen die DNA-Synthese inhibieren und einen Zellzyklus-Arrest induzieren. Andererseits führt die Behandlung mit einer niedrigen DAC-Konzentration zur kovalenten Bindung von DNA-Methyltransferasen an die DNA, wodurch diese degradieren, ohne dass ein Zellzyklusarrest stattfindet. Die Fortsetzung der DNA-

Replikation in Abwesenheit von DNMTs führt anschließend zu einer Hypomethylierung der DNA (Issa *et al.*, 2009; Oki *et al.*, 2007). Da das letzere Szenario für die Wirksamkeit gegenüber Tumoren favorisiert wird, ist es notwendig die Anwendung reduzierter DAC-Dosen in klinischen Studie an soliden Tumoren zu überprüfen (Plimack *et al.*, 2007).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, kombinierte Anwendungsschemata des DNMT-Inhibitors DAC mit Cisplatin zu untersuchen. Grundsätzlich werden Kombinationen von verschiedenen Behandlungen in der klinischen Praxis eingesetzt, um sowohl die Ansprechrate und -Dauer zu verlängern, als auch die Toxizität der Behandlung zu verringern. Daher wurden von beiden Substanzen niedrige, klinisch relevante Konzentrationen eingesetzt, die alleine nur einen moderaten Effekt erzielen (Appleton *et al.*, 2007; Gyorffy *et al.*, 2006; Stresemann *et al.*, 2006). Die hier präsentierten Daten zeigen einen signifikanten synergistischen Effekt einer Kombination von Cisplatin und DAC in Bezug auf die Zellviabilität in der Cisplatin-resistenteren Zelllinie AGS. Jedoch konnte dies nicht für die Cisplatin-sensitivere Zelllinie MKN28 nachgewiesen werden. Dies deutet möglicherweise darauf hin, dass eine DAC-Behandlung vor allem für die Überwindung einer Cisplatinresistenz von Nutzen ist (Plumb *et al.*, 2000; Reu *et al.*, 2006).

DNMT-Inhibitoren haben sich bereits in einigen *in vitro* Untersuchungen als nützliche Agenzien für die Sensibilisierung von Zelllinien, Magenkarzinomzelllinien eingeschlossen, gegenüber Bestrahlung und verschiedenen gängigen chemotherapeutischen Substanzen erwiesen (Balch *et al.*, 2005; Qiu *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2006b). Dabei ist zu erwähnen, dass vor allem eine Vorbehandlung der Zelllinien vor der Inkubation mit dem Chemotherapeutikum vielversprechende Resultate lieferte, wohingegen die umgekehrte Reihenfolge keinen Effekt zeigte (Kristensen *et al.*, 2009; Plumb *et al.*, 2000; Reu *et al.*, 2006). Diese Erkenntnisse sind eine wichtige Grundlage für die Umsetzung einer Kombinationstherapie in einem klinischen Ansatz (Plimack *et al.*, 2007).

Die erste Studie in Phase I zur Untersuchung von kombinatorischen Behandlungsstrategien mit niedrigdosiertem Decitabin zeigte, dass es möglich ist Decitabin, welches einige Tage vor der ersten Chemotherapie-Dosis verabreicht wurde, mit Carboplatin bei der Behandlung solider Tumoren zu kombinieren, ohne dass eine nicht tolerierbare Toxizität gegeben war (Appleton *et al.*, 2007). Auch in einer Studie, bei der Patienten mit Platin-resistenten epithelialen Ovarialkarzinomen behandelt wurden, ließ sich dies

bestätigen. Es zeigte sich zusätzlich, dass diese Behandlung auch eine biologische Aktivität aufwies, die sich in Form von DNA-Hypomethylierung und dem Ansprechen einiger Patienten auf die Behandlung äußerte (Fang *et al.*, 2010). In einer Publikation von Plimack *et al.* wird jedoch eine Kombination von Decitabin mit Cisplatin als geeignetere Alternative diskutiert, da sowohl eine Behandlung mit Decitabin als auch eine Behandlung mit Carboplatin mit einer verstärkten Myelosuppression in Verbindung gebracht wird. Darüber hinaus befinden sich weitere DNMT-Inhibitoren gegen DNMT1 in der Entwicklung, die nicht aus der Gruppe der Nukleosidanaloga stammen, sondern zu der Gruppe der *small molecule inhibitors* oder *oligonukleotid antisense inhibitors* gehören, von denen eine größere Spezifität und geringere Toxizität erwartet wird (Plummer *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2010).

Zusammenfassend liefern die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Resultate Anhaltspunkte, dass die Proteinexpression von DNMT1 mit dem Ansprechen auf die Platin/5-FU basierte neoadjuvante Chemotherapie bei Magenkarzinompatienten assoziiert ist. Die *in vitro* Untersuchung der Chemosensitivität von Zellen mit herab-regulierter DNMT1-Expression sprechen für einen funktionellen Zusammenhang zwischen DNMT1-Expression und Cisplatinsensitivität. Zusätzlich konnte in einer Cisplatin-resistenten Zelllinie ein synergistischer Effekt von Cisplatin und DAC gezeigt werden. Daher könnte DNMT1, neben einer potentiellen Funktion als prädiktiver Biomarker, auch eine vielversprechende therapeutische Zielstruktur darstellen. Dies unterstreicht den möglichen Nutzen einer kombinierten Therapie durch die Integration eines DNMT-Inhibitors für Magenkarzinompatienten mit einer hohen Expression von DNMT1.

5.2 Histondeacetylasen

5.2.1 Bedeutung von HDAC1 und HDAC2 als prädiktive und prognostische Biomarker

Die Untersuchung der Histondeacetylasen ergab eine hohe HDAC1-Expression in 54 % (69/127) der untersuchten Tumoren. Dies ist vergleichbar mit einer Studie, bei der

fortgeschrittene Magenkarzinome (T3, T4) mit einer analogen Methode der immunhistochemischen Detektion und Bewertung untersucht wurden und bei der eine hohe Expression von HDAC1 in 65 % bzw. 36 % der Tumoren in einem Trainingsset und einem Validierungsset detektiert wurde (Weichert *et al.*, 2008a). Eine hohe HDAC2-Expression wurde in derselben Studie in 70 % bzw. 63 % der Tumoren gezeigt, was ein wenig niedriger ist als in der hier vorgelegten Arbeit, in der eine hohe Expression von HDAC2 in 85 % der untersuchten prätherapeutischen Biopsien festgestellt wurde. Eine Überexpression von HDAC1 und HDAC2 wurde bereits in verschiedenen Publikationen für das Magenkarzinom (Choi *et al.*, 2001; Song *et al.*, 2005; Weichert *et al.*, 2008a) aber auch für andere Tumorentitäten wie Kolorektal- Leberzell- Pankreas- Prostata- und Ovarialkarzinome bestätigt (Halkidou *et al.*, 2004; Ishihama *et al.*, 2007; Miyake *et al.*, 2008; Rikimaru *et al.*, 2007; Weichert *et al.*, 2008c; Weichert *et al.*, 2008d; Zhu *et al.*, 2004).

In der hier vorgelegten Arbeit wurde weder für HDAC1 noch für HDAC2 eine Assoziation der Expression mit dem Ansprechen oder dem Überleben der Patienten gezeigt. Die prognostische Relevanz von Klasse I HDACs wurde in verschiedenen humanen Tumorentitäten demonstriert, obwohl die in der Literatur vorhandenen Daten zum Teil inkonsistent sind (Weichert *et al.*, 2008a; Weichert *et al.*, 2008b). Eine Korrelation einer hohen Expression der Histondeacetylasen 1, 2 und 3 mit einer schlechteren Prognose wurde für primär resezierte fortgeschrittene Magenkarzinome beschrieben (Weichert *et al.*, 2008a), jedoch sind die Ergebnisse nicht direkt vergleichbar, da es sich um eine unbehandeltes Patientenkollektiv handelt.

Eine der wichtigsten Erkenntnisse bezüglich der HDAC-Expression war die signifikante Assoziation einer hohen HDAC1-Expression mit einem verkürzten Gesamtüberleben von Patienten, die nach histopathologischen bzw. klinischen Kriterien auf die neoadjuvante Chemotherapie angesprochen haben. Dies weist darauf hin, dass eine Bestimmung der HDAC1-Expression in dieser Patientengruppe möglicherweise für eine Risiko-Stratifikation nach einer chemotherapeutischen Behandlung nützlich sein könnte.

Die HDAC1-Expression war interessanterweise nur im Zusammenhang mit einer beträchtlichen Reduktion der Tumormasse von prognostischer Bedeutung. Der Krebsstammzellhypothese zufolge repräsentieren residuale Tumorzellen, die nach einer chemotherapeutischen Behandlung im Tumorbett verbleiben, eine Zellpopulation die

mit intrinsisch chemoresistenten Tumorstammzellen angereichert ist (Dean *et al.*, 2005). Aufgrund der Tatsache, dass epigenetische Veränderungen als frühe Ereignisse bei der Entstehung von Tumorstammzellen diskutiert werden (Feinberg *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 2007), stellte sich die Frage, ob möglicherweise jene, nach der Chemotherapie zurückbleibende Tumorzellen, verstärkt HDAC1 exprimieren und damit einen Hinweis auf eine Beteiligung von HDAC1 am Phänotyp von Tumorstammzellen liefern könnten. Der Vergleich der HDAC1-Expression zwischen prätherapeutischer Biopsie und korrespondierenden Resektat, die jeweils den Status vor und nach der chemotherapeutischen Behandlung repräsentieren, wurde für einen Teil der Patienten durchgeführt, ergab jedoch in der Analyse keinen Anhaltspunkt für eine verstärkte HDAC1-Expression in den Resektaten der Patienten mit einer starken Tumorregression. Bezogen auf das gesamte Kollektiv zeigte sich eine Assoziation von hoher HDAC2-Expression mit einer reduzierten Tumordifferenzierung, die auch in anderen Studien in unterschiedlichen Tumorentitäten einschließlich dem Magenkarzinom dokumentiert wurde (Weichert *et al.*, 2008a; Weichert *et al.*, 2008b; Zhu *et al.*, 2004).

5.2.2 Potentielle Integration von HDAC-Inhibitoren in die Behandlung von Magenkarzinompatienten

Der Bestimmung der Expression der Histondeacetylasen der Klasse I in Tumoren wird aufgrund der Verfügbarkeit von HDAC-Inhibitoren als vielversprechende neue Agenzien in der Krebstherapie in letzter Zeit ein steigendes Interesse entgegengebracht (Kristensen *et al.*, 2009; Minucci *et al.*, 2006). Trotz zahlreicher Untersuchungen zum Effekt von HDAC-Inhibitoren in Karzinomzelllinien, ist im speziellen in Magenkarzinomzelllinien wenig über den Nutzen von klinisch einsetzbaren HDAC-Inhibitoren als Einzelagenzien, aber vor allem in Kombination mit Cisplatin bekannt (Kim *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008; Owonikoko *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2006a). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Behandlung von vier unterschiedlichen Magenkarzinomzelllinien mit den HDAC-Inhibitoren VPA oder SAHA innerhalb einer relativ geringen Konzentrationsspanne zu einer 50 %igen Reduktion der Zellviabilität führte, wohingegen für Cisplatin eine deutlich breitere Konzentrationsspanne der IC₅₀ zu beobachten war. Beachtenswert ist dabei, dass die Zelllinie AGS, die sich am

resistentesten gegenüber Cisplatin zeigte, am sensitivsten auf VPA und SAHA reagierte. Ähnliche Resultate stammen aus Untersuchungen an Ovarialkarzinomzelllinien, bei denen eine erhöhte Sensitivität gegenüber VPA in Zellen mit erworbener Cisplatinresistenz festgestellt werden konnte (Lin *et al.*, 2008). Ob dies allerdings auf einem generell inversen Verhältnis zwischen der Sensitivität gegenüber Cisplatin und HDAC-Inhibitoren beruht, bleibt in weiteren Analysen zu untersuchen.

Eine Kombination von Cisplatin mit SAHA unter Verwendung von klinisch relevanten Konzentrationen (Gyorffy *et al.*, 2006; Kelly *et al.*, 2003), wurde in zwei Zelllinien getestet, die sich deutlich in Bezug auf ihre Cisplatinempfindlichkeit unterscheiden. Interessanterweise konnte durch eine Vorbehandlung der Zellen mit SAHA, unabhängig von der ursprünglichen Cisplatinempfindlichkeit der Zelllinien, eine beträchtliche Sensitivierung für Cisplatin erreicht werden. Zusätzlich wurde gezeigt, dass dieser Effekt auf einer synergistischen Wirkungsweise der beiden Agenzien beruht und nicht lediglich einen additiven Effekt darstellt. Dabei stimmen die hier gezeigten Ergebnisse im Wesentlichen mit den Resultaten der bisher durchgeführten *in vitro* Studien überein, in denen der Effekt einer Kombination von HDAC-Inhibitoren mit DNA-schädigenden Agenzien untersucht wurde (Kim *et al.*, 2003; Lin *et al.*, 2008). Die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren kann beträchtliche pleiotrope Effekte induzieren, aber es konnte mit Hilfe von spektroskopischen Analyseverfahren nachgewiesen werden, dass die Hyperacetylierung von Histonen durch Histondeacetylaseinhibitoren die Zugänglichkeit von Chromatin für fluoreszenzmarkierte Dextrane erhöht (Gorisch *et al.*, 2005) und die hier gezeigten Daten unterstützen die Theorie einer verbesserten Zugänglichkeit der DNA für DNA-bindende Agenzien durch die Vorinkubation mit einem HDAC-Inhibitor (Siegel *et al.*, 2009).

In Magenkarzinomzelllinien wurde durch eine Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A (TSA) eine Sensitivierung für etliche Chemotherapeutika erzielt (Lee *et al.*, 2006; Owonikoko *et al.*, 2010), allerdings ist TSA aufgrund des Auftretens von schweren toxischen Nebenwirkungen nicht in der Klinik einsetzbar (Kristensen *et al.*, 2009). Der einzige bisher von der FDA für die Behandlung einer Tumorerkrankung zugelassene HDAC-Inhibitor ist SAHA (Vorinostat oder Zolinza), der zur Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms eingesetzt wird (Kristensen *et al.*, 2009; Mann *et al.*, 2007). Verschiedene klinische Studien zur Anwendung von HDAC-Inhibitoren wurden

inzwischen auch für solide Tumoren durchgeführt und zeigen zwar akzeptable Sicherheit in der Anwendung, allerdings in Abhängigkeit der Tumorentität deutliche Unterschiede in der Effektivität (Lane *et al.*, 2009; Siegel *et al.*, 2009). Die bisher durchgeführten Phase-I Studien zu Kombination von SAHA mit verschiedenen etablierten Chemotherapeutika zeigen bei Patienten mit fortgeschrittenen soliden Tumoren generell eine gute Verträglichkeit und es wurde in Patienten mit nicht-kleinzelligem Bronchialkarzinom (NSCLC) unter Verwendung von SAHA, Carboplatin und Paclitaxel bereits eine vielversprechende Antitumoraktivität festgestellt (Ramalingam *et al.*, 2007; Siegel *et al.*, 2009). Daher unterstützen die hier gezeigten Resultate in Magenkarzinomzelllinien den Ansatz der Entwicklung eines Chemotherapieschemas zur Behandlung von Magenkarzinompatienten, das einen klinisch einsetzbaren HDAC-Inhibitor und Cisplatin beinhaltet.

Aufgrund dieser Entwicklung stellt sich die Frage nach prädiktiven Markern für eine Behandlung mit HDAC-Inhibitoren. Dabei wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Expression von Klasse I HDACs einen prädiktiven Faktor für den Erfolg einer HDAC-Inhibitor basierten Therapie darstellen könnte (Stimson *et al.*, 2009; Weichert *et al.*, 2008a). Hinweise ergaben sich aus der Beobachtung, dass die Herabregulation von HDAC1, nicht aber HDAC2, in einer humanen Zervixkarzinomzelllinie in einer verstärkten Resistenz gegenüber dem HDAC-Inhibitor Belinostat resultierte (Dejligbjerg *et al.*, 2008). Vergleicht man die Proteinexpression von HDAC1 und HDAC2 in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Magenkarzinomzelllinien mit dem Effekt der HDAC-Inhibitoren SAHA und VPA, so exprimierten die Zelllinien AGS und KATOIII basierend auf Immunhistochemie- und Western-Blot-Analysen die geringste Menge an HDAC1 und HDAC2 und zeigten sich am sensitivsten gegenüber SAHA und VPA.

Eine Schlussfolgerung ist aufgrund der geringen Anzahl an getesteten Zelllinien deutlich limitiert, aber die Hypothese einer einfachen, direkten Beziehung zwischen hoher HDAC-Expression und einem Ansprechen auf eine Therapie basierend auf HDAC-Inhibitoren wird durch diese Ergebnisse nicht gestützt. Weiterhin konnte erst kürzlich in einer Genom-weiten Untersuchung durch die Verwendung von shRNAs eine Gruppe von Genen identifiziert werden, die eine HDAC-Inhibitor-induzierte Apoptose verhinderten, wenn sie herab reguliert wurden. In der Gruppe dieser Proteine befand sich keine Histondeacetylase, was darauf schließen lässt, dass deren Expression nicht im

Zusammenhang mit einem Ansprechen auf einen HDAC-Inhibitor steht. Eines der in der Studie identifizierten, potentiell prognostisch relevanten Gene, HR23B, das am proteasomalen Abbau von Transportproteinen beteiligt ist, wurde dabei als besonders vielversprechend eingestuft und wird im Moment in verschiedenen Ansätzen weiter untersucht (Fotheringham *et al.*, 2009; Stimson *et al.*, 2009).

Zusammenfassend wurde in der hier vorgelegten Arbeit gezeigt, dass die Expression von HDAC1 oder HDAC2 keinen geeigneten Marker darstellt, um das Ansprechen oder das Überleben von Magenkarzinompatienten vorherzusagen, die mit einer Platin/5-FU basierten neoadjuvanten Chemotherapie behandelt wurden. Die dargestellten Daten zeigen allerdings eine deutliche prognostische Relevanz der HDAC1-Expression in der Gruppe der Patienten die auf die Therapie ansprechen, was auf eine mögliche Anwendbarkeit der Bestimmung der HDAC1-Expression zur Risikobewertung in dieser Patientengruppe hindeutet. Dies könnte helfen diejenigen Patienten zu identifizieren, bei denen die Ausschöpfung zusätzlicher Therapieoptionen ungeachtet eines Ansprechens auf die Chemotherapie, notwendig erscheint.

In vitro wurde durch die Vorbehandlung von Magenkarzinomzelllinien mit SAHA der antiproliferativen Effekt von Cisplatin unabhängig von der ursprünglichen Cisplatin-sensitivität verstärkt. Dies lässt für die Behandlung von Magenkarzinompatienten die Entwicklung von alternativen Chemotherapieschemata sinnvoll erscheinen, die einen HDAC-Inhibitor beinhalten.

5.3 Polycombproteine

Die Proteine BMI-1 und EZH2, die der Familie der Polycombproteine angehören, sind ebenfalls an epigenetischen Regulationsmechanismen beteiligt und wurden daher in die Expressionsuntersuchung an Tumorgewebe eingeschlossen.

Eine hohe Expression von BMI-1 wurde in 42 % (30/71) der untersuchten Magenkarzinombiopsien festgestellt. Dabei ergaben sich keine signifikanten Assoziationen der Expression mit klinisch-pathologischen Parametern, dem Überleben der Patienten oder deren Ansprechen auf die neoadjuvante Chemotherapie. In einer 2008 veröffentlichten Studie, bei der eine Expressionsanalyse von BMI-1 auf Basis einer immunhistochemischen Untersuchung an Magenkarzinomen durchgeführt wurde,

wurde eine hohe Expression in 67,8 % der Fälle detektiert, wobei jedoch ein anderer Grenzwerte zur Einstufung der Expressionsstärke verwendet wurde (Liu *et al.*, 2008). Dabei war eine hohe Expression von BMI-1 mit einem höheren T-Stadien und dem Auftreten von Lymphknotenmetastasen assoziiert. Vor allem jedoch ergab sich eine signifikante Korrelation mit einem kürzeren Überleben der Patienten (Liu *et al.*, 2008). Zu erwähnen ist allerdings, dass es sich bei dem untersuchten Patientenkollektiv um Fälle von primär resezierten Magenkarzinomen handelt, die nicht chemotherapeutisch behandelt wurden. Auch in anderen Tumorentitäten wie Pankreas-, Ovarial- und Kolonkarzinomen wurde unlängst eine prognostische Relevanz der BMI-1 Expression gezeigt (Li *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2010; Yang *et al.*, 2010). Zusätzlich wurde *in vitro* nach der Herabregulation von BMI-1, neben einer Reduktion der Proliferationsrate und der Invasivität der Magenkarzinomzelllinien AGS, auch eine erhöhte Apoptoserate dokumentiert (Xiao *et al.*, 2009). In einem Tiermodell wurde außerdem nachgewiesen, dass die verminderte BMI-1-Expression einer Pankreaskarzinomzelllinie zu einer Suppression des Tumorwachstums führte (Song *et al.*, 2010).

Bezüglich der Expression von EZH2 zeigten 46 % (33/71) der untersuchten prätherapeutischen Biopsien eine starke Expression von EZH2. Ebenso wie für BMI-1 wurde auch für EZH2 keine Assoziation der Expression mit klinisch-pathologischen Parametern, dem Ansprechen oder dem Überleben der Patienten gefunden. Für das Magenkarzinom ist in anderen Studien durch immunhistochemische Untersuchungen eine hohe Expression von EZH2 in 56,6 % bis 78,8 % der untersuchten Fälle nachgewiesen worden, wobei hier unterschiedliche Definitionen von hoher Expression angewendet wurden (Choi *et al.*, 2010; Matsukawa *et al.*, 2006; Mattioli *et al.*, 2007). Dabei sind die Daten für die prognostische Signifikanz diskrepant. Eine Studie zeigte, dass eine erhöhte Expression von EZH2 mit einem schlechteren Überleben der Patienten einhergeht (Matsukawa *et al.*, 2006), wohingegen diese Assoziation in einer anderen nicht festgestellt wurde (Choi *et al.*, 2010). In beiden Studien wurde das Auftreten von Metastasen mit einer erhöhten EZH2-Expression in Zusammenhang gebracht. Auch für andere Tumorentitäten, wie beispielsweise für das Nierenzellkarzinom, wurden heterogene Daten veröffentlicht. Eine Assoziation einer hohen EZH2-Proteinexpression mit einer schlechteren Prognose wurde von Wagener *et al.* beschrieben, wohingegen eine Publikation von Hinz *et al.* von einer Assoziation einer hohen mRNA Expression mit

einer verringerten Rezidivrate berichtet (Hinz *et al.*, 2009; Wagener *et al.*, 2010). Für verschiedene Tumorentitäten wurde jedoch bereits gezeigt, dass eine erhöhte EZH2-Expression mit einer verstärkten Aggressivität der Tumoren und einer schlechten Prognose verknüpft ist (Bachmann *et al.*, 2006; Kleer *et al.*, 2003; Sudo *et al.*, 2005; Varambally *et al.*, 2002). Interessanterweise wurde in einer kürzlich erschienenen Studie an prätherapeutischen Biopsien von Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Ösophagus, eine Assoziation von erhöhter EZH2-Expression mit einer schlechteren Prognose und außerdem einem schlechteren Ansprechen auf eine Chemoradiotherapie gezeigt. Auch in verschiedenen *in vitro* Untersuchungen wurde nachgewiesen, dass Tumorzellen, die eine Überexpression von EZH2 aufweisen, eine erhöhte Proliferationsrate und verstärkte Invasivität zeigten, eine Herabregulation jedoch zur Wachstums-einschränkung und erhöhter Apoptoserate führte (Tan *et al.*, 2007; Tang *et al.*, 2004; Varambally *et al.*, 2002; Wagener *et al.*, 2008).

Zusammengenommen deuten die in der Literatur vorhandenen Daten auf eine Rolle sowohl von BMI-1 als auch von EZH2 im Zusammenhang mit der Karzinogenese in verschiedenen Tumorentitäten hin. In der hier vorgelegten Arbeit wurde kein Zusammenhang der Expression mit der Prognose oder dem Ansprechen auf eine Chemotherapie festgestellt. Vergleichbare Daten zur prognostischen und prädiktiven Bedeutung von BMI-1 und EZH2 für neoadjuvant chemotherapierte Magenkarzinompatienten liegen in der Literatur nicht vor.

5.4 Ausblick

In der hier vorgelegten Arbeit zeigte die DNMT1-Expression eine prognostische und prädiktive Wertigkeit für neoadjuvant chemotherapierte Magenkarzinompatienten. Eine grundlegende Voraussetzung für die Etablierung der DNMT1-Expression als prädiktiver und auch prognostischer Biomarker für neoadjuvant behandelte Magenkarzinompatienten ist eine Evaluierung der hier gezeigten Ergebnisse an einem unabhängigen Patientenkollektiv und darüber hinaus im Rahmen von prospektiven klinischen Studien. Die hier gezeigten Untersuchungen an Magenkarzinomzelllinien deuten darauf hin, dass ein funktioneller Zusammenhang zwischen DNMT1-Expression und der Chemosensitivität gegenüber Cisplatin besteht. Der diesem Zusammenhang zugrunde liegende

Mechanismus muss in weiterführenden Studien untersucht werden. Um diesen zu charakterisieren scheint es sinnvoll, die präliminären Ergebnisse zur differentiellen Genexpression von Komponenten des Wnt- und des Hedgehog-Signalwegs in AGS Zellen mit shRNA-vermittelter herab regulierter DNMT1-Expression zu validieren. Weiterhin wäre es möglich durch eine Expressionsanalyse, bei der auch mit dem DNMT-Inhibitor DAC behandelte Zellen eingeschlossen werden, Gene zu identifizieren, die sowohl durch eine shRNA- als auch eine DNMT-Inhibitor-vermittelte Herabregulation der DNMT1 differentiell exprimiert werden. Da bisher unklar ist, ob die verminderte Zellviabilität nach DNMT1-Herabregulation bzw. DAC-Behandlung auf eine erhöhte Apoptoserate oder auf den Eintritt der Zellen in einen Zellzyklusarrest zurückzuführen ist, könnte dieser Punkt durch eine Zellzyklusbestimmung und eine Untersuchung apoptose-relevanter Signalwege ausführlicher hinterfragt werden.

Die in der vorgelegten Arbeit gezeigten Ergebnisse zur Kombination von epigenetisch wirksamen Inhibitoren mit dem Chemotherapeutikum Cisplatin liefern erste Hinweise auf die klinische Anwendbarkeit bei Magenkarzinompatienten. Um die Anwendbarkeit der kombinatorischen Behandlung unter Verwendung von Cisplatin und DAC zu validieren, ist eine Erweiterung der präklinischen Modelle notwendig. Zum einen ist die Integration von normalen Fibroblasten in kombinatorischen Chemosensitivitätstests ein Ausgangspunkt um mögliche toxische Auswirkungen auf normale Zellen auszuschließen. Zum anderen ist auch die Übertragbarkeit der *in vitro* Ergebnisse auf die *in vivo* Situation durch die Etablierung geeigneter Tiermodelle zu prüfen, um sowohl die Wirksamkeit zu bestätigen, als auch eine Toxizität gegenüber normalen Organen ausschließen zu können. Darüber hinaus ist die Durchführung von klinischen Phase-I Studien für die Weiterentwicklung dieser neuen Therapiestrategie notwendig. Dabei muss sowohl die Verträglichkeit der Kombination in Abhängigkeit der verabreichten Dosen der eingesetzten Therapeutika, als auch das optimale zeitliche Behandlungsschema genauer charakterisiert werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Ajani JA, Ota DM, Jessup JM, Ames FC, McBride C, Boddie A, Levin B, Jackson DE, Roh M, Hohn D (1991). Resectable gastric carcinoma. An evaluation of preoperative and postoperative chemotherapy. *Cancer* 68: 1501-6.

Amara K, Ziadi S, Hachana M, Soltani N, Korbi S, Trimeche M (2010). DNA methyltransferase DNMT3b protein overexpression as a prognostic factor in patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Cancer Sci* 101: 1722-30.

An C, Choi IS, Yao JC, Worah S, Xie K, Mansfield PF, Ajani JA, Rashid A, Hamilton SR, Wu TT (2005). Prognostic significance of CpG island methylator phenotype and microsatellite instability in gastric carcinoma. *Clin Cancer Res* 11: 656-63.

Aparicio A, Weber JS (2002). Review of the clinical experience with 5-azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine in solid tumors. *Curr Opin Investig Drugs* 3: 627-33.

Appleton K, Mackay HJ, Judson I, Plumb JA, McCormick C, Strathdee G, Lee C, Barrett S, Reade S, Jadayel D, *et al.* (2007). Phase I and pharmacodynamic trial of the DNA methyltransferase inhibitor decitabine and carboplatin in solid tumors. *J Clin Oncol* 25: 4603-9.

Arai E, Kanai Y, Ushijima S, Fujimoto H, Mukai K, Hirohashi S (2006). Regional DNA hypermethylation and DNA methyltransferase (DNMT) 1 protein overexpression in both renal tumors and corresponding nontumorous renal tissues. *Int J Cancer* 119: 288-96.

Arkenau HT (2009). Gastric cancer in the era of molecularly targeted agents: current drug development strategies. *J Cancer Res Clin Oncol* 135: 855-66.

Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, Salvesen HB, Otte AP, Akslen LA (2006). EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol* 24: 268-73.

Balch C, Yan P, Craft T, Young S, Skalnik DG, Huang TH, Nephew KP (2005). Antimitogenic and chemosensitizing effects of the methylation inhibitor zebularine in ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 4: 1505-14.

Bamford S, Dawson E, Forbes S, Clements J, Pettett R, Dogan A, Flanagan A, Teague J, Futreal PA, Stratton MR, *et al.* (2004). The COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer) database and website. *Br J Cancer* 91: 355-8.

Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, *et al.* (2010). Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 376: 687-97.

Baylin SB (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2 Suppl 1: S4-11.

Becker K, Mueller JD, Schulmacher C, Ott K, Fink U, Busch R, Bottcher K, Siewert JR, Hofler H (2003). Histomorphology and grading of regression in gastric carcinoma treated with neoadjuvant chemotherapy. *Cancer* 98: 1521-30.

Becker K, Keller G (2010). Gastric Cancer. In: *Encyclopedia of Life Science*: Doi:10.1002/9780470015902.a0006056.pub2.

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.

Bertuccio P, Chatenoud L, Levi F, Praud D, Ferlay J, Negri E, Malvezzi M, La Vecchia C (2009). Recent patterns in gastric cancer: a global overview. *Int J Cancer* 125: 666-73.

Billam M, Sobolewski MD, Davidson NE (2010). Effects of a novel DNA methyltransferase inhibitor zebularine on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 120: 581-92.

Bird A (1992). The essentials of DNA methylation. *Cell* 70: 5-8.

Bird A (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev* 16: 6-21.

Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.

Buonsanti G, Calistri D, Padovan L, Luinetti O, Fiocca R, Solcia E, Ranzani GN (1997). Microsatellite instability in intestinal- and diffuse-type gastric carcinoma. *J Pathol* 182: 167-73.

Butler LM, Agus DB, Scher HI, Higgins B, Rose A, Cordon-Cardo C, Thaler HT, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM (2000). Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 60: 5165-70.

Catalano V, Labianca R, Beretta GD, Gatta G, de Braud F, Van Cutsem E (2009). Gastric cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 71: 127-64.

Champion C, Guianvarc'h D, Senamaud-Beaufort C, Jurkowska RZ, Jeltsch A, Ponger L, Arimondo PB, Guieysse-Peugeot AL (2010). Mechanistic insights on the inhibition of c5 DNA methyltransferases by zebularine. *PLoS One* 5: e12388.

Chen L, Fischle W, Verdin E, Greene WC (2001). Duration of nuclear NF-kappaB action regulated by reversible acetylation. *Science* 293: 1653-7.

Chen T, Hevi S, Gay F, Tsujimoto N, He T, Zhang B, Ueda Y, Li E (2007). Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. *Nat Genet* 39: 391-6.

Cheng JC, Matsen CB, Gonzales FA, Ye W, Greer S, Marquez VE, Jones PA, Selker EU (2003). Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *J Natl Cancer Inst* 95: 399-409.

Choi JH, Kwon HJ, Yoon BI, Kim JH, Han SU, Joo HJ, Kim DY (2001). Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Jpn J Cancer Res* 92: 1300-4.

Choi JH, Song YS, Yoon JS, Song KW, Lee YY (2010). Enhancer of zeste homolog 2 expression is associated with tumor cell proliferation and metastasis in gastric cancer. *APMIS* 118: 196-202.

Chou TC, Talalay P (1984). Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors. *Adv Enzyme Regul* 22: 27-55.

Chuang LS, Ian HI, Koh TW, Ng HH, Xu G, Li BF (1997). Human DNA-(cytosine-5) methyltransferase-PCNA complex as a target for p21WAF1. *Science* 277: 1996-2000.

Classen AK, Bunker BD, Harvey KF, Vaccari T, Bilder D (2009). A tumor suppressor activity of Drosophila Polycomb genes mediated by JAK-STAT signaling. *Nat Genet* 41: 1150-5.

Collett K, Eide GE, Arnes J, Stefansson IM, Eide J, Braaten A, Aas T, Otte AP, Akslen LA (2006). Expression of enhancer of zeste homologue 2 is significantly associated with increased tumor cell proliferation and is a marker of aggressive breast cancer. *Clin Cancer Res* 12: 1168-74.

Correa P (2004). Is gastric cancer preventable? *Gut* 53: 1217-9.

Craig JM, Bickmore WA (1994). The distribution of CpG islands in mammalian chromosomes. *Nat Genet* 7: 376-82.

Crew KD, Neugut AI (2006). Epidemiology of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 12: 354-62.

Crul M, van Waardenburg RC, Beijnen JH, Schellens JH (2002). DNA-based drug interactions of cisplatin. *Cancer Treat Rev* 28: 291-303.

Cunningham D, Allum WH, Stenning SP, Thompson JN, Van de Velde CJ, Nicolson M, Scarffe JH, Lofts FJ, Falk SJ, Iveson TJ, *et al.* (2006). Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer. *N Engl J Med* 355: 11-20.

Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, Guldberg P, Kohler G, Wijermans P, Jones PA, Lubbert M (2002). Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood* 100: 2957-64.

Davies NP, Hardman LC, Murray V (2000). The effect of chromatin structure on cisplatin damage in intact human cells. *Nucleic Acids Res* 28: 2954-8.

de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* 370: 737-49.

de Sousa Abreu R, Penalva LO, Marcotte EM, Vogel C (2009). Global signatures of protein and mRNA expression levels. *Mol Biosyst* 5: 1512-26.

Dean M, Fojo T, Bates S (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nat Rev Cancer* 5: 275-84.

Dejligbjerg M, Grauslund M, Litman T, Collins L, Qian X, Jeffers M, Lichenstein H, Jensen PB, Sehested M (2008). Differential effects of class I isoform histone deacetylase depletion and enzymatic inhibition by belinostat or valproic acid in HeLa cells. *Mol Cancer* 7: 70.

Didenko VV (2001). DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications. *Biotechniques* 31: 1106-16, 1118, 1120-1.

Dimri GP, Martinez JL, Jacobs JJ, Keblusek P, Itahana K, Van Lohuizen M, Campisi J, Wazer DE, Band V (2002). The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 62: 4736-45.

Ding WJ, Fang JY, Chen XY, Peng YS (2008). The expression and clinical significance of DNA methyltransferase proteins in human gastric cancer. *Dig Dis Sci* 53: 2083-9.

dos Santos NR, Seruca R, Constancia M, Seixas M, Sobrinho-Simoes M (1996). Microsatellite instability at multiple loci in gastric carcinoma: clinicopathologic implications and prognosis. *Gastroenterology* 110: 38-44.

Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, Herrera LA (2008). Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev* 34: 206-22.

Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Danenberg PV, Laird PW (1999). CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression. *Cancer Res* 59: 2302-6.

Eastman A (1990). Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system. *Cancer Cells* 2: 275-80.

Esteller M (2007). Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nat Rev Genet* 8: 286-98.

Esteller M (2008). Epigenetics in cancer. *N Engl J Med* 358: 1148-59.

Etoh T, Kanai Y, Ushijima S, Nakagawa T, Nakanishi Y, Sasako M, Kitano S, Hirohashi S (2004). Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression correlates significantly with poorer tumor differentiation and frequent DNA hypermethylation of multiple CpG islands in gastric cancers. *Am J Pathol* 164: 689-99.

Fang F, Balch C, Schilder J, Breen T, Zhang S, Shen C, Li L, Kulesavage C, Snyder AJ, Nephew KP, *et al.* (2010). A phase 1 and pharmacodynamic study of decitabine in combination with carboplatin in patients with recurrent, platinum-resistant, epithelial ovarian cancer. *Cancer* 116: 4043-53.

Fareed KR, Kaye P, Soomro IN, Ilyas M, Martin S, Parsons SL, Madhusudan S (2009). Biomarkers of response to therapy in oesophago-gastric cancer. *Gut* 58: 127-43.

Feinberg AP, Vogelstein B (1983). Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts. *Nature* 301: 89-92.

Feinberg AP, Cui H, Ohlsson R (2002). DNA methylation and genomic imprinting: insights from cancer into epigenetic mechanisms. *Semin Cancer Biol* 12: 389-98.

Feinberg AP, Ohlsson R, Henikoff S (2006). The epigenetic progenitor origin of human cancer. *Nat Rev Genet* 7: 21-33.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*.

Fitzgerald RC, Hardwick R, Huntsman D, Carneiro F, Guilford P, Blair V, Chung DC, Norton J, Ragnath K, Van Krieken JH, *et al.* (2010). Hereditary diffuse gastric cancer: updated consensus guidelines for clinical management and directions for future research. *J Med Genet* 47: 436-44.

Forman D, Burley VJ (2006). Gastric cancer: global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 20: 633-49.

Fotheringham S, Epping MT, Stimson L, Khan O, Wood V, Pezzella F, Bernardis R, La Thangue NB (2009). Genome-wide loss-of-function screen reveals an important role for the proteasome in HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Cancer Cell* 15: 57-66.

Fritzsche FR, Weichert W, Roske A, Gekeler V, Beckers T, Stephan C, Jung K, Scholman K, Denkert C, Dietel M, *et al.* (2008). Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in renal cell cancer. *BMC Cancer* 8: 381.

Gately DP, Howell SB (1993). Cellular accumulation of the anticancer agent cisplatin: a review. *Br J Cancer* 67: 1171-6.

Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Bai S, Kutay H, Motiwala T, Jacob ST (2005). 5-Aza-deoxycytidine induces selective degradation of DNA methyltransferase 1 by a proteasomal pathway that requires the KEN box, bromo-adjacent homology domain, and nuclear localization signal. *Mol Cell Biol* 25: 4727-41.

Gibney ER, Nolan CM (2010). Epigenetics and gene expression. *Heredity* 105: 4-13.

Girault I, Tozlu S, Lidereau R, Bieche I (2003). Expression analysis of DNA methyltransferases 1, 3A, and 3B in sporadic breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 9: 4415-22.

Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G, Raychaudhury A, Newton HB, Chiocca EA, Lawler S (2008). Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res* 68: 9125-30.

Goll MG, Bestor TH (2005). Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu Rev Biochem* 74: 481-514.

Gorisch SM, Wachsmuth M, Toth KF, Lichter P, Rippe K (2005). Histone acetylation increases chromatin accessibility. *J Cell Sci* 118: 5825-34.

Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, *et al.* (2001). Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 20: 6969-78.

Gregory PD, Wagner K, Horz W (2001). Histone acetylation and chromatin remodeling. *Exp Cell Res* 265: 195-202.

Gu W, Roeder RG (1997). Activation of p53 sequence-specific DNA binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell* 90: 595-606.

Guilford P, Hopkins J, Harraway J, McLeod M, McLeod N, Harawira P, Taite H, Scoular R, Miller A, Reeve AE (1998). E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. *Nature* 392: 402-5.

Gyorffy B, Surowiak P, Kiesslich O, Denkert C, Schafer R, Dietel M, Lage H (2006). Gene expression profiling of 30 cancer cell lines predicts resistance towards 11 anticancer drugs at clinically achieved concentrations. *Int J Cancer* 118: 1699-712.

Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN (2004). Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate* 59: 177-89.

Hamilton S, Aaltonen L (2000). WHO classification of tumors. Pathology and Genetics of tumours of the Digestive System. IARC Press.

Hattori Y, Odagiri H, Nakatani H, Miyagawa K, Naito K, Sakamoto H, Katoh O, Yoshida T, Sugimura T, Terada M (1990). K-sam, an amplified gene in stomach cancer, is a member of the heparin-binding growth factor receptor genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 5983-7.

Haupt Y, Alexander WS, Barri G, Klinken SP, Adams JM (1991). Novel zinc finger gene implicated as myc collaborator by retrovirally accelerated lymphomagenesis in E mu-myc transgenic mice. *Cell* 65: 753-63.

Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR, Linehan WM, *et al.* (1994). Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 9700-4.

Herman JG, Baylin SB (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349: 2042-54.

Hinz S, Weikert S, Magheli A, Hoffmann M, Engers R, Miller K, Kempkensteffen C (2009). Expression profile of the polycomb group protein enhancer of Zeste homologue 2 and its prognostic relevance in renal cell carcinoma. *J Urol* 182: 2920-5.

Holleran JL, Parise RA, Joseph E, Eiseman JL, Covey JM, Glaze ER, Lyubimov AV, Chen YF, D'Argenio DZ, Egorin MJ (2005). Plasma pharmacokinetics, oral bioavailability, and interspecies scaling of the DNA methyltransferase inhibitor, zebularine. *Clin Cancer Res* 11: 3862-8.

Holliday R (1987). The inheritance of epigenetic defects. *Science* 238: 163-70.

Holliday R (1990). DNA methylation and epigenetic inheritance. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 326: 329-38.

Hu J, Fan H, Liu D, Zhang S, Zhang F, Xu H (2010). DNMT3B promoter polymorphism and risk of gastric cancer. *Dig Dis Sci* 55: 1011-6.

Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, Gelmetti V, Marchesi F, Viale A, Altucci L, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG (2005). Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med* 11: 71-6.

Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 14298-302.

Ishihama K, Yamakawa M, Semba S, Takeda H, Kawata S, Kimura S, Kimura W (2007). Expression of HDAC1 and CBP/p300 in human colorectal carcinomas. *J Clin Pathol* 60: 1205-10.

Issa JP, Gharibyan V, Cortes J, Jelinek J, Morris G, Verstovsek S, Talpaz M, Garcia-Manero G, Kantarjian HM (2005). Phase II study of low-dose decitabine in patients with chronic myelogenous leukemia resistant to imatinib mesylate. *J Clin Oncol* 23: 3948-56.

Issa JP, Kantarjian HM (2009). Targeting DNA methylation. *Clin Cancer Res* 15: 3938-46.

Jabbour E, Issa JP, Garcia-Manero G, Kantarjian H (2008). Evolution of decitabine development: accomplishments, ongoing investigations, and future strategies. *Cancer* 112: 2341-51.

Jair KW, Bachman KE, Suzuki H, Ting AH, Rhee I, Yen RW, Baylin SB, Schuebel KE (2006). De novo CpG island methylation in human cancer cells. *Cancer Res* 66: 682-92.

Jemal A, Center MM, DeSantis C, Ward EM (2010). Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 19: 1893-907.

Jenuwein T, Allis CD (2001). Translating the histone code. *Science* 293: 1074-80.

Jiang L, Li J, Song L (2009). Bmi-1, stem cells and cancer. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 41: 527-34.

Jones JS, Amos CI, Pande M, Gu X, Chen J, Campos IM, Wei Q, Rodriguez-Bigas M, Lynch PM, Frazier ML (2006). DNMT3b polymorphism and hereditary nonpolyposis colorectal cancer age of onset. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 15: 886-91.

Jones PA, Baylin SB (2007). The epigenomics of cancer. *Cell* 128: 683-92.

Jung Y, Park J, Kim TY, Park JH, Jong HS, Im SA, Robertson KD, Bang YJ (2007). Potential advantages of DNA methyltransferase 1 (DNMT1)-targeted inhibition for cancer therapy. *J Mol Med* 85: 1137-48.

Jurkowska RZ, Jurkowski TP, Jeltsch A (2010). Structure and Function of Mammalian DNA Methyltransferases. *Chembiochem*.

Kamangar F, Dores GM, Anderson WF (2006). Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 24: 2137-50.

Kanai Y, Ushijima S, Kondo Y, Nakanishi Y, Hirohashi S (2001). DNA methyltransferase expression and DNA methylation of CPG islands and peri-centromeric satellite regions in human colorectal and stomach cancers. *Int J Cancer* 91: 205-12.

Katz D, Ito E, Lau KS, Mocanu JD, Bastianutto C, Schimmer AD, Liu FF (2008). Increased efficiency for performing colony formation assays in 96-well plates: novel applications to combination therapies and high-throughput screening. *Biotechniques* 44: ix-xiv.

Keller G, Rotter M, Vogelsang H, Bischoff P, Becker KF, Mueller J, Brauch H, Siewert JR, Hofler H (1995). Microsatellite instability in adenocarcinomas of the upper gastrointestinal tract. Relation to clinicopathological data and family history. *Am J Pathol* 147: 593-600.

Keller G, Hofler H, Becker KF (2005). Molecular medicine of gastric adenocarcinomas. *Expert Rev Mol Med* 7: 1-13.

Keller G, Langer R, Höfler H (2008). Therapy Related Markers and Response Prediction Towards Multimodal Treatment of Carcinomas of the Upper Gastrointestinal Tract *Current Pharmacogenomics and Personalized Medicine*. 6: 85-97.

Kelley JR, Duggan JM (2003). Gastric cancer epidemiology and risk factors. *J Clin Epidemiol* 56: 1-9.

Kelly WK, Richon VM, O'Connor O, Curley T, MacGregor-Curtelli B, Tong W, Klang M, Schwartz L, Richardson S, Rosa E, *et al.* (2003). Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor: suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously. *Clin Cancer Res* 9: 3578-88.

Kelsen DP (1996). Adjuvant and neoadjuvant therapy for gastric cancer. *Semin Oncol* 23: 379-89.

Khorasanizadeh S (2004). The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. *Cell* 116: 259-72.

Kim H, Kwon YM, Kim JS, Han J, Shim YM, Park J, Kim DH (2006). Elevated mRNA levels of DNA methyltransferase-1 as an independent prognostic factor in primary nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 107: 1042-9.

Kim JG, Chung HY, Yu W (2010). Recent advances in chemotherapy for advanced gastric cancer. *World J Gastrointest Oncol* 2: 287-94.

Kim JH, Yoon SY, Kim CN, Joo JH, Moon SK, Choe IS, Choe YK, Kim JW (2004). The Bmi-1 oncoprotein is overexpressed in human colorectal cancer and correlates with the reduced p16INK4a/p14ARF proteins. *Cancer Lett* 203: 217-24.

Kim MA, Jung EJ, Lee HS, Lee HE, Jeon YK, Yang HK, Kim WH (2007). Evaluation of HER-2 gene status in gastric carcinoma using immunohistochemistry, fluorescence in situ hybridization, and real-time quantitative polymerase chain reaction. *Hum Pathol* 38: 1386-93.

Kim MS, Blake M, Baek JH, Kohlhagen G, Pommier Y, Carrier F (2003). Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res* 63: 7291-300.

Kleer CG, Cao Q, Varambally S, Shen R, Ota I, Tomlins SA, Ghosh D, Sewalt RG, Otte AP, Hayes DF, *et al.* (2003). EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 11606-11.

Kovacs JJ, Murphy PJ, Gaillard S, Zhao X, Wu JT, Nicchitta CV, Yoshida M, Toft DO, Pratt WB, Yao TP (2005). HDAC6 regulates Hsp90 acetylation and chaperone-dependent activation of glucocorticoid receptor. *Mol Cell* 18: 601-7.

Kristensen LS, Nielsen HM, Hansen LL (2009). Epigenetics and cancer treatment. *Eur J Pharmacol* 625: 131-42.

Kuniyasu H, Yasui W, Yokozaki H, Kitadai Y, Tahara E (1993). Aberrant expression of c-met mRNA in human gastric carcinomas. *Int J Cancer* 55: 72-5.

Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-5.

Lane AA, Chabner BA (2009). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol* 27: 5459-68.

Lauren P (1965). The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand* 64: 31-49.

Lee JH, Park JH, Jung Y, Kim JH, Jong HS, Kim TY, Bang YJ (2006). Histone deacetylase inhibitor enhances 5-fluorouracil cytotoxicity by down-regulating thymidylate synthase in human cancer cells. *Mol Cancer Ther* 5: 3085-95.

Li DW, Tang HM, Fan JW, Yan DW, Zhou CZ, Li SX, Wang XL, Peng ZH (2010). Expression level of Bmi-1 oncoprotein is associated with progression and prognosis in colon cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 997-1006.

Li S, Chiang TC, Richard-Davis G, Barrett JC, McLachlan JA (2003). DNA hypomethylation and imbalanced expression of DNA methyltransferases (DNMT1, 3A, and 3B) in human uterine leiomyoma. *Gynecol Oncol* 90: 123-30.

Li XN, Shu Q, Su JM, Perlaky L, Blaney SM, Lau CC (2005). Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol Cancer Ther* 4: 1912-22.

Lin CT, Lai HC, Lee HY, Lin WH, Chang CC, Chu TY, Lin YW, Lee KD, Yu MH (2008). Valproic acid resensitizes cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Cancer Sci* 99: 1218-26.

Lin RK, Hsu HS, Chang JW, Chen CY, Chen JT, Wang YC (2007). Alteration of DNA methyltransferases contributes to 5'CpG methylation and poor prognosis in lung cancer. *Lung Cancer* 55: 205-13.

Liu JH, Song LB, Zhang X, Guo BH, Feng Y, Li XX, Liao WT, Zeng MS, Huang KH (2008). Bmi-1 expression predicts prognosis for patients with gastric carcinoma. *J Surg Oncol* 97: 267-72.

Longley DB, Harkin DP, Johnston PG (2003). 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3: 330-8.

Lordick F, Siewert JR (2005). Recent advances in multimodal treatment for gastric cancer: a review. *Gastric Cancer* 8: 78-85.

Lordick F, Lubber B, Lorenzen S, Hegewisch-Becker S, Folprecht G, Woll E, Decker T, Endlicher E, Rothling N, Schuster T, *et al.* (2010). Cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer: a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *Br J Cancer* 102: 500-5.

Lowy AM, Mansfield PF, Leach SD, Pazdur R, Dumas P, Ajani JA (1999). Response to neoadjuvant chemotherapy best predicts survival after curative resection of gastric cancer. *Ann Surg* 229: 303-8.

Luczak MW, Jagodzinski PP (2006). The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol* 44: 143-54.

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* 389: 251-60.

Lund AH, van Lohuizen M (2004). Epigenetics and cancer. *Genes Dev* 18: 2315-35.

Lyko F, Brown R (2005). DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *J Natl Cancer Inst* 97: 1498-506.

Mader RM, Muller M, Steger GG (1998). Resistance to 5-fluorouracil. *Gen Pharmacol* 31: 661-6.

Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R (2007). FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist* 12: 1247-52.

Marquez VE, Kelley JA, Agbaria R, Ben-Kasus T, Cheng JC, Yoo CB, Jones PA (2005). Zebularine: a unique molecule for an epigenetically based strategy in cancer chemotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 1058: 246-54.

Martinez AM, Schuettengruber B, Sakr S, Janic A, Gonzalez C, Cavalli G (2009). Polyhomeotic has a tumor suppressor activity mediated by repression of Notch signaling. *Nat Genet* 41: 1076-82.

Matsukawa Y, Semba S, Kato H, Ito A, Yanagihara K, Yokozaki H (2006). Expression of the enhancer of zeste homolog 2 is correlated with poor prognosis in human gastric cancer. *Cancer Sci* 97: 484-91.

Mattioli E, Vogiatzi P, Sun A, Abbadessa G, Angeloni G, D'Ugo D, Trani D, Gaughan JP, Vecchio FM, Cevenini G, *et al.* (2007). Immunohistochemical analysis of pRb2/p130, VEGF, EZH2, p53, p16(INK4A), p27(KIP1), p21(WAF1), Ki-67 expression patterns in gastric cancer. *J Cell Physiol* 210: 183-91.

Milne AN, Sitarz R, Carvalho R, Carneiro F, Offerhaus GJ (2007). Early onset gastric cancer: on the road to unraveling gastric carcinogenesis. *Curr Mol Med* 7: 15-28.

Minucci S, Pelicci PG (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 38-51.

Mishra MV, Bisht KS, Sun L, Muldoon-Jacobs K, Awwad R, Kaushal A, Nguyen P, Huang L, Pennington JD, Markovina S, *et al.* (2008). DNMT1 as a molecular target in a multimodality-resistant phenotype in tumor cells. *Mol Cancer Res* 6: 243-9.

Miyake K, Yoshizumi T, Imura S, Sugimoto K, Batmunkh E, Kanemura H, Morine Y, Shimada M (2008). Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha, histone deacetylase 1, and metastasis-associated protein 1 in pancreatic carcinoma: correlation with poor prognosis with possible regulation. *Pancreas* 36: e1-9.

Momparler RL (2005). Pharmacology of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine). *Semin Hematol* 42: S9-16.

Montgomery KG, Liu MC, Eccles DM, Campbell IG (2004). The DNMT3B C-->T promoter polymorphism and risk of breast cancer in a British population: a case-control study. *Breast Cancer Res* 6: R390-4.

Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T, Aishima S, Yao T, Hosoi F, Basaki Y, Ono M, Kuwano M, Tanaka M, *et al.* (2007). Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. *Oncol Rep* 18: 769-74.

Nakagawa T, Kanai Y, Saito Y, Kitamura T, Kakizoe T, Hirohashi S (2003). Increased DNA methyltransferase 1 protein expression in human transitional cell carcinoma of the bladder. *J Urol* 170: 2463-6.

Nakagawa T, Kanai Y, Ushijima S, Kitamura T, Kakizoe T, Hirohashi S (2005). DNA hypermethylation on multiple CpG islands associated with increased DNA methyltransferase DNMT1 protein expression during multistage urothelial carcinogenesis. *J Urol* 173: 1767-71.

Napieralski R, Ott K, Kremer M, Becker K, Boulesteix AL, Lordick F, Siewert JR, Hofler H, Keller G (2007). Methylation of tumor-related genes in neoadjuvant-treated gastric cancer: relation to therapy response and clinicopathologic and molecular features. *Clin Cancer Res* 13: 5095-102.

Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, Knops R, Massop M, Tonnissen ER, van der Heijden A, Scheele TN, Vandenberghe P, de Witte T, *et al.* (2010). Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet* 42: 665-7.

Nygren AO, Ameziane N, Duarte HM, Vijzelaar RN, Waisfisz Q, Hess CJ, Schouten JP, Errami A (2005). Methylation-specific MLPA (MS-MLPA): simultaneous detection of CpG methylation and copy number changes of up to 40 sequences. *Nucleic Acids Res* 33: e128.

Oda T, Kanai Y, Oyama T, Yoshiura K, Shimoyama Y, Birchmeier W, Sugimura T, Hirohashi S (1994). E-cadherin gene mutations in human gastric carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 1858-62.

Oh BK, Kim H, Park HJ, Shim YH, Choi J, Park C, Park YN (2007). DNA methyltransferase expression and DNA methylation in human hepatocellular carcinoma and their clinicopathological correlation. *Int J Mol Med* 20: 65-73.

Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E (1999). DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99: 247-57.

Oki Y, Aoki E, Issa JP (2007). Decitabine--bedside to bench. *Crit Rev Oncol Hematol* 61: 140-52.

OMIM-Datenbank <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim>.

Ostler KR, Davis EM, Payne SL, Gosalia BB, Exposito-Cespedes J, Le Beau MM, Godley LA (2007). Cancer cells express aberrant DNMT3B transcripts encoding truncated proteins. *Oncogene* 26: 5553-63.

Ott K, Sendler A, Becker K, Dittler HJ, Helmberger H, Busch R, Kollmannsberger C, Siewert JR, Fink U (2003a). Neoadjuvant chemotherapy with cisplatin, 5-FU, and leucovorin (PLF) in locally advanced gastric cancer: a prospective phase II study. *Gastric Cancer* 6: 159-67.

Ott K, Fink U, Becker K, Stahl A, Dittler HJ, Busch R, Stein H, Lordick F, Link T, Schwaiger M, *et al.* (2003b). Prediction of response to preoperative chemotherapy in gastric carcinoma by metabolic imaging: results of a prospective trial. *J Clin Oncol* 21: 4604-10.

Owonikoko TK, Ramalingam SS, Kanterewicz B, Balias TE, Belani CP, Hershberger PA (2010). Vorinostat increases carboplatin and paclitaxel activity in non-small-cell lung cancer cells. *Int J Cancer* 126: 743-55.

Palii SS, Van Emburgh BO, Sankpal UT, Brown KD, Robertson KD (2008). DNA methylation inhibitor 5-Aza-2'-deoxycytidine induces reversible genome-wide DNA damage that is distinctly influenced by DNA methyltransferases 1 and 3B. *Mol Cell Biol* 28: 752-71.

Palli D (2000). Epidemiology of gastric cancer: an evaluation of available evidence. *J Gastroenterol* 35 Suppl 12: 84-9.

Panani AD (2008). Cytogenetic and molecular aspects of gastric cancer: clinical implications. *Cancer Lett* 266: 99-115.

Park HJ, Yu E, Shim YH (2006). DNA methyltransferase expression and DNA hypermethylation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 233: 271-8.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P (2005). Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 55: 74-108.

Patel JH, Du Y, Ard PG, Phillips C, Carella B, Chen CJ, Rakowski C, Chatterjee C, Lieberman PM, Lane WS, *et al.* (2004). The c-MYC oncoprotein is a substrate of the acetyltransferases hGCN5/PCAF and TIP60. *Mol Cell Biol* 24: 10826-34.

Peng DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, Kosuge T, Hirohashi S (2005). Increased DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein expression in precancerous conditions and ductal carcinomas of the pancreas. *Cancer Sci* 96: 403-8.

Peng DF, Kanai Y, Sawada M, Ushijima S, Hiraoka N, Kitazawa S, Hirohashi S (2006). DNA methylation of multiple tumor-related genes in association with overexpression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) during multistage carcinogenesis of the pancreas. *Carcinogenesis* 27: 1160-8.

Pinedo HM, Peters GF (1988). Fluorouracil: biochemistry and pharmacology. *J Clin Oncol* 6: 1653-64.

Pinto M, Oliveira C, Cirnes L, Carlos Machado J, Ramires M, Nogueira A, Carneiro F, Seruca R (2003). Promoter methylation of TGFbeta receptor I and mutation of TGFbeta receptor II are frequent events in MSI sporadic gastric carcinomas. *J Pathol* 200: 32-8.

Plimack ER, Stewart DJ, Issa JP (2007). Combining epigenetic and cytotoxic therapy in the treatment of solid tumors. *J Clin Oncol* 25: 4519-21.

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: 6039-44.

Plummer R, Vidal L, Griffin M, Lesley M, de Bono J, Coulthard S, Sludden J, Siu LL, Chen EX, Oza AM, *et al.* (2009). Phase I study of MG98, an oligonucleotide antisense inhibitor of human DNA methyltransferase 1, given as a 7-day infusion in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 15: 3177-83.

Pradhan S, Bacolla A, Wells RD, Roberts RJ (1999). Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation. *J Biol Chem* 274: 33002-10.

Qiu H, Yashiro M, Shinto O, Matsuzaki T, Hirakawa K (2009). DNA methyltransferase inhibitor 5-aza-CdR enhances the radiosensitivity of gastric cancer cells. *Cancer Sci* 100: 181-8.

Qiu YY, Mirkin BL, Dwivedi RS (2005). Inhibition of DNA methyltransferase reverses cisplatin induced drug resistance in murine neuroblastoma cells. *Cancer Detect Prev* 29: 456-63.

Qu Y, Mu G, Wu Y, Dai X, Zhou F, Xu X, Wang Y, Wei F (2010). Overexpression of DNA methyltransferases 1, 3a, and 3b significantly correlates with retinoblastoma tumorigenesis. *Am J Clin Pathol* 134: 826-34.

Rajdev L (2010). Treatment options for surgically resectable gastric cancer. *Curr Treat Options Oncol* 11: 14-23.

Ramalingam SS, Parise RA, Ramanathan RK, Lagattuta TF, Musguire LA, Stoller RG, Potter DM, Argiris AE, Zwiebel JA, Egorin MJ, *et al.* (2007). Phase I and pharmacokinetic study of vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, in combination with carboplatin and paclitaxel for advanced solid malignancies. *Clin Cancer Res* 13: 3605-10.

Raman JD, Mongan NP, Tickoo SK, Boorjian SA, Scherr DS, Gudas LJ (2005). Increased expression of the polycomb group gene, EZH2, in transitional cell carcinoma of the bladder. *Clin Cancer Res* 11: 8570-6.

Reik W, Lewis A (2005). Co-evolution of X-chromosome inactivation and imprinting in mammals. *Nat Rev Genet* 6: 403-10.

Reu FJ, Bae SI, Cherkassky L, Leaman DW, Lindner D, Beaulieu N, MacLeod AR, Borden EC (2006). Overcoming resistance to interferon-induced apoptosis of renal carcinoma and melanoma cells by DNA demethylation. *J Clin Oncol* 24: 3771-9.

Rhee I, Jair KW, Yen RW, Lengauer C, Herman JG, Kinzler KW, Vogelstein B, Baylin SB, Schuebel KE (2000). CpG methylation is maintained in human cancer cells lacking DNMT1. *Nature* 404: 1003-7.

Rhee I, Bachman KE, Park BH, Jair KW, Yen RW, Schuebel KE, Cui H, Feinberg AP, Lengauer C, Kinzler KW, *et al.* (2002). DNMT1 and DNMT3b cooperate to silence genes in human cancer cells. *Nature* 416: 552-6.

Rice JC, Allis CD (2001). Code of silence. *Nature* 414: 258-61.

Rikimaru T, Taketomi A, Yamashita Y, Shirabe K, Hamatsu T, Shimada M, Maehara Y (2007). Clinical significance of histone deacetylase 1 expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncology* 72: 69-74.

Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR (2003). DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet* 33: 61-5.

Robertson KD, Keyomarsi K, Gonzales FA, Velicescu M, Jones PA (2000). Differential mRNA expression of the human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b during the G(0)/G(1) to S phase transition in normal and tumor cells. *Nucleic Acids Res* 28: 2108-13.

Robertson KD (2001). DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene* 20: 3139-55.

Saito Y, Kanai Y, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S (2001). Expression of mRNA for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins and DNA methylation status on CpG islands and pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 33: 561-8.

Saito Y, Kanai Y, Nakagawa T, Sakamoto M, Saito H, Ishii H, Hirohashi S (2003). Increased protein expression of DNA methyltransferase (DNMT) 1 is significantly correlated with the malignant potential and poor prognosis of human hepatocellular carcinomas. *Int J Cancer* 105: 527-32.

Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP (1991). Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet* 48: 880-8.

Samlowski WE, Leachman SA, Wade M, Cassidy P, Porter-Gill P, Busby L, Wheeler R, Boucher K, Fitzpatrick F, Jones DA, *et al.* (2005). Evaluation of a 7-day continuous intravenous infusion of decitabine: inhibition of promoter-specific and global genomic DNA methylation. *J Clin Oncol* 23: 3897-905.

Satoh S, Kawashima K, Matsumoto S, Hasegawa S, Okabe H, Nomura A, Yoshibayashi H, Watanabe G, Nagayama S, Fukushima M, *et al.* (2007). Retrospective evaluation of sequential outpatient chemotherapy for advanced gastric cancer. *Chemotherapy* 53: 226-32.

Sawada M, Kanai Y, Arai E, Ushijima S, Ojima H, Hirohashi S (2007). Increased expression of DNA methyltransferase 1 (DNMT1) protein in uterine cervix squamous cell carcinoma and its precursor lesion. *Cancer Lett* 251: 211-9.

Schapira F (1983). DNA methylation and gene expression. *Biomed Pharmacother* 37: 173-5.

Schrump DS, Fischette MR, Nguyen DM, Zhao M, Li X, Kunst TF, Hancox A, Hong JA, Chen GA, Pishchik V, *et al.* (2006). Phase I study of decitabine-mediated gene expression in patients with cancers involving the lungs, esophagus, or pleura. *Clin Cancer Res* 12: 5777-85.

Schuhmacher CP, Fink U, Becker K, Busch R, Dittler HJ, Mueller J, Siewert JR (2001). Neoadjuvant therapy for patients with locally advanced gastric carcinoma with etoposide, doxorubicin, and cisplatin. Closing results after 5 years of follow-up. *Cancer* 91: 918-27.

Scott SA, Lakshimikuttysamma A, Sheridan DP, Sanche SE, Geyer CR, DeCoteau JF (2007). Zebularine inhibits human acute myeloid leukemia cell growth in vitro in association with p15INK4B demethylation and reexpression. *Exp Hematol* 35: 263-73.

Shen H, Wang L, Spitz MR, Hong WK, Mao L, Wei Q (2002). A novel polymorphism in human cytosine DNA-methyltransferase-3B promoter is associated with an increased risk of lung cancer. *Cancer Res* 62: 4992-5.

Siddik ZH (2003). Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 22: 7265-79.

Siegel D, Hussein M, Belani C, Robert F, Galanis E, Richon VM, Garcia-Vargas J, Sanz-Rodriguez C, Rizvi S (2009). Vorinostat in solid and hematologic malignancies. *J Hematol Oncol* 2: 31.

Simon JA, Lange CA (2008). Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. *Mutat Res* 647: 21-9.

Simon JA, Kingston RE (2009). Mechanisms of polycomb gene silencing: knowns and unknowns. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 697-708.

Song J, Noh JH, Lee JH, Eun JW, Ahn YM, Kim SY, Lee SH, Park WS, Yoo NJ, Lee JY, *et al.* (2005). Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer. *APMIS* 113: 264-8.

Song LB, Zeng MS, Liao WT, Zhang L, Mo HY, Liu WL, Shao JY, Wu QL, Li MZ, Xia YF, *et al.* (2006). Bmi-1 is a novel molecular marker of nasopharyngeal carcinoma progression and immortalizes primary human nasopharyngeal epithelial cells. *Cancer Res* 66: 6225-32.

Song W, Tao K, Li H, Jin C, Song Z, Li J, Shi H, Li X, Dang Z, Dou K (2010). Bmi-1 is related to proliferation, survival and poor prognosis in pancreatic cancer. *Cancer Sci* 101: 1754-60.

Sparmann A, van Lohuizen M (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 846-56.

Stemmermann GN (1994). Intestinal metaplasia of the stomach. A status report. *Cancer* 74: 556-64.

Stimson L, La Thangue NB (2009). Biomarkers for predicting clinical responses to HDAC inhibitors. *Cancer Lett* 280: 177-83.

Stresemann C, Brueckner B, Musch T, Stopper H, Lyko F (2006). Functional diversity of DNA methyltransferase inhibitors in human cancer cell lines. *Cancer Res* 66: 2794-800.

Su X, Lv C, Qiao F, Qiu X, Huang W, Wu Q, Zhao Z, Fan H (2010). Expression pattern and clinical significance of DNA methyltransferase 3B variants in gastric carcinoma. *Oncol Rep* 23: 819-26.

Sudo T, Utsunomiya T, Mimori K, Nagahara H, Ogawa K, Inoue H, Wakiyama S, Fujita H, Shirouzu K, Mori M (2005). Clinicopathological significance of EZH2 mRNA expression in patients with hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 92: 1754-8.

Suzuki J, Chen YY, Scott GK, Devries S, Chin K, Benz CC, Waldman FM, Hwang ES (2009). Protein acetylation and histone deacetylase expression associated with malignant breast cancer progression. *Clin Cancer Res* 15: 3163-71.

Suzuki M, Shinohara F, Nishimura K, Echigo S, Rikiishi H (2007). Epigenetic regulation of chemosensitivity to 5-fluorouracil and cisplatin by zebularine in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* 31: 1449-56.

Suzuki T, Tanaka R, Hamada S, Nakagawa H, Miyata N (2010). Design, synthesis, inhibitory activity, and binding mode study of novel DNA methyltransferase 1 inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 20: 1124-7.

Tahara E (2004). Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ*: 327-49.

Tamura G (2006). Alterations of tumor suppressor and tumor-related genes in the development and progression of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 12: 192-8.

Tan HH, Porter AG (2009). p21(WAF1) negatively regulates DNMT1 expression in mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 382: 171-6.

Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, Chen W, Lee PL, Karuturi RK, Tan PB, Liu ET, Yu Q (2007). Pharmacologic disruption of Polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev* 21: 1050-63.

Tang X, Milyavsky M, Shats I, Erez N, Goldfinger N, Rotter V (2004). Activated p53 suppresses the histone methyltransferase EZH2 gene. *Oncogene* 23: 5759-69.

Tate PH, Bird AP (1993). Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 3: 226-31.

Ting AH, Jair KW, Suzuki H, Yen RW, Baylin SB, Schuebel KE (2004). CpG island hypermethylation is maintained in human colorectal cancer cells after RNAi-mediated depletion of DNMT1. *Nat Genet* 36: 582-4.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1992). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* 24: 145-9.

Toyota M, Ahuja N, Suzuki H, Itoh F, Ohe-Toyota M, Imai K, Baylin SB, Issa JP (1999). Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. *Cancer Res* 59: 5438-42.

Uemori T, Asada K, Kato I, Harasawa R (1992). Amplification of the 16S-23S spacer region in rRNA operons of mycoplasmas by the polymerase chain reaction. *Syst Appl Microbiol* 15: 181-186.

Ushijima T, Watanabe N, Shimizu K, Miyamoto K, Sugimura T, Kaneda A (2005). Decreased fidelity in replicating CpG methylation patterns in cancer cells. *Cancer Res* 65: 11-7.

Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M (2004). Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell* 118: 409-18.

Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, Barrette TR, Kumar-Sinha C, Sanda MG, Ghosh D, Pienta KJ, Sewalt RG, Otte AP, et al. (2002). The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature* 419: 624-9.

Vire E, Brenner C, Deplus R, Blanchon L, Fraga M, Didelot C, Morey L, Van Eynde A, Bernard D, Vanderwinden JM, et al. (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439: 871-4.

Vogiatzi P, Vindigni C, Roviello F, Renieri A, Giordano A (2007). Deciphering the underlying genetic and epigenetic events leading to gastric carcinogenesis. *J Cell Physiol* 211: 287-95.

Vonlanthen S, Heighway J, Altermatt HJ, Gugger M, Kappeler A, Borner MM, van Lohuizen M, Betticher DC (2001). The bmi-1 oncoprotein is differentially expressed in non-small cell lung cancer and correlates with INK4A-ARF locus expression. *Br J Cancer* 84: 1372-6.

Wagner N, Holland D, Bulkescher J, Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler K, Zentgraf H, Pritsch M, Buse S, Pfitzenmaier J, Haferkamp A, *et al.* (2008). The enhancer of zeste homolog 2 gene contributes to cell proliferation and apoptosis resistance in renal cell carcinoma cells. *Int J Cancer* 123: 1545-50.

Wagner N, Macher-Goeppinger S, Pritsch M, Husing J, Hoppe-Seyler K, Schirmacher P, Pfitzenmaier J, Haferkamp A, Hoppe-Seyler F, Hohenfellner M (2010). Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression is an independent prognostic factor in renal cell carcinoma. *BMC Cancer* 10: 524.

Walsh CP, Chaillet JR, Bestor TH (1998). Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nat Genet* 20: 116-7.

Wang DF, Helquist P, Wiech NL, Wiest O (2005). Toward selective histone deacetylase inhibitor design: homology modeling, docking studies, and molecular dynamics simulations of human class I histone deacetylases. *J Med Chem* 48: 6936-47.

Wang W, Gao J, Man XH, Li ZS, Gong YF (2009a). Significance of DNA methyltransferase-1 and histone deacetylase-1 in pancreatic cancer. *Oncol Rep* 21: 1439-47.

Wang XQ, Terry PD, Yan H (2009b). Review of salt consumption and stomach cancer risk: epidemiological and biological evidence. *World J Gastroenterol* 15: 2204-13.

Warlick ED, Smith BD (2007). Myelodysplastic syndromes: review of pathophysiology and current novel treatment approaches. *Curr Cancer Drug Targets* 7: 541-58.

Watanabe N, Okochi-Takada E, Yagi Y, Furuta JI, Ushijima T (2006). Decreased fidelity in replicating DNA methylation patterns in cancer cells leads to dense methylation of a CpG island. *Curr Top Microbiol Immunol* 310: 199-210.

Weber M, Hellmann I, Stadler MB, Ramos L, Paabo S, Rebhan M, Schubeler D (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet* 39: 457-66.

Weichert W, Roske A, Gekeler V, Beckers T, Ebert MP, Pross M, Dietel M, Denkert C, Rocken C (2008a). Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis. *Lancet Oncol* 9: 139-48.

Weichert W, Roske A, Niesporek S, Noske A, Buckendahl AC, Dietel M, Gekeler V, Boehm M, Beckers T, Denkert C (2008b). Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 14: 1669-77.

Weichert W, Denkert C, Noske A, Darb-Esfahani S, Dietel M, Kalloger SE, Huntsman DG, Kobel M (2008c). Expression of class I histone deacetylases indicates poor prognosis in endometrioid subtypes of ovarian and endometrial carcinomas. *Neoplasia* 10: 1021-7.

Weichert W, Roske A, Gekeler V, Beckers T, Stephan C, Jung K, Fritzsche FR, Niesporek S, Denkert C, Dietel M, *et al.* (2008d). Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. *Br J Cancer* 98: 604-10.

Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I (2009). HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* 277: 8-21.

Worsham MJ, Chen KM, Meduri V, Nygren AO, Errami A, Schouten JP, Benninger MS (2006). Epigenetic events of disease progression in head and neck squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 132: 668-77.

Wu H, Chen Y, Liang J, Shi B, Wu G, Zhang Y, Wang D, Li R, Yi X, Zhang H, *et al.* (2005). Hypomethylation-linked activation of PAX2 mediates tamoxifen-stimulated endometrial carcinogenesis. *Nature* 438: 981-7.

Wu WK, Cho CH, Lee CW, Fan D, Wu K, Yu J, Sung JJ (2010). Dysregulation of cellular signaling in gastric cancer. *Cancer Lett* 295: 144-53.

Xiao J, Deng C (2009). Knockdown of Bmi-1 impairs growth and invasiveness of human gastric carcinoma cells. *Oncol Res* 17: 613-20.

Yamashita S, Tsujino Y, Moriguchi K, Tatematsu M, Ushijima T (2006). Chemical genomic screening for methylation-silenced genes in gastric cancer cell lines using 5-aza-2'-deoxycytidine treatment and oligonucleotide microarray. *Cancer Sci* 97: 64-71.

Yang GF, He WP, Cai MY, He LR, Luo JH, Deng HX, Guan XY, Zeng MS, Zeng YX, Xie D (2010). Intensive expression of Bmi-1 is a new independent predictor of poor outcome in patients with ovarian carcinoma. *BMC Cancer* 10: 133.

Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, Naka K, Kuniyasu H, Tahara E (2000). Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach. *J Gastroenterol* 35 Suppl 12: 111-5.

Yokozaki H (2000). Molecular characteristics of eight gastric cancer cell lines established in Japan. *Pathol Int* 50: 767-77.

Yonemura Y, Ninomiya I, Ohoyama S, Kimura H, Yamaguchi A, Fushida S, Kosaka T, Miwa K, Miyazaki I, Endou Y, *et al.* (1991). Expression of c-erbB-2 oncoprotein in gastric carcinoma. Immunoreactivity for c-erbB-2 protein is an independent indicator of poor short-term prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 67: 2914-8.

Yoo CB, Cheng JC, Jones PA (2004). Zebularine: a new drug for epigenetic therapy. *Biochem Soc Trans* 32: 910-2.

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

Zhang X, Yashiro M, Ren J, Hirakawa K (2006a). Histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, increases the chemosensitivity of anticancer drugs in gastric cancer cell lines. *Oncol Rep* 16: 563-8.

Zhang X, Yashiro M, Ohira M, Ren J, Hirakawa K (2006b). Synergic antiproliferative effect of DNA methyltransferase inhibitor in combination with anticancer drugs in gastric carcinoma. *Cancer Sci* 97: 938-44.

Zhou L, Cheng X, Connolly BA, Dickman MJ, Hurd PJ, Hornby DP (2002). Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *J Mol Biol* 321: 591-9.

Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Gottlicher M (2004). Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* 5: 455-63.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

5-FU	5-Fluorouracil
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxidisulfat
Aqua bidest.	Doppelt destilliertes, vollentsalztes Wasser
BMI-1	<i>B-cell-specific molony murine leukemia virus integration site 1</i>
Bromphenolblau	Tetrabromphenolsulfonphthalein
bp	<i>base pair</i> (Basenpaar)
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserum-Albumin)
°C	Grad Celsius
CDH1	E-Cadherin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CI	Konfidenzintervall
CIMP	<i>CpG island methylator phenotype</i>
Ct	<i>Cycle Threshold</i> (Schwellenwert Zyklus)
DAC	5-Aza-2'-deoxycytidin
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiothreitol
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)
DNMT	DNA-Methyltransferase
dNTP	<i>deoxynucleotide triphosphate</i> (Desoxynukleosidtriphosphat)
DPD	Dihydropyrimidin-Dehydrogenase
dTMP	Desoxythimidin-Monophosphat
dUMP	Desoxyuridin-Monophosphat
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i> (Chemilumineszenz-Substrat)
ECACC	<i>European Collection of Cell Culture</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> (Ethylenediamintetraessigsäure)
EGFR	epidermal growth factor receptor
ERCC1	<i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 1</i>
ERCC2	<i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 2</i>
ERCC4	<i>Excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 4</i>
et al.	et alii (und andere)
EZH2	<i>enhancer of zeste homolog 2</i>
FAP	Familiäre Adenomatöse Polyposis
FCS	<i>fetal calf serum</i> (Fötales Kälberserum)
FDA	<i>US Food and Drug Administration</i>
FdUMP	5-Fluoro-2-desoxyuridin-Monophosphat
FFPE	formalin-fixed and paraffin-embedded
Fw	<i>forward</i> (forwärts)
FRET	Förster-Resonanzenergietransfers
g	Gramm

GADD45	<i>growth arrest and DNA-damage inducible</i>
h	Stunde(n)
HAT	Histonacetyltransferase
HCl	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylase
HDGC	<i>Hereditary-Diffuse-Type Gastric Cancer Syndrome</i>
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
hMLH1	<i>human mutL homolog 1</i>
hMLH2	<i>human mutL homolog 2</i>
hMSH4	<i>human MutS homolog 6</i>
HNPCC	hereditäres non-polypöses Kolonkarzinom
IC ₂₀ /IC ₅₀ /IC ₇₀	<i>Inhibitory Concentration 20 bzw. 50 bzw. 70</i>
IHC	Immunhistochemie
k	Kilo-
l	Liter
LINES	<i>long interspersed elements</i>
LOH	<i>loss of heterozygosity</i>
μ	mikro
m	Milli, Meter
M	molar
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
min	Minute
MMR	<i>Mismatch-Reparatur</i>
MSI	Mikrosatelliteninstabilität
MS-MLPA	<i>methylation specific multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MW	<i>Molecular Weight</i> (Molekulargewicht)
n	Nano-
Na	Natrium
NCI	<i>National Cancer Institute</i> (USA)
NER	Nukleotid-Exzisions-Reparatur
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
p	Pico-
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaktion</i> (Polymerasekettenreaktion)
PCR1	<i>polycomb repressive complex 1</i>
PCR2	<i>polycomb repressive complex 2</i>
PK	Proteinase K
PMS	Phenazinmethosulfat
Rev	<i>reverse</i> (rückwärts)
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> (Ribonukleinsäure)
rpm	<i>rounds per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SAHA	<i>Suberoylanilide hydroxamic acid</i> (Suberoylanilide-Hydroxamsäure)
SAM	S-Adenosylmethionin
SDS	Dimethylsulfoxid
shRNA	<i>short hairpin</i> RNA
SI	<i>Staining Index</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
ToGA	<i>Trastuzuman for Gastric Cancer</i>
TP	Thymidinphosphorylase
Tris	Tris (hydroxymethyl-) aminomethan
TS	Thymidylatsynthase
Tween 20	Polyoxyethylen Sorbitan-monolaurat
U	<i>enzyme activity unit</i>
UICC	<i>Union internationale contre le cancer</i> (Internationale Vereinigung gegen Krebs)
ÜN	über Nacht
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenprozent)
VPA	2-Propylpentansäure oder Valproinsäure
WHO	<i>World Health Organisation</i> (Weltgesundheitsorganisation)
w/v	<i>weights per volume</i> (Gewichtsprozent)
XTT	2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilid
ypM	pathologische Beurteilung des Metastasestatus nach Chemotherapie
ypN	pathologische Beurteilung des Lymphknotenstatus nach Chemotherapie
ypT	pathologische Beurteilung der Ausdehnung des Primärtumors nach Chemotherapie

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1.1:	Genetische Alterationen des Magenkarzinoms.	8
Abb. 1.2:	Strukturformeln der in der neoadjuvanten Chemotherapie des Magenkarzinoms eingesetzten Zytostatika Cisplatin und 5-FU	10
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung der Umwandlung von Cytosin in 5-Methylcytosin durch eine DNA-Methyltransferase	13
Abb. 1.4:	Methylierungsassoziiertes Modell der Genstilllegung	15
Abb. 1.5:	Histonmodifikationen in normalen Zellen und Tumorzellen	17
Abb. 1.6:	Struktur der humanen DNA-Methyltransferasen	19
Abb. 1.7:	DNA-Methyltransferase-Inhibitoren. Strukturformeln von Decitabin und Zebularin	24
Abb. 1.8:	Histondeacetylase-Inhibitoren. Strukturformeln von VPA und SAHA	25
Abb. 2.1:	Morphologie der Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und KATOIII	30
Abb. 2.2:	Karte des Vektorgrundgerüsts pLKO.1-puro von Sigma Aldrich	31
Abb. 3.1:	Funktionsweise von <i>TaqMan</i> [®] -Sonden	60
Abb. 3.2:	Schematische Darstellung der Quantifizierung spezifischer cDNA durch die Ermittlung des Ct-Wertes	61
Abb. 3.3:	Standradkurven für DNMT1 und DNMT3b zur Quantifizierung in der Real Time PCR	62
Abb. 3.4:	Schematische Darstellung des MS-MLPA-Tests	65
Abb. 4.1:	Kaplan-Meier Überlebenskurven des Patientenkollektivs	75
Abb. 4.2:	Expression der Histondeacetylasen 1 und 2 in Magenkarzinombiopsien	76
Abb. 4.3:	Kaplan-Meier Analyse für die Expression der Histondeacetylasen	79
Abb. 4.4:	Kaplan-Meier Analyse für die Expression von HDAC1 in den Subgruppen der Responder und Nonresponder	80
Abb. 4.5:	HDAC1-Expression in Resektaten bezogen auf die Expression in den korrespondierenden Biopsien	82
Abb. 4.6:	Expression der DNA-Methyltransferasen 1 und 3b in Magenkarzinombiopsien	83
Abb. 4.7:	Graphische Darstellung der Assoziation von hoher DNMT1-Expression mit schlechterem histopathologischen und klinischen Ansprechen.	86

Abb. 4.8: Kaplan-Meier Analyse für die Expression der DNA-Methyltransferasen	87
Abb. 4.9: Expression der Polycombproteine BMI-1 und EZH2 in Magenkarzinom- biopsien	90
Abb. 4.10: Kaplan-Meier Analyse für die Expression der Polycombproteine	93
Abb. 4.11: Proliferation der Magenkarzinomzelllinien MKN28, MKN45, AGS und KATOIII	95
Abb. 4.12: Prozentualer Anteil an Veränderungen der Methylierung und der Kopienzahl in Magenkarzinomzelllinien	96
Abb. 4.13: Dosis-Wirkungskurven und IC ₅₀ für Cisplatin und 5-FU	99
Abb. 4.14: Dosis-Wirkungskurven und IC ₅₀ für die HDAC-Inhibitoren SAHA und VPA	101
Abb. 4.15: Zellviabilität nach Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und SAHA	103
Abb. 4.16: Expression von HDAC1 und HDAC2 in Magenkarzinomzelllinien	105
Abb. 4.17: Dosis-Wirkungskurven und IC ₅₀ für die DNMT-Inhibitoren DAC und Zebularin	106
Abb. 4.18: Zellviabilität nach Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und DAC	108
Abb. 4.19: Expression von DNMT1 in Magenkarzinomzelllinien	110
Abb. 4.20: Expression von DNMT3b in Magenkarzinomzelllinien	111
Abb. 4.21: Einfluss der Behandlung mit DNMT-Inhibitoren auf die Methylierungs- rate	116
Abb. 4.22: DNMT1 Proteinexpression nach der Behandlung mit dem DNMT-Inhibitor DAC	117
Abb. 4.23: Expression von DNMT1 nach Herabregulation in AGS Zellen	119
Abb. 4.24: Proliferation der DNMT1-Knockdownzellen C, sh1, sh2 und sh3	120
Abb. 4.25: Einfluss der DNMT1-Herabregulation auf die Chemosensitivität gegenüber Cisplatin	121
Abb. 4.26: Einfluss der DNMT1-Herabregulation auf die Chemosensitivität gegenüber 5-FU	122
Abb. 4.27: Zellviabilität nach Kombinationsbehandlung mit Cisplatin und DAC in Zellen mit herabregulierter DNMT1-Expression	123
Abb. 4.28: Einfluss einer DAC-Behandlung auf die Methylierungsrate in Zellen mit herabregulierter DNMT1-Expression	124

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 2.1:	Sequenzen der verwendeten shRNA Inserts _____	32
Tab. 2.2:	Sequenzen der Primer für den Nachweis von Mycoplasmen (Uemori et al. 1992) _____	34
Tab. 2.3:	Sequenzen der Primer für den Nachweis PDHB (Grillo et al., 1990) _____	34
Tab. 2.4:	Primer und Sonden für die quantitative Real Time PCR _____	34
Tab. 2.5:	Primer für die direkte Sequenzierung _____	34
Tab. 2.6:	Übersicht über die verwendeten Zytostatika-Stocklösungen _____	38
Tab. 3.1:	Übersicht über die optimalen Bedingungen für den immunhistochemischen Antigennachweis _____	45
Tab. 3.2:	Übersicht über die möglichen Wertungen zur Bestimmung des Staining Index _____	46
Tab. 3.3:	Definition von hoher und niedriger Proteinexpression für die immunhistochemische Färbung von Tumorproben _____	47
Tab. 3.4:	Ansatz für die PCR 1 zum Nachweis von Mycoplasmen _____	49
Tab. 3.5:	Übersicht über die Produktlängen beim Nachweis verschiedener Mycoplasmenstämme _____	50
Tab. 3.7:	Inkubationszeiten und Zytostatika-Konzentrationen der Dosis-Wirkungs-Kurven _____	52
Tab. 3.8:	Kombinationsschemata für eine Kombination von Cisplatin mit DAC bzw. SAHA _____	54
Tab. 3.9:	PCR Ansatz zu Überprüfung der cDNA-Synthese _____	58
Tab. 3.10:	Übersicht über die im SALSA® MS-MLPA® KIT enthaltenen Sonden _____	66
Tab. 3.11:	Standardkurve für die Proteinbestimmung nach Bradford _____	69
Tab. 3.12:	Schema zu Herstellung von Trenn- und Sammelgelen _____	70
Tab. 3.13:	Übersicht über die Bedingungen des Antikörpergebrauchs beim Western Blot _____	72
Tab. 4.1:	Übersicht über die Patientencharakteristika des Kollektivs _____	74
Tab. 4.2:	Übersicht über die Assoziation von klinisch-pathologischen Parametern mit der HDAC1- und HDAC2-Expression _____	77
Tab. 4.3:	Verteilung der Responder und Nonresponder in den Patientengruppen mit hoher und niedriger HDAC1- bzw. HDAC2-Expression _____	78

Tab. 4.4:	Medianes Überleben und relatives Risiko der Patienten mit niedriger und hoher HDAC1- bzw. HDAC2-Expression_____	78
Tab. 4.5:	Übersicht über die Assoziation von klinisch-pathologischen Parametern mit der DNMT1- und DNMT3b-Expression_____	84
Tab. 4.6:	Verteilung der Responder und Nonresponder in den Patientengruppen mit hoher und niedriger DNMT1 bzw. DNMT3b-Expression _____	85
Tab. 4.7:	Medianes Überleben und relatives Risiko der Patienten mit niedriger und hoher DNMT1- bzw. DNMT3b-Expression _____	87
Tab. 4.8:	Multivariate Analyse der signifikant mit dem Überleben assoziierten Parameter unter Verwendung der Cox-Regression _____	88
Tab. 4.9:	Übersichtstabelle zu Assoziation der DNMT-Expression mit dem Methylierungsstatus in prätherapeutischen Biopsien _____	89
Tab. 4.10:	Übersicht über die Assoziation von klinisch-pathologischen Parametern mit der BMI-1 und EZH2-Expression_____	91
Tab. 4.11:	Verteilung der Responder und Nonresponder in den Patientengruppen mit hoher und niedriger BMI-1 bzw. EZH2-Expression _____	92
Tab. 4.12:	Medianes Überleben und relatives Risiko der Patienten mit niedriger und hoher BMI-1- bzw. EZH2-Expression_____	92
Tab. 4.13:	Übersicht über die mit dem MS-MLPA Test ermittelten Veränderungen der Methylierung (n=24) und der Kopienzahl (n=39) der getesteten Gene in Magenkarzinomzelllinien_____	97
Tab. 4.14:	Übersicht über die IC ₅₀ Werte für Cisplatin und 5-FU_____	99
Tab. 4.15:	Übersicht über die IC ₅₀ Werte für die HDAC-Inhibitoren _____	101
Tab. 4.16:	Berechnung des Kombinations-Index (CI) für die Kombination von Cisplatin und SAHA _____	103
Tab. 4.17:	Übersicht über die IC ₅₀ Werte für die DNMT-Inhibitoren_____	107
Tab. 4.18:	Berechnung des Kombinations-Index (CI) für die Kombination von Cisplatin und DAC _____	108
Tab. 4.19:	Methylierungsrate der Zelllinie MKN28 nach der Behandlung mit DAC__	112
Tab. 4.20:	Methylierungsrate der Zelllinie MKN28 nach der Behandlung mit Zebularin _____	113
Tab. 4.21:	Methylierungsrate der Zelllinie AGS nach der Behandlung mit DAC_____	114
Tab. 4.22:	Methylierungsrate der Zelllinie AGS nach der Behandlung mit Zebularin	115

PUBLIKATIONEN

Teile dieser Arbeit wurden publiziert:

Mutze K, Langer R, Becker K, Ott K, Novotny A, Lubert B, Hapfelmeier A, Göttlicher M, Höfler H, Keller G. *Histone Deacetylase (HDAC) 1 and 2 Expression and Chemotherapy in Gastric Cancer*. Annals of Surgical Oncology. 2010; 17: 3336-3343

Mutze K, Langer R, Schumacher F, Becker K, Ott K, Novotny A, Hapfelmeier, Höfler H, Keller G. *DNA-Methyltransferase 1 as a predictive biomarker and potential therapeutic target for chemotherapy in gastric cancer*. European Journal of Cancer. 2011; 47: 1817-1825

Teile dieser Arbeit wurden präsentiert:

Vortrag

Mutze K, Langer R, Ott K, Becker K, Lubert B, Höfler H, Keller G. *Bedeutung der DNA-Methyltransferase 1 für neoadjuvant chemotherapierte Magenkarzinome*.

93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 04.-07. 2009 Juni in Freiburg

Poster

Mutze K, Langer R, Ott K, Becker K, Novotny A, Höfler H, Keller G. *DNA Methyltransferase 1 (DNMT1) and Chemotherapy in Gastric Cancer*.

4th Mildred Scheel Cancer Conference, 19.-21. Mai 2010 in Königswinter

Poster

Mutze K, Langer R, Ott K, Becker K, Novotny A, Höfler H, Keller G. *Histone deacetylase 1 and 2 expression in neoadjuvant treated locally advanced gastric cancer: prognostic and predictive value*.

93. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie, 27.-30. Mai 2010 in Berlin

DANKSAGUNG

Ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Gisela Keller, unter deren Anleitung diese Arbeit entstanden ist. Ich danke ihr zum einen für die interessante Themenstellung, vor allem aber für ihre uneingeschränkte Unterstützung, ihre stete Diskussionsbereitschaft und ihre wertvollen Hinweise und Anregungen, die entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Herrn Prof. Dr. Adelbert Bacher möchte ich an dieser Stelle für seine Bereitschaft danken, die Doktorarbeit als Erstprüfer zu bewerten.

Herrn Prof. Dr. Michael Groll und Frau Prof. Dr. Sevil Weinkauff danke ich für das Einverständnis als weiterer Prüfer bzw. als Vorsitzende der Prüfungskommission zu fungieren.

Herrn Prof. Dr. Heinz Höfler danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie anfertigen zu dürfen.

Bedanken möchte ich mich ganz herzlich bei PD Dr. Rupert Langer, für die Unterstützung bei histologischen sowie pathologischen Fragen und für die zweite Meinung bei den umfangreichen immunhistochemischen Auswertungen.

Vielen Dank an Susanne Plaschke, auf deren Hilfe ich immer zählen konnte, egal ob es um das Schneiden von Tumorblöcken oder das Arbeiten am Sequenzer ging.

Ich möchte Felix Schumacher danken, der in Rahmen seiner Masterarbeit zu diesem Projekt beigetragen hat.

Vielen Dank auch an Alexander Hapfelmeier, für die Beratung in statistischen Fragen.

Allen Mitarbeitern der Pathologie, ehemaligen wie aktuellen, danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft und Kollegialität. Vor allem aber möchte ich mich bei Joëlle, Stefan, Susi, Anja, Rita, Catharina, Susanne, Evi, Simone, Claudia, Katharina und ganz besonders bei Lukas bedanken, für diverse fachliche Diskussionen und für all den Spaß innerhalb wie außerhalb des Labors. Claudia, Katharina und Lukas danke ich außerdem für die große Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Ein herzlicher Dank geht an meine Freunde, die mir in den letzten Jahren nicht nur ein wichtiger Rückhalt waren, sondern auch für die nötige *Work-Life-Balance* gesorgt haben.

Mein ganz besonderer Dank geht an meinen Freund Ilian, für seine stete Unterstützung, sein Verständnis und für all den Zuspruch und die vielen Aufmunterungen während des Studiums und der Doktorarbeit.

Mein größter Dank geht an meine Familie, an meine Schwester Nina, die immer für mich da ist, vor allem aber an meine Eltern, die mich, seit ich denken kann, vorbehaltlos unterstützt und mir so viel ermöglicht haben. DANKE!