

**Aus der Universitätsklinik für Radioonkologie Tübingen**

**Abteilung Radioonkologie**

**Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Bamberg**

**Sektion für Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung**

**Leiter: Professor Dr. H. P. Rodemann**

**Molekulare Zusammenhänge der Retinoid-Insensitivität  
der humanen Kolonkarzinomzelllinie HCT116**

**Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen**

**vorgelegt von  
Anne Corinna Raff**

**aus**

**Stuttgart**

**2003**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. P. Rodemann

2. Berichterstatter: Professor Dr. G. Fierlbeck

Diese Arbeit wurde mit Unterstützung der Deutschen Krebshilfe (Dr. Mildred-Scheel Stiftung 10-1579 Ro 1) erstellt.



Meinen Eltern und meinen Geschwistern Christiane und Tilman



# Inhaltsverzeichnis

---

1	Einleitung .....	1
1.1	Vitamin A und seine Derivate .....	1
1.1.1	Familie der Retinoide .....	1
1.2	Molekularer Wirkmechanismus der Retinoide auf zellulärer Ebene.....	3
1.2.1	Transport und Metabolismus .....	3
1.2.2	Aufbau und Wirkungsweise der kernständigen Rezeptoren.....	5
1.3	Retinsäure und Tumorgenese .....	8
1.4	Retinsäure als therapeutische Substanz .....	8
1.4.1	Regulation von Differenzierung, Proliferation und Apoptose .....	9
1.5	Retinsäuren in Kombination mit Bestrahlung.....	10
1.6	Zielsetzung und Aufgabenstellung.....	10
2	Material .....	11
2.1	Chemikalien.....	11
2.2	Retinoide .....	12
2.3	Zelllinien.....	12
2.4	Zellbiologische Materialien .....	12
2.4.1	Lösungen, Puffer und Medien .....	12
2.4.2	Kulturgefäße.....	14
2.5	Molekularbiologie.....	14
2.5.1	Lösungen, Puffer .....	14
2.5.2	Synthetische Oligonukleotide .....	14
2.5.3	Apparaturen.....	16
2.6	Western Blot.....	16
2.6.1	Lysepuffer zur Proteinisolierung.....	16
2.6.2	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese .....	17

## Inhaltsverzeichnis

---

2.6.3	Blotting .....	18
2.6.4	Blocking.....	18
2.6.5	Antikörper .....	18
2.7	Enzyme, Kits und andere Materialien .....	19
3	Methoden .....	20
3.1	Zellbiologische Methoden.....	20
3.1.1	Steriltechnik.....	20
3.1.2	Allgemeine Zellkulturbedingungen .....	20
3.1.3	Auftauen von Zellen .....	20
3.1.4	Stammkulturen und Passagierung .....	20
3.1.5	Kryokonservierung .....	21
3.1.6	DAPI-Routinefärbung .....	21
3.1.7	Koloniebildungstest .....	22
3.2	Molekularbiologische Methoden .....	24
3.2.1	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion .....	24
3.2.2	PCR-ELISA .....	28
3.2.3	DNA-Sequenzierung .....	30
3.3	Western-Blot.....	30
3.3.1	Protein-Isolierung .....	30
3.3.2	Messung der Proteinkonzentration.....	31
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese .....	32
3.3.4	Blotting .....	33
3.3.5	Nachweisreaktion .....	34
3.3.6	Chemilumineszenzreaktion .....	35
4	Ergebnisse .....	36



4.1 Klonogenes Verhalten von Tumorzellen nach Behandlung mit all-trans-Retinsäure (ATRA) .....	36
4.2 Klonogene Aktivität der Tumor-Zelllinie HCT116 nach Behandlung mit ATRA und ionisierender Bestrahlung.....	38
4.3 Nachweis der zytoplasmatischen Bindungsproteine und der nukleären Retinsäurerezeptoren mittels RT-PCR .....	41
4.4 Nachweis der zytoplasmatischen Bindungsproteine und der nukleären Retinsäurerezeptoren mittels PCR-ELISA .....	45
4.5 Nachweis des zytoplasmatischen Retinsäurebindungsproteins CRABP I und des Retinsäurekernrezeptors RAR $\beta$ auf Proteinebene .....	48
4.6 Sequenzierung der codierenden DNA-Abschnitte für CRABP II und RAR $\beta$ .....	52
5 Diskussion.....	59
6 Zusammenfassung.....	68
7 Literaturverzeichnis .....	70



# 1 Einleitung

## 1.1 Vitamin A und seine Derivate

Retinoide spielen eine entscheidende Rolle bei vielen wichtigen biologischen Vorgängen. Seit langem ist bekannt, daß das Aldehyd des Vitamin A Bestandteil des Sehfärbstoffes Rhodopsin ist. Aber nicht nur für das Sehen sind die Retinoide unentbehrlich. Über die Regulation der Genexpression regulieren sie die Proliferation, Differenzierung und Apoptose der Zellen im Körper des Menschen und aller Wirbeltiere. Dadurch haben sie einen entscheidenden Einfluß auf funktionelle Vorgänge, wie Fortpflanzung, fetale Entwicklung, Epitheldifferenzierung, Knochenwachstum und das Immunsystem (5). Retinoide sind für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des menschlichen Lebens unbedingt erforderlich.

### 1.1.1 Familie der Retinoide

Zur Familie der Retinoide gehören sowohl die natürlich vorkommenden Verbindungen des Vitamin A, als auch die synthetischen Retinol-Analoga, unabhängig von deren biologischer Aktivität. Die Grundstruktur besteht aus einem trimethylierten Cyclohexenring, einer Seitenkette mit konjugierten Doppelbindungen und einer polaren Endgruppe. Retinoide sind hydrophob und durch Isomerisation ihrer konjugierten Doppelbindungen instabil in Gegenwart von Oxydantien wie Sauerstoff und Licht (18). Durch Veränderungen der polaren Endgruppe und der Seitenkette des Vitamin A wurden die Retinoide der ersten Generation entwickelt, wie zum Beispiel Tretinoin (all-trans-Retinsäure) und Isotretinoin (13-cis-Retinsäure). Die zweite Generation der Retinoide entstand durch Modifikationen der aromatischen Grundstruktur (z. B. Etretinat). Durch Einfügen zyklischer Strukturen in die Seitenkette (z. B. RO 13-7410) wird bei den Retinoiden der dritten Generation versucht, Moleküle zu entwickeln, die spezifisch mit den gewünschten Rezeptoren agonisieren bzw. antagonisieren und somit in ihrer therapeutischen Wirkung hochpotent mit geringeren Nebenwirkungen sind (s.

Abb. 1). Durch die beschriebenen Modifikationen des Vitamin A Moleküls wurden bis heute über 2000 neue Retinoide synthetisiert.

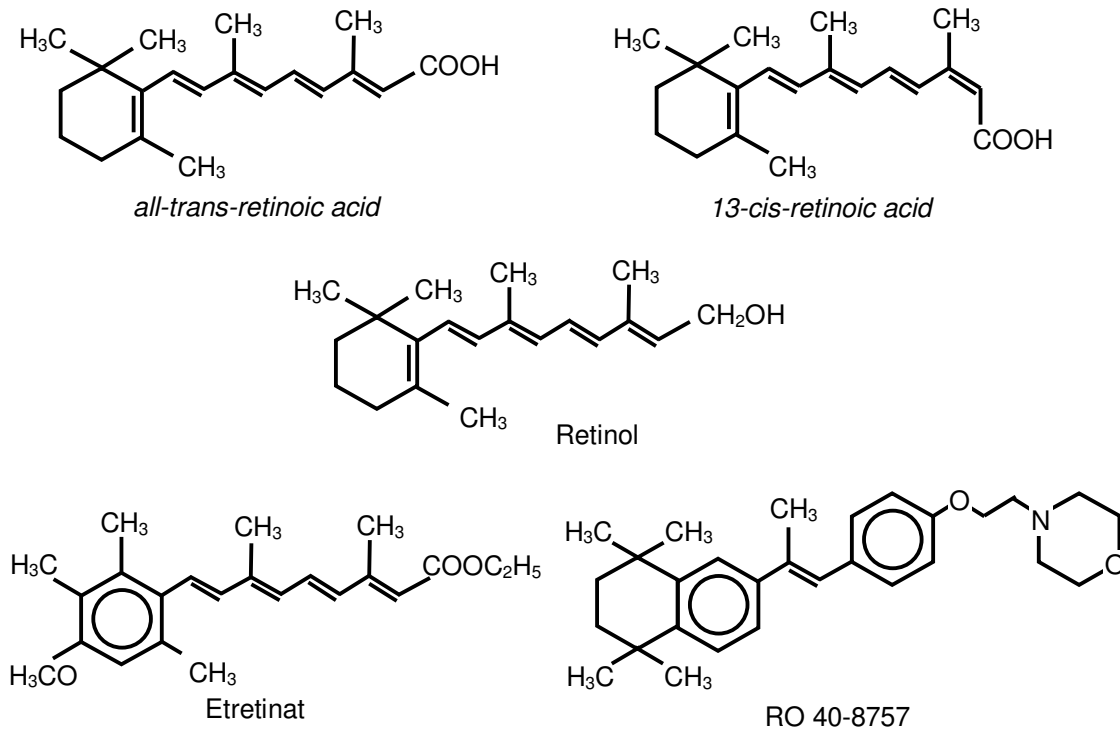


Abb. 1: Chemische Struktur des Retinols und einiger wichtiger Retinsäuren

Mit der Nahrung wird Retinol v.a. in Form von Provitamin A  $\beta$ -Carotinoiden (in Mango/Zitrusfrüchten und grünem Gemüse) aufgenommen. Retinol selbst hat keine biologische Aktivität, dient aber als Substrat bei der Umwandlung in die physiologisch aktiven Formen (18).

Für den Sehvorgang handelt es sich dabei um 11-cis-Retinal. Bei allen Vorgängen, die die Genexpression regulieren, handelt es sich um Retinsäure (RA).

## 1.2 Molekularer Wirkmechanismus der Retinoide auf zellulärer Ebene

### 1.2.1 Transport und Metabolismus

Bevor die Retinoide ihre Funktionen erfüllen können, müssen sie erst durch verschiedene Organsysteme und Zellkompartimente transportiert werden. Der Transport des Retinols im Blutplasma erfolgt durch Bindung an Albumine oder an ein  $\alpha_1$ -Globulin (engl. *retinol-binding protein*, RBP) (5).

Innerhalb der Zelle gibt es 4 verschiedene Proteine, die spezifisch Retinoide binden. Sie gehören zur Familie der zytoplasmatischen lipidbindenden Proteine. Zum einen handelt es sich dabei um die zytoplasmatischen retinolbindende Proteine I und II (CRBP I/II), zum anderen um die zytoplasmatischen retinsäurebindende Proteine I und II (CRABP I/II) (42).

Alle 4 Proteine bestehen aus etwa 135 Aminosäuren. Von der Sequenz der Aminosäuren sind CRBP I und II zu 56% identisch, CRABP I und II sind sogar zu 74% sequenzidentisch. Zwischen den beiden Paaren liegt die gleiche Abfolge der Aminosäuren bei 40%. Aufgrund dieser Sequenzhomologie ist es sehr wahrscheinlich, daß die 4 Proteine von einem gemeinsamen Gen abstammen (42). Die Bindungsproteine werden während der Entwicklung und im Gewebe unterschiedlich exprimiert. CRBP I ist weit verbreitet und v.a. in Zellen zu finden, die größere Mengen an Vitamin A verarbeiten, wie z.B. die Kupfer-Sternzellen der Leber oder die Pigmentepithelzellen des Auges. CRBP II ist nur in den Enterozyten des Dünndarms vorhanden. CRABP I ist in den meisten Zellen des Körpers zu finden. CRABP II befindet sich v.a. in Zellen der Haut (41).

Das sich in den Enterozyten befindende CRBP II ist für die Absorption der Retinoide aus dem Darmlumen nötig. CRBP I interagiert mit verschiedenen Retinoid-modifizierenden Enzymen innerhalb der Zelle und fördert die Umwandlung von Retinol zu Retinylaldehyd und der hormonell aktiven Form Retinsäure (engl. *retinoic acid*, RA) (5).

CRABP I und CRABP II binden spezifisch diese RA. Die genaue Funktion der retinsäurebindenden Proteine ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. CRABP I senkt den RA-Spiegel innerhalb der Zelle, indem es zum einen die RA aktiv aus der Zelle transportiert und zum anderen mit katabolen Enzymen innerhalb der Zelle interagiert und so den Abbau der RA fördert (6). Dagegen wird die RA nach Bindung an CRABP II als RA-CRABP II-Komplex in den Zellkern transportiert und bindet dort an die Retinsäurerezeptor-Dimere (s. Abb. 2). Da CRABP II eine niedrigere Bindungsaffinität zu RA hat als CRABP I, ist der Transport in den Zellkern aber erst nach Absättigung von CRABP I möglich (17).

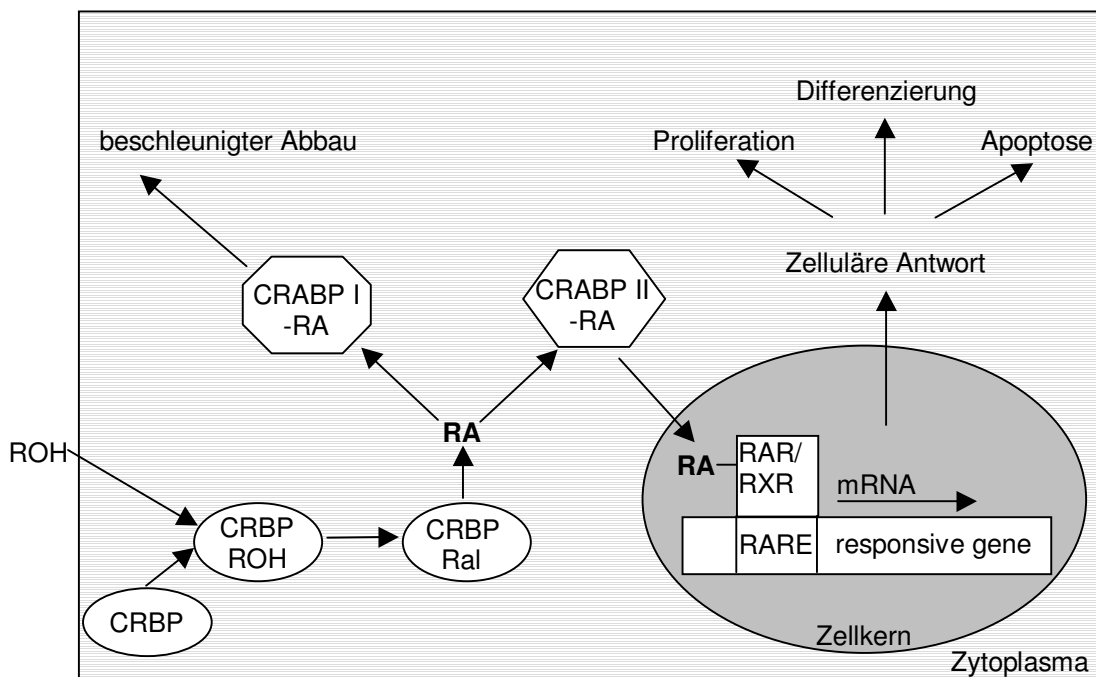


Abb. 2: Schematische Darstellung des Wirkmechanismus der Retinoide (ROH = Retinol; Ral = Retinylaldehyd)

### 1.2.2 Aufbau und Wirkungsweise der kernständigen Rezeptoren

Die nukleären Retinoidrezeptoren gehören zur großen Familie der ligandeninduzierbaren Transkriptionsfaktoren, zu der auch die Steroidrezeptoren, Thyroidrezeptoren (TR), Vitamin-D<sub>3</sub>-Rezeptoren (VDR), Peroxisomenproliferatoren (PPAR) und etwa 20 Orphanrezeptoren mit bisher unbekanntem Liganden gehören (37).

Es gibt zwei Familien von Retinoidrezeptoren: Die Retinoic-Acid-Rezeptoren (RAR) und Retinoic-Acid-X-Rezeptoren (RXR). Jede dieser Rezeptorfamilien lässt sich noch weiter in je 3 Subtypen ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) unterteilen. Durch unterschiedlichen Promotorgebrauch und alternatives Splicing entsteht zusätzlich für die RA-Rezeptoren eine große Zahl an unterschiedlichen Rezeptor-Isotypen (RAR  $\alpha_{1+2}$ , RAR  $\beta_{1-4}$  und RAR  $\gamma_{1+2}$ ) (37).

Die Rezeptoren sind aus 5 verschiedenen Domänen aufgebaut (s. Abb. 3). Die N-terminale A/B Domäne enthält eine ligandenunabhängige (AF-1) Transaktivierungsregion. Daran schließt sich C mit der DNA-Bindungsstelle und einer Region zur Dimerbildung an. Die Bindung an die DNA erfolgt über zwei Zink-Finger-Motive, die die spezifische Bindung an die entsprechenden *Response Elements* (s.u.) möglich machen. Die Domäne D beinhaltet ein Translokationssignal. An der C-terminalen E Domäne erfolgt die Liganden-Bindung. Außerdem besitzt diese Region noch eine Dimerisierungsfunktion, ein Translokationssignal und eine ligandenunabhängige Transaktivierungsregion (AF-2) (9).

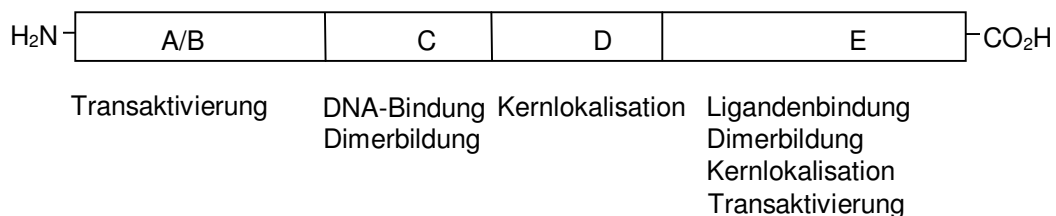


Abb. 3: Schematischer Aufbau der nukleären Retinoidrezeptoren

Die DNA-Bindung der Kernrezeptoren erfolgt an den sogenannten *retinoic acid response elements* (RARE bzw. RXRE). Diese liegen im Promotorbereich von retinsäureregulierten Genen (37). Die nukleären Hormonrezeptoren binden als Dimere an die spezifischen Hormon Response Elements. Sie verbinden sich untereinander zu sogenannten Homodimeren oder gehen mit anderen Hormonrezeptoren eine Verbindung ein und bilden Heterodimere (43).

Zwischen RARs und RXRs bestehen hier deutliche Unterschiede. Während RAR nur mit RXR heterodimerisieren kann, bildet RXR auch mit TR, VDR und PPAR Heterodimere. RXR erhöht dabei die Affinität und Spezifität der DNA-Bindung seines Dimer-Partners und steigert damit die Transkriptionsaktivierung durch dessen Liganden. Durch Beteiligung von RXR können so verschiedenste endokrine Vorgänge aktiviert werden (43). Im Gegensatz zu RAR, die nur Heterodimere bilden, können RXR auch Homodimere bilden. Die Aktivierung der Rezeptoren erfolgt durch Bindung des Liganden. Während RXR nur durch Bindung von 9-cis RA aktiviert wird, kann die Aktivierung der RAR-Rezeptoren durch Bindung von verschiedenen natürlichen Vitamin A Derivaten erfolgen: all-trans RA, 9-cis RA, 4-oxo RA, 3,4-dihydro RA (s. Abb. 4) (1).

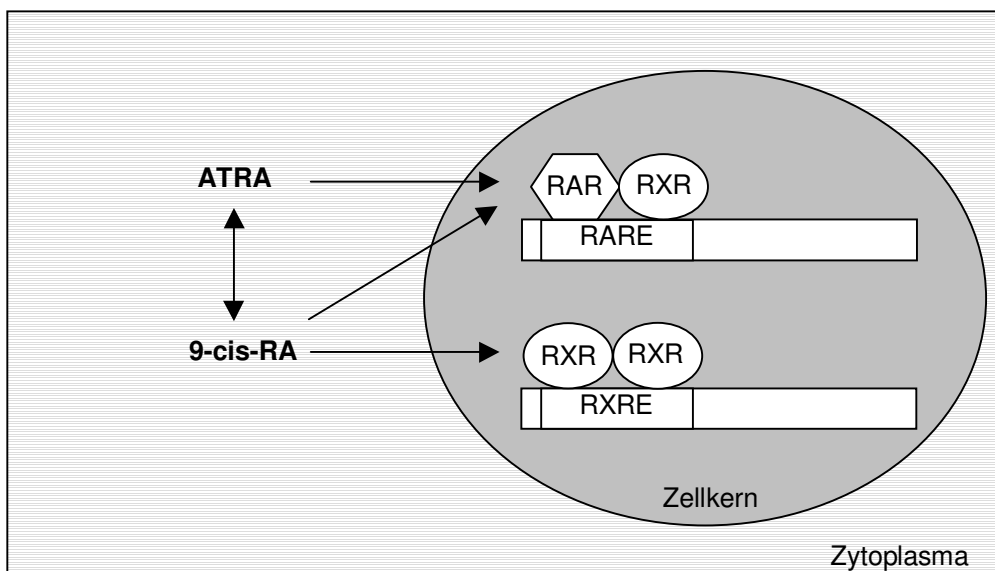


Abb. 4: Schematische Darstellung der Dimerbildung der Kernrezeptoren und Aktivierung durch ATRA bzw. 9-cis-RA



Die Kernrezeptoren binden unabhängig von der Ligandenbindung an die DNA und hemmen in Abwesenheit des Liganden die Transkription des nachfolgenden Gens. Dies geschieht durch Bindung eines Komplexes von Corepressorproteinen (aus SMRT/N-CoR, Sin3A und HDAC1 oder 2). Diese Komplexbindung bewirkt eine Histon-Deacetylierung. Die DNA kann so nicht abgelesen werden (9, 39). Die Bindung des Liganden führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptordimers, wodurch die Corepressoren freigesetzt und im Gegenzug verschiedene Coaktivatoren (z.B. CBP/p300 und P/CAF) mit Histonacetylase-Aktivität angelagert werden. Die lokale Histon-Acetylierung macht die DNA der Transkription zugänglich (s. Abb. 5) (39).

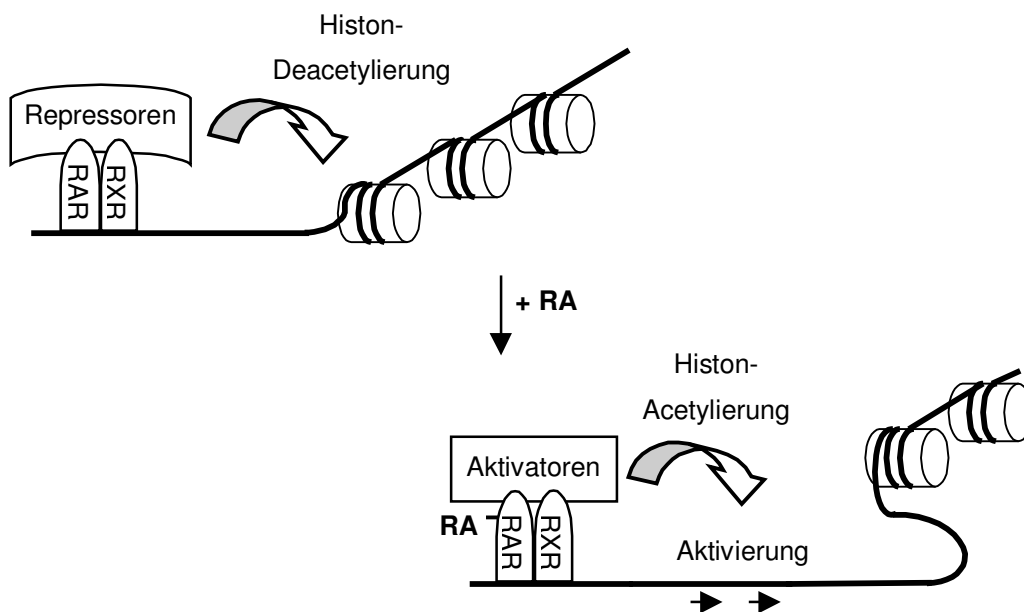


Abb. 5: Mechanismus der Transkriptionsaktivierung

Neue Untersuchungen zeigen, daß auch CRABP II nicht nur als Transportmittel der RA in den Zellkern funktioniert, sondern direkt an der Transaktivierung beteiligt ist. Als Teil des DNA gebundenen Kernrezeptorkomplexes kann CRABP II so die RA vermittelte Gentranskription verstärken (13).

### **1.3 Retinsäure und Tumorgenese**

Viele Ergebnisse der Retinoidforschung stammen aus dem Bereich der Embryogenese, bei der die Retinsäure als Regulator wirkt (38). Auch bei der Tumorgenese spielen die Retinoide eine wichtige Rolle, da durch Mutationen im Bereich ihrer Rezeptoren die Regulation der Genexpression eingeschränkt und die Entstehung von Tumoren möglich wird (25). So läßt sich bei der akuten Promyelozytenleukämie eine Translokation des RAR $\alpha$ - Gens nachweisen (52). Vor allem die Expression von RAR $\beta$  scheint eine Rolle bei der Tumorgenese zu spielen. So konnte bei vielen Tumorzelllinien, wie bei Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs, der Zervix oder bei Prostata- und Lungenkrebszellen eine im Vergleich zum Normalgewebe vorliegende Herabregulierung oder ein Verlust der Induzierbarkeit des Rezeptors festgestellt werden (4, 25, 36, 55). Dies läßt vermuten, daß RAR $\beta$  die Funktion eines Tumorsuppressor-Gens besitzt. Die Wiederherstellung von normalen RAR $\beta$ -Spiegeln in Ovarialkarzinomzellen bewirkte ein Ansprechen der zuvor resistenten Zellen auf Retinsäure (48).

### **1.4 Retinsäure als therapeutische Substanz**

Aufgrund experimenteller Ergebnisse spielen die Retinoide in zweierlei Hinsicht eine wichtige Rolle bei der Tumorthherapie. Zum einen wurde festgestellt, daß die Retinoide chemopräventiv wirken können: So konnten durch Retinoid-Behandlung Leukoplakien (Vorstufen maligner Entartung) der Mundschleimhaut zurückgedrängt werden (22) und auch bei bronchogenen Metaplasien oder Zervixdysplasien zeigten die Retinoide einen chemopräventiven Effekt (23, 35). Bei Patienten mit bereits behandeltem Tumor im Kopf-Hals-Bereich konnte durch die Retinoid-Behandlung das Auftreten eines Zweittumors im aerodigestiven Trakt stark reduziert werden (24). Zum anderen haben Retinoide eine direkte tumorhemmende Wirkung. Dies konnte sowohl an hämatologischen Systemerkrankungen als auch an soliden Tumoren gezeigt werden, wie z.B. bei der Promyelozyten-Leukämie oder bei T-Zell-Lymphomen (10, 53). Vor allem in Kombination mit Zytokinen sind Retinoide auch bei soliden Tumoren therapeu-

tisch wirksam. Dies konnte bei lokal fortgeschrittenem Plattenepithelkarzinom der Zervix durch eine Behandlung mit 13-cis-RA kombiniert mit Interferon- $\alpha$ 2a gezeigt werden (4, 33).

Die beschriebenen antitumorösen Wirkungen sind Folge der differenzierungsinduzierenden, antiproliferativen und zytotoxischen Wirkung der Retinoide.

### **1.4.1 Regulation von Differenzierung, Proliferation und Apoptose**

Retinoide modulieren das Wachstum und die Differenzierung durch Aktivierung der Gentranskription bestimmter direkt und indirekt an der Zellzykluskontrolle beteiligter Gene (z.B. p21, TGF $\beta$ , Transglutaminasen). Sie üben eine proliferationshemmende Wirkung aus. Bei verschiedenen Zelllinien führte die Behandlung mit Retinoiden zur Differenzierung, klinisch wird dies bei der sogenannten Differenzierungstherapie bei promyelozytischer Leukämie angewandt (53).

Die antiproliferative Wirkung der Retinoide konnte bei verschiedenen Tumorzellen nachgewiesen werden. Durch die Behandlung mit ATRA konnte bei Plattenepithelkarzinomzellen des Kopf-Hals-Bereichs eine Hemmung des Tumorzellwachstums erreicht werden (7). Auch die Behandlung von verschiedenen Brustkarzinomzelllinien mit ATRA führte zu Proliferationshemmung (26).

Der Mechanismus der antiproliferativen und differenzierungsinduzierenden Wirkung ist noch nicht vollständig geklärt. Die Steuerung dieser Vorgänge kann zum einen über die Expressionsregulation verschiedener Gene, die wiederum für die Expression von Wachstumsfaktoren (z. B. EGF oder TGF- $\beta$ ) verantwortlich sind, erfolgen (15, 49, 56). Zum anderen können Retinoide auch indirekt Einfluß auf die Transkription bestimmter Gene nehmen, in dem sie andere Transkriptionsfaktoren (z. B. AP-1), die für die Proliferation oder bei Entzündungsprozessen wichtig sind, binden (16, 40).

Eine weitere Wirkung der Retinoide ist ihre Fähigkeit, Apoptose (programmierter Zelltod) zu induzieren. In vielen Tumorzelllinien, wie Zervix- und Ovarialkarzinomzellen konnte diese Wirkung nachgewiesen werden (29, 32). Auch hier konnte gezeigt werden, daß der Mechanismus über die Expressionssteuerung von Apoptose-regulierenden Genen erfolgt (40).

## **1.5 Retinsäuren in Kombination mit Bestrahlung**

Die tumorhemmende Wirkung einer Bestrahlung kann durch zusätzliche Retinoid-Behandlung erhöht werden. Retinoide üben auf viele Tumorzelllinien einen radiosensitivierenden Effekt aus. Bei einer zweiwöchigen Vorbehandlung mit 13-cis-Retinsäure und Interferon- $\alpha$ 2a bei 22 Patientinnen mit lokal fortgeschrittenem Zervixkarzinom konnte gezeigt werden, daß die Tumoroxygenierung deutlich verbessert wurde (14). Da die innerhalb eines Tumors vorkommenden hypoxischen Areale meist schlecht auf eine Radiotherapie ansprechen, kann durch verbesserte Oxygenierung die Effektivität der Bestrahlung erhöht werden. Auch bei anderen Zelllinien, wie etwa bei Zellen von Plattenepithelkarzinomen des Kopf- Hals- Bereichs, bei Brustkrebszellen oder Melanomzellen konnte eine radiosensitivierende Wirkung der Retinoide festgestellt werden (4, 12, 45, 46).

## **1.6 Zielsetzung und Aufgabenstellung**

Ziel der Arbeit war es, die retinoidvermittelten Mechanismen der Zyto- und Radiotoxizität weiter aufzuklären. Hierzu sollte die in der Literatur als retinsäureresistent beschriebene Kolonkarzinomzelllinie HCT 116 auf zellbiologischer und molekularbiologischer Ebene untersucht werden um eventuelle Unterschiede zu retinoidsensitiven Zellen aufzudecken. In diesem Zusammenhang ist insbesondere die basale und die durch Retinsäure induzierte Expression der Bindungsproteine CRABP I und II, sowie der nukleären Retinoidrezeptoren RAR  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und RXR  $\alpha$  und  $\beta$  von Bedeutung. Zur Erhebung dieser Parameter sollte die Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR), der Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) und die Western Blot Methodik zur Anwendung kommen. Mittels Koloniebildungstests sollte außerdem ein möglicher radiosensitivierender Effekt der Retinoide untersucht werden.

## 2 Material

### 2.1 Chemikalien

Acrylamid	Serva
Agarose	Sigma
Albumin Fraktion 5 (BSA)	Roth
Bisacrylamid	Serva
Borsäure	Sigma
Bromphenolblau	Pharmacia
Coomassie Blue G250	Serva
4,6-Diamino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)	Serva
Diethylpyrocarbonatin (DEPC)	Sigma
Dimethylsulfid (DMSO)	Sigma
Essigsäure (Eisessig) 100%	Merck
Ethanol	Merck
Ethylendiamintetraessigsäure-Natriumsalz (EDTA)	Sigma
Formaldehyd, 37%	Merck
Giemsa (Azur-Eosin-Methylenblau)	Merck
Glycerin	Sigma
HEPES	Life Technologies
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Roth
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	Merck
3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS)	Sigma
Natriumacetat	Merck
Natriumbicarbonat	Biochrom KG
Natriumchlorid	Merck
SDS	Roth
Sucrose	Sigma
Triton-X-100	Serva
Trizma Base	Sigma
Tween 20	Roth

## 2.2 Retinoide

Tretinoin: all-trans-Retinsäure, ATRA;  $C_{20}H_{28}O_2$  (Sigma)

Isotretinoin: 13-cis-Retinsäure, 13cRA;  $C_{20}H_{28}O_2$  (Sigma)

Die verwendeten Retinoide wurden als Trockensubstanz bei  $-70^{\circ}C$  aufbewahrt. Direkt vor Gebrauch wurden Stammlösungen ( $10^{-2}$  M) in DMSO hergestellt und mit dem Zellkulturmedium auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt.

## 2.3 Zelllinien

SiHa (HTB-35;+): Plattenepithelkarzinom-Zelllinie der Zervix, entstammt einer 55jährigen japanischen Patientin, etabliert 1970 (19).

SCC 9 (CRL-1629;+): keratinisierende Plattenepithelkarzinomzelllinie der Zunge, 1981 von einem 25jährigen Patienten etabliert (44).

HCT 116 (CCL-247;-): Adenokarzinomzelllinie des Dickdarms, isoliert aus dem Dickdarm eines männlichen Patienten, enthält eine Mutation im Kodon 13 des ras-Protoonkogens (8).

## 2.4 Zellbiologische Materialien

### 2.4.1 Lösungen, Puffer und Medien

Je nach Zellart wurden unterschiedliche Kulturmedien verwendet:

„Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium“ (DMEM) wurde für die Kultivierung der Zelllinie HCT 116 verwendet, „Eagle´s Minimum Essential Medium“ (MEM) für die Kultivierung der Zelllinien HTB 35 und SCC 9.

- **DMEM-Kulturmedium**

12,04g DMEM Trockenmedium (Life Technologies) wurden mit 3,33g  $NaHCO_3$  in 900 ml destilliertem  $H_2O$  gelöst. Nach Zugabe von 10ml Penicillin-Streptomycinlösung (10.000 $\mu$ g/ml) wurde der pH mit 1 N HCl auf 7,2 eingestellt.

- **MEM-Kulturmedium**

9,68g MEM Trockenmedium (Biochrom KG) wurden mit 2,2g NaHCO<sub>3</sub> in 900 ml destilliertem H<sub>2</sub>O gelöst. Nach Zugabe von 10ml Penicillin-Streptomycinlösung (10.000µg/ml) wurde der pH mit 1N HCl auf 7,2 eingestellt.

Den Medien wurde nach der Sterilfiltration noch 10% fötales Kälberserum zugegeben.

- **Fötales Kälberserum (FKS)**

Fötales Kälberserum (Life Technologies, 10270-106, Charge 40 G 7285 K) wurde portioniert und bis zur Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

- **Trypsin-Lösung**

Für die Passagierung wurde portionierte und bei -20°C gelagerte Trypsin-Lösung (Serva, 37290) verwendet.

- **Phosphat-buffered Saline (PBS)**

PBS<sup>-</sup> (ohne Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup>): in 1l destilliertem H<sub>2</sub>O werden 8,0g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 0,2g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> gelöst und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt.

- **Einfriermedium**

DMEM oder MEM (s.o.) + 20% FKS + 5% DMSO

- **Auftaumedium**

DMEM oder MEM (s.o.) + 20% FKS

Alle Lösungen, die nicht schon vom Hersteller steril geliefert wurden, wurden autoklaviert oder mittels Sterilfilter (Sartorius) filtriert.

- **0,05% Coomassie-Blau-Lösung zur Zytoplasmaanfärbung**

0,5g Coomassie in 200ml Methanol + 75ml Eisessig + 75ml H<sub>2</sub>O.

- **Giemsa-Lösung zur Zellkernanfärbung**

4ml Giemsa-Lösung (Azur-Eosin-Methylenblau) in 100ml Sörensenpuffer A/B auf pH 7,2 eingestellt.

Sörensenpuffer A/B: 38,8ml Sörensen-Puffer A (9,1g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> in 1l H<sub>2</sub>O) + 61,2ml Sörensen-Puffer B (11,9g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> in 1l H<sub>2</sub>O)

## 2.4.2 Kulturgefäße

Alle Zellkulturgefäße wurden von der Firma Falcon Becton & Dickinson, die Bluecaps (15ml und 50ml) von der Firma Greiner Labortechnik und die Einfrier-  
röhrchen von der Firma Nalge Nunc International bezogen.

## 2.5 Molekularbiologie

### 2.5.1 Lösungen, Puffer

- **DEPC-H<sub>2</sub>O**

200µl DEPC in 1000ml H<sub>2</sub>O bidest, bei RT über Nacht inkubieren, anschließend autoklavieren.

- **0,5M EDTA**

14,62g EDTA ad 100ml DEPC-H<sub>2</sub>O, pH mit NaOH auf 8

- **1M HCL**

8,6ml konz. HCl ad 91,4ml H<sub>2</sub>O bidest

- **50 x TAE-Puffer**

242g Tris-Base + 57,1ml Eisessig + 100ml 0,5M EDTA mit H<sub>2</sub>O bidest auf  
1000ml auffüllen, pH 8,0 einstellen und autoklavieren.

- **10 x MOPS-Puffer**

41,86g MOPS in 800ml DEPC-H<sub>2</sub>O lösen,

- **DNA-Probenpuffer**

Blue Run (Best.Nr. DANN-BR-S, Firma AGS)

- **Molekulargewichtsmarker**

Boe VI (Boehringer)

### 2.5.2 Synthetische Oligonukleotide

- CRABP I-Primer (Biometra)

1) forward (5´ -3´ ): CGG CAC CTG GAA GAT GCG CA

2) reverse (5´ -3´ ): CCA CGT CAT CGG CGC CAA AC



- CRABP II-Primer (Biometra)
  - 1) forward (5' -3' ): CGC CAC CAT GCC CAA CTT C
  - 2) reverse (5' -3' ): TCT CCC ATT TCA CCA GGC TC
- CRABP II-Volllänge-Primer (Biometra)
  - 1) forward (5' -3' ): TAC GGG GAC CGC CTC CCG
  - 2) reverse (5' -3' ): GGT TCT GAA TTC GGC ATG TCA CTC TCG GAC  
GTA GAC CCT
- RAR $\alpha$ -Primer (Biometra)
  - 1) forward (5' -3' ): GCC CAA GCC CGA GTG CTC
  - 2) reverse (5' -3' ): CGC TCA GAG TGT CCA GGC
- RAR $\beta$ -Primer (Biometra)
  - 1) forward (5' -3' ): GAC TTC GAA GCC AAG AAT GCA C
  - 2) reverse (5' -3' ): CAC TTG AAC TTG GGG TCA AGG
- RAR $\beta$ -Volllänge-Primer ( Life Technologies)
  - 1) forward (5' -3' ): GGG AAT TCA TGT TTG ACT GTA TGG ATG TTC
  - 2) reverse (5' -3' ): AAG AAT TCT TAT TGC ACG AGT GGT GAC TGA
- RAR $\gamma$  -Primer (Biometra)
  - 1) forward (5' -3' ): TCA CCA AGG TCA GCA AAG CC
  - 2) reverse (5' -3' ): GTC AGG CTG GGG ACT TCA G
- RXR $\alpha$ -Primer (Biometra)
  - 1) forward (5' -3' ): TAC GTG GAG GCA AAC ATG GG
  - 2) reverse (5' -3' ): GTC AAA GAT GGC GCC CAC C
- RXR $\beta$ -Primer (Biometra)
  - 1) forward (5' -3' ): GGC AGG AGC CCA AAT GAC C
  - 2) reverse (5' -3' ): CTC ATG TCA CGC ATT TTG GAC
- EF1 $\alpha$ -Primer (Biometra)
  - 1) forward (5' -3' ): CCA TGA AGC TTT GAG TGA AGC
  - 2) reverse (5' -3' ): TTC TGG GCA GAC TTG GTG AC

### 2.5.3 Apparaturen

- **Thermocycler**

PCR System 2400 (Perkin Elmer)

- **RNA-Gelkammer**

MWG-Biotech

- **DNA-Gelkammer**

LKB GNA 100 (Pharmacia)

- **Electrophoresis Power Supply**

EPS 3500 (Pharmacia)

## 2.6 Western Blot

### 2.6.1 Lysepuffer zur Proteinisolierung

- **SAPU-Puffer**

2,0ml Glycerol

2,0ml 10 % SDS

0,25ml Bromphenol Blau

2,5ml 4x Sammelgelpuffer

0,5ml  $\beta$ -Mercaptoethanol

Mit H<sub>2</sub>O auf ein Endvolumen von 10ml auffüllen.

- **Lysepuffer zur Einfrier/Auftau-Methode**

1ml HEPES (1M, pH 8,0)

10ml Sucrose (0,5M)

100 $\mu$ l EDTA (200mM)

200 $\mu$ l MgSO<sub>4</sub> (0,5M)

2ml NaF (0,5M)

Direkt davor werden 50 $\mu$ l DTT (1 mM) und 100 $\mu$ l Pefabloc zugegeben.

Mit H<sub>2</sub>O auf 20ml Endvolumen auffüllen.

## 2.6.2 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

- **4x Trenngelpuffer**

36,34g Tris-base

8ml 10% SDS

Mit H<sub>2</sub>O bidest auf 200ml auffüllen, pH auf 8,8 einstellen.

- **4x Sammelgelpuffer**

12,12g Tris-base

8ml 10% SDS

Mit H<sub>2</sub>O bidest auf 200ml auffüllen, pH auf 6,8 einstellen.

- **10x SDS-PAGE-Laufpuffer**

30g Tris-base

144g Glycerin

100ml 10%SDS

Mit H<sub>2</sub>O bidest auf 1000ml Endvolumen auffüllen, pH auf 8,3 einstellen.

- **30% Acrylamid-Lösung (37,5:1)**

30g Acrylamid

0,8g Bisacrylamid

Mit H<sub>2</sub>O auf 100ml auffüllen, bei 4 °C aufbewahren.

- **4x SDS-Probenpuffer**

2,5ml Glycerin

2,0ml 10% SDS

0,25mg BromphenolBlau

2,5ml 4x Sammelgelpuffer

Mit H<sub>2</sub>O auf 10ml auffüllen und 0,5ml β-Mercaptoethanol zugeben.

- **Molekulargewichtsmarker**

10kD Protein Ladder (Life Technologies)

- **Prestain**

prestained Pyruvate Kinase (66,0kDa) (Sigma)

- **Apparatur**

Electrophoreses Unit (Hofer Scientific Instruments)

### 2.6.3 Blotting

- **Nitrocellulosemembran**

Optitran BA-S 83 (Schleicher u. Schuell)

- **Filterkartons**

GB 002 Gel-Plotting-Papier (Schleicher u. Schuell)

- **Anodenpuffer**

3,1g Borsäure + 4ml SDS (10%), mit NaOH auf pH9 einstellen, 200ml Methanol zugeben, ad 1000ml H<sub>2</sub>O bidest

- **Kathodenpuffer**

3,1g Borsäure + 4ml SDS (10%), mit NaOH auf pH9 einstellen, 50ml Methanol zugeben, ad 1000ml H<sub>2</sub>O bidest

- **Ponceau-S-Färbung**

20ml Ponceau-S Konzentrat (Sigma) + 180ml H<sub>2</sub>O bidest

- **Apparatur**

SemiPhor (Hoefer Scientific Instruments)

### 2.6.4 Blocking

- **Blocking-Lösung**

1g Milchpulver + 0,02ml Tween in 20ml PBS<sup>-</sup>

- **Waschlösung**

PBS<sup>-</sup> + 0,05% Tween 20

- **ECLChemilumineszenz**

ECL Plus<sup>TM</sup> Western Blotting reagent pack (Amersham)

### 2.6.5 Antikörper

Die Antikörper wurden portioniert bei -20°C aufbewahrt und vor Gebrauch in Blocking-Lösung entsprechend verdünnt.

- **Erst-Antikörper**

Maus-anti-CRABP I (Dianova); Verdünnung 1:800

Kaninchen-anti-Aktin (Sigma, A2066); Verdünnung 1:500

Kaninchen-anti-RARβ (Biomol); Verdünnung 1:750

- **Zweit-Antikörper (HRP konjugiert)**

Anti-Maus-Antikörper (Amersham); Verdünnung 1:2500

Anti-Kaninchen-Antikörper (Amersham); Verdünnung bei Aktin 1:10000

Verdünnung bei RAR $\beta$  1:5000

## **2.7 Enzyme, Kits und andere Materialien**

RNeasy Mini Kit (Qiagen)

1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthese Kit for RT-PCR (Roche Diagnostics GmbH)

PCR Core Kit (Roche Diagnostics GmbH) (Roche Diagnostics GmbH)

PCR ELISA (Dig Labeling) (Roche Diagnostics GmbH)

PCR ELISA (Dig Detection) (Roche Diagnostics GmbH)

Bio Rad D<sub>c</sub>Protein Assay (Bio Rad Laboratories)

## **3 Methoden**

### **3.1 Zellbiologische Methoden**

#### **3.1.1 Steriltechnik**

Das Arbeiten mit Zellkulturen erfordert, daß alle Kulturgefäße, Nährlösungen und Arbeitsgeräte steril sind. Alle benötigten Materialien, die nicht bereits vom Hersteller sterilverpackt geliefert wurden, mußten im Autoklaven bei 1,0 bar Überdruck und 121 °C für ca. 20 min oder im Heißluftsterilisator bei 180 °C über Nacht behandelt werden. Alle Lösungen und Zellkulturmedien wurden sterilfiltriert oder autoklaviert und bei 4 °C in sterilen Flaschen aufbewahrt. Die Arbeit mit Zellkulturen wurde an einer Sterilbank durchgeführt.

#### **3.1.2 Allgemeine Zellkulturbedingungen**

Zur Kultivierung befanden sich die Zellen in Inkubatoren (Heraeus 6000) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 37 °C unter Begasung mit 7% CO<sub>2</sub> und pH 7,2 – 7,4. Vor Gebrauch wurden alle benötigten Medien und Lösungen mit Hilfe eines Wasserbades auf 37 °C erwärmt um optimale Kulturbedingungen zu erreichen.

#### **3.1.3 Auftauen von Zellen**

Zum Auftauen wurden die Zellen aus dem Stickstoff genommen, im Wasserbad bei 37 °C angetaut und in kleine Kulturflaschen (25cm<sup>2</sup>) in 4ml Auftaumedium ausgesät. Nach 4h, bzw. bei der Zelllinie HCT116 nach 10h wurde die Anwachsrate bestimmt und auf Kulturmedium gewechselt. Die Zellen konnten nach 3 – 5 Tagen in große Kulturflaschen (75cm<sup>2</sup>) umgesetzt werden.

#### **3.1.4 Stammkulturen und Passagierung**

Für die Stammkulturen wurden  $0,7 \times 10^6$  Zellen in große Kulturflaschen in 10ml Kulturmedium ausgesät. Alle 3 – 5 Tage wurden die Zellen passagiert und das Medium bei Bedarf gewechselt. Für die Passagierung wurde das Medium ab-

gesaugt und zum Waschen 10ml PBS<sup>-</sup> zugegeben. Zum Lösen der Zellen vom Flaschenboden wurde mit 2ml Trypsin bei 37°C für 2min inkubiert. Nachdem sich die Zellen vom Flaschenboden abgelöst hatten, wurde 8ml Kulturmedium zugegeben. Die Zellen wurden mit Hilfe einer 5ml Glaspipette durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Anschließend konnte die Zellzahl mit Hilfe einer Fuchs-Rosenthal-Kammer unter dem Mikroskop bestimmt werden. Aus der Zellsuspension konnten dann wieder Zellen für die Stammkultur oder für Versuche ausgesät werden. Bei der Routinepassagierung wurde mit Hilfe der Ausgangs- und der Endzellzahl die Zellzuwachsrate in Populationsverdoppelungen (PD) nach folgender Formel berechnet:

$$PD = \ln N - \ln N_0 / \ln 2 \quad (N = \text{Endzellzahl}; N_0 = \text{Ausgangszellzahl}).$$

Durch Addieren der Populationsverdoppelungen ergeben sich die kumulativen Populationsverdoppelungen (CPD).

### **3.1.5 Kryokonservierung**

Zur Kryokonservierung wurden die trypsinisierten Zellen für 2min bei 1400rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in einer entsprechenden Menge kaltem Einfriermedium ( $1 \times 10^6$  Zellen / ml) suspendiert. Die Zellen wurden in gekühlte Kryoröhrchen gefüllt, schrittweise mit Hilfe eines Einfrierstutzens auf  $-196^\circ\text{C}$  gebracht und in flüssigem Stickstoff konserviert.

### **3.1.6 DAPI-Routinefärbung**

Zum Ausschluß einer Mykoplasmenkontamination der Zellen wurde vor der Kryokonservierung eine DAPI-Routinefärbung durchgeführt. Pro Loch einer 6-well-Platte wurden  $2 \times 10^4$  Zellen in 2ml Kulturmedium auf sterile Deckgläschen ausgesät. Die Zellen wurden 2 – 3 Tage kultiviert. Dann wurde das Medium abgesaugt, die Zellen mit je 2ml PBS<sup>-</sup> gewaschen und mit 2ml Methanol kurz fixiert. Von der DAPI-Stammlösung (5µg DAPI /ml Methanol) wurde 1µl in 10ml Methanol verdünnt. Mit diesem DAPI-Methanol-Gemisch wurden die Zellen 15 – 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde einmal mit Methanol und mehrmals mit PBS<sup>-</sup> gewaschen. Die Deckgläschen konnten nun auf einen Objektträ-

ger überführt und in einem Tropfen Mowiol eingebettet werden. Bei 465nm UV-Anregung wurden die Zellen nun unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

DAPI komplexiert mit doppelsträngiger DNA. Die Zellkerne fluoreszieren daher blau. Bei einem Befall mit Mykoplasmen werden diese als kleine blaufluoreszierende Punkte auf der Zelloberfläche sichtbar. Befallene Zellen können weder für die Zellkultur noch für Versuche verwendet werden.

### 3.1.7 Koloniebildungstest

Mit Hilfe dieses Tests ist es möglich, das Klonierungsverhalten von Zellen unter verschiedenen Behandlungsbedingungen zu untersuchen. In 6-well-Platten wurden je Loch 500 Zellen in 2ml Kulturmedium ausgesät. Je nach Zelllinie wurde nach 10- bzw. 12-tägiger Inkubationszeit der Koloniebildungstest abgestoppt, fixiert, gefärbt und ausgewertet:

Zur Fixierung wurden die Zellen erst 2x mit PBS<sup>-</sup> gewaschen, für 10min mit 3,7% Formaldehyd und anschließend für 30min mit 70% Ethanol behandelt. Durch Spülen mit destilliertem Wasser wurde der Alkohol entfernt.

Um das Zytoplasma anzufärben, wurden die Zellen für 30 – 60sec in 0,05% Coomassie-Blau-Lösung inkubiert und dann abgespült. Zur Zellkernfärbung wurden die Zellen für 40min mit Giemsa-Lösung inkubiert und abgespült. Nach jeder Spülung wurden die Platten im Wärmeschrank bei 50°C getrocknet.

Zur Auswertung wurde die Anzahl der gebildeten Kolonien bestimmt. Eine Kolonie ist eine Population von Zellen, die aus einer einzelnen Zelle durch mitotische Teilung entstanden ist. Als Kolonie wurde normalerweise ein Zellhaufen > 50 Zellen gewertet. Diese Klone, die bei idealer Verteilung einzeln lagen, wurden gezählt und die Anwachsrate (*plating efficiency*; PE) mit Hilfe folgender Formel bestimmt:

$$PE [\%] = 100 \times \text{Klonzahl pro Platte} / \text{Anzahl der ausgesäten Zellen.}$$

Um die Behandlung zu quantifizieren, wurde die Surviving Fraction (SF) der jeweiligen Behandlungsbedingung ermittelt:

$$SF = PE \text{ der Bedingung} / PE \text{ der Kontrolle.}$$



### 3.1.7.1 Retinoidbehandlung

Bevor die Retinoid-Behandlung (ATRA bzw. 13-cis-RA) erfolgen konnte, wurde eine Stammlösung des Retinoids von 10 mM hergestellt. Die Retinsäure wurde dazu in DMSO gelöst. Das Versuchsmedium zur Behandlung der Zellen wurde mit dieser Stammlösung und dem Kulturmedium durch eine Verdünnungsreihe hergestellt, sodaß sich folgende Retinoidkonzentrationen ergaben: 100; 10; 1; 0,1 und 0,01 $\mu$ M. Als Kontrolle wurde Kulturmedium verwendet, das mit der entsprechenden DMSO-Konzentration versetzt war.

Nachdem die Zellen 3 Tage im Brutschrank kultiviert worden waren, wurde das Kulturmedium abgesaugt und das entsprechende Versuchsmedium zur Behandlung der Zellen zugegeben. Die Zellen wurden lichtgeschützt für 24h im Inkubator kultiviert, anschließend wurde wie unter 1.1.7 beschrieben ein Koloniebildungstest durchgeführt.

### 3.1.7.2 Kombinierte Bestrahlung und Retinoid-Behandlung

Die Bestrahlung der Zellen erfolgte in einem Linearbeschleuniger bei einer *source surface distance* (SSD) von 100cm und einer Feldgröße von 30 x 30cm. Wie oben beschrieben, wurden die Zellen 24h vor der Bestrahlung (Einzeldosis von 2Gy) mit den Retinoiden (ATRA bzw. 13-cis-RA) in den Konzentrationen 10 und 0,1 $\mu$ M behandelt. Nach der Bestrahlung wurden zwei Koloniebildungstests mit den Zellen durchgeführt: Ein Teil der Zellen wurde direkt nach der Bestrahlung (*immediate plating*) und der andere Teil (Mediumwechsel direkt nach Bestrahlung) 8h später (*delayed plating*) in 6-well-Platten ausgesät. Zur 10tägigen Inkubation wurde Kulturmedium verwendet.

In einem weiteren Versuchsansatz wurde während dieser Inkubation statt des Kulturmediums Versuchsmedium verwendet, sodaß die Zellen mit der entsprechenden Retinoidkonzentration, mit der sie vor der Bestrahlung behandelt worden waren, während der 10tägigen Inkubation weiterbehandelt wurden.

Zur Auswertung wurden die SF' s der retinoidbehandelten und bestrahlten Zellen bezogen auf die unbestrahlten Kontrollen berechnet.

## **3.2 Molekularbiologische Methoden**

### **3.2.1 Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion**

#### **3.2.1.1 Isolation und Aufarbeitung der RNA**

RNA ist im Vergleich zu DNA sehr anfällig für spontane und enzymatisch katalysierte Hydrolyse. Ribonukleasen, die RNA abbauen, kommen ubiquitär vor. Alle Lösungen wurden deshalb in heißluftsterilisierten Gefäßen mit autoklavierten Rührfischen, Pipetten und RNase-freiem Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandeltem H<sub>2</sub>O hergestellt.

Die Isolierung der RNA wurde mit Hilfe des RNeasy-Mini-Kit von Qiagen durchgeführt. Die Zellen wurden je nach Versuch 24h zuvor behandelt (ATRA bzw. 13-cis-RA in den Konzentrationen 10 und 0,1µM), dann trypsiniert, gezählt und abzentrifugiert (5min bei 1200rpm), der Überstand wurde verworfen. Nachdem das Pellet mit PBS<sup>-</sup> gewaschen und abzentrifugiert wurde, konnten es nach Kitanleitung weiterbehandelt werden. Die isolierte RNA wurde mit 2 x 30µl DEPC-Wasser durch Zentrifugation bei 10.000 rpm von der Säule eluiert.

Die Reinheit und die Ausbeute der RNA wurde mit einem Photometer bestimmt.

#### **3.2.1.2 Bestimmung der Reinheit und Konzentration der RNA**

Die Menge der isolierten RNA läßt sich mittels UV-Spektroskopie bestimmen: Eine Probe der eluierten RNA wurde in DEPC-Wasser 1:50 verdünnt und bei 260nm mit einem Spektralphotometer gemessen. Eine Extinktion von 1,0 entspricht einer Konzentration von 40µg RNA/ml. Die Qualität der Nukleinsäure kann mit Hilfe des Extinktionverhältnisses der Wellenlängen 260nm und 280nm bestimmt werden. Diese Ratio sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

### 3.2.1.3 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Als weitere Kontrolle auf RNase-freies Arbeiten bei der RNA-Isolation wurde eine Gelanalyse auf einem Formaldehyd-Agarosegel durchgeführt. Für die elektrophoretische Auftrennung der RNA wurde ein 1% Agarosegel verwendet. Die Denaturierung der RNA erfolgte durch Formaldehyd.

Für eine kleine Gelkammer wurden 250mg Agarose in 18,25ml DEPC-H<sub>2</sub>O und 2,5ml 10x MOPS aufgekocht. Nach dem Abkühlen der Agarose auf ca. 60°C wurde 4,25ml 37% Formaldehyd zugegeben und das Gel unter dem Abzug gegossen. Nach einer Stunde war das Gel erstarrt und wurde 1 – 2mm mit Laufpuffer überschichtet. Der Laufpuffer wurde aus 270ml DEPC-Wasser und 30ml 10x MOPS hergestellt. 1,5 – 3µg jeder Probe wurde mit RNA-Probenpuffer im Verhältniss 3 : 5 gemischt und für 15min bei 65°C denaturiert. Anschließend wurden die Proben für 5min auf Eis gestellt, um die Wiederausbildung der RNA-Sekundärstruktur zu verhindern. Die Proben wurden dann auf das Gel aufgetragen und bei 90V in etwa 1,5h elektrophoretisch aufgetrennt. Die Banden konnten mit Ethidiumbromid angefärbt werden und unter UV-Licht (260nm) auf einem Transluminator detektiert werden. Lag kein Abbau der RNA durch RNasen vor, war eine stärkere 28S-Bande und eine schwächere 18S-Bande und keinerlei „Schmier“ auf dem Gel zu erkennen (s. Abb. 6).

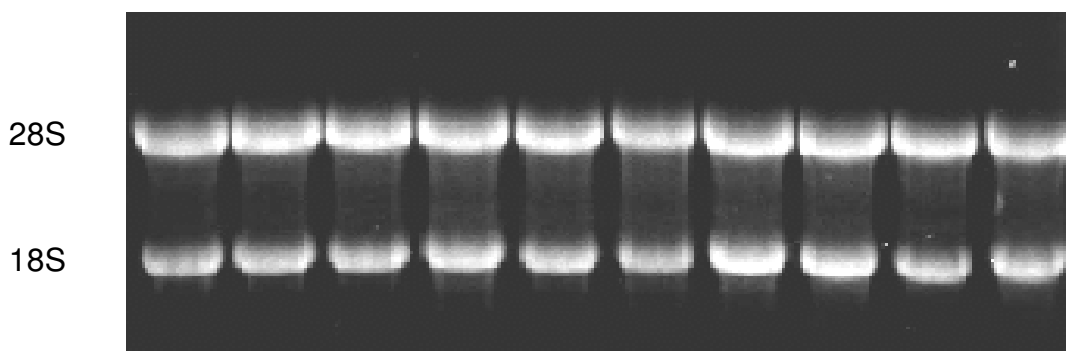


Abb. 6: Elektrophoresegel zur Auftrennung der RNA in 18S- und 28S-Banden.

### 3.2.1.4 Reverse Transkription

Mit Hilfe der Reversen Transkription kann cDNA über mRNA als Matrize synthetisiert werden und enthält so keine Intronsequenzen. Durch Verwendung von Oligo-(dT)-Primern kann aus der Gesamt-RNA selektiv mRNA (2-4% der Gesamt-RNA) in cDNA umgeschrieben werden.

Die cDNA-Synthese erfolgte mit Hilfe des First-Strand-cDNA-Synthesis-Kit von Boehringer. Während der RNase-Inhibitor und die AMV-RT zuletzt auf Eis aufgetaut wurden, wurden alle übrigen Lösungen bei Raumtemperatur aufgetaut. Bei mehr als einer Probe wurde ein Master-Mix nach Kit-Anleitung hergestellt. 1µg eluierte RNA wurde mit destilliertem H<sub>2</sub>O auf 7,8µl aufgefüllt, bei 65°C über 15min denaturiert und anschließend für 5min auf Eis gestellt. Je 12,2µl Master-Mix wurden mit einer RNA-Probe gemischt und vorsichtig abzentrifugiert. Die reverse Transkription erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

Die cDNA wurde mit sterilem H<sub>2</sub>O bidest 1 : 20 verdünnt und, um mehrmaliges Auftauen zu vermeiden, zu je 10µl in PCR-Cups portioniert und bei -70°C eingefroren.

### 3.2.1.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht es, von bestimmten Nucleotidsequenzen millionenfache Kopien enzymatisch in vitro herzustellen.

Der PCR-Zyklus beginnt mit der thermischen Denaturierung, wobei der zu amplifizierende DNA-Doppelstrang bei 90 – 95°C in 2 Einzelstränge überführt wird. Danach erfolgt bei etwa 50°C die Bindung der 2 synthetischen Oligonucleotide (= Primer) an die komplementären Sequenzen der Matrizen-DNA. Anschließend erfolgt bei 72°C die eigentliche Amplifikation. Dabei synthetisiert die hitzestabile DNA-Polymerase den neuen, zwischen den beiden Primern liegenden Doppelstrang. Durch zyklische Wiederholung der einzelnen Reaktionsschritte wird die Matrize exponentiell amplifiziert.

Die PCR erfolgte ausschließlich mit der nach RNA-Isolierung und cDNA-Synthese gewonnenen cDNA.

Die benötigten Lösungen wurden auf Eis aufgetaut und vorsichtig abzentrifugiert. Es wurde ein Mastermix hergestellt, wobei die Taq-Polymerase als letztes zugegeben wurde:

21µl	H <sub>2</sub> O bidest
5µl	10x Reaktionspuffer + MgCl <sub>2</sub> (Roche Diagnostics GmbH)
1µl	dNTP-Mix (10mM) (Roche Diagnostics GmbH)
1µl	DMSO
5µl	Sense-Primer (10µg/ml)
5µl	Antisense-Primer (10µg/ml)
2µl	Taq-Polymerase (1U/µl) (Roche Diagnostics GmbH)

Je 40µl des Mastermixes wurden den 10µl der 1 : 20 mit H<sub>2</sub>O bidest verdünnten cDNA-Probe zugegeben, der Reaktionsansatz wurde gut durchmischt, zentrifugiert, in den Thermocycler gesetzt und das entsprechende PCR-Programm gestartet.

### PCR-Programme:

CRABP I, RAR alpha: 95°C 5'  
95°C 45'' - 63°C 45'' - 72°C 45'' - 35 Zyklen  
72°C 7' - 4°C $\infty$

CRABP II, RAR beta, RXR beta: 95°C 5'  
95°C 45'' - 59°C 45'' - 72°C 45'' - 35 Zyklen  
72°C 7' - 4°C $\infty$

RAR gamma, RXR alpha: 95°C 5'  
95°C 45'' - 60°C 45'' - 72°C 45'' - 35 Zyklen  
72°C 7' - 4°C $\infty$

EF1 alpha: 95°C 5'  
95°C 45'' - 59°C 45'' - 72°C 45'' - 22 Zyklen  
72°C 7' - 4°C $\infty$

### **3.2.1.6 DNA-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung der DNA erfolgte mit 2% TAE-Agarosegelen. Dazu wurde 1g Agarose in 50ml 1x TAE-Puffer aufgekocht. Nachdem das Gel auf etwa 60 °C abgekühlt war, wurde 4µl Ethidiumbromid zugegeben. Das TAE-Agarose-Gemisch wurde dann in eine horizontale Laufkammer gegossen und ein Kamm eingesetzt. Nach etwa 30min konnte der Kamm entfernt werden und das erstarrte Gel mit 1x TAE-Laufpuffer 1 – 2mm überschichtet werden. 7µl PCR-Probe wurden mit 1µl Probenpuffer versetzt und in die Tasche pipettiert. Zusätzlich wurde noch ein Molekulargewichtsmarker zur Größenbestimmung der Fragmente aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 90V für 50min. Die Nukleinsäurebanden konnten dann bei 260nm unter UV-Licht auf einem Transluminator detektiert und mit Hilfe einer Polaroidkamera dokumentiert werden.

### **3.2.1.7 Auswertung**

Die Abbildungen der Elektrophoresegele wurden eingescannt und densitometrisch ausgewertet (Photoshop V). Als Referenz für die untersuchten Rezeptoren wurde das Housekeeping-Gen EF1alpha verwendet. Die Expression der verschiedenen Rezeptoren konnte somit als Vielfaches der EF1alpha-Expression dargestellt werden.

### **3.2.2 PCR-ELISA**

Um einen noch sensitiveren Nachweis der PCR-Produkte zu erreichen, wurde der PCR-ELISA mit dem PCR ELISA (Dig Labeling) bzw. PCR ELISA (Dig Detection) Kit (Roche Diagnostics GmbH) durchgeführt. So können auch PCR-Produkte, die aufgrund ihrer geringen Konzentration in einem Agarosegel nicht sichtbar sind, nachgewiesen und gemessen werden.

Es wird eine PCR durchgeführt, in der Biotin markierte Primer verwendet werden. Zur späteren Quantifizierung wird zusätzlich Digoxigenin in die PCR-Produkte eingebaut. Anschließend werden die PCR-Proben in Streptavidin beschichtete ELISA-Platten gegeben. Die biotinylierten Primer dienen als Fangsonde und binden das PCR-Produkt an Streptavidin. Unspezifische Pro-

dukte können nicht binden und werden über mehrere Waschschrirte entfernt. Das während der Markierungsreaktion eingebaute Digoxigenin wird bei Zugabe der anti-Dig-IgG konjugierten Peroxidase detektiert. Der Umsatz des Substrats Azinodiethylbenzthiazolin (ABTS) kann dann im ELISA-Reader gemessen werden.

### **PCR-DIG-Markierungsreaktion:**

19µl	H <sub>2</sub> O bidest
5µl	10x Reaktionspuffer + MgCl <sub>2</sub>
3,75µl	dNTP-Mix (2mM)
1,25µl	PCR-Dig-Labeling-Mix (2mM)
5µl	Sense-Primer (10µg/ml)
5µl	Antisense-Primer (10µg/ml)
1µl	Taq-Polymerase (1U/µl)

Es wurden die gleichen PCR-Programme wie unter 3.1.2.5 beschrieben verwendet.

### **PCR-DIG-Detektionssystem:**

10µl des PCR-Produktes werden mit 40µl Denaturierungslösung gemischt, abzentrifugiert und 10min lang bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wird 450µl Hybridisierungslösung zugegeben, gevortext und zentrifugiert und anschließend je 200µl in je ein Loch der Streptavidin-beschichteten ELISA-Platte pipettiert. Die Platte wird dann für 3h bei 37°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. In dieser Zeit hybridisiert die Sonde zum einen an die Probe, zum anderen bindet sie mit dem anderen Ende an das Streptavidin am Boden der Platte. Nach den 3h wird 5mal mit je 200µl Waschlösung gewaschen, um ungebundene Produkte zu entfernen. Dann wird pro Loch 200µl anti-Dig-POD-Lösung zugegeben und für 30min bei 37°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Es wird nochmals gewaschen und anschließend mit je 200µl ABTS-Substrat-Lösung für weitere 30min bei 37°C auf einem Schüttler im Dunkeln inkubiert. Die Farbentwicklung wird bei 405nm gegen 620nm im ELISA-Reader gemessen und gegen einen Leerwert bestimmt.

Zur Auswertung wird wieder die Rezeptorexpression im Verhältnis zu EF1 alpha berechnet.

### **3.2.3 DNA-Sequenzierung**

Zum Ausschluß von Mutationen in der DNA-Sequenz von CRABP II und RAR $\beta$  wurde eine Doppelstrang-Sequenzierung durchgeführt. Dazu wurde wie unter 3.2.1 beschrieben, RNA der Zelllinie HCT 116 isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels PCR amplifiziert. Da die vollständige codierende Sequenz analysiert werden sollte, wurden bei der PCR andere Primer (Volllänge-Primer) eingesetzt. Beim PCR-Programm für CRABP II wurde darum die Annaeling-Temperatur auf 58°C gesenkt und die Synthesezeit auf 1 Minute verlängert. Es wurden 35 Zyklen durchgeführt. Da die Sequenz von RAR $\beta$  nur in sehr geringen Mengen nachweisbar war, wurden bei der PCR und bei der cDNA-Synthese einige Modifikationen durchgeführt, um ein stärkeres PCR-Signal, bzw. eine größere Menge an RAR $\beta$  zu erhalten. Bei der cDNA-Umschreibung wurden 15 $\mu$ g RNA eingesetzt. Beim PCR-Programm für RAR $\beta$  wurde die Annaeling-Temperatur auf 56°C gesenkt und die Synthesezeit wurde auf 1 Minute und 30 Sekunden verlängert. Es wurden 45 Zyklen durchgeführt.

Die PCR-Produkte von CRABP II und RAR $\beta$  wurde dann von der Firma MWG sequenziert.

## **3.3 Western-Blot**

### **3.3.1 Protein-Isolierung**

Es wurden je 0,7 x 10<sup>6</sup> Zellen in große Kulturflaschen (75cm<sup>2</sup>) ausgesät, 3 Tage im Brutschrank kultiviert und 24h vor der Protein-Isolierung behandelt (ATRA bzw. 13-cis-RA in den Konzentrationen 10 und 0,1 $\mu$ M). Die Proteine wurden mit Hilfe zweier verschiedener Methoden isoliert:



### **SAPU-Isolierung**

Diese Methode wurde verwendet, um CRABP I nachzuweisen. Die Zellen wurden trypsinisiert und die Zellzahl bestimmt. Die Zellsuspension wurde in ein Bluecap überführt und bei 1000 – 1500rpm für 4min bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde kurz mit kaltem PBS<sup>-</sup> gewaschen und nochmals zentrifugiert. Dem Pellet wurde die entsprechende Menge (40µl / 1x10<sup>6</sup> Zellen) des erhitzten SAPU-Puffers zugegeben und mit Hilfe einer 1ml Spritze und einer 20G Nadel lysiert. Die Suspension wurde 5min gekocht, abzentrifugiert und auf Eis gestellt. Die lysierten Proteine konnten nun sofort verwendet werden oder im Eisschrank bei -70°C aufbewahrt werden.

### **Einfrier-Auftau-Methode**

Zum Nachweis der Kernrezeptors RARbeta wurde diese Methode verwendet. Auch hier werden die Zellen trypsinisiert, die Zellzahl bestimmt und in einem Bluecap bei 1000 – 1500rpm für 4min bei 4°C zentrifugiert. Nachdem einmal mit kaltem PBS<sup>-</sup> gewaschen wurde, wird das Pellet in gleicher Menge Lysepuffer aufgenommen und gemischt. Anschließend wird die Suspension in einem Eppendorf-Cup erst für etwa 20sec in flüssigen Stickstoff getaucht, dann 20sec in einem Wasserbad bei 37°C aufgetaut und schließlich kräftig gevortext. Nachdem dieser Vorgang dreimal durchgeführt wurde, wird das Eppendorf-Cup bei 14000rpm für 20min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird dann vorsichtig abpipettiert. Nachdem der Proteingehalt bestimmt wurde, können die lysierten Proteine entweder sofort verwendet werden oder als Aliquots bei -70°C aufbewahrt werden.

### **3.3.2 Messung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration wurde mit dem DC Protein Assay Kit der Firma BioRad bestimmt. Die Quantifizierung der lysierten Proteinmenge beruht auf der Lowry-Methode. Dabei erfolgt durch Zugabe von Phenol eine Reaktion mit Tyrosilbestandteilen der unbekanntem Proteinmenge mit Farbumschlag. Dieser kann nun mit Hilfe einer Standard-Verdünnungsreihe aus BSA quantifiziert werden.

### 3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

Das Prinzip der Gel-Elektrophorese ist die Wanderung geladener Moleküle im elektrischen Feld. Durch Zugabe des Detergenz SDS (Sodiumdodecylsulfat) werden die Proteine denaturiert, außerdem wird die Eigenladung der Proteine überdeckt, so daß die elektrophoretische Beweglichkeit allein von der Größe des Moleküls und der Porengröße des Gels abhängt. Die Porengröße wird durch die Acrylamidkonzentration bestimmt, wobei mit steigender Konzentration die Porengröße ab- und der Siebeffekt zunimmt.

Zunächst wird die Elektrophorese-Kammer vorbereitet. Dabei werden die Glasplatten mit Hilfe von Ethanol und Aceton entfettet und gemäß den Angaben des Herstellers mit den Spacern zu einen Sandwich zusammengebaut und in die vorgesehene Halterung geklemmt. Der Kamm wird eingesetzt, dann kann das Trenngel gegossen werden. Da es sich bei CRABP I um ein sehr kleines Protein handelt, wurde ein Trenngel mit einer 15%igen Acrylamidkonzentration verwendet. Beim Nachweis von RAR beta handelte es sich um ein 9%iges Trenngel:

<b>Trenngel</b>	<b>9% (20ml)</b>	<b>15% (20ml)</b>
H <sub>2</sub> O	8,6ml	6,6ml
30% Acrylamid-Lösung	6,0ml	8,0ml
4x Trenngelpuffer	5,0ml	5,0ml
10% SDS	0,2ml	0,2ml
10% Ammoniumpersulfat	0,2ml	0,2ml
TEMED	0,012ml	0,008ml

Damit sich eine flache Grenzfläche ausbilden kann, wird das Trenngel mit Iso-propanol überschichtet und polymerisiert in einer Stunde. Anschließend wird das Sammelgel gegossen:

#### **5%iges Sammelgel (5ml)**

H <sub>2</sub> O	3,4ml
30% Acrylamid-Lösung	0,83ml
4x Sammelgelpuffer	0,63ml
10% SDS	0,05ml

10% Ammoniumpersulfat	0,05ml
TEMED	0,005ml

Nach etwa 20 min ist das Sammelgel polymerisiert, so daß man den Kamm ziehen kann und die Taschen mit Laufpuffer ausspült.

### **Probenvorbereitung:**

Die Proteine wurden wie oben beschrieben isoliert. Den Proben wurde Probenpuffer zugegeben. Bevor die Proben auf das Gel aufgetragen werden konnten, wurden sie 5min gekocht, zentrifugiert und auf Eis gestellt.

Zum Nachweis von CRABP I wurden 20µl (entspricht  $0,5 \times 10^6$  Zellen), beim Nachweis der Kernrezeptoren je 100µg Protein aufgetragen. Als Kontrolle wurde außerdem eine farbstoffmarkierte Proteinmischung (Prestain, 66kD) und ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen.

### **Elektrophorese:**

Die Gelkassette wird nach Herstellerangaben in die Elektrophoreseapparatur eingebaut. Beide Elektrophoresekammern werden mit 1x Laufpuffer gefüllt. Die Proben können nun mit Hilfe einer Hamiltonspritze aufgetragen werden. Nicht benötigte Probenaschen werden mit gleichem Volumen 1x Probenpuffer beladen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 25mA über etwa 5h.

### **3.3.4 Blotting**

Unmittelbar nach Abschluß der Gelelektrophorese erfolgt der Transfer der getrennten Proteine auf eine proteinbindende Membran. Mit Hilfe des Semi-Dry-Verfahrens werden die Proteine durch Anlegen einer Spannung aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran überführt.

Die Nitrocellulosemembran und 8 Filterkartons werden auf die entsprechende Gelgröße zurechtgeschnitten. 4 Filterkartons und die Blottingmembran werden in Anodenpuffer, die anderen 4 Filterkartons in Kathodenpuffer getränkt. Die Elektrodenplatten der Blotting-Apparatur werden befeuchtet.

Der Blotting-Sandwich wird folgendermaßen in der Apparatur aufgebaut:

4 in Anodenpuffer getränkte Filterkartons, Blottingmembran, Elektrophorese-Gel; 4 in Kathodenpuffer getränkte Filterkartons.

Durch vorsichtiges Rollen mit einem Glasstab werden Luftblasen aus dem Sandwich entfernt. Nachdem die obere Elektrodenplatte aufgelegt wurde, wird etwa 1,5 Stunden geblottet. Die Stromstärke berechnet sich je nach Gelgröße mit folgender Formel:

$$\text{mA} = 0,8 \times \text{cm}^2 \text{ Gelfläche.}$$

### **Färbung der transferierten Proteine:**

Um das Funktionieren des Blot-Vorgangs zu überprüfen, kann die Nitrocellulosemembran anschließend mit Ponceau-S-Lösung für etwa 5min inkubiert werden. Dieses Färbereagenz färbt generell Proteine an. Überschüssige Lösung wird durch Waschen mit PBS<sup>-</sup> entfernt. Die Positionen der Banden des Molekulargewichtsmarkers werden vorsichtig mit Kugelschreiber markiert, dann kann die Membran zu Dokumentationszwecken zwischen 2 Folien fotokopiert werden. Die Färbung ist nicht permanent und verschwindet beim Absättigen der Membran wieder.

### **3.3.5 Nachweisreaktion**

Durch Bindung der Erst- und Zweit-Antikörper können die Proteine spezifisch auf der Membran nachgewiesen werden. Vor Beginn der Nachweisreaktion muß der Protein-Blot abgesättigt werden. Auf diese Weise können überschüssige Proteinbindestellen „geblockt“ und so unspezifische Bindungen der Nachweisreagenzien verhindert werden.

### **Blocking:**

Der Protein-Blot wird in Folie eingeschweißt, die Blocking-Lösung wird zugegeben und der Blot 1h unter langsamen Schwenken auf einem Rotationsschüttler bei Raumtemperatur abgesättigt.

### **Erst- und Zweit- Antikörper- Zugabe:**

Nachdem die Blocking-Lösung entfernt wurde, wird der Blot in Erst-Antikörperlösung über Nacht unter langsamem Schwenken bei 4°C und am nächsten Tag noch für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Die überschüssige Antikörperlösung muß anschließend gründlich abgespült werden. Dabei wird der Blot mit Wasch-Lösung in einer Schale unter Schwenken eine Stunde gewaschen, wobei die Waschlösung alle 10 Minuten gewechselt wird.

Der Blot wird wieder eingeschweißt, die Zweit-Antikörper-Lösung zugegeben und bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 30min wird die Lösung entfernt und der Blot nochmals wie oben beschrieben gründlich gewaschen.

### **3.3.6 Chemilumineszenzreaktion**

Der zuletzt aufgetragene Zweit-Antikörper trägt eine Enzym-Markierung. Es handelt sich dabei um Meerrettichperoxidase (HRP). Bei Zugabe von Luminol als Substrat liefert dieses Enzym dann ein Licht emittierendes Produkt (Chemilumineszenz), das am Ort seiner Entstehung Licht ausstrahlt und so die Position der Nachweisreagenzien sichtbar macht. Durch Exposition eines Röntgenfilms kann die Chemilumineszenz dargestellt und dokumentiert werden. Als Visualisierungsreagenz wurde hier ECL Western-Blotting detection reagents von Amersham verwendet.

Die Membran wurde unter Schwenken für 1min mit der Lösung inkubiert. Die Membran wurde dann luftblasenfrei zwischen zwei Folien in eine Filmkassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde sofort ein Röntgenfilm aufgelegt und für 1 bis 10min exponiert. Der Röntgenfilm konnte anschließend entwickelt werden.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Klonogenes Verhalten von Tumorzellen nach Behandlung mit all-trans-Retinsäure (ATRA)

Um den Einfluß von all-trans-Retinsäure auf das klonogene Überleben maligner Zellen zu untersuchen, wurden Koloniebildungstests mit der zervikalen Plattenepithelkarzinomzelllinie HTB35, der Plattenepithelkarzinomzelllinie des Kopf/Halsbereichs SCC9 und der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 unter Behandlung mit verschiedenen ATRA-Konzentrationen durchgeführt (s. 3.1.7). Die Tumorzellen wurden mit den fünf ATRA-Konzentrationen 0,01; 0,1; 1; 10 und 100µM semikonfluent in Massenkulturen behandelt. In Abbildung 7 sind die Überlebensraten der drei Tumorzelllinien dargestellt. Bei den beiden Plattenepithelkarzinomzelllinien HTB35 und SCC9 läßt sich eine starke konzentrationsabhängige Inaktivierung des klonogenen Überlebens nachweisen. Dabei zeigte die Zelllinie HTB35 die höchste Retinoidsensitivität. Bereits bei einer ATRA-Konzentration von 0,01µM beträgt die klonogene Überlebensrate nur noch 50,1%, bei 0,1µM 17,2% und sinkt bei 1µM auf 1,7% ab. Bei 10µM zeigt die Zelllinie HTB35 kein klonogenes Verhalten mehr, d.h. es ließen sich zwar Zellen nachweisen, jedoch keine Populationen > 50 Zellen. Die Konzentration von 100µM ATRA ist für diese Zelllinie toxisch, es können keine Zellen überleben. Auch die Zelllinie SCC9 reagiert mit einem verminderten klonogenen Überleben auf die Retinoidbehandlung. Hier zeigt sich bei einer Konzentration von 0,01µM ATRA eine klonogene Überlebensrate von 60,8%, bei 0,1µM 31,7% und bei 1µM 15,8%. Bei einer Konzentration von 10µM beträgt das klonogene Überleben noch 3,3%. Entsprechend der Zelllinie HTB35 wird die toxische Konzentration durch ATRA für die Zelllinie SCC9 bei 100µM erreicht, bei der keine Zellen mehr nachweisbar sind.

Im Gegensatz zu den beiden zuvor untersuchten Plattenepithelkarzinomzelllinien HTB35 und SCC9 zeigt die Zelllinie HCT116 kein bzw. nur ein sehr eingeschränktes Ansprechen auf die Retinoidbehandlung. Bei den Konzentrationen von 0,01 und 0,1µM ATRA beträgt die klonogene Überlebensrate 106%

bzw.124%. Bei einer Behandlung mit 1 $\mu$ M ATRA zeigt sich ein klonogenes Überleben von 102%. Diese drei klonogenen Überlebensraten weisen eher auf eine Proliferationsinduktion unter Retinoidbehandlung hin, die allerdings keine Dosisabhängigkeit aufweist. Nur bei einer Konzentration von 10 $\mu$ m konnte eine Hemmung des klonogenen Überlebens auf 88% nachgewiesen werden. Wie bei den beiden Plattenepithelkarzinomzelllinien zuvor schon gezeigt, war die Konzentration von 100 $\mu$ M ATRA auch bei diesen Kolonkarzinomzellen toxisch.

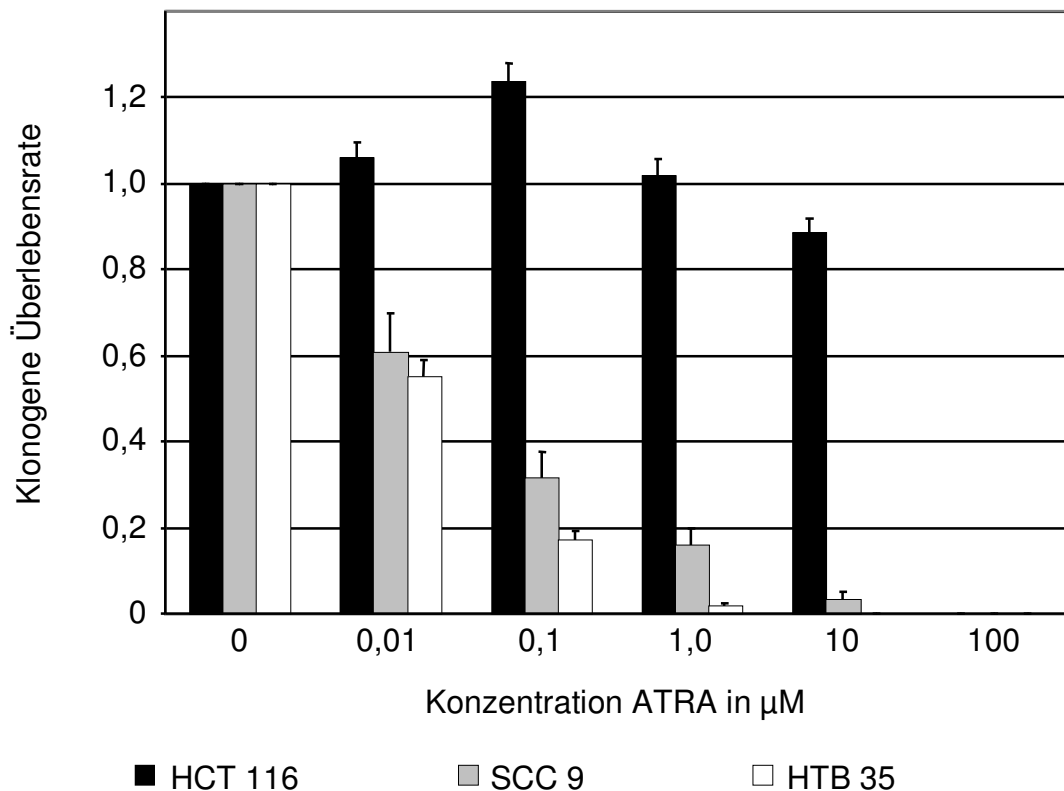


Abb. 7: Klonogene Aktivität der Tumorzelllinien HCT116, SCC9 und HTB35 nach Behandlung mit ATRA im Koloniebildungstest (Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen).

## 4.2 Klonogene Aktivität der Tumor-Zelllinie HCT116 nach Behandlung mit ATRA und ionisierender Bestrahlung

Da sowohl in vivo- als auch in vitro-Untersuchungen zeigen konnten, daß Retinsäure radiosensitivierend auf verschiedene Zelllinien wirkt, sollte nun untersucht werden, ob die Retinsäure auch bei der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 die Wirkung der ionisierenden Bestrahlung verstärken kann. Wie unter 3.1.7.2 beschrieben, wurde eine kombinierte Behandlung mit ionisierender Strahlung (Dosis 2Gy) und ATRA durchgeführt. Die Tumorzellen wurden mit 0,1 und 10µM ATRA behandelt. Diese beiden Konzentrationen wurden aufgrund der vorher durchgeführten Koloniebildungstests ausgewählt, da nur bei 0,1µM ATRA ein Anstieg und nur bei 10µM ATRA eine Abnahme der klonogenen Überlebensrate nachweisbar war, während sich bei den Konzentrationen 0,01µM und 1µM ATRA kein Einfluß auf das klonogene Überleben nachweisen ließ bzw. die Konzentration von 100µM eine toxische Wirkung auf die Tumorzellen hatte. Die Aussaat für den Koloniebildungstest erfolgte entweder sofort nach der Bestrahlung (*immediate plating*) oder es wurde ein Wechsel des Mediums durchgeführt und die Kolonkarzinomzellen erst 8 Stunden nach erfolgter Bestrahlung ausgesät (*delayed plating*). Dadurch ermöglicht man den Zellen beim *delayed plating*, Schäden, die durch die ionisierende Bestrahlung entstanden sind, über zelleigene Reparaturmechanismen zu reparieren. Der Koloniebildungstest nach der Bestrahlung wurde in zwei unterschiedlichen Versuchsansätzen durchgeführt: Zum einen erfolgte die 10tägige Kultivierung in unbehandeltem DMEM-Medium, zum anderen erfolgte eine Weiterbehandlung mit der entsprechenden ATRA-Konzentration.

Abbildung 8a zeigt den Versuchsansatz ohne Weiterbehandlung im Koloniebildungstest. Bei *immediate plating* führt die alleinige Bestrahlung der Zellen mit 2Gy zu einer Reduktion der klonogenen Aktivität auf 65%. Eine vorhergehende Behandlung mit 0,1µM ATRA und anschließender Bestrahlung mit 2Gy senkt die klonogene Überlebensrate nur geringfügig auf 58%. Auch durch eine Behandlung mit der deutlich höheren ATRA-Konzentration von 10µM kann keine weitere Abnahme der klonogenen Aktivität festgestellt werden und die Redukti-



on der klonogenen Überlebensrate beträgt ebenfalls 58%. Bei *delayed plating* kommt es durch die ionisierende Bestrahlung alleine zu einer klonogenen Überlebensrate von 63%. Werden die Tumorzellen zuvor mit 0,1 $\mu$ M ATRA behandelt, beträgt das klonogene Überleben 57%. Die Behandlung mit 10 $\mu$ M ATRA führt zu einer klonogenen Überlebensrate von 63%.

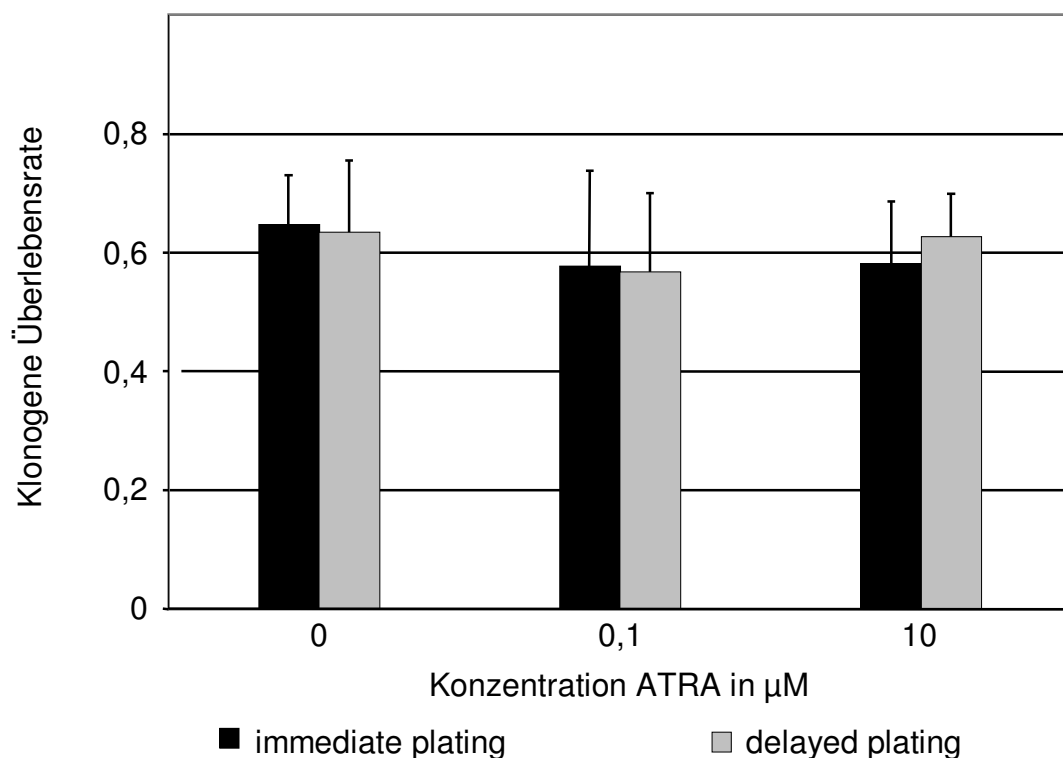


Abb. 8a: Klonogene Überlebensrate der Tumor-Zelllinie HCT116 nach 24 stündiger Behandlung mit ATRA und anschließender Bestrahlung mit 2Gy ohne Weiterbehandlung im Koloniebildungstest (Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen).

Abbildung 8b zeigt den Versuchsansatz mit der Weiterbehandlung im Koloniebildungstest. Die ATRA-Konzentrationen entsprechen dabei denen der 24stündigen Behandlung vor der Bestrahlung. Bei *immediate plating* senkt die alleinige Bestrahlung mit 2Gy die Gesamtklonzahl auf 53%. Eine Behandlung mit 0,1 $\mu$ M ATRA als auch mit 10 $\mu$ M ATRA führt ebenfalls zu einer klonogenen Überlebensrate von 53%. Bei *delayed plating* beträgt das klonogene Überleben bei alleiniger Bestrahlung mit 2Gy 56%. Werden die Tumorzellen mit 0,1 $\mu$ M ATRA behandelt, kommt es zur Reduktion der Gesamtklonzahl auf 43%. Bei Behandlung mit 10 $\mu$ M ATRA beträgt die klonogene Überlebensrate 60%.

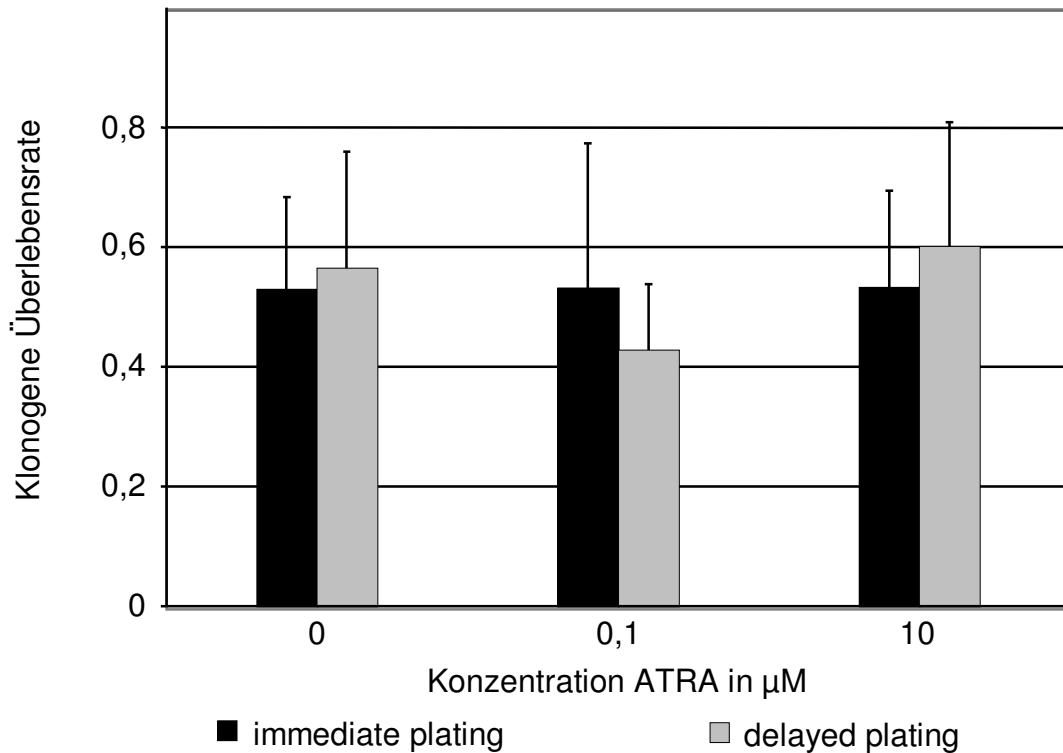


Abb. 8b: Klonogene Überlebensrate der Tumor-Zelllinie HCT116 nach 24 stündiger Behandlung mit ATRA, anschließender Bestrahlung mit 2Gy und Weiterbehandlung mit ATRA im Koloniebildungstest (Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen).

### 4.3 Nachweis der zytoplasmatischen Bindungsproteine und der nukleären Retinsäurerezeptoren mittels RT-PCR

Da das Expressionsverhalten der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 im Bereich der zytoplasmatischen Retinsäurebindungsproteine und der nukleären Retinsäurerezeptoren Aufschlüsse über die Ursache der Resistenz geben könnte, wurde die Tumorzelllinie auf molekularer Ebene näher untersucht. Die Retinsäurerezeptoren RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  und RXR $\beta$  und die zytoplasmatischen Retinsäurebindungsproteine CRABP I und CRABP II wurden mittels RT-PCR, wie in 3.2.1 beschrieben, auf mRNA-Ebene analysiert. Es wurde zum einen die Basalexpression in unbehandelten Zellen als auch die Expression nach 24stündiger Behandlung mit 0,1 und 10 $\mu$ M ATRA und 13-cis-RA untersucht. Die PCR-Produkte wurden mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt. Abbildung 9 zeigt beispielhaft das Ergebnis einer solchen Agarosegel-Elektrophorese mit der basalen Expression der Retinsäurerezeptoren und der zytoplasmatischen Retinsäurebindungsproteine der Kolonkarzinomzelllinie HCT116.



Marker	CRABP I	CRABP II	RAR $\alpha$	RAR $\beta$	RAR $\gamma$	RXR $\alpha$	RXR $\beta$	EF1 $\alpha$
	(366bp)	(275bp)	(767bp)	(783bp)	(798bp)	(297bp)	(311bp)	(490bp)

Abb. 9: Basalexpression der zytoplasmatischen Retinsäurebindungsproteine, nukleären Retinsäurerezeptoren und EF1 $\alpha$  der Zelllinie HCT116. Amplifikation mittels RT-PCR und Darstellung über Agarosegel-Elektrophorese.

Die Darstellung aller PCR-Proben als Einzelbanden im Agarosegel zeigt, daß die RT-PCR ordnungsgemäß durchgeführt wurde und spezifisch die gesuchten

Fragmente amplifiziert wurden. Da während der Amplifikationsphase der RT-PCR für die verschiedenen untersuchten Retinsäurerezeptoren und Retinsäurebindungsproteine die gleiche Zyklenzahl verwendet wurde und auf das Agarosegel gleiche Volumina aufgetragen wurden, gibt die ungleiche Signalstärke der Banden eine ungleiche Expressionsstärke wieder. Es ließen sich beide zytoplasmatischen Bindungsproteine CRABP I und CRABP II nachweisen. Von den nukleären Retinsäurerezeptoren gelang der Nachweis mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese nur für RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  und RXR $\beta$ . Die Kernrezeptoren RAR $\beta$  und RXR $\alpha$  konnten über die Agarosegel-Elektrophorese nicht dargestellt werden. Abbildung 10 zeigt die prozentuale Verteilung der drei nachweisbaren Rezeptoren. RXR $\beta$  hat mit 44% den höchsten Anteil. RAR $\alpha$  und RAR $\gamma$  werden basal etwa gleich stark exprimiert und haben einen Anteil von 27 bzw. 29%.



Abb. 10: Verteilung der nachweisbaren nukleären Retinsäurerezeptoren RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  und RXR $\beta$  der Zelllinie HCT116 bei Nachweis mittels Agarosegel-Elektrophorese nach RT-PCR.

Die Elektrophoresebanden der Rezeptoren und Bindungsproteine wurden densitometrisch ausgewertet. Als Referenzwert wurde der Elongationsfaktor EF1 $\alpha$  verwendet. Bei EF1 $\alpha$  handelt es sich um ein sogenanntes *housekeeping*-Gen, dessen Expression durch eine Retinsäure-Behandlung nicht verändert wird. Die Expression der Kernrezeptoren und Bindungsproteine wurde als ein Vielfaches der EF1 $\alpha$ -Expression dargestellt. Abbildung 11 zeigt diese relativen

Expressionen als Basalwerte und nach Behandlung mit ATRA (11A) bzw. 13-cisRA (11B).

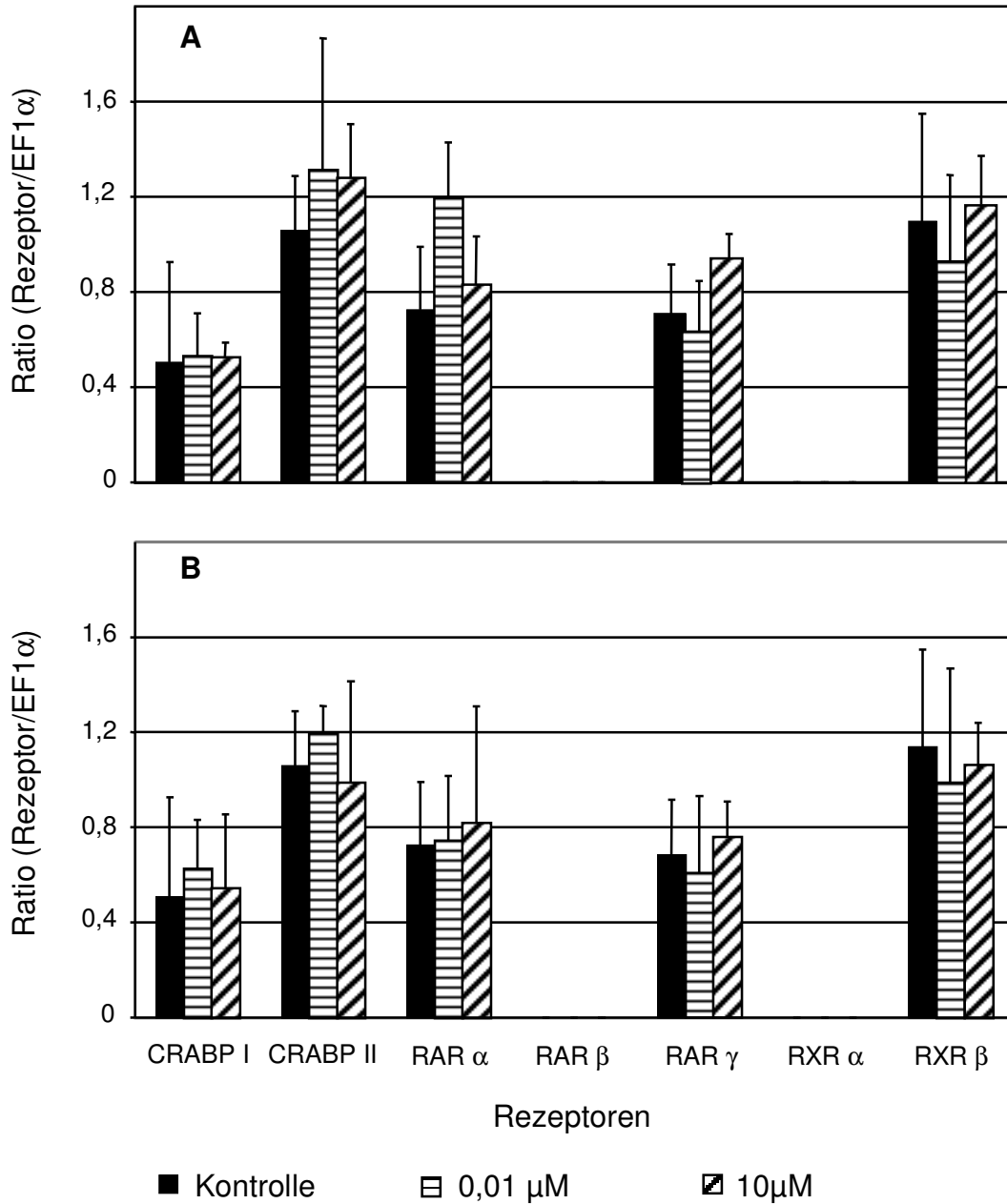


Abb. 11: HCT116: Expression der Bindungsproteine und Kernrezeptoren in Relation zu EF1 $\alpha$  nach Behandlung mit ATRA (A) und 13-cis RA (B) in den Konzentrationen 0,01  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M (Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen).

Die zytoplasmatischen Retinsäurebindungsproteine CRABP I und II werden, wie in Abbildung 11 ersichtlich, unterschiedlich stark exprimiert. Bei CRABP I lag die relative Basalexpression bei 0,51. Durch eine Behandlung mit ATRA in den Konzentrationen 0,01 bzw. 10 $\mu$ M kam es nur zu einer unwesentlichen Expressionsänderung auf 0,53. Bei einer Behandlung mit 0,01 $\mu$ M 13-cisRA betrug die relative Expression 0,63, bei 10 $\mu$ M 13-cisRA 0,54. Die relative Expression des zytoplasmatischen Bindungsproteins CRABP II lag deutlich höher bei einem Basalwert von 1,06. Bei den Konzentrationen 0,01 und 10 $\mu$ M ATRA kam es zu einer Erhöhung der relativen Expression auf 1,31 und 1,28. Die Behandlung mit 0,01 bzw. 10 $\mu$ M 13-cisRA zeigt eine Expression von 1,20 bzw. 0,99.

Der nukleäre Retinsäurerezeptor RAR $\alpha$  hat eine relative Basalexpression von 0,73. Die Behandlung mit 0,01 und 10 $\mu$ M ATRA und 0,01 bzw. 10 $\mu$ M 13-cisRA führt zu einer relativen Expression von 1,20 und 0,83 bzw. 0,74 und 0,82. Der Kernrezeptor RAR $\beta$  ließ sich mit Hilfe dieses Detektionssystems nicht nachweisen. Beim Retinsäurerezeptor RAR $\gamma$  lag die Basalexpression bei 0,76. Durch eine Retinsäurebehandlung ließ sich keine deutliche dosisabhängige Expressionsänderung feststellen. Bei 0,01 $\mu$ M ATRA lag die Expression bei 0,61, bei 10 $\mu$ M ATRA bei 0,94. Die Werte der relativen Expression bei 0,01 bzw. 10 $\mu$ M 13-cisRA-Behandlung lagen bei 0,62 bzw. 0,78. Wie RAR $\beta$  ließ sich auch der nukleäre Retinsäurerezeptor RXR $\alpha$  nicht mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese nachweisen. Der Kernrezeptor RXR $\beta$  war dagegen deutlich detektierbar. Hier betrug die Basalexpression 1,17. Durch die Behandlung kam es zu einer relativen Expression von 0,95 und 1,19 bei 0,01 und 10 $\mu$ M ATRA. Bei einer Behandlung mit 13-cisRA in den Konzentrationen 0,01 bzw. 10 $\mu$ M betrug die relative Expression 0,99 bzw. 1,12.

#### 4.4 Nachweis der zytoplasmatischen Bindungsproteine und der nukleären Retinsäurerezeptoren mittels PCR-ELISA

Die beiden Kernrezeptoren RAR $\beta$  und RXR $\alpha$  ließen sich, wie unter 4.3 beschrieben, mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese nicht nachweisen. Da es aber möglich war, daß diese Kernrezeptoren in der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 zwar vorhanden, aber nur sehr gering exprimiert wurden, wurde als sensitiveres Verfahren ein PCR-ELISA durchgeführt. Wie unter 3.2.2 beschrieben, können aufgrund dieses Detektionssystems auch PCR-Produkte nachgewiesen und gemessen werden, die aufgrund ihrer geringen Konzentration in einem Agarosegel nicht sichtbar sind. Mit Hilfe des PCR-ELISA konnten nun sowohl die beiden zytoplasmatischen Bindungsproteine CRABP I und II als auch alle nukleären Retinsäurerezeptoren nachgewiesen werden. Abbildung 12 zeigt die prozentuale Verteilung der fünf Kernrezeptoren beim Nachweis mittels PCR-ELISA. Die drei Hauptrezeptoren RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  und RXR $\beta$  haben etwa den gleichen Anteil von 34%, 30% und 31%. RAR $\beta$  und RXR $\alpha$  lassen sich schwach nachweisen, RAR $\beta$  mit einem Anteil von 2%, RXR $\alpha$  mit einem Anteil von 3%.

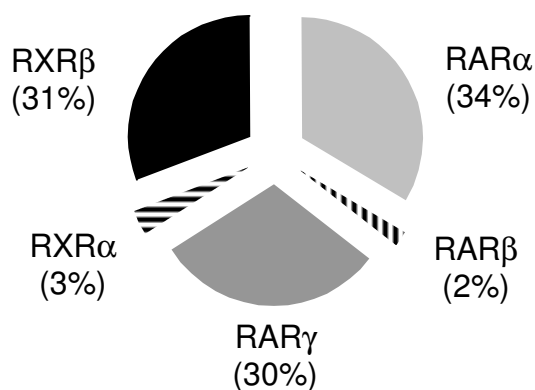


Abb. 12: Verteilung der nukleären Retinsäurerezeptoren RAR $\alpha$ , RAR $\beta$ , RAR $\gamma$ , RXR $\alpha$  und RXR $\beta$  der Zelllinie HCT116 bei Nachweis mittels PCR-ELISA.

Abbildung 13 zeigt die relativen Expressionen der Bindungsproteine und Rezeptoren unbehandelt und nach Behandlung mit ATRA (13A) bzw. 13-cisRA (13B).

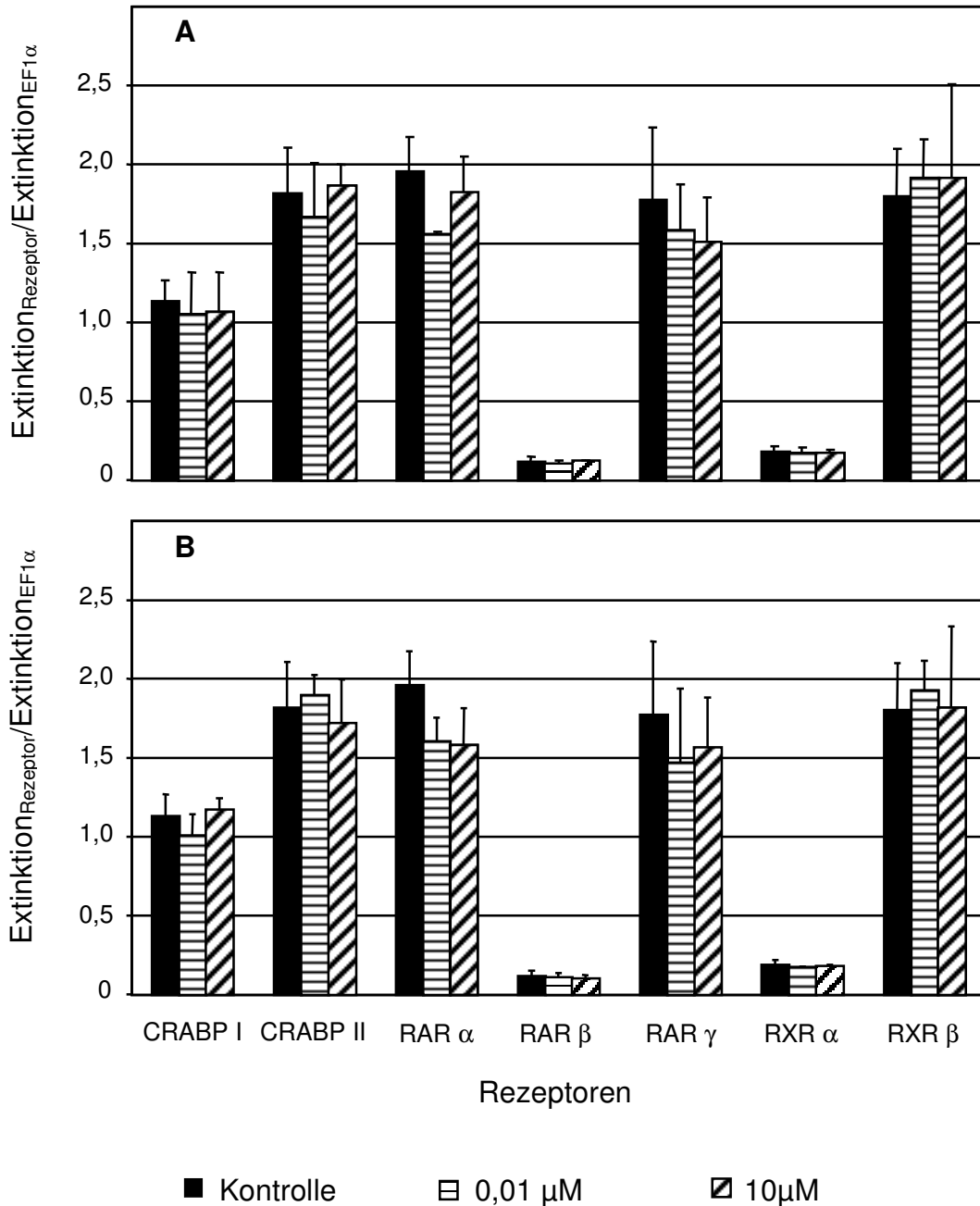


Abb. 13: HCT116: Expression der Bindungsproteine und Kernrezeptoren in Relation zu EF1 $\alpha$  nach Behandlung mit ATRA (A) und 13-cis RA (B) in den Konzentrationen 0,01  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M (Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen).



Die zytoplasmatischen Retinsäurebindungsproteine CRABP I und II der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 zeigen in Abbildung 13 eine unterschiedlich starke Expression. Die relative Basalexpression von CRABP I liegt bei 1,13. Bei CRABP II läßt sich basal eine relative Expression von 1,82 nachweisen. Durch Behandlung mit Retinsäure kommt es bei beiden Bindungsproteinen nur zu geringen Expressionsänderungen. Bei CRABP I liegt die relative Expression nach Behandlung mit 0,01µM und 10µM ATRA bei 1,05 und 1,06 bzw. nach Behandlung mit 0,01µM und 10µM 13-cisRA bei 1,01 und 1,17. Die relative Expression von CRABP II beträgt bei 0,01µM und 10µM ATRA 1,67 und 1,86, bei 0,01µM und 10µM 13-cisRA 1,90 und 1,72.

Der Retinsäurekernrezeptor RAR $\alpha$  zeigt eine relative Basalexpression von 1,96. Die Behandlung mit 0,01µM und 10µM ATRA bzw. 0,01µM und 10µM 13-cisRA führt zu einer relativen Expression von 1,55 und 1,82 bzw. 1,60 und 1,58. Mit Hilfe des PCR-ELISA kann die geringe Expression des nukleären Retinsäurerezeptors RAR $\beta$  nachgewiesen werden. Sie liegt basal bei 0,12 und beträgt bei Behandlung mit 0,01µM ATRA 0,11, bei 10µM ATRA 0,12. Die Behandlung mit 0,01µM und 10µM 13-cisRA führt zu einer relativen Expression von 0,11 und 0,10. Der Retinsäurerezeptor RAR $\gamma$  zeigt eine relative Basalexpression von 1,77. Nach Behandlung mit 0,01µM und 10µM ATRA bzw. 0,01µM und 10µM 13-cisRA läßt sich eine relative Expression von 1,58 und 1,51 bzw. 1,47 und 1,57 nachweisen. Auch die Expression des nukleären Retinsäurerezeptors RXR $\alpha$  kann nun mit Hilfe des PCR-ELISA nachgewiesen werden. Die Basalexpression liegt bei 0,19. Die Behandlung mit 0,01µM ATRA bzw. 13-cisRA führt zu einer relativen Expression von 0,17. Bei einer Behandlung mit 10µM ATRA bzw. 13-cisRA läßt sich eine relative Expression von 0,17 bzw. 0,18 nachweisen. Der Kernrezeptor RXR $\beta$  zeigt eine Basalexpression von 1,80. Durch die Behandlung mit 0,01µM und 10µM ATRA kam es zu einer relativen Expressionssteigerung auf 1,92. Bei einer Behandlung mit 13-cisRA in den Konzentrationen 0,01 bzw. 10µM betrug die relative Expression 1,93 bzw. 1,82.

#### 4.5 Nachweis des zytoplasmatischen Retinsäurebindungsproteins CRABP I und des Retinsäurekernrezeptors RAR $\beta$ auf Proteinebene

Da das zytoplasmatische Retinsäurebindungsprotein CRABP I eine wichtige Rolle bei der Retinsäureresistenz von Tumorzellen spielt, wurde es mit Hilfe des Western Blot auf Proteinebene untersucht.

Die Abbildung 14 zeigt den Proteinnachweis für CRABP I bei der Kolonkarzinomzelllinie HCT116. Es wurden sowohl unbehandelte Tumorzellen als auch Tumorzellen nach Behandlung mit 0,01 $\mu$ M und 10 $\mu$ M ATRA bzw. 13-cis RA untersucht. Dabei wurde die isolierte Proteinmenge von jeweils  $1 \times 10^6$  Zellen aufgetragen. CRABP I hat ein Molekulargewicht von 16kD (5). Das Molekulargewicht der im Western Blot dargestellten Banden läßt sich mit Hilfe des aufgetragenen Markers über eine Eichgerade berechnen. Außer dem Nachweis von CRABP I bei 16,2kDa ließ sich noch eine zweite Bande mit 15,7kDa nachweisen. Dabei könnte es sich um CRABP II handeln (Molekulargewicht 15kDa) (5). Als Beladungskontrolle wurde außerdem Aktin nachgewiesen, das sich wie EF1 $\alpha$  nicht durch Retinoidbehandlung modulieren läßt.

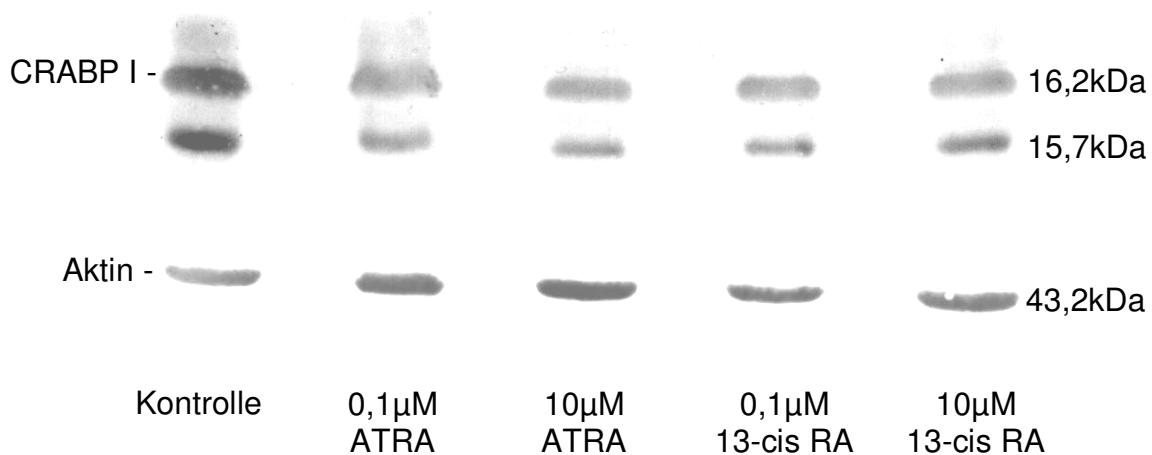


Abb. 14: Nachweis von CRABP I der Zelllinie HCT116 auf Proteinebene mittels Western-Blot nach Behandlung mit ATRA bzw. 13-cis RA.

In drei unabhängigen Versuchen war CRABP I sowohl basal als auch nach Retinoidbehandlung darstellbar. Abbildung 15 zeigt die densitometrische Auswertung. Die Expression des Bindungsproteins wurde als ein Vielfaches der Aktin-Expression dargestellt.

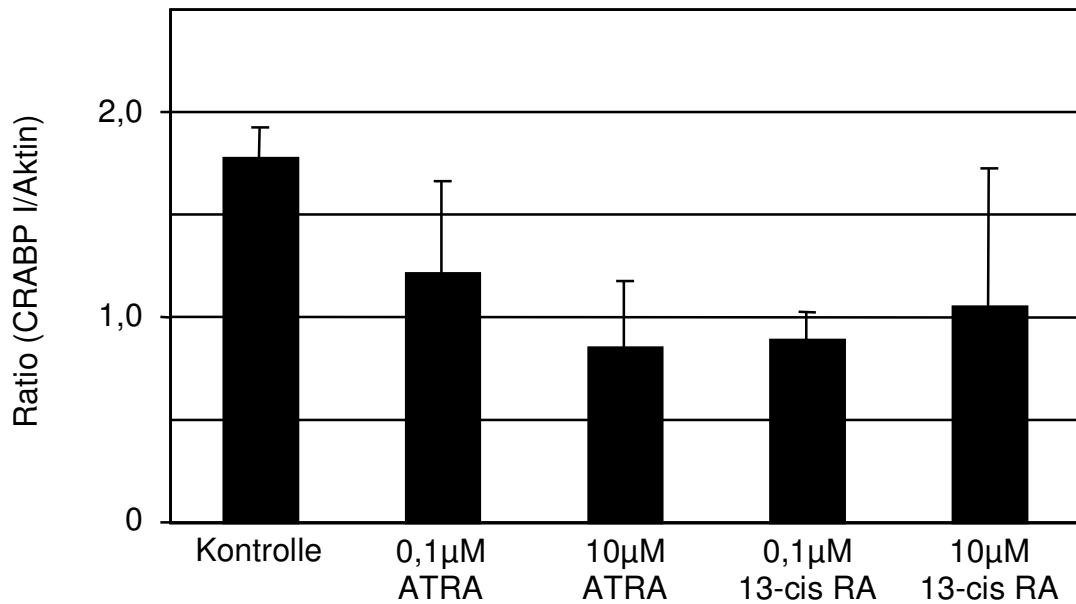


Abb. 15: HCT116: Densitometrische Auswertung der relativen Proteinexpression von CRABP I nach Behandlung mit ATRA bzw. 13-cis RA (Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen).

Die relative Proteinexpression von CRABP I beträgt basal 1,78. Eine Behandlung mit Retinsäure führte zu einer geringen Abnahme der relativen Expression. Durch die Behandlung mit 0,1µM ATRA kam es zu einer relativen CRABP I-Expression von 1,21, bei Behandlung mit 10µM ATRA zu einer Expression von 0,85. Eine Behandlung mit 13-cis RA führte bei einer Konzentration von 0,1µM zu einer relativen Expression von 0,89 und bei einer Konzentration von 10µM zu einer relativen Expression von 1,05.

Auch der Retinsäurekernrezeptor RAR $\beta$ , der eine wichtige Rolle bei der retinoidvermittelten Wirkung spielt, wurde mit Hilfe des Western Blot näher untersucht. Die Abbildung 16 zeigt den Proteinnachweis für RAR $\beta$  bei der Kolonkarzinomzelllinie HCT116. Auch hier wurde sowohl die basale Expression als auch die Expression der Tumorzelllinie nach Behandlung mit 0,01 $\mu$ M bzw. 10 $\mu$ M ATRA und 13-cis RA untersucht. Es wurden jeweils 100 $\mu$ g Protein aufgetragen. RAR $\beta$  hat ein Molekulargewicht von etwa 52kDa (9). Für die im Western Blot dargestellte Bande errechnet mit Hilfe der Eichgerade ein Molekulargewicht von 52,6kD. Als Beladungskontrolle wurde außerdem wieder Aktin nachgewiesen.

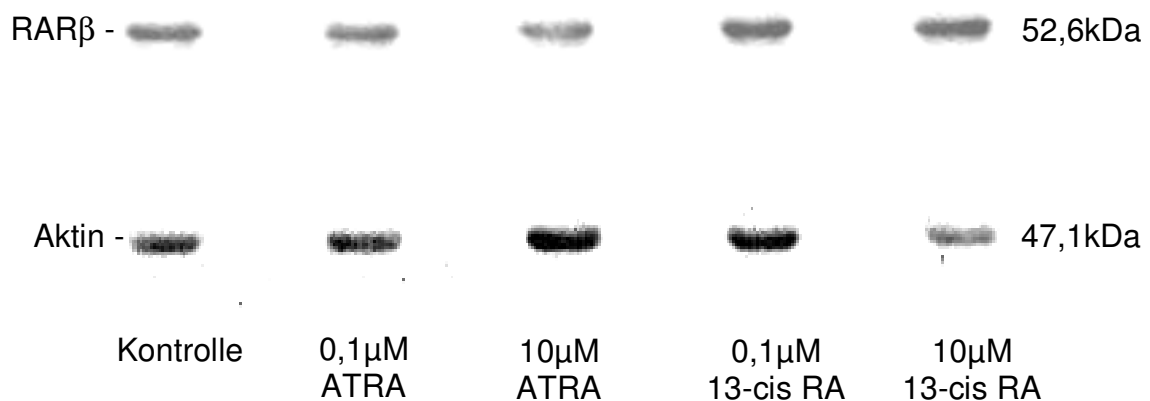


Abb. 16: Nachweis von RAR $\beta$  der Zelllinie HCT116 auf Proteinebene mittels Western-Blot nach Behandlung mit ATRA bzw. 13-cis RA.

Abbildung 17 zeigt die densitometrische Auswertung von drei unabhängigen Experimenten. Die RAR $\beta$ -Proteinexpression wird als ein Vielfaches der Expression von Aktin dargestellt.

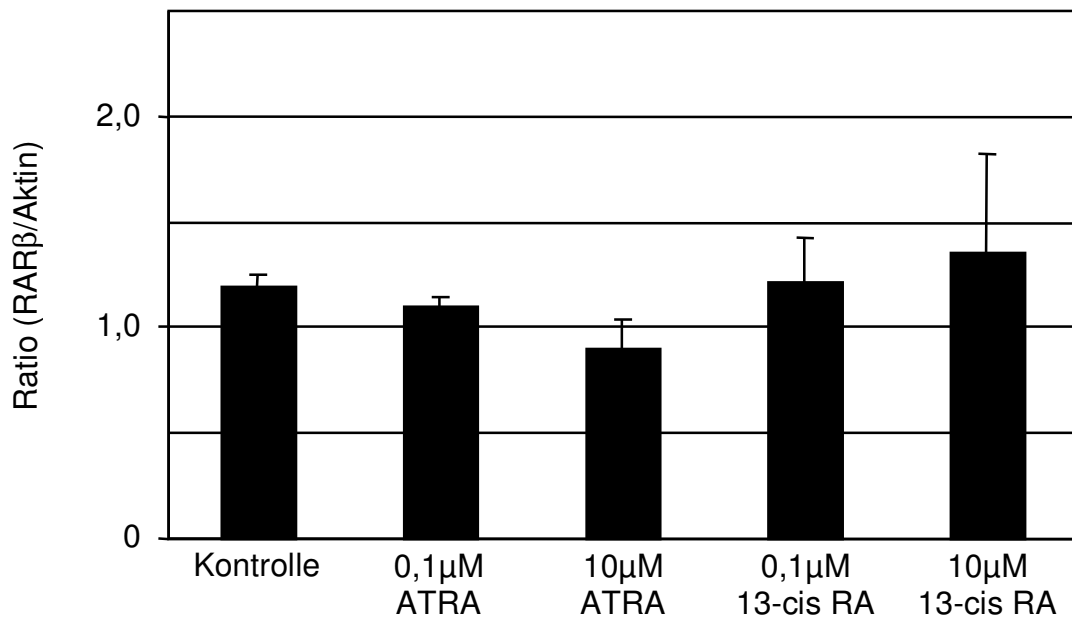


Abb. 17: HCT116: Densitometrische Auswertung der relativen Proteinexpression von RAR $\beta$  nach Behandlung mit ATRA bzw. 13-cis RA (Mittelwerte und Standardabweichungen aus 3 unabhängigen Versuchen).

Die relative Basalexpression von RAR $\beta$  beträgt 1,19. Durch eine Behandlung mit Retinsäure ließ sich die Expression nicht wesentlich verändern. Nach Behandlung mit 0,01 $\mu$ M ATRA betrug die relative Expression 1,09, nach Behandlung mit 10 $\mu$ M ATRA 0,9. Eine Behandlung mit 0,1 $\mu$ M bzw. 10 $\mu$ M 13-cis RA führte zu einer relativen Proteinexpression von 1,21 bzw. 1,35.

#### 4.6 Sequenzierung der codierenden DNA-Abschnitte für CRABP II und RAR $\beta$

Um mögliche Mutationen der codierenden DNA-Sequenzen für CRABP II und RAR $\beta$  in der Zelllinie HCT116 nachzuweisen und somit Rückschlüsse über mögliche Funktionsstörungen der Proteine zu ziehen, wurde die cDNA-Sequenz analysiert. Dabei wurde zunächst, wie in 3.2.3 beschrieben, die vollständige codierende Region für CRABP II und RAR $\beta_1$  mittels RT-PCR amplifiziert.

Abbildung 18 macht diese amplifizierte cDNA-Sequenz von CRABP II als Bande einer Agarosegel-Elektrophorese sichtbar. Die vollständige Sequenz hat eine Länge von 453bp. Mit Hilfe des Markers läßt sich nachweisen, daß die amplifizierte Sequenz die gleiche Größe hat.

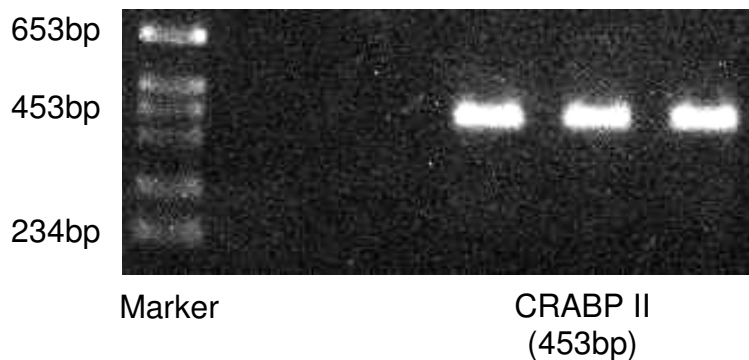


Abb. 18: HCT116: Darstellung der vollständig codierenden DNA-Sequenz von CRABP II über Agarosegel-Elektrophorese nach Amplifikation mittels RT-PCR.

Abbildung 19 zeigt die amplifizierte cDNA-Sequenz von RAR $\beta_1$ . Bei der in Bande A dargestellten Sequenz wurden zur Amplifikation die gleichen Primer verwendet, die auch zum Nachweis von RAR $\beta$  auf RNA-Ebene mittels RT-PCR verwendet wurden (s. 4.3). Dabei handelt es sich nur um einen Teil der vollständig codierenden Sequenz. Mit Hilfe der modifizierten Durchführung der cDNA-Synthese und RT-PCR (s. 3.2.3) ließ sich das RAR $\beta$ -Fragment hier nachweisen. Bei der in Bande C dargestellten Sequenz wurden zur Amplifikation Volllänge-Primer verwendet (s. 3.2.3). Die vollständig codierende Sequenz für RAR $\beta_1$  hat eine Größe von 1334bp. Die Bande C der Agarosegel-Elektrophorese entspricht dieser Größe.

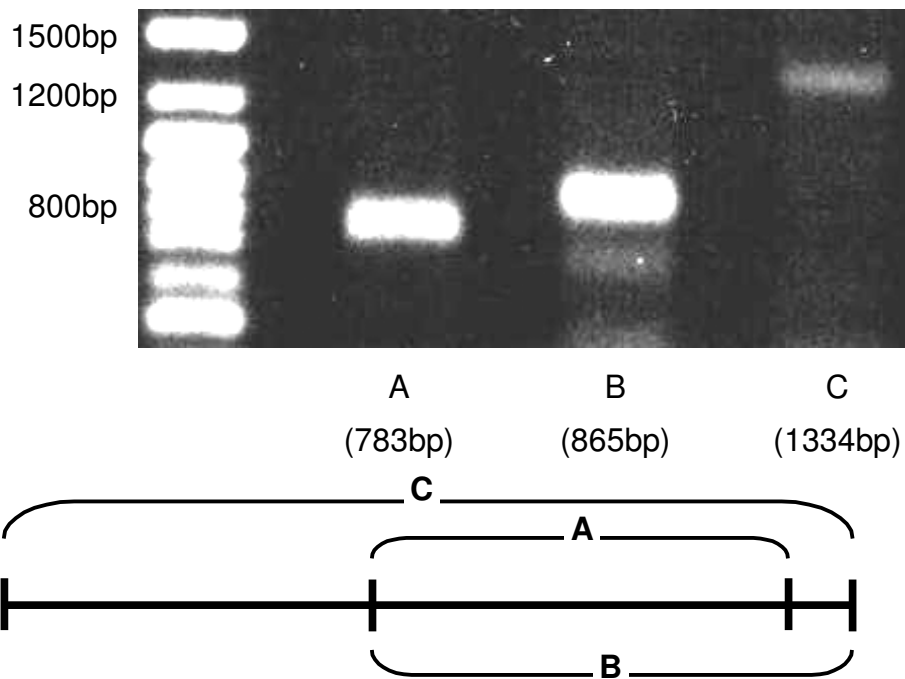


Abb. 19: HCT116: Darstellung der vollständig codierenden DNA-Sequenz von RAR $\beta_1$  über Agarosegel-Elektrophorese nach Amplifikation mittels RT-PCR.

Die amplifizierten Genabschnitte wurden anschließend durch die Firma MWG sequenziert. Es wurde eine Doppelstrangsequenzierung durchgeführt, d.h. der Genabschnitt wurde in beiden Ableserichtungen sequenziert und als *Forward*- bzw. *Reverse*-Sequenz wiedergegeben. Die so erhaltenen Sequenzen wurden dann durch Vergleich (DNAsis Software) mit der in der Genbank hinterlegten Originalsequenz von CRABP II (Genbank: EMBL, Acc.Nr. M68867) bzw. RAR $\beta_1$  (Genbank: EMBL, Acc.Nr. NM000965) auf Mutationen untersucht.

Abbildung 20 und 21 zeigt die Sequenzanalyse von CRABP II. Abbildung 20 gibt den Vergleich zwischen Originalsequenz und *Forward*-Sequenz wieder, Abbildung 21 den Vergleich zwischen Originalsequenz und *Reverse*-Sequenz. Der codierende Abschnitt der Originalsequenz liegt zwischen 99 und 515 (30). Die davor bzw. dahinter liegenden Sequenzen sind keine proteincodierenden Abschnitte. In den Abbildungen wird in der oberen Zeile die Originalsequenz und in der unteren Zeile die analysierte Sequenz dargestellt. Übereinstimmende Basenpaare sind schwarz unterlegt. Im codierenden Bereich konnte beim Vergleich mit den sequenzierten Abschnitten eine 100%ige Homologie nachgewiesen werden. In der cDNA-Sequenz für CRABP II war somit keine Mutation nachweisbar.



## Ergebnisse

	10	20	30	40	50
1	CCTGACGACC	CGGCGACGGC	GACGTCTCTT	TTGACTAAAA	GACAGTGTCC
-74	.....	.....	.....	.....	.....
	60	70	80	90	100
51	AGTGCTCCAG	CCTAGGAGTC	TACG <b>GGGACC</b>	<b>GCCTCCCGCG</b>	<b>CCGCCACCAT</b>
-24	.....	.....	.... <b>GGGACC</b>	<b>GCCTCCCGSG</b>	<b>CCGCCACCAT</b>
	110	120	130	140	150
101	<b>GCCCAACTTC</b>	<b>TCTGGCAACT</b>	<b>GGAAAATCAT</b>	<b>CCGATCGGAA</b>	<b>AACTTCGAGG</b>
27	<b>GCCCAACTTC</b>	<b>TCTGGCAACT</b>	<b>GGAAAATCAT</b>	<b>CCGATCGGAA</b>	<b>AACTTCGAGG</b>
	160	170	180	190	200
151	<b>AATTGCTCAA</b>	<b>AGTGCTGGGG</b>	<b>GTGAATGTGA</b>	<b>TGCTGAGGAA</b>	<b>GATTGCTGTG</b>
77	<b>AATTGCTCAA</b>	<b>AGTGCTGGGG</b>	<b>GTGAATGTGA</b>	<b>TGCTGAGGAA</b>	<b>GATTGCTGTG</b>
	210	220	230	240	250
201	<b>GCTGCAGCGT</b>	<b>CCAAGCCAGC</b>	<b>AGTGGAGATC</b>	<b>AAACAGGAGG</b>	<b>GAGACACTTT</b>
127	<b>GCTGCAGCGT</b>	<b>CCAAGCCAGC</b>	<b>AGTGGAGATC</b>	<b>AAACAGGAGG</b>	<b>GAGACACTTT</b>
	260	270	280	290	300
251	<b>CTACATCAAA</b>	<b>ACCTCCACCA</b>	<b>CCGTGCGCAC</b>	<b>CACAGAGATT</b>	<b>AACTTCAAGG</b>
177	<b>YTACATCAAA</b>	<b>ACCTCCACCA</b>	<b>CCGTGCGCAC</b>	<b>CACAGAGATT</b>	<b>AACTTCAAGG</b>
	310	320	330	340	350
301	<b>TTGGGGAGGA</b>	<b>GTTTGAGGAG</b>	<b>CAGACTGTGG</b>	<b>ATGGGAGGCC</b>	<b>CTGTAAGAGC</b>
227	<b>TTGGGGAGGA</b>	<b>GTTTGAGGAG</b>	<b>CAGACTGTGG</b>	<b>ATGGGAGGCC</b>	<b>CTGTAAGAGC</b>
	360	370	380	390	400
351	<b>CTGGTGAAAT</b>	<b>GGGAGAGTGA</b>	<b>GAATAAAATG</b>	<b>GTCTGTGAGC</b>	<b>AGAAGCTCCT</b>
277	<b>CTGGTGAAAT</b>	<b>GGGAGAGTGA</b>	<b>GAATAAAATG</b>	<b>GTCTGTGAGC</b>	<b>AGAAGCTCCT</b>
	410	420	430	440	450
401	<b>GAAGGGAGAG</b>	<b>GGCCCCAAGA</b>	<b>CCTCGTGGAC</b>	<b>CAGAGAACTG</b>	<b>ACCAACGATG</b>
327	<b>GAAGGGAGAG</b>	<b>GGCCCCAAGA</b>	<b>CCTCGTGGAC</b>	<b>CAGAGAACTG</b>	<b>ACCAACGATG</b>
	460	470	480	490	500
451	<b>GGGAACTGAT</b>	<b>CCTGACCATG</b>	<b>ACGGCGGATG</b>	<b>ACGTTGTGTG</b>	<b>CACCAGGGTC</b>
377	<b>GGGAACTGAT</b>	<b>CCTACCATGA</b>	<b>CGGCGCA...</b>	.....	.....

Abb. 20: Vergleich der CRABP II Originalsequenz (obere Zeile) mit der analysierten *Forward*-Sequenz (untere Zeile) der Zelllinie HCT116.

## Ergebnisse

---

	110	120	130	140	150
101	GCCCAACTTC	TCTGGCAACT	GGAAAATCAT	CCGATCGGAA	AACTTCGAGG
-25	.....	.....	.....GACAT	CCGATCGGAA	AACTTCGAGG
	160	170	180	190	200
151	AATTGCTCAA	AGTGCTGGGG	GTGAATGTGA	TGCTGAGGAA	GATTGCTGTG
26	AATTGCTCAA	AGTGCTGGGG	GTGAATGTGA	TGCTGAGGAA	GATTGCTGTG
	210	220	230	240	250
201	GCTGCAGCGT	CCAAGCCAGC	AGTGGAGATC	AAACAGGAGG	GAGACACTTT
76	GCTGCAGCGT	CCAAGCCAGC	AGTGGAGATC	AAACAGGAGG	GAGACACTTT
	260	270	280	290	300
251	CTACATCAAA	ACCTCCACCA	CCGTGCGCAC	CACAGAGATT	AACTTCAAGG
126	CTACATCAAA	ACCTCCACCA	CCGTGCGCAC	CACAGAGATT	AACTTCAAGG
	310	320	330	340	350
301	TTGGGGAGGA	GTTTGAGGAG	CAGACTGTGG	ATGGGAGGCC	CTGTAAGAGC
176	TTGGGGAGGA	GTTTGAGGAG	CAGACTGTGG	ATGGGAGGCC	CTGTAAGAGC
	360	370	380	390	400
351	CTGGTGAAAT	GGGAGAGTGA	GAATAAAATG	GTCTGTGAGC	AGAAGCTCCT
226	CTGGTGAAAT	GGGAGAGTGA	GAATAAAATG	GTCTGTGAGC	AGAAGCTCCT
	410	420	430	440	450
401	GAAGGGAGAG	GGCCCCAAGA	CCTCGTGGAC	CAGAGAACTG	ACCAACGATG
276	GAAGGGAGAG	GGCCCCAAGA	CCTCGTGGAC	CAGAGAACTG	ACCAACGATG
	460	470	480	490	500
451	GGGAACTGAT	CCTGACCATG	ACGGCGGATG	ACGTTGTGTG	CACCAGGGTC
326	GGGAACTGAT	CCTGACCATG	ACGGCGGATG	ACGTTGTGTG	CACCAGGGTC
	510	520	530	540	550
501	TACGTCCGAG	AGTGAGTGGC	CACAGGTAGA	ACCGCGGCCG	AAGCCCACCA
376	TACGTCCGAG	AGTGACATGC	CGAATTCAGA	ACCA.....	.....

Abb. 21: Vergleich der CRABP II Originalsequenz (obere Zeile) mit der analysierten *Reverse*-Sequenz (untere Zeile) der Zelllinie HCT116.

Abbildung 22 zeigt die Sequenzanalyse für RAR $\beta_1$ . Es wird die Originalsequenz (31) im Vergleich mit der *Forward*-Sequenz dargestellt. Der codierende Abschnitt der Originalsequenz liegt zwischen 322 und 1668. Die Originalsequenz wird in der oberen Zeile, die analysierte Sequenz in der unteren Zeile dargestellt. Auch hier stellen schwarz unterlegte Basenpaare Übereinstimmung dar.

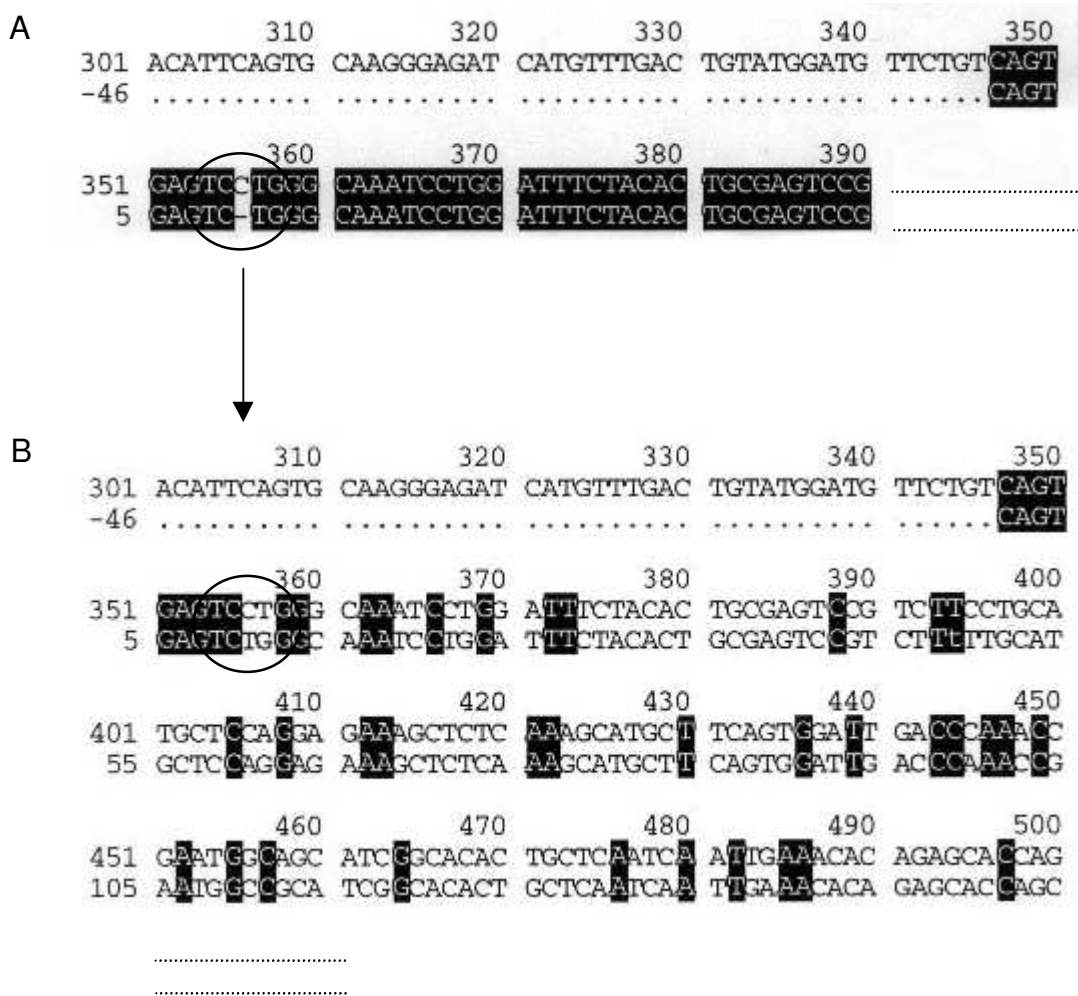


Abb. 22: Sequenzvergleich der RAR $\beta_1$ -Originalsequenz (obere Zeile) mit der analysierten *Forward*-Sequenz (untere Zeile) der Zelllinie HCT116. In A ist der Basenverlust an Position 355 dargestellt (Kreis). In B ist das verschobene Ableseraster ab der Mutation zu sehen (Kreis).

Abbildung 22 zeigt deutlich, daß die in der Originalsequenz an 355. Stelle stehende Base Cytosin in der analysierten *Forward*-Sequenz nicht nachweisbar ist. Dies führt zu einem *frame shift*, einer sogenannten Raster-Mutation in +1 Richtung. Die Folge davon ist ein komplett verschobenes Ableseraster.

Der Vergleich zwischen der Originalsequenz und der *Reverse*-Sequenz zeigt eine fast vollständige Übereinstimmung (Gegenüberstellung nicht dargestellt).

## 5 Diskussion

Retinoide üben auf viele Tumorzelllinien eine antiproliferative und differenzierungsinduzierende Wirkung aus. So konnte sowohl bei in vivo- als auch bei in vitro-Untersuchungen von verschiedenen Plattenepithelkarzinomzelllinien des Kopf-Hals-Bereichs, der Zervix oder bei Brustkarzinomzellen durch die Retinoidbehandlung eine Hemmung des Tumorwachstums gezeigt werden (4, 23, 24, 28). Aber nicht alle Tumorzelllinien sprechen auf diese Behandlung an. Verschiedene Glioblastomzelllinien, Melanom- oder Kolonkarzinomzelllinien erwiesen sich als resistent gegenüber der Retinoidbehandlung (30, 47, 51).

Da der genaue Mechanismus der retinoidvermittelten Zyto- und Radiotoxizität noch nicht vollständig geklärt ist, sollte in dieser Arbeit eine retinoidresistente Zelllinie näher untersucht werden, um so weitere Aufschlüsse über die Ursache der Resistenz und den Wirkmechanismus zu geben. Als retinoidresistente Zelllinie wurde die bereits in der Literatur (47) als resistent beschriebene Kolonkarzinomzelllinie HCT116 ausgewählt.

Zunächst wurde in eigenen Versuchen die Wirkung der all-trans-Retinsäure auf die Kolonkarzinomzelllinie überprüft. Dabei wurden Koloniebildungstests durchgeführt und als Parameter für die Wirksamkeit der Retinsäure die klonogene Aktivität der Zellen ermittelt. Außer der Zelllinie HCT116 wurde als interne Kontrolle auch noch die zervikale Plattenepithelkarzinomzelllinie HTB35 und die Plattenepithelkarzinomzelllinie des Kopf-/Halsbereichs SCC9 mit ATRA behandelt. Diese beiden Zelllinien sind bereits detailliert untersucht und als retinoidsensitiv beschrieben worden (21). In den eigenen Versuchen zeigte sich bei beiden Plattenepithelkarzinomzelllinien eine deutliche konzentrationsabhängige Abnahme des klonogenen Überlebens, wobei die Zelllinie HTB35, wie in der Literatur beschrieben, stärker auf eine Behandlung mit Retinsäure reagierte. Damit konnte die Retinoidsensitivität beider Zelllinien und die korrekte Durchführung der Versuche bestätigt werden.

Bei der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 wurde von Sonneveld et al (47) im Konzentrationsbereich von 0,1 bis 10 $\mu$ M ATRA eine Retinsäureresistenz angegeben. In den eigenen Versuchen wurde das klonogene Verhalten der Zelllinie

HCT116 im Konzentrationsbereich 0,01 bis 100 $\mu$ M ATRA untersucht. Hier konnte gezeigt werden, daß sich bei einer Behandlung der Tumorzelllinie mit 0,01 und 0,1 $\mu$ M ATRA sogar eine leichte Induktion der Proliferation nachweisen läßt. In der Literatur läßt sich eine Stimulation des Wachstums auch bei anderen retinsäureresistenten Zelllinien nachweisen. So konnte Takatsuka et al (51) unter anderem bei der Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 eine Stimulation des Wachstums durch Behandlung mit ATRA nachweisen. Weiter führte in den eigenen Versuchen eine Behandlung der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 mit einer Konzentration von 1 $\mu$ M ATRA zu keiner, bzw. bei einer Konzentration von 10 $\mu$ M ATRA nur zu einer geringen Abnahme der klonogenen Aktivität. Die durchgeführten Versuche bestätigen, daß die Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116, wie von Sonneveld et al beschrieben (47), in einem Konzentrationsbereich von 0,01 bis 10 $\mu$ M ATRA retinsäureresistent ist. Bei einer Konzentration von 100 $\mu$ M ATRA waren sowohl bei beiden Plattenepithelkarzinomzelllinien HTB35 und SCC9, als auch bei der Zelllinie HCT116 im Koloniebildungstest keine Zellen mehr nachweisbar. Daraus läßt sich schließen, daß die Retinsäure in diesem Konzentrationsbereich sowohl bei retinoidsensitiven als auch bei retinoidresistenten Zelllinien toxisch wirkt. Da die Zellen bei dieser Retinsäurekonzentration nicht überleben und sich vom Boden der 6-well-Platten lösen, lassen sich nach 12tägiger Inkubation im Koloniebildungstest keine Zellen mehr nachweisen.

Als Chemotherapeutikum zur Behandlung bösartiger Tumoren konnten verschiedene präklinische und klinische Studien zeigen, daß die Retinsäure bei sensitiven Tumorzelllinien auch in der Radiotherapie eine wichtige Rolle spielt. Durch die radiosensibilisierende Wirkung der Retinsäure ist es möglich, die Effektivität einer alleinigen Radiotherapie durch Kombinationsbehandlung mit Retinsäure zu erhöhen und gleichzeitig das gesunde Gewebe zu schonen. Diese Wirkung stellt einen wichtigen Faktor in der Strahlentherapie dar, da bei gleicher Wirkung mit niedrigeren Dosen bestrahlt werden kann und so die durch Bestrahlung erzeugten Nebenwirkungen gesenkt werden können. Klinisch angewandt wurde diese radiosensibilisierende Wirkung zum Beispiel bei Patientinnen mit fortgeschrittenem Zervixkarzinom oder bei Patienten mit Plattenepithelkarzinomen des Kopf- Hals- Bereichs (12, 14). Desweiteren konnten in-vitro-

Versuche mit Retinsäure bei bestimmten Brustkrebs- und Melanomzelllinien eine radiosensibilisierende Wirkung feststellen (45, 46). Hoffmann et al (20) konnten unter anderem auch bei den Plattenepithelkarzinomzelllinien HTB35 und SCC9 eine, gegenüber alleiniger Retinoid-Behandlung, signifikant erhöhte Inhibition der klonogenen Aktivität bei kombinierter Retinoid/Radiation-Behandlung nachweisen. Auch bei der Zelllinie HCT116 wurde eine sensibilisierende Wirkung der Retinsäure unter ionisierender Bestrahlung mit 2Gy untersucht. Durch die alleinige Bestrahlung der Zellen konnte die klonogene Aktivität um etwa 40% gesenkt werden. Durch eine Kombination aus Bestrahlung und Behandlung mit ATRA ließ sich dieser Effekt jedoch nicht weiter steigern. Somit läßt sich bei der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 kein radiosensibilisierender Effekt der all-trans-Retinsäure nachweisen. Über die zwei Versuchsansätze *immediate* und *delayed plating* wurde außerdem der Reparaturmechanismus der Zelllinie HCT116 überprüft. Bei *delayed plating* ist es den Zellen möglich, Schäden, die durch die ionisierende Bestrahlung entstanden sind, zu reparieren. Dadurch liegt die klonogene Aktivität bei Zellen mit intaktem Reparaturmechanismus nach *delayed plating* höher als nach *immediate plating*. Bei der Tumorzelllinie HCT116 konnte kein Unterschied zwischen der klonogenen Aktivität bei *immediate plating* und bei *delayed plating* festgestellt werden. Dies könnte darauf hindeuten, daß die Erholungsfähigkeit der Kolonkarzinomzelllinie HCT116, d.h. möglicherweise die Reparatur potentieller letaler DNA-Schäden beeinträchtigt ist. Untersuchungen von Brattain et al (8) haben ergeben, daß die Zelllinie HCT116 aufgrund einer Mutation eine fehlerhafte Reparatur durchführt (mismatch-repair). Durch diese Mutation könnte es der Zelllinie nicht möglich sein, die durch die ionisierende Bestrahlung erfolgten Schäden zu reparieren.

Die vorangehenden Versuche verdeutlichen, daß es sich bei der Zelllinie HCT116 um eine retinoidresistente Zelllinie handelt. Um ein solches Nicht-Ansprechen auf Retinsäuren zu erklären, muß der molekulare Wirkmechanismus der Retinoide näher untersucht werden. Dieser Wirkmechanismus erfolgt zum einen über die zytoplasmatischen Retinsäure-Bindungsproteine (CRABP I und II) und zum anderen über kernständige Retinsäurerezeptoren (RARs und

RXR<sub>s</sub>). Aus diesem Grund wurden verschiedene Resistenzmechanismen sowohl auf Transportebene als auch auf Kernrezeptorebene näher analysiert.

Bei den zytoplasmatischen Retinsäure-Bindungsproteinen lassen sich zwei Proteine mit relativ gegensätzlicher Wirkung unterscheiden. Während CRABP I den Abbau der Retinsäure fördert und die RA aus der Zelle transportiert und somit eine Wirkung der RA auf die Zelle verhindert, scheint CRABP II für den Transport der RA in den Zellkern verantwortlich zu sein und vermittelt so die Wirksamkeit der RA auf die Zelle (5). Ein theoretisch möglicher Resistenzmechanismus wäre somit ein relativ hoher Gehalt an CRABP I in der Zelle, wodurch die RA nicht zum Zellkern gelangen kann und ohne Einfluß auf das Proliferations- bzw. Differenzierungsverhalten der Zelle genommen zu haben, in der Zelle abgebaut oder aus der Zelle ausgeschleußt wird. Diese theoretische Überlegung konnte von Boylan et al bei einer Teratokarzinomzelllinie bestätigt werden (6). Eine Überexpression des CRABP I-Proteins führte bei diesen Zellen zu einer herabgesetzten Retinsäuresensitivität. Auch Hoffmann et al konnten diesen Resistenzmechanismus bei Plattenepithelkarzinomzelllinien bestätigen (20). Hier zeigte sich, daß bei der resistenten Pharynxkarzinomzelllinie HTB43 im Gegensatz zur Zervixkarzinomzelllinie HTB35 eine deutlich höhere basale CRABP I-mRNA-Expression nachweisbar war. In eigenen Versuchen wurde nun bei der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 der basale Gehalt von CRABP I und CRABP II auf mRNA-Ebene mit Hilfe der RT-PCR und des PCR-ELISA untersucht. Hier zeigte sich, daß CRABP II deutlich stärker als CRABP I exprimiert wurde. Das Verhältnis CRABP II : CRABP I lag beim Nachweis mittels Agarosegel-Elektrophorese bei 2,08, d.h. die Basalexpression von CRABP II war mehr als doppelt so hoch als von CRABP I. Mit Hilfe des PCR-ELISA konnte dieses Ergebnis bestätigt werden. Hier lag das Verhältnis der basalen Expression von CRABP II : CRABP I bei 1,58. Mit Hilfe des Western-Blots ließ sich CRABP I auch auf Proteinebene nachweisen. Ein Antikörper für CRABP II ist derzeit kommerziell nicht erhältlich. Da sich jedoch regelmäßig mit Hilfe des monoklonalen CRABP I-Antikörper zusätzlich eine zweite, etwa 500Da leichtere Proteinbande nachweisen ließ und CRABP I und II zu 74% sequenzidentisch sind (5), ist es sehr wahrscheinlich, daß es sich dabei um den Nachweis von



CRABP II auf Proteinebene handelt. Da diese Vermutung aber nicht gesichert werden kann, wurde auf Proteinebene kein Verhältnis CRABP I : CRABP II berechnet. Die beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß die resistente Tumorzelllinie HCT116 auf mRNA-Ebene CRABP I deutlich schwächer exprimiert als CRABP II. Damit sprechen diese Ergebnisse gegen den oben beschriebenen möglichen Resistenzmechanismus.

Als weiteren möglichen Erklärungsansatz für die Resistenz der Tumorzelllinie HCT116 wurde die Überlegung angestellt, daß CRABP II möglicherweise nicht intakt ist und so die oben beschriebene Funktion nicht erfüllen kann. Dadurch würde die RA trotz höherer Expression des zytoplasmatischen Retinsäurebindungsproteins II durch den Defekt nicht zum Zellkern gelangen und so keinen Einfluß auf die Zelle ausüben können. Zur Überprüfung dieses Erklärungsansatzes wurde eine Sequenzierung der codierenden Region von CRABP II veranlaßt, um so eine mögliche Mutation aufzudecken. Die Genanalyse von CRABP II erbrachte jedoch eine 100%ige Übereinstimmung im codierenden Bereich. Damit kann in diesem Bereich eine Mutation ausgeschlossen werden und das Bindungsprotein II als intakt und funktionstüchtig gelten. Die Untersuchung der Bindungsproteine erbrachte somit keinen Hinweis auf den Resistenzmechanismus der Zelllinie HCT116.

Außer der Basalexpression wurde auch eine mögliche Modulierbarkeit der Bindungsproteine durch eine Retinsäure-Behandlung untersucht. Bei der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 ließen sich beide zytoplasmatischen Retinsäure-Bindungsproteine CRABP I und CRABP II sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene durch eine ATRA- bzw. 13-cisRA-Behandlung nicht modulieren. Im Gegensatz dazu konnten Astrom et al zeigen, daß zwar bei CRABP I keine Expressionsveränderung durch eine RA-Behandlung nachweisbar ist, die Expression von CRABP II aber normalerweise durch RA-Behandlung induzierbar ist (2). Da diese Induktion über ein RAR/RXR-Heterodimer erfolgt, wurden nun die Kernrezeptoren genauer untersucht.

Bei der Vermittlung der Retinoid-Wirkung im Zellkern spielen die kernständigen Retinsäurerezeptoren eine große Rolle. Diese Rezeptoren gehören zu den Ste-

roid-Thyreoid-Hormonrezeptoren und lassen sich in die Untergruppen RAR $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  und RXR $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$  unterteilen. Die Rezeptoren binden als Dimere an die DNA. Durch Bindung der RA an den Rezeptorkomplex kommt es zu einer Konformationsänderung, die eine Transkription der DNA ermöglicht. Bei den nukleären Retinsäurerezeptoren handelt es sich damit um ligandeninduzierbare Transkriptionsregulatoren (37). Da die Rezeptoren nicht nur untereinander, sondern auch mit anderen Rezeptoren der Steroid-Thyreoid-Hormonrezeptorfamilie Dimere bilden, vermitteln sie auf sehr komplexe Weise ihre biologische Wirkung (43).

Da die verschiedenen Kernrezeptoren während der Entwicklung und Differenzierung eines Lebewesens unterschiedlich exprimiert werden (38), kann man vermuten, daß jeder Rezeptor durch den Einfluß auf bestimmte Gene eigene spezifische Funktionen erfüllt. Ein abweichendes Expressionsmuster der Kernrezeptoren in einer Zelle könnte die regulierende Wirkung der Retinoide aufheben und so zu einer Retinsäureresistenz dieser Zelle führen. Diese Vermutung konnte zum Beispiel bei Untersuchungen an Pankreaskarzinomzellen bestätigt werden. Bei diesen Tumorzellen kam es durch den Verlust von RAR $\gamma$  zu einer verminderten Retinoidsensitivität (27). Viele Tumorzelllinien zeigen allerdings ein sehr konserviertes Verteilungsmuster der kernständigen Retinsäurerezeptoren (11, 28). Bei verschiedenen Plattenepithelkarzinom-Zelllinien konnte gezeigt werden, daß sich von den Kernrezeptoren vor allem RAR $\alpha$ , RAR  $\gamma$  und RXR $\beta$  nachweisen lassen, sodaß man vermuten kann, daß die Wirkung der Retinsäure hauptsächlich über diese drei Rezeptoren vermittelt wird. Eine durch die Behandlung mit Retinsäure bedingte Modulation der Rezeptoren zeigte keine Korrelation mit der Hemmung der klonogenen Aktivität (11).

Bei der Zelllinie HCT116 wurde das Expressionsmuster der nukleären Retinsäurerezeptoren auf RNA-Ebene mittels RT-PCR und PCR-ELISA untersucht. Von Sonnefeld et al (47) wurde die Zelllinie aufgrund von Northern-Blot-Ergebnissen als RAR $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -negativ beschrieben. Die RXR-Rezeptoren waren nicht untersucht worden. In den eigenen Versuchen konnte gezeigt werden, daß sich mit Hilfe der RT-PCR basal sowohl eine RAR $\alpha$ , als auch eine

RAR $\gamma$  und RXR $\beta$  mRNA-Expression nachweisen läßt. Die Expression der Kernrezeptoren RAR $\beta$  und RXR $\alpha$  war deutlich geringer und konnte nur mit Hilfe der sensitiveren PCR-ELISA-Detektion dargestellt werden. Diese Verteilung der Kernrezeptorexpression entspricht dem oben dargestellten konservierten Expressionsmuster und kann auch durch eine Studie von van der Leede et al (30) bestätigt werden. Hier wurden speziell verschiedene retinsäureresistente Tumorzelllinien in Bezug auf ihren Kernrezeptorstatus verglichen. Es zeigte sich, daß RAR $\alpha$  und RAR $\gamma$  in allen Zelllinien exprimiert wurde, die Expression von RAR $\beta$  war in den meisten der 11 untersuchten Zelllinien supprimiert. RXR $\alpha$  konnte deutlich und RXR $\beta$  nur sehr gering nachgewiesen werden. Außerdem zeigte Leede et al (30), daß durch eine Behandlung mit Retinsäure die Expression von RAR $\beta$  bei manchen Tumorzelllinien induziert werden konnte. Bei den anderen Kernrezeptoren ließ sich keine Expressionsmodulation nachweisen. In eigenen Versuchen ließ sich auch bei der Kolonkarzinom-Zelllinie HCT116 keine eindeutige Modulation der Retinsäurerezeptoren nachweisen. Der Kernrezeptor RAR $\beta$  ließ sich durch die Behandlung mit ATRA bzw. 13-cisRA nicht induzieren. Während die RAR $\beta$ -Expression in humanen Hautfibroblasten durch Retinsäurebehandlung deutlich induzierbar ist (46), konnte zum Beispiel bei Plattenepithelkarzinom-Zelllinien des Kopf-Hals-Bereiches ebenfalls keine Induktion des nukleären Retinsäurerezeptors RAR $\beta$  nachgewiesen werden (11). RAR $\beta$  scheint in Bezug auf die Tumorentstehung und die retinoidvermittelte Wirkung eine herausragende Rolle zu spielen. So konnte in verschiedenen Studien dargestellt werden, daß sich dieser Kernrezeptor in gesundem Gewebe nachweisen ließ, die Expression in malignen Zellen jedoch regelmäßig sehr gering bis nicht mehr nachweisbar ist. In einer Untersuchung von Plattenepithelzellen des Kopf-Hals-Bereiches wurde nachgewiesen, daß die Expression von RAR $\beta$  bereits in dysplastischen Zellen abnimmt und in malignen Zellen sehr stark supprimiert ist (55). Auch in der Studie von Li et al konnte der Kernrezeptor RAR $\beta$  in Leberkarzinomzellen im Gegensatz zu gesunden Leberzellen nicht mehr nachgewiesen werden (31). Durch Transfektion der Zellen mit RAR $\beta$  kam es zur Differenzierung und zu einem verbesserten Ansprechen der Tumorzellen auf die Retinsäurebehandlung. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß es sich bei

RAR $\beta$  um ein Tumorsuppressor-Gen handelt. Eine erniedrigte RAR $\beta$ -Expression scheint bei vielen Zelllinien zu einer neoplastischen Umwandlung zu führen und außerdem zu einer Resistenz gegenüber der regulierenden Wirkung der Retinoiden. Wie bereits beschrieben, war die Expression von RAR $\beta$  auch bei der Tumorzelllinie HCT116 sehr stark supprimiert und ließ sich nur mit dem sensitiveren PCR-ELISA-Detektionsverfahren nachweisen. Dies bestätigt die oben beschriebenen Untersuchungen an anderen Tumorzellen und könnte bedeuten, daß es auch bei diesen Zellen durch Veränderung der RAR $\beta$ -Expression zu einer malignen Umwandlung in die Kolonkarzinomzelllinie HCT116 kam.

Da der Kernrezeptor RAR $\beta$  bei der Tumorgenese und der Resistenzentwicklung von Tumorzellen eine wichtige Rolle spielt, wurde die RAR $\beta$ -Expression der Zelllinie HCT116 auch auf Proteinebene untersucht. Mit Hilfe des Western Blot ließ sich der Kernrezeptor sowohl basal als auch nach Behandlung mit Retinsäure nachweisen. Durch die Behandlung ließ sich auch auf Proteinebene keine Induktion des Rezeptors darstellen. Da der Kernrezeptor auf RNA-Ebene nur sehr schwach detektierbar war, spricht die deutliche Expression auf Proteinebene für eine ausgeprägte Translation der mRNA des RAR $\beta$ -Kernrezeptors. Dieser sichere Nachweis des RAR $\beta$ -Proteins bei der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 spricht so gegen eine mögliche Resistenz der Zelllinie aufgrund einer supprimierten RAR $\beta$ -Expression. Eine mögliche Erklärung wäre jedoch, daß der Kernrezeptor defekt ist und aufgrund dieses Defekts seine regulierende Funktion nicht ausüben kann. Ein weiterer Hinweis für einen RAR $\beta$ -Defekt ist die Tatsache, daß in den eigenen Versuchen, entgegen in der Literatur veröffentlichter Ergebnisse (2), auf mRNA-Ebene keine Induktion des Bindungsproteins CRABP II durch ATRA- bzw. 13-cisRA-Behandlung nachgewiesen werden konnte. Aström et al (3) konnten zeigen, daß der Kernrezeptor RAR $\beta$  über ein  $\beta$ RARE-Element das zytoplasmatische Retinsäurebindungsprotein CRABP II induziert. Ein Defekt des Kernrezeptors könnte die fehlende retinoidvermittelte CRABP II-Induktion der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 erklären. Um eine Mutation der proteincodierenden Region nachzuweisen und so Rückschlüsse über

eine mögliche Funktionsstörung des RAR $\beta$ -Proteins ziehen zu können, wurde die codierende DNA-Sequenzen für RAR $\beta$  der Zelllinie HCT116 analysiert. Hier zeigte sich, daß Cytosin an Position 355 in der analysierten Sequenz nicht nachweisbar war. Durch den Verlust einer Base kommt es zu einem sogenannten frame shift. Da sich das Ableseraster der codierenden Region um eine Base verschiebt, ist die Aminosäuresequenz ab der angegebenen Stelle verändert. Das Protein ist aufgrund dieser Mutation verändert und kann nicht als funktionstüchtig angesehen werden.

Die oben diskutierten Ergebnisse zeigen, daß es sich bei der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 um eine retinsäureresistente Zelllinie handelt, bei der auch bei kombinierter Retinsäure/Radiatio-Behandlung kein radiosensibilisierender Effekt nachweisbar war. Untersuchungen der zytoplasmatischen Bindungsproteine und der nukleären Retinsäurerezeptorverteilung erbrachten keinen Aufschluß über die Ursache der Retinsäureresistenz. Mögliche Erklärung für das fehlende Ansprechen auf Retinsäure könnte der Nachweis eines Gendefektes des Kernrezeptors RAR $\beta$  sein. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte im weiteren Verlauf versucht werden, durch eine gezielte Transfektion der resistenten Zelllinie mit dem Kernrezeptor RAR $\beta$  bzw. durch eine Überexpression von CRABP II und Repression von CRABP I eine Sensitivität zu induzieren.

## 6 Zusammenfassung

Die Bedeutung der Retinoide in der Chemo- und Radiotherapie von malignen Tumoren konnte bereits in zahlreichen präklinischen und klinischen Studien belegt werden. Die Wirkung der Retinoide bei zahlreichen Tumorzelllinien beruht auf den antiproliferativen, differenzierungs- und apoptoseinduzierenden Eigenschaften. Die Kombination der Retinoid-Behandlung mit Radiotherapie kann außerdem die Radiotoxizität signifikant steigern, so daß man von einer radiosensibilisierenden Wirkung der Retinoide sprechen kann. Der genaue Wirkmechanismus, der den oben beschriebenen Eigenschaften durch die Retinoide zugrundeliegt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist bekannt, daß die Retinsäure durch Bindung an das zytoplasmatische Retinsäure-Bindungsprotein CRABP II in den Zellkern transportiert wird, während eine Bindung an das zytoplasmatische Retinsäure-Bindungsprotein CRABP I zu einem Abbau der Retinsäure führt. Im Zellkern wird die Wirkung der Retinsäure über kernständige Retinsäurerezeptoren ( $RAR\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  und  $RXR\alpha$  und  $\beta$ ) vermittelt. Diese Rezeptoren wirken als ligandeninduzierbare Transkriptionsregulatoren, die zahlreiche Gene der Wachstums- und Differenzierungskontrolle steuern.

Die Ursache für ein Nicht-Ansprechen auf eine Retinoidbehandlung bei manchen Tumorzelllinien ist noch weitgehend ungeklärt. Um diese Retinsäureresistenz und damit auch den Retinsäure-vermittelten Wirkmechanismus genauer aufzuklären, sollte eine retinsäureresistente Zelllinie sowohl auf zellbiologischer als auch molekularbiologischer Ebene näher untersucht werden.

Es ergaben sich im wesentlichen folgende Ergebnisse:

- Die humane Kolonkarzinomzelllinie HCT116 ist in einem Konzentrationsbereich von  $0,01\mu\text{M}$  bis  $10\mu\text{M}$  ATRA retinsäureresistent. Bei einer Konzentration von  $0,01\mu\text{M}$  und  $0,1\mu\text{M}$  ATRA läßt sich eine geringgradige Proliferationsinduktion nachweisen.
- Bei kombinierter Behandlung mit  $0,1\mu\text{M}$  bzw.  $10\mu\text{M}$  ATRA und ionisierender Bestrahlung mit 2Gy läßt sich bei der Zelllinie HCT116 kein radiosensibilisierender Effekt nachweisen.

- Der Vergleich zwischen *immediate* und *delayed plating* gibt einen Hinweis auf eine möglicherweise gestörte PLD (*potential-lethal-damage*)–Reparatur.
- Untersuchungen auf mRNA-Ebene zeigen, daß bei der Expression der zytoplasmatischen Retinsäure-Bindungsproteine die Expression von CRABP II überwiegt. Durch eine Behandlung mit ATRA bzw. 13-cisRA läßt sich weder bei CRABP I noch bei CRABP II eine Induktion nachweisen.
- In der sequenzanalytischen Untersuchung für CRABP II läßt sich im protein-codierenden Bereich keine Mutation nachweisen.
- Bei den kernständigen Retinsäurerezeptoren überwiegt auf mRNA-Ebene die Expression von RAR $\alpha$ , RAR $\gamma$  und RXR $\beta$ . Durch eine Behandlung mit ATRA bzw. 13-cisRA läßt sich bei allen Kernrezeptoren keine Modulation der Expression feststellen.
- Die sequenzanalytische Untersuchung des Kernrezeptors RAR $\beta$  ergibt eine Mutation in der protein-codierenden Region. Es läßt sich der Verlust der Base Cytosin an Position 355 nachweisen. Der daraus folgende *frame shift* führt zu einem veränderten und nicht funktionsfähigen Protein.

Zusammenfassend zeigen diese Ergebnisse, daß es sich bei der Kolonkarzinomzelllinie HCT116 um eine retinsäureresistente Zelllinie handelt. Während die Untersuchungen der zytoplasmatischen Bindungsproteine keinen Aufschluß über den Resistenzmechanismus erbrachten, kann der Nachweis des defekten RAR $\beta$ -Proteins diese Resistenz möglicherweise erklären. Die Ergebnisse verdeutlichen damit die wichtige Funktion des RAR $\beta$ -Rezeptors bei der retinoid-vermittelnden Wirkung.

## 7 Literaturverzeichnis

- 1) Allenby, G., Bocquel, M., Saunders, M., Kazmer, S., Speck, J., Rosenberger, M., Lovey, A., Kastner, P., Grippo, J., Chambon, P., Levin, A. (1993) Retinoic acid receptors and retinoid X receptors: Interactions with endogenous retinoic acids.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 30-34
- 2) Astrom, A., Pettersson, U., Chambon, P., Voorhees, J.J. (1994) Retinoic acid induction of human cellular retinoic acid-binding protein-II gene transcription is mediated by retinoic acid receptor-retinoid X receptor heterodimers bound to one far upstream retinoic acid-responsive element with 5-base pair spacing.  
J. Biol. Chem. 269, 22334-22339
- 3) Astrom, A., Pettersson, U., Voorhees, J.J. (1992) Structure of human cellular retinoic acid binding protein II gene.  
J. Biol. Chem. 267, 25251-25255
- 4) Bläse, M., Zaruba, M., Santo-Höltje, L., Bamberg, M., Hoffmann, W., Rodemann, H.-P. (1999) 13-cis retinoic acid in combination with interferon-alpha enhances radiation survival of human squamous cell carcinoma cells of the oral cavity.  
Strahlenther. Onkol. 175 (11), 563-568
- 5) Blomhoff, R. (1994) Transport and metabolism of vitamin A.  
Nutr. Rev. 52, 13-23
- 6) Boylan, J.F., Gudas, L.J. (1992) The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells.  
J. Biol. Chem. 267, 21486-21491
- 7) Braakhuis, B., Klaassen, I., van der Leede, B., Cloos, J., Brakenhoff, R., Copper, M., Teerlink, T., Hendriks, H., van der Saag, P., Snow, G. (1997) Retinoid metabolism and all-trans retinoic acid-induced growth inhibition in head and neck squamous cell carcinoma cell lines.  
Br. J. Cancer 76, 189-197
- 8) Brattain, M.G., Fine, W., Khaled, F., Thompson, J., Brattain, D.E. (1981) Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma.  
Cancer Res. 41, 1751-1756
- 9) Chambon, P. (1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors.  
FASEB J. 10, 940-954



- 10) Cheng, A.L., Su, I., Chen, C., Tien, H., Lay, J.D., Chen, B., Pu, Y., Hong, R., Shen, M., Wang, C. (1994)  
Use of retinoic acids in the treatment of peripheral T-cell lymphoma: a pilot study.  
J. Clin. Oncol. 12, 1185-1192
- 11) Cooper, M.P., Klaassen, I., Brakenhoff, R.H., Cloos, J. (1997)  
All-trans retinoic acid induced gene expression and growth inhibition in head and neck cancer cell lines.  
Oral. Oncol. 33, 270-274
- 12) DeLaney, T.F., Afridid, N., Taghian, A., Sanders, D.A., Fulheihan, N.S., Faller, D., Nogueira, C.P. (1996)  
13-cis retinoic acid with alpha-2a-interferon enhances radiation cytotoxicity in head and neck squamous cell carcinoma in vitro.  
Cancer Research 56, 2277-2280
- 13) Delva, L., Bastie, J.N., Rochette-Egly, C., Kraiba, R., Balitrand, N., Despouy, G., Chambon, P., Chomienne, C. (1999)  
Physical and functional interactions between cellular retinoic acid binding protein II and the retinoic acid-dependent nuclear complex.  
Mol. Cell. Biol. 19, 7158-7167
- 14) Dunst, J., Hänsgen, G., Krause, U., Füchsel, G., Köhler, U., Becker, A. (1998)  
A 2-week pretreatment with 13-cis-retinoic acid + interferon-alpha-2a prior to definitive radiation improves tumor tissue oxygenation in cervical cancer.  
Strahlenther. Onkol. 174, 571-574
- 15) Falk, L.A., DeBenedetti, F., Lohrey, N., Birchenall-Roberts, M., Ellingsworth, L., Faltynek, C., Ruscetti, F.W. (1991)  
Induction of transforming growth factor- $\beta_1$  (TGF- $\beta_1$ ) receptor expression and TGF- $\beta_1$  protein production in retinoic acid-treated HL-60 cells: possible TGF- $\beta_1$ -mediated autocrine inhibition.  
Blood 77, 1248-1255
- 16) Fanjul, A., Dawson, M., Hobbs, P., Jong, L., Cameron, J., Harlev, E., Graupner, G., Lu, X., Pfahl, M. (1994)  
A new class of retinoids with selective inhibition of AP-1 inhibits proliferation. Nature 372, 107-111
- 17) Fogh, K., Voorhees, J.J., Astrom, A. (1993)  
Expression, purification and binding properties of human cellular retinoic acid-binding protein type I and type II.  
Arch. Biochem. Biophys. 300, 751-755
- 18) Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K. (1996)  
Retinol, Retinsäure, Retinal, 640-643  
in: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie;  
7. Auflage, Spektrum Verlag Stuttgart

- 19) Friedl, F., Kimura, I., Osato, T., Ito, Y. (1970)  
Studies on a new human cell line (SiHa) derived from carcinoma of uterus.  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 135, 543-545
- 20) Hoffmann, W., Bläse, M., Santo-Hoeltje, L., Herskind, C., Bamberg, M., Rodemann, H.P. (1999)  
Radiation sensitivity of human squamous cell carcinoma cells in vitro is modulated by all-trans and 13-cis-retinoic acid in combination with interferon- $\alpha$ .  
Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys. 45, 991-998
- 21) Hoffmann, W., Schlak, I., Schiller, U., Bamberg, M., Rodemann, H.P. (1994)  
Growth modulating effects of all-trans-retinoic acid, interferon- $\alpha$  and ionizing radiation in human head and neck and cervical cancer cell lines.  
Ann. Oncol. 5, 3-6
- 22) Hong, W., Endicott, J., Itri, L., Doos, W., Batsakis, J., Bell, R., Fofonoff, S., Byers, R., Atkinson, N., Vaughan, C., Toth, B., Kramer, A., Dimery, I., Skipper, P., Strong, S. (1986)  
13-cis-retinoic acid in the treatment of oral leukoplakia.  
N. Engl. J. Med. 315, 1501-1505
- 23) Hong, W., Lippman, S., Hittelman, W., Lotan, R. (1995)  
Retinoid chemoprevention of aerodigestive cancer: from basic research to the clinic.  
Clin. Cancer Res. 1, 677-686
- 24) Hong, W., Lippman, S., Itri, L., Karp, D., Lee, J., Byers, R., Schantz, S., Kramer, A., Lotan, R., Peters, L., Dimery, I., Brown, B., Goepfert, H. (1990)  
Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous-cell carcinoma of the head and neck.  
N. Engl. J. Med. 323, 795-801
- 25) Hu, L., Crowe, D., Rheinwald, J., Chambon, P., Gudas, L. (1991)  
Abnormal expression of retinoic acid receptors and keratin 19 by human oral and epidermal squamous cell carcinoma cell lines.  
Cancer Research 51, 3972-3981
- 26) Jing, Y., Waxman, S., Mira-y-Lopez, R. (1997)  
The cellular retinoic acid binding protein II is a positive regulator of retinoic acid signaling in breast cancer cells.  
Cancer Research 57, 1688-1672
- 27) Kaiser, A., Wolf-Breitinger, M., Albers, A., Dorbic, T., Wittig, B., Riecken, E., Rosewicz, S. (1998)  
Retinoic acid receptor gamma1 expression determines retinoid sensitivity in pancreatic carcinoma cells.  
Gastroenterology 115, 967-977
- 28) Kley, J., Hoffmann, W., Bamberg, M., Rodemann, H.P. (1997)  
Expression of cytoplasmatic retinoic acid binding proteins and nuclear receptors in squamous cell carcinomas in vitro.  
Int. J. Cancer 70, 478-480

- 29) Krupitz, G., Hulla, W. (1995)  
Retinoic acid induced death of ovarian carcinoma cells correlates with c-myc stimulation.  
Int. J. of Cancer 61, 649-657
- 30) Van der Leede, B., van der Brink, C., van der Saag, P. (1993)  
Retinoic acid receptor and retinoid X receptor expression in retinoic acid-resistant human tumor cell lines.  
Mol. Carcinog. 8, 112-122
- 31) Li, C., Wan, Y.J. (1998)  
Differentiation and antiproliferation effects of retinoic acid receptor beta in hepatoma cells.  
Cancer Lett. 124, 205-211
- 32) Liaudet-Coopman, E., Berchem, G., Wellstein, A. (1997)  
In vivo inhibition of angiogenesis and induction of apoptosis by retinoic acid in squamous cell carcinoma.  
Clin. Cancer Research 3, 179-184
- 33) Lippmann, S.M., Kavanagh, J., Paredes-Espinoza, M., Delgadillo-Madrueno, F., Paredes-Casillas, P., Hong, W., Holdener, E., Krakoff, I. (1992)  
13-cis-retinoic acid plus interferon alpha-2a: Highly active systemic therapy for squamous cell carcinoma of the cervix.  
J. Natl. Cancer Inst. 84, 241-246
- 34) Lippmann, S.M. (1988)  
Treatment of advanced squamous cell carcinoma of the head and the neck with isotretinoin.  
Invest. New Drugs 6, 51-56
- 35) Lotan, R. (1996)  
Retinoids in cancer chemoprevention.  
FASEB J. 10, 1031-1039
- 36) Lotan, Y., Xu X., Shalev, M., Lotan, R., Williams, R., Wheeler, T., Thompson, T., Kadmon, D. (2000)  
Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal and malignant prostates.  
J. Clin. Oncol. 18, 116-121
- 37) Mangelsdorf, D.J. (1994)  
Vitamin A receptors.  
Nutr. Rev. 52, 32-44
- 38) Morriss-Kay, G.M., Sokolova, N. (1996)  
Embryonic development and pattern formation.  
FASEB J. 10, 961-968

- 39) Nagpal, S., Ghosn, C., DiSepio, D., Molina, Y., Sutter, M., Klein, E., Chandraratna, R. (1999)  
Retinoid-dependent recruitment of a histone H1 displacement activity by retinoic acid receptor.  
J. Biol. Chem. 274, 22563-22568
- 40) Nagy, L., Thomazy, V., Heyman, R.A., Davies, P.J. (1998)  
Retinoid-induced apoptosis in normal and neoplastic tissues.  
Cell Death Differ. 5, 11-19
- 41) Napoli, J. (1996)  
Biochemical pathways of retinoid transport, metabolism and signal transduction.  
Clin. Immun. Immunopath. 80, 52-62
- 42) Ong, E.D. (1994)  
Cellular transport and metabolism of vitamin A: roles of the cellular retinoid-binding proteins.  
Nutr. Rev. 52, 24-31
- 43) Pfahl, M. (1994)  
The retinoid response: A molecular dissection.  
Annals of Oncology 5, 11-15
- 44) Rheinwald, J.G., Beckett, M.A. (1981)  
Tumorigenic keratinocyte lines requiring anchorage and fibroblast support cultures from human squamous cell carcinomas.  
Cancer Res. 41, 1657-1663
- 45) Rutz, H.P., Little, J.B. (1989)  
Modification of radiosensitivity and recovery from x-ray damage in vitro by retinoic acid.  
Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 16, 1285-1288
- 46) Schiller, U., Hoffmann, W., Mayer, C., Ulrich, W., Bamberg, M., Rodemann, H.P. (1994)  
All-trans-retinoic acid modulates the radiosensitivity and differentiation of normal and tumour cells in vitro.  
Ann. Oncol. 5, 1-3
- 47) Sonneveld, E., Van den Brink, C.E., Van der Leede, B., Schulkes, R., Petkovich, M., Van der Burg, B., Van der Saag, P.T. (1998)  
Human retinoic acid (RA) 4-hydroxylase (CYP26) is highly specific for all-trans-RA and can be induced through RA receptors in human breast and colon carcinoma cells.  
Cell Growth Differ. 9, 629-637
- 48) Srivastava, R.K., Srivastava, A.R., Cho-Chung, Y.S. (2000)  
Synergistic effects of 8-Cl-cAMP and retinoic acids in the inhibition of growth and induction of apoptosis in ovarian cancer cells: Induction of retinoic acid receptor  $\beta$ .  
Mol. Cell. Biochem. 204, 1-9

- 49) Steck, P.A., Hadi, A., Lotan, R., Yung, W.K. (1990)  
Inhibition of epidermal growth factor receptor activity by retinoic acid in glioma cells.  
J. Cell. Biochem. 42, 83-94
- 50) Sun, S., Yue, P., Mao, L., Dawson, M., Shroot, B., Lamph, W., Heyman, R., Chandraratna, R., Shudo, K., Hong, W., Lotan, R. (2000)  
Identification of receptor-selective retinoids that are potent inhibitors of the growth of human head and neck squamous cell carcinoma cells.  
Clin. Cancer Res. 6, 1563-1573
- 51) Takatsuka, J., Takahashi, N., De Luca, L. (1996)  
Retinoic acid metabolism and inhibition of cell proliferation: an unexpected liaison.  
Cancer Research 56, 675-678
- 52) de The, H., Lavau, C. (1991)  
The PML-RAR $\alpha$  fusion mRNA generated by the t(15;17)translocation in acute promyelotic leukemia encodes a functionally altered RAR.  
Cell 66, 675-684
- 53) Warrell, R., Frankel, S., Miller, W., Scheinberg, D., Itri, L., Hittelman, W., Vyas, R., Andreeff, M., Tafuri, A., Jakubowski, A., Gabrilove, J., Gordon, M., Dmitrovsky, E. (1991)  
Differentiation therapy of acute promyelocytic leukemia with tretinoin (all-trans-retinoic acid).  
N. Engl. J. Med. 324, 1385-1393
- 54) Wu, S., Zhang, Z., Zhang, D., Soprano, D., Soprano, K. (1997)  
Reduction of both RAR and RXR levels is required to maximally alter sensitivity of CA-OV3 ovarian tumor cells growth suppression by all-trans-retinoic acid.  
Exp. Cell. Res. 237, 118-126
- 55) Xu, X.C., Ro, J.Y., Lee, J., Shin, D., Hong, W., Lotan, R. (1994)  
Differential expression of nuclear retinoid receptors in normal, premalignant and malignant head and neck tissues.  
Cancer Research 54, 3580-3587
- 56) Zheng, Z.S., Polakowska, R., Johnson, A., Goldsmith, L. (1992)  
Transcriptional control of epidermal growth factor receptor by retinoic acid.  
Cell. Growth. Differ. 3, 225-232

## Danksagung

---

Abschließend möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Rodemann für die Stellung des Arbeitsthemas, das Interesse und die Diskussionsfreude während der Zeit im Labor und die Geduld bei der Fertigstellung dieser Arbeit. Herrn Dr. Marcel Bläse und Frau Dr. Lan Santo-Höltje danke ich ganz herzlich für die gute Einarbeitung in die Laborarbeit, die Bereitschaft, immer ein offenes Ohr für alle aufgetretenen Probleme zu haben und auch für die praktische und moralische Unterstützung, durch die die vielen Stunden im Labor sehr viel Freude gemacht haben. Bei allen Mitarbeitern der Abteilung für Strahlenbiologie möchte ich mich für die vielen labortechnischen Tips, den motivierenden Zuspruch und das gute Arbeitsklima bedanken.

## Lebenslauf

Name: Corinna Raff  
Geburtsdatum: 08.07.1975  
Geburtsort: Stuttgart  
Familienstand: ledig

### Schulausbildung

09/1982 – 07/1986 Grundschule in Freiberg  
09/1986 – 07/1995 Oscar-Paret-Schule Freiberg, Abteilung Gymnasium  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

### Hochschulausbildung

10/1995 – 07/1997 Vorklinisches Studium an der Eberhard-Karls-Universität  
Tübingen  
08/1997 Ärztliche Vorprüfung  
10/1997 – 04/2001 Klinisches Studium an der Eberhard-Karls-Universität  
Tübingen  
08/1998 1. Staatsexamen  
03/2001 2. Staatsexamen  
04/2001 – 03/2002 Praktisches Jahr am Marienhospital Stuttgart bzw. am  
Royal Melbourne Hospital, University of Melbourne,  
Australien  
14.05.2002 3. Staatsexamen und Abschluß des Studiums

### Promotion

11/1998 – 02/2002 Prof. Dr. rer. nat. H.-P. Rodemann, Leiter der Abteilung für  
Strahlenbiologie und Molekulare Umweltforschung, Univer-  
sitätsklinik für Radioonkologie Tübingen