



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Einfluss ernährungsrelevanter Faktoren auf epigenetische Regulatoren
und Genexpression im Caco-2 Zellmodell

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Naturwissenschaften (Mag. rer.nat.)

Verfasserin:	Karoline Kubala
Matrikel-Nummer:	0203971
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Univ-Doz. Dr. Alexander Haslberger

Wien, am Dezember 2008

DANKSAGUNG

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle Herrn Univ. –Doz. Dr. Alexander Haslberger, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, dieses interessante Diplomarbeitsthema in seiner Arbeitsgruppe durchzuführen. Ich bedanke mich für die geduldige Unterstützung und Bewältigung meiner Arbeit.

Weiters bedanke ich mich bei allen Kollegen der Arbeitsgemeinschaft für ein gutes Arbeitsklima und viele neue Freundschaften. Die Zusammenarbeit und die konstruktiven Gespräche haben mich bei meiner Arbeit sehr unterstützt.

Herrn Mag. Roman Thaler danke ich für die Betreuung dieser Arbeit und das Erlernen wertvoller wissenschaftlicher Grundkenntnisse. Er hat sehr viel Zeit und Mühe für meine Fragen und Probleme aufgebracht.

Frau Mag. Jutta Zwieler danke ich als Studienkollegin und Freundin für ihre geduldige Hilfestellung in kritischen Situationen.

Einen herzlichen Dank gilt meinen Eltern und meinem Bruder für ihre uneingeschränkte emotionale Unterstützung und die mir während meiner gesamten Studienzzeit stets zur Seite standen.

Vielen Dank auch an meine Freunde, die trotz meiner Höhen und Tiefen immer noch meine Freunde sind.

INHALTSVERZEICHNIS

VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN		IV
VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN		V
VERZEICHNIS DER TABELLEN		VI
1	EINLEITUNG	1
2	FRAGESTELLUNG	2
3	LITERATURÜBERBLICK	3
3.1	Epigenetik	3
3.2	Epigenetik und Ernährung	6
3.3	Epigenetik und Kanzerogenese	8
3.4	Modifikationen der Epigenetik	9
3.4.1	Genomic Imprinting	9
3.4.2	DNA-Methylierung	10
3.4.2.1	Demethylierungstransferasen	14
3.4.2.2	DNA Methylierungsinhibitor	14
3.4.3	Histonmodifikation	16
3.4.3.1	Histondeacetylasen	20
3.4.3.2	Histondeacetylase-Inhibitor	22
3.4.4	siRNA	23
3.5	Regulatorische Proteine	24
3.5.1	Regulatorische Proteine in der Methylierungs- und Histonmodifikation	24
3.5.1.1	DNA Methyltransferase1	24
3.5.1.2	DNA Methyltransferase3a und -3b	24
3.5.1.3	Histondeacetylase2	25
3.5.2	Proteine mit bekannter epigenetischer Steuerung	25
3.5.2.1	Insulin-like growth factor 2 receptor	25
3.5.2.2	E-cadherin	25
3.5.2.3	Interleukin-8	26
3.5.2.4	Mangan Superoxid Dismutase	27

3.5.3	Housekeeping Gen	28
3.5.3.1	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase	28
4	MATERIAL UND METHODEN	29
4.1	Probengewinnung und Probenkonservierung	29
4.1.1	Caco-2 Zellkulturlinie	29
4.1.2	Inkubation der Zellen	29
4.2	RNA Aufbereitung	31
4.2.1	RNA-Isolierung	31
4.2.2	RNA-Extraktion	31
4.2.3	Reverse Transkription der RNA in cDNA	32
4.3	PCR	33
4.3.1	Prinzip der PCR Methode	33
4.4	Real-Time PCR	36
4.4.1	Auswertung der quantitativen Real-Time PCR	36
4.5	Real-Time PCR-Konditionen	40
4.6	Agarose Gelelektrophorese	43
5	ERGEBNISSE	44
5.1	Ergebnisse der Genexpression	46
5.1.1	Interleukin-8	46
5.1.2	Histondeacetylase-2	47
5.1.3	DNA Methyltransferase-1	48
5.1.4	DNA Methyltransferase-3a	48
5.1.5	DNA Methyltransferase-3b	48
5.1.6	Mangan Superoxid Dismutase	49
5.1.7	E-Cadherin	49
5.1.8	Insulin-like growth factor 2 receptor	49
6	DISKUSSION	50
7	SCHLUSSBETRACHTUNG	53

8	ZUSAMMENFASSUNG	54
9	SUMMARY	56
10	LITERATURVERZEICHNIS	57
	ANHANG	

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ATP	Adenosintriphosphat
cDNA	Komplementäre DNA
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA	Desoxiribonucleic acid
DNMT	DNA-Methyltransferasen
dsRNA	Doppelsträngige RNA
G6PD	Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histondeacetylasen
HMT	Histonmethyltransferase
IGF	Insulin-like growth factor
Igf2r	Insulin-like growth factor 2 receptor
IL-8	Interleukin-8
LPS	Lipopolysaccharide
MBD	Methyl-CpG-binding Proteine
MnSOD	Mangan Superoxid Dismutase
mRNA	Messenger RNA
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
PBS	Phosphate Buffered Saline
PPP	Pentose-Phosphat-Pathway
RDR	RNA-polymeraseabhängige RNA
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reaktive Sauerstoffspezie
RT-PCR	Real time PCR
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
siRNA	Einzelsträngige RNA
TM	Transmembran-Domäne
VPA	Valproat

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<i>Abbildung 3.1: Auswirkung individueller oder zusammenhängender epigenetischer und genetischer Änderungen.</i>	4
<i>Abbildung 3.2: veränderte DNA-Methylierung in der Tumorgenese.</i>	8
<i>Abbildung 3.3: Methylierte DNA</i>	10
<i>Abbildung 3.4: DNA-Methylierung</i>	10
<i>Abbildung 3.5: CpG-Islands</i>	11
<i>Abbildung 3.6: Methylierungsweg</i>	13
<i>Abbildung 3.7: Strukturformel Zebularine</i>	15
<i>Abbildung 3.8: Epigenetische Therapie basierend auf Demethylierung hypermethylierter Promotorregionen von „silenced“ Genen.</i>	15
<i>Abbildung 3.9: Darstellung eines Nukleosoms</i>	16
<i>Abbildung 3.10: Histonmodifikationen mit ihren Enzymen</i>	17
<i>Abbildung 3.11: Epigenetische Modifikationen der Chromatinstruktur beeinflussen die Genexpression.</i>	18
<i>Abbildung 3.12: Darstellung der aus- oder eingeschalteten Gene</i>	18
<i>Abbildung 3.13: Aktivität der Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen</i>	19
<i>Abbildung 3.14: Chromatinstrukturveränderung</i>	20
<i>Abbildung 3.15: Diätetische Einflussfaktoren auf Histonmodifikationen und deren In- oder Aktivierung des Chromatins</i>	21
<i>Abbildung 3.16: Strukturformel von Valproat</i>	22
<i>Abbildung 3.17: Darstellung von E-cadherin</i>	26
<i>Abbildung 3.18: Verschiedene Faktoren einer Entzündung und sein Einfluss in der Tumorgenese</i>	27
<i>Abbildung 4.1: 6-Wells Platte</i>	30
<i>Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Zyklen</i>	34
<i>Abbildung 4.3: Ablauf der einzelnen PCR Schritte</i>	35
<i>Abbildung 4.4: Darstellung einer quantitativen PCR Amplifikation</i>	37
<i>Abbildung 4.5: Beispiel einer Schmelzkurve-Analyse</i>	37
<i>Abbildung 4.6: Standardgerade der Amplikons</i>	39
<i>Abbildung 4.7: Agarosegel unter der UV-Lampe</i>	43
<i>Abbildung 5.1: IL-8 Expression</i>	47

TABELLENVERZEICHNIS

<i>Tabelle 4.1: RT-PCR Mix</i>	33
<i>Tabelle 4.2: verwendete Primersequenzen</i>	40
<i>Tabelle 4.3: verwendete Primerkonzentrationen mit spezifischer Annealing Temperatur</i>	41
<i>Tabelle 4.4: RT-PCR Mastermix</i>	42
<i>Tabelle 5.1: Korrelation zwischen Primer und Referenzgen</i>	45
<i>Tabelle 5.2: Korrelation zwischen bereits ausgewertetem Referenzgen zur Kontrolle</i>	45

1 EINLEITUNG

Immer mehr Zivilisationskrankheiten werden mit Ernährung in Verbindung gebracht, wie Koronarerkrankungen (Herzinfarkt und Atherosklerose), Diabetes Mellitus, Gicht, Anämien, Osteoporose, Übergewicht uvm.

Beobachtungen zeigten auch einen Zusammenhang von Krebserkrankungen in Folge von Ernährungseinflüssen. Japaner, die in die USA auswanderten, hatten eine weit höhere Wahrscheinlichkeit an Magenkrebs zu erkranken als ihre Landsleute in Japan. Auch die in den USA lebenden Afroamerikaner erleiden häufiger an Darmkrebs als die genetisch identische indigene Bevölkerung in Westafrika (Elmadfa und Leitzmann 1998).

Rund ein Drittel aller diagnostizierter Krebserkrankungen wird mit falscher Ernährung in Verbindung gebracht. Hinzu kommen Risikofaktoren wie erhöhter Alkoholkonsum, Übergewicht und Fettzufuhr, die bei Frauen eine höhere Brustkrebsrate verursachen, während bei Männern, bedingt durch einen gesteigerten Konsum an kalziumreichen Lebensmitteln wie Milch und Milchprodukte, diese das Risiko an Prostata zu erkranken, erhöht. Krebs stellt mit 20 % nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen mit 50 % die zweithäufigste Todesursache in Österreich dar (Krebshilfe-Krebsgesellschaft 2008). Im Jahr 2000 erkrankten etwa 35.000 Österreicher an bösartigen Neubildungen (Hackl 2004).

Ernährungsabhängige Faktoren können neben der Genexpression tumorrelevanter Gene auch epigenetische Regulatoren beeinflussen, welche stark regulierend auf Erkrankungen wirken.

Lebensmittelinhaltsstoffe mit deren regulierenden Effekten werden in der vorliegenden Arbeit anhand des Caco-2 Zellmodells untersucht.

2 FRAGESTELLUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Zellmodell zu etablieren und zu erstellen, welches Analysen ausgewählter Markern mit anzunehmender epigenetischer Regulierung enthält. Als Testsubstanzen wurden Zebularine, Valproat, LPS und als Lebensmittelinhaltsstoffe Folsäure, Vitamin B12, Genistein und Homocystein eingesetzt. Es galt, die Regulationsmechanismen der ausgesuchten Proteine auf die Genexpression anhand dieser Substanzen zu untersuchen.

Folgende Frage wird versucht, in dieser Arbeit beantwortet zu werden:

- Ist es möglich, ein Zellmodell als Nachweis ernährungsrelevanter Faktoren auf epigenetische Regulatoren und Genexpression zu verwenden?

Analysiert wurden:

1. die Genexpression der Demethylierungstransferasen (DNMT1, 3a, 3b)
2. die Genexpression der Histondeacetylase (HDAC2)
3. die Genexpression des Insulin-like growth factor 2 receptor (Igf2r)
4. die Genexpression des Zelladhäsionsmoleküls (E-cadherin)
5. die Genexpression des Entzündungsmarker (IL-8)
6. die Genexpression des Entgiftungsmarkers (MnSOD)
7. die Genexpression des Referenzgenes (G6PD)

Diese Ergebnisse mit den dazu gehörigen Methoden sollen zukünftig eine Basis individueller Austestung einer begleitenden Therapie mit ernährungsphysiologischen Modifikationen von Methylierungsmustern bei der Tumorgenese (z.B.: diätetische Maßnahmen) bieten.

Sie können desweiteren auch als Anlehnung einer restriktiven Diät an einem Mausmodell verwendet werden.

3 LITERATURÜBERBLICK

3.1 Epigenetik

„Genetik ist die Lehre von der Vererbung. Sie beschäftigt sich mit dem Vorgang, bei dem Merkmale von den Eltern an die Nachkommen weitergegeben werden, so dass alle Lebewesen einschließlich des Menschen ihren Vorfahren ähneln“ (Brown 1993).

Die Genetik ist damit beschäftigt, zu erläutern, welche Einflüsse (wie etwa Strahlen, chemische Substanzen) dazu führen, dass Gene mutieren, während die Epigenetik die Einflüsse regulatorischer Auswirkungen auf die Genexpression zum Ziel hat.

Bei der Epigenetik werden Vererbungen und Funktionen der Gene anhand von Modifikationen von Nukleotiden und stabilen Chromatinstrukturen vorgegeben. Anders als bei der Genetik, die durch DNA-Sequenzen bestimmt wird (Schuster 2007).

Epigenetik ist ein schnell wachsender Bereich der Forschung, der sehr großes Interesse mit sich bringt und wird erstmals von Conrad Waddington 1942 als „der Entwicklungsprozess eines Genotyps zu einem Phänotyp“ bezeichnet. Heute wird Epigenetik als „die Vererbung von Informationen basierend auf Genexpression statt auf Gensequenzen“ beschrieben (Junien 2006).

Epigenetik beinhaltet alle Vorgänge, die sich „epi“ – d. h. neben oder über der DNA abspielen, d.h. nicht die Anreihung der Gene oder die Sequenz wird untersucht, sondern ob und wann Gene ein- oder ausgeschaltet werden.

Die Aktivierung einer kodierten Information in einem Gen führt zu einem bestimmten Prozess in der Zelle, welcher für die Ausprägung eines Merkmals (Phänotyps) für ein Individuum unentbehrlich ist (Schuster 2007).

Das Ziel der Epigenetik ist es herauszufinden, welche schaltenden Moleküle, Signale und Eiweiße einer Zelle eine regulatorische Auswirkung auf eine „Genaktivierung“ – bekannt auch als „Genexpression“ – hervorrufen (Roloff und Nuber 2005).

Die Genexpression hängt von zwei Codetypen ab. Zum einen der bekannte „genetische Code“, welcher jene informationsübertragenden 30.000 Gene (etwa 3 Milliarden Basenpaare der DNA) komprimiert. Zum anderen der „epigenetische Code“ welcher

in allen Gewebearten mit den selben 30.000 Genen enthalten ist, doch nur ein Teil dieser Gene wird exprimiert und entwickelt den Phänotyp (Junien 2006).

Diese epigenetischen Veränderungen bestimmen jene Eigenschaften der Mutter und des Vaters, welche weiter vererbt werden. Gensilencing (= das nicht Ablesen eines Genes), durch epigenetische Steuerung verursacht, wird sehr stark im Bereich der Entstehung von Tumorgenese verfolgt (Lehen-Bevel 2003).

Untersuchungen zeigen, dass differenzierte Zellen ebenfalls ihre Genexpression und lokale Chromatinstruktur durch äußere Reize wie Ökologie und Ernährung (Abb.: 3.1) verändern können. Genexpressionsregulierende Mechanismen sind unter anderem Chromatinstrukturveränderungen, DNA-Methylierung, veränderte Histonmodifikationen uvm (Roloff und Nuber 2005).

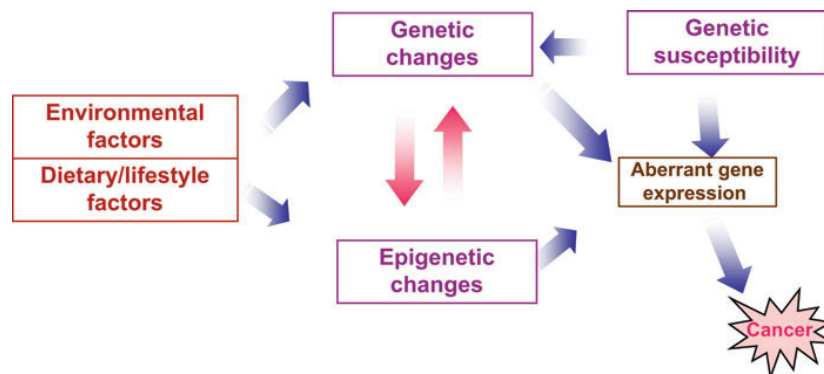


Abbildung 3.1: Auswirkung individueller oder zusammenhängender epigenetischer und genetischer Änderungen bedingt durch ökologische, ernährungsabhängige Faktoren, Lebensstil (Rauchen, Stress) (Herceg 2007).

Die Epigenetik ist nicht nur an der Kanzerogenese beteiligt, sondern kann auch Auslöser weiterer Krankheiten wie Diabetes, Adipositas, Herzkrankheiten und Geistesstörungen wie Schizophrenie sein (Kargul und Laurent 2008).

Kargul und Laurent kamen in ihrer 2008 durchgeführten Studie zum Fazit, dass eine direkte Verbindung der Epigenetik zu Autoimmunkrankheiten besteht. Autoimmunität bezeichnet eine Immunantwort auf körpereigene Zellen. Der menschliche Alterungsprozess wird mit Immunseneszenz und häufigem Auftreten von Autoimmunkrankhei-

ten in Beziehung gebracht. Dies schließt organspezifische Autoimmunkrankheiten wie Hashimoto-Thyreoiditis (chronische Entzündung der Schilddrüse) und entzündliche Erkrankungen, wie rheumatische Arthritis, mit ein. Epigenetik bewirkt durch die umwelt- und alterungsbedingten Faktoren einen großen Einfluss auf die Regelung altersbedingter Autoimmunerkrankungen (Hirst und Marra 2008).

3.2 Epigenetik und Ernährung

Es besteht eine Wechselbeziehung zwischen Ernährung und epigenetischen Mechanismen wie Chromatinveränderung und der Regulierung der Genexpression. Mit der heutigen Technologieentwicklung und Forschungen und der daraus resultierenden Erkenntnissen ist es möglich, ernährungsbedingte Effekte auf exprimierte Gene sowie entsprechende Proteine und deren posttranskriptionellen Derivaten und Metabolismus, zu erfassen. Diese ernährungsabhängigen Produkte können die Beziehung zwischen Biologie und Ernährung, Gesundheit oder Krankheit begründen. Die Kombination dieser verschiedenen Aspekte in der epigenetischen Forschung könnten neue Strategien zur Prävention metabolischer Defekte mit sich bringen.

Kurzzeitige ernährungsrelevante Stimuli können nachhaltig Einfluss auf die Expression verschiedener Gene, Chromatinstrukturveränderungen, epigenetische Mechanismen und die Zugänglichkeit der Transkriptionsfaktoren nehmen (Junien 2006).

Bestimmte Mikronährstoffe die z.B.: für eine Methylgruppenübertragung essentiell sind, übernehmen eine relevante Funktion in der Inhibition der Histondeacetylasen, wodurch eine tatsächliche Steuerung der Epigenetik durch Ernährung deutlich erkennbar wird (Junien 2006).

Metabolische Faktoren sind zum Beispiel Acetyl-CoA für HAT Aktivität, NAD^+ für Sir2 Deacetylase (Sir2-Gen beeinflusst den Alterungsprozess) und ATP für die Chromatinsubstrat-Deacetylierung und Methylendonors für SAM im Methylierungspathway.

In Hefezellen findet keine DNA-Methylierung statt, das Element Nickel ist in der Lage Acetylierungsveränderungen am Lysinrest des N-terminalen Endes am Histon H4, die Genexpression zu regulieren. Weiters zeigten Spurenelemente wie Zink, Selen, Arsen, Eisen, Vitamin C und Niacin (= Vorstufe des NAD^+) eine einflussreiche inhibitorische Wirkungen auf epigenetische Prozesse. Arsen und Alkohol dezimieren den Pool an Methylendonatoren (Junien 2006).

Eine im Jahr 2008 in diesem Zusammenhang durchgeführte Studie von Thaler et al., verglich die Genexpression von MnSOD zwischen Vegetariern und Mischköstlern. Es wurde beobachtet, dass das MnSOD Gen bei Vegetariern weniger methyliert ist als bei Mischköstlern und die Genexpression von MnSOD in Vegetariern erhöht war.

Wie der Methylierungspfad (Abb.: 3.6) zeigt, ist Vitamin B12 ein einflussreicher Cofaktor (Thaler et al. 2008). Die Autoren stellen die Hypothese auf, dass Vegetarier mit Vitamin B12 eher unterversorgt sein könnten, was zu einer erhöhten Menge an Homocystein führt. Die verringerte Remethylierung von Homocystein hat einen verringerten Methioninstatus zur Folge.

Eine Ernährung, die arm an Methylendonatoren ist, hemmt Histonmethyltransferasen (HMTs) und DNA-Methylierungstransferasen (DNMTs) (Davis und Ross 2007).

Epigenetischen Veränderungen durch DNA-Methylierung und Histonacetylierung treten während der ersten Lebenswoche auf und verbleiben bis ins hohe Alter (Gallou-Kabani und Junien 2005).

3.3 Epigenetik und Kanzerogenese

In vielen Studien wurde bewiesen, dass epigenetische Veränderungen wie Methylierung der DNA und Histonmodifikationen in Tumorzellen vermehrt auffindbar sind. Estellers Forschungen belegen, dass ein „silencing“ von Tumorsuppressorgenen ein Indikator tumorentstehender Prozesse ist, die zur Inaktivierung von Tumorsuppressoren führt. Hypermethylierte Promotor CpG Islands sind Auslöser des „silencing“ und ist typisch für alle gekennzeichneten Krebszellen (Esteller 2007).

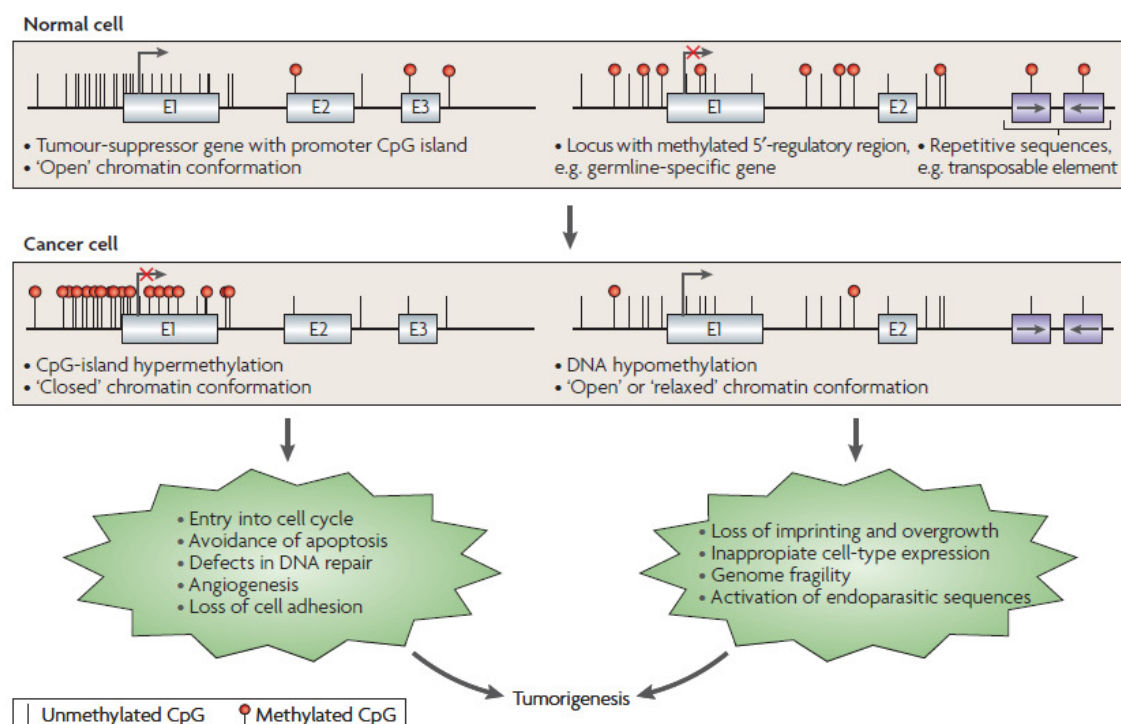


Abbildung 3.2: veränderte DNA-Methylierung in der Tumorigenese. Die Hypermethylierung zeigt eine Transkriptionsinaktivierung normaler Zellfunktionen. Doch zur selben Zeit findet eine Global Hypomethylierung an sich wiederholenden Sequenzen statt, gewebsspezifische und imprinted Gene zeigen einen Verlust der DNA-Methylierung (Esteller 2007).

Genauso wie ein verändertes DNA-Methylierungsmuster mit der Krebsentstehung assoziiert wird, zeigen auch Histonmodifikationen wie Histonhypoacetylierung und Histonhypermethylierung eine Verbindung zur Tumorigenese.

3.4 Modifikationen der Epigenetik

Die vier Hauptmodifikationen der Epigenetik sind:

- Genomic Imprinting (= Genomische Prägung)
- DNA-Methylierung
- Histonmodifikation
- siRNA

3.4.1 Genomic Imprinting

Menschen bekommen zwei Kopien von jedem Gen, eines der Mutter und eines vom Vater, eine „Sicherheitskopie“ ist vorhanden. Normalerweise werden beide Kopien verwendet bzw. exprimiert. Doch in speziellen Fällen kommt es vor, dass entweder das Gen der Mutter oder des Vaters ausgeschaltet wird, und somit nur eine aktive Kopie vorhanden ist (Scott 2008).

Dieses Phänomen trägt den Namen „Genomic Imprinting“. Bestimmte chemische Veränderung der DNA, wie Methylierung, scheinen den Chromosomen eine Art Gedächtnis hinsichtlich des elterlichen Ursprungs zu geben (Cockcroft 2008).

Genomic Imprinting ist ein Mechanismus, welcher die Genexpression und die Entwicklung des Fötus reguliert und eine Hauptfunktion in der Wachstumsregulierung hat (Scott 2008).

Imprinting ist als genetische Kontroverse gedacht, der Einfluss des elterlichen Ursprungs auf den Nachwuchs hat.

Ein besonderes Beispiel diese elterliche Ursprungskontroverse stellt der Insulin-like growth factor (= IGF) dar, die einen starken Einfluss auf die Entwicklung des Fötus hat. Dieser Faktor besteht aus zwei Komponenten, dem Igf2 (= Insulinähnlicher wachstumsfördernder Faktor exprimiert väterliche Gene) und dem Igf2r (= wachstumhemmender Faktor aus mütterlichen Genen) (Cockcroft 2008).

Imprinted Gene spielen eine große Rolle im Fötus- und Plazentawachstum und können sich in späteren Verhaltensweisen niederschlagen. Eine Störung des Imprinting kann zu Krankheiten führen und Expression normalerweise „stillen“ Allele führen, was eine Verdoppelung der Gene oder eine Unterdrückung normaler aktiver Allele – resultierend auf ein Defizit des Gens – zur Folge hat (Rossignol et al. 2008).

3.4.2 DNA-Methylierung

Bei der DNA-Methylierung werden Methylgruppen an bestimmte Bausteine der DNA gekoppelt. Es kommt zu einer chemischen Abänderung der Bausteine, jedoch nicht zu einer Änderung der DNA-Sequenz (= Abfolge der DNA Bausteine) (Trepte 2006). Dieses veränderte Methylierungsmuster legt Gene still oder verringert deren Aktivität (Rautenstrauch 2005).

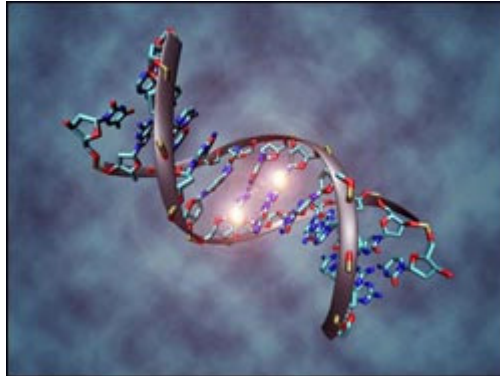


Abbildung 3.3: Methylierte DNA (Trepte 2006).

DNA-Methylierungen treten meistens an Cytosinen der symmetrischen Dinukleotiden CpG auf (Abb.: 3.4) (Worm und Guldberg 2002).

Die DNA-Methylierung bei Säugetieren wurde erstmals auf der 5'Position des Cytidintringes eines CpGs lokalisiert (Roloff und Nuber 2005).

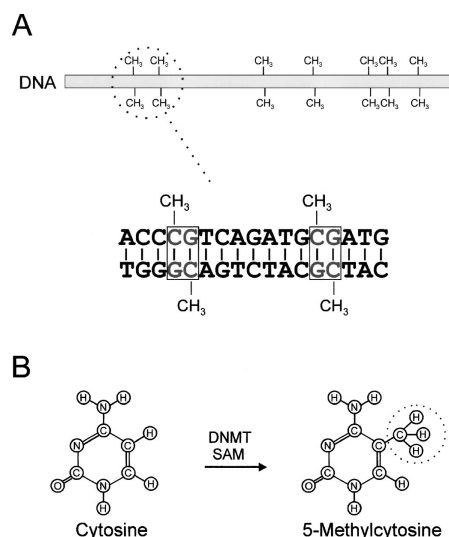


Abbildung 3.4: (A) DNA-Methylierung: Ankopplung der Methylgruppen an Cytosinen der CpG Dinukleotiden. (B) DNMTs (= DNA Methyltransferasen) koppeln eine Methylgruppe an das Cytosin, wobei SAM (= S-Adenosyl-L-Methionin) als Substrat hilft (Worm und Guldberg 2002).

Etwa 70% aller CpG Dinukleotiden sind methyliert und sind im menschlichen Genom weit verbreitet. Nichtmethylierte CpG sind primär auf DNA Regionen mit hoher CpG Dichte, sogenannter CpG-Inseln (= CpG-Islands) beschränkt. Das Genom enthält nahezu 29.000 CpG-Islands, die nicht dem Zufallsprinzip unterliegen und dazu neigen sich an Promoter- und an erste Exon Regionen zu platzieren. Während die meisten CpG Islands unmethyliert bleiben und somit zur einer Transkription führen, werden jene methylierten CpG-Islands mit „Imprinted“ Genen und der Deaktivierung des X Chromosoms assoziiert (Worm und Guldberg 2002).

Eine Hypermethylierung der CpG-Islands in der Promoter Region führt zu meist zu „silencing“, folglich zu keiner Transkription. Eine CpG-Island-Methylierung spielt einerseits auch bei der Krebsentstehung eine entscheidende Rolle, da die Tumorsuppressorgene abgestellt werden, andererseits auch beim genomischen Imprinting (Roloff und Nuber 2005).

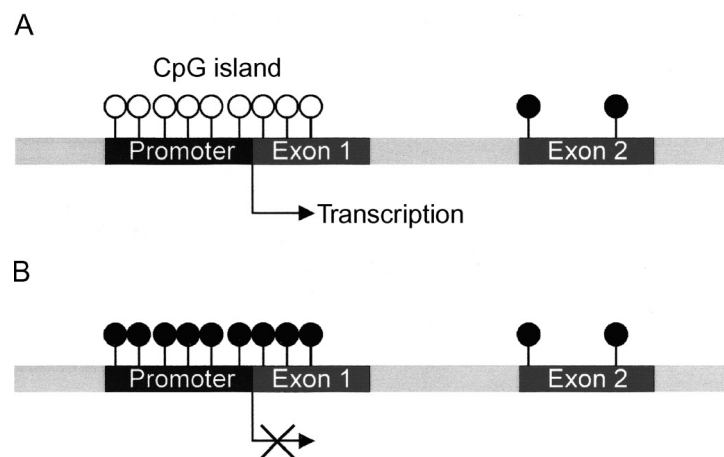


Abbildung 3.5: (A) unmethylierte CpG-Islands können transkribiert werden. (B) methylierte CpGs können nicht transkribiert werden (Worm und Guldberg 2002).

Die DNA-Methylierung kann mit Hilfe der DNA-Synthese reproduziert werden und wird auch auf die Tochterzellen übertragen. Dem auf dem neusynthetisierten DNA Strang enthaltenen hemimethylierte CG-Dinukleotid, wird das unmethylierte Cytosin methyliert, während sonstige unmethylierte CG-Bereiche nicht methyliert werden. Andererseits werden Methylgruppen auch auf eine vollständig „unberührte“ DNA übertragen (de novo Methylierung) (Worm und Guldberg 2002).

In vielen Fällen wurde bereits erläutert, dass ein gestörter Methylierungsmetabolismus zu Krankheiten führen kann. Eine aberrante DNA-Methylierung kann auf zwei

Wegen erfolgen, einerseits durch eine Hypermethylierung und andererseits durch eine Hypomethylierung.

DNA (Cytosine -5) – Methyltransferasen (DNMT) katalysieren den Transport einer Methylgruppe vom S-Adenosyl-L-Methionin (SAM) zum C5 des Cytosins innerhalb eines CpG-Dinukleotid der DNA.

Folsäure und Vitamin B12 sorgen für eine metabolische Verwandlung des Homocysteins in Methionin. Methionin wird weiter zu SAM metabolisiert, welcher der eigentliche Methyl donor ist und somit für die Cystinmethylierung in der DNA Verantwortung trägt.

Eine verringerte Methyldiät, kombiniert mit Methionin-, Cholin- und Folatmangel, führt zu einer verringerten Konzentration von SAM, was folglich eine DNA-Hypomethylierung verursacht (Fang und Xiao 2003).

Eine DNA-Hypomethylierung kann eine genomische Instabilität verursachen, die kanzerogene Effekte zur Folge haben kann. Weitere Nachteile einer CpG Hypomethylierung sind verstärkte Genexpression und Aktivierung der Proto-Onkogene, welche in Tumorzellen nachgewiesen werden können.

Im Gegensatz zur Hypomethylierung, führt eine gestörte Hypermethylierung der CpG Islands zu „silencing“ von Genen und ebenfalls zu Krankheitsbildern (Lu et al. 2006). Durch diese molekularen Mechanismen wird die Genexpression reguliert. Eine geringe Methylierung führt zu einer Aktivierung des Gens, während eine erhöhte Methylierung zu einer Deaktivierung bzw. zu keiner Genexpression führt (Roloff und Nuber 2005).

Ein Mangel von Cholin, Methionin, Vitamin B12 und Folsäure erhöht das Risiko einer Erkrankung. Versuche mit Cholinmangeldiäten bei Ratten zeigten eine erhöhte Lebertumorgenität und Arteriosklerose. Mangelndes Vitamin B12 und Folsäure verursachten neurologische Beschwerden sowie Fehlgeburten bei Menschen und Tieren (Poirier 2002). Somit kann eine gestörte DNA-Methylierung zu Krebs, Arteriosklerose, Fehlgeburten uvm. führen.

Im Methylierungsweg (Abb.: 3.6) sind die Wirkungen von Vitamin B12, Folsäure, Cholin und Methionin gut ersichtlich. Sie spielen eine bedeutende Rolle in der Bildung vom Methyl donors S-adenosylmethionin (SAM). SAM ist aufgrund seiner Übertragung einer Methylgruppe ein wichtiger Aspekt in der DNA-Methylierung. Nach der

DNA-Methylierung verwandelt sich SAM zu S-Adenosylhomocystein (SAH), welches durch die Verwandlung zu Homocystein den Kreislauf wieder schließt.

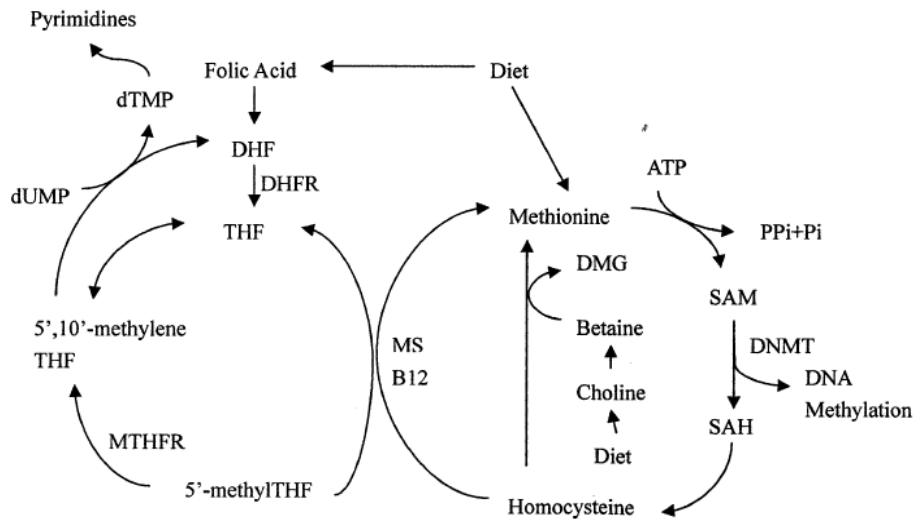


Abbildung 3.6: Methylierungsweg: Bildung von SAM (S-Adosylmethionin) (Lu et al. 2006).

Umweltveränderungen, Ernährung und andere exogene Reize können dazu führen, dass während eines Lebenszyklus epigenetische Veränderungen auftreten können. Anhand des Beispiels der Kanzerogenese zeigt sich die epigenetische Ausschaltung der betroffenen Reparaturenzyme oder Schutzmechanismen (Lehen-Bevel 2003).

3.4.2.1 DNA Methyltransferasen

DNA Methyltransferasen (= DNMTs) sind Enzyme, die das Andocken einer Methylgruppe an einer bestimmten Stelle der DNA ermöglichen. Diese angedockten Methylgruppen sind ausschlaggebend, ob ein Gen abgeschaltet wird und somit in seiner Funktionsausübung verhindert wird. Es findet keine Genaktivität statt (Dirscherl 2005).

Die DNA Methyltransferasen können in drei Klassen aufgeteilt werden: DNMT1, DNMT2 und DNMT3 (Roloff und Nuber 2005).

Das Enzym DNA Methyltransferase1 (= DNMT1) ist für die Ankopplung einer Methylgruppe an halbmethylierte CpGs zuständig. Zusätzlich wurden noch zwei weitere DNA Methyltransferasen kloniert, DNMT3a und DNMT3b, um den Transfer der Methylgruppen an der „unberührten“ DNA zu katalysieren (de novo Methylierung) (Worm und Guldborg 2002).

In frühen Stammzellen und peri-Implantationsphasen von Embryos sind DNMTs mit spezifischer „de novo“ Methylierung Aktivität notwendig: „de novo“ DNMT Aktivität ist in differenzierten Zellen verringert. Die Methylierung auf Cytosinresten kommt nach der Replikation durch DNMTs vor, solche wie DNMT1, welche für eine akkurate Verbreitung einer DNA-Methylierung während der Zellteilung sorgen (Kelly und Trasler 2004).

3.4.2.2 DNA Methylierungsinhibitor

Zebularine

Zebularine [1-(beta-D-ribofuranosyl)-1,2-dihydropyrimidin-2-1] ist ein stabiles Cytidin-Analog und für die Inhibition der DNA Methylierung verantwortlich.

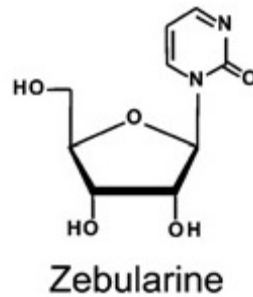


Abbildung 3.7: Strukturformel von Zebularine (Yoo et al. 2004).

Eine Hypermethylierung in Promoterregionen bestimmter regulierender Gene kann zu „silencing“ führen. „Silenced“ Tumorsuppressorgene, DNA-Reparaturgene, Zellzyklus regulierende Gene, Apoptose Gene und Gene die in der Angiogenese involviert sind werden wieder exprimiert nach Exposition mit DNA-Methylierungsinhibitoren wie Zebularine. Eine solche Reaktivität kann eine Suppression des Zellwachstums oder eine erhöhte Sensibilität bestehender Therapien bewirken (Yoo et al. 2004; Herranz et al. 2006).

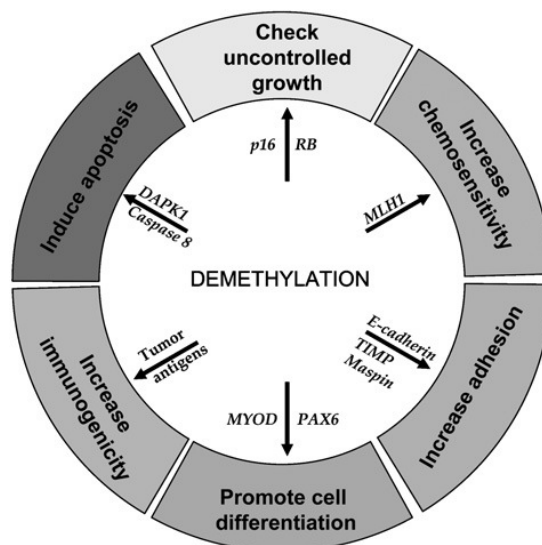


Abbildung 3.8: Epigenetische Therapie basierend auf Demethylierung hypermethylierter Promotorregionen von „silenced“ Genen. Demethylierung bewirkt eine Reaktivität einiger Gene (Yoo et al. 2004).

3.4.3 Histonmodifikation

Histone sind Proteine, um die sich die DNA windet. Sie ermöglichen es, den langen DNA-Faden in einen sehr kleinen Zellkern zu komprimieren. Weiters sind Histone für die Stilllegung des zweiten X-Chromosoms verantwortlich, da die weibliche Zelle zwei X-Chromosomen hat und die Erbinformation nur von einem X-Chromosom abgelesen wird (Schwarz 2004).

Die DNA wickelt sich zweimal um ein Histonoctamer, zusammengesetzt aus H2A, H2B, H3 und H4, und stellt gefalten eine höhere Ordnung des Chromatins dar (Junien 2006).

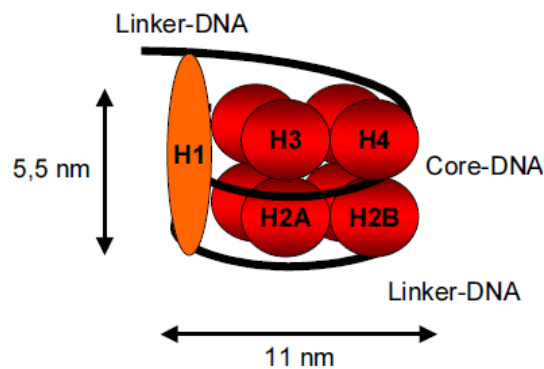


Abbildung 3.9: Darstellung eines Nukleosoms (DNA mit Histonen), in der sich die DNA um ein Histonoctamer windet. H1 bindet die Histone zu einer kompakten Form des Chromatins (Beermann 2007).

Die Muster dieser Histonmodifikationen sind ebenfalls regulierende Faktoren der Genexpression. Zu den Histonmodifikationen zählen Acetylierung, Phosphorylierung, Methylierung, Ubiquitinierung, Sumoylierung und ADP Ribosylierung (Roloff und Nuber 2005).

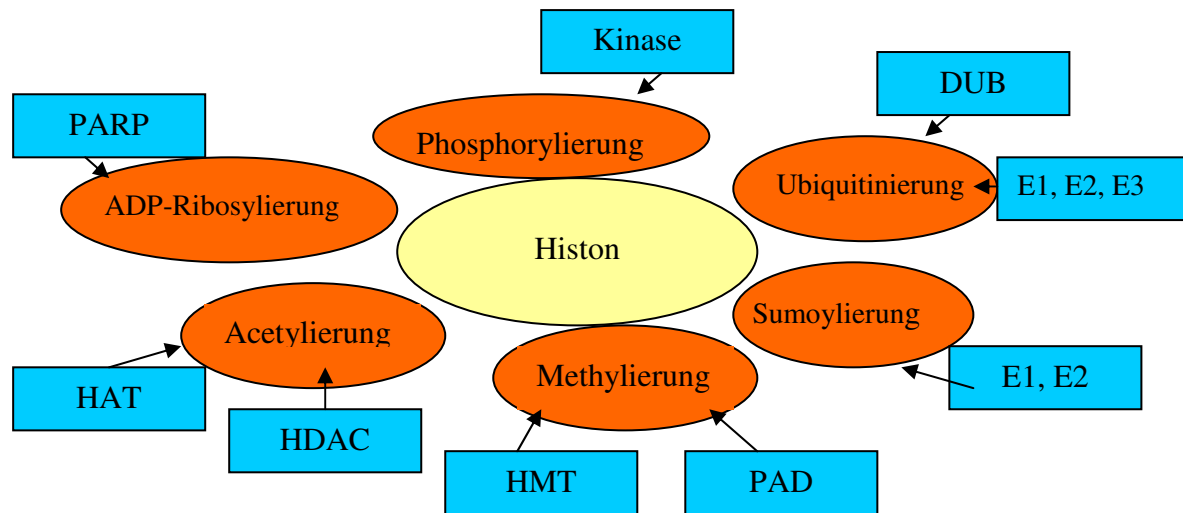


Abbildung 3.10: Histonmodifikationen mit ihren Enzymen. Modifizierte Abbildung nach (Roloff und Nuber 2005)

Histon(de)acetylierung spielt eine kritische Rolle in der Zelldifferenzierung während der Embryonalentwicklung. Die verringerte Acetylierung bewirkt durch eine gesteigerte Tätigkeit der Histondeacetylasen (HDACs) eine veränderte Struktur der Proteine, welche an Apoptosis, Zellproliferation, Angiogenese und verschiedenen Krebstypen beteiligt sind (Kargul und Laurent 2008).

Histondeacetylasen modulieren die Gentranskription und Chromatinstruktur indem Histone in der posttranskriptionellen Phase verändert werden. Eine erhöhte Aktivität der HDACs wurde in Krebszellen entdeckt, die durch Veränderung der lokalen Chromatinstruktur, unterdrückter Gentranskription und gestörter Differenzierung abgeleitet wurden. In der Leukämietherapie üben bereits HDAC-Inhibitoren aufgrund einer Entlastung der Transkriptionsunterdrückung einen Antitumoreffekt aus (Nencioni et al. 2007).

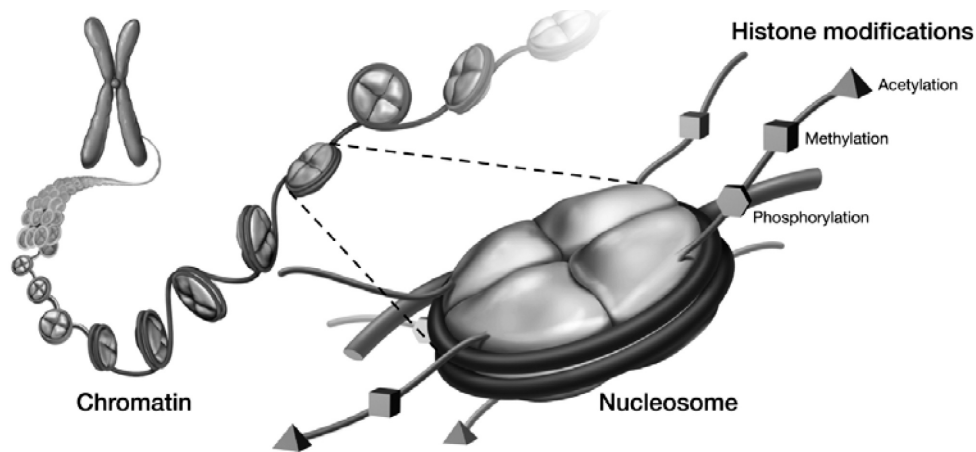


Abbildung 3.11: Epigenetische Modifikationen der Chromatinstruktur beeinflussen die Genexpression. Darstellung der unwickelten DNA anhand der Vergrößerung (Davis und Ross 2007).

Veränderungen an der Chromatinstruktur führen zu einer Beeinträchtigung der Genexpression. Wenn das Chromatin geschlossen ist, kommt es zu keiner Aktivierung der Gene. Ist jedoch das Chromatin offen, leicht verpackt, findet eine Expression der Gene statt (eingeschaltete Gene) (Davis und Ross 2007).

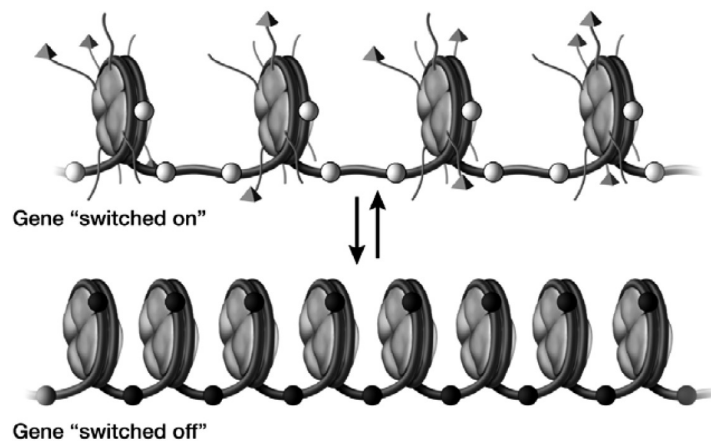


Abbildung 3.12: Darstellung der aus- oder eingeschalteten Gene. Die Pyramiden symbolisieren die Histonacetylierung, während die grauen Kreise unmethylierte Cytosine verkörpern. Im Kontrast dazu sind, bei den ausgeschalteten Genen, die Histone deacetyliert und Cytosine, in schwarzen Kugeln gehalten, methyliert (Davis und Ross 2007).

Die Funktion besonders stark verpackter Gene ist den Enzymen Histondeacetylasen (HDACs) zuzuordnen, während ihre Gegenspieler, die Histon-Acetyltransferasen (HATs), für eine Genaktivität sorgen (Van den Heuvel 2007).

Forschungen belegen, dass ein Ungleichgewicht zwischen HAT und HDAC zu Deaktivierung relevanter Gene bzw. Repression der Transkription und der daraus folgenden Tumorentstehung führen (Beermann 2007).

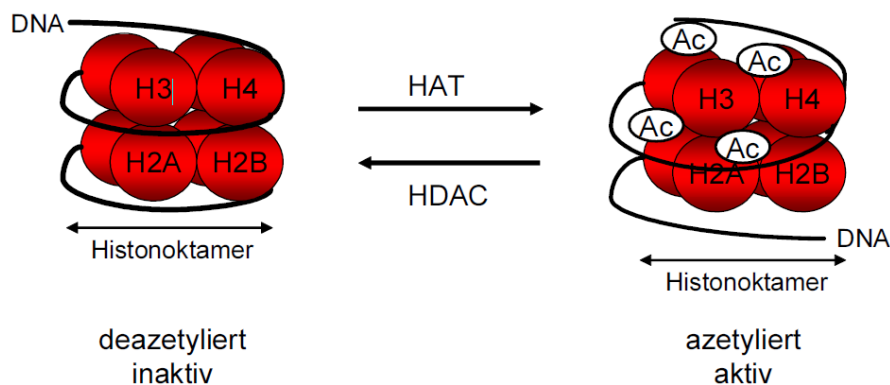


Abbildung 3.13: Aktivität der Histon-Acetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylasen (HDAC) (Beermann 2007).

DNA-Methylierung kann eine Unterdrückung der Transkription bewirken indem Transkriptionsfaktoren durch Methyl-CpG-binding Proteine (= MBD) blockiert werden. Diese sogenannten Methyl-CpG-binding Proteine haften an methylierten Cytosinen und sorgen wiederum dafür, dass Histondeacetylasen (HDACs) und Histonmethyltransferasen (HMTs) nahe der DNA rekrutiert werden und so das Chromatin zu einer transkriptionsinaktiven Konfiguration umkehrt. Histonmodifikationen spezieller Lysinresten an den N-terminalen Histonenden, beeinflussen die Chromatinstruktur fundamental, so dass es eine massive regulierende Bedeutung der Transkription hat (Lu et al. 2006).

Eine Transkription der Gene ist nur dann durchführbar, wenn die Chromatinstruktur offen und die DNA frei zugänglich für RNA-Polymerase II und Transkriptionskomplexe ist, die die tatsächliche Transkription initiieren (Beermann 2007).

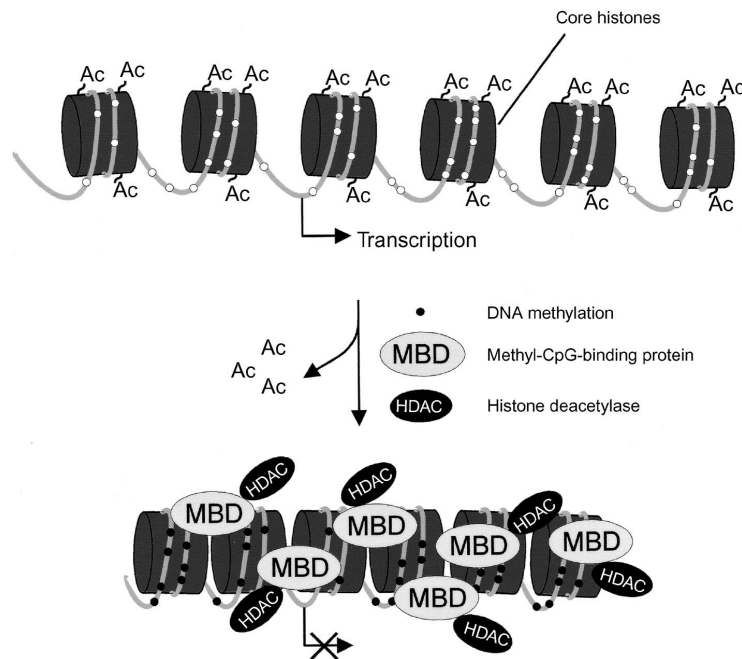


Abbildung 3.14: Chromatinstrukturveränderungen: offene Chromatinkonfiguration durch Acetylierung der Histone wird durch Histondeacetylierungen (HDAC) und Methyl-CpG-binding Proteine (MBD) zu einer geschlossenen nicht intakten transkriptionsfähigen Chromatinstruktur (Worm und Guldberg 2002).

3.4.3.1 Histondeacetylasen

Histondeacetylasen (HDACs) sind Enzyme, die das Entfernen der Acetylgruppen (COCH_3) vom Histonkern katalysieren und somit die zu übersetzende offene Chromatinstruktur zu einer verschlossenen und nicht transkriptionsfähigen Struktur umwandeln (Worm und Guldberg 2002).

HDACs können in drei Gruppen aufgeteilt werden:

Typ I HDACs inkludieren HDAC1, 2, 3 und 8. Alle sind durch begrenzte Homologie mit der Hefezelle verbunden. Sie sind im Nukleus lokalisiert und kommen in vielen Humanzelllinien und Geweben vor.

Typ II HDACs können zwischen Cytoplasma und Nukleus hin und herwechseln. Sie deuten auf eine mögliche extranukleare Funktion hin, welche den Acetylierungsstatus von Nichthistonensubstraten reguliert.

Typ III HDACs werden oft der SIR2-Familie zugesprochen. Typ III HDACs benötigen Nicotinamid Adenin (NAD), um zu funktionieren (Lin et al. 2006).

Laut einigen Studien erkennen HDACs verschiedene Acetylierungsmuster und regulieren Gene (Beermann 2007).

Neuere Beobachtungen belegen, dass einige diätetische Faktoren wie Butyrate (im Darm entstandene Fettsäuren aus fermentierten Ballaststoffen während der Verdauung); Diallyldisulfide (in Knoblauch und anderem „Allium“ Gemüse); und Sulphoraphane (in „Cruciferae“ Gemüse, Kreuzblütler) fähig sind, Typ I und II HDAC Enzyme zu hemmen. Typ III HDAC kann durch kalorische Restriktion und Resveratrol (Antioxidans) aktiviert werden. Auch Histonacetyltransferasen (HATs) können durch restriktive Mengen an Kupfer und Curcumin inhibiert werden (Davis und Ross 2007).

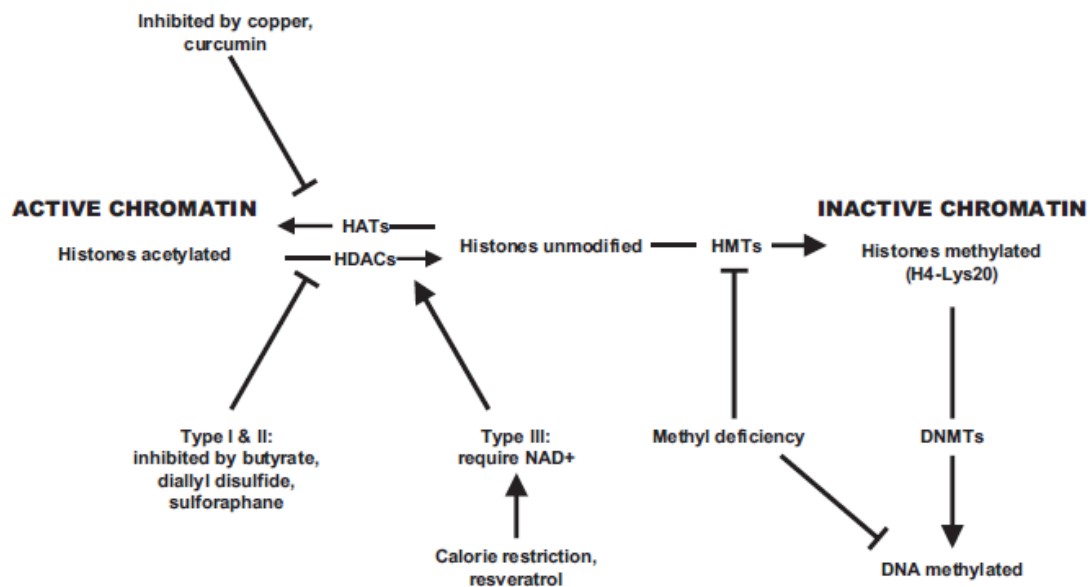


Abbildung 3.15: Diätetische Einflussfaktoren auf Histonmodifikationen und deren In- oder Aktivierung des Chromatins (Davis und Ross 2007).

3.4.3.2 Histondeacetylase-Inhibitoren

Den Histondeacetylase-Inhibitoren wird eine große Rolle in der Tumorthherapie zugesprochen (Beermann 2007).

HDAC-Inhibitoren zeigen eine Einflussnahme der Transkription einiger Gene durch eine Chromatinveränderung. Hier sind weniger als 10% der exprimierten Gene aktiviert oder deaktiviert. Viele dieser Gene, die durch HDAC-Inhibition beeinträchtigt werden, sind für jene codierten Proteine, die Tumorgenese oder Tumorsuppression vermitteln, ausschlaggebend (Lin et al. 2006).

Lin erwähnt in seiner Studie ebenso nicht epigenetische Mechanismen, welche möglicherweise einen antiproliferativen Effekt an HDAC-Inhibitoren bewirken: Tumorassoziierte Proteine, die Proliferation und progressiven Zellzyklus herbeiführen, scheinen ihren Acetylierungszustand durch HDAC-Inhibitoren verändert zu bekommen (Lin et al. 2006).

In dieser Arbeit wurde als HDAC-Inhibitor Valproat ausgesucht, da bereits eine gute Literaturübersicht über Valproat existiert. Valproat ist dafür bekannt, eine regulierende Eigenschaft auf die Genaktivität zu haben.

Valproat

Valproat (Valproinsäure, VPA; Dipropyllessigsäure) ist eine verzweigte Carbonsäure mit 5 Kohlenstoffatomen.

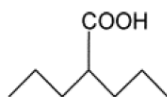


Abbildung 3.16: Strukturformel von Valproat (VPA) (Becker 2006).

Valproat wird als Antiepileptikum wegen seiner krampflösenden Eigenschaft eingesetzt. Weiters wird VPA zur Migräneprophylaxe bei Hirnerkrankungstherapien und psychischer Leiden verwendet. Wird VPA in der Schwangerschaft eingenommen, kann dies zu Missbildungen des Embryos führen. Das Potential einer Inhibierung der HDACs wurde bei VPA entdeckt. Forschungen ergaben eine Hyperacetylierung der Histonen H3 und H4 in vivo und in Zellkulturen. Eine genaue Dosierung von VPA

konnte eine Unterbrechung der HDAC beeinflussenden Repression unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren erzielen, was folglich eine erhöhte Genexpression zeigt (Becker 2006).

Zelllinien von Patienten und Mausmodellen wurden erfolgreich verwendet, um die Umkehrbarkeit epigenetischer Markierungen durch das Verwenden bestimmter Inhibitoren und Aktivatoren der epigenetischen Modifikation zu prüfen. Valproat wird die Fähigkeit, HDACs zu hemmen, zugeschrieben (Junien 2006).

3.4.4 siRNA (small interfering RNA)

Doppelsträngige RNAs (dsRNA) führen zu einem post-transkriptionellen Gensilencing in einigen Tier- und Pflanzenarten. Gensilencing wird unter anderem durch DNA-Methylierung herbeigeführt. Small interfering einzelsträngige RNA (siRNA) bestehend aus 21 – 25 Nucleotide entsteht mit Hilfe des Enzyms Rnase III Dicer von der doppelsträngigen RNA. siRNA ist ein weiterer wichtiger Faktor der epigenetischen Modifikation (Kawasaki und Taira 2004).

Diese siRNAs besitzen die Fähigkeit zur gezielten Spaltung der RNA in eine spezifisch veränderte gerichtete Nukleotidsequenz. Die gespaltenen RNAs werden weiter degradiert, oder stellen eine Vorlage für eine RNA-polymeraseabhängige RNA (RDR) dar, welche wiederum neue dsRNAs bilden können. Die durch RNA-Polymerase gebildeten dsRNAs können eine Kaskade auslösen, wodurch eine weitere Vermehrung der siRNAs erfolgt. Es ist möglich, dass diese vermehrten siRNAs einen Mechanismus darstellen welcher mRNA gegen Veränderungen beschützt, oder durch bestimmte äußere Gegebenheiten einen extensiven Wandel der mRNA herbeiführt (Baulcombe 2006).

siRNA wurde mit Silencing der Gene, sowie einer Chromatininaktivierung besonders bei endogenen Genen, in Verbindung gebracht. Erbrachte Ergebnisse zeigen zielorientierte siRNAs, die eine DNA-Methylierung, Histonmodifikation und Chromatininaktivierung in homologen genomischen Sequenzen hervorrufen. siRNA induziert ebenso „de novo“ Methylierung an Cytosinrückständen der DNA (Okano et al. 2007).

3.5 Regulatorische Proteine

In der Literatur wurden die anführenden Proteine mit einer epigenetisch regulierenden Steuerung in Zusammenhang gebracht. Diese Proteine wurden ausgesucht um anhand der Genexpression eine epigenetische Steuerung in der Tumorgenese zu erforschen. Ihre Genexpression-Aktivität wurde anhand des Caco-2 Zellmodells gemessen.

3.5.1 Regulatorische Proteine in der Methylierungs- und Histonmodifikation

3.5.1.1 DNA Methyltransferase1 (DNMT1)

DNMT1 neigt zu hemi-methylierter DNA und ist sehr essentiell für die Erhaltung der Methylierungsmuster während der DNA-Replikation. Methylierungen sind stark reduziert (nahezu 5 % von normalen Bereichen) in embryonalen Stammzellen und Embryos aufgrund der Unzulänglichkeit dieser Proteine (Kelly und Trasler 2004).

3.5.1.2 DNA Methyltransferase3a und -3b (DNMT3a und DNMT3b)

DNMT3a und DNMT3b fördern vorwiegend „de novo“ Methylierungen. Verschiedene Gene codieren DNMT3a und DNMT3b, beide sind stark exprimiert in ungeteilten Embryonalzellen. Diese Expression nimmt während der Teilung ab. Die Studie von Kelly und Trasler ergaben, dass das männliche DNMT3a eine Rolle in der Akquisition der „de novo“ Methylierung während der pränatalen Phase der Stammzellenentwicklung spielt. Während DNMT3b bei der Erhaltung bzw. Fortsetzung der „de novo“ Methylierung in den ersten mitotischen Stammzellen einer wesentlichen Bedeutung zukommt. Eine Wechselwirkung von DNMT3a und DNMT3b konnte nachgewiesen werden, d.h. sie können nicht ohne den anderen funktionieren (Kelly und Trasler 2004).

3.5.1.3 Histondeacetylase2 (HDAC2)

Eine Repression der Transkription bedingt durch Histondeacetylasen (HDACs), stellt als Folge einer Krebsentstehung dar.

Eine HDAC2 Expression verursacht den Verlust von APC (Adenomatous polyposis coli) Tumorsuppressorgenen. Speziell die HDAC2 Expression lässt sich in erhöhter Dosis im menschlichen Darmkrebs, sowie in der Intestinal Mucosa lokalisieren. Starke HDAC2 Expression ist erforderlich, um einen umgewandelten zellularen Phänotyp in Bezug auf verminderte Apoptosis und Darmkrebszellen zu erhalten (Zhu et al. 2004).

3.5.2 Proteine mit bekannter epigenetischer Steuerung

3.5.2.1 Insulin-like growth factor 2 receptor (IGF2R)

Wie im Kapitel (siehe 3.4.1) Genomic Imprinting bereits erwähnt wurde, wird das Igf2r durch den Imprinting Mechanismus geprägt.

Igf2r ist dafür bekannt, dass es eine wesentliche Rolle im fötalen Wachstum hat. Igf2 Wachstumsfaktor bindet mit hoher Affinität an Igf2r, welcher im Austausch dazu eine Degradation von Igf2 herbeiführt.

Der Verlust der Funktionsfähigkeit von Igf2r bedingt, durch eine Veränderung in den kodierenden Regionen und dem Verlust an Heterozygotie, werden mit Tumorsuppressorgenen in Verbindung gebracht (Apostolidou et al. 2007).

3.5.2.2 E-cadherin

E-cadherin ist ein calciumreguliertes Zelladhäsionsmolekül, das in Epithelzellen gebildet wird. Zelladhäsionsmoleküle, sind Moleküle die für eine homotypische und heterotypische Adhäsion von Zellen sorgen und dem die Bindung von Zellen an die extrazelluläre Matrix auch beigemessen wird. Die extrazelluläre Region vermittelt die calciumabhängige und homophile Adhäsion. Viele verschiedene Moleküle treten in Wechselwirkung mit dem zytoplasmatischen Teil. Die exprimierenden Zellen von E-cadherin bilden Zellverbindungsstrukturen („tight“ und „gap junctions“).

E-cadherin scheint außerhalb der Zelladhäsion auch an genregulatorischen Prozessen beteiligt zu sein (Becker 2000).

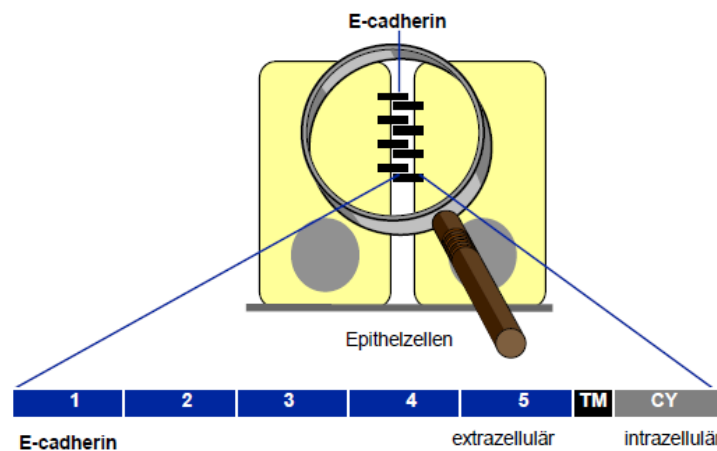


Abbildung 3.17: Darstellung von E-cadherin. 5 Domäne stellen den extrazellulären Teil dar, die eine Zell-zu-Zell Interaktion bewirken. Die Transmembran-Domäne (TM) sorgt für eine Verankerung des Oberflächenmoleküls in die Zellmembran. Mit Hilfe der zytoplastischen Domäne kann E-cadherin in Wechselwirkung mit Cateninen treten und sich somit an das Aktinzytoskelett an koppeln (Becker 2000).

3.5.2.3 Interleukin-8 (IL-8)

IL-8 ist ein Chemokin der CXC Familie, ein wichtiger Entzündungsmediator und „Chemolockmittel“ für Neutrophile welche in hohen Konzentrationen aktiver humaner Monozyten lokalisiert werden können. Diese kleinen ausgeschiedenen Proteine spielen eine Rolle in der Regulierung einer Entzündungsreaktion. Dies hat zur Folge, dass IL-8 mit der Pathogenese einiger entzündlicher Krankheiten, wie Asthma, Sepsis und chronische Erkrankungen sowie mit einigen Krebserkrankungen in Zusammenhang gebracht werden (Li 2004; Xie 2001; Wen und Wu 2001). Die mitogenische und angiogenische Funktion von IL-8 kann zu einer Mortalität führen und ist ein potentieller Auslöser für Krebsentstehung. Einige Beispiele solcher Krebserkrankungen sind Gehirntumor, Darmkrebs, Brust- und Prostatakrebs und Bauchspeicheldrüsenkrebs uvm (Xie 2001).

IL-8 wird durch das Stimulieren verschiedener Zelltypen freigesetzt, das zu einer Rekrutierung von Leukozyten während einer Entzündung beiträgt (Beermann 2007).

Durch eine solche Leukozytenrekrutierung in der Arterienwand, ist das IL-8 häufig in erhöhten Mengen auch bei arteriosklerotischen Läsionen auffindbar. Die Konvertie-

zung der Monozyten zu einer starken Adhäsion an die Endothelialschicht ist für eine Pathogenese von Atherosklerose verantwortlich (Zeng et al. 2003).

Weiters wird IL-8 eine Rolle in der Angiogenese zu gesprochen. Diese kapillarwachsende Eigenschaft trägt zu potentiellen metastasenbildenden Tumorzellen bei, die ektopisch erhebliche Mengen an IL-8 freigeben (De Larco et al. 2003).

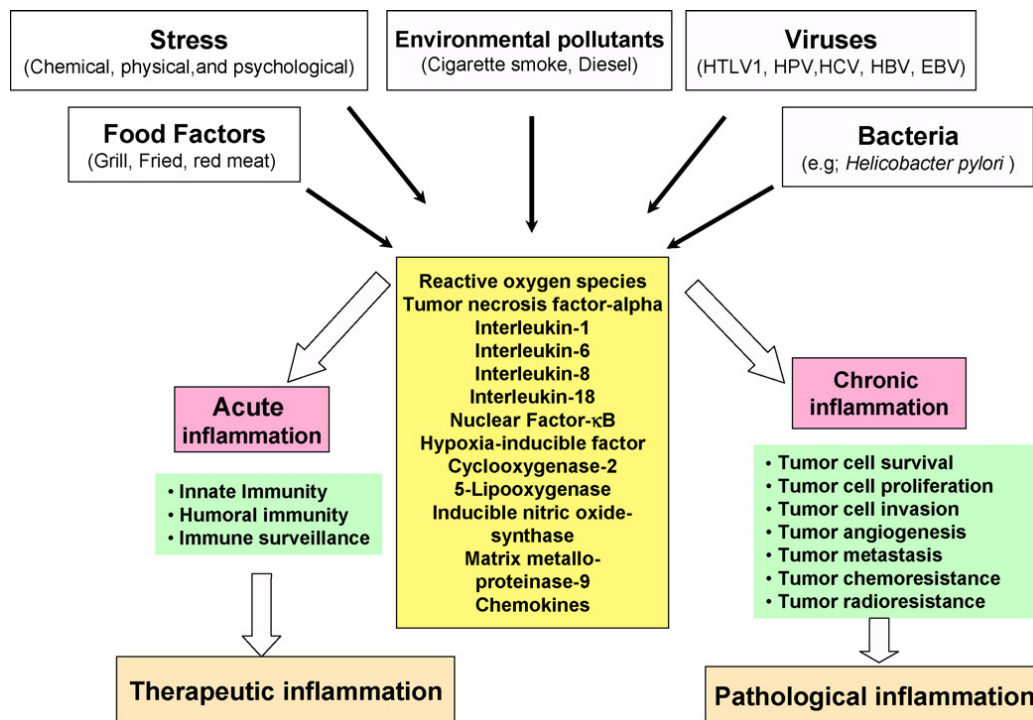


Abbildung 3.18: Verschiedene Faktoren einer Entzündung und sein Einfluss in der Tumorgenerierung (Aggarwal et al. 2006).

3.5.2.4 Mangan Superoxid Dismutase (MnSOD)

Reaktive Sauerstoffspezien (ROS) entstehen durch oxidative Phosphorylierung und mitochondriale Elektronentransportkette. Diese Sauerstoffradikale reduzieren den molekularen Sauerstoff, indem ein Elektron entnommen wird und somit die Superoxidation ($O^{\cdot -}$) aus Sauerstoff entsteht. ROS hängen in Zusammenhang mit Modifikationen von multiplen molekularen Prozessen, wie Lipidperoxidation, Transkriptionsfaktor Modulation und oxidative Zerstörung der DNA, zusammen.

SOD2 ist ein Enzym, welches die Überführung freier Sauerstoffradikale ($O^{\cdot -}$) katalysiert. SOD2 ist in zwei Formen anzutreffen, einerseits als Mangan Superoxid Dismutase in der Mitochondrienmatrix und andererseits als Kupfer-Zink Superoxid Dismutase

im Cytoplasma. SOD2 konvertiert Superoxidradikale ($O^{\cdot -}$) in Wasserstoffperoxid (H_2O_2), welches wiederum durch Katalase in die ungiftige Form des Wasser umgeformt wird (Hodge et al. 2005).

3.5.3 Housekeeping Gen

3.5.3.1 Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PD)

Im Pentose-Phosphat-Pathway (PPP) wird Glucose-6-Phosphat (G6P) mit Hilfe des Enzyms Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase (G6PD) zu Ribose-5-Phosphat umgewandelt. Ribose-5-Phosphat ist ein bedeutender Vorläufer vieler wichtiger Moleküle wie RNA, DNA, ATP, NAD und FAD. Im PPP werden auch NADPH-Moleküle produziert, die als Elektronendonors der Zelle ihre Funktion tragen. Es gibt keine weiteren metabolischen Prozesse, in der die Zelle NADPH produzieren kann, außer durch das Enzym G6PD. Aus diesem Grund ist ein Mangel an G6PD zellschädigend.

G6PD-Mangel ist ein gründlich erforschtes Themenfeld zu dem zahlreiche internationale Studien existieren, da es hauptverantwortlich für die bekanntesten Humangenetikdefekten bei mehr als 400 Millionen Menschen ist (Minucci et al. 2008). Aufgrund dieser Referenz dient das G6PD in der vorliegenden Arbeit als Housekeeping Gen.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Probengewinnung und Probenkonservierung

4.1.1 Caco-2 Zellkulturlinie

Die verwendete Zelllinie Caco-2 wurde vom Departement für Ernährungswissenschaften der Universität Wien, Österreich zur Verfügung gestellt.

Die Caco-2 Zelllinie wurde aus einem Darmtumor eines 72jährigen kaukasischen Mannes etabliert (Wen und Wu 2001).

Die Caco-2 Zellen wurden in 75 cm² Kulturflasche in einem Inkubator bei 37°C, 95 % Luft und 5 % CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), dem 3,5 g/l D-Glucose, 3,7 g/l Sodumbicarbonat, 1 % L-Glutamin [200 mM], 1 % Penicillin-Streptomycin Lösung [10.000 U Penicillin, 10 mg Streptomycin * ml⁻¹ 0,9 % NaCl] und 10 % fetalem Kälberserum zugefügt wurden, gezüchtet. Jeden dritten Tag wurde das Medium gewechselt. An jedem 6ten Tag wurden die Zellen mit Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen um Mediumreste auszuwaschen, mit Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 % Trypsin und 0,02 % EDTA in PBS) geerntet und in einer Dichte von 2 x 10⁴ Zellen pro cm² neu ausgesiedelt. Diese Zellen kommen ursprünglich von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Bereich Menschliche und Tierische Zellkulturen, Braunschweig, Deutschland. Passage 35 - 45.

4.1.2 Inkubation der Zellen

Die fertig gezüchteten Caco-2 Zellen wurden in 5 x 6-Wells Platten bei einer Dichte von 10⁶Zellen/ml ausgesiedelt, und für 24h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden den Zellen die ausgesuchten Substanzen hinzugefügt und für weitere 48h inkubiert. Diese Substanzen waren:

Folsäure (200 μM), Cobalamine (200 μM), Genistein (200 μM), Genistein (5 μm), Valproat (200 μM), Homocystein (200 μM), Zebularine (200 μM), LPS (=Lipopolysaccharid) (200 μM)

Kreuzungen:

LPS + Valproat (je 200 μM), LPS + Zebularin (je 200 μM), Genistein + Valproat (je 200 μM), Homocystein + Zebularine (je 200 μM)

Jede der 6-Wells Platten beinhaltete eine Probe mit der Substanz in Doppelbestimmung und eine Leerkontrolle.

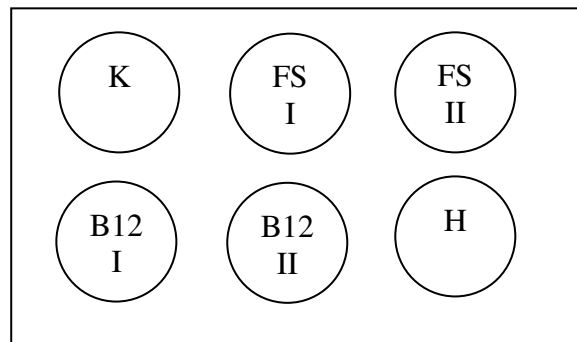


Abbildung 4.1: 6-Wells Platte: K = Kontrolle, FS = Folsäure, B12 = Cobalamine, H = Homocystein

Nach der Inkubationszeit von 48h wurden die Zellen aus dem Brutschrank genommen. Das Nährmedium inklusive der zugesetzten Testsubstanzen wurden herausgesaugt und mehrmals mit PBS Buffer gewaschen.

Die gewaschenen Zellen wurde mit etwas PBS Puffer versetzt und mit einem Cell Scrubber geerntet und sofort bei -70 °C eingefroren.

Die Doppelbestimmungen (z.B.: FS II) wurden bei -70 °C aufs erste sichergestellt. Die ersten Proben (z.B.:FS I) wurden während des Arbeitens bei -30 °C aufbewahrt.

Um RNA–Transkripte in Zellen nachweisen zu können, ist es erforderlich die RNA zu isolieren, mRNA in cDNA umzuschreiben, um anschließend mittels PCR die Genexpression zu messen.

4.2 RNA Aufbereitung

4.2.1 RNA-Isolierung

Durch die RNA-Isolierung wird eine effektive Beseitigung von Verunreinigungen und eine Zell-Lyse erreicht. Im RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen) ist eine Phenol- und Guanidin-Thiocyanat-Lösung, zur Zell-Lyse enthalten, das ausserdem RNasen inhibiert. Weitere Reinigungen wurden mit Hilfe von Waschpuffern und Säulen durchgeführt. Diese Säulen enthalten Membrane, welche die RNA an sich binden können, um sie somit von der DNA zu trennen. DNA-Rückstände werden während der Inkubationszeit mittels DNasen beseitigt. Die saubere RNA wurde anschließend mit RNase-freiem Wasser eluiert.

4.2.2 RNA-Extraktion

Die RNA Extraktion erfolgt mit Hilfe dem RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen).

Ablauf des Kits:

1. 200 µl Probe in 1 ml Qiazol Lysis Reagent dazugeben
2. 20 – 30 sec. vortexen
3. 5 min bei Raumtemperatur inkubieren
4. 200 µl Chloroform hinzufügen -> 15 sec vortexen
5. weitere 2-3 min bei Zimmertemperatur inkubieren
6. 15 min bei 12.000 g bei 4 °C zentrifugieren
Dabei entstehen 3 Phasen:
 - oberste farblose RNA Schicht
 - weiße Interphase
 - untere, rote organische Phase
7. die farblose RNA in ein neues Tube umfüllen ca. 500 - 900 µl
8. 600 µl 70 % Ethanol dazugeben -> vortexen
9. 700 µl der Probe werden in ein RNeasy Mini Spin Column 2 ml Collection Tube überführt
10. 15 sec bei Raumtemperatur bei 8000 g zentrifugieren Überstand entfernen

11. 700 µl RW1 Buffer in RNeasy Spin Column geben und 15 sec bei 8000 g zentrifugieren -> Überstand und Collection Tube wegschmeißen
12. RNeasy Spin Column in ein neues 2 ml Tube geben, 500 µl RPE – Buffer dazugeben und wieder 15 sec. bei 8000 g zentrifugieren -> Überstand weg
13. wiederholen 500 µl RPE Buffer, 2 min bei 8000 g zentrifugieren
14. RNeasy Spin Column in ein neues 2 ml Tube geben -> 1 min Full Speed zentrifugieren
15. Eluieren: RNeasy Spin Column in ein 1,5ml Tube geben. 30 – 50 µl RNasefreies Wasser dazugeben, 1 min bei 8000 g zentrifugieren
16. Vorgang ein zweites Mal wiederholen.

RNA wurde bei -70 °C in RNase und DNase-freiem Wasser gelagert.

4.2.3 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Der nächste Schritt ist nun die instabile mRNA in die für die Genexpression verwertbare komplementäre DNA (cDNA) zu konvertieren, was mit Hilfe des Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics, USA) gemacht wurde. Das Enzym Reverse Transkriptase ermöglicht es, aus der mRNA eine cDNA zu gewinnen. Die cDNA ist stabiler als mRNA und ist im Gegensatz zu genomischer DNA Intronfrei. Introns (nicht-codierende DNA-Abschnitte) werden vor der Translation aus der mRNA gespleißt, da sie keine relevante Information beinhalten.

Die dazu verwendeten Komponenten:

Tabelle 4.1: RT-PCR Mix

Reagenz	Volumen	Konzentration
10 x Reaction buffer	2,0 µl	1 x
25 mM MgCl ₂	4,0 µl	5 mM
Deoxynucleotide Mix	2,0 µl	1 mM
Oligo-p(dT) ₁₅ Primer	2,0 µl	1,6 µg
RNase-Inhibitor	1,0 µl	50 units
Reverse Transcriptase	0,8 µl	> 20 units
mRNA – Probe	12 µl	
Total	20 µl	

Protokoll der RT-PCR

- 30 min für 55 °C für Primer
- 60 min für 50 °C für die reverse Transkriptase
- 5 min für 85 °C zur Inaktivierung der reversen Transkriptase

Die RT-PCR wurde mit Robocycler von Stratagene durchgeführt. Die anschließend daraus entstehende cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

4.3 PCR

4.3.1 Prinzip der PCR Methode

Polymerase Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, die es ermöglicht, genau definierte DNA-Fragmente zu amplifizieren. Spezifische Primer haften an ganz bestimmten DNA-Sequenzen und sorgen mit jedem einzelnen Zyklus für eine quantitative Amplifikation sprich eine identische Vervielfältigung dieses selektiven Bereichs.

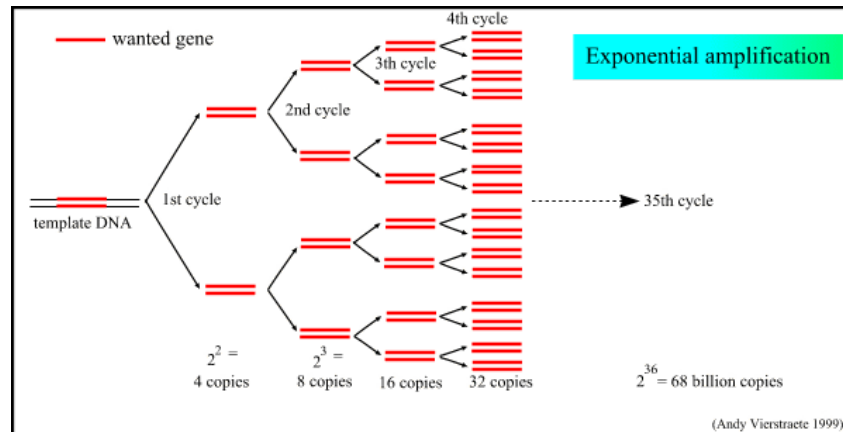


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Zyklen und der somit resultierenden Vervielfältigung (Modifiziert nach users.ugent.be).

Der PCR-Prozess besteht aus den 3 folgenden Schritten:

- 1. Denaturierung:** Die doppelsträngige DNA wird auf 95 °C erhitzt, um einzelne DNA Stränge zu erhalten. Damit sich die Original-DNA und die Primer vollständig voneinander trennen, verweilen sie für eine längere Zeit bei dieser Temperatur.
- 2. Primer Annealing:** Hier wird eine genau abgestimmte primerspezifische Temperatur gewählt, die eine Anlagerung der Primer an die Einzelstränge der DNA ermöglicht. Ist die Temperatur zu niedrig, kann ein unspezifisches Produkt entstehen. Ist jedoch die Temperatur zu hoch, ist es den Primern nicht möglich sich an die DNA anzulagern und entsteht kein Produkt.
- 3. Elongation:** Das Enzym, DNA Polymerase, bindet sich bei 72 °C an das 3' terminale Ende des Primers, wandert am DNA Strang entlang und synthetisiert den neuen komplementären Strang.

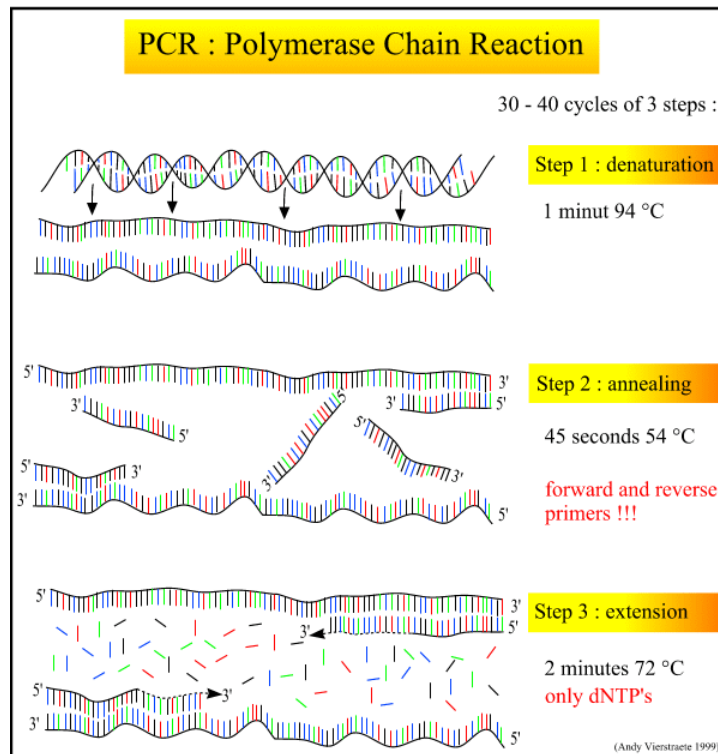


Abbildung 4.3: Ablauf der einzelnen PCR Schritte (Modifizierte Abbildung nach users.ugent.be).

Für die Amplifikation der DNA benötigt man zusätzlich zur DNA spezifische Primer, das Enzym DNA-Polymerase, etwa 1,5 mM $MgCl_2$ und Deoxinukleotid-Triphosphate in einer Konzentration von 400 μM .

4.4 Real-Time PCR

In dieser Arbeit wurde die Genexpression ausschließlich mit der Real-Time PCR nachgewiesen.

Der Hauptunterschied zur normalen PCR besteht darin, dass man den Vorgang der einzelnen Schritte in Echtzeit mitverfolgen kann. Verschiedene Fluorophore sind erhältlich für Verwendung in quantitativer Real-Time PCR. In dieser Diplomarbeit wurde SybrGreen verwendet.

SybrGreen ist ein Farbstoff mit fluoreszierender Eigenschaft, welcher sich nur an doppelsträngige DNA haftet, jedoch nicht an eine einzelsträngige DNA. Am Ende der Elongation eines jeden PCR-Zyklus wird die Fluoreszenz gemessen. Die Zunahme an PCR-Produkten kann anhand der Steigerung der Fluoreszenz verfolgt werden. Im Vergleich zu Proben bekannter Konzentration kann die Menge an eingesetzter cDNA bestimmt werden. Die Steilheit der Kurve gibt Auskunft über die Effizienz der Reaktion und erlaubt Rückschlüsse auf eventuell vorhandene inhibitorische Substanzen. Mit Hilfe einer Schmelzkurve am Ende der Amplifikation kann festgestellt werden, ob nur ein spezifisches Produkt für die Zunahme der Fluoreszenz verantwortlich war, oder ob unspezifische Produkte oder Primer-Dimere entstanden sind.

4.4.1 Auswertung der quantitativen Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR Auswertung ergibt sich über besagende C_T -Werte oder auch unter „Threshold Cycle“ bekannt. (Abb.: 4.4) Aus diesen ist die Maßeinheit der primären DNA-Menge in der Probe zu berechnen. Unter Threshold Cycle versteht man jenen PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenz erstmals über das Grundrauschen ansteigt. Je mehr DNA-Moleküle anfangs eingesetzt wurden, desto früher kann man einen Anstieg beobachten. Ein Schwellenwert wird festgelegt, bei dem die Verdünnungsreihe einer Probe oder eines Standards in Abständen von 3,3 Zyklen über dem Grundrauschen liegen. An diesem Schwellenwert werden die C_T -Werte aller Proben gemessen, weil man davon ausgeht, dass dann die Quantifizierung am zuverlässigsten ist, wenn auch die Standards in Abständen von 3,3 Zyklen ansteigen.

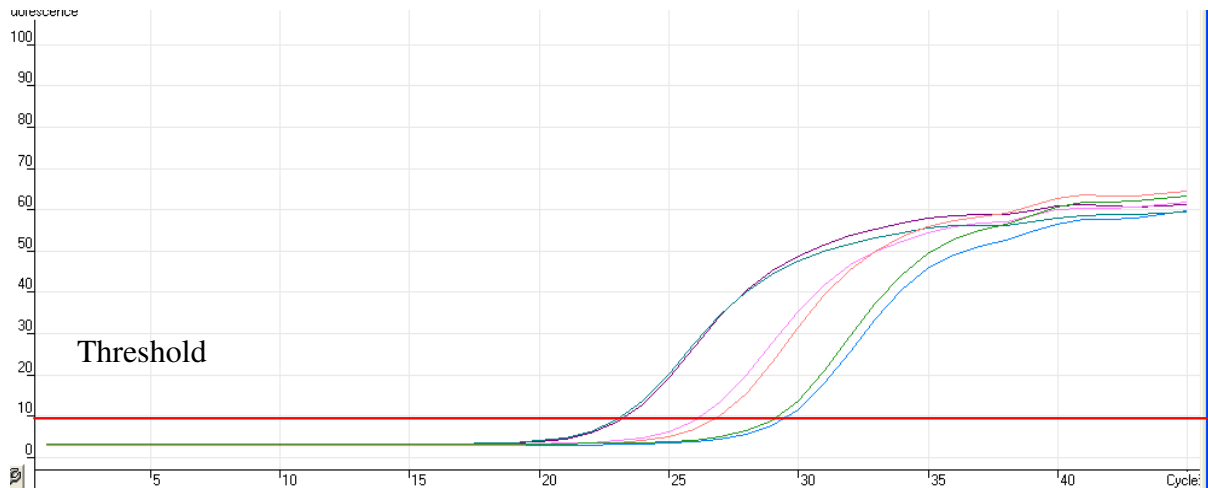


Abbildung 4.4: Darstellung einer quantitativen PCR Amplifikation

Anhand der Schmelzkurve kann man Primer-Dimere von gewünschtem PCR-Produkt unterscheiden und so ein aussagekräftiges Resultat erlangen.

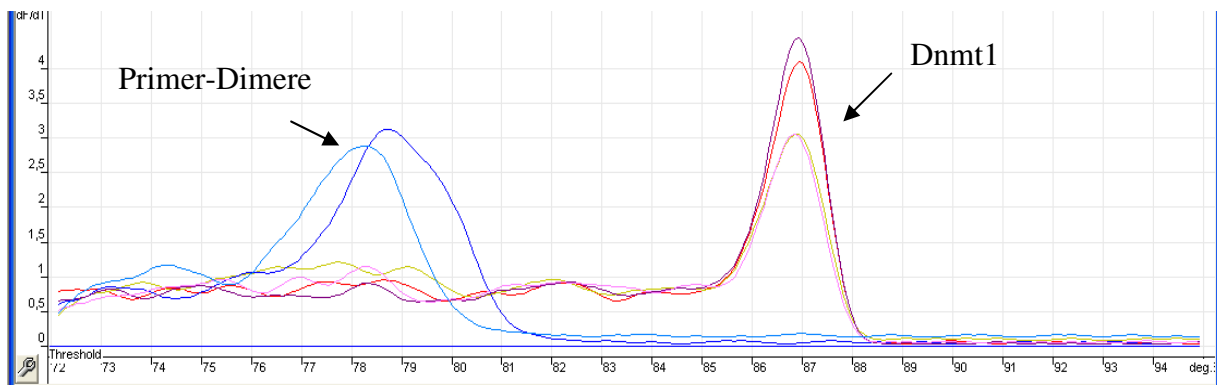


Abbildung 4.5: Beispiel einer Schmelzkurven-Analyse

Primer-Dimere haben eine geringe Schmelztemperatur, weil sie nur maximal so lang wie die beiden Primer zusammen sind, und können so anhand der Schmelzkurve vom gewünschten Amplikon unterschieden werden. Die Schmelzkurve wird erstellt, indem die Temperatur in 0,5°C Schritten erhöht wird. Der Schmelzpunkt ist die Temperatur, bei der das doppelsträngige Amplikon vollständig denaturiert ist und einzelsträngig vorliegt. Mit der Denaturierung nimmt auch die Fluoreszenz ab, da Sybr Green nur in doppelsträngiger DNA interkaliert.

Auswertung:

Die PCR ist exponentiell, in jedem Zyklus verdoppelt im Idealfall die Anzahl der Amplikons.

$$N = N_0 \times 2^n$$

N: Anzahl der Amplikons

N_0 : Ausgangsmenge

n: Anzahl der Amplifikationszyklen

2: für jedes Amplikon wurden 2 neue Kopien erhalten

Um eine optimale Effizienz zu erreichen, steigen die einzelnen Werte einer Verdünnungsreihe im Abstand von 3,3 Zyklen an.

$$\text{Eff} = 10^{(1/\text{Steigung}) - 1}$$

Eff: Effizienz

Steigung: C_T 's einer Verdünnungsreihe

Die Effizienz sollte zwischen 90 – 100 % sein.

Beispiel: Effizienz: 1

$$N = 100 \times 1^{45}$$

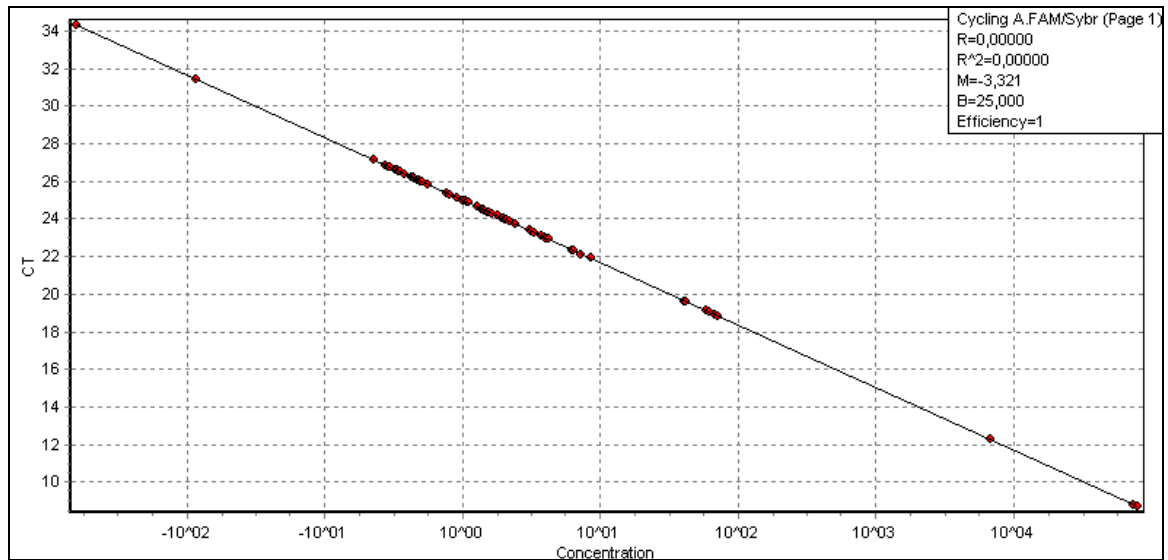


Abbildung 4.6: Standardgerade der Amplikons C_T-Werte mit bekannten Konzentrationen

Treten von dieser Idealvorstellung abweichende Effizienzen auf, kann man dies bei der Quantifizierung mittels Korrektur der Eichgerade berücksichtigen:

4.5 Real-Time PCR-Konditionen

Ermittlung der ausgewählten Enzymaktivitäten

Tabelle 4.2: verwendete Primersequenzen

Primer	Sequence	Reference
Dnmt1	Dnmt1 sense 5'- ACC GCT TCT ACT TCC TCG AGG CCT A -3' Dnmt1 antisense 5'- GTT GCA GTC CTC TGT GAA CAC TGT GG -3'	(Mizuno et al. 2001)
Dnmt3a	Dnmt3a sense 5'- CAC ACA GAA GCA TAT CCA GGA GTG -3' Dnmt3a antisense 5'- AGT GGA CTG GGA AAC CAA ATA CCC -3'	(Mizuno et al. 2001)
Dnmt3b	Dnmt3b sense 5'- AAC CGT GAA GCA CGA GGG GAA TAT -3' Dnmt3b antisense 5'- ACT GGA TTA CAC TCC AGG AAC CGT -3'	(Huntriss et al. 2004)
HDAC2	HDAC2 sense 5'- CAA TCT AAC AGT CAA AGG TCA TGC -3' HDAC2 antisense 5'- TGA AGT CTG GTC CAA AAT ACT CAA -3'	(Song et al. 2006)
Igf2r	Igf2r sense 5'- GTA AGA GAG GTG TGA GCA TGG GA -3' Igf2r antisense 5'- TCA CAT CAC ACC CAC GCA CTT C -3'	Designed von Thaler
E-cadherin	E-cadherin sense 5'- GAC GCG GAC GAT GAT GTG AAC -3' E-cadherin antisense 5'- TTG TAC GTG GTG GGA TTG AAG A -3'	(Saito et al. 2001)
IL-8	IL-8 sense 5'- ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT -3' IL-8 antisense 5'- TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT C -3'	(Li et al. 2004)

MnSOD	MnSOD sense 5'- AAG GGA GAT GTT ACA GCC CAG ATA -3' MnSOD antisense 5'- TCC AGA AAA TGC TAT GAT TGA TAT GAC -3'	(Thaler et al. 2008)
G6PD	G6PD sense 5'- ATC GAC CAC TAC CTG GGC AA -3' G6PD antisense 5'- GAT GCA TTT CAA CAC CTT GAC CT -3'	(Thaler et al. 2008)

Tabelle 4.3: verwendete Primerkonzentrationen mit spezifischer Annealing Temperatur

Primer	Primer Konzentration	Annealing Tm
Dnmt1	2,5 pMol	67 °C
Dnmt3a	8 pMol	67 °C
Dnmt3b	2,5 pMol	67 °C
HDAC2	15 pMol	67 °C
Igf2r	2,5 pMol	67 °C
E-Cadherin	5 pMol	67 °C
IL-8	2,5 pMol	64 °C
MnSod	5 pMol	67 °C
G6PD	5 pMol	67 °C

Die Genexpression der ausgewählten Markern wurde durch ROTORGENE (RG 3000a von Corbett Research) ermittelt. Als Housekeeping Gen wurde das G6PD genommen, da es als sehr gut erforschtes Gen gilt, und in allen Zellphasen gleich zu exprimiert wird. Durch diese Eigenschaft dient es daher als sehr gute Referenz und Vergleichsbasis zu den anderen Markern.

Real-Time PCR Zusammensetzung des Mastermix für eine Probe:

Tabelle 4.4: RT-PCR Mastermix

Reagenz	Volumen
Master Mix (4mM MgCl ₂)	5 µl
Primer	2 µl
H ₂ O	1 µl
Probe	2 µl
Total	10 µl

Die Real-Time Konditionen:

- DNA Denaturierung bei 95 °C mit 30 sek
- Annealing: alle Enzyme bis auf das IL-8 bei 67 °C mit 40 sek
IL-8 bei 64 °C mit 40 sek
- Elongation: bei 72 °C mit 30 sek
- 45 Amplifikationszyklen

Bei jedem Real-Time PCR Lauf wurde das G6PD parallel zu den anderen Zielgenen untersucht und Leerkontrollen für jedes Primerpaar (ohne template) gemacht.

4.6 Agarose Gelelektrophorese

Die Agarose Gelelektrophorese dient dazu die Intaktheit der cDNA zu überprüfen bzw. amplifizierte Banden sichtbar zu machen und anhand der Leerkontrolle zu prüfen, ob keine Verschmutzung in den Mastermix gelangt ist. Hierbei werden DNA oder RNA Moleküle der Größe nach aufgetrennt. Das 1%ige Agarose-Gel setzt sich zusammen aus 3 Gramm Agarose (Genexpress) auf 300 ml 1xTAE Puffer (Appli-Chem). Dafür wurden 6 µl Probe mit 2 µl Loadingdye (Fermentes) vermischt und auf ein 1%iges Agarose-Gel aufgetragen. Neben den Proben wird noch zusätzlich vergleichsweise eine 100bp DNA-Leiter (Fermentes) auf das Agarosegel mit aufgetragen. Das Auftrennen der Fragmente findet bei ca. 130 Volt für ca. 1 ½ Stunden in der Gelelektrophorese (Scientific) statt. Visualisierung der Banden erfolgt in UV-Licht nach Ethidiumbromid-Färbung (ROTH).

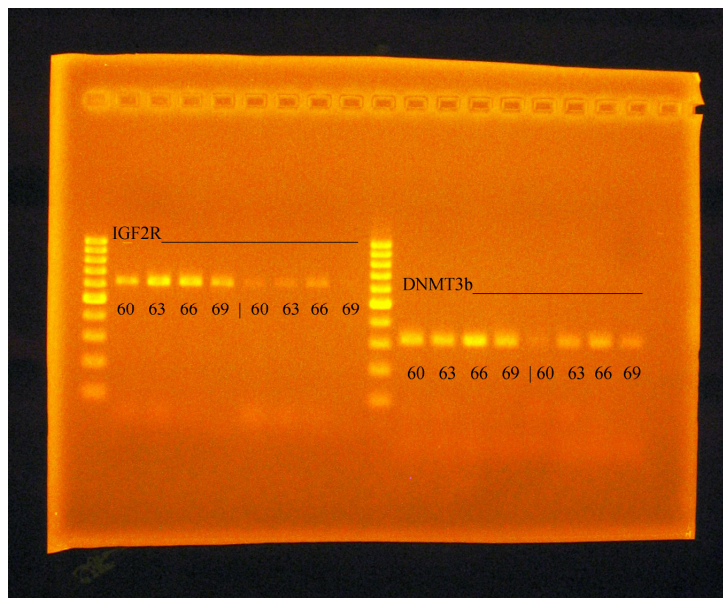


Abbildung 4.7: Das bearbeitete Agarosegel unter der UV-Lampe (Vilber Lourmat) sichtbar gemacht.

5 ERGEBNISSE

Dieser Teil der Arbeit dient der Erläuterung und Darstellung der erforschten Ergebnisse. Caco-2 Zellen wurden mit verschiedenen Behandlungssubstanzen versetzt, um ihren Einfluss auf die Genexpression zu ermitteln.

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte mittels Microsoft Office Excel 2003 und dem Programm für Rotor Gene.

Für die Auswertung der Ergebnisse wurde mittels Erfassung der Amplifikation jedes einzelnen Primers der Median und die Standardabweichung berechnet. Die Genexpressionsunterschiede wurden durch eine vergleichende Quantifizierung (=hypothetischen Konzentration) gemessen. Jede Probe wurde 4fach bestimmt.

$$\frac{\text{(hypothetische Konzentration) behandeltes Gen}}{\text{(hypothetische Konzentration) Referenzgen}} \cdot 100$$

Anhand der Amplifikation wurde die Effizienz errechnet.

$$\text{Amplifikation} / 2 = \text{Effizienz}$$

Die Genexpression wurde mit Hilfe der PCR Effizienz korrigiert.

Beispiel für die Berechnung der Genexpression anhand des IL-8

Tabelle 5.1: Korrelation zwischen Primer und Referenzgen

			G6PD			
IL-8	IL-8	IL-8 K	IL-8	IL-8 K	Gen/Rgen 1L	Gen/Rgen K
FS	7575,926	6371,069	1848,752	1587,844	409,786	401,240
FS K	6991,372	6684,29		1555,916		429,640
	MW	6905,799	MW	1664,171		
	Stbw	513,535	Stbw	160,647		

Die Genexpression der jeweiligen Probe wurde mit dem Housekeeping Gen G6PD prozentuell verglichen. Das G6PD dient mit 100 % als Vergleichsstandard.

Nach dem Vergleich mit dem Referenzgen wird das Resultat auf die jeweilige unbehandelte Plattenkontrolle korreliert.

Tabelle 5.2: Korrelation zwischen bereits ausgewertetem Referenzgen zur Kontrolle

Gen/Rgen 1L	Gen/Rgen K	1L/Plattenkontrolle	KL/Plattenkontrolle
409,786	401,240	227,065927	222,330709
	429,640		238,066993
		MW	229,154543
		Stbw	8,07337555
		Ergebnis:	229,154
		Genexpressionszuwachs von 129,154 %	

5.1 Ergebnisse der Genexpression

Die nach der Real – Time PCR erfassten Daten werden zunächst prozentuell zu dem Referenzgen G6PD berechnet. Das G6PD wird als 100 % angenommen, und anhand der vergleichenden Quantifizierung, einer sogenannten hypothetischen Konzentration der prozentuelle Anteil zum G6PD berechnet. Dieser dargelegte Anteil wird anschließend zur Nullkontrolle referiert und ergibt die gesuchte Genexpression. Jede untersuchte Probe wurde in 4facher Bestimmung ausgewertet.

5.1.1 Interleukin-8

Bei der Expression von Interleukin 8 ist zu bemerken, dass eine stärkere Genexpression als beim Housekeeping Gen G6PD vorhanden war. Nach Inkubation mit Folsäure lag der Median der Expression von IL-8 bei $413,6 \pm 14,6$; bei Vitamin B12 lag er bei $561,7 \pm 222,3$; Genistein erreichte $483,8 \pm 129,8$; während Valproat einen Median von $1160 \pm 356,9$; Homocystein $335 \pm 20,9$; Genistein $5\mu\text{l}$ $427,5 \pm 36,3$; Zebularine $205,8 \pm 25$ erwiesen. Inkubation mit Lipopolysaccharid (LPS) lag die Expression beim Median bei $340 \pm 107,9$; LPS + Valproat $1696,7 \pm 255,9$; LPS + Zebularine $707,7 \pm 518$; Genistein + Valproat $1439,3 \pm 1199$ und Homocystein + Zebularine 357 ± 154 .

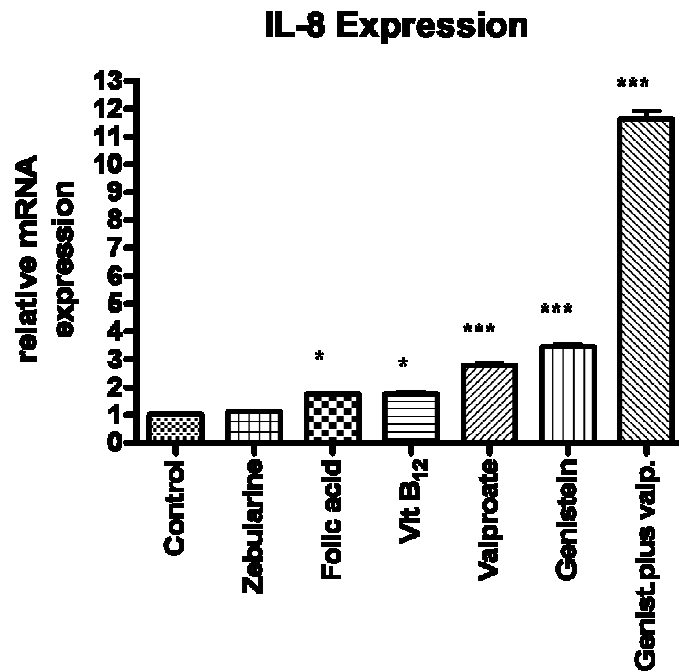


Abbildung 5.1: IL-8 Expression im Vergleich der nichtbehandelten Zelle mit den Zellen die mit den angeführten Substanzen versetzt wurden (Thaler et al. 2008).

Inkubation mit Genistein führte zu einem signifikanten Genexpressionsanstieg auf das 3,58fache ($\pm 0,22$), während Valproat (HDAC-Inhibitor) die Genexpression des IL-8 um das 2,70fache ($\pm 0,17$) steigert. Die Kombination der Substanzen Genistein mit Valproat führte zu einem höheren Anstieg von 12,02 ($\pm 0,40$). Die Ergebnisse unterscheiden sich signifikant zur Nullkontrolle bei $p < 0,001$. Die IL-8 Expression nach Inkubation mit Folsäure stieg um das 2,18fache ($\pm 0,44$). Inkubation mit Vitamin B12 führte zu einem Zuwachs um das 2,20fache ($\pm 0,36$). Zebularine Exposition zeigte keine signifikante Wirkung auf die Expression von IL-8 in Caco-2 Zellen ($p < 0,05$).

5.1.2 Histondeacetylase2

Bei der Expression von HDAC2 wurden folgende Werte erzielt: Folsäure 181069 ± 50322 ; Vitamin B12 150061 ± 11256 ; Genistein 54456 ± 20345 ; Valproat 153831 ± 93765 ; Homocystein 120523 ± 28675 ; Genistein 5 μ l 164090 ± 13635 ; Zebularine 97241 ± 55400 ; LPS 118786 ± 32438 ; LPS + Valproat 125982 ± 31691 ; LPS + Zebularine 121580 ± 33455 ; Genistein + Valproat 61537 ± 17304 und Homocystein + Zebularine 138147 ± 35120 .

5.1.3 DNA Methyltransferase1

Bei der Expression von Dnmt1 wurden folgende Werte beobachtet: Folsäure 61 ± 20 ; Vitamin B12 68 ± 27 ; Genistein 46 ± 10 ; Valproat 62 ± 2 ; Homocystein 106 ± 11 ; Genistein 5 μ l 55 ± 2 ; Zebularine $59,6 \pm 9,8$; LPS $77 \pm 23,7$; LPS + Valproat $61 \pm 32,8$; LPS + Zebularine $56,6 \pm 7$; Genistein + Valproat $46,87 \pm 28,5$ und Homocystein + Zebularine $43,9 \pm 11,2$

5.1.4 DNA Methyltransferase3a

Bei der Expression von Dnmt3a waren bei der Folsäure ein Wert von $1685,8 \pm 111$; bei Vitamin B12 $3555 \pm 992,7$; bei Genistein $1486,5 \pm 168,8$; bei Valproat 2114 ± 491 und bei Homocystein $5371 \pm 190,5$ zu finden. Bei Genistein 5 μ l lag der Median bei $4649,7 \pm 2430,7$ und bei Zebularine bei $2713 \pm 457,6$. LPS zeigte einen Wert bei 2312 ± 737 ; LPS + Valproat bei $2046,8 \pm 1646$; LPS + Zebularine bei $1711,6 \pm 217$; Genistein + Valproat $1013,8 \pm 529,7$ und Homocystein + Zebularine bei $4684 \pm 1343,5$.

5.1.5 DNA Methyltransferase3b

Bei der Expression von Dnmt3b wurde ein Wert bei der Folsäure von $710,8 \pm 420,5$; bei Vitamin B12 bei 412 ± 22 . Genistein erzielte einen Wert von $231,5 \pm 717$; während Valproat bei 785 ± 57 und Homocystein bei $333,6 \pm 129,6$ lagen. Genistein 5 μ l hatte einen Wert bei $403,7 \pm 33$; Zebularine bei $523,8 \pm 201,7$; LPS bei $448 \pm 140,8$; LPS + Valproat bei $458 \pm 82,7$; LPS + Zebularine bei $359,7 \pm 117,4$; Genistein + Valproat bei $354 \pm 97,8$ und Homocystein + Zebularine bei $357,6 \pm 59$.

5.1.6 Mangan Superoxid Dismutase

Bei der Expression von MnSOD ergab sich bei der Folsäure ein Wert von 2502 ± 1386 und bei Vitamin B12 bei $1887 \pm 1115,5$. Bei Genistein wurde ein Wert bei $693,5 \pm 194,7$ erreicht, jedoch bei Valproat findet sich der Wert bei $1918,9 \pm 552$ und bei Homocystein $1454 \pm 1074,6$ wieder. Bei Genistein $5\mu\text{l}$ ermittelte man einen Wert von $1360 \pm 165,6$ und bei Zebularine bei $1303,9 \pm 431$. Bei LPS zeigte sich bei $1441 \pm 113,6$; bei LPS + Valproat bei $2333,7 \pm 155,5$ und bei LPS + Zebularine ein Wert bei $1045,5 \pm 189,9$. Der Wert bei Genistein + Valproat lag bei 668 ± 123 und bei Homocystein + Zebularine bei $1943,9 \pm 539,9$.

5.1.7 E-Cadherin

Bei der Expression von E-Cadherin beobachtete man folgende Werte: Folsäure $4908,6 \pm 1915,7$; Vitamin B12 bei $6499 \pm 2444,7$; Genistein $2648 \pm 99,6$; Valproat 2777 ± 423 ; Homocystein $4036,8 \pm 1241,7$; Genistein $5\mu\text{l}$ $7551,9 \pm 2179$; Zebularine $7112,8 \pm 2492$; LPS 5392 ± 2832 ; LPS + Valproat $2743 \pm 62,8$; LPS + Zebularine $2899,7 \pm 256,7$; Genistein + Valproat $3557,9 \pm 1255,7$; Homocystein + Zebularine 8356 ± 2373 .

5.1.8 Insulin-like growth factor 2 receptor

Bei der Expression von Igf2r erhob man bei der Folsäure einen Wert bei $319,5 \pm 104,7$; bei Vitamin B12 bei $405,6 \pm 26,6$ und bei Genistein bei $208,9 \pm 29,7$. Weiters lag der Wert beim Valproat bei 346 ± 72 ; beim Homocystein $304 \pm 31,2$; bei Genistein $5\mu\text{l}$ $351 \pm 149,7$ und beim Zebularine bei $421,9 \pm 33,6$. LPS zeigte einen Median bei $353,9 \pm 92$; bei LPS + Valproat bei $249,8 \pm 7,6$; bei LPS + Zebularine $245 \pm 8,2$; bei Genistein + Valproat $261,8 \pm 170,8$ und bei Homocystein + Zebularine $678,6 \pm 63$.

6 DISKUSSION

Ziel dieser Arbeit war es, methodische Grundlagen für Analysen der Genexpression aussortierter Marker zu dokumentieren. Das Caco-2 Zellmodell etabliert aus einem Colonadenokarzinom, diente als Grundlage der Analyse der Genexpression ausgewählter Marker mit zunehmender Steuerung epigenetischer Mechanismen. Valproat, Zebularine sowie einiger Nährstoffe in Lebensmitteln wurden getestet.

Strikte Regulierung immunmodulatorischer Proteine ist wichtig für die Initiation einer Entzündungskaskade wie chemoattraktive Cytokine. Es ist wesentlich den Beginn einer zwanglosen Immunaktivität zu verhindern. Anhand der Caco-2 Zelllinie konnte nachgewiesen werden, dass Zelldifferenzierungen eine immunaktivierte Transkription von IL-8 Genen verhindern, ein Mechanismus der von einer histondeacetasen-vorausgesetzten Aktivität abhängig ist.

Die Caco-2 Zellen sind anfänglich in einem verhältnismäßig undifferenzierten Zustand. Erst nach der Behandlung mit den ausgewählten Substanzen entwickeln sie spontan Marker eines differenzierten Phänotyps, samt Expression verdauungsfördernder Enzyme, bestimmter Ionentransporte, Tight Junctions, gut entwickeltem Bürstensaum und einer polarisierenden Morphologie (Wen und Wu 2001).

Anhand einer Sequenzierung der behandelten Zelle, zeigte sich auch beim Interleukin-8 eine verstärkte CpG Methylierung an den Stellen -1342 bp und -1412 bp sowie eine Steigerung der Expression (Thaler et al. 2008). Im Kapitel 3.5.2.3 wurde das Interleukin-8 als ein bedeutender Entzündungsmediator in der Immunantwort, aber auch in der Pathogenese der Atherosklerose beschrieben.

Es ist allgemein bekannt, dass Homocystein ein Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen ist. Eine hohe Menge an Homocystein führt zu einer Aktivität des IL-8. Die Auswirkungen des Homocysteins werden in erster Linie mit dem ROS (reactive oxygen species) durch die NAD(P)H oxidase sichtbar. Das Homocystein sorgt für eine vermehrte Produktion des ROS und inhibiert die Proteinkinase C, Calmodulin, freie Radikalfänger oder die NAD(P)H oxidase, welche die homocysteininduzierte ROS-Produktion und IL-8 in diesen Zellen hemmen. Studien zeigten, dass Homocystein eine Expression und Sekretion von IL-8 in humanen Endothelzellen der Aorta

verursacht. IL-8 wird durch Makrophagen in humanen Läsionen exprimiert. Hyperhomocysteinemia kann durch Chemokineproduktion von Monozyten und Makrophagen Atherogenesis herbeigeführt werden. Dadurch werden Leukozyten in vaskuläre Verletzungen infiltriert, die zur einer vaskulären Entzündung führen kann. (Zeng et al. 2003).

Studien belegen auch, dass ein hoher Homocysteinspiegel durch B-Vitaminsupplemente herabgesetzt werden konnte. Folsäure und Vitamin B12 sind Komponenten, die nicht nur beim DNA-Methylierungsweg eine bedeutende Rolle spielen, sondern auch dafür bekannt sind, die Histonacetylierung ebenso wie Genistein zu beeinflussen. Die hier in der Arbeit behandelte Caco-2 Zelle mit Folsäure oder Vitamin B12 zeigte einen signifikanten Anstieg bei CpG Methylierung, jedoch keine Abnahme bei der Genexpression, wie es normalerweise der Fall wäre. Dies ließ den Schluss zu, dass eine Methylierung an diesen CpG-Islands keinen Einfluss auf die IL-8 Genexpression hat.

Zellen die mit Zebularine, einem DNA-Methyltransferase Inhibitor, behandelt worden waren, zeigten eine erhöhte Demethylierung der CpG-Islands besonders bei ca. -1,3 kb. Seid dem Ergebnis, dass Zebularine für seine Funktion einer verminderten DNA-Methylierung bekannt ist, verwendet man spezielle Dnmts, Dnmt3a und Dnmt3b, nämlich für jene 2 erwähnten CpG Stellen die methylieren. Allgemein bekannt ist auch die Verknüpfung zwischen Dnmts und Hdacs sowie Histonmethylierungstranferasen, die zusätzlich zu einem „Gensilencing“ führen (Thaler et al. 2008).

Bei nicht differenzierten Caco-2 Zellen, die mit Valproat, einem Histondeacetylierungsinhibitor oder Genistein versetzt wurden, konnte ein starker Anstieg der Genexpression durch eine Steigerung der Histonacetylierung beobachtet werden. Eine Kombination der beiden Komponenten zeigte jedoch den stärksten Effekt. Das Genistein, ein Isoflavone, das überwiegend in Sojabohnen enthalten ist, führt zu einer Histonacetylierung durch einen Östrogenrezeptor α (ER α), welcher in Cacos weniger vorhanden ist (Thaler et al. 2008).

Genistein besitzt eine antioxidative sowie eine unterdrückende Wirkung des Tumorstwachstums, bedingt durch antiproliferative und antiangiogenetische Mechanismen. Ein vermehrter Konsum von Soja-Isoflavonen zeigte in Asien einen Zusammenhang mit vermindertem Auftreten von Prostatakrebs. Im Vergleich zu westlichen Ländern

ist Prostatakrebs die zweithäufigste Todesursache bei Männern. Der Genuss von sojaisoflavonoidreichen Lebensmitteln wurde mit einem verringerten Risiko an einer Erkrankung an Prostatakrebs assoziiert. Anhand des humanen PC-3 Prostatakrebs Zellmodells in der Studie von Handayani wurde eine verringerte Regulierung des IL-8 beobachtet. Diese Erkenntnis ist ein wichtiger Hinweis auf IL-8 bekannte Mechanismen einer Stimulation einer Angiogenese, Tumorgenizität und eines metastasenbildenden Potential in unterschiedlichen Krebszelltypen (Handayani et al. 2006).

So ist auch anhand dieses Beispiels erwiesen, dass bestimmte Mengen eines bzw mehrerer Inhaltsstoffe wie z.B.: Genistein zu einer verringerten Pathogenese einzelner Krebsarten führen kann.

7 SCHLUSSBETRACHTUNG

Unser Gesundheitszustand wird stark von unserer Umwelt und Lebensstil beeinträchtigt. Immer mehr Krankheiten werden mit Ernährung und anderen äußeren Reizen in Verbindung gebracht. Das Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zu etablieren, welches als Nachweis ernährungsrelevanter Faktoren auf epigenetische Regulatoren und Genexpression dienen soll. Getestet wurden pharmakologische Substanzen und Lebensmittelinhaltsstoffe um deren Einfluss auf die Regulationsmechanismen der ausgewählten Proteine zu untersuchen. Am Beispiel des Interleukin-8 zeigte sich eine erhöhte Genexpression durch die Supplementierung von Sojaisoflavin Genistein und/oder Valproat. Ein weiterer starker Einfluss wurde auch beim Adhäsionsmolekül E-cadherin verzeichnet.

Dieses Modell dient einem besseren Verständnis in Krankheitsfällen mit entarteter epigenetischer Steuerung, welche durch Ernährung und Umwelt beeinflusst wurden. Mit Hilfe dieser Ergebnisse kann in Zukunft ein Fundament einer individuell angepassten Diät zur begleitenden Therapie mit ernährungsphysiologischen Modifikationen von Methylierungsmustern bei der Tumorgenese und anderen Erkrankungen geboten werden.

8 ZUSAMMENFASSUNG

Die Epigenetik wird als, „Vererbung von Informationen basierend auf Genexpression statt auf Gensequenzen“, beschrieben (Junien 2006).

Ein weiteres Merkmal der Epigenetik ist der gesteuerte Einfluss äußerer Reize, wie Ernährung auf die Genexpression. Das durch epigenetischgesteuert verursachte „Gensilencing“ wird nicht nur im Bereich der Kanzerogenese verfolgt, sondern auch bei vielen anderen Krankheiten wie Adipositas, Herzkrankheiten, Diabetes, Autoimmunkrankheiten uvm. (Kargul und Laurent 2008)

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein Modell zu etablieren, welches die Einflüsse ausgewählter Lebensmittelinhaltsstoffe auf die epigenetische Steuerung der Expression relevanter Gene ausübt. Dazu wurde die Caco-2 Colonzellkulturlinie verwendet.

Als pharmakologisch bekannte Standards wurden Valproat als HDAC-Inhibitor für die Histonmodifikation in der Epigenetik, und Zebularine ein DNA Methylierungsinhibitor getestet. Zu den zu erforschenden Lebensmittelinhaltsstoffen zählen Folsäure, Genistein, Homocystein und Vitamin B12. Diese Substanzen wurden auf die epigenetische Steuerung relevanter Gene wie Demethylierungstransferasen, Histondeacetylasen, Insulin-like growth factor 2 Rezeptor, das Zelladhäsionsmolekül E-cadherin, der Entzündungsmediator IL-8 und das antioxidative Entgiftungsenzym MnSOD untersucht.

Mit Hilfe der Real Time PCR wurde die Auswirkung der Substanzen auf die Expression dieser ausgewählten Enzyme ermittelt. Das G6PD dient als Housekeeping Kontrollgen, an welches die ermittelten Ergebnisse referiert wurden.

Am Beispiel des Interleukin-8, das in dieser Arbeit besonders diskutiert wird, zeigte sich eine erhöhte Genexpression durch die Supplementierung von Sojaisoflavin Genistein und/oder Histonacetylierungsinhibitor Valproat. Dies konnte durch eine gesteigerte Histonacetylierung erfasst werden, die durch diese beiden Komponenten epigenetisch reguliert wurden.

Die Ergebnisse zeigen nicht nur einen starken Einfluss auf epigenetische Steuerung bei der Expression des immunologischen Mediators Interleukin-8, sondern auch des Adhäsionsmoleküls E-cadherin.

Diese starke Wirkung der Nahrungsinhaltsstoffe auf die epigenetische Genregulie-

rung, wie Methylierung in Promotorregionen aber auch Effekte auf das Histon, könnte für individuell angepasste Diät zur begleitenden Therapie in Krankheitsfällen mit einer entarteten epigenetischen Steuerung entwickelt werden.

9 SUMMARY

Epigenetics is defined as „the inheritance of information based on gene expression levels rather than on gene sequence” (Junien 2006).

Another attribute of epigenetics is the regulated influence like nutrition on gene expression. The Gensilencing which is steered by epigenetics is not only shown in cancer but also in many other diseases such as obesity, heart diseases, diabetes, and autoimmune disease. (Kargul und Laurent 2008)

The aim of this work was to establish a model which demonstrates the influences of selected food components on the expression of relevant genes. Thus for the colon cell line Caco-2 was taken.

Pharmacological standards as Valproat for inhibition of histone modification and Zebularine a DNA methylation inhibitor were tested. For the nutritional components were chosen folic acid, genisteine, homocysteine and vitamin B12. Those substances were researched into epigenetics caused regulation gene like demethylation-transferases, histone deacetylases, Insulin-like growth factor 2 receptor, cell adhesion molecule E-cadherin, chemokine Interleukin-8 and the antioxidative enzyme MnSOD.

The effects of these food components on the selected genes were demonstrated with the real time PCR. As the housekeeping gen conduced G6PD to the results as a reference.

The particular discussed Interleukin-8 has shown an increased gene expression by supplementation of the soyaisoflavone genisteine and/or histone deacetylation inhibitor Valproat. This achieves by an enhanced histone acetylation caused by the epigenetic regulation of those two components.

The results do not only show an intensely influence of an epigenetic controlled expression of immune mediator Interleukin-8 but also of adhesion molecule E-cadherin. This powerful effect of nutritional contents on the epigenetic gene regulation as methylation on promoterregions and also impacts on histones could be made useable to an individually adapted diet next to an attendant therapy for diseases which pathogeneses are influenced by epigenetics.

10 LITERATURVERZEICHNIS

- Aggarwal B. B., Shishodia S., Sandur S. K., et al. Inflammation and cancer: How hot is the link? *Biochemical Pharmacology* 2006; 72: 1605-1621.
- Apostolidou S., Abu-Amero S., O'Donoghue K., et al. Elevated placental expression of the imprinted PHLDA2 gene is associated with low birth weight. *J Mol Med* 2007; 85(4): 379-87.
- Baulcombe D. C. Short silencing RNA: the dark matter of genetics? *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2006; 71: 13-20.
- Becker K.-F. Mutationen im Zelladhäsionsmolekül E-cadherin: von der Tumorbilogie zur individuellen Krebstherapie. 2000, München.
- Becker U. Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die tumorinduzierte Angiogenese in der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2. 2006, Gießen.
- Beermann W. Histonmodifikation in der Pathogenese bakterieller Infektion. 2007, Berlin.
- Brown T. A. *Moderne Genetik*. 1993; 2.Aufl., Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. 3
- Cockcroft C. Evolutionary origin of mammalian gene regulation unravelled 150 million years by Anglo-Australian-American consortium. 2008. Internet: http://www.innovations-report.de/html/berichte/biowissenschaften_chemie/bericht-113446.html. Letzter Zugriff: 09.08.2008
- Davis C. D. und Ross S. A. Dietary components impact histone modifications and cancer risk. *Nutr Rev* 2007; 65(2): 88-94.
- De Larco J. E., Wuertz B. R. K., Yee D., et al. Atypical methylation of the interleukin-8 gene correlates strongly with the metastatic potential of breast carcinoma cells. *PNAS* 2003; 100: 13988–13993.

- Dirscherl L. Neue Wege für die Krebsforschung - Enzymfalle beleuchtet Fehlfunktionen in der Zelle. 2005. Internet: http://www.innovations-report.de/html/berichte/biowissenschaften_chemie/bericht-49693.html. Letzter Zugriff: 10.08.2008
- Elmadfa I. und Leitzmann C. Ernährung des Menschen. 1998; 3. Aufl., Stuttgart (Hohenheim): Ulmer. 487-570
- Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. Nat Rev Genet 2007; 8(4): 286-98.
- Fang J. Y. und Xiao S. D. Folic acid, polymorphism of methyl-group metabolism genes, and DNA methylation in relation to GI carcinogenesis. Journal of Gastroenterology 2003; 38: 821-829.
- Gallou-Kabani C. und Junien C. Nutritional epigenomics of metabolic syndrome: new perspective against the epidemic. Diabetes 2005; 54(7): 1899-906.
- Hackl M. Krebsinzidenz und Krebsmortalität in Österreich. 2004, Statistik Austria.
- Handayani R., Rice L., Cui Y., et al. Soy isoflavones alter expression of genes associated with cancer progression, including interleukin-8, in androgen-independent PC-3 human prostate cancer cells. J Nutr 2006; 136(1): 75-82.
- Herceg Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. Mutagenesis 2007; 22(2): 91-103.
- Herranz M., Martin-Caballero J., Fraga M. F., et al. The novel DNA methylation inhibitor zebularine is effective against the development of murine T-cell lymphoma. Blood 2006; 107(3): 1174-7.
- Hirst M. und Marra M. A. Epigenetics and human disease. Int J Biochem Cell Biol 2008.
- Hodge D. R., Peng B., Pompeia C., et al. Epigenetic silencing of manganese superoxide dismutase (SOD-2) in KAS 6/1 human multiple myeloma cells increases cell proliferation. Cancer Biol Ther 2005; 4(5): 585-92.

- Huntriss J., Hinkins M., Oliver B., et al. Expression of mRNAs for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins in the human female germ line, pre-implantation embryos, and embryonic stem cells. *Mol Reprod Dev* 2004; 67(3): 323-36.
- Junien C. Impact of diets and nutrients/drugs on early epigenetic programming. *J Inherit Metab Dis* 2006; 29(2-3): 359-65.
- Kargul J. und Laurent G. J. Epigenetics and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2008.
- Kawasaki H. und Taira K. Induction of DNA methylation and gene silencing by short interfering RNAs in human cells. *Nature* 2004; 431(7005): 211-7.
- Kelly T. L. und Trasler J. M. Reproductive epigenetics. *Clin Genet* 2004; 65(4): 247-60.
- Krebshilfe-Krebsgesellschaft W. 100 Antworten auf Ihre Fragen zum Thema Krebs und Ernährung. 2008, Mauerbach: Wiener Krebshilfe.
- Lehen-Bevel I. Epigenetik: Vererbung ist mehr als die Summe der Gene. 2003. Internet:
<http://www.wissenschaft.de/wissenschaft/hintergrund/228254.html?page=2>.
Letzter Zugriff: 09.08.2008
- Li J., Moran T., Swanson E., et al. Regulation of IL-8 and IL-1b expression in Crohn's disease associated NOD2/CARD15 mutations. *Human Molecular Genetics* 2004; 13(16): 1715-1725.
- Lin H. Y., Chen C. S., Lin S. P., et al. Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med Res Rev* 2006; 26(4): 397-413.
- Lu Q., Qiu X., Hu N., et al. Epigenetics, disease, and therapeutic interventions. *Ageing Res Rev* 2006; 5(4): 449-67.
- Minucci A., Delibato E., Castagnola M., et al. Identification of RFLP G6PD mutations by using microcapillary electrophoretic chips (Experion). *J.Sep.Sci.* 2008; 31: 2694-2700.

- Mizuno S., Chijiwa T., Okamura T., et al. Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2001; 97(5): 1172-9.
- Nencioni A., Beck J., Werth D., et al. Histone Deacetylase Inhibitors Affect Dendritic Cell Differentiation and Immunogenicity. *Cli Cancer Res* 2007; 13(13): 3933-3941.
- Okano Y., Miki D. und Shimamoto K. Small interfering RNA (siRNA) targeting of endogenous promoters induces DNA methylation, but not necessarily gene silencing, in rice. *The Plant Journal* 2007; 53: 65-77.
- Poirier L. A. The effects of diet, genetics and chemicals on toxicity and aberrant DNA methylation: an introduction. *J Nutr* 2002; 132(8 Suppl): 2336S-2339S.
- Rautenstrauch J. Neuer Wirkstoff programmiert Tumorzellen um. 2005. Internet: http://www.innovations-report.de/html/berichte/biowissenschaften_chemie/bericht-46619.html. Letzter Zugriff: 09.08.2008
- Roloff T. C. und Nuber U. A. Chromatin, epigenetics and stem cells. *Eur J Cell Biol* 2005; 84(2-3): 123-35.
- Rossignol S., Netchine I., Le Bouc Y., et al. Epigenetics in Silver-Russell syndrome. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2008; 22(3): 403-14.
- Saito T., Oda Y., Sugimachi K., et al. E-cadherin gene mutations frequently occur in synovial sarcoma as a determinant of histological features. *Am J Pathol* 2001; 159(6): 2117-24.
- Schuster D. Analyse von Proliferationsmarkern und die Expression altersassoziierter bzw. Fettstoffwechsl-relevanter Gene in der Mundschleimhaut von verschiedenen Personengruppen. 2007, Wien.
- Schwarz M. Dem Geheimnis der Zelle auf der Spur. 2004. Internet: http://www.innovations-report.de/html/berichte/biowissenschaften_chemie/bericht-36524.html. Letzter Zugriff: 10.08.2008

- Scott R. Discovery - marsupials and humans shared same genetic imprinting 150 million years ago. 2008. Internet: http://www.innovations-report.de/html/berichte/biowissenschaften_chemie/bericht-114474.html. Letzter Zugriff: 09.08.2008
- Song K. H., Park Y. Y., Kee H. J., et al. Orphan nuclear receptor Nur77 induces zinc finger protein GIOT-1 gene expression, and GIOT-1 acts as a novel corepressor of orphan nuclear receptor SF-1 via recruitment of HDAC2. J Biol Chem 2006; 281(23): 15605-14.
- Thaler R., Aumeueller E., Kubala K., et al. Epigenetic regulation of IL-8 expression by histone acetylation and DNA methylation is modulated by food ingredients in Caco 2 cells. 2008, Submitted Manuskript
- Thaler R., Karlic H., Rust P., et al. Epigenetic regulation of human buccal mucosa mitochondrial superoxide dismutase gene expression by diet. Br J Nutr 2008: 1-7.
- Trepte A. Bioinformatik erschließt neue Strategien gegen Krebs. 2006. Internet: http://www.innovations-report.de/html/berichte/biowissenschaften_chemie/bericht-56099.html. Letzter Zugriff: 10.08.2008
- Van den Heuvel M. Wenn Gene nicht entpackt werden können: Mausmodell für gestörten Histonstoffwechsel etabliert. 2007. Internet: http://www.innovations-report.de/html/berichte/biowissenschaften_chemie/bericht-80275.html. Letzter Zugriff: 09.08.2008
- Wen X. und Wu G. D. Evidence for epigenetic mechanisms that silence both basal and immune-stimulated transcription of the IL-8 gene. J Immunol 2001; 166(12): 7290-9.
- Worm J. und Guldborg P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. J Oral Pathol Med 2002; 31: 443-9.
- Xie K. Interleukin-8 and human cancer biology. Cytokine Growth Factor Rev 2001; 12(4): 375-91.

Yoo C. B., Cheng J. C. und Jones P. A. Zebularine: a new drug for epigenetic therapy. *Biochem Soc Trans* 2004; 32(Pt 6): 910-2.

Zeng X., Dai J., Remick D. G., et al. Homocysteine mediated expression and secretion of monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in human monocytes. *Circ Res* 2003; 93(4): 311-20.

Zhu P., Martin E., Mengwasser J., et al. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell* 2004; 5: 455-463.

Internet: <http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html>. Letzter Zugriff: 22.11.2008

ANHANG

Publikation - Manuskript

Epigenetic regulation of IL-8 expression by histone acetylation and DNA methylation is modulated by food ingredients in CACO 2 cells

Roman Thaler¹, Eva Aumueller¹, Karoline Kubala¹, Petra Klein¹, Alexander G. Haslberger¹

Department of Nutritional Sciences, University of Vienna
Althanstrasse 14, A- 1090 Vienna, Austria

Corresponding author:

Alexander G. Haslberger

Institute of Nutritional Sciences of the University of Vienna,

Althanstrasse 14, UZAI

1090 Vienna, Austria

Contact

Tel. +43 1 4277 54996

e-mail: alexander.haslberger@univie.ac.at

Key Words: IL-8, DNA-methylation, histone acetylation, CACO-2 cell line, Vit B12, Folic Acid, Genistein

Abstract

High ectopic expression of IL-8 is seen in undifferentiated cells of various tumors and is correlated with metastatic potential and tumor growth. Increase in IL-8 gene expression was linked to an increase in methylation of the CpGs at - 1342 and - 1412 bp as well as histone modification. This study examined the relevance of methylation of different CpG sites and histone deacetylation as well as food ingredients effecting epigenetic pathways for the expression of IL-8 in undifferentiated, preconfluent CACO 2 cells. Folic acid (200 μ M) and vitamin B₁₂ (200 μ M), both major determinants of the methyl group donor S-adenosylmethionine (SAM), increased IL-8 expression (2.18 fold \pm 0.44 and 2.20 fold \pm 0.36 respectively). IL-8 expression was also stimulated by the histone deacetylase inhibitor valproate (2.70 fold \pm 0.17) and the isoflavonoid genistein which is discussed to mediate histone acetylation (3.58 \pm 0.22 fold). Treatment with both compounds showed a synergistic increase of IL-8 gene expression by 12.02 fold (\pm 0.40). All these results were significant by $p < 0.001$. The strongest increase on CpG methylation for the sites - 1342 and - 1412 resulted after treatment of the cells for 48 h with the natural food compounds vitamin B₁₂ (4.16 \pm 0.21 and 6.5 \pm 0.21 fold, $p < 0.001$) and folic acid (4.22 \pm 0.15 and 8.08 \pm 0.46 fold, $p < 0.001$). The DNMT1 inhibitor zebularine (200 μ M) induced only a mild demethylation on both CpG-sites. In a CpG island at the region at \sim - 3kb, where the CpG-sites are predominantly methylated in the untreated cell line, treatment with zebularine led to a strong decrease in methylation, treatment with vitamin B₁₂ or folic acid to a significant increase in CpG methylation. As changes of methylation in the CpG island did not correlate with the IL-8 expression these results suggest that only DNA methylation of the CpGs at - 1342 and - 1412 bp as well as histone modulation participate in the epigenetic control of IL-8 expression and metastatic characteristics. Furthermore, dietary strategies may be effective in the modulation of multiple inflammatory diseases where IL-8 expression plays an important role.

Introduction.

Interleukin 8 (IL-8) belongs to the group of chemokine proteins which play a critical role in the regulation of inflammatory responses (Oppenheim et al. 1991; Rossi und Zlotnik 2000). Gene expression of chemokines is tightly regulated because of the potent effects induced by even minute quantities of such proteins in an autocrine, paracrine or hormonally derived way (Tuschil et al. 1992; Kitadai et al. 2000; Wen und Wu 2001). Under normal conditions, IL-8 expression is restricted to a few kinds of cells including monocytes, endothelial cells, epithelial cells and fibroblasts and is stimulated by pro-inflammatory cytokines, stress and viral infections (Mastrorarde et al. 1996; Elenkov 2008). Although the transcriptional activation of IL-8 is limited to these type of cells, the expression of regulatory proteins controlling IL-8 expression is ubiquitous (Agelopoulos und Thanos 2006). High ectopic expression of IL-8 is seen in several undifferentiated tumour cells and is positively correlated with the metastatic potential and tumour growth of melanoma cells, lung tumours, breast tumour tissues and colon carcinoma cells (Bar-Eli 1999; Singh et al. 1999; Li et al. 2001; De Larco et al. 2003; Cheng et al. 2004). The high metastatic KM12L4 colon carcinoma cells show very high IL-8 expression levels compared with the non metastatic colon carcinoma cells CACO-2. The CACO-2 cell-line is in the preconfluent proliferative state relatively undifferentiated and shows ectopic IL-8 expression which is inhibited after spontaneous differentiation (Li et al. 2001; Wen und Wu 2001).

Activation of IL-8 expression by immune mediators is primarily controlled by a basal promoter located immediately upstream of the transcriptional start site which includes four cis-regulatory elements: NF- κ B at - 82 to - 70, CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) at - 94 to - 84, activator protein 1(AP1) at - 126 to - 120 as positive acting elements and Oct-1 at - 90 to - 83 as repressor of IL-8 transcription (Figure 1) (Matsushima et al. 1989; Fraga et al. 2005). Wen et al (Wen und Wu 2001) demonstrated that in CACO-2 cells, immune-activated transcription of the IL-8 gene is silenced upon differentiation through epigenetic histone deacetylation by elements located outside of the immediate 5'-flanking region of the gene. The same study showed a basal transcriptional repression of the gene by an epigenetic, but histone deacetylase independent mechanism that requires elements located several kilobases away from the gene locus. Moreover, using a reporter gene approach it was shown that a reporter gene with 1.5 kb of the IL-8 promoter showed a significant higher gene expression as the basal promoter reporter (~ 150 bp). In a study (De Larco et al. 2003), comparing high and low

metastatic breast carcinoma cell lines, a strong, positive correlation between the methylation status of two CpG sites located at - 1342 and - 1412 bp upstream of the transcriptional start site and ectopic expressed IL-8 mRNA was identified.

In the present work we analyzed the impact of food ingredients on the cytosine methylation of the CpGs located at - 1342 and at - 1412 on IL-8 mRNA expression in CACO-2 cells. The effects of diets on epigenetic regulation of gene expression was shown by our group before (Thaler et al. 2008). As previous results with reporter minigene transfections showed a somewhat greater expression activity for a minigene containing ~ 5 kb as for the minigene containing only ~ 1.5 kb of the IL-8 5' flanking region (Wen und Wu 2001), we additionally analyzed the promoter region up to - 5 kb for CpG islands. A single CpG island with potential SP1-containing transcription modules was detected at - 2792 to - 3457. Effects of vitamin B₁₂ and folic acid as methyl group donators for S-adenosylmethionine (SAM) (Selhub 2002) and the tyrosine kinase inhibitor and histone acetyl transferase inducer genistein (Hong et al. 2004) on the different elements of the epigenetic control indicate a complex epigenetic regulation of the IL-8 expression.

Methods:

Cell line and culture conditions. The human colon carcinoma cell line CACO-2 was grown in six well tissue culture plates and cultured in DMEM media supplemented with 10 % heat-inactivated foetal bovine serum, 1 % L-Glutamin (200 mM) and 1 % of penicillin- streptomycin solution (10 000 U penicillin, 10 mg streptomycin/ml, 0,9 % NaCl) at 37°C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂ in air. Growth medium was replaced every 2-3 days. The CACO-2 cells were cultured for 6 days to achieve undifferentiated cells. Cell treatments were performed in duplicates with folic acid, vitamin B₁₂, genistein, valproate, valproate plus genistein and zebularine respectively at a concentration of 200 µmol/l for 48 hours. Cells were washed twice with cooled PBS (4°C) before nucleotide extraction.

Genomic DNA isolation and bisulfite modification. DNA was isolated from cells using a DNA Isolation Kit (Qiagen) and bisulfite conversion for detection of unmethylated cytosines was performed using the Epiect Bisulfite Kit (Qiagen). Both kits were used according to the manufacturer's instructions.

Analysis of CpG methylation. Analysis of methylated CpGs was performed by bisulfite genomic sequencing PCR (BSP) in triplicates. To increase specificity of PCR after DNA con-

version, a nested PCR approach was used. Characteristics of the diverse primers are listed in table 1. All external PCRs were performed in a 10 µl final volume using the Promega PCR Master Mix, (Wisconsin, USA) with the following PCR-conditions: 95°C for 5 min, 30 cycles at 95°C for 30 sec, 1 min at a specific temperature and 1 min at 72°C and 5 min at 72°C. For internal PCR, probes were diluted 1:100 and amplified with the same master mix in a 100 µl final volume. Subsequently, probes were concentrated by ethanol precipitation and rehydrated in 30 µl H₂O. Thereon, DNA fragments of intended size were purified by agarose-gel extraction with the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) and subsequently directly sequenced by an ABI sequencing system. Finally, at the interested CpG sites, signal heights were directly compared using the software Sequence Scanner, version 1.0 from Applied Biosystems. No significant differences were seen between sequencing of cloned samples compared with directly sequenced samples.

Analysis of gene expression. Total mRNA was extracted from cells using the mRNA Isolation Kit (Roche, Mannheim, Germany) and reverse transcribed using the single-strand cDNA Synthesis Kit (Roche, Mannheim, Germany). Gene expression was performed in triplicates by Sybr-green real-time PCR using the Corbett Rotor-Gene 3000. The target mRNA expression was normalized to the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mRNA expression which was found to be stable expressed after the listed cell-treatments. The primers for gene expression are characterized in table 1. The following thermo-cycling conditions were selected: 95°C for 10 minutes followed by 45 cycles at 95°C for 30 sec, further 40 sec 64°C and 30 sec at 72°C. All reactions were set-up in a 10 µl final volume using the master mix SensiMix DNA Kit, (Quantace, London). Optimum reaction conditions were obtained with 5 µl 2x PCR master mix, 1 µl of each primer, 2 µl H₂O and 2 µl template (cDNA).

Analysis of the IL-8 5'-flanking region and primer design for DNA methylation analysis
For BSP-primer design as well as CpG-island analysis, the Methyl Primer Express version 1.0 software was used. A CpG-island was defined to be at least 300 bp long with a C+C content over 51%. Analysis of IL-8 5' flanking region for transcription factor binding sites were performed with the online software-tools MatInspector and ModelInspector from Genomatix. Primer design and sequence analyses are performed referring to the sequence CH471057 (Homo sapiens 211000035843682 genomic scaffold, whole genome shotgun sequence).

Results:

IL-8 CpG methylation at - 1342 and - 1412 in CACO-2 cells

Methylation status at the two CpG-sites - 1342 and - 1412 on the IL-8 promoter region have been shown to correlate positively with IL-8 expression in highly metastatic breast carcinoma cell-lines. In the preconfluent state of the CACO-2 cell line these sites are also predominately methylated: the comparison of methylated versus unmethylated DNA showed a ratio of 2.27 (± 0.07) at site - 1342 and 2.45 (± 0.05) at site - 1412 (Figure 2). Treatment of the cells for 48 h with the DNMT1 inhibitor zebularine induced only a mild, non significant demethylation on both CpG-sites. Treatment with the histone acetyl transferase (HAT) inducer genistein did not show relevant changes, treatment with the HDAC inhibitor valproate resulted in an enhancement of methylation for both sites by ~ 1.35 fold compared to control (Figure 2). The strongest increase of the ratio methylated versus unmethylated DNA by 4.16 (± 0.21) and 6.51 (± 0.21) for site - 1342 and by 4.22 (± 0.15) and 8.08 (± 0.46) fold for site - 1412 resulted after treatment of the cells with the natural food compounds vitamin B₁₂ and folic acid respectively. The last four results were significant by $p < 0.001$ compared to the untreated control.

CpG methylation of the IL-8 CpG island

The first 5 kb upstream from the transcriptional start site displays a single CpG island at ~ -3 kb. These CpG-sites were in the untreated cells predominantly methylated as shown in figure 3. Treatment with zebularine at a concentration of 200 μ M led to an important decrease in methylation in the CpG-island (Figure 3). Under the same conditions, treatment with valproate or genistein did not show significant changes in CpG methylation. However, under the influence of vitamin B₁₂ or folic acid at a concentration of 200 μ M for 48 h, a significant increase in CpG methylation could be seen for these sites (Figure 3).

Modifications of epigenetic control of IL-8 gene expression

Using undifferentiated cells, genistein significantly increased gene expression by 3.58 (± 0.22) fold. The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproate enhanced IL-8 gene expression by 2.70 fold (± 0.17) (Figure 4). Treatment of the cells with both compounds led to an increase of IL-8 gene expression by 12.02 fold (± 0.40). These results were significant by $p < 0.001$. Under the influence of folic acid or vitamin B₁₂, the expression increased by 2.18 fold (± 0.44) and 2.20 fold (± 0.36) respectively (Figure 4). Exposure of cells to zebularine did not show significant changes in IL-8 gene expression. These increases in IL-8 gene expression were significant by $p < 0.05$. Analysis of IL-8 protein concentration in supernatants with ELISA correlated with the results from real Time PCR (data not shown).

Discussion

A tight regulation of the expression of inflammatory mediators like IL-8 is required for preventing several chronic diseases. As illustrated in figure 1, a primary promoter region for the IL-8 gene is well defined but less is known about how epigenetic mechanisms precisely influence IL-8 gene transcription. As the immediate IL-8 5'-flanking region lacks typical CpG-islands, and thus methylation status of the CpGs situated within the primary promoter region where shown not to influence transcriptional activity (De Larco et al. 2003), a role of an epigenetic gene regulation seems likely. Indeed, several studies demonstrated that histone deacetylation as well as histone replacement influence strongly IL-8 transcription (Wen und Wu 2001; Agelopoulos und Thanos 2006; Nozell et al. 2006). A positive correlation of the methylation status of two CpGs at a distance from the established IL-8 promoter region with aberrant IL-8 gene expression and with the metastatic potential of these cells has been noticed (Bar-Eli 1999).

In the present study we analyzed in the CACO-2 cell line the methylation status of the two CpGs discussed for their relevance in epigenetic control and of the CpG-island located within the first 5 kb upstream of the transcriptional start site. We also investigated the effect of zebularine (Zhou et al. 2002) or valproate (Angelucci et al. 2006) as well as consequences of several natural food compounds (Dolinoy et al. 2006; Park et al. 2008) on CpG methylation, histone acetylation and gene transcription of the IL-8 gene. We showed that in the undifferentiated status of the non metastatic CACO-2 cell-line, the two CpGs located at the sites - 1342 bp and at - 1412 bp were largely methylated. This is somehow surprising as CpG methylation at these two sites and IL-8 expression was correlated with a metastatic potential of carcinoma cell lines before (Bar-Eli 1999). Nevertheless, treatment of CACO-2 cells with folic acid or vitamin B₁₂ resulted in a significant increase of CpG methylation, but also in IL-8 gene expression. This result underlines that the two analyzed CpG sites are implicated in a basal mechanism controlling IL-8 transcription. However, the impact of this mechanism may vary between cell or tissue type or/and cell status. In experiments using reporter constructs, IL-1 β induced promoter activation of reporter genes containing either 1469 or 135 bp of the IL-8 5' flanking region resulted in a ~ 20 fold higher activation in preconfluent CACO-2 cells and a ~ 10 fold higher activation in differentiated CACO-2 cells for the longer promoter-reporter construct (Wen und Wu 2001). Thus, an additional, important regulatory site might occur within the first ~ 1.5 kb upstream of the transcriptional start with a potential involvement of the two discussed CpGs sites. The positive correlation of CpG methylation with gene expression is, according to the common understanding about epigenetic DNA-methylation (methyla-

tion of CpGs leads to silencing of gene expression), unusual but not unknown (Xiong et al. 2002; Kelavkar et al. 2007). It was discussed that in the IL-8 5' flank, the methylation at - 1342 bp and - 1412 bp may block the binding of some repressor complex within the vicinity of the two 5' CpG sites. However, analyzing the area around the two CpG-sites at - 1342 and - 1412 bp by Genomatix software, no concrete modules containing binding sites for repression factors could be found.

Interestingly treatment of the cells with zebularine showed a largely stronger demethylation in the CpG-island as of the two CpGs at ~ - 1.3 kb. As zebularine preferentially depletes the DNA global methylation related DNMT1 (Cheng et al. 2004), we propose that these two sites may be methylated by the specific DNMTs, 3a or 3b. As also protein-protein interactions amongst DNMTs and histone deacetylases as well as histone methyl transferases can lead to gene silencing (Klose und Bird 2006), the understanding of the nucleosome conformation in this region remains important. It was reported that IL-8 silencing in B cells is due to the recruitment of the repressive macroH2A histone variant in the basal IL-8 promoter region. But no macroH2A was found in the IL-8 promoter in HeLa cells or in the epithelial kidney cell line 293 (Agelopoulos und Thanos 2006).

Treatment of the cells with genistein or valproate increased IL-8 gene expression by increasing histone acetylation, whereby combined treatment shows the strongest effect. These results agree with previously published results (Wen und Wu 2001) confirming the influence of histone acetylation on the IL-8 transcription. The soy compound genistein mediates histone acetylation through the oestrogen receptor α (ER α) (Hong et al. 2004) which is also expressed in the CACO-2 cell line (Campbell-Thompson et al. 2001). After treatment with folic acid or vitamin B₁₂, methylation of the oestrogen receptor α promoter increased with a concomitant decrease in receptor gene expression; the inverse situation was seen for treatment with zebularine (data presented elsewhere).

In conclusion our results suggest that DNA methylation of various CpGs as well as histone modulation participates in the epigenetic control of IL-8 expression and that dietary strategies may be effective in the modulation of multiple inflammatory diseases where IL-8 expression plays an important role.

Acknowledgments: This work was supported by the Federal Ministry of Health, Family and Youth. All authors contributed equally to the work. The authors declare that they have no conflicts of interest.

Legend

Figure 1. IL-8 5'-flanking region up to - 5000 bp from the transcriptional start site. A. Structure of the region, showing the primary promoter, the two discussed CpGs at position - 1342 and - 1412 and the CpG island. B. Potential transcriptional repressor sites around the CpGs at - 1342 and - 1412. C. Primary IL-8 promoter region. Binding sites for transcriptional activators: NF- κ B at - 82 to - 70, CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) at - 94 to - 84 and activator protein 1(AP1) at - 126 to - 120. D. CpG island. CpGs are marked with position number relative to the transcriptional start site on sequence selections and by small vertical lines on the survey sequence.

Figure 2. Methylation status (methylated versus unmethylated cytosines) of the two CpGs at position - 1342 and - 1412 from the transcriptional start site. In untreated CACO-2 cells, the DNA on both sites is nearly 2.4 times more methylated than unmethylated. Treatment of the cells with natural food compounds acting in the DNA methylation pathway enhances significantly CpG methylation at these sites.

Figure 3. Methylated versus unmethylated cytosines of selected CpG-sites of the IL-8 CpG island after treatment of the CACO-2 cells for 48 h with several compounds.

Figure 4. IL-8 mRNA expression after a 48 h treatment with the listed agents in the endodermal Caco-2 cell line. IL-8 expression increased in genistein plus valproate treated cells by 12.02 (\pm 0.40) fold compared with untreated cells ($p < 0.001$). IL-8 gene expression is referenced to glucose-6-phosphate dehydrogenase expression levels.

Figure 1:

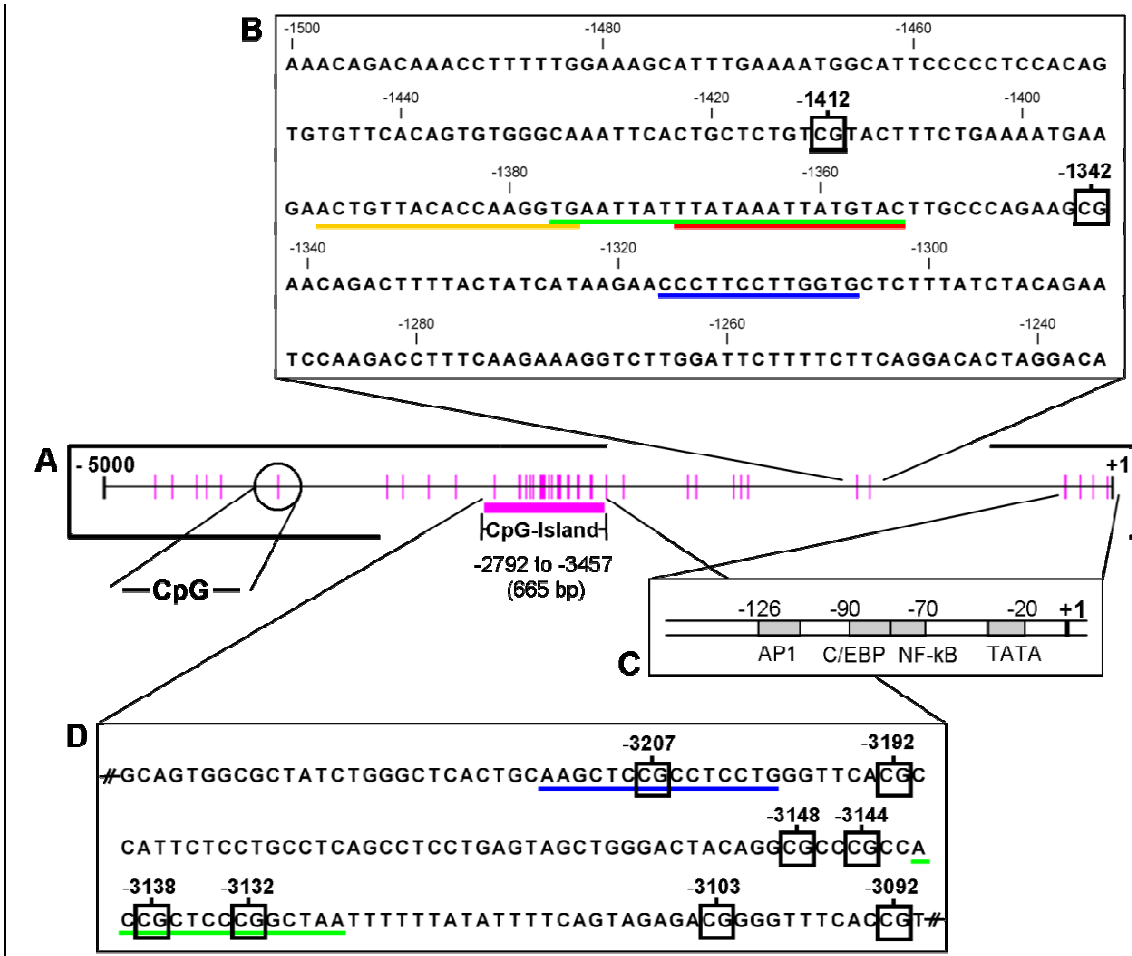


Figure 2:

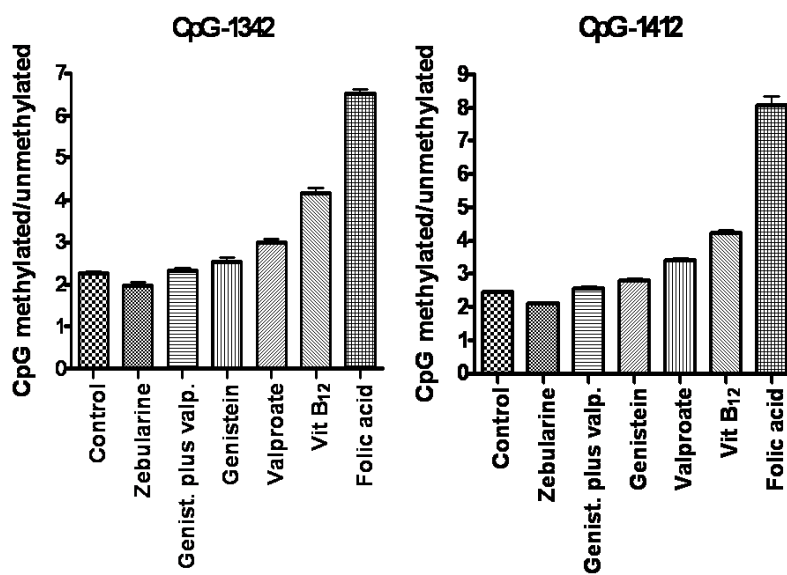


Figure 3:

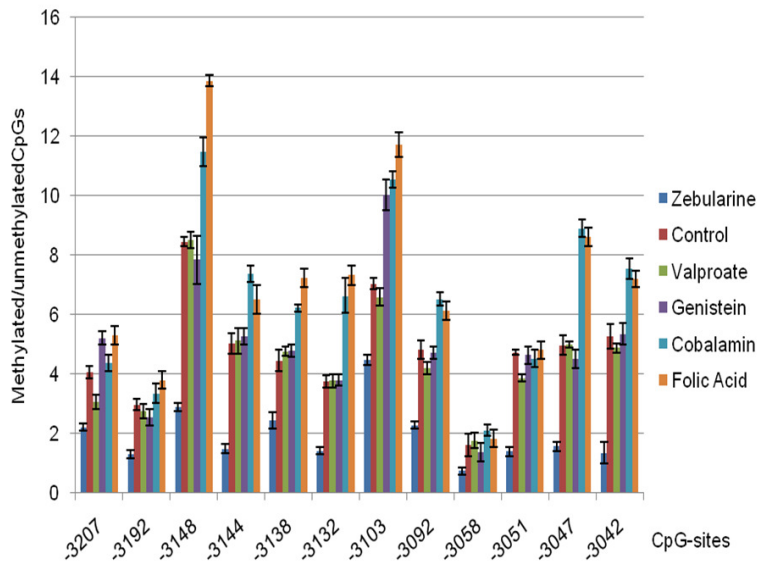


Figure 4:

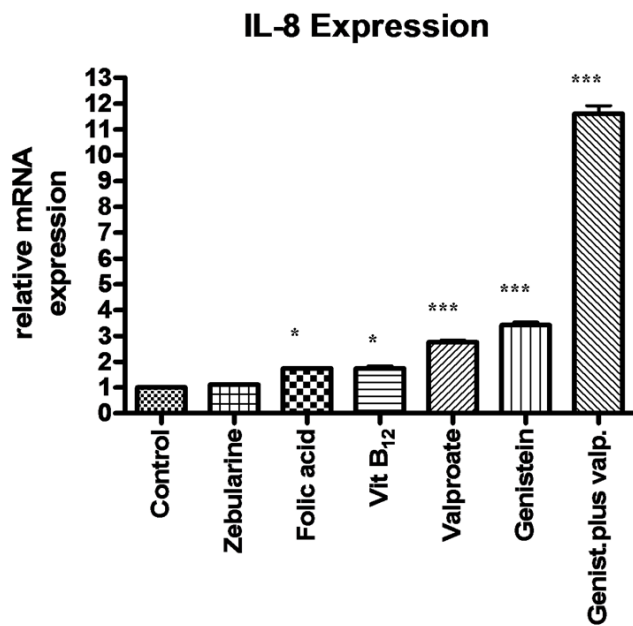


Table 1:**Primer set for DNA-methylation analysis**

Gene /primer position	Sense primer	Antisense primer	T m	Conc. (μ mol/ μ l)
External primer IL-8				
-1342/- 1312	GGT TGG AGA AAG ATA ATA AAA AGA A	AAC ACC AAA TCT AAC CTC TAA AAA C	59 °C	20
CpG- island	GGA AAA GTA GAG GTT ATT TTT GTT	ACT CCT AAA CCA TAA AAA TCA TTT	57 °C	20
Internal primer IL-8				
-1342/- 1312	AGT GTG TTT ATA GTG TGG GTA AAT T	AAA AAT TTC AAC AAA TCA TAA AAA A	58 °C	10
CpG- island	GTT ATT TTT GTT TTT GTT TTT TTT	CAA AAA CTA ACA CCT AAA TAT CCT	56 °C	10
Gene expression primer				
IL-8	ATG ACT TCC AAG CTG GCC GTG GCT	TCT CAG CCC TCT TCA AAA ACT TCT C	64 °C	5
G6PD	ATC GAC CAC TAC CTG GGC AA	TTC TGC ATC ACG TCC CGG A	64 °C	2,5

- Agelopoulos M. and Thanos D. (2006) Epigenetic determination of a cell-specific gene expression program by ATF-2 and the histone variant macroH2A. *Embo J* **25**, 4843-53.
- Angelucci A., Valentini A., Millimaggi D., Gravina G. L., Miano R., Dolo V., Vicentini C., Bologna M., Federici G. and Bernardini S. (2006) Valproic acid induces apoptosis in prostate carcinoma cell lines by activation of multiple death pathways. *Anticancer Drugs* **17**, 1141-50.
- Bar-Eli M. (1999) Role of interleukin-8 in tumor growth and metastasis of human melanoma. *Pathobiology* **67**, 12-8.
- Campbell-Thompson M., Lynch I. J. and Bhardwaj B. (2001) Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res* **61**, 632-40.
- Cheng J. C., Yoo C. B., Weisenberger D. J., Chuang J., Wozniak C., Liang G., Marquez V. E., Greer S., Orntoft T. F., Thykjaer T. and Jones P. A. (2004) Preferential response of cancer cells to zebularine. *Cancer Cell* **6**, 151-8.
- De Larco J. E., Wuertz B. R., Yee D., Rickert B. L. and Furcht L. T. (2003) Atypical methylation of the interleukin-8 gene correlates strongly with the metastatic potential of breast carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 13988-93.
- Dolinoy D. C., Weidman J. R., Waterland R. A. and Jirtle R. L. (2006) Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ Health Perspect* **114**, 567-72.
- Elenkov I. J. (2008) Neurohormonal-cytokine interactions: implications for inflammation, common human diseases and well-being. *Neurochem Int* **52**, 40-51.
- Fraga M. F., Ballestar E., Paz M. F., Ropero S., Setien F., Ballestar M. L., Heine-Suner D., Cigudosa J. C., Urioste M., Benitez J., Boix-Chornet M., Sanchez-Aguilera A., Ling C., Carlsson E., Poulsen P., Vaag A., Stephan Z., Spector T. D., Wu Y. Z., Plass C. and Esteller M. (2005) Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 10604-9.
- Hong T., Nakagawa T., Pan W., Kim M. Y., Kraus W. L., Ikehara T., Yasui K., Aihara H., Takebe M., Muramatsu M. and Ito T. (2004) Isoflavones stimulate estrogen receptor-mediated core histone acetylation. *Biochem Biophys Res Commun* **317**, 259-64.
- Kelavkar U. P., Harya N. S., Hutzley J., Bacich D. J., Monzon F. A., Chandran U., Dhir R. and O'Keefe D. S. (2007) DNA methylation paradigm shift: 15-lipoxygenase-1 upregulation in prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer by atypical promoter hypermethylation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **82**, 185-97.
- Kitadai Y., Haruma K., Mukaida N., Ohmoto Y., Matsutani N., Yasui W., Yamamoto S., Sumii K., Kajiyama G., Fidler I. J. and Tahara E. (2000) Regulation of disease-progression genes in human gastric carcinoma cells by interleukin 8. *Clin Cancer Res* **6**, 2735-40.
- Klose R. J. and Bird A. P. (2006) Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem Sci* **31**, 89-97.
- Li A., Varney M. L. and Singh R. K. (2001) Expression of interleukin 8 and its receptors in human colon carcinoma cells with different metastatic potentials. *Clin Cancer Res* **7**, 3298-304.
- Mastrorarde J. G., He B., Monick M. M., Mukaida N., Matsushima K. and Hunninghake G. W. (1996) Induction of interleukin (IL)-8 gene expression by respiratory syncytial virus involves activation of nuclear factor (NF)-kappa B and NF-IL-6. *J Infect Dis* **174**, 262-7.
- Matsushima K., Larsen C. G., DuBois G. C. and Oppenheim J. J. (1989) Purification and characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human myelomonocytic cell line. *J Exp Med* **169**, 1485-90.

- Nozell S., Laver T., Patel K. and Benveniste E. N. (2006) Mechanism of IFN-beta-mediated inhibition of IL-8 gene expression in astrogloma cells. *J Immunol* **177**, 822-30.
- Oppenheim J. J., Zachariae C. O., Mukaida N. and Matsushima K. (1991) Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol* **9**, 617-48.
- Park C. S., Cho K., Bae D. R., Joo N. E., Kim H. H., Mabasa L. and Fowler A. W. (2008) Methyl-donor nutrients inhibit breast cancer cell growth. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*
- Rossi D. and Zlotnik A. (2000) The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* **18**, 217-42.
- Selhub J. (2002) Folate, vitamin B12 and vitamin B6 and one carbon metabolism. *J Nutr Health Aging* **6**, 39-42.
- Singh R. K., Varney M. L., Bucana C. D. and Johansson S. L. (1999) Expression of interleukin-8 in primary and metastatic malignant melanoma of the skin. *Melanoma Res* **9**, 383-7.
- Thaler R., Karlic H., Rust P. and Haslberger A. G. (2008) Epigenetic regulation of human buccal mucosa mitochondrial superoxide dismutase gene expression by diet. *Br J Nutr*, 1-7.
- Tuschil A., Lam C., Haslberger A. and Lindley I. (1992) Interleukin-8 stimulates calcium transients and promotes epidermal cell proliferation. *J Invest Dermatol* **99**, 294-8.
- Wen X. and Wu G. D. (2001) Evidence for epigenetic mechanisms that silence both basal and immune-stimulated transcription of the IL-8 gene. *J Immunol* **166**, 7290-9.
- Xiong W., Tappich W. E. and Cox G. S. (2002) Mechanism of gonadotropin gene expression. Identification of a novel negative regulatory element at the transcription start site of the glycoprotein hormone alpha-subunit gene. *J Biol Chem* **277**, 40235-46.
- Zhou L., Cheng X., Connolly B. A., Dickman M. J., Hurd P. J. and Hornby D. P. (2002) Zebularine: a novel DNA methylation inhibitor that forms a covalent complex with DNA methyltransferases. *J Mol Biol* **321**, 591-9.

LEBENS LAUF

ANGABEN ZUR PERSON

Name: Karoline Kubala

Geburtsdaten: 28. Februar 1983, Mödling

Staatsbürgerschaft: Österreich

Familienstand: Ledig

SCHUL- UND BERUFSAUSBILDUNG

Schulbildung: 1989-1993 Volksschule Biedermannsdorf
1993-1997 Bundesrealgymnasium in Mödling
1997-2002 HAK Vienna Business School mit Matura
mit Schwerpunkt Management/Marketing
ab 2002 Universität Wien
Studiengang Ernährungswissenschaften

STUDIUMBEZOGENE PRAKTIKA

Oktober 2003 – Februar 2004
Aushilfslaborantin bei der Firma Neuber
(geringfügig beschäftigt)

Juli und August 2004
Praktikum bei MAPAG Umweltanalytik

Oktober 2004 – November 2005
Ordinationsassistentin beim Herrn Dr. Szalay

Juli 2005 – Dezember 2008
Praktikum und geringfügig beschäftigt bei Symrise

August – September 2006
Volontariatspraktikum in Süd Afrika

SONSTIGE BERUFSERFAHRUNG

Juli 1999, Ferialpraxis bei Whirlpool
In der Abteilung Marketing

Juli 2000, Ferialpraxis bei Whirlpool
In der Abteilung Marketing

Juli 2001, Ferialpraxis bei Whirlpool
In der Abteilung Marketing

1997 – 2003, Aushilfe im Gastronomiebereich

Februar – September 2003, Kartenvorverkauf im Theater Metropol

Juni 2003, Aushilfe bei Interspot – ORF
Seitenblicke

2006 – 2008, Event- und Filmcatering

Besondere Fähigkeiten: Englisch, Kroatisch, Slowakisch, Maturaniveau Französisch