

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin  
der Philipps-Universität Marburg  
Abteilung Hämatologie / Onkologie  
Geschäftsführender Direktor: Univ.-Professor Dr. med. Andreas Neubauer

# **Hypermethylierung von E-Cadherin und HIC-1 bei zwei prognostisch verschiedenen AML-Subgruppen**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin



dem Fachbereich Humanmedizin der  
Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt

von  
**Katharina Hölzle**  
aus Gelsenkirchen

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg am  
28.Juli 2005.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Dekan: Prof. Dr. med. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. med. M. Schuermann

1. Coreferent: Prof. Dr. med. H. Pralle

2. Coreferent: Prof. Dr. med. D. Hoelzer

**Für meine Eltern**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>5</b>
<b>1.1</b>	<b>Akute Myeloische Leukämie (AML) .....</b>	<b>5</b>
1.1.1	Definition.....	5
1.1.2	Epidemiologie.....	6
1.1.3	Ätiologie und Pathogenese .....	6
1.1.4	Klassifikation und Morphologie.....	7
1.1.5	Zytogenetik.....	7
1.1.5.1	Translokation (8;21) .....	8
1.1.5.2	Monosomie 7/ del(7q) .....	9
1.1.5.3	Monosomie 5/ del(5q) .....	10
1.1.6	Klinik.....	11
1.1.7	Laborbefunde und Diagnose.....	12
1.1.8	Prognostische Faktoren .....	12
1.1.9	Therapie.....	13
<b>1.2</b>	<b>DNA-Methylierung.....</b>	<b>15</b>
1.2.1	DNA-Methyltransferasen .....	16
1.2.2	CpG-Dinukleotide .....	17
1.2.3	Molekulare Mechanismen der Inhibition der Genexpression durch Methylierung .....	18
1.2.4	Funktionen der DNA-Methylierung in normalen Zellen.....	20
1.2.5	DNA-Methylierung bei neoplastischen Zellen.....	22
1.2.5.1	Regionale Promotor-Hypermethylierung .....	22
1.2.5.2	Allgemeine Hypomethylierung von DNA.....	25
1.2.5.3	Erhöhte DNMT1-Aktivität .....	25
1.2.6	Neue Therapieansätze für die Behandlung myeloischer Leukämien .....	26
<b>1.3</b>	<b>Fragestellung.....</b>	<b>27</b>

---

<b>2</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>28</b>
<b>2.1</b>	<b>Material .....</b>	<b>28</b>
2.1.1	Chemikalien.....	28
2.1.2	Lösungen, (Fertig-)Puffer und Medien.....	29
2.1.3	Enzyme und Nukleinsäuren.....	30
2.1.4	Kitsysteme .....	30
2.1.5	Geräte .....	30
2.1.6	Oligonukleotide .....	31
2.1.7	Proben.....	31
2.1.7.1	Kontrollgruppe .....	32
2.1.7.2	AML-Patienten .....	32
2.1.8	Bakterienstämme .....	33
2.1.9	Analyse .....	33
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>33</b>
2.2.1	Isolierung genomischer DNA aus Knochenmark.....	34
2.2.1.1	Aufarbeitung einer Spongiosaprobe .....	34
2.2.1.2	Extraktion genomischer DNA aus Leukozyten.....	35
2.2.2	Gel-Elektrophorese.....	35
2.2.3	DNA-Quantifizierung.....	36
2.2.4	Umwandlung von DNA mit Hilfe von Natriumbisulfit .....	36
2.2.5	Nested bzw. semi-nested PCR.....	38
2.2.6	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	40
2.2.7	Semiquantitative Abschätzung des Methylierungsstatus durch PCR- Produkt-Sequenzierung .....	41
2.2.8	Klonierungstechniken.....	42
2.2.8.1	Ligation.....	42
2.2.8.2	Transformation .....	43
2.2.8.3	Plasmid isolation aus Bakterien.....	43
2.2.8.4	Restriktionsverdau von Plasmiden .....	44
2.2.9	Automatisierte Sequenzierung.....	45
2.2.10	Auswertung.....	46

<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>47</b>
3.1	<b>Etablierung einer Methode.....</b>	<b>47</b>
3.1.1	Anwendung der Methode nach Melki et al. (s. 2.2.7).....	47
3.1.2	Semiquantitative Abschätzung des Methylierungsstatus durch Sequenzierung von einklonierten PCR-Produkten.....	48
3.2	<b>Darstellung der Ergebnisse.....</b>	<b>51</b>
3.2.1	Vergleich der Methylierungsereignisse Kontrollgruppe versus AML- Patienten.....	52
3.2.2	Vergleich der Methylierungsereignisse Niedrigrisiko- versus Hochrisikogruppe.....	54
3.2.2.1	Gruppenspezifische Ausprägungsgrade der Methylierung.....	54
3.2.2.2	Betrachtung des Methylierungsstatus in Abhängigkeit vom Blastenanteil.....	55
3.2.2.3	Betrachtung des Methylierungsstatus in Abhängigkeit vom Alter.....	57
3.2.2.4	Betrachtung des Methylierungsstatus in Abhängigkeit von der Überlebensdauer.....	58
3.2.3	Besteht ein Trend zur Clusterbildung in den untersuchten Genregionen ? .....	60
3.2.4	Ergebnisse im Überblick.....	69
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>71</b>
4.1	<b>Methodische Schwierigkeiten bei der Bestimmung des quantitativen Methylierungsstatus. ....</b>	<b>72</b>
4.2	<b>Bewertung der Ergebnisse.....</b>	<b>73</b>
4.2.1	Kontrollpersonen versus AML-Patienten.....	73
4.2.2	Niedrigrisiko- versus Hochrisikogruppe.....	75
4.2.2.1	Methylierungsstatus.....	75
4.2.2.2	Blastenanteil.....	76
4.2.2.3	Alter.....	77
4.2.2.4	Überlebenszeit.....	78
4.2.3	Methylierungsmuster.....	80

4.2.4	E-Cadherin und HIC-1 .....	82
4.3	Schlussfolgerung aus den Ergebnissen .....	84
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>86</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>87</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>102</b>
<b>8</b>	<b>Akademische Lehrer.....</b>	<b>106</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>108</b>
<b>10</b>	<b>Lebenslauf.....</b>	<b>109</b>
<b>11</b>	<b>Erklärung .....</b>	<b>110</b>

# **1 Einleitung**

Maligne Tumorerkrankungen sind nach der koronaren Herzerkrankung die zweit häufigste Todesursache in westlichen Ländern. Daran hat die Leukämie als Neoplasie hämatopoetischer Zellen einen Anteil von ungefähr 3% (Amtliche Todesursachen-Statistik, Statistisches Bundesamt, Wiesbaden). Sie ist eine Erkrankung, die in unterschiedlichsten Formen und Krankheitsbildern auftritt. Man unterteilt sie nach der Progressionsrate ohne Therapie in akute und chronische Leukämien und nach der Differenzierungsreihe des malignen Zellklons in myeloische und lymphatische Leukämien. Zu den klinisch besonders gravierend verlaufenden Formen gehört die akute myeloische Leukämie (AML), die unterschiedliche Erscheinungsformen besitzt und an der pro Jahr allein in der Bundesrepublik Deutschland ca. 2000 Menschen erkranken. Die Überlebensprognose ist häufig extrem schlecht und den Patienten verbleibt nach der Diagnosestellung nur noch sehr kurze Zeit. Diese Überlebenszeit ist zudem oft geprägt von den Nebenwirkungen der Chemotherapie, die häufig die Lebensqualität stark beeinträchtigt.

Ein besseres Verständnis der molekuarbiologischen Ursachen der AML wäre sehr wünschenswert, um neue Anstöße für die Entwicklung wirksamer und möglicherweise nebenwirkungsärmerer Therapien geben zu können.

## **1.1 Akute Myeloische Leukämie (AML)**

### **1.1.1 Definition**

Die akuten myeloischen Leukämien sind eine Gruppe heterogener Erkrankungen des hämatopoetischen Systems, denen die maligne Transformation einer hämatopoetischen Vorläuferzelle zu Grunde liegt (BUSQUE & GILLILAND 1993).



### **1.1.2 Epidemiologie**

Die AML besitzt eine Inzidenz von 2,3 Fällen pro 100000 Einwohner pro Jahr, die mit dem Alter ansteigt (HEIL & GANSER 2002). Während die AML bei Kindern nur etwa 20% der akuten Leukämien ausmacht, dominiert sie bei Erwachsenen mit 80% aller akuten Leukämien (SANDLER 1995).

### **1.1.3 Ätiologie und Pathogenese**

Die Ursache für die maligne Transformation einer hämatopoetischen Vorläuferzelle ist bei den meisten Patienten unklar. In ca. 10% der Fälle findet man anamnestisch Hinweise auf den Einfluss bestimmter Risikofaktoren, von denen in der Literatur verschiedene für die Entwicklung einer AML beschrieben werden (DEVEREUX 1991):

- Vererbung (verschiedene Syndrome mit Aneuploidie, z.B. das Down-, Klinefelter- und Patau-Syndrom, oder Erkrankungen mit angeborener Chromosomeninstabilität, wie z.B. die Faconi-Anämie oder die teleangiektatische Ataxie)
- Einwirkung ionisierender Strahlung
- Chemische Substanzen und andere Giftstoffe (Benzole, Rauchen, Ethylenoxide Herbizide, Pestizide)

(FAUCI et al. 1998)

Der mit 10-20% häufigste Faktor aller AML-Erkrankungen ist die vorangehende Therapie mit Chemotherapeutika, insbesondere Alkylanzien oder Topoisomerase-II-Inhibitoren (LOWENBERG et al. 1999).

Die maligne Transformation einer hämatopoetischen Zelle entsteht durch genetische Veränderungen, die zu einem Verlust bzw. einer Einschränkung der Zelldifferenzierung in einem frühen Myelopoese Stadium oder zu einer gestörten Apoptose führen (HEIL & GANSER 2002, FEURIG-BUSKE et al., 2002). Infolge der autonomen Zellvermehrung kommt es zu einer klonalen Expansion der leukämischen Stammzelle und letztlich zur Verdrängung der normalen Hämatopoese (FEURIG-BUSKE et al., 2002).

### 1.1.4 Klassifikation und Morphologie

Die AML lässt sich gemäß der French-American-British-Klassifikation (FAB) in sieben Unterkategorien einteilen. Diese gründen sich hauptsächlich auf zellmorphologischen Kriterien. Daneben spielen in den letzten Jahren v.a. immunologische sowie zytogenetische Kriterien in der Differenzierung eine immer wichtigere Rolle.

**Tabelle 1.1 FAB-Klassifikation.** Die AML wird dabei nach dominierendem Zelltyp, Differenzierungsgrad und zytochemischen Aspekten in acht Subtypen von M0 bis M7 unterteilt. MPO=Myeloperoxidase, NSE=Nichtspezifische Esterase. Die Tabelle macht deutlich, dass es sich bei AML um eine sehr heterogene Gruppe von Erkrankungen des myeloepoetischen Systems handelt (BAENKLER et al. 2001, FAUCI et al. 1998).

FAB Subtyp	%	Morphologie	Zytochemie	
			MPO	NSE
M0: Undifferenziert	2-3	undifferenzierte Blasten, keine oder nur schwach ausgeprägte Granulierung	neg.	neg.
M1: AML ohne Granulierung	20	selten azurophile Granula, Auerstäbchen oder beides	>3%	neg.
M2: AML mit Granulierung	25-30	Reifung bis Promyelozyten, häufig Auerstäbchen, Variante: M2 mit Baso.: mit basophilen Granulozyten	pos.	neg.
M3: Promyelozytäre Leukämie	8-15	meist abnorme Promyelozyten, oft Auerstäbchen in Bündeln, zahlreiche Granula, Variante: hypogranulär	pos.	neg.
M4: Akute myelomonozytäre Leukämie	20-25	myelozytäre und monozytoide Blasten, Variante: M4 > 3% Eosinophilie	pos./neg.	pos.
M5: Akute monozytäre Leukämie	20-25	Monoblasten, Promonozyten, 2 Subtypen; M5a undifferenziert, M5b differenziert	neg.	pos.
M6: Akute erythrozytäre Leukämie (Di Guglielmo's)	5	Erythroblasten über 50 % der nukleären Zellen, Myeloblasten über 30 % der nicht-erythrozytären Zellen	pos./neg.	neg.
M7: Akute megakaryoblastische Leukämie	1-2	Megakaryoblasten über 30 % von allen nukleären Zellen	neg.	neg.

### 1.1.5 Zytogenetik

Die Entdeckung des Philadelphia-Chromosoms 1960 durch Nowel und Hungerford bei Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie war der erste Beweis dafür, dass

zytogenetische Veränderungen bei Neoplasien kein zufälliges Ereignis sind (NOWEL & HUNGERFORD 1960).

Bei vielen Leukämiepatienten lassen sich chromosomentypische Veränderungen nachweisen, die oft so spezifisch für einen bestimmten Subtyp sind, dass sie sowohl als diagnostischer als auch als prognostischer Faktor benutzt werden (WHITTAKER & HOLMES 1998).

Bei Leukämien treten meist Translokationen (t), Deletionen (del) und Inversionen (inv) auf. Auch numerische Veränderungen werden gefunden (Monosomien oder Trisomien). Viele der häufig gefundenen chromosomalen Abnormalitäten sind mit bestimmten klinischen Charakteristika assoziiert (s. 1.1.5.1, 1.1.5.2 und 1.1.5.3).

### 1.1.5.1 Translokation (8;21)

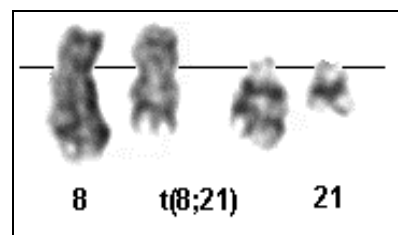


Abbildung 1.1 Chromosomen mit t(8;21)(q22;q22). G-Banden-Darstellung (HURET 1997).

Die t(8;21)(q22;q22) wurde als erste Abweichung vom normalen Karyotypen bei AML entdeckt (ROWLEY 1973). Sie ist eine der häufigsten karyotypischen Veränderungen bei AML (7-8%) (STROUT et al. 1999, MARCUCCI et al. 2000). Meist gehört die t(8;21) der M2-Gruppe der FAB an (90%) (ANDRIEU et al. 1996, HAYASHI 2000, NAKAMURA et al. 1997, NUCIFORA et al. 1994, ROWLEY & TESTA 1982, SWIRSKY et al. 1984).

Man findet sie deutlich häufiger bei Patienten unter 60 Jahren und meist bei *de novo* AML (GRIMWADE et al. 1998, MROZEK et al. 1997, MROZEK et al. 2000, RAIMONDI et al. 1999, SLOVAK et al. 2000). Die Patienten mit t(8;21) gehören der „Niedrigrisikogruppe“ an, d.h. sie besitzen eine im Vergleich günstige Prognose (s. auch Tab 1.2) (BITTER et al. 1987, MARTINEZ-CLIMENT et al. 1995, SWANSBURY et al. 1994). Verschiedene Studien haben für Patienten der Niedrigrisikogruppe 5-Jahres-Überlebensraten zwischen 56 und 65 % ermittelt (APPELBAUM 1999).

Die t(8;21) führt zur Fusion des AML1-Gens, das sich auf dem langen Arm (q) von Chromosom 21 befindet, mit dem ETO-Gen des langen Arms von Chromosom 8 (ERICKSON et al. 1992). Das AML1-Gen kodiert für CBF $\alpha$ 2, einen Bestandteil des

dimeren CBF-Transkriptionsfaktors, der eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Transkription von an der normalen Hämatopoese beteiligter Gene, wie zum Beispiel GM-CSF, CSF1R oder TCR spielt (TENEN et al. 1997, WANG et al.1996). Beim ETO-Gen handelt es sich ebenfalls um einen Transkriptionsregulator, dessen biologische Funktion allerdings noch nicht geklärt ist.

### 1.1.5.2 Monosomie 7/ del(7q)

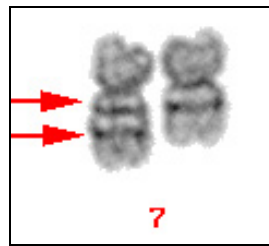


Abbildung 1.2 Chromosomen mit Deletion 7q. G-Banden-Darstellung (DESANGLES 1999).

Die Karyotypen Monosomie 7/ del(7q) werden in 10% der Fälle bei Patienten mit *de novo* AML nachgewiesen (BERNSTEIN et al. 1984). Die beiden Formen werden meist der Unterkategorie M4 oder M6 zugeordnet (HUTTER et al. 1984, SCHIFFER et al.1989, WEH et al. 1988, YUNIS 1984). Die Inzidenz steigt nach dem 60. Lebensjahr drastisch an (FAUCI et al. 1998). Die Monosomie/ del(7q) tritt biphasisch auf: der erste Erkrankungsgipfel findet sich bei Kindern im Alter von 2 bis 5 Jahren, der zweite bei Sechzigjährigen (LUNA-FINEMAN et al. 1995).

Die del(7q) wird in der Literatur als eine interstitielle Deletion mit gehäuft auftretenden Bruchstellen zwischen 7q11 und 7q36 beschrieben (FISCHER et al. 1997, JOHANSSON et al. 1993, JOHNSON et al. 1996, LE BEAU et al. 1996). Davon sind zwei Segmente gehäuft betroffen und werden als „kritische Regionen“ für die Entwicklung einer myeloischen Leukämie angesehen: 7q22 und distal 7q32-34 (LE BEAU et al. 1986, NEUMAN et al. 1992). Durch den Verlust des genetischen Materials gehen Genorte verloren, die als Zielregion für die Entstehung der AML von Bedeutung sind. Man geht von bestimmten dort vorhandenen Tumorsuppressorgenen und anderen Genen aus, die eine Rolle in der Leukämogenese spielen. Dazu gehören u.a. die Genorte ASNS, ACHE, EPO und PLANH1(JOHNSON et al. 1996, STEPHENSON et al. 1996, LAW et al. 1986).

Die Prognose für die Patienten mit diesen beschriebenen zytogenetischen Veränderungen ist unabhängig von der FAB-Gruppenzugehörigkeit extrem schlecht, so

dass sie einer „Hochrisikogruppe“ zugeordnet werden (JACOBS et al. 1986, PARLIER et al. 1994, YUNIS et al. 1988). Die Monosomie 7/del(7q) geht häufig mit Therapieresistenz und einer geringen Remissionsrate einher, sowie kurzer Überlebenszeit (s. Abb. 1.4) (BERNSTEIN et al. 1984, LE BEAU et al. 1986).

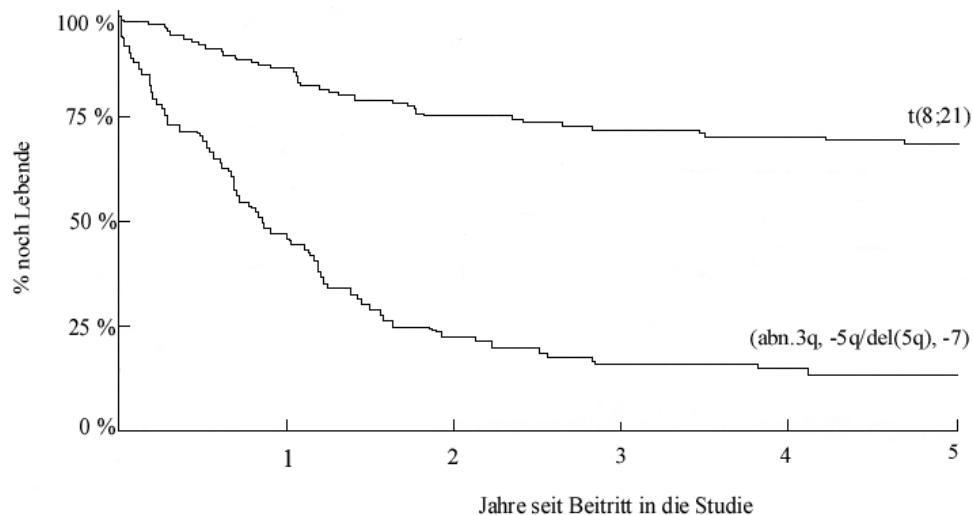
### 1.1.5.3 Monosomie 5/ del(5q)



Abbildung 1.3 Chromosomen mit Deletion 5q. G-Banden-Darstellung (CHARRIN 1998).

Das mittlere Auftretensalter der Deletion 5q liegt bei 66 Jahren, wobei nur 15% der Patienten jünger als 50 sind (DEWALD et al. 1985, VAN DEN BERGHE et al. 1985). Auch bei der Deletion 5q handelt es sich um eine interstitielle Deletion mit variierenden proximalen und distalen Bruchpunkten, die sich zwischen 5q11 und 5q35 befinden (BOULTWOOD et al. 1994, PEDERSEN & JENSEN 1991). del (5)(q13.3q33.1) wird dabei am häufigsten gefunden (PEDERSEN & JENSEN 1991). Man vermutet, dass die Deletion zum Verlust von einem oder mehreren Tumorsuppressor-Genen führt, bei denen es sich u.a. um EGR1, IRF1 und CSF1R handeln könnte (NAGARAJAN 1995, SALTMAN et al. 1993, WARRINGTON et al. 1992, WESTBROOK et al. 1992).

Auch diese Subgruppe der AML-Patienten hat mit einer mittleren Überlebenszeit von 11 Monaten eine sehr schlechte Prognose und gehört ebenfalls der Hochrisikogruppe an (PEDERSEN & JENSEN 1991).



**Abbildung 1.4 Vergleich der Kaplan-Meier-Überlebenskurven von Patienten unterschiedlicher zytogenetischer Risikogruppen.** Die Daten entstammen dem MRC AML 10 Trial, der Kinder und Erwachsene bis zum Alter von 55 Jahren beinhaltet. Anhand von 1612 Patienten wurde die Bedeutung der Zytogenetik für den Verlauf der Erkrankung analysiert. Es wird deutlich, dass die Patienten mit t(8;21) eine erheblich höhere 5-Jahres-Überlebensrate besitzen als Patienten der Hochrisikogruppe, zu der hier Monosomie 5 und 7, del(5q) und abnormales 3q zusammengefasst wurden (GRIMWADE 2001, GRIMWADE et al. 1998).

## 1.1.6 Klinik

Klinische Symptome lassen sich zum einen durch Verdrängung der normalen Hämatopoese und dem daraus resultierenden Mangel an funktionstüchtigen Leukozyten, Erythrocyten und Thrombocyten erklären. Durch die Anämie kommt es zu Blässe, Müdigkeit, Abgeschlagenheit, Dyspnoe. Die verringerte Anzahl an Granulozyten führt zu gehäuftem Auftreten von bakteriellen und viralen Infekten. Infolge einer Thrombozytopenie, disseminierter intravasaler Gerinnung und/oder reaktiver Hyperfibrinolyse können Nasenbluten oder Blutungen von Zahnfleisch und Gastro-Intestinal-Trakt auftreten, was insbesondere bei Promyelozyten-Leukämien (M3) der Fall ist (FAUCI et al. 1998).

Zum anderen kommt es durch die unkontrollierte Produktion von leukämischen Zellen und deren Abgabe ins Blut zur Induktion von Gerinnungsstörungen und mechanisch zu peripheren Organinfarkten durch Verstopfung kleinerer Blutgefäße.

Zusätzlich leiden die meisten der Erkrankten an unspezifischen Symptomen wie Müdigkeit und Gewichtsverlust, die nicht immer sofort zum Arztbesuch führen. So weisen die Hälfte der Erkrankten bereits 3 Monate oder länger Symptome auf, ehe die

Diagnose gestellt wird (FAUCI et al. 1998). Hinzu kommen als allgemeine Krankheitssymptome häufig Fieber, Nachtschweiß und Gewichtsabnahme (FAUCI et al. 1998).

Lymphknoten-, Leber- und Milzschwellungen und sternale Schmerzen können als weitere Symptome auftreten (FAUCI et al. 1998).

### 1.1.7 Laborbefunde und Diagnose

Nur bei ungefähr der Hälfte der Leukämiepatienten findet sich eine Leukozytose bei Diagnosestellung, in anderen Fällen kann sogar die Zytopenie wegweisend sein. Diagnostisch entscheidend ist der klinische Symptomenkomplex, das Differentialblutbild und eine obligatorisch vorzunehmende Knochenmarkszytologie und/ oder -biopsie (BAENKLER et al. 2001). Zur Diagnosestellung ist ein Blastenanteil von mindestens 30 % im peripheren Blut und/ oder Knochenmark erforderlich (FAUCI et al. 1998). 75 % der Patienten besitzen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung Thrombozytenzahlen unter 100000/ $\mu$ l (FAUCI et al. 1998). Oft bestehen auch eine Anämie, eine Granulozytopenie und ein Hiatus leucaemicus, bei dem sich zwar einige differenzierte Granulozyten neben den Blasten im Differentialblut finden, sämtliche Zwischenstufen jedoch fehlen (BAENKLER et al. 2001).

### 1.1.8 Prognostische Faktoren

Das therapeutische Ansprechen im Sinne des Erreichens einer Komplettremission sowie die Langzeitprognose selbst wird bei AML-Patienten von unterschiedlichen prognostischen Faktoren beeinflusst. Als ungünstig haben sich ein Alter über 60 Jahren, geringe Chemosensitivität der Blasten, hämatologische Vorerkrankungen, sekundäre AML, Multi-drug-resistance-Expression sowie der Nachweis von Monosomie 5 und 7-Karyotypen erwiesen (HEIL & GANSER 2002).

### 1.1.9 Therapie

Ziel der Therapie bei AML-Erkrankungen ist die Elimination der leukämischen Zellen sowie die Rekonstitution der normalen Hämatopoese, was in zwei Behandlungsabschnitten erreicht werden soll (HEIL & GANSER 2002). Die erste Phase, die Induktionstherapie, dient der raschen Reduktion des leukämischen Klons und soll zu einer „kompletten Remission“ (CR) führen (HEIL & GANSER 2002). Die Komplettremission wird bestimmt durch Untersuchung von peripherem Blut und Knochenmark und sollte mindestens 4 Wochen andauern (CHESON et al. 1990). Kriterien einer CR sind nach Heil und Ganser 2002:

- Mindestens 1500/ $\mu\text{l}$  neutrophile Granulocyten und 100000/ $\mu\text{l}$  Thrombocyten im peripheren Blut.
- Weniger als 5% Blasten bei einer Zellularität des Knochenmarks von mindestens 20%.

Im Anschluss erfolgt die Postremissionstherapie, die möglichst der Elimination von residuellen leukämischen Zellen dient, zumindest jedoch deren Proliferation verhindern soll und so zu einer Heilung bzw. Verlängerung der Remission führt (HEIL & GANSER 2002).

Es existieren bundesweit verschiedene multizentrische Therapie-Studien, nach deren aktualisierten Protokollen eine Behandlung der AML-Patienten erfolgt. Im folgenden wird beispielhaft das Behandlungsprotokoll dargestellt, nach dem die für die vorliegende Arbeit untersuchten Patienten therapiert wurden (STUDIENPROTOKOLL DER KOOPERATIVEN AML-STUDIE '96 DER SÜDDEUTSCHEN HÄMOBLASTOSEGRUPPE).

Alle Patienten erhalten zunächst eine erste Induktionstherapie mit MAV<sup>1</sup> und nach 28 Tagen eine zweite Induktionstherapie mit MAMAC<sup>2</sup>. Die sich anschließende Postremissionstherapie variiert, je nachdem welcher Risiko-Kategorie ein Patient zugeordnet wird, was nach prognostisch günstigen und ungünstigen Karyotyp-Veränderungen erfolgt.

---

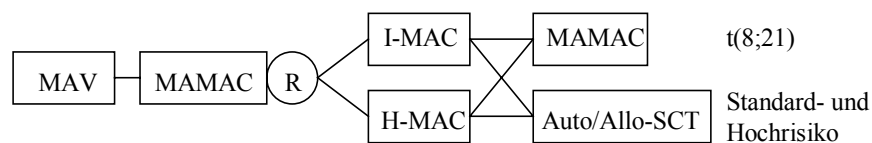
<sup>1</sup> MAV (Mitoxantron 10 mg/ m<sup>2</sup> KI i.v. Tag 4-8; Ara-C 100 mg/ m<sup>2</sup> 24h i.v. Tag 1-8; VP 16 100 mg/ m<sup>2</sup> KI i.v. Tag 4-8)

<sup>2</sup> MAMAC (Ara-C 2 x 1000 mg/ m<sup>2</sup> 2h i.v. Tag 1-5; m-AMSA 100 mg/ m<sup>2</sup> 1h i.v. Tag 1-5)



**Tabelle 1.2 Zytologische Zuordnung von AML-Patienten zu verschiedenen Risikogruppen.** Diese Einteilung von Patienten nach zytogenetischen Kriterien diente der prospektiven Multizenter-AML-Studie '96 der Süddeutschen Hämoblastosegruppe (SHG) als Grundlage für die jeweilige Therapie des einzelnen Patienten.

Niedrigrisiko	Standardrisiko	Hochrisiko
t(8;21)	alle ohne Niedrig- oder	5/ del (5q)
t(8;21) mit -X	Hochrisiko-Merkmale	7/ del (7q)
t(8;21) mit -Y		andere Monosomien
		inv(3q)
		abn. 12p
		abn. 11q
		11
		13
		21
		22
		t(6;9)
		t(9;22)
		t(3;3)
		multiple Aberrationen
		sek. therapiebedingte AML



**Abbildung 1.5** Die Therapie beginnt mit je einem Zyklus MAV und MAMAC. Nach Erreichen einer Remission (R) wird dann je nach Risikogruppe, der der Patient angehört, unterschiedlich weitertherapiert. SCT=Stammzelltransplantation (KOMPENTENZNETZWERK LEUKÄMIE 2004).

- Die Niedrigrisikogruppe erhält randomisiert zugeteilt entweder I-MAC<sup>3</sup> oder H-MAC<sup>4</sup> und einen Kurs MAMAC.
- Bei der Standardrisikogruppe erfolgt die Postremissionstherapie nach unterschiedlicher Priorität (P1-3). In der Studie wird vorzugsweise bei Patienten bis zum 55. Lebensjahr eine allogene Stammzelltransplantation durchgeführt (P1). Patienten bis zum 60. Lebensjahr erhalten randomisiert I-MAC bzw. H-MAC und eine autologe Stammzelltransplantation (P2). Besteht keine Möglichkeit der allogenen oder autologen Stammzelltransplantation, bekommen die Patienten randomisiert I-MAC/ H-MAC und anschließend MAMAC (P3).

<sup>3</sup> I-MAC (Ara-C 2 x 1000 mg/ m<sup>2</sup> 2h i.v. Tag 1-6; Mitoxantron 10 mg/ m<sup>2</sup> KI i.v. Tag 4 - 6)

<sup>4</sup> H-MAC (Ara-C 2 x 3000 mg/ m<sup>2</sup> 2h i.v. Tag 1-6; Mitoxantron 10 mg/ m<sup>2</sup> KI i.v. Tag 6)

- Die Patienten der Hochrisikogruppe erhalten eine Postremissionstherapie nach vier unterschiedlichen Prioritäten. Nach Möglichkeit erhalten die Patienten eine allogene Stammzelltransplantation (P1) in direktem Anschluss an die 1. Remission. Sofern die Verwandtenspende ausscheidet, hat eine allogene Fremdspendertransplantation nächst höhere Priorität (P2). Patienten bis zum 60. Lebensjahr ohne geeigneten Spender erhalten I-MAC/ H-MAC nach Randomisation mit anschließender autologer Stammzellproliferation (P3). Ist keine Möglichkeit einer allogenen oder autologen Stammzelltransplantation gegeben, so bekommen die Patienten eine dosisintensive Chemotherapie: randomisiert I-MAC oder H-MAC und nachfolgend einen Block nach dem MAMAC-Protokoll.

Patienten, die über 60 Jahre alt sind, erhalten nach Protokoll der SHG-Studiengruppe eine erste Induktionstherapie mit DA-I<sup>5</sup>, eine zweite Induktionstherapie mit DA II<sup>6</sup> und eine Postremissionstherapie, die individuell in Abhängigkeit vom klinischen Zustand ausgewählt wird.

## 1.2 DNA-Methylierung

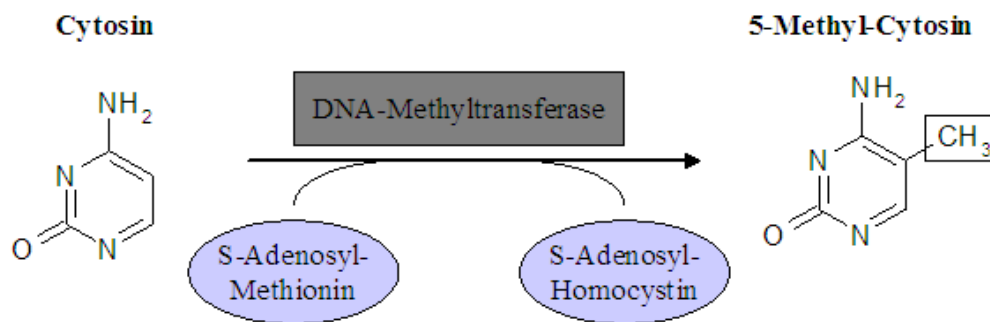
Bereits vor über 50 Jahren wurde von Hotchkiss und Wyatt die Existenz von methylierten Basen der DNA entdeckt. Man stellte bald fest, dass es sich um eine DNA-Modifikation handelte, die in nahezu allen Lebewesen, Eukaryonten wie Prokaryonten mit nur wenigen Ausnahmen, z.B. dem zu den Nematoden gehörenden Wurm *Caenorhabditis elegans* (BIRD 2002) auftrat.

---

<sup>5</sup> DA I (Daunorubicin 45 mg/ m<sup>2</sup> KI i.v. Tag 3-5; Ara-C 100 mg/ m<sup>2</sup> 24h i.v. Tag 1-7)

<sup>6</sup> DA II (Daunorubicin 45 mg/ m<sup>2</sup> KI i.v. Tag 3-4; Ara-C 100 mg/ m<sup>2</sup> 24h i.v. Tag 1-7)

### 1.2.1 DNA-Methyltransferasen



**Abbildung 1.6 Funktionsweise der DNA-Methyltransferase.** Unter Umwandlung eines S-Adenosyl-Methionin in ein S-Adenosyl-Homocystin erfolgt die Freisetzung einer Methylgruppe, die an ein Cytosin gebunden wird.

Die Methylgruppen werden mit Hilfe des Enzyms DNA-Methyltransferase, die S-Adenosyl-Methionin als  $-\text{CH}_3$ -Donor benutzt, auf die Cytosine übertragen. Bestor et al. entdeckten 1988 bei Mäusen das für das Enzym kodierende Gen, was daraufhin auch bei vielen anderen Organismen nachgewiesen werden konnten (ANIELLO et al. 1996, TAJIMA et al. 1995). Bei Säugetieren entsteht das Methylierungsmuster des Genoms durch das komplexe Zusammenspiel von mindestens drei Methyltransferasen, die unabhängig voneinander kodiert werden: DNMT1, DNMT3A und DNMT3B (ROBERTSON 2001).

Die DNMT1 hat eine besondere Affinität zu hemimethylierten DNA-Strängen, die in der S-Phase des Zellzyklus bei der semikonversativen Replikation auftreten (BESTOR et al. 1988, GRUENBAUM et al. 1982, YODER et al. 1996). Der parentale Strang besitzt weiterhin das ihm eigene Methylierungsmuster, während der neugebildete Tochterstrang vollständig unmethyliert vorliegt. Die DNMT1 erkennt die palindromartigen CG-Sequenzen und führt nur zur Methylierung eines Cytosins, wenn der Mutterstrang an jeweils komplementärer Stelle eine Methylgruppe trägt (BESTOR 1992, PRADHAN et al. 1999). Da man annimmt, dass dieses Enzym primär für die Aufrechterhaltung spezifischer Methylierungsmuster nach der Replikation verantwortlich ist, gibt man ihm häufig den Namen „Maintenance-Methyltransferase“ (ROBERTSON 2001).

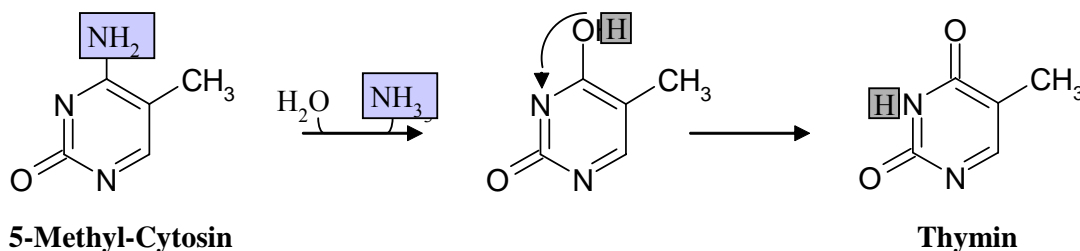
Knock-out Experimente der DNMT3s haben gezeigt, dass diese Enzyme für die embryonale *de-novo* (Re)-Methylierung verantwortlich sind (OKANO et al. 1999).

Sowohl diese Ergebnisse als auch *in vitro* gesammelte Daten legen die Vermutung nahe, dass DNMT3-Enzyme gleiche Präferenzen für hemimethylierte und unmethylierte DNA besitzen, was dazu geführt hat, dass diese als „*de novo*“ Methyltransferasen bezeichnet werden.

### 1.2.2 CpG-Dinukleotide

CpG ist eine Abkürzung für Cytosin-Phospho-Guanin, wobei der Term „Phospho“ wiederum für Phosphodiester steht, über die die vier Basen der DNA miteinander verbunden werden. Bei einer Anzahl von 16 möglichen Dinukleotidkombinationen (AA, AT, AC, ...) würde erwartet, jede einzelne dieser Kombinationen bei zufälliger Verteilung mit einem Anteil von ca. 6,25 % am menschlichen Genom ( $2,9 \times 10^9$  bp) zu finden. Im Laufe der Evolution hat sich dieser Anteil jedoch immer mehr verringert, so dass nur noch 5-10 % der erwarteten CpGs vorhanden sind (ANTEQUERA & BIRD 1993, BIRD 1995). Bei dieser Entwicklung scheint Methylierung eine wichtige Rolle gespielt zu haben.

Im Gegensatz zu Cytosinen sind 5-Methylcytosine relativ instabile Basen, da ihre spontane Desaminierung über Keto-Enol-Tautomerie zur Umwandlung in ein Thymin führt, dem sich bei der Replikation als komplementäre Base ein Adenin gegenüberlagert. Durch diese C-T-Transition kommt es zum Übergang einer CG-Basenpaarung in eine TA-Basenpaarung und damit zu einer Punktmutation und einem Cytosin-Verlust (s. Abb. 1.7) (LÖFFLER & PETRIDES 1998a).



**Abbildung 1.7 C zu T Transition.** Im ersten Reaktionsschritt wird die Desaminierung (Verlust einer NH<sub>2</sub>-Gruppe) gezeigt, im zweiten die Keto-Enol-Tautomerie(LÖFFLER & PETRIDES 1998a).

Diese Formen von Mutationen sind eine der Hauptursachen von Keimzellmutationen bei Erbkrankheiten und von somatischen Mutationen bei Neoplasien (ZINGG & JONES 1997). Die CpG-Dinukleotide im menschlichen Genom sind zu 70-80 % methyliert (EHRlich et al. 1982).

Das Phänomen der CG-Verringerung findet sich im gesamten Genom mit Ausnahme bestimmter Regionen, die als CpG-Insel bezeichnet werden. Dabei handelt es sich um kleine Bereiche der DNA mit variierender Größe von 0,5 bis 4-5 kb, die durchschnittlich alle 100 kb auftreten und den erwarteten Gehalt an CpG-Sequenzen von 6,25 % oder mehr aufweisen (ANTEQUERA & BIRD 1993, BIRD 1986, BIRD 1992, BIRD 1995). Der Anteil an Cytosinen und Guaninen ist größer als 60 % (ANTEQUERA & BIRD 1993). Typischerweise liegen die CpG-Inseln in der 5'-Regulator-Region und im Exon 1-Bereich von Genen und stellen einen Anteil von 1-2% des Gesamtgenoms dar (BIRD et al. 1987, COLOT & ROSSIGNOL 1999).

Ca. 60 % der menschlichen Gene besitzen CpG-Inseln in ihren Promotor-Regionen (ANTEQUERA & BIRD 1993).

### **1.2.3 Molekulare Mechanismen der Inhibition der Genexpression durch Methylierung**

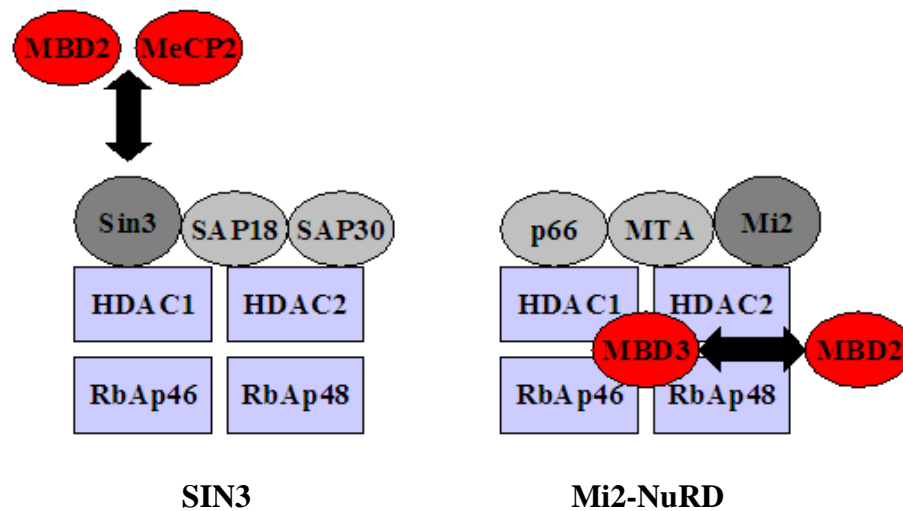
Der humane Organismus bringt seine 46 DNA-Moleküle (diploider Satz) mit ihren 6 mal  $10^9$  bp und einer Gesamtlänge von ungefähr 2m in Zellkernen unter, deren Durchmesser nicht mehr als 10  $\mu$ m beträgt (KOOLMAN & RÖHM 1998). Dazu ist eine gut organisierte, dichte Packung der DNA notwendig. Bei den dabei beteiligten Proteinen unterscheidet man Histone und Nichthistone. Je zwei Dimere der Histone aus H2A und H2B sowie H3 und H4 bilden ein Oktamer, um das die DNA in einer Länge von 146 bp eine linksgängige Superhelix mit 1,8 Windungen bildet (Nucleosom) (KOOLMAN & RÖHM 1998). Diese Nucleosomen wiederholen sich im Abstand von ca. 50-60bp und werden von dem Histon H1 „verschlossen“(LÖFFLER & PETRIDES 1998b). Diese Faser bildet unter Beteiligung von Nichthistonen mehrere Schleifen aus, von denen je 20 zu einer Bande organisiert werden, von denen mehrere schließlich ein Chromosom ergeben (KOOLMAN & RÖHM 1998, LÖFFLER & PETRIDES 1998b).

Die Arbeitsgruppe um Strahl postuliert einen „Histon-Code“, wobei Kombinationen von N-terminalen Modifikationen der Histone, wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung und ADP-Ribosylierung die Genexpression, DNA-Replikation und weitere Chromatin-abhängige Prozesse beeinflussen (STRAHL & ALLIS 2000). Zu diesen Histon-modifizierenden Enzymen gehören u.a. die Histonacetyltransferasen (HATs) und die Histondeacetylasen (HDACs). So führt z.B. die Acetylierung der Lysinreste der Histone H3 und H4 durch die HAT zur „Entpackung“ und damit erhöhter Transkription, während die Entfernung dieser Acetylgruppen durch die HDAC die Chromatinkonfiguration so verändert, dass die DNA für Transkriptionsfaktoren nicht mehr zugänglich ist (ROUNTREE et al. 2001).

Diese De- bzw. Acetylierung zählt man zu „epigenetischen“ Modifikationen der DNA, die bei allen Eukaryoten vorzukommen scheinen (GRUNDSTEIN 1997). Der zweite bekannte epigenetische Mechanismus, der an der Regulation der Genexpression beteiligt ist, ist die DNA-Methylierung. Wie bereits oben erwähnt führt die Methylierung von Regulatorregionen der DNA in vielen Fällen zur Repression der Transkription des entsprechenden Gens. DNA-Methylierung wirkt auf zwei unterschiedliche Arten repressiv. Zum einen scheint die Methylierung direkt die Bindung sogenannter „Methyl-sensitiver“ Transkriptionsfaktoren zu verhindern, zu denen zum Beispiel die Transkriptionsfaktoren AP2, cMyc/Myn, NK- $\kappa$ B, cMyb und ETS gehören (NAKAO 2001, TATE & BIRD 1993). Die meisten Transkriptionsfaktoren weisen aber keine CpG-Sequenz in ihrer Erkennungssequenz auf oder werden in ihrer Funktion durch Methylierung nicht beeinflusst, obwohl sie eine CpG-Sequenz enthalten (SZYF & DETICH 2001).

Der Großteil der Transkriptionshemmung scheint daher durch indirekte Mechanismen zu erfolgen, an denen viele weitere Faktoren beteiligt sind, deren Zusammenspiel letztendlich in einer Änderung der Chromatininformation endet.

Man nimmt an, dass Methyl-CpG-bindende-Proteine eine Interaktion zwischen DNA-Methylierung, Histon-Deacetylierung und verschiedenen Chromatinbestandteilen vermitteln. Mittlerweile sind fünf Mitglieder einer Proteinfamilie, die eine Methyl-Bindungsdomäne (MBD) besitzen und so methylierte Cytosine erkennen, entdeckt worden (CROSS et al. 1997, HENDRICH & BIRD 1998, LEWIS et al. 1992, MEEHAN et al. 1989). Dazu gehören die Proteine MBD1, MBD2, MBD3 und MeCP2. Die MBDs assoziieren mit Korepressoren wie Sin3A, die wiederum HDACs zu methylierten Genen rekrutieren (BOEKE et al. 2000, JONES et al. 1998, NAN et al. 1998, NG et al. 1999, NG et al. 2000).



**Abbildung 1.8 HDAC-Komplexe.** Welche Proteine oder Deacetylasen mit MBD1 assoziiert sind, ist bis heute ungeklärt (NG et al. 2000). Darüberhinaus wurde gezeigt, dass auch die DNMT1 mit HDAC1 und HDAC2 interagieren kann, wobei die Bedeutung dieser Interaktion allerdings noch nicht geklärt ist (FUKS et al. 2000, ROUNTREE et al.. 2000).

#### 1.2.4 Funktionen der DNA-Methylierung in normalen Zellen

Die Funktionen der DNA-Methylierung werden kontrovers diskutiert. Im folgenden sollen einige Thesen vorgestellt werden.

DNA-Methylierung ist beteiligt an der Genexpression. Zahlreiche Untersuchungen weisen auf eine inverse Korrelation zwischen Methylierung und Transkription hin (BIRD 1992, EDEN & CEDAR 1994).

Beim humanen  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Globin hängt die Transkriptionshinhibition mit der Dichte der Promotor-Methylierung und weniger mit der Methylierung bestimmter CpG-Positionen zusammen, was zum Beispiel bei dem Thymidin-Kinase-Promotor des Herpes-Simplex-Virus der Fall ist (BEN-HATTAR & JIRICNY 1988, BOYES & BIRD 1992).

Bereits in der Embryonalentwicklung scheint die DNA-Methylierung eine wichtige Rolle zu spielen (MONK 1990, MONK et al. 1987, RAZIN & SHEMER 1995). Zwischen dem 8-Zell-Stadium und Ausbildung der Blastozyste kommt es zum vollständigen Verschwinden aller zunächst bestehenden Methylierungen (BAYLIN et al. 1998). Im sich anschließenden Stadium der Gastrulation erfolgt eine *de-novo* Remethylierung (BAYLIN et al. 1998). Ein Großteil des späteren Methylierungsmusters wird in der späten

Embryogenese durch die *de-novo* Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B festgelegt (HSIEH 1999, OKANO et al. 1998, OKANO et al. 1999). Ferner ist daran auch eine gewebsspezifische Demethylierung beteiligt (SHEMER et al. 1990). Das Fehlen dieser Methylierung führt zu embryonaler Letalität (LI et al. 1992).

Die DNA-Methylierung ist ferner an der Inaktivierung des X-Chromosoms beteiligt. In einer frühen Phase der weiblichen Entwicklung kommt es in allen Körperzellen zur Inaktivierung eines der beiden X-Chromosomen (Lyon-Hypothese) (LYON 1961). Man nimmt an, dass dabei DNA-Methylierung und Histon H4-Azetylierung zur Stabilisierung und zur Verstärkung des inaktiven Zustands dienen (JEPPESEN & TURNER 1993).

Beim genomischen Imprinting spielt die DNA-Methylierung ebenfalls eine Rolle. Dabei handelt es sich um die differentielle Expression paternaler und maternaler Allele, die durch genetische Markierung bestimmt wird (BRANDEIS et al. 1993, EFSTRATIADIS 1994). Mittlerweile konnten ca. 40 Gene, die einem Imprinting unterliegen, identifiziert werden, wie zum Beispiel IGF II, von dem nur das paternale Allel transkribiert wird (PAULSEN & FERGUSON-SMITH 2001). Man vermutet, dass Methylierung entweder bei der Etablierung oder der Aufrechterhaltung des Imprinting beteiligt ist (ZINGG & JONES 1997).

Des Weiteren scheint DNA-Methylierung die homologe Rekombination zwischen repetitiven Elementen zu supprimieren (COLOT & ROSSIGNOL 1999). Versuche mit *Ascobulus immersus* ergaben, dass sich die Frequenz des meiotischen crossing-overs für eine bestimmte Region reduzierte, wenn beide parentale Chromosomen in der untersuchten Region methyliert vorlagen (MALOISEL & ROSSIGNOL 1998).

Nach diesen Ergebnissen stellt sich die Frage, ob auch die somatische Rekombination, die in ähnlichen Schritten wie die homologe Rekombination abzulaufen scheint, durch Methylierung beeinflusst wird. Diese Annahme unterstützen zum Beispiel die erhöhte Mutationsrate und die Art der Mutationen, die man in hypomethylierten, murinen embryonalen Stammzellen beobachtete (CHEN et al. 1998). DNA-Methylierung ermöglicht DNA-Reparaturenzymen eine Unterscheidung zwischen „Original“ und „Kopie“, so dass für sie erkennbar ist, welcher der beiden Stränge bei fehlerhaftem Baseneinbau korrigiert werden muss, da kurz nach der Replikation nur der Mutterstrang im Gegensatz zum Tochterstrang Methylgruppen besitzt (HARE & TAYLOR 1985).



### **1.2.5 DNA-Methylierung bei neoplastischen Zellen**

Krebs ist eine Erkrankung, die auf der Anhäufung und dem Zusammenspiel von genetischen und epigenetischen Veränderungen beruht (ROUNTREE et al. 2001). Unter dem Begriff epigenetisch versteht man vererbare Veränderungen der Genexpression, die ohne Veränderung der DNA-Sequenz auftreten (WOLFFE & MATZKE 1999). Vor über 15 Jahren wurde zum ersten Mal entdeckt, dass sich die Methylierungsmuster in Tumorzelllinien von normalen Zellen unterscheiden (FEINBERG et al. 1988, GOELZ et al. 1985). Man fand eine globale Hypomethylierung mit regionsspezifischen Hypermethylierungen und einer erhöhten DNMT-Aktivität in neoplastischen Zellen (BAYLIN et al. 1991, JONES 1996, LAIRD & JAENISCH 1994). In proliferierenden Zellen wird beispielsweise Hypomethylierung als auch eine erhöhte Methyltransferase-Aktivität gefunden (TOYOTA & ISSA 1999). *De novo* Methylierung von CpG-Inseln dagegen ist ein Tumor-spezifisches Ereignis, das nicht bei normaler Proliferation auftritt (SANTINI et al. 2001).

#### **1.2.5.1 Regionale Promotor-Hypermethylierung**

Der Veränderung, der bisher am meisten Beachtung geschenkt wird, ist die Promotor-Hypermethylierung von CpG-Inseln. Letztere geht mit einer Repression der Transkription einher (BAYLIN & HERMAN 2000). Nach dem *RBI*-Gen konnte die Promotor-Hypermethylierung und der damit assoziierte Transkriptionsstopp auch für eine Reihe von Tumorsuppressorgenen nachgewiesen werden (SAKAI et al. 1991). Auf diese Weise kann es zur Beeinträchtigung diverser zellulärer Mechanismen, wie Zellwachstum, Differenzierung, DNA-Reparatur, Zellzyklus, aber auch der Angiogenese und Invasivität kommen (bezüglich der molekularen Mechanismen s. 1.2.3) (SANTINI et al. 2001).

Hypermethylierung geht bei Neoplasien jedoch nicht immer mit reprimierter Transkription einher, da die betroffenen CpG-Inseln zum Beispiel nicht in der Promotorregion von Genen liegen oder Gene betroffen sind, die im erkrankten Gewebe normalerweise nicht exprimiert werden (AHUJA et al. 1998, BENDER et al. 1999).

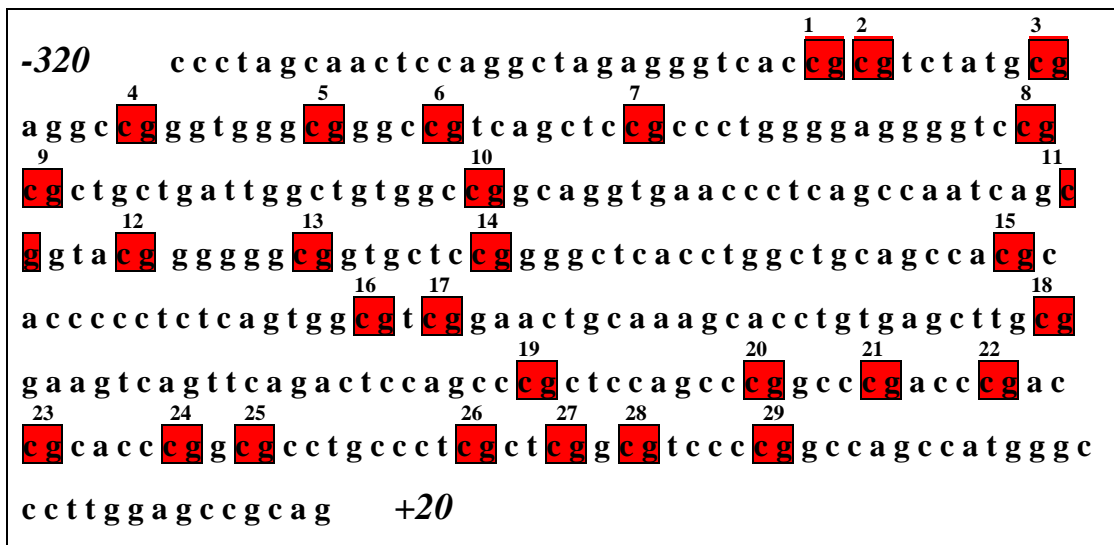
Neben den klassischen Tumorsuppressorgen finden sich zunehmend Gene mit hypermethylierten Regulatorregionen, deren Bedeutung für die Tumorigenese noch nicht geklärt ist (HERMAN 1999). So wurde eine CpG-Island Hypermethylierung bei bestimmten Neoplasien zunächst für das Calcitonin- und das *MyoD*-Gen beschrieben (BAYLIN et al. 1986, JONES et al. 1990). Eventuell spiegeln sie auch nur ein generell abnormales Methylierungsmuster von neoplastischen Zellen wider (ROUNTREE et al. 2001).

Verschiedene Studien haben Cluster von Methylierungen in Subgruppen von kolorektalen Tumoren gezeigt, die als CpG-Island-Methylierungsphänotyp aufgefasst werden (AHUJA et al. 1997, KUISMANEN et al. 1999, TOYOTA et al. 1999). Die Ursachen für diesen Methylierungsphänotyp sind zur Zeit noch ungeklärt. Die absolute Höhe der Mtase-Aktivität und der mRNA-Menge der drei wichtigsten Mtase-Gene (s.1.2.1) korrelieren nicht mit dem Ausmaß der CpG-Methylierung in primären kolorektalen Tumoren (AHUJA et al. 1997, EADS et al. 1999, TOYOTA et al. 1999). Die Intensität der Methylierung in einigen der Fälle lässt eine Aufhebung der Kontrollmechanismen für Methylierung annehmen (ISSA 2000).

Auch bei Leukämien wurden mittlerweile eine Reihe von Genen ermittelt, die hypermethyliert vorliegen, wie z.B. *p15*, *MDR1*, *ER*, *Calcitonin* (HERMAN et al. 1997, ISSA et al. 1996, NAKAYAMA et al. 1998, NELKIN et al. 1991). Auf Grund der Ergebnisse von Melki et al. 1999, die annehmen lassen, dass E-Cadherin und HIC-1 bei der Entstehung von AML Suppressorgenstatus haben, wurden diese beiden Gene zur Untersuchung der vorliegenden Fragestellung ausgewählt.

Bei E-Cadherin handelt es sich um ein integrales Membran-Glykoprotein, das der calciumabhängigen Zell-Zelladhäsion dient und an der Kontrolle von Zellwachstum und Differenzierung beteiligt ist (BATTLE et al. 2000, TYCKO 2000). Die kodierende Genregion befindet sich auf Chromosom 16 (16q22.1). Während der Entwicklung von Brust-, Kolon-, Prostata-, Magen-, Leber-, Ösophagus-, Haut-, Nieren- und Lungenkarzinomen kommt es zu einem Verlust der Expression des Gens (BIRCHMEIER & BEHRENS 1994, GRAFF et al. 1995). Man nimmt an, dass der Verlust von interzellulären Verbindungen Invasivität und Metastasierung des Tumors vorausgeht (KARAYIANNAKIS et al. 1998, OKA et al. 1993, SULZER et al. 1998, ZHENG et al. 1999). E-Cadherin wird aber nicht nur in epithelialen Geweben, sondern auch in Stroma- und mononukleären Zellen des Knochenmarks exprimiert (TUREL & RAO 1998). Es konnte gezeigt werden, dass CpG-Methylierung der Promotorregion die Expression des nachgeschalteten Gens beeinflusst

(GRAFF et al. 1997, YOSHIURA et al. 1995). E-Cadherin spielt eine Rolle während der normalen Erythropoese, wobei die Funktion während myeloischer und lymphoider Differenzierung allerdings noch ungeklärt ist (ARMEANU et al. 1995). Hypermethylierung des E-Cadherin-Promotors ist ein häufiges Ereignis in AML und ALL (CORN et al. 2000).

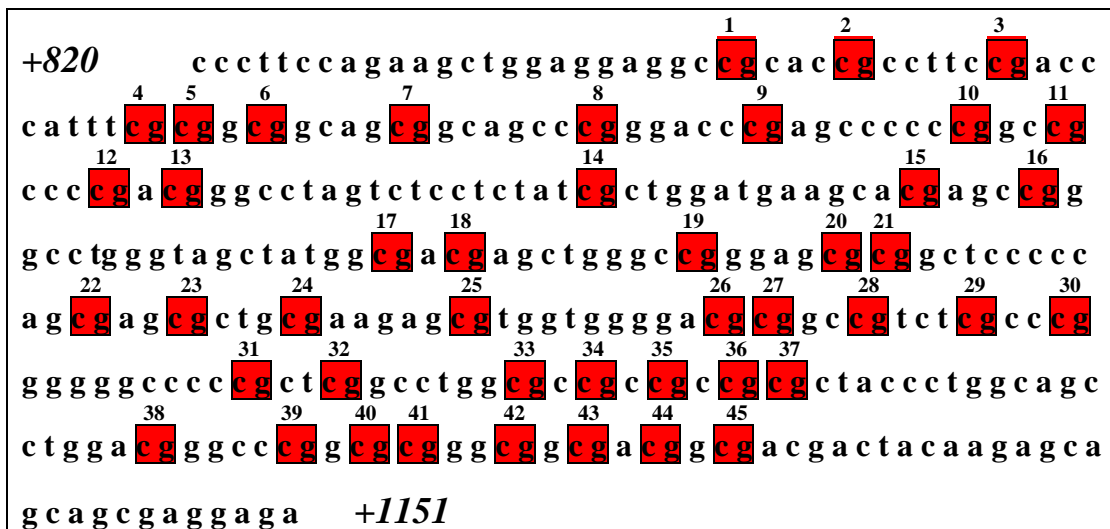


**Abbildung 1.9 E-Cadherin.** Der untersuchte Genabschnitt umfasst die CpG-reiche Promotorregion und Teile von Exon 1.

HIC ist die Abkürzung für „**H**yper**m**ethylated **I**n **C**ancer“ (WALES et al. 1995). Dieses Gen ist 4,6 kb groß, beinhaltet 3 Exons und kodiert zwei verschiedene Transkriptionsprodukte (GUERARDEL et al. 2001, WALES et al. 1995).

HIC-1 findet sich auf Chromosom 17 (17p13.3), distal von p53, durch dessen Produkt es positiv reguliert wird (GUERARDEL et al. 2001, WALES et al. 1995). HIC-1 ist vermutlich ein Tumorsuppressorgen, das Bestandteil einer in verschiedenen Tumor-Zelllinien hypermethylierten CpG-Insel ist (WALES et al. 1995). Damit liegt es in einer Region, die häufig in vielen verschiedenen Tumoren einer Deletion von einem der beiden Chromosomen 17 unterliegt (WALES et al. 1995). Es erwies sich als neues Mitglied einer Familie von Zink-Finger-Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle bei Entwicklungsprozessen spielen (FUJII et al. 1998, MAKOS et al. 1992, MAKOS et al. 1993, WALES et al. 1995). Bei verschiedenen Neoplasien, wie z.B. im Kolon, in der Brust, im Gehirn, der Prostata, im Magen aber auch bei Leukämien, wird HIC-1 hypermethyliert gefunden (FUJII et al. 1998, ISSA et al. 1997, KANAI et al. 1998, MAKOS et al. 1992). Expressionsanalysen von HIC-1 bei Lebertumoren und nicht-kleinzelligen Bronchialtumoren zeigten, dass bei hypermethylierter HIC-1-Genregion die mRNA-

Expression deutlich vermindert ist (HAYASHI et al. 2001, KANAI et al. 1999). Auch in Astrozytomen und Kulturen von Kolon-, Brust- und Bronchialtumoren wurde HIC-1 nicht oder geringer exprimiert als in normalen Geweben, wo es unmethyliert gefunden und ubiquitär transkribiert wird (WALES et al. 1995).



**Abbildung 1.10 HIC-1 cen.** Ungewöhnlicherweise liegt das vollständige HIC-1-Gen in einer CpG-reichen Region. Für die Analyse ausgewählt wurde der hier dargestellte zentrale Bereich, der Teile des Introns 2 und Exons 3 beinhaltet.

### 1.2.5.2 Allgemeine Hypomethylierung von DNA

Die Hypomethylierung betrifft vor allem repetitive DNA-Sequenzen. Über die Bedeutung gibt es mehrere Hypothesen. Zum einen könnte es zu einer Transkriptions-Induktion von unerwünschten, normalerweise nicht exprimierten Genen kommen (YODER et al. 1997). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass Hypomethylierung *in vitro* mit chromosomaler Instabilität einhergeht, was auch eventuell bei Neoplasien eine Rolle spielen könnte (CHEN et al. 1998). So sind sowohl numerische, als auch strukturelle chromosomale Aberrationen ein wesentlicher Bestandteil in der Leukämogenese (s. 1.1.5).

### 1.2.5.3 Erhöhte DNMT1-Aktivität

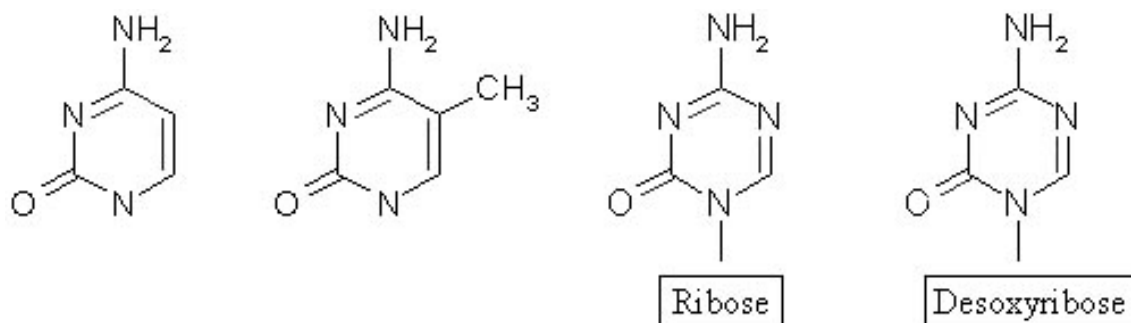
Vertino et al. konnten zeigen, dass eine induzierte Überexpression von DNMT1 in Gewebekultur-Zellen zu einer CpG-Island Hypermethylierung führt und in zellulärer Transformation endet (VERTINO et al. 1996). Der exakte Grad, wie hoch die

Überexpression der DNMT1 letztendlich in Tumoren ist, ist noch nicht bekannt. Man nimmt in den meisten Fällen eine „low-level“-Überexpression an, wobei es trotzdem schwer vorstellbar ist, wie es dadurch zu einer gleichzeitigen globalen Hypomethylierung kommen kann (ROBERTSON 2001). Auch sind eine Reihe von Tumoren bekannt, bei denen eine erhöhte Methyltransferase-Expression nicht nachweisbar ist (EADS et al. 1999, ROBERTSON et al. 1999).

### 1.2.6 Neue Therapieansätze für die Behandlung myeloischer Leukämien

Vorhandene Daten zeigen, dass bei verschiedenen Neoplasien ein unterschiedlicher Grad an *de novo* Methylierung auftritt (ISSA 1999). Auch akute und chronische Leukämien weisen einen hohen Grad an Methylierung von CpG-Inseln auf, wovon verschiedenste Gene, die bei der Leukämogenese eine wichtige Rolle spielen, betroffen sind (SANTINI et al. 2001). Daher eröffnen sich neue therapeutische Möglichkeiten bei diesen Krankheitsbildern.

Ein erstes Beispiel ist der Einsatz von Decitabin, einer Substanz, die als Cytidin-Analogon eine Modifikation in Position 5 des Pyrimidin-Rings besitzt.



**Abbildung 1.11 Strukturformeln.** Abgebildet sind zunächst Cytosin und 5-Methyl-Cytosin. Zu den eingesetzten Substanzen gehören 5-Azacytidin, 5-Aza-2'-Desoxycytidin (Decitabin), an 3. und 4. Stelle folgend und Pseudo-Cytidin und 5'-Fluoro-2'-Desoxycytidin (hier nicht dargestellt) (SANTINI et al. 2001).

*In vitro* konnte mit Hilfe von diesen Substanzen eine Reaktivierung der Expression von Genen bewirkt werden, die entweder physiologisch oder pathologisch in ihrer Transkription inhibiert vorlagen (BENDER et al. 1998a). Darüberhinaus konnte nachgewiesen werden, dass 5-Desoxyazacytidin signifikant die Verdopplungszeit von

neoplastischen Zellen verringert, jedoch keinen Einfluß auf normale Fibroblastenzelllinien besitzt (BENDER et al. 1998b).

Verschiedene Tierversuche mit demethylierenden Substanzen ergaben, dass das Auftreten von Neoplasien verhindert bzw. rückgängig gemacht werden konnte (LAIRD et al. 1995, LANTRY et al. 1999). Klinische Studien von Patienten mit AML ergaben Komplett- bzw. Partialremissionsraten von 20 und 16 %, wobei die Dosis des verabreichten 5-Azacytidin weniger entscheidend war als die Länge der Infusionsdauer (VON HOFF et al. 1976). Decitabin Gabe in refraktärer und rezidivierender akuter Leukämie führten zu Ansprechraten zwischen 33 und 89% (RIVARD et al. 1981, MOMPALER et al. 1985). Hypomethylierende Agenzien erscheinen daher ein Erfolg versprechendes Forschungsgebiet in der Behandlung von Neoplasien zu sein.

### 1.3 Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob sich bestimmte prognostisch divergente AML-Subgruppen bezüglich der Methylierungsfrequenzen oder des Methylierungsphänotyps unterscheiden.

Dazu wurden zwei nach gängiger klinischer Praxis eingeteilte zytogenetische Subgruppen ausgewählt: sieben Patienten mit t(8;21), die der Niedrigrisikogruppe zugeteilt werden und acht Patienten mit Monosomie 5 bzw. 7 oder del(5q) bzw. del(7q), die eine schlechtere Prognose besitzen und der Hochrisikogruppe angehören.

Die Untersuchung soll bei Beantwortung der Frage helfen, ob eine unterschiedliche Methylierungsfrequenz in der molekularen Pathogenese und Klinik der AML eine Rolle spielt und für bestimmte Risikogruppen typisch sein könnte. Dies könnte dann weiterführend die Basis zur Entwicklung neuer Therapieansätze darstellen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

#### **2.1.1 Chemikalien**

Ampicillin	Sigma, USA
APS	Sigma, USA
Borsäure	Merck, Deutschland
BSA	Sigma, USA
DMF	Sigma, USA
EDTA	Sigma, USA
Ethanol	Riedel-de-Haen, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Deutschland
Ficoll	Pharmacia, Schweden
Formamid	Amresco, USA
Hydrochinon	Sigma, USA
IPTG	Sigma, USA
LiChrosolvR (HPLC gereinigtes H <sub>2</sub> O)	Merck, Deutschland
Natriumbisulfit	Sigma, USA
Natriumchlorid	Merck, Deutschland
PAA	Sigma, USA
Iso-Propanol	Riedel-de-Haen, Deutschland
Sephadex G-50	Pharmacia, Schweden
TEMED	Sigma, USA
Tris	Roth, Deutschland
Trypton	Sigma, Deutschland
Urea	Sigma, USA
X-Gal	Sigma, USA
Yeast-Extrakt	Sigma, Deutschland

### 2.1.2 Lösungen, (Fertig-)Puffer und Medien

Gelladepuffer für Agarosegele	0,25% Bromphenol Blau 40% Sucrose in H <sub>2</sub> O
Gelladepuffer für Sequenziergele	25mM EDTA pH 8,0 Blue Dextran (50mg/ml) Formamid
LB-Medium	1% Trypton 0,5% Natriumchlorid 0,5% Yeast-Extrakt 3M Natriumacetat pH 7,0 10N NaOH
5x TBE	5mM Tris pH 8,5 445mM Borsäure 10mM EDTA
TE	10mM Tris/HCl pH 7,6 1mM EDTA
10x Inkubationspuffer H (Fermentas)	Zusammensetzung gemäß Herstellerangaben
1x PBS (Biochrom)	Zusammensetzung gemäß Herstellerangaben
PCR-Buffer 10x (Qiagen)	Zusammensetzung gemäß Herstellerangaben
SOC-Medium (Invitrogen)	Zusammensetzung gemäß Herstellerangaben
10x Lyse-Puffer	8,02g Ammoniumchlorid 1g Kaliumhydrogencarbonat 0,037g EDTA auf 100ml



### **2.1.3 Enzyme und Nukleinsäuren**

EcoR I	MBI-Fermentas, Deutschland
Proteinase K	Qiagen, Deutschland
Taq DNA Polymerase	Qiagen, Deutschland
ABI Prism RR-Kit	PE Applied Biosystems, USA
DNA-Längenstandards:	
pUC8 Mix Marker	MBI-Fermentas, Deutschland
100bp DNA-Leiter	Gibco BRL, Großbritannien
Lambda DNA/ <i>Hind</i> III Marker	MBI-Fermentas, Deutschland
Desoxynukleotide:	Pharmacia, Schweden
DNA-Polymerisationsmix (je 20 mM)	
Poly(dAdT)-Poly(dAdT) Copolymeren	Pharmacia, Schweden

### **2.1.4 Kitsysteme**

Nur die jeweils den entsprechenden Kit produzierende Firma kennt die Mengen der Stoffe, aus denen die einzelnen Lösungen zusammengesetzt sind.

QIAamp R DNA Mini Kit <sup>TM</sup>	Qiagen, Deutschland
QIAprep Spin Miniprep Kit <sup>TM</sup>	Qiagen, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit <sup>TM</sup>	Qiagen, Deutschland
TOPO TA Cloning Kit <sup>TM</sup>	Invitrogen, USA
Wizard DNA Clean-Up System <sup>TM</sup>	Promega, USA

### **2.1.5 Geräte**

Die folgende Auflistung beinhaltet lediglich die Geräte, die zusätzlich zu den Standardgeräten eines molekularbiologischen Labors benutzt wurden:

automatischer Sequenzierer	Applied Biosystems, USA
----------------------------	-------------------------

ABI 310	
ABI 377XL	
Gene Amp PCR System 2700 und 9700	Applied Biosystems, USA
Schüttelinkubator Innova 4000	New Brunswick Scientific, USA
Vac-Man Laboratory Manifold	Promega, USA
Vakuumpkonzentrator Savant	Bachhofer, Deutschland

### 2.1.6 Oligonukleotide

Die eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert:

Tabelle 2.1

Primer	Sequenz 5' → 3'
E-Cadherin_out1	ATT TAG TGG AAT TAG AAT AGT GTA GGT TTT
E-Cadherin_out2	CTA CAA CTC CAA AAA CCC ATA ACT AAC
E-Cadherin_in1M13	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TTA GTA ATT TTA GGT TAG
E-Cadherin_in2	CTA CAA CTC CAA AAA CCC ATA ACT AAC
Hic-1 cen_out1	TTT TTT GTG GTT TGG ATT TGT TTA AGA AG
Hic-1 cen_out2	CAA CTA CTC AAA ACT AAA AAA ACC CTT AC
Hic-1 cen_in1M13	TGT AAA ACG ACG GCC AGT TTT TTT AGA AGT TGG AGG
Hic-1 cen_in2	ATC TCC TCA CTA CTA CTC TTA TAA TCA
T7	AAT ACG ACT CAC TAT AG
(-21) M13	TGT AAA ACG ACG GCC AGT

### 2.1.7 Proben

Untersucht wurde Knochenmark von acht gesunden Probanden und 15 Leukämiepatienten. Die DNA wurde nach identischem Protokoll präpariert (siehe 2.2.1).

### 2.1.7.1 Kontrollgruppe

Die verwendeten DNA-Proben stammen von Patienten der Abteilung für Orthopädie des Klinikums der Philipps-Universität Marburg und wurden in der Zeit zwischen Februar und Juli 2000 gewonnen. Die Patienten unterzogen sich einer Hüft-Totalendoprothesen-Operation, bei der, um Raum für die Verankerung der Gelenkprothese zu schaffen, der Femurschaftknochen und das darin enthaltene Knochenmark ausgefräht werden mussten. Ein Teil dieses Materials wurde zur Befestigung der Prothese wieder eingepflanzt, ein anderer Teil jedoch verworfen. Die Nutzung dieses Überschussmaterials wurde von der örtlichen Ethikkommission als ethisch unbedenklich eingeschätzt.

Die Patienten wurden zufällig ausgewählt, sie sollten lediglich nicht an einem benignen oder malignen Tumor erkrankt sein. Es handelt sich um sechs Frauen und zwei Männer im Alter von 55 bis 87 Jahren. Die DNA wurde aus Knochenmark der Spongiosa extrahiert, das während der Operation keilförmig entnommen wurde.

### 2.1.7.2 AML-Patienten

Das Probenmaterial stammt aus zehn verschiedenen Kliniken Deutschlands, die sich an einer prospektiven Multizenter-AML-Studie '96 der Süddeutschen Hämoblastosegruppe (SHG) mit dem Ziel der Entwicklung einer verbesserten Postremissionstherapie der AML bei Erwachsenen beteiligen (STUDIENPROTOKOLL DER KOOPERATIVEN AML-STUDIE '96 DER SÜDDEUTSCHEN HÄMOBLASTOSEGRUPPE). Nach AML-Diagnosestellung in einem der beteiligten Häuser wurde aus der Knochenmarksbiopsie, die routinemäßig im Rahmen der Diagnostik durchgeführt wird, mit Einwilligung der Patienten DNA und RNA gewonnen und zur Erstellung einer Datenbank der Medizinischen Klinik und Poliklinik I des Universitätsklinikums Carl Gustav Carus der Technischen Universität Dresden zugesandt. Die Knochenmarkbiopsien wurden zwischen Oktober 1996 und April 2000 aufgearbeitet. Die 15 Leukämiepatienten lassen sich in zwei große Subgruppen unterteilen, die eine prognostische Relevanz haben (s. 1.1.5) :

- a) Sieben Patienten, in deren Zytologie eine Translokation (8;21) nachgewiesen werden konnte

- b) Acht AML-Erkrankte mit einer Monosomie 7 (3), Monosomie 5 und 7 (1), Deletion 7q (2) und Deletion 5q (2)

Bei allen Proben stammt die gewonnene DNA von Knochenmark, das bei Erstdiagnosestellung entnommen wurde, d.h. ehe die Patienten sich jeglicher Therapie unterzogen. Der Blastenanteil im Knochenmark lag zwischen 30% und 84%. Es handelt sich um sieben weibliche und acht männliche Patienten im Alter von 26 bis 70 Jahren, deren Therapie nach Studienprotokoll durchgeführt wurde.

### 2.1.8 Bakterienstämme

Bei den eingesetzten „One Shot™ Cells“ der Firma Invitrogen handelt es sich um den kompetenten E. coli Stamm TOP10F'. Dieser Stamm besitzt folgenden Genotyp:

$F' \{lacI^q \text{ Tn10 (Tet}^R)\} mcrA \Delta(mrr- hsdRMS-mcrBC) \Phi80lacZ\Delta M15 \Delta lacX74$   
 $recA1deoR araD139 \Delta(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str^R) endA1 nupG$

### 2.1.9 Analyse

Die Auswertung der Daten erfolgte mit Hilfe folgender Programme:

Data Collection Software	PE Applied Biosystems, USA
ABI Prism <sup>R</sup> DNA Sequencing Analysis 3.3	PE Applied Biosystems, USA
Genedoc	Free Software Foundation, USA
StatXact 5	Cytel Software Cooperation, USA

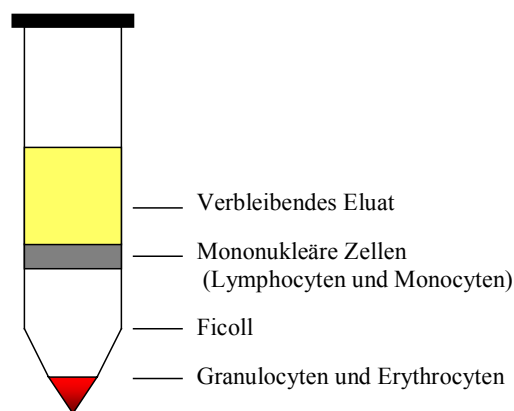
## 2.2 Methoden

Die Reihenfolge der Auflistung der angewandten Methoden entspricht der Abfolge der Arbeitsschritte

### 2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus Knochenmark

#### 2.2.1.1 Aufarbeitung einer Spongiosaprobe

Das Spongiosastück wurde mit einem Skalpell zerkleinert und zusammen mit 50ml PBS auf Eis für eine Stunde geschüttelt, um die sich zwischen den Spongiosabälkchen befindlichen Knochenmarkszellen herauszuschwämmen. Das erhaltene Gemisch wurde dann mittels eines 40µm-Nylon-Filters (Becton Dickinson Labware, USA) von den Knochen- und Fettgeweberesten befreit. 20ml des erhaltenen Eluats wurden auf 17ml Ficoll in einem 50ml-Falcon-Röhrchens geschichtet und für 30 Minuten bei 1500rpm zentrifugiert. Erythrocyten und polymorphkernige Granulozyten besitzen eine größere, mononukleäre Zellen (Lymphocyten und einige Monocyten) verfügen über eine kleinere Dichte als das Ficoll, so dass durch die Zentrifugation eine Aufteilung der verschiedenen Zellpopulationen erfolgt.



**Abbildung 2.1 Separierung von Knochenmarkszellen mit Hilfe eines Ficoll-Gradienten.** Bei Zentrifugation von aus Knochenmark isolierten Zellen reichern sich die mononukleären Zellen auf Grund ihrer relativ geringen Dichte auf dem Ficoll an.

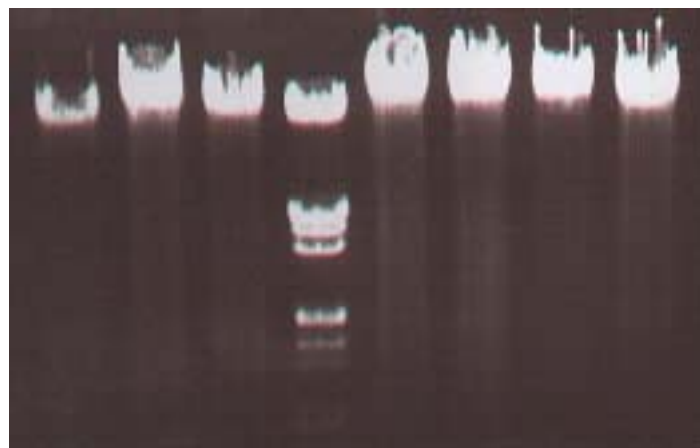
Die Phase der mononukleären Zellen konnte von der Grenzschicht per Pipette abgenommen (ca.12-15ml), erneut zentrifugiert (1500rpm, fünf Minuten) und der Überstand verworfen werden. Sofern Erythrocyten im erhaltenen Zellpellet vorhanden sein sollten, wurde 1x Lysepuffer hinzugegeben, erneut zentrifugiert und die flüssige Phase entfernt. Mit 10ml PBS und wiederholter Zentrifugation wurde der Lyse-Puffer anschließend herausgewaschen und das Pellet in 200µl PBS resuspendiert.

### 2.2.1.2 Extraktion genomischer DNA aus Leukozyten

Die Präparation erfolgte mit QIAamp DNA-Mini-Kit der Firma Qiagen nach Protokoll des Herstellers:

Zu der unter 2.2.1.1 erhaltenen Resuspensionslösung wurden 20µl Proteinase K (20mg/ml) zur Proteindegradation und 200 µl AL-Puffer zum Zellaufschluss (alkalische Lyse) gegeben und mittels Vortexer gründlich gemischt. Nach einer Inkubationszeit von zehn Minuten bei 56°C wurde die Probe auf eine Silica-Säule übertragen und eine Minute bei 6000g zentrifugiert. In Gegenwart der hohen Salzkonzentration, die durch den AL-Puffer geschaffen wurde, konnte die DNA an die Membran der Säule gebunden werden, während Proteine und andere Verunreinigungen die Säule passierten. Es wurden zwei Waschschrte zur Entfernung der Salze angeschlossen (500µl AW1-Puffer, 6000g, 1 Minute; 500µl AW2-Puffer, 20000g, 3 Minuten) und die DNA mit 150µl H<sub>2</sub>O durch ein niedrigkonzentriertes Salzmilieu und einen entsprechenden pH-Wert aus der Säule eluiert.

Zur Überprüfung der Qualität der isolierten DNA wurden 3µl des Eluats mit 8µl Gelladepuffer auf ein 0,5%-Agarose-Gel aufgetragen.



**Abbildung 2.2 Extrahierte DNA aus mononukleären Zellen.** Aufgetragen mit Lambda DNA/*Hind* III Marker, dessen größtes Fragment 23130bp groß ist.

### 2.2.2 Gel-Elektrophorese

Zur Beurteilung von Größe und Reinheit der aus mononukleären Zellen extrahierten DNA als auch von PCR-Produkten und zur Kontrolle der Transformation bzw. Plasmidextraktion wurde eine horizontale Gelelektrophorese gewählt. Als Matrix dienten 0,5 - 2%-ige Agarosegele. Eine jeweilige Menge Agarose wurde mit 1x TBE-Puffer in der Mikrowelle erhitzt und so geschmolzen. Nach Abkühlung auf ca. 50°C wurde Ethidiumbromid in einer Konzentration von 1,4µg/ml hinzugegeben und das Gel in einen Schlitten gegossen. Die DNA wurde mit DNA-Gelladepuffer vermischt und auf das polymerisierte Gel aufgetragen und zwischen 30 und 60 Minuten bei 80-100V aufgetrennt. Als Größenstandards wurden eine 100bp-Leiter, ein pUC8-Marker und ein Lambda DNA/*Hind* III Marker eingesetzt. Mit einem UV-Transluminator (302nm) wurden die DNA-Banden im Ethidiumbromid gefärbten Gel sichtbar gemacht. Per Photodokumentationssystem (Gel print 1000i, Biophotonics® Corporation) konnten die Gele dokumentiert werden.

### 2.2.3 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Konzentration wurde mittels optischer Dichte (OD) bestimmt. Dazu wurden zunächst zwei Verdünnungen der zu untersuchenden Probe (1:70 und 1:35) hergestellt. Es schlossen sich zwei Messungen im Photometer an, wobei bei 260nm die DNA-Konzentrationsbestimmung der Probe durchgeführt und bei 280nm die Proteinkonzentration gemessen wurde. Das Verhältnis von OD<sub>260</sub> zu OD<sub>280</sub> erlaubt eine Aussage über die Reinheit der Probe (Soll: 1,8–2,0). Dieser Wert fällt deutlich geringer aus, wenn eine Verunreinigung vorliegt, zum Beispiel durch Proteine. In diesem Fall ist keine zuverlässige Konzentrationsbestimmung möglich.

### 2.2.4 Umwandlung von DNA mit Hilfe von Natriumbisulfit

Die Natriumbisulfit-Behandlung dient der Umwandlung von nicht methylierten Cytosinen in Uracil, während methylierte Cytosine von der Methylgruppe vor dem „Angriff“ des Natriumbisulfits geschützt bleiben, d.h. sich nicht verändern. Mit Hilfe

dieser Technik können so indirekt methylierte Cytosine der zu untersuchenden DNA nachgewiesen werden. Diese Umwandlung erfolgt in drei Schritten:

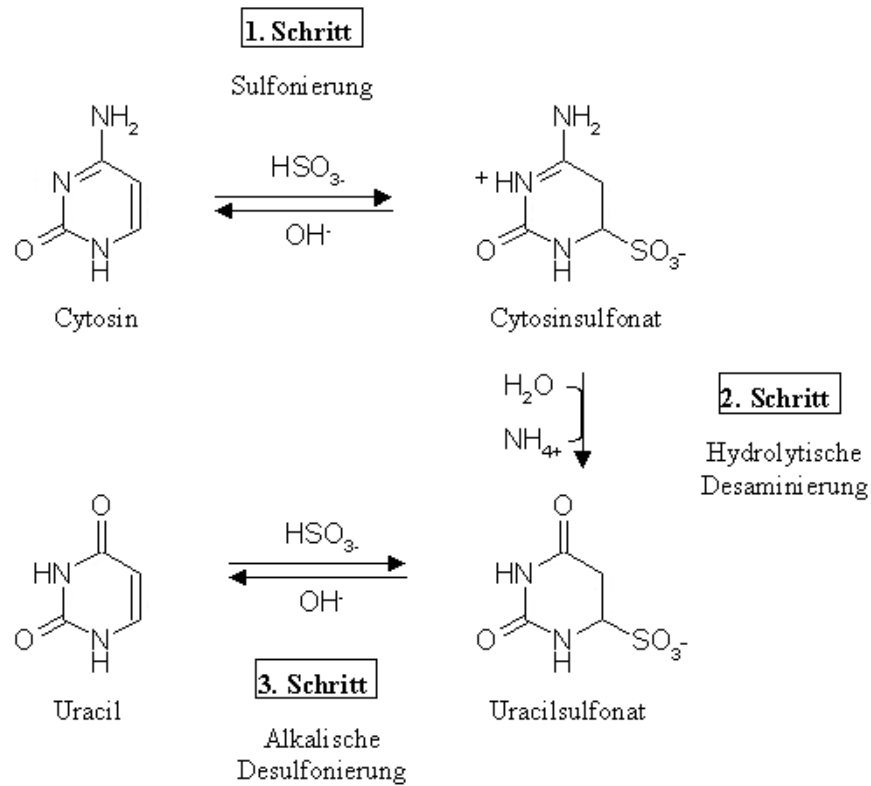


Abbildung 2.3 Umwandlung eines Cytosin- in ein Uracil-Molekül durch Natriumbisulfit (CLARK et al.1994).

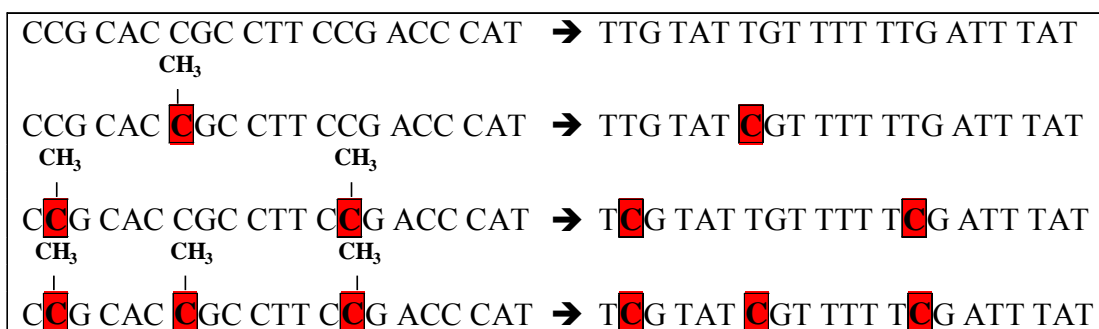


Abbildung 2.4 Schematische Darstellung von DNA-Strängen vor und nach Natriumbisulfitbehandlung. Die Methyl-Cytosine (rot unterlegt) bleiben vor dem „Angriff“ des Natriumbisulfits geschützt. Alle anderen Cytosine werden in Uracile bzw. nach Replikation durch die nested-PCR in Thyminen, wie hier dargestellt, umgewandelt.

Nach der Bisulfitbehandlung wurden den 15 Proben der AML-Patienten zufällig Zahlen von 1 bis 15 zugewiesen, so dass nicht mehr erkennbar war, ob es sich um die Probe eines Hoch- oder eines Niedrigrisikopatienten handelte.



Durch anschließende Sequenzierung konnte der genaue Methylierungsstatus des zu untersuchenden DNA-Abschnittes bestimmt werden. Ca. 1µg der extrahierten DNA wurde mit 1µg Poly(dAdT)-Poly(dAdT) Copolymeren vermischt. Nach Zugabe von 1M NaOH wurde dieses Gemisch in einem Volumen von 50µl (Endkonzentration 0,2M) für 15 Minuten bei 37°C denaturiert. 30µl 10mM Hydrochinon und 520µl 3M Natriumbisulfit pH 5,0 wurden hinzugefügt, vermischt und mit einigen Tropfen Mineralöl überschichtet, um eine Verdunstung zu vermeiden. Anschließend wurde für 16 Stunden bei 55°C inkubiert.

Mittels Wizard DNA Clean-Up<sup>TM</sup> System wurde die flüssige Phase aufgereinigt: 1ml des Reinigungsharzes wurde mit 570µl des Inkubationsansatzes gründlich vermischt und mit Hilfe einer Vakuumpumpe durch die Aufreinigungssäulen gesogen. Danach wurden die Säulen mit 80%-igem Isopropanol gewaschen und durch Zentrifugation für 2 Minuten bei 5000rpm vom restlichen Isopropanol befreit. Mit auf 80°C erhitztem TE (pH 7,6) wurde in 2 Schritten eluiert (50µl TE, 15 Minuten Inkubationszeit, 30µl TE, 1 Minute Inkubationszeit mit jeweils anschließender Zentrifugation bei 9000rpm für 20 Sekunden).

Die gereinigte DNA wurde dann, um eine vollständige Desulfonierung sicherzustellen, mit 1M NaOH (0,3N Endkonzentration) für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, und mit 1/10 Volumen 3M Natriumacetat pH 7,0 und 2,5 Volumen Ethanol (absolut) bei -20°C präzipitiert.

Nach dem Waschen mit 70%-igem Ethanol konnte die aufgereinigte DNA in 40µl Aqua dest. resuspendiert und bei -20°C gelagert werden.

### 2.2.5 Nested bzw. semi-nested PCR

Zur Amplifikation eines ausgewählten DNA-Bereiches wurde die Polymerase-Kettenreaktion (**polymerase-chain-reaction** = PCR) eingesetzt, die von K. Mullis entwickelt und von Saiki et al. 1986 das erste Mal beschrieben wurde.

Angewandt wurde ein semi-nested- (E-Cadherin) und ein nested-PCR-Verfahren (HIC-1) mit einem 25µl Reaktionsvolumen. Diese PCR-Modulationen erhöhen die Spezifität der Gewinnung des gewünschten Produktes dadurch, dass fast alle unspezifischen Produkte unbeachtet bleiben. Zunächst wurde eine PCR mit Primern, die beiderseits

außerhalb des gewünschten Produktes liegen, durchgeführt. Erst in einer zweiten PCR wurden die Primer eingesetzt, die die Zielsequenz begrenzen. Als Template wurden die verdünnten Amplifikate der ersten PCR benutzt. Die unspezifischen Produkte verfügten über keine zu den inneren Primern komplementären Sequenzen, d.h. sie konnten nicht als Matrize benutzt werden, was zur vorrangigen Amplifikation der Zielsequenz führte. Dieses Verfahren eignet sich insbesondere bei der geplanten Sequenzierung von PCR-Produkten, da man störende Überlagerungen durch unspezifische Produkte vermeidet.

Die verwendeten Primer verfügen über eine sogenannte „Bispezifität“, d.h. sie vervielfältigen sowohl unmethylierte als auch methylierte DNA. Die jeweils inneren Vorwärtsprimer enthielten zusätzlich zur Sequenz, mit der die spezifische Hybridisierung stattfinden sollte, die Sequenz des (-21) M13-Standard-Primers.

In der ersten (äußeren) PCR wurde 5µl der Bisulfit-behandelten DNA mit 200µM dNTPs, 0,4µM jedes Primers (out1 und out2), einfach PCR-Puffer und 0,65U Taq Polymerase vermischt. Die Reaktionen im Thermocycler für beide zu untersuchenden Gene umfassten eine initiale Denaturierung bei 96°C für 3 Minuten, eine finale Elongation bei 72°C für 4 Minuten und 30 Zyklen mit jeweils drei Phasen (Denaturierung, spezifische Hybridisierung und Synthesephase) mit folgenden Temperatur-Bedingungen:

**Tabelle 2.2 Cycle-Bedingungen für die äußere PCR.**

<b>HIC-1</b>			<b>E-Cadherin</b>	
95°C	1 min.	(Denaturierung)	95°C	1 min.
50°C	2 min.	(Hybridisierung)	58°C	2 min.
72°C	3 min.	(Synthese)	72°C	3 min.

Bei der zweiten (inneren) PCR wurden 2µl des 1:50 verdünnten Produktes der ersten (äußeren) PCR zu 200µM dNTPs, 0,4µM jedes Primers (in1M13 und in2), 1fach PCR-Puffer (Qiagen) und 0,65U Taq Polymerase gegeben. Es wurde eine initiale Denaturierung wiederum bei 96°C für drei Minuten und eine finale Elongation bei 72°C für 10 Minuten durchgeführt. Ansonsten wurden die Thermocycler-Bedingungen folgendermaßen gewählt:

Tabelle 2.3 Cycle-Bedingungen für die innere PCR.

HIC-1			E-Cadherin	
95°C	1 min.	(Denaturierung)	95°C	1 min.
52°C	40 sec.	(Hybridisierung)	61°C	40 sec.
72°C	1 min.	(Synthese)	72°C	1 min.

Nach Beendigung der Amplifikation wurden 8µl des nach der 2.PCR erhaltenen Produktes gemeinsam mit 3µl Gelladepuffer auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen.

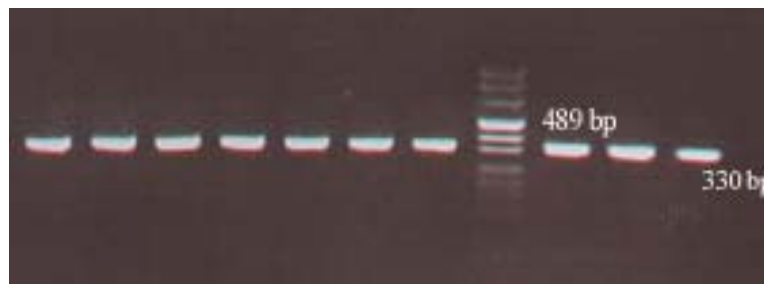


Abbildung 2.5 330bp große E-Cadherin-PCR-Produkte mit pUC-Marker als Längenstandard.

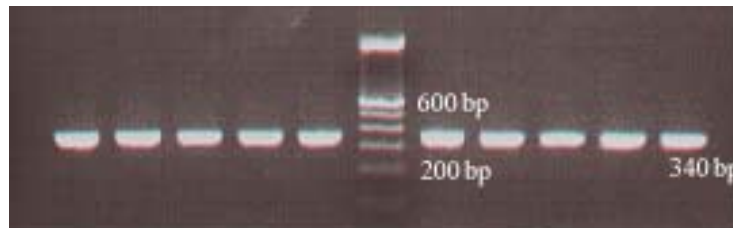


Abbildung 2.6 340bp große HIC-1-PCR-Produkte mit einem 100bp Längenstandard.

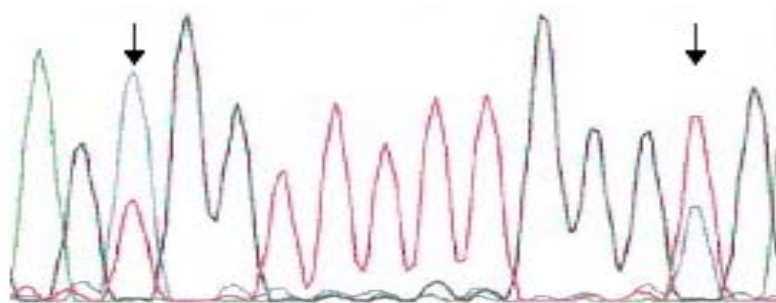
### 2.2.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung der PCR-Produkte wurde mit dem PCR-Purification-Kit™ der Firma Qiagen durchgeführt (geeignet für Fragmente von 100bp bis 10kb). Sie dient der Entfernung von überschüssigen Primern, Nukleotiden, Taq-Polymerase und Salzen. Zunächst wurden fünf Volumina des PB-Puffers, der über eine hohe Salzkonzentration verfügt, mit einem Volumen des PCR-Produktes vermischt, auf eine Säule aufgetragen und bei 10000g für eine Minute zentrifugiert. Während die DNA in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen an die Silika-Membran der Säule gebunden hatte, wurden Primer, NPTs etc. nicht von der Membran zurückgehalten. Zur Entfernung von Salzen wurde

die Säule mit 750µl PE-Puffer beladen und zweimal erneut zentrifugiert (1 Minute, 10000g). Im Anschluss konnte die DNA mit Hilfe von 30µl H<sub>2</sub>O von der Säule eluiert werden.

### 2.2.7 Semiquantitative Abschätzung des Methylierungsstatus durch PCR-Produkt-Sequenzierung

Da es sich bei dem Ausgangsmaterial um von mononukleären Zellen des Knochenmarks gewonnene DNA handelte, erhielt man ein Gemisch von DNA aus vielen unterschiedlichen Zellen und Zellarten, das zur Untersuchung in die PCRs eingesetzt wurde. Jeder dieser DNA-Stränge verfügt unter Umständen über ein unterschiedliches Methylierungsmuster in den einzelnen CpG-Positionen (s. Abb. 2.2). Analog Melki et al. erfolgt zur Abschätzung des Methylierungsstatus eine direkte Sequenzierung der aufgereinigten PCR-Produkte (MELKI et al. 1999). In der Sequenzierung wurde aufgrund des eingesetzten DNA-Gemischs und der unterschiedlichen Methylierung der einzelnen Stränge an den CpG-Positionen ein doppeltes Signal erwartet, was sich im Elektropherogramm als Doppelpeak, bestehend aus Cytosin und Thymin, darstellt. Ein reines T- bzw. C-Signal wird allerdings nur dann erhalten, wenn die DNA eines Probanden an einem CpG-Position entweder gar nicht bzw. vollständig methyliert war.

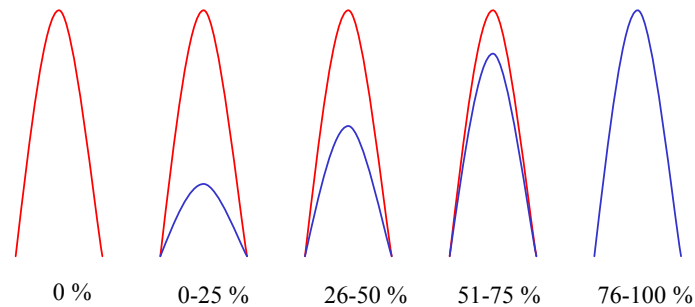


**Abbildung 2.7** Zwei Cytosin-Thymin-Doppelpeaks sind in diesem Ausschnitt aus einer automatischen Sequenzierung mit Pfeilen versehen. Es handelt sich um CpG-Inseln, wie man an der jeweils folgenden schwarzen Guanin-Position erkennen kann. Im ersten Fall überwiegt das blaue Cytosin- das rote Thymin-Signal. Im zweiten markierten Beispiel ist es genau umgekehrt.

Die Arbeitsgruppe um John R. Melki quantifizierte auf Grund dieser Tatsache prozentual den Anteil der Methylcytosine von den einzelnen CpG-Dinukleotiden durch

Vergleich der Peak-Höhe des Cytosin-Signals mit der Peak-Höhe des Cytosin- plus Thymin-Signals bei folgenden Genen: *Calcitonin*, *ER*, *E-Cadherin*, *p15*, *p16*, *Rb*, *GST-pi*, *HIC-1* zentraler Promoter und *HIC-1* 5'-Bereich (MELKI et al. 1999).

Fünf Abstufungen wurden bei der semiquantitativen Abschätzung des Methylierungsstatus, je nach Verhältnis der Peak-Höhen zueinander, gewählt (Abb. 2.8):



**Abbildung 2.8 Semiquantitative Abschätzung der methylierten Cytosine.** Zur Auswertung wurden die Peak-Höhen des Thyminsignals (rot) und des Cytosinsignals (blau) zueinander ins Verhältnis gesetzt und so der Methylierungsstatus in 5 prozentualen Kategorien bestimmt.

### 2.2.8 Klonierungstechniken

#### 2.2.8.1 Ligation

Als Klonierungsvektor wurde pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO (Invitrogen) verwendet, der eine direkte Insertion von Taq-Polymerase amplifizierten PCR-Produkten ermöglicht, da er – linearisiert- an beiden Enden über einen einzelnen Thymidin (T) Überhang verfügt. Taq Polymerase besitzt eine terminale Transferase-Aktivität, was dazu führt, dass ein einzelnes Desoxyadenosin (A) an das Ende des PCR-Produktes angefügt wird. So ist es möglich, die PCR-Produkte mit dem Vektor zu ligieren.

1µl des pCR R-TOPO Vektors wurden mit ca. 50 bis 100ng des PCR-Produktes zu einem Endvolumen von 5µl vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur (25°C) inkubiert.

### 2.2.8.2 Transformation

Bei der Transformation wird der hergestellte Vektor in das Bakterium (One Shot Cells, Invitrogen, siehe 2.1.8) eingebracht.

Hierzu wurden 2µl des Ligationsansatzes zu 50µl der Bakterien gegeben, für 30 Minuten auf Eis inkubiert, im Anschluss für 30 Sekunden hitzegeschockt und erneut 2 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 250µl SOC-Medium wird der Transformationsansatz für 30 Minuten bei 37°C im Bakterienschüttler inkubiert und nachfolgend 150µl auf einer LB-Platte (Ampicillin 50µg/ml, X-Gal 40µg/ml, IPTG 20µg/ml) ausgestrichen. Die Platten werden über Nacht in einem 37°C warmen Brutschrank inkubiert.

Der pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO-Vektor verfügt über ein Gen, das den Bakterien Ampicillinresistenz verleiht, so dass nur vektorhaltigen Bakterien ein Wachstum möglich war, da der LB-Platte Ampicillin zugefügt wurde. Ferner ermöglicht die sogenannte Blau-Weiß-Selektion eine Unterscheidung von Bakterien, in deren Vektor das PCR-Produkt eingebaut bzw. nicht eingebaut wurde: das sich ebenfalls im Vektor befindliche *lacZ*-alpha-Gen kodiert für β-Galaktosidase und wird als „Reporter-gen“ bezeichnet, da es durch Umwandlung von im Nährboden enthaltenen X-Gal zu einem Indigofarbstoff zur Blaufärbung der heranwachsenden Kolonie führt. Die Klonierungstelle ist in das *lacZ*-alpha-Gen integriert. Die Expression von β-Galaktosidase wird nicht beeinträchtigt, sofern keine Fremd-DNA eingebaut ist. Ist jedoch ein PCR-Produkt gebunden worden, wird der Leserahmen des Gens gestört, was die Entstehung einer funktionsunfähigen β-Galaktosidase zur Folge hat. Dementsprechend stellen sich also Kolonien, deren Plasmid das PCR-Produkt enthält, weiß dar.

Am nächsten Tag erfolgte das Heraufziehen weißer Klone in einer Übernachtskultur in mit 4ml LB-Medium (Ampicillin 50µg/ml) gefüllten Kulturröhrchen bei 37°C und 290rpm auf dem Bakterienschüttler. Für die vorliegende Arbeit wurden für jede Probe acht weiße Klone untersucht, um eine quantitative Aussage zu erlauben.

### 2.2.8.3 Plasmidisolation aus Bakterien

Mit dem Qiagen-Miniprep-Kit wurde das Plasmid aus den Bakterien entfernt und aufgereinigt.

Das durch Zentrifugation von 2ml der Übernachtskultur für 1 Minute bei 10 000rpm erhaltene Bakterienpellet wurde mit Hilfe eines Vortexers in 250µl P1-Puffer gelöst (Resuspension), mit noch einmal derselben Menge P2-Puffer (Zellaufschluss) und 350µl N3-Puffer (zur Neutralisation) vermischt und für 10 Minuten bei 10000g zentrifugiert. Der erhaltene Überstand wurde auf eine Säule aufgetragen und per Zentrifugation (1 Minute bei 10000g) durch die Säule gezogen, wobei die DNA durch die hohe Salzkonzentration des Puffers N3 an der Silikon-Membran der Säule gebunden wurde, während RNA, Proteine etc. die Membran passierten. Das Auswaschen der Salze erfolgte durch 750µl PE-Puffer, bevor mit 50µl Aqua dest. die Probe eluiert wurde.

### 2.2.8.4 Restriktionsverdau von Plasmiden

Die enzymatische Restriktion der DNA zur Überprüfung, ob das Plasmid ein Fragment der richtigen Länge enthält, ist mit Restriktionsenzymen, die spezifisch eine bestimmte DNA-Sequenz erkennen und schneiden, möglich. Ein 15µl Ansatz mit 5µl Qiagen Miniprep-Eluat, 5U *Eco* RI und 1x Inkubationspuffer H (Fermentas) wurde für eine Stunde bei 37°C inkubiert.

*Eco*RI (G'AATTC) verfügt über zwei Schnittstellen innerhalb des 3,9kb großen pCR R 2.1-TOPO Vektors. Diese beiden Schnittstellen befinden sich nur wenige bp beiderseits des einligierten PCR-Produktes, so dass man nach dem Verdau im 1%-igen Agarose-Gel 2 Banden erwartete: eine in Größe des PCR-Produktes und die andere bei ungefähr 3,6kb (Vektor-Größe minus PCR-Produktgröße):

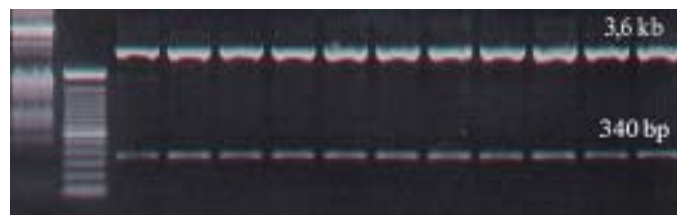


Abbildung 2.9 Plasmide nach Restriktionsverdau mit Lambda DNA/ *Hind* III Marker und 100 bp Leiter.

### 2.2.9 Automatisierte Sequenzierung

Der automatischen Sequenzierung liegt die von Sanger et al. 1977 entwickelte enzymatische Kettenabbruchmethode mit Didesoxy-Nukleotiden (ddNTPs) zu Grunde. Zunächst wurde mit einem 20µl Ansatz, bestehend aus ca. 300ng aufgereinigtem Plasmid, 10pmol T7-Primer (Vorwärtssequenzierung) und 8µl RR-Mix (Perkin-Elmer) ein Cycle-Sequencing (initiale Denaturierung für 30 Sekunden bei 96°C, dann 25 Zyklen mit 96°C, 10 Sekunden, 55°C, 15 Sekunden und 50°C, 4 Minuten) durchgeführt. In dem von ABI Prism eingesetzten RR-Kit befinden sich im definierten Verhältnis Desoxynukleotide, fluoreszenzmarkierte ddNTPs, Tris HCl (pH 9,0), MgCl<sub>2</sub>, thermostabile Pyrophosphate und darüber hinaus eine *Ampli-Taq* DNA-Polymerase, FS. Immer, wenn durch die DNA-Polymerase ein ddNTP im neu synthetisierten Strang eingebaut wurde, kam es zum Kettenabbruch, da die ddNTPs nicht über das für den Einbau einer nächsten Base benötigte, freie 3'OH-Ende verfügten. Auf diese Weise entstanden Fragmente unterschiedlicher Länge, die am Ende alle eine fluoreszenzmarkierte Base tragen, wobei jede der vier Basen eine spezifische Farbmakierung aufzeigt.

Der Cycle-Sequencing-Ansatz wurde dann mit Hilfe von Sephadex-Säulen von überschüssigen dNTPs, ddNTPs, DNA-Polymerase und Salzen befreit, das Eluat im Vakuumkonzentrator 35 Minuten lang lyophilisiert und anschließend in 4µl Ladepuffer (1:4 Ladepuffer:Formamid-Lösung) aufgenommen. Nachdem das Gemisch 2 Minuten bei 90°C denaturiert wurde, wurden 1,3µl auf das Sequenziergel aufgetragen.

Die einzelnen Fragmente wurden hier durch eine Elektrophorese (3,0 kV) über 10 Stunden aufgetrennt, da sie auf Grund ihrer unterschiedlichen Größe im Gel verschiedene Laufgeschwindigkeiten besitzen (je kleiner, desto schneller). Somit liefen die Fragmente nacheinander an einem sich am Ende des Gels befindlichen Laserdetektor vorbei. Dieser regte die jeweils mit einem Farbstoff markierten Fragmente an, Licht einer für diese Base spezifischen Wellenlänge zu emittieren, das von einem Fotomultiplier gemessen und computergestützt (Apple Power Macintosh G3) in eine Basensequenz „übersetzt“ und in Form eines Elektropherogramms dokumentiert wurde.

Da sich die Fragmente allerdings nur in der Länge um eine Base unterscheiden, war der Einsatz eines 5%-igen PAA-Gels notwendig, welches hochauflösend war: 21g Harnstoff, der eine denaturierende Wirkung besitzt und somit die Ausbildung einer die



Auftrennung störender Sekundärstruktur der DNA verhindert, wurde mit 20ml Aqua dest., 6ml 10fach TBE und 8,4ml einer 30%-igen PAA-Lösung gemischt und für 30 Minuten gerührt. Nach Filterung über einen 0,2µm Membranfilter (RC58, Schleicher und Schuell, Deutschland) wurde die Gellösung entgast. Um das Gel zu polymerisieren, wurden dann 300µl einer 10%-igen APS-Lösung (zum Reaktionsstart) und 20µl TEMED (zur Vernetzung) zugegeben. Das Giessen des Gels erfolgte zwischen zwei 25cm x 36cm großen Glasplatten mit einer Dicke von 2mm.

### 2.2.10 Auswertung

Die prozentuale Methylierungsdichte jeder Probe wurde berechnet durch Bestimmung der Anzahl der Methylierungen bezogen auf die möglichen methylierten Cytosine je nach vorliegendem Gen, wobei es sich bei E-Cadherin um 232, bei HIC-1 um 360 handelt.

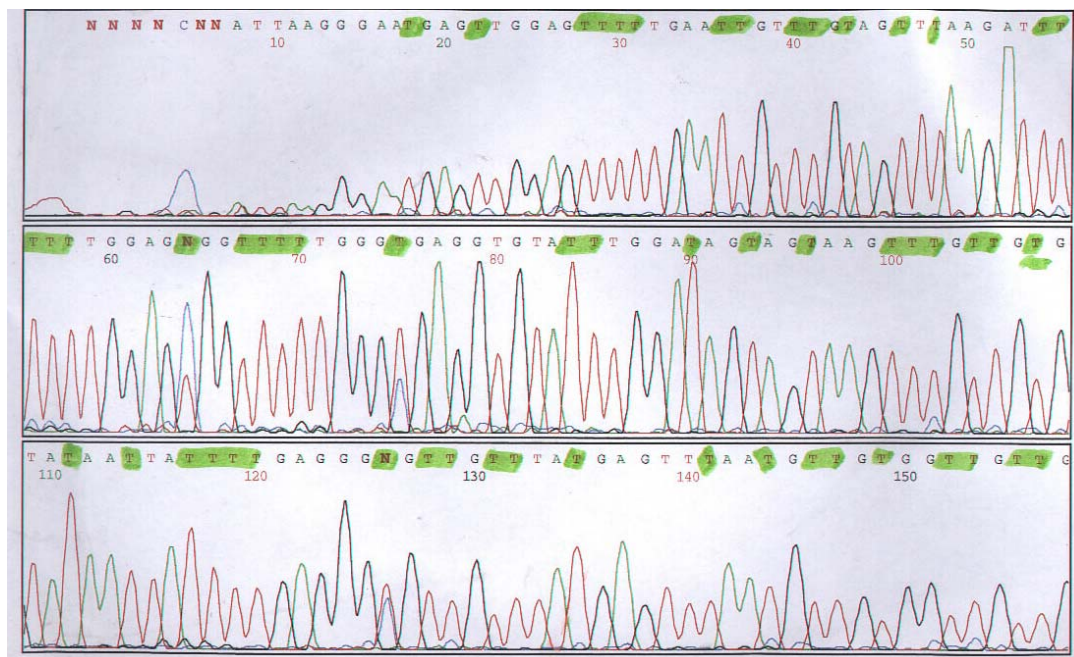
## 3 Ergebnisse

### 3.1 Etablierung einer Methode

Für die Bestimmung des Methylierungsgrades der Gene E-Cadherin und HIC-1 bei acht nicht an einer malignen Erkrankung leidenden Kontrollpersonen und von 15 AML-Patienten war vorgesehen, die Methode von Melki et al. zu verwenden (MELKI et al. 1999). Die Arbeitsgruppe wendete ein neues Verfahren zur Untersuchung methylierter Promoterregionen an (s. 2.2.7). Jedoch zeigte sich im Laufe der Untersuchung, dass diese Methode Mängel in der quantitativen Abschätzung aufwies, wie im folgenden unter 3.1.1 dargestellt bzw. unter 4.1 erläutert wird.

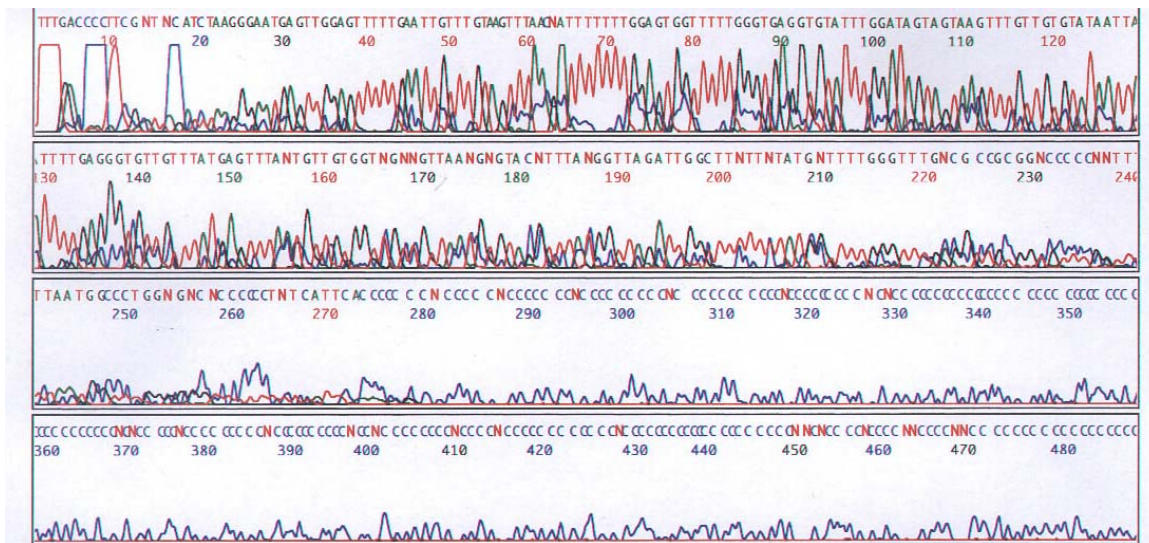
#### 3.1.1 Anwendung der Methode nach Melki et al. (s. 2.2.7)

Die Vorversuche mit dem HIC-1-cen-Fragment, bei denen ein automatischer Sequenzierer ABI 310 eingesetzt wurde, ließen keinerlei methodische Probleme erkennen.



**Abbildung 3.1 PCR-Produktsequenzierung von HIC-1 mit ABI 3.10-Sequenzier.** Die Abbildung zeigt ein von einem Cytosin- überlagertes Thymin-Signal (64) und zwei von einem Thymin- überlagerte Cytosinsignale (Position 75 und 126), anhand derer eine semiquantitative Abschätzung des Methylierungsstatus vorgenommen werden kann.

Bei Sequenzierung auf einem automatischen Sequenzierer Gerät ABI 377 stellte sich jedoch folgendes Bild dar: die Sequenzierung ist durchgehend von einem blauen Cytosin-Hintergrundsignal überlagert, was eine Auswertung unmöglich macht. Bei der Suche nach der Ursache dieses Hintergrundsignals stellte sich heraus, dass sich diese Methode nicht zur Beantwortung der Fragestellung eignet, weil sie grundsätzlich keine semiquantitativen Aussagen zulässt (s. 4.1). D.h. auch die Auswertungen von Melki et al. sind in Form einer semiquantitativen Abschätzung problematisch.



**Abbildung 3.2 PCR-Produktsequenzierung von HIC-1 mit ABI 377-Sequenzier.** Die Abbildung zeigt ein deutliches blaues Cytosin-Hintergrundsignal, was eine Auswertung der Sequenz nicht möglich macht.

Daher wurde für die vorliegende Arbeit das im folgenden Kapitel dargestellte alternative Verfahren angewendet.

### 3.1.2 Semiquantitative Abschätzung des Methylierungsstatus durch Sequenzierung von einklonierten PCR-Produkten

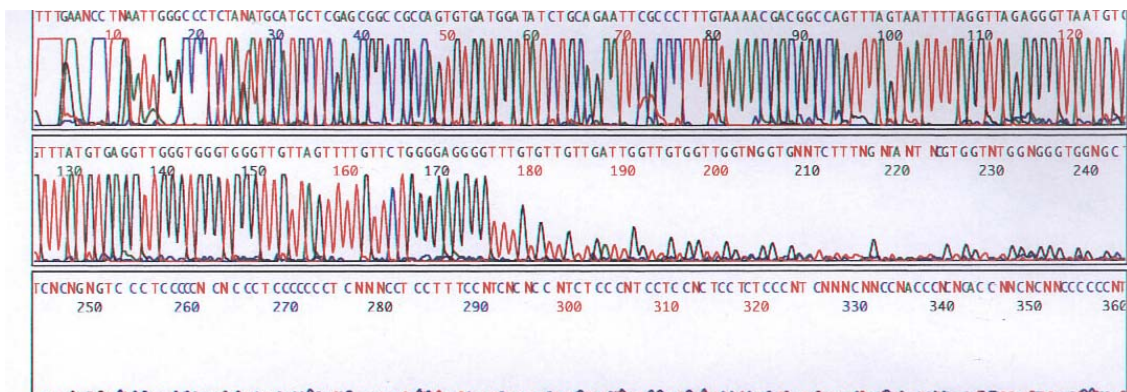
Die zu analysierende DNA wurde zunächst wieder mit Hilfe von Natriumbisulfid umgewandelt und mit einer nested-PCR amplifiziert. Im Unterschied zu Melki et al. wurden die PCR-Produkte aber nicht direkt sequenziert, sondern in einen Vektor ligiert (s. 2.2.8.1) (CAMERON et al. 1999). Von den wachsenden Klonen wurde pro untersuchter Probe aus Gründen der Kostenersparnis DNA von acht Klonen präpariert, die nach

stochastischen Kriterien selektiert wurden (s. 2.2.8.2). Das sich anschließende Cycle-Sequencing mit dem T7-Primer wurde zunächst unter Standardbedingungen mit einer auf den Primer abgestimmten spezifischen Hybridisierungstemperatur durchgeführt.

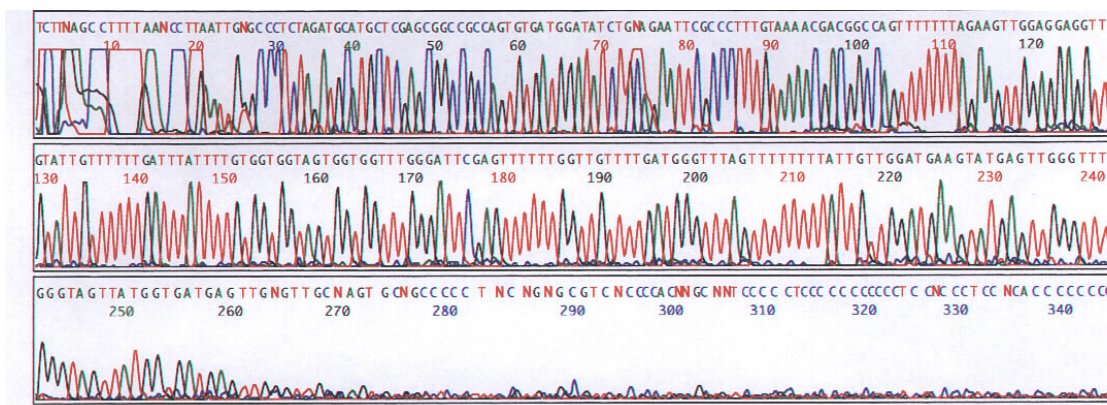
**Tabelle 3.1 ABI-Standard-Cycle-Sequencing-Bedingungen** Nach initialer Denaturierung für 30 Sekunden bei 96° C schlossen sich 25 Zyklen mit den dargestellten Bedingungen an:

96°C	10 Sekunden
55°C	15 Sekunden
60°C	4 Minuten

Dabei zeigte sich bei E-Cadherin nach ca. 190, bei HIC-1 nach ca. 260 gelesenen Basenpaaren unter ABI-Standardbedingungen ein Sequenzabbruch (s. Abb. 3.3 und 3.4).



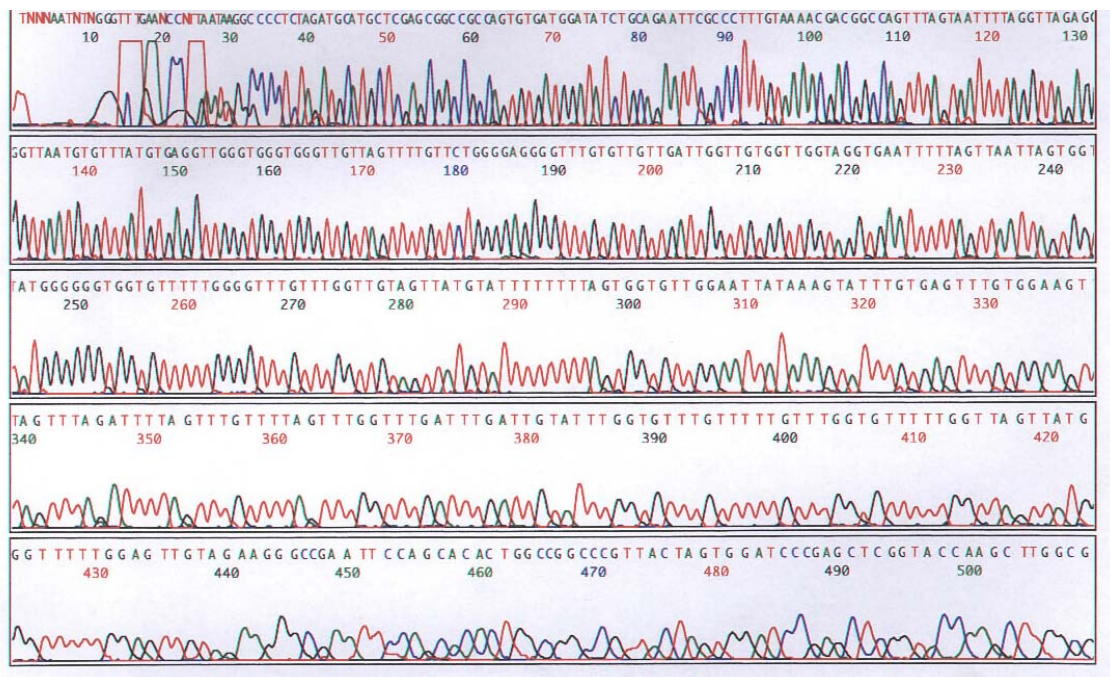
**Abbildung 3.3 Sequenzabbruch von E-Cadherin nach ungefähr 180 bp.**



**Abbildung 3.4 Sequenzabbruch von HIC-1 nach ungefähr 260 bp.**

Um hier weiterführend sequenzieren zu können, wurde durch Veränderung der einzelnen beteiligten Parameter (Primerkonzentration, Menge des BigDye Ready-Reaction-Kits, eingesetzte DNA-Konzentration, Verringerung der Ansatzgröße oder Verlängerungen der Gelelektrophoresedauer) in unterschiedlichen Kombinationen miteinander versucht, die Leseweite in der automatischen Sequenzierung zu verlängern, was jedoch zunächst nur unzureichend gelang.

Den entscheidenden Fortschritt erbrachte erst eine Absenkung der Temperatur während der Synthesephase um 9 °C (s. Abb. 3.5 und 3.6).



**Abbildung 3.5** Vollständige Sequenzierung von E-Cadherin.

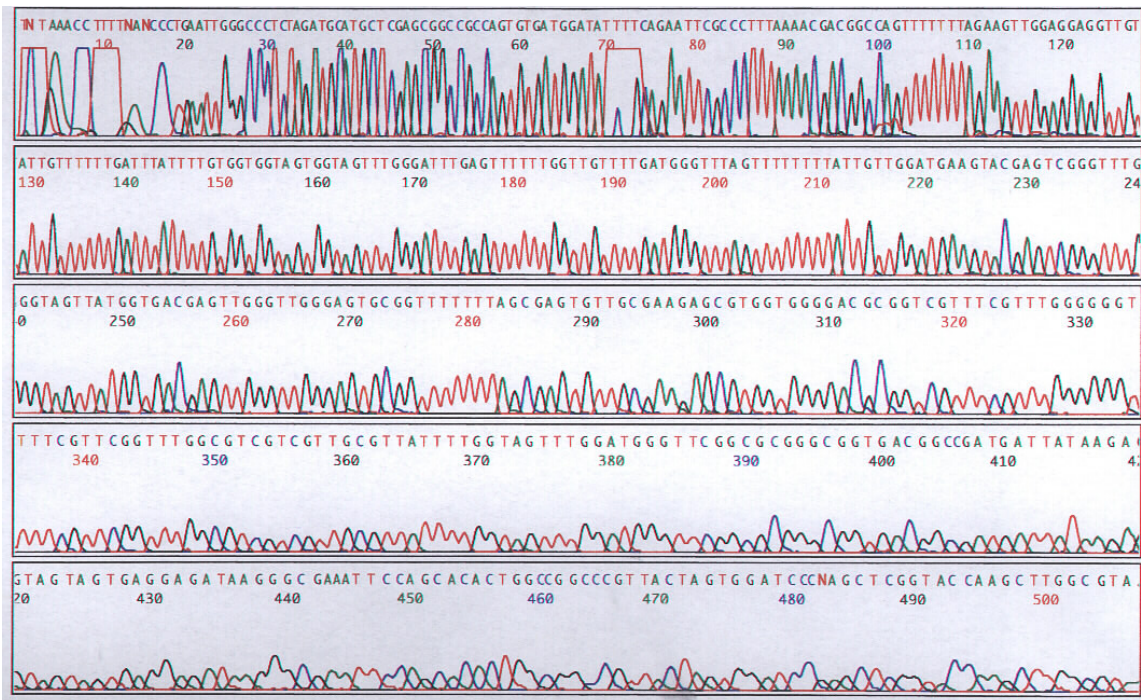


Abbildung 3.6 Vollständige Sequenzierung von HIC-1.

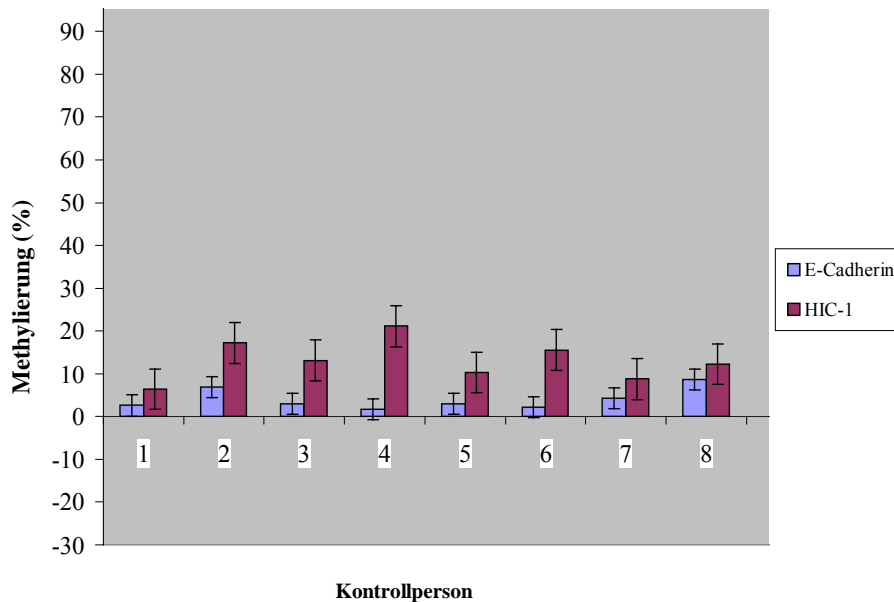
Zum Nachweis von methylierten CpG-Inseln bietet diese Methode erhebliche Vorteile gegenüber anderen Verfahren, wie z.B. MSP. Es kann die Verteilung von Methylierungsereignissen in einem bestimmtem genetischen Abschnitt beschrieben werden, was zum Beispiel weder mit methylierungsspezifischen Restriktionsenzymen, noch mit einer methylspezifischen PCR erreicht werden kann. Diese beiden Verfahren sind beschränkt auf die Untersuchung von ein bis zwei definierten CpG-Positionen innerhalb eines Genlocus und nicht vieler Positionen innerhalb eines Versuches.

## 3.2 Darstellung der Ergebnisse

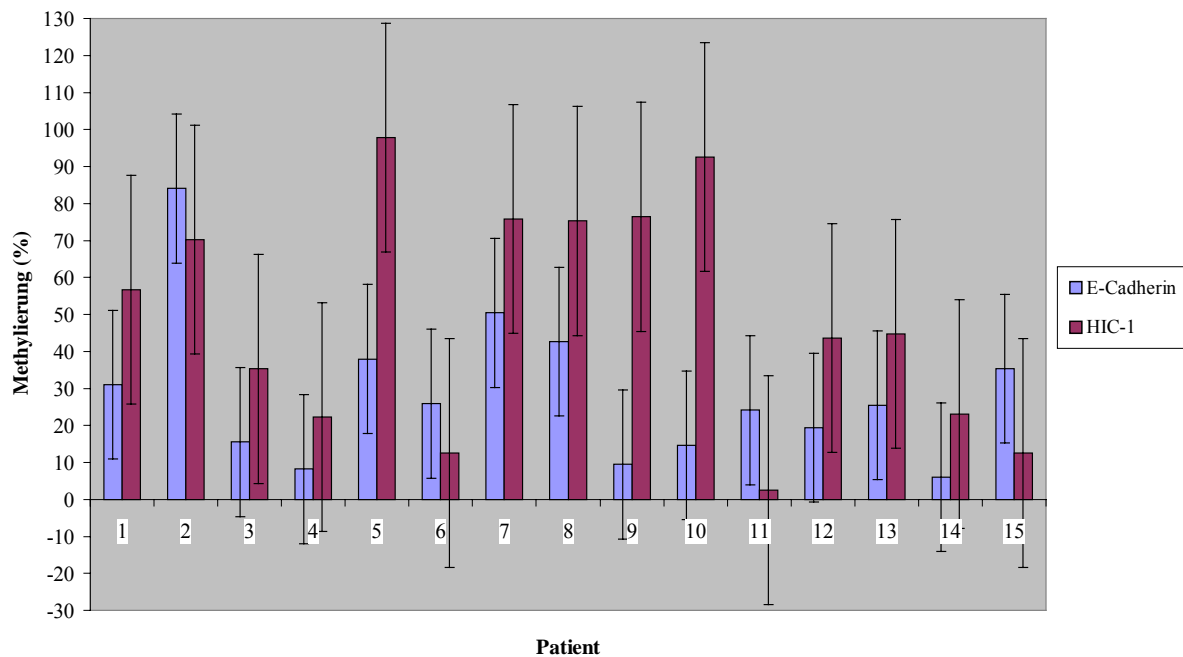
Bei Untersuchung der Fragestellung, ob sich bestimmte prognostisch divergente AML-Subgruppen bezüglich der Methylierungsfrequenzen oder des Methylierungsphänotyps unterscheiden, wurde zusätzlich eine Kontrollgruppe, d.h. Personen, die nicht an einer malignen Grunderkrankung leiden, mitgeführt. Im folgenden wird zunächst, wie auch schon in anderen Publikationen, der Methylierungsstatus von Kontrollpersonen und an AML-Erkrankten verglichen (3.2.1). Anschliessend werden die Ergebnisse der beiden in ihrer Prognose unterschiedlichen AML-Untergruppen gegenübergestellt (3.2.2).

### 3.2.1 Vergleich der Methylierungsereignisse Kontrollgruppe versus AML-Patienten

Bei E-Cadherin und HIC-1 ist die durchschnittliche Methylierungsfrequenz bei der Kontrollgruppe geringer als bei den untersuchten Patienten.



**Abbildung 3.7 Methylierungsstatus der Kontrollpersonen bei E-Cadherin und HIC-1 im Vergleich.** Die Gesamtzahl an methylierten Cytosinen wurde für jedes der beiden Gene prozentual umgerechnet und als Höhe einer Säule dargestellt.



**Abbildung 3.8 Methylierungsstatus der AML-Patienten bei beiden untersuchten Genen im Vergleich.** Die Gesamtzahl an methylierten Cytosinen wurde für jedes der beiden Gene prozentual umgerechnet und als Höhe einer Säule dargestellt.

Eine durchschnittliche Methylierungsfrequenz von 4,04% (Minimalwert 1,72%, Maximalwert 8,62%) der Kontrollpersonen bei der Untersuchung von E-Cadherin steht einem Prozentsatz von 29,15% der AML-Patienten gegenüber. Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test (WMW) errechnet sich ein signifikanter Unterschied im Methylierungsgrad zwischen Kontrollgruppe und AML-Patienten ( $p < 0,0001$ ).

Bei den meisten untersuchten Patienten ist die prozentuale Methylierung bei einem Höchstwert von 84,05% (Patient 2) deutlich größer als bei den Kontrollpersonen. Der Median der Methylierungsfrequenz von E-Cadherin beträgt bei den Kontrollpersonen 3,02%, bei den Patienten 25,43%.

Bei der Untersuchung von Methylierungsereignissen im HIC-1-cen-Bereich ergaben sich folgende Prozentwerte: Die Kontrollgruppe weist als Minimalwert 6,39% (Patient 1) und Maximalwert 21,11% (Patient 4) methylierte Cytosine auf (durchschnittlicher Wert 11,56%). In der Gruppe der AML-Patienten finden sich zwischen 2,5% (Patient 11) und 97,78% (Patient 5) Methylierungen (Mittelwert 49,61%).

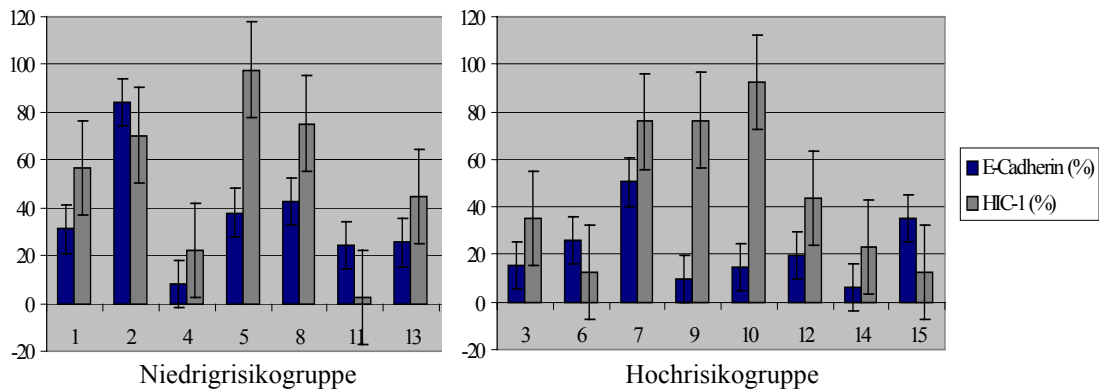
Im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test ergibt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ( $p = 0,0031$ ).

Der Median der prozentualen Methylierung von HIC-1 ist mit 44,72% bei den untersuchten Patienten 3,53fach so groß wie bei den Kontrollpersonen (12,66%).



### 3.2.2 Vergleich der Methylierungsereignisse Niedrigrisiko- versus Hochrisiko-Gruppe

#### 3.2.2.1 Gruppenspezifische Ausprägungsgrade der Methylierung



**Abbildung 3.9** Prozentuale Methylierung der beiden AML-Subgruppen für E-Cadherin und HIC-1. In den Diagrammen sind die Patienten mit entsprechender Nummer (x-Achse) und der prozentuale Methylierungsstatus der beiden untersuchten Gene (y-Achse) gegeneinander aufgetragen.

Bei der Hochrisiko-Gruppe schwankt bei E-Cadherin die Methylierungsfrequenz zwischen 6,03% (Patient 14) und 50,43% (Patient 7), bei den Patienten mit t(8;21) zwischen 8,19% (Patient 4) und 84,05% (Patient 2). Die Durchschnittswerte betragen 22,09% und 36,21%. Der Median ist bei der Niedrigrisikogruppe mit 31,03% fast doppelt so groß wie der der Hochrisikogruppe (17,46%).

Die beiden Extremwerte bezüglich des Methylierungsstatus bei HIC-1 (97,78% Patient 5 und 2,5% Patient 11) finden sich beide in der Niedrigrisikogruppe. Insgesamt erhält man einen Mittelwert von 52,77%, der sich damit nicht gravierend vom Durchschnittswert der Hochrisiko-Gruppe von 46,45% unterscheidet. Hier schwanken die Werte im Bereich von 12,49% (Patienten 6 und 15) und 92,5% (Patient 10). Die Mediane mit 56,66% der Niedrigrisikogruppe und 39,44% der Hochrisikogruppe unterscheiden sich deutlicher als die entsprechenden Mittelwerte.

Im dritten Paarvergleich (s. 3.2.2.1) errechnet sich im Wilcoxon-Mann-Whitney-Test weder für E-Cadherin ( $p=0,2319$ ) noch für HIC-1 ( $p=0,8401$ ) ein signifikanter Unterschied im Methylierungsgrad zwischen den beiden AML-Subgruppen. Die dazu gehörenden Punktschätzer nach Hodges und Lehmann betragen  $-11,85\%$  ( $-27,5$

Methylierungen) für E-Cadherin und -7,36% (-26,5 Methylierungen) für HIC-1 bei KIs von [-74; 18 Methylierungen] bzw. [-170; 114 Methylierungen].

### 3.2.2.2 Betrachtung des Methylierungsstatus in Abhängigkeit vom Blastenanteil

Als Blastenanteil wird der prozentuale Anteil der Lymphoblastenzellen an den kernhaltigen Zellen im Knochenmark bezeichnet. Er spielt bei der Auswertung der Ergebnisse eine große Rolle, da mit steigendem Blastenanteil auch die Wahrscheinlichkeit steigt, dass die DNA einer Blastenzelle und nicht die eines „gesunden“ Lymphocyten in die Sequenzierung eingeht.

**Tabelle 3.2 Absolute Anzahl von Methylierungen der einzelnen Klone bei E-Cadherin in Abhängigkeit vom Blastenanteil** (Definition s. 3.2.3.4). Die Niedrig- (1-7) und Hochrisikogruppe (8-10) werden getrennt dargestellt. Für jeden der acht untersuchten Klone pro Patient wurde die Anzahl an methylierten Cytosinen bestimmt und insgesamt zu einer Summe addiert. Es erfolgte eine naive Adjustierung nach folgender Formel:  $[\text{Summe} - (100 - \text{Blastenanteil}) / 100 \cdot \text{Durchschnitt der Kontrollen}] / \text{Blastenanteil} \cdot 100 = \text{adjustierte Summe}$

Patient	Klon									Summe	Blastenanteil (%)	adjustierte Summe
	1	2	3	4	5	6	7	8				
<b>1</b>	1	3	5	5	7	8	10	17	17	72	84	83,93
<b>2</b>	2	20	21	23	24	25	26	28	28	195	33	571,86
<b>3</b>	4	0	0	0	1	1	2	2	13	19	47	29,85
<b>4</b>	5	4	7	7	10	12	14	17	17	88	64	132,22
<b>5</b>	8	0	1	2	16	17	18	21	24	99	48,5	194,16
<b>6</b>	11	0	0	1	3	6	7	18	21	56	38,5	130,47
<b>7</b>	13	4	6	6	7	7	7	11	11	59	71,5	78,78
<b>8</b>	3	2	2	3	4	6	6	6	7	36	/	/
<b>9</b>	6	1	3	3	5	5	5	20	20	60	35	154,01
<b>10</b>	7	0	1	16	18	19	20	21	22	117	85	135,99
<b>11</b>	9	0	2	2	2	3	3	3	7	22	30	51,47
<b>12</b>	10	1	1	1	3	3	3	11	11	34	36	77,77
<b>13</b>	12	0	1	1	2	2	9	11	19	45	58	70,79
<b>14</b>	14	0	1	2	2	2	2	2	3	14	81	15,08
<b>15</b>	15	3	4	7	9	12	12	14	21	82	33,5	226,16

7

Patient 2 der Niedrigrisikogruppe verfügt innerhalb dieser Subgruppe über den geringsten Blastenanteil (33%), so dass bei ihm nach den Gesetzen der Wahrscheinlichkeit nur ein Drittel der untersuchten Klone von Blastenzellen stammen. Er weist in allen 8 Klonen eine hohe Anzahl an Methylgruppen auf und ist damit mit

<sup>7</sup> Blastenanteil von Patient 3 unbekannt.

weitem Abstand der Patient mit der höchsten Methylierung. Im Gegensatz dazu steht Patient 1, der von den t(8;21)-Patienten den höchsten Blastenanteil besitzt (84%), sich jedoch nur in zwei der acht Klone hinsichtlich der Methylierungszahl von der Kontrollgruppe unterscheidet.

Patient 11 entspricht im Gegensatz zu den vorher genannten der Hypothese, da er mit einem geringen Blastenanteil (38,5%) auch nur zwei Klone besitzt, die sich deutlich vom Methylierungsgrad der Kontrollgruppe abheben.

In der Hochrisiko-Gruppe besitzt Patient 7 mit dem höchsten Blastenanteil (85%) die höchste Anzahl an Methylierungen. Patient 9 weist mit 30% den geringsten Blastenanteil dieser Subgruppe auf. Er verfügt über keinen Klon, der höher methyliert ist als die Kontrollgruppen-Klone. Patient 14 besitzt nur Klone, die in der Größenordnung der Kontrollgruppe Methylgruppen tragen. Mit 81% hat er einen im Vergleich zu den anderen untersuchten AML-Patienten sehr hohen Blastenanteil.

**Tabelle 3.3 Absolute Anzahl von Methylierungen der einzelnen Klone bei HIC-1 in Abhängigkeit vom Blastenanteil** (Definition s. 3.2.3.4). Die Niedrig- (1-7) und Hochrisikogruppe (8-10) werden getrennt dargestellt. Für jeden der acht untersuchten Klone pro Patient wurde die Anzahl an methylierten Cytosinen bestimmt und insgesamt zu einer Summe addiert. Es erfolgte eine naive Adjustierung nach folgender Formel:  $[\text{Summe} - (100 - \text{Blastenanteil}) / 100 \times \text{Durchschnitt der Kontrollen}] / \text{Blastenanteil} \cdot 100 = x$

	Patient	Klon								Summe	Blastenanteil (%)	adjustierte Summe
		1	2	3	4	5	6	7	8			
<b>1</b>	1	7	7	7	10	39	44	45	45	204	84,0	233,88
<b>2</b>	2	9	11	12	44	44	44	44	45	253	33,0	670,98
<b>3</b>	4	1	8	9	9	10	10	10	23	80	47,0	117,07
<b>4</b>	5	44	44	44	44	44	44	44	44	352	64,0	523,49
<b>5</b>	8	2	23	23	43	45	45	45	45	271	48,5	508,72
<b>6</b>	11	0	0	0	0	0	1	3	5	9	38,5	-51,91
<b>7</b>	13	2	7	7	7	7	43	43	45	9	71,5	-6,20
<b>8</b>	3	0	0	9	14	19	23	23	39	127	/	/
<b>9</b>	6	0	0	0	0	0	0	0	45	45	35,0	41,04
<b>10</b>	7	2	23	23	45	45	45	45	45	273	85,0	312,86
<b>11</b>	9	16	16	18	45	45	45	45	45	275	30,0	806,70
<b>12</b>	10	19	44	45	45	45	45	45	45	333	36,0	841,21
<b>13</b>	12	2	8	9	18	19	19	36	36	157	58,0	236,56
<b>14</b>	14	3	8	9	11	12	13	13	14	83	81,0	91,41
<b>15</b>	15	1	1	2	2	3	12	12	12	45	33,5	40,77

Bei HIC-1 ergibt sich ein ähnliches Bild von sowohl mit der Hypothese konform als auch nicht konform gehenden Ergebnissen: Patient 10 (Hochrisiko-Gruppe) besitzt mit

einem relativ geringen Blastenanteil (36%) die zweitmeisten methylierten Cytosine bezogen auf das gesamte Patientenkollektiv. Patient 1 (Niedrigrisiko-Gruppe) mit einem sehr hohen Blastenanteil (84%) weist nur bei der Hälfte seiner Klone eine Methylierung auf. Die Patienten 11 (t(8;21)), 6 und 15 (Hochrisiko) mit niedrigem Blastenanteil besitzen keinen bzw. nur einen Klon (Patient 6), der in der Methylierungsanzahl die Kontrollgruppe weit übertrifft.

### 3.2.2.3 Betrachtung des Methylierungsstatus in Abhängigkeit vom Alter

In manchen Geweben unterliegen einige Gene z.T. einer altersabhängigen Methylierung (s. 4.2.2.3), so dass die erhaltenen Ergebnisse auch unter Berücksichtigung dieses Aspekts kritisch betrachtet werden sollten.

**Tabelle 3.4 Gegenüberstellung von Alter der Probanden und Methylierungsstatus von E-Cadherin und HIC-1 in %.** Die Tabelle ist untergliedert in Kontrollpersonen (KP; 1-8) und Patienten (P) der Niedrig- (9-15) und Hochrisikogruppe (16-23). Das Alter der Kontrollpersonen wurde in Jahren bei Entnahme des Knochenmarkkeils im Rahmen einer Hüft-TEP (s. 2.1.7.1), bei den AML-Patienten zum Zeitpunkt der Erstdiagnosestellung bestimmt. Der prozentuale Methylierungsmenge von E-Cadherin und HIC-1 errechnete sich durch die Anzahl gefundener Methylierungen in allen acht Klonen bezogen auf die Anzahl möglicher Methylierungen.

	KP/P	Alter	E-Cadherin	HIC-1
1	1	58	2,59	6,39
2	2	56	6,9	17,22
3	3	87	3,02	13,1
4	4	77	1,72	21,11
5	5	72	3,02	10,28
6	6	57	2,16	15,56
7	7	79	4,31	8,8
8	8	55	8,62	12,22
9	1	68	31,03	56,66
10	2	40	84,05	70,27
11	4	54	8,19	22,22
12	5	32	37,93	97,78
13	8	26	42,67	75,27
14	11	56	24,14	2,5
15	13	59	25,43	44,72
16	3	64	15,52	35,27
17	6	59	25,86	12,49
18	7	41	50,43	75,83
19	9	61	9,48	76,38
20	10	54	14,66	92,5
21	12	62	19,4	43,61
22	14	70	6,03	23,05
23	15	30	35,34	12,49

**Tabelle 3.5 Mittelwert (MW), Standardabweichung (SD) und Median des Alters der drei untersuchten Gruppen in Jahren.**

	Kontrollpersonen	Niedrigrisikogruppe	Hochrisikogruppe
<b>MW</b>	67,63	47,86	55,13
<b>SD</b>	12,6	15,41	13,25
<b>Median</b>	65	54	60

Die Kontrollpersonen sind mit 67,63 Jahren durchschnittlich älter als die beiden AML-Subgruppen, wobei die Niedrigrisikogruppe im Mittel beinahe 20 Jahre jünger ist.

Es findet sich keine eindeutige Korrelation zwischen Alter und Methylierungsstatus. Patient 8 weist als jüngster eine relativ große Menge von Methylierungen auf. Patient 14, der der älteste Proband der AML-Patienten ist, besitzt dagegen geringe Werte. So auch Patient 4, dessen Alter dem Median der Niedrigrisikogruppe entspricht.

#### **3.2.2.4 Betrachtung des Methylierungsstatus in Abhängigkeit von der Überlebensdauer**

Im Rahmen der Fragestellung besteht die Hypothese, dass die Überlebenszeit der Patienten und die vorhandene Anzahl an Methylierungen invers korrelieren.

**Tabelle 3.6 Darstellung des Methylierungsstatus in Abhängigkeit der Überlebensdauer der Patienten in Monaten nach Erstdiagnosestellung.** Die Tabelle ist untergliedert in Patienten der Niedrig- (1-7) und Hochrisikogruppe (8-15). Jedem Patienten ist sein aktueller Status zum Zeitpunkt des Verfassens der vorliegenden Arbeit zugeordnet: verstorben, Komplettremission (CR) oder Rezidiv, was bedeutet, dass nach dem Erreichen einer CR erneut die Erkrankung aufgetreten ist. Der prozentuale Methylierungsmenge von E-Cadherin und HIC-1 errechnete sich durch die Anzahl gefundener Methylierungen in allen acht Klonen bezogen auf die Anzahl möglicher Methylierungen.

Patient	Status	Überlebenszeit in Monaten	Methylierungsstatus E-Cadherin in %	Methylierungsstatus HIC-1 in %	
1	1	verstorben	0,66	31,03	56,66
2	2	CR	41,29	84,05	70,27
3	4	CR	57,07	8,19	22,22
4	5	CR	34,65	37,93	97,78
5	8	Rezidiv	35,77	42,67	75,27
6	11	CR	29,03	24,14	2,5
7	13	verstorben	24,69	25,43	44,72
8	3	verstorben	1,08	15,52	35,27
9	6	CR	33,79	25,86	12,49
10	7	verstorben	1,22	50,43	75,83
11	9	verstorben	1,48	9,48	76,38
12	10	verstorben	4,31	14,66	92,5
13	12	verstorben	3,91	19,4	43,61
14	14	verstorben	16,24	6,03	23,05
15	15	verstorben	20,97	35,34	12,49

Patient 2 verfügt innerhalb der Niedrigrisiko-Gruppe über die höchste prozentuale Methylierung bei E-Cadherin. Bei ihm ist eine Komplettremission eingetreten, wie auch bei drei weiteren Patienten dieser Gruppe (5, 8 und 11), deren Methylierungsstatus sich zwischen 24,14% und 42,67 % befindet. Auch im Bezug auf HIC-1 weist Patient 2 mit 70,27% eine der höchsten Methylierungsfrequenzen auf, Patient 5, ebenfalls mit Komplettremission, beinahe eine vollständige (97,78%). Patient 11 gehört bei HIC-1 zu den Patienten, deren untersuchter Genabschnitt über eine geringere Anzahl methylierter Cytosine verfügt. Er zeigt mit 2,5% die mit weitem Abstand geringste Methylierungsfrequenz auf.

Patient 1 weist bei beiden untersuchten Genen im Vergleich zu den anderen Patienten mit t (8;21) eher eine mittlere Methylierungsfrequenz auf (E-Cadherin: 31,03%; HIC-1: 56,66%). Nach Diagnosestellung lebte er nur weniger als einen Monat und damit deutlich kürzer als die übrigen Patienten dieser Subgruppe.



Patient 3, der der Hochrisikogruppe angehört und innerhalb dieser Gruppe mit 1,08 Monaten die kürzeste Überlebensrate aufweist, hat ebenfalls eine mittlere Anzahl an methylierten Cytosinen. Bei einem Patienten der Hochrisikogruppe, Nummer 6, ist eine Komplettremission eingetreten. Er besitzt im Bezug auf HIC-1 zusammen mit Patient 15 den niedrigsten Methylierungsstatus (12,49%) und bei E-Cadherin mit 25,86% den dritthöchsten. Ein ähnliches Bild lässt sich bei Patient 9 finden, der mit einer relativ kurzen Überlebensdauer von 1,48 Monaten mit 9,48% (E-Cadherin) die zweitniedrigste Methylierungsanzahl aufweist, bei HIC-1 hingegen die zweithöchste (76,38%).





### **3.2.3 Besteht ein Trend zur Clusterbildung in den untersuchten Genregionen ?**

Um eine Aussage machen zu können, ob bestimmte CpG-Positionen zum Beispiel immer, häufig, selten oder nie methyliert sind oder ob sich bestimmte Methylierungsmuster bei den beiden untersuchten Genen ergeben, wurde zunächst der Grad der Methylierung einer bestimmten CpG-Position jedes Probanden in Form einer Schattierung dargestellt (s. Abb. 3.10 und 3.11).

		CpG																												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1)	Kontrollperson 1																													
2)	Kontrollperson 2																													
3)	Kontrollperson 3																													
4)	Kontrollperson 4																													
5)	Kontrollperson 5																													
6)	Kontrollperson 6																													
7)	Kontrollperson 7																													
8)	Kontrollperson 8																													

		CpG																												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
9)	Patient 1																													
10)	Patient 2																													
11)	Patient 4																													
12)	Patient 5																													
13)	Patient 8																													
14)	Patient 11																													
15)	Patient 13																													
16)	Patient 3																													
17)	Patient 6																													
18)	Patient 7																													
19)	Patient 9																													
20)	Patient 10																													
21)	Patient 12																													
22)	Patient 14																													
23)	Patient 15																													

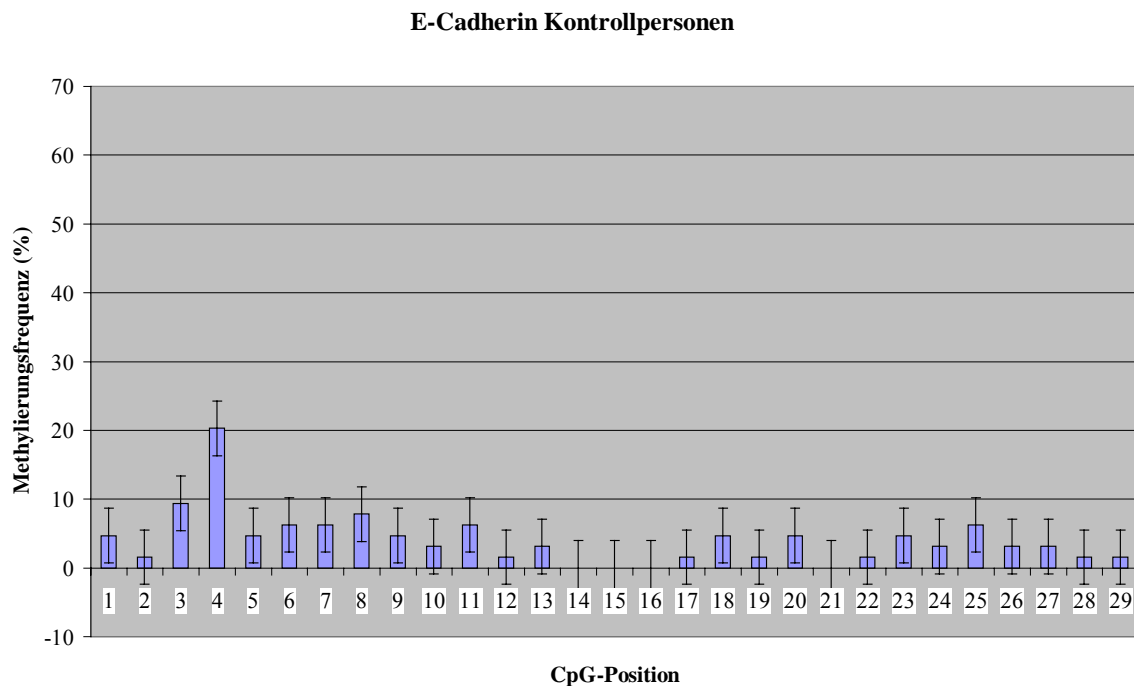
**Abbildung 3.10 Darstellung der 29 untersuchten CpG-Positionen von E-Cadherin bei Kontrollpersonen bzw. Patienten.** In den Abbildungen wird der Grad der Methylierung in Form einer Schattierung einer bestimmten Position repräsentiert. Dieser Grad ergibt sich als Summe der methylierten Cytosine einer bestimmten Position von den 8 pro Person untersuchten Klonen. Maximal können also alle 8 Klone eines Patienten ein Methyl-Cytosin besitzen , minimal keine  (0). Zu Grunde gelegt wurden 4 Kategorien methylierter Cytosine an CpG-Position x:

 0 bis 1    2 bis 3    4 bis 5    6 bis 8





Darüberhinaus wurde die Anzahl aller festgestellten methylierten Cytosine für jedes betrachtete CpG-Position berechnet.

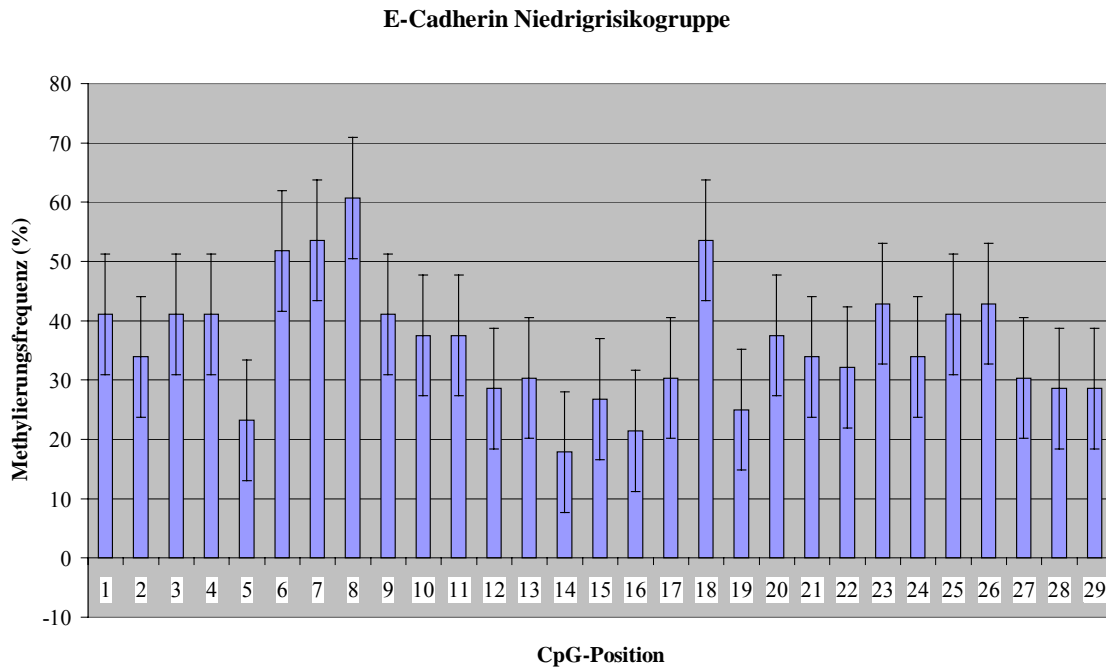


**Abbildung 3.12 Darstellung der prozentualen Methylierung von E-Cadherin an 29 untersuchten CpG-Positionen bei der Kontrollgruppe.** Für die Abbildung wurden die methylierten Cytosine an Position x von allen 8 Klonen aller 8 Kontrollpersonen addiert und bezogen auf die Anzahl der möglichen Methylierungen an dieser Position ( $8 \cdot 8 = 64$  entspricht 100%). Der errechnete Prozentwert wird in Höhe einer Säule dargestellt, die zusätzlich mit der dazugehörigen Standardabweichung versehen wurde.

Bei Untersuchung von E-Cadherin bei der Kontrollgruppe hebt sich CpG-Position 4 ganz deutlich von den übrigen ab. Mit 13 Methylierungen (20,31%) von 64 möglichen, verfügt sie über einen mehr als doppelt so hohen Methylierungsstatus wie alle übrigen Positionen. Auch im Schattierungsdiagramm findet sich an Position 4 eine Häufung.

Während jedoch beim Schattierungsdiagramm bis auf zwei alle Methylierungen im Bereich der Positionen 1 bis 11 zu finden sind, zeigt Abb. 3.12 eher 2 Häufungen: Position 1 bis 13 und 17 bis 29, was durch die Art der Kategorienwahl im Schattierungsdiagramm begründet ist.

Die CpG-Positionen 14, 15, 16 und 21 weisen keinerlei Methylierungen auf.

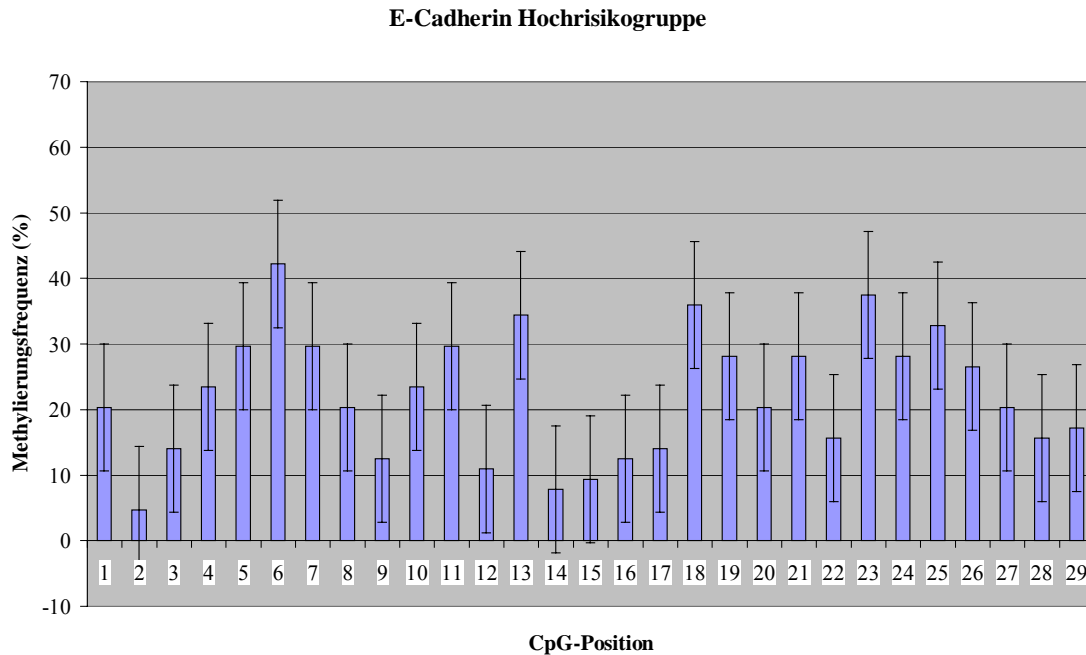


**Abbildung 3.13 Darstellung der prozentualen Methylierung von E-Cadherin an 29 untersuchten CpG-Positionen bei der Niedrigrisikogruppe.** Für die Abbildung wurden die methylierten Cytosine an Position x von allen acht Klonen aller sieben Patienten der Niedrigrisikogruppe addiert und auf die Anzahl der möglichen Methylierungen an dieser Position ( $8 \cdot 7 = 56$  entspricht 100%) bezogen. Der errechnete Prozentwert wird in Höhe einer Säule dargestellt, die zusätzlich mit der dazugehörigen Standardabweichung versehen wurde.

Für die Niedrigrisiko-Gruppe ergeben sich Häufungen bei CpG-Position 8 (34; 60,71%), 7 und 18 (30; 53,57%) sowie 6 (29; 51,79%). Keine der 29 Positionen besitzt weniger als zehn (17,86%) Methylierungen. Das Minimum befindet sich mit 10 (17,86%) methylierten Cytosinen bei CpG-Position 14.

Im Schattierungsdiagramm fallen die Patienten 2 und 5 durch viele CpG-Positionen mit sechs oder mehr Methylgruppen auf.

In beiden Abbildungen sind wie auch bei der Kontrollgruppe zwei Häufungen erkennbar: Position 1 bis 13 und 17 bis 29, wohingegen die Positionen 14, 15 und 16 eher geringer methyliert sind.



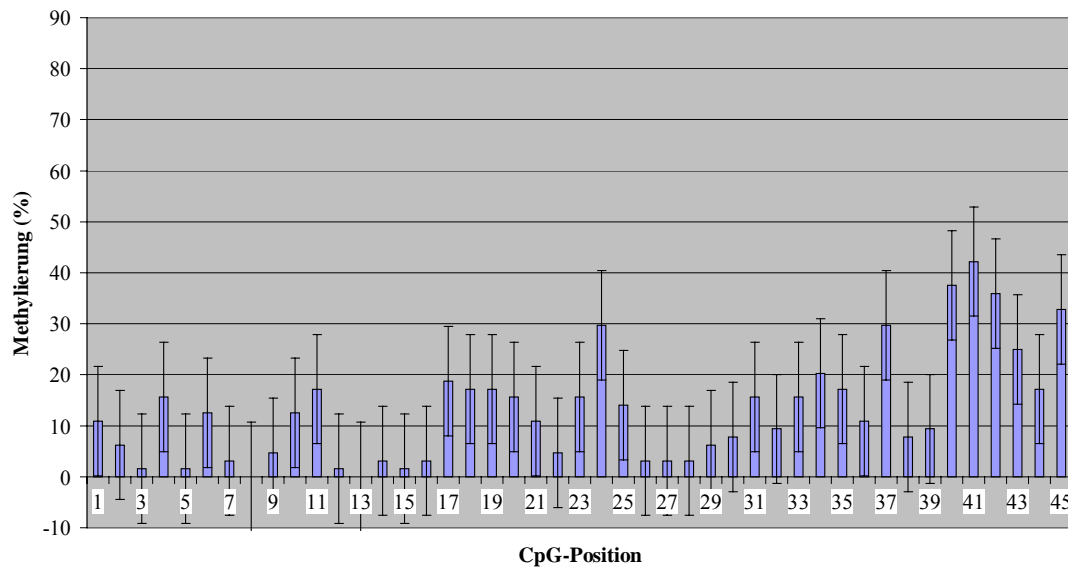
**Abbildung 3.14 Darstellung der prozentualen Methylierung von E-Cadherin an 29 untersuchten CpG-Positionen bei der Hochrisikogruppe.** Für die Abbildung wurden die methylierten Cytosine an Position x von allen acht Klonen aller acht Patienten der Hochrisikogruppe addiert und bezogen auf die Anzahl der möglichen Methylierungen an dieser Position ( $8 \cdot 8 = 64$  entspricht 100%). Der errechnete Prozentwert wird in Höhe einer Säule dargestellt, die zusätzlich mit der dazugehörigen Standardabweichung versehen wurde.

In der Hochrisiko-Gruppe wird das Maximum der Methylierungsfrequenz der Niedrigrisikogruppe nicht erreicht. Mit 27 (42,19%) methylierten Cytosinen an CpG-Position 6 (7 Methylierungen weniger) und 24 (37,5%; Position 23) bzw. 23 (35,94%; Position 18) liegen die Werte in dieser Gruppe fast durchgehend unter denen des Niedrigrisikokollektivs. Ein Minimum von 3 (4,69%) Methylierungen findet sich an CpG-Position 2.

Im Schattierungsdiagramm hebt sich Patient 7 durch viele CpG-Positionen mit sechs oder mehr methylierten Cytosinen hervor, Patient 14 dagegen durch häufiges Auftreten der Kategorie keiner oder einer Methylgruppe.

Die Clusterbildung bzw. Häufung entspricht auch hier der der Kontrollpersonen bzw. der Niedrigrisikogruppe, wobei hier CpG-Position 17 noch zusätzlich zu 14 bis 16 zu den gering methylierten hinzugezählt werden kann.

## HIC-1 Kontrollgruppe

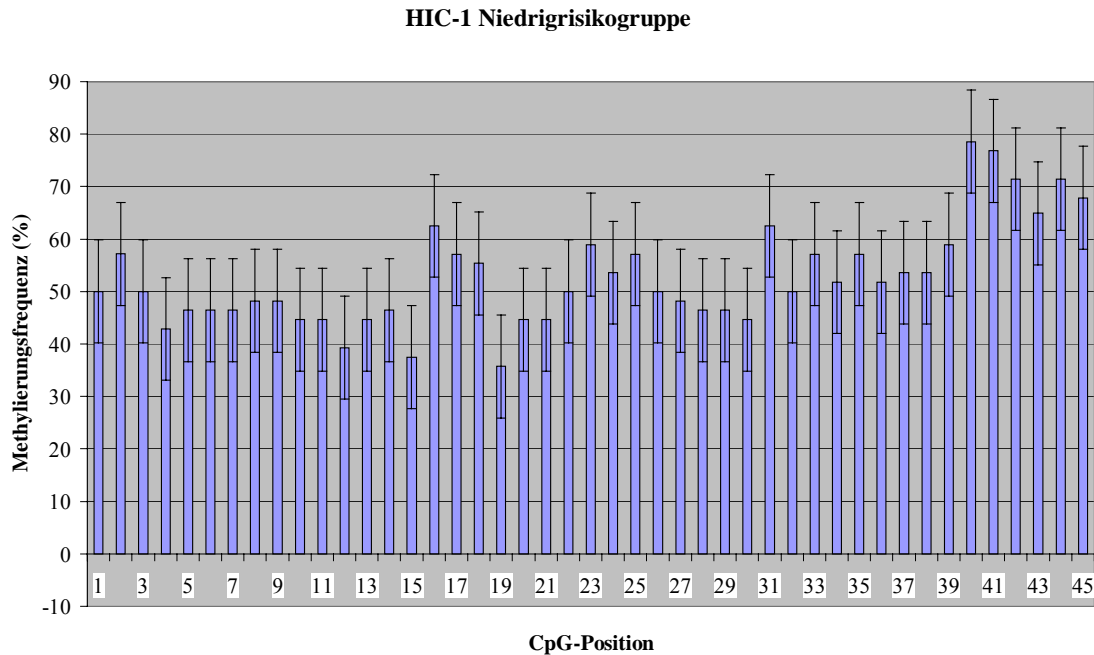


**Abbildung 3.15 Darstellung der prozentualen Methylierung von HIC-1an 45 untersuchten CpG-Positionen bei der Kontrollgruppe.** Für die Abbildung wurden die methylierten Cytosine an Position x von allen acht Klonen aller acht Kontrollpersonen addiert und bezogen auf die Anzahl der möglichen Methylierungen an dieser Position ( $8 \cdot 8 = 64$  entspricht 100%). Der errechnete Prozentwert wird in Höhe einer Säule dargestellt, die zusätzlich mit der dazugehörigen Standardabweichung versehen wurde.

Bei HIC-1 schwankte die Methylierungsrate zwischen 0 (Positionen 8 und 13) und 27 (Position 41), was einem Wert von 42,19% entspricht. Die letzten sechs CpG-Positionen (40-45) sind in der Summe deutlich höher methyliert als der übrige Teil des Gens.

Im Schattierungsdiagramm treten die Kontrollpersonen 5 und 7 durch fünf bzw. vier CpG-Positionen hervor, die sechs oder mehr methylierte Cytosine aufweisen.

Beide Abbildungen zeigen drei Anhäufungen: im vorderen, mittleren und hinteren Bereich, so dass man zumindest andeutungsweise von einer Clusterbildung sprechen kann.

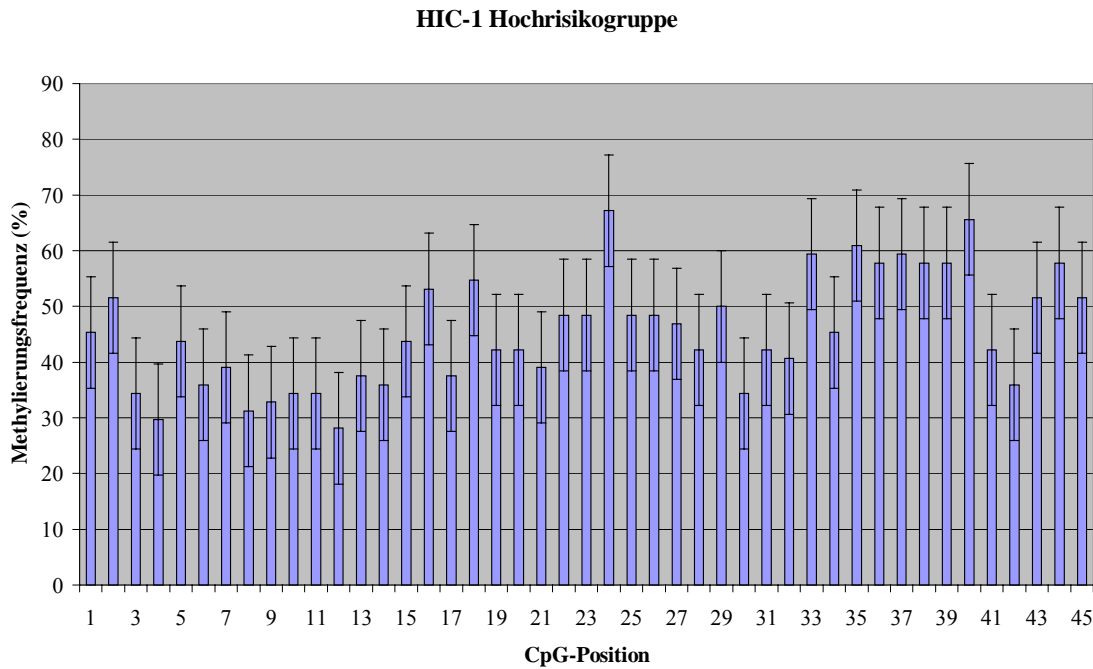


**Abbildung 3.16 Darstellung der prozentualen Methylierung von HIC-1 an 45 untersuchten CpG-Positionen bei der Niedrigrisikogruppe.** Für die Abbildung wurden die methylierten Cytosine an Position x von allen acht Klonen aller sieben Patienten der Niedrigrisikogruppe addiert und bezogen auf die Anzahl der möglichen Methylierungen an dieser Position ( $8 \cdot 7 = 56$  entspricht 100%). Der errechnete Prozentwert wird in Höhe einer Säule dargestellt, die zusätzlich mit der dazugehörigen Standardabweichung versehen wurde.

Die geringste Anzahl findet sich bei CpG-Position 19 mit 20 (35,71%) Methylierungen und steht einem Höchstwert von 44 (78,57%) an Position 40 gegenüber.

Im Schattierungsdiagramm hebt sich Patient 11 durch ausschließliche Zugehörigkeit zur ersten Kategorie hervor.

Wie auch bei den Kontrollpersonen bei der Untersuchung von HIC-1 sind die letzten sechs CpG-Positionen (40-45) in der Summe deutlich höher methyliert als der übrige Teil des Gens. Die oben beschriebene Clusterbildung mit drei Häufungen lässt sich hier ebenfalls feststellen.



**Abbildung 3.17 Darstellung der prozentualen Methylierung von HIC-1 an 45 untersuchten CpG-Positionen bei der Hochrisikogruppe.** Für die Abbildung wurden die methylierten Cytosine an Position  $x$  von allen acht Klonen aller acht Patienten der Hochrisikogruppe addiert und bezogen auf die Anzahl der möglichen Methylierungen an dieser Position ( $8 \cdot 8 = 64$  entspricht 100%). Der errechnete Prozentwert wird in Höhe einer Säule dargestellt, die zusätzlich mit der dazugehörigen Standardabweichung versehen wurde.

Bei der Hochrisiko-Gruppe findet sich das Maximum an Position 24 mit 43 (67,19%) methylierten Cytosinen in einer deutlich geringer methylierten Umgebung. Als zweithöchster Wert schließt sich Position 40 mit einer Anzahl von 42 (65,63%) an. Dies entspricht der Lage des Maximums des Patientenkollektivs mit  $t(8;21)$ . Dagegen sind nicht die letzten 6, sondern die CpG-Positionen 35 bis 40 in der Summe höher methyliert als der restliche untersuchte Genabschnitt.

Patient 10 wird im Schattierungsdiagramm durchgehend der vierten Kategorie zugeordnet.

Auch in diesem Fall deutet sich erneut die gleiche Clusterbildung an wie bei den Kontrollpersonen und der Niedrigrisikogruppe.

### 3.2.4 Ergebnisse im Überblick

**Tabelle 3.7 Absolute und prozentuale Methylierung der Kontrollpersonen (KP) und Patienten (P) bei E-Cadherin im Überblick.** Horizontal Einteilung der 3 Gruppen (Kontrollpersonen (1-8), Niedrig- (9-15) und Hochrisikopatienten (16-23)). Vertikal absolute Anzahl methylierter Cytosine (abs.) gefolgt von entsprechendem Prozentwert (%), zunächst auf jeden untersuchten Klon im Einzelnen berechnet, d.h. 29 Methyl-Cytosine entsprechen 100 % bei E-Cadherin entsprechend der Anzahl untersuchter CpG-Positionen des jeweiligen Gens). Im Anschluss Summe der methylierten Cytosine von allen 8 pro Patient untersuchten Klonen und prozentuale Umrechnung (d.h. 29·8=232 entsprechen 100% bei E-Cadherin). Letztere wie Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) grau unterlegt.

Nr.	KP/P	Klon 1		Klon 2		Klon 3		Klon 4		Klon 5		Klon 6		Klon 7		Klon 8		Σ		MW		SD	
		abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
1	1	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	3,45	1	3,45	1	3,45	3	10,34	6	2,59	0,75	2,59	1,04	3,57
2	2	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	3,45	2	6,90	3	10,34	10	34,48	16	6,90	2,00	6,90	3,42	11,80
3	3	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	3,45	2	6,90	2	6,90	2	6,90	7	3,02	0,88	3,02	0,99	3,42
4	4	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	3,45	1	3,45	1	3,45	1	3,45	4	1,72	0,50	1,73	0,53	1,84
5	5	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	3,45	1	3,45	2	6,90	3	10,34	7	3,02	0,88	3,02	1,13	3,88
6	6	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	3,45	1	3,45	3	10,34	5	2,16	0,63	2,16	1,06	3,66
7	7	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	3	10,34	7	24,14	10	4,31	1,25	4,31	2,55	8,79
8	8	0	0,00	1	3,45	1	3,45	1	3,45	2	6,90	2	6,90	6	20,69	7	24,14	20	8,60	2,50	8,62	2,56	8,84
9	1	3	10,34	5	17,24	5	17,24	7	24,14	8	27,59	10	34,48	17	58,62	17	58,62	72	31,03	9,00	31,03	5,37	18,52
10	2	20	68,97	21	72,41	23	79,31	24	82,76	25	86,21	26	89,66	28	96,55	28	96,55	195	84,05	24,38	84,05	2,97	10,25
11	4	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	3,45	1	3,45	2	6,90	2	6,90	13	44,83	19	8,19	2,38	8,19	4,37	15,08
12	5	4	13,79	7	24,14	7	24,14	10	34,48	12	41,38	14	48,28	17	58,62	17	58,62	88	37,93	11,00	37,93	4,84	16,69
13	8	0	0,00	1	3,45	2	6,90	16	55,17	17	58,62	18	62,07	21	72,41	24	82,76	99	42,67	12,38	42,67	9,75	33,63
14	11	0	0,00	0	0,00	1	3,45	3	10,34	6	20,69	7	24,14	18	62,07	21	72,41	56	24,14	7,00	24,14	8,18	28,19
15	13	4	13,79	6	20,69	6	20,69	7	24,14	7	24,14	7	24,14	11	37,93	11	37,93	59	25,43	7,38	25,43	2,45	8,43
16	3	2	6,90	2	6,90	3	10,34	4	13,79	6	20,69	6	20,69	6	20,69	7	24,14	36	15,52	4,50	15,52	2,00	6,90
17	6	1	3,45	3	10,34	3	10,34	5	17,24	5	17,24	5	17,24	20	68,97	20	68,97	60	25,86	7,75	26,72	7,69	26,51
18	7	0	0,00	1	3,45	16	55,17	18	62,07	19	65,52	20	68,97	21	72,41	22	75,86	117	50,43	14,63	50,43	8,91	30,73
19	9	0	0,00	2	6,90	2	6,90	2	6,90	3	10,34	3	10,34	3	10,34	7	24,14	22	9,48	2,75	9,48	1,98	6,83
20	10	1	3,45	1	3,45	1	3,45	3	10,34	3	10,34	3	10,34	11	37,93	11	37,93	34	14,66	4,25	14,65	4,27	14,72
21	12	0	0,00	1	3,45	1	3,45	2	6,90	2	6,90	2	6,90	9	31,03	11	37,93	45	19,40	5,63	19,40	6,76	23,31
22	14	0	0,00	1	3,45	2	6,90	2	6,90	2	6,90	2	6,90	3	10,34	3	10,34	14	6,03	1,75	6,04	0,89	3,06
23	15	3	10,34	4	13,79	7	24,14	9	31,03	12	41,38	12	41,38	14	48,28	21	72,41	82	35,34	10,25	35,34	5,85	20,17



**Tabelle 3.8 Absolute und prozentuale Methylierung der Kontrollpersonen (KP) und Patienten (P) bei HIC-1 im Überblick.** Horizontal Einteilung der 3 Gruppen (Kontrollpersonen (1-8), Niedrig- (9-15) und Hochrisikopatienten (16-23)). Vertikal absolute Anzahl methylierter Cytosine (abs.) gefolgt von entsprechendem Prozentwert (%), zunächst auf jeden untersuchten Klon im Einzelnen berechnet, d.h. 45 Methyl-Cytosine entsprechen 100 % bei HIC-1 entsprechend der Anzahl untersuchter CpG-Positionen des Gens). Im Anschluss Summe der methylierten Cytosine von allen 8 pro Patient untersuchten Klonen und prozentuale Umrechnung (d.h. 45·8=360 entsprechen 100 % bei HIC-1). Letztere wie Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) grau unterlegt.

Nr.	KP/P	Klon 1		Klon 2		Klon 3		Klon 4		Klon 5		Klon 6		Klon 7		Klon 8		Σ		MW		SD	
		abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%	abs.	%
1	1	0	0,00	0	0,00	1	2,22	1	2,22	2	4,44	4	8,89	7	15,56	8	17,78	23	6,39	2,88	6,39	3,14	3,15
2	2	0	0,00	1	2,22	2	4,44	4	8,89	6	13,33	7	15,56	10	22,22	32	71,11	62	17,22	7,75	17,22	10,35	10,65
3	3	1	2,22	1	2,22	4	8,89	4	8,89	4	8,89	4	8,89	5	11,11	24	53,33	47	13,10	5,88	13,06	7,47	7,79
4	4	1	2,22	3	6,67	8	17,78	8	17,78	9	20,00	13	28,89	17	37,78	17	37,78	76	21,11	9,50	21,11	5,90	5,19
5	5	3	6,67	4	8,89	5	11,11	5	11,11	5	11,11	5	11,11	5	11,11	5	11,11	37	10,28	4,63	10,28	0,74	0,38
6	6	2	4,44	3	6,67	6	13,33	7	15,56	7	15,56	9	20,00	10	22,22	12	26,67	56	15,56	7,00	15,56	3,38	2,93
7	7	4	8,89	4	8,89	4	8,89	4	8,89	4	8,89	4	8,89	4	8,89	4	8,89	32	8,80	4,00	8,89	0,00	0,00
8	8	1	2,22	1	2,22	4	8,89	6	13,33	8	17,78	8	17,78	8	17,78	8	17,78	44	12,22	5,50	12,22	3,12	2,73
9	1	7	15,56	7	15,56	7	15,56	10	22,22	39	86,67	44	97,78	45	100,00	45	100,00	204	56,66	25,50	56,67	19,09	42,43
10	2	9	20,00	11	24,44	12	26,67	44	97,78	44	97,78	44	97,78	44	97,78	45	100,00	253	70,27	31,63	70,28	17,38	38,62
11	4	1	2,22	8	17,78	9	20,00	9	20,00	10	22,22	10	22,22	10	22,22	23	51,11	80	22,22	10,00	22,22	6,05	13,44
12	5	44	97,78	44	97,78	44	97,78	44	97,78	44	97,78	44	97,78	44	97,78	44	97,78	352	97,78	44,00	97,78	0,00	0,00
13	8	2	4,44	23	51,11	23	51,11	43	95,56	45	100,00	45	100,00	45	100,00	45	100,00	271	75,27	33,88	75,28	16,17	35,94
14	11	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	1	2,22	3	6,67	5	11,11	9	2,50	1,13	2,50	1,89	4,19
15	13	2	4,44	7	15,56	7	15,56	7	15,56	7	15,56	43	95,56	43	95,56	45	100,00	161	44,72	20,13	44,73	19,58	43,51
16	3	0	0,00	0	0,00	9	20,00	14	31,11	19	42,22	23	51,11	23	51,11	39	86,67	127	35,27	15,88	35,28	13,10	29,11
17	6	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	0	0,00	45	100,00	45	12,49	5,63	12,50	15,91	35,36
18	7	2	4,44	23	51,11	23	51,11	45	100,00	45	100,00	45	100,00	45	100,00	45	100,00	273	75,83	34,13	75,83	16,35	36,33
19	9	16	35,56	16	35,56	18	40,00	45	100,00	45	100,00	45	100,00	45	100,00	45	100,00	275	76,38	34,38	76,39	14,68	32,61
20	10	19	42,22	44	97,78	45	100,00	45	100,00	45	100,00	45	100,00	45	100,00	45	100,00	333	92,50	41,63	92,50	9,15	20,33
21	12	2	4,44	8	17,78	9	20,00	18	40,00	19	42,22	19	42,22	36	80,00	36	80,00	157	43,61	18,38	40,83	12,45	27,68
22	14	3	6,67	8	17,78	9	20,00	11	24,44	12	26,67	13	28,89	13	28,89	14	31,11	83	23,05	10,38	23,06	3,62	8,05
23	15	1	2,22	1	2,22	2	4,44	2	4,44	3	6,67	12	26,67	12	26,67	12	26,67	45	12,49	5,63	12,50	5,32	11,82

## **4 Diskussion**

AML ist eine maligne Erkrankung des hämatopoetischen Systems, bei der gehäuft bestimmte chromosomale Aberrationen gefunden werden (GILLILAND 1998). Diese zytogenetischen Veränderungen spielen eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Gentranskription etc. (ROWLEY 1998). Zusätzlich zu diesen genetischen sind epigenetische Veränderungen gefunden worden, die bei vielen verschiedenen Neoplasien die Tumorentstehung/ -progression beeinflussen. Dazu zählt unter anderem auch eine veränderte DNA-Methylierung (BAYLIN et al. 1998, JONES & LAIRD 1999).

So besteht unter anderem ein deutlicher Unterschied im Methylierungsstatus der Promotorregionen verschiedener für die Tumorigenese relevanter Gene von AML-Patienten und Personen, die nicht an einer malignen Erkrankung leiden (MELKI et al. 1999).

AML ist, wie unter 1.1 bereits beschrieben, vom molekularbiologischen und molekulargenetischen Standpunkt betrachtet eine sehr heterogene Erkrankung. Patienten haben nach Erstdiagnosestellung in Abhängigkeit vom Markerprofil eine deutlich unterschiedliche Prognose. Ziel der vorliegenden Arbeit war es, auch epigenetische Alterationen bei der AML zu bestimmen und ihre mögliche Assoziationen mit zytogenetisch bekannten Risikogruppen zu untersuchen.

In den ersten vorliegenden Studien zur Promotormethylierung bei hämatologischen Erkrankungen oder Patienten mit AML wurde bislang keine Unterteilung in Subgruppen vorgenommen (CORN et al. 2000, MELKI et al. 1999, MELKI et al. 2000, TOYOTA et al. 2001). In der vorliegenden Arbeit werden nun Daten zweier zytogenetisch distinkter AML-Proben gegenübergestellt, die nach allgemeiner Kenntnis wie auch nach Lage der Verlaufsbeobachtungen der AML 96-Studie einer Hoch- und einer Niedrigrisikogruppe entsprechen. Es sollte festgestellt werden, ob der Methylierungsstatus sich zwischen Patienten dieser beiden Subgruppen in quantitativer und qualitativer Hinsicht unterscheidet.

## 4.1 Methodische Schwierigkeiten bei der Bestimmung des quantitativen Methylierungsstatus.

Bei der Etablierung der von Melki et al. 1999 publizierten Methode zur Untersuchung des Methylierungsstatus traten zwei wesentliche Probleme auf:

Das als Abbildung 3.2 dargestellte Elektropherogramm zeigt deutlich einen „blauen Cytosin-Hintergrund“, der eine Auswertung der Sequenzierung an vielen Stellen nicht möglich macht. Das Cytosin-Signal käme nur dann als eigenständiges Signal vor, wenn an einer bestimmten CpG-Position alle aus dem Zellpool extrahierten DNA-Stränge Methylgruppen getragen hätten (s. Abb. 2.8). Ansonsten erfolgt ein gleichzeitiges Auftreten mit einem Thymin-Signal als Doppelpeak (s. Abb. 2.8), wodurch die Intensität des Cytosin-Signals abgeschwächt wird. Die mittlere Signalintensität dieser Base fällt so immer deutlich geringer aus. Zum Teil betrug sie sogar nur ein Zehntel von der Intensität des Thymin-Signals.

Die Data Collection Software von ABI ermittelt für jede einzelne der vier Basen eine eigene, mittlere Signalintensität<sup>8</sup>. Abhängig von der Größe der Signalintensität einer Base im Vergleich zu den übrigen 3 Basen wird zum Beispiel bei schwacher Intensität deren Signal computergesteuert verstärkt, so dass im Elektropherogramm die Peak-Höhen der Basen untereinander angeglichen werden. So erfolgt eine Angleichung der Farbkanäle, was im vorliegenden Fall zur Verstärkung der blauen Farbe führt. Beim ABI PRISM 310 Genetic Analyzer erfolgt diese Anpassung der einzelnen Farbkanäle hingegen nicht, was erklärt, warum hier das blaue Hintergrundsignal ausblieb.

Außerdem besteht keine Möglichkeit zur Darstellung von relativen Häufigkeiten. Aufgrund der oben beschriebenen Verstärkung entspricht die Größe der Peaks so nicht mehr der eigentlichen Signalstärke. Eine Quantifizierung über die Beurteilung der Peak-Höhen zueinander gibt somit nicht das reale Verhältnis von methylierten zu unmethylierten Cytosinen wieder. Dies wäre nur möglich, wenn der Verstärkungsfaktor jeweils ermittelbar wäre. Der Faktor, mit dem die jeweilige Verstärkung erfolgt, kann aber nicht angegeben werden, da dieser Abgleich vom jeweiligen Fall abhängt und nicht mit Hilfe der Software einsehbar ist. Auf Grund der signifikant geringeren mittleren Signalintensität des Cytosins erfolgt durch die Software eine so deutliche Verstärkung,

---

<sup>8</sup> Nachfolgende Darstellung basiert auf Auskünften von Alexander Sartori, Applied Biosystems, Deutschland

dass ein kontinuierliches „blaues“ Hintergrundsignal entsteht, wie die Abbildung 3.2 zeigt.

Weitere Recherchen bei Applied Biosystems ergaben jedoch, dass ein Rückschluss aus den Peak-Höhen auf das tatsächliche Verhältnis dieser Basen in der Originalprobe aus verschiedenen weiteren Gründen generell nicht möglich ist. Der erfolgreiche Einbau der farbmarkierten ddNTPs hängt von vielen Faktoren ab, die zum Teil nicht beeinflussbar sind. So sind zum Beispiel die Farbstoffmoleküle [F] an den ddNTP-Molekülen sehr groß und unterscheiden sich vor allem untereinander in ihrer chemischen Struktur, so dass diese [F]ddNTP mit den dNTP nicht mehr viel gemeinsam haben. Um hier Abhilfe zu schaffen, besitzt die im Ready-Reaction-Kit verwendete Taq-Polymerase eine Mutation im aktiven Zentrum, die zu einer erhöhten Toleranz gegenüber [F]ddNTP führt (AmpliTaq FS). Die Fluoreszenzintensitäten der einzelnen Farbstoffe unterscheiden sich z.T. erheblich. In der BigDye Chemie hat man diese Unterschiede über einen physikalischen "Trick" jedoch weitgehend ausgeglichen. Darüber hinaus gibt es keinen konstanten Faktor, mit dem die Software einzelne Farben anhebt oder absenkt. Unter "idealen" Bedingungen würde hierdurch ein relativ homogenes Signalbild entstehen. In der Realität spielen aber weitere Faktoren eine Rolle, die die Höhe (Einbaurrate) einzelner Basen im Elektropherogramm beeinflussen. Zum einen ist die Sequenzumgebung der einzubauenden Base zu nennen, da es einen Unterschied macht, ob ein Cytosin auf ein Adenin oder ein Thymin folgt. Zum anderen sind eventuell vorhandene Sekundärstrukturen zu erwähnen, die in einzelnen Fällen nur durch eine spezielle thermische Behandlung der DNA überwunden werden können. Auf Grund der geschilderten Probleme musste somit auf eine andere Methode zur Analyse des Methylierungsstatus zurückgegriffen werden (s. 3.1.2).

## 4.2 Bewertung der Ergebnisse

### 4.2.1 Kontrollpersonen versus AML-Patienten

Vergleicht man den prozentualen Methylierungsstatus der Kontrollpersonen mit dem der AML-Patienten, so lässt sich bei beiden untersuchten Genen ein signifikanter

Unterschied feststellen ( $p < 0,0001$  für E-Cadherin;  $p = 0,0031$  für HIC-1). Die DNA der Kontrollpersonen ist sowohl bei E-Cadherin als auch bei HIC-1 überwiegend deutlich geringer methyliert als die der untersuchten 15 Patienten, was in Übereinstimmung mit den von Melki erhobenen Daten steht (MELKI et al. 1999).

Im Einzelfall bestehen jedoch durchaus Überschneidungen zwischen beiden Gruppen:

- Patient 14 unterschreitet mit einer prozentualen Methylierung von 2,5 % im Bereich des HIC-1-Gens auch deutlich die Methylierungsfrequenz der Kontrollen.
- Die Patienten 6 und 15 liegen nur 0,93 % oberhalb des durchschnittlichen Methylierungsstatus der Kontrollpersonen bei HIC-1.
- Die Patienten 4 und 14 besitzen im Bereich des HIC-1-Promotors prozentual nicht mehr methylierte Cytosine als Kontrollpersonen mit hoher Methylierungsfrequenz. Gleiches trifft auf die beiden genannten Patienten und Patient 9 im Fall des analysierten E-Cadherin-Promotors zu.

Auch in der absoluten Anzahl der Methylierungen heben sich die an AML-Erkrankten deutlich vom Kollektiv der Kontrollpersonen ab. Bei Untersuchung von E-Cadherin finden sich nur in 4 von 64 analysierten Klonen mehr als 3 Methylgruppen bei den Kontrollen. Es gibt keine Kontrollperson, die im untersuchten Abschnitt mehr als 20 Methylierungen besitzt. Hingegen verfügen die meisten Patienten über mehr als 30, ein Drittel sogar über mehr als 80 methylierte CpG-Dinukleotide. Aber auch hier gibt es wiederum Ausnahmen:

- Bei Kontrollperson 2 findet sich ein Klon mit 10 Methylierungsereignissen bei E-Cadherin bzw. mit 32 methylierten Cytosinen bei HIC-1, was erheblich mehr Methylierungen sind als sich bei vielen der AML-Patienten innerhalb eines Klons finden lassen.
- Das Ergebnis der Patienten 4, 6, 11, 14 und 15 ist dem der Kontrollgruppe ähnlich.
- Patient 11 verfügt in allen 8 Klonen über eine Methylierungsanzahl, die dem unteren Bereich der Kontrollgruppe entspricht.

Ein Vergleich der Ergebnisse mit denen der Arbeitsgruppe um Melki zeigt für E-Cadherin:

- Die Normalkontrollen weisen kaum oder keine Methylierung auf.

- Die Patienten hingegen besitzen nicht nur in der 3'-Region des untersuchten Promotorabschnittes vermehrt Methylierungen, sondern auch am 5'-Ende (MELKI et al. 1999).

Auch bei HIC-1 lassen sich unterschiedliche Ergebnisse finden:

- Auch hier wurde eine signifikante Methylierung bei den Kontrollpersonen gefunden.
- Die Methylierung beschränkte sich jedoch nicht nur auf Exon 3, sondern war auch in Intron 2 nachweisbar. Daher wird im Gegensatz zu der Melki-Arbeitsgruppe die Methylierung von Intron 2, wie sie dort nur bei den AML-Patienten auftrat, nach den vorliegenden Ergebnissen nicht für leukämie-spezifisch gehalten.

Deutliche Unterschiede des Methylierungsstatus von E-Cadherin bei Leukämie-Patienten und Kontrollpersonen sind auch in verschiedenen anderen Publikationen zu finden (CORN et al. 2000, MELKI et al. 2000). Für HIC-1 gibt es allerdings nur eine vergleichbare Studie von Melki et al. 1999, da in den übrigen Fällen die Promotorregion und nicht die Zentralregion in Bezug auf Methylierung untersucht wurde.

### 4.2.2 Niedrigrisiko versus Hochrisikogruppe

#### 4.2.2.1 Methylierungsstatus

Es besteht keine eindeutige Korrelation zwischen Methylierungsstatus und untersuchter AML-Subgruppe.

Der durchschnittliche prozentuale Methylierungsstatus der Niedrig- und der Hochrisikogruppe unterscheidet sich nicht signifikant ( $p=0,2319$  für E-Cadherin,  $p=0,8401$  für HIC-1).

Beide Patientenkollektive weisen bei E-Cadherin zwei bis drei Patienten mit Methylierungen in Größenordnung der Kontrollpersonen auf. Nur Patient 2 besitzt bei Betrachtung von E-Cadherin in allen acht Klonen eine große Anzahl methylierter Cytosine. Dieser Patient gehört jedoch der Niedrigrisikogruppe an. Ansonsten finden sich keine gravierenden Unterschiede.

Bei HIC-1 ergibt sich für die beiden AML-Subgruppen ein ähnliches Bild. Die Mittelwerte differieren kaum. In beiden Gruppen gibt es Patienten, die sowohl sehr hoch als auch sehr gering methylierte Klone aufweisen.

Sowohl der Minimal- als auch der Maximalwert bei der Untersuchung von HIC-1 finden sich bei Patienten der Niedrigrisikogruppe. Diese beiden Werte setzen sich deutlich von den Werten der übrigen 5 Patienten dieser Gruppe ab. In der Hochrisikogruppe schwanken die Ergebnisse untereinander nicht so deutlich wie bei den Patienten der Niedrigrisikogruppe.

Allerdings weicht die mittlere absolute Anzahl methylierter Klone bei E-Cadherin im Gegensatz zu HIC-1 deutlich mit 84 (Hochrisikogruppe) und 51,25 (Niedrigrisikogruppe) voneinander ab. Bei der Hochrisikogruppe schwanken die Ergebnisse untereinander allerdings nicht so deutlich wie bei den Patienten der Niedrigrisikogruppe.

Bisher gibt es nur wenige Studien, bei denen der Methylierungsstatus bestimmter Gene bei verschiedenen AML-Subgruppen untereinander verglichen wird (CHEN et al. 2003). Meist werden Gene von AML-Patienten, die nicht weiter in Subgruppen klassifiziert sind, untersucht, so dass kaum Vergleiche mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen möglich sind (CORN et al. 2000, MELKI et al. 2000, TOYOTA et al. 2001). Einige Studien lassen im Fall von *p15* vermuten, dass Leukämien im Laufe der Zeit eine zunehmende Hypermethylierung entwickeln, die dann dem jeweiligen Zellklon mit der dichtesten Methylierung, in diesem Fall des Gens *p15*, einen Selektionsvorteil verschafft (CAMERON et al. 1999, QUESNEL et al. 1998, UCHIDA et al. 1997). Ein nicht signifikanter Unterschied zwischen den beiden Subgruppen wäre eventuell dadurch zu erklären, dass die Menge der Methylierung u.U. abhängig ist von der Dauer des Bestehens der Leukämie und nicht von der Zugehörigkeit zu einer bestimmten Subgruppe.

Weitere mögliche Ursachen, warum keine signifikant unterschiedliche Methylierungsfrequenz gefunden wird, werden im folgenden detailliert nach verschiedenen Gesichtspunkten diskutiert.

### 4.2.2.2 Blastenanteil

Ein grundsätzliches Problem bei der Untersuchung der beiden Patientenkollektive ist die Tatsache, dass die Blastenanteile der zur Verfügung gestellten Proben nicht

mindestens 70 % betragen, wie es ursprünglich vorgesehen war, sondern sich eine große Schwankungsbreite von 30-85 % Blasten findet.

Der Blastenanteil steht für die statistische Wahrscheinlichkeit, mit der normale oder Blasten-DNA kloniert wurde. Es fällt auf, dass viele Patienten (z.B. bei HIC-1 die Patienten 1, 2, 7, 8, 9 und 13) Klone aufweisen, die stark methyliert sind und gleichzeitig solche, deren Anzahl von Methylierungen eher denen der Kontrollgruppe entspricht. Eine mögliche Erklärung wäre, dass erstere von DNA aus Blastenzellen vervielfältigt wurden. Letztere DNA-Klone könnten hingegen von „gesunden“ Zellen stammen. Auch die Arbeitsgruppe um E. Cameron vermutet, dass unmethylierte Allele, die sie neben hochmethylierten nachgewiesen haben, von normalen Lymphocyten stammen (CAMERON et al. 1999). Denn obwohl die von ihnen eingesetzten Proben vorherrschend Blasten enthielten, könnten die Ergebnisse die Zufälligkeit des Klonierungsprozesses widerspiegeln (CAMERON et al. 1999).

Es wurde versucht, diese grundlegende Differenz der einzelnen Proben durch naive Adjustierung in einen untereinander vergleichbareren Wert zu beheben. Die Ergebnisse bei den Patienten 2 und 14 z.B. lassen sich allerdings auch nach der Adjustierung nicht mit der Hypothese vereinbaren. Patient 2 besitzt einen niedrigen Blastenanteil, aber in allen 8 Klonen eine große Anzahl von Methylierungen. Im Gegenteil dazu weist Patient 14 einen hohen Blastenanteil, doch in sämtlichen untersuchten Klonen nur wenig methylierte Cytosine auf. Als Ursache hierfür wäre denkbar, dass DNA einer „gesunden“ Zelle bzw. einer Blastenzelle häufiger bzw. weniger häufig kloniert wurde als es statistisch wahrscheinlich war. Dies wäre auf Grund der geringen Anzahl von Klonen (8 bzw. 16 bezogen auf beide Gene) durchaus denkbar.

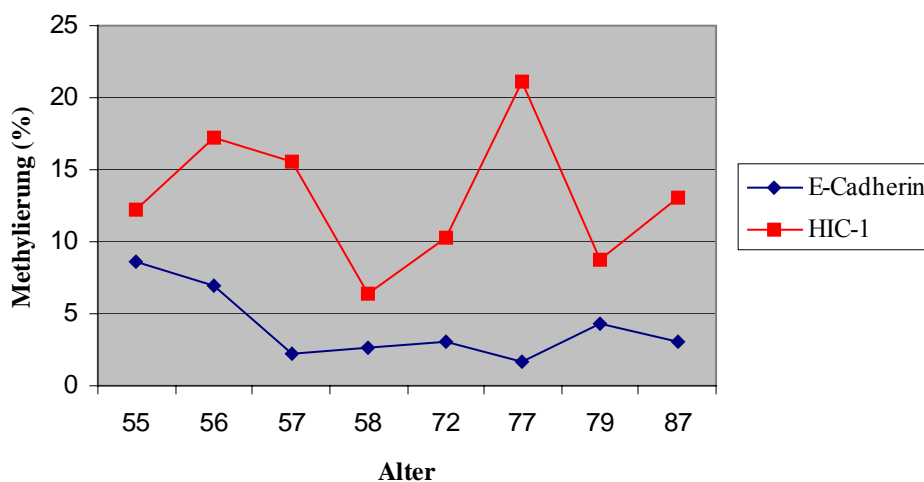
### 4.2.2.3 Alter

Alter ist ein wesentlicher Risikofaktor bei der Entstehung der meisten malignen Erkrankungen (ERSHLER & LONGO 1997). Die Inzidenz von Neoplasien steigt nach dem 60. Lebensjahr deutlich an (LANDIS et al. 1998). Epigenetische Veränderungen der DNA, zu denen auch Hypermethylierungen zählen, werden mitverantwortlich gemacht für Altern und die damit verbundene höhere Inzidenz von Krebserkrankungen (HOLLIDAY 1987, ISSA 1999). Z.B. findet sich bei Kolon- und Rektumkarzinomen immer eine Hypermethylierung der Promotorregion des Östrogen-Rezeptor-Gens, wohingegen bei



jungen Menschen kein und bei Älteren ein teilweiser Anstieg von Methylierungen auftritt (ISSA et al. 1994). Für HIC-1 konnte in normaler Kolon-Mukosa keine altersabhängige Methylierung nachgewiesen werden (AHUJA et al. 1998). In normalem Prostatagewebe dagegen finden sich teilweise Methylierungen mit Hinweisen auf Altersabhängigkeit (BAYLIN et al. 1998). Warum nur bestimmte Gene und diese z.T. auch nur in bestimmten Geweben eine altersabhängige Methylierung aufweisen, ist zur Zeit noch ungeklärt (AHUJA et al. 1998).

In der Literatur konnten keine Angaben gefunden werden, ob im Fall von AML-Erkrankungen eine altersabhängige Methylierung des HIC-1-Promotors auftritt. Diese könnte den im Vergleich zu E-Cadherin höheren Methylierungsgrad der Kontrollgruppe erklären, die sich mit einem Durchschnittsalter von 67,6 Jahren eher aus Menschen fortgeschrittenen Alters zusammensetzt. Auf eine stratifizierte Analyse der vorliegenden Daten wurde aber aufgrund der insgesamt geringen Gruppengröße verzichtet.



**Abbildung 4.1 Korrelation von Alter und Methylierung.** Die Abbildung zeigt deutlich, dass weder eine positive, noch eine negative Korrelation von Alter und Methylierungsstatus der einzelnen Patienten bei keinem der untersuchten Gene vorhanden ist. Daher wurde auch auf die Darstellung einer Korrelationsgerade verzichtet.

#### 4.2.2.4 Überlebenszeit

Es finden sich einige auffällige Ergebnisse:

- Patient 6 lebt nach Stellung der Erstdiagnose noch mindestens 33,8 Monate und besitzt bei HIC-1 nur 12,5% Methyl-Cytosine.

- Ähnlich Patient 15, der für einen Hochrisikopatienten mit ca. 21 Monaten noch eine relativ lange Überlebenszeit nach Diagnosestellung besaß. Auch dieser Patient weist „nur“ 12,5% Methylierungen bei HIC-1 auf.
- Patient 11 lebt mindestens noch 29 Monate und besitzt in beiden untersuchten Genen eine sehr geringe prozentuale Methylierung.
- Mit relativ hohem Methylierungsstatus in beiden Genen starb Patient 7 bereits 1,22 Monate nach Bekanntwerden der Erkrankung.
- Ebenso Patient 1 (Tod nach 0,66 Monaten), dem als Angehörigen der Niedrigrisikogruppe prognostisch eine längere Überlebenszeit zugeordnet worden wäre.

Trotzdem findet sich generell keine inverse Korrelation zwischen Methylierungsstatus und Überlebenszeit. Patient 2 zum Beispiel lebt mindestens noch 41,29 Monate nach Erstdiagnose, obwohl er in beiden untersuchten Genen über einen extrem hohen Methylierungsstatus verfügt.

Bei dem Ergebnis bleibt zu berücksichtigen, dass die Überlebenszeit eine Größe ist, die von vielen verschiedenen prognostischen Variablen abhängig ist. Zu den sogenannten „pretreatment“ Faktoren gehören die bereits in der Einleitung beschriebenen Faktoren Alter, chronische Erkrankungen, akute medizinische Probleme und genereller Status (s. 1.1.8).

Ferner zählen dazu die Chromosomenaberrationen. Patienten mit  $t(8;21)$  und  $inv(16)$  haben extrem gute Prognosen (FAUCI et al. 1998). Für Patienten ohne zytogenetische Veränderungen oder mit  $t(15;17)$  sind weniger günstige Verläufe mit Hochdosis-Cytarabin beschrieben (FAUCI et al. 1998). Patienten mit  $del(5q)$ ,  $-7$  und Veränderungen, die den kurzen Arm von Chromosom 12 betreffen, haben eine sehr schlechte Prognose (FAUCI et al. 1998).

Auch das Auftreten von Symptomen weit vor Diagnosestellung sowie vorangehende Erkrankungen des hämatologischen Systems sind Faktoren, die offensichtlich sowohl die CR-Rate verringern als auch mit einer kürzeren Überlebenszeit einhergehen (FAUCI et al. 1998). Patienten, die länger als einen Monat vor Diagnosestellung der AML eine Anämie, Leukopenie oder Thrombocytopenie aufweisen, haben eine geringere CR-Rate als Patienten ohne diese Blutbildveränderungen (FAUCI et al. 1998). Je länger diese Symptomatik andauert, desto schlechter erscheint ein Ansprechen auf Chemotherapie (FAUCI et al. 1998).

Außerdem gibt es weitere Prognosefaktoren, wie z.B. FAB-Klassifikation, Auerstäbchen oder die Multidrogenresistenz, deren Bedeutung jedoch noch nicht abschließend gesichert ist (FAUCI et al. 1998).

Darüber hinaus gibt es noch behandlungsbedingte Faktoren, wie z.B. die Zeitspanne bis zum kompletten Verschwinden der Blastenpopulation (FAUCI et al. 1998).

Auch die Anzahl der Induktionszyklen bis zum Erreichen einer CR ist von Bedeutung (FAUCI et al. 1998). Die Remissionsdauer ist dann länger, wenn die CR nach nur einem Zyklus erreicht wurde als im Fall von Patienten, die dazu mehrere Zyklen benötigt haben (FAUCI et al. 1998). Eine bessere Prognose ist auch für Patienten mit weniger als ein Prozent Blasten im Knochenmark bei Erreichen der CR beschrieben (FAUCI et al. 1998).

Bisher ist noch ungeklärt, ob Methylierung in entscheidendem Zusammenhang mit der Ansprechbarkeit auf Chemotherapeutika steht.

Bei der Einschätzung der Ergebnisse ist zu berücksichtigen, dass eine Adjustierung auf die oben genannten prognostischen Faktoren nicht erfolgt ist, da die dafür benötigten Daten nicht verfügbar waren. Durch Wahl zweier zytogenetisch definierter Gruppen wurde versucht, eine homogene zytogenetisch definierte Subgruppe zu bilden. Doch trotz gleicher Zytogenetik haben die Patienten einer AML-Subgruppe zum Teil sehr unterschiedliche Überlebenszeiten. Patient 1 der Niedrigrisikogruppe, der unerwartet schnell nach weniger als einem Monat stirbt und Patient 6, der als Angehöriger der Hochrisikogruppe eine überraschend lange Überlebenszeit von mindestens 33 Monaten besitzt, zeigen zum Beispiel, dass eine zytogenetische Einteilung in Niedrig- und Hochrisikopatienten nicht immer das wirkliche Risiko widerspiegelt. Diese gravierenden Unterschiede in der Überlebenszeit von Patienten auch innerhalb einer definierten Risikogruppe lassen nicht verwundern, dass auch das molekularbiologische Ergebnis von Patienten einer Subgruppe deutliche Variationen aufweist.

### 4.2.3 Methylierungsmuster

Epigenetische Veränderungen der DNA, zu denen auch die Methylierung zählt, spielen eine wichtige Rolle bei der Tumorigenese (BAYLIN & HERMAN 2000, JONES & LAIRD 1999, ROUNTREE et al. 2001). Hypermethylierung der Promotorregion verschiedener Tumorsuppressorgene führt zum Transkriptionsstopp des zugehörigen Gens. Wie die

dafür erforderliche Art der Methylierung im Einzelnen aussieht, ist allerdings noch ungeklärt. Folgende Möglichkeiten werden diskutiert:

- Die Methylierung einer bestimmten CpG-Position innerhalb einer CpG-Insel ist entscheidend.
- Quantitativ ist eine bestimmte Menge von Methylierungen im Bereich der Promotorregion erforderlich, unabhängig von ihrer Verteilung. Cameron et al. haben z.B. für *p15* nachgewiesen, dass Methylierung von 30 bis 40 % der CpG-Positionen erforderlich ist, um einen vollständigen Transkriptionsstopp zu erzielen, während ein Grad von 6 bis 8 % die Expression lediglich verringert (CAMERON et al. 1999). Ähnliche Ergebnisse wurden für den *Rb*- und den RSV LTR-Promotor gefunden, wie auch für E-Cadherin (CORN et al. 2000, HSIEH 1994, OHTANI-FUJITA et al. 1993).
- Mehrere CpG-Inseln müssen in einer spezifischen Verteilung methyliert vorliegen („Muster“).

Eine Beantwortung dieser Frage wäre äußerst relevant, da die Bestimmung eines Methylierungsmusters ungleich aufwändiger und teurer ist als die Untersuchung einer ausgewählten Position, die durch eine methylspezifische PCR analysiert werden könnte. Hypermethylierung von Tumorsuppressorgenen ist vermutlich ein frühes Ereignis in der Tumorigenese (BELINSKY et al. 1998). Hierdurch wird die Möglichkeit eröffnet, Hypermethylierung als Biomarker für die frühe Diagnose von Tumoren zu benutzen (BAYLIN et al. 2001, ESTELLER et al. 2001). Ferner konnte gezeigt werden, dass Hypermethylierung benutzt werden kann, um Vorhersagen über die Ansprechrate auf alkylierende Medikamente, die 5-Jahres-„disease-free“-Überlebensrate oder das Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen zu machen (ESTELLER et al. 2000, ESTELLER et al. 2002, PARK et al. 2001).

Nach Auswertung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit kann festgehalten werden:

- Bei keinem der beiden untersuchten Gene findet sich ein CpG-Dinukleotid, das durchgehend in allen 8 Klonen bei allen 15 untersuchten Patienten methyliert vorliegt.
- Die gefundene Methylierungsmenge schwankt bei E-Cadherin und HIC-1 zwischen 6,03 und 84,1% bzw. 2,5 und 97,8%. Da keine Bestimmung der Expression vorgenommen wurde, kann keine sichere Aussage darüber getroffen werden, ob bei den untersuchten Patienten eine vollständige Suppression der Transkription vorhanden ist.

- Ein deutliches „Muster“ bei der Methylierung der untersuchten Genabschnitte lässt sich weder bei E-Cadherin noch bei HIC-1 finden, sondern wie unter 3.2.3 bereits angedeutet, höchstens vermuten. Es wurde darauf verzichtet, statistisch ein mögliches Methylierungsmuster zu errechnen. Dies wäre zwar möglich, doch würde sich bei Untersuchung weiterer oder noch einmal derselben Patienten mit großer Wahrscheinlichkeit ein völlig verändertes bzw. nicht reproduzierbares Ergebnis zeigen.

Es kann also keine sichere Beantwortung der Frage erfolgen, da wie unter 4.2.2.2 bereits diskutiert, mit großer Wahrscheinlichkeit Klone von gesunden Zellen mit analysiert wurden. Dies würde z.B nicht ausschließen, dass in allen Blastenzellen eine bestimmte CpG-Position durchgehend methyliert vorliegt. Klone von gesunden Lymphocyten, die signifikant geringer methyliert sind (s. 3.2.2.1) und ebenfalls in das Ergebnis mit einfließen, lassen diese CpG-Dinukleotidstelle jedoch nicht deutlich hervortreten. Ebenso werden Menge als auch Verteilung der Methylierung durch Überlagerung von den Ergebnissen normaler Lymphocyten beeinflusst. Hier wäre denkbar, dass eine Methylierung von z. B. mindestens 20 % der untersuchten Positionen ausreichen könnte, um einen Transkriptionsstopp auszulösen, was aber, wie oben bereits beschrieben, ebenfalls nicht erkannt werden kann, da das Ergebnis durch Klone von gesunden Lymphocyten „verfälscht“ wird.

Auch die Arbeitsgruppe um Melki hat für beide Gene sehr heterogene Methylierungsmuster erhalten (MELKI et al.1999).

### 4.2.4 E-Cadherin und HIC-1

Wie bereits beschrieben (1.2.5 und 4.2.3) wird veränderte Methylierung von Promotorregionen bestimmter Gene zunehmend neben genetischen Mutationen bei der Entstehung von Neoplasien für wichtig gehalten. Es bleibt aber weiterhin ungeklärt, welche Mechanismen zu diesen veränderten Methylierungsmustern führen (CHIM et al. 2003). Bei Leukämien und Kolonkarzinomen wurden erhöhte Mengen des Enzyms DNA-Methyltransferase gefunden, was als Erklärung allein allerdings nicht ausreicht, da so erhöhte Methylierung von Promotorregionen generell zu erwarten wäre, was ein unspezifisches Ereignis darstellen würde (CHIM et al. 2003, ISSA et al. 1993, MIZUNO et al.

2001). Eine Reihe von Studien haben allerdings gezeigt, dass bestimmte Tumorentitäten spezifische „Methylierungs-Profile“ aufweisen (COSTELLO et al. 2000, ESTELLER et al. 2001).

Vergleicht man die Ergebnisse verschiedener Studien, die seit 2000 die Methylierungsfrequenz verschiedener Gene bei AML-Patienten zum Gegenstand haben, so werden z.T. erhebliche Unterschiede deutlich (CHIM 2003, CORN 2000, MELKI et al. 2000, TOYATA et al. 2001). Melki et al. fanden E-Cadherin bei 69 % der untersuchten Patienten methyliert, Corn et al. bei 32 %. Chim et al., die ausschließlich DNA von Patienten mit Akuter Promyelozyten Leukämie (APL, einer Leukämieuntergruppe mit überwiegend guter Prognose und 15;17-Translokation) analysierten, konnten Methylierung von E-Cadherin nur bei 7 % der Patienten nachweisen.

Dabei bleibt zu berücksichtigen, dass die einzelnen Arbeitsgruppen z.T. unterschiedliche Methoden (MSP, z.T. MSP mit anschließender Sequenzierung des PCR-Produktes) zum Nachweis angewandt haben. In der vorliegenden Arbeit wurde wiederum eine andere Methode gewählt, bei der nicht angegeben kann, bei wie viel Prozent der Patienten Methylierung nachweisbar ist, sondern lediglich die durchschnittliche Methylierung der untersuchten Genabschnitte (E-Cadherin 29,2%, HIC-1 49,6%).

Einige Proben weisen bei HIC-1 eine große, bei E-Cadherin dagegen eine geringe Anzahl von Methylierungen auf, wie z.B. im Fall von Patient 11. Im umgekehrten Fall trifft dies nicht so deutlich zu. Patienten mit vielen methylierten Cytosinen bei E-Cadherin besitzen auch einen hohen Methylierungsstatus bei HIC-1, z.B. die Patienten 2 und 7. Insbesondere das deutlich von den übrigen Studien abweichende Resultat bei APL-Patienten lässt vermuten, dass u.U. Unterschiede des Methylierungsprofils bei unterschiedlichen AML-Subgruppen bestehen. Dies wäre eine mögliche Erklärung, warum einige der untersuchten Patienten zwar eine hohe Methylierungsfrequenz des einen, aber nicht des anderen Gens besitzen. Für die Methylierung von *SOCS1* konnte z. B. ein signifikanter Unterschied ( $p=0,014$ ) bei verschiedenen zytogenetischen Subgruppen festgestellt werden (CHEN et al. 2003). Auf Grund einer multifaktoriellen Pathogenese wäre es erforderlich, eine Vielzahl von Genen zu analysieren und jeweils deutlich mehr als 8 Klone zu betrachten, da die Untersuchung von zwei mehr oder weniger zufällig ausgewählten Genen einer derartig komplexen Erkrankung wie AML sicherlich nicht gerecht werden kann.

Der Methylierungsstatus ist bei HIC-1 sowohl bei den Kontrollpersonen als auch bei beiden AML-Subgruppen höher als bei E-Cadherin. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass eine leichte altersabhängige Methylierung von HIC-1 (s. 4.2.2.3) von einer krankheitspezifischen Methylierung überlagert wird.

### 4.3 Schlussfolgerung aus den Ergebnissen

Die Hypothese, dass AML-Patienten, die zytogenetisch einer Niedrigrisikogruppe angehören, weniger Methylierung in Promotorregionen bestimmter Gene aufweisen als Patienten aus einer Hochrisikogruppe, denen eine schlechtere Prognose zugeordnet wird, konnte nicht verifiziert werden. Dieses Ergebnis kann verschiedene Ursachen haben.

Eine Möglichkeit wäre, dass kein Zusammenhang zwischen der Erkrankung AML und Methylierung besteht.

Weiter wäre denkbar, dass Hypermethylierung bestimmter Gene die Leukämogenese beeinflusst, jedoch dies nicht für die beiden ausgewählten Gene zutrifft. Da aber nicht nur in der vorliegenden Arbeit, sondern auch in zahlreichen weiteren Studien signifikante Unterschiede des Methylierungsstatus von E-Cadherin und HIC-1 bei AML-Patienten und nicht an einer malignen Erkrankung leidenden Kontrollpersonen nachgewiesen werden konnten, erscheint dies eher unwahrscheinlich.

Des Weiteren könnte die angewandte Methode bzw. bestimmte Versuchsvoraussetzungen Ursache für das erhaltene Ergebnis sein, die bereits diskutiert wurden.

Ferner stellt sich die Frage, ob die Klassifikation der beiden Subgruppen nach zytogenetischen Gesichtspunkten zur Untersuchung der zu Grunde liegenden Fragestellung sinnvoll ist. Zu dem „Phänotyp“ AML gehören sehr komplexe Krankheitsbilder, was sich auch in den vielen möglichen Klassifizierungsmöglichkeiten bei AML widerspiegelt. Trotz z.B. gleicher Zytogenetik liegen der Erkrankung AML unterschiedliche Ursachen und damit andere Kausalzusammenhänge zu Grunde. Außerdem sind bei den Chromosomenaberrationen große Gene betroffen. Die molekularbiologischen Feinheiten eines bestimmten zytogenetischen Typs können daher differieren. Eine genauere Klassifikation dieser minimalen Unterschiede wäre

sicherlich von Interesse, denn auch innerhalb relativ reiner zyto-genetischer Subgruppen von AML zeigen sich erhebliche Unterschiede z.B. in Bezug auf Ansprechraten von Therapien und deren Dauer (APPELBAUM 1999). Es wurden bereits weitere molekulare Diagnostik-Tests entwickelt, um diese Unterschiede zu erklären, wie z. B. Analysen von Mutationen oder Expressionsveränderungen bestimmter Onkogene (RAS, p53, p73 und BCL2), Immunphänotypisierung von Oberflächenantigenen, Studien des Zellzyklus und Expressionsstudien von Genen, die assoziiert sind mit Medikamenten-Resistenz (BANKER et al. 1997, BANKER et al. 1998, CAMPOS et al. 1993, LI 1999, WATTEL et al. 1994).

Für die vorliegende Arbeit wurde angenommen, dass bei Wahl von zwei definierten Subgruppen eine möglichst große gruppenspezifische Homogenität erhalten bliebe, die einen direkten Gruppenvergleich erlaubt. Auswahl und Aufteilung der Patienten nach Überlebenszeit im Anschluss an die Erstdiagnose, was in Bezug auf die Fragestellung zunächst näher gelegen hätte, hätte die unter 4.2.2.4 beschriebenen Aspekte nicht berücksichtigt.

Bei der festgestellten großen Variationsbreite innerhalb einer Subgruppe, lässt sich sicherlich annehmen, dass auch hier zwischen Überlebenszeit und Methylierungsausmaß keine Korrelation bestünde.

Möglicherweise erreicht die bisherige molekularbiologische Analyse hier Grenzen, wo bei hohem zeitlichen Aufwand nur zwei Promotororte bei einer geringen Fallzahl analysiert werden können.

Daher wäre es weitergehend erforderlich, mit Hilfe neuerer Techniken, etwa der Chip-basierten Expressionsanalyse, die Promotoruntersuchungen zu vertiefen. Ein in Entwicklung befindlicher „Methylierungs“-Chip würde erlauben, bei einer grösseren Fallzahl multiple Genregionen simultan zu analysieren und so die entscheidenden Kriterien für eine aberrante Promotormethylierung bei verschiedenen AML-Subgruppen nachzuweisen.



## **5 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurde der Methylierungsstatus von zwei zytogenetisch definierten Formen der akuten myeloischen Leukämie verglichen. Es wurde DNA von sieben Patienten mit t(8;21), die der Niedrigrisikogruppe zugeteilt werden und acht Patienten mit Monosomie 5 bzw. 7 oder del(5q) bzw. del(7q), die eine schlechtere Prognose besitzen und der Hochrisikogruppe angehören sowie die DNA von acht nicht an einer malignen Erkrankung leidenden Kontrollpersonen untersucht. Es sollte festgestellt werden, ob sich bestimmte prognostisch divergente AML-Subgruppen bezüglich der Methylierungsfrequenzen oder des Methylierungsphänotyps unterscheiden.

Eine semiquantitative Abschätzung des Methylierungsstatus durch PCR-Produkt-Sequenzierung analog Melki et al. war für diesen Zweck jedoch nicht geeignet, so dass eine erheblich arbeits- und kostenintensivere Methode (Klonierung und automatische Sequenzierung) durchgeführt werden musste.

Es konnte bei allen AML-Patienten eine signifikant höhere Methylierungsfrequenz als bei den Kontrollpersonen nachgewiesen werden, was bedeutet, dass Methylierung im Sinne einer epigenetischen Alteration offenbar eine Relevanz bei der Entstehung der AML besitzt.

Im Unterschied zur vorangehenden Aussage lässt eine Analyse der zytogenetischen Subgruppe jedoch keinen Unterschied in Bezug auf Topographie und Häufigkeit methylierter CpG-Dinukleotide erkennen.

Anhand der untersuchten zwei Promotorregionen (E-Cadherin und HIC-1) kann also festgestellt werden, dass aberrante Methylierung bei AML eine häufige Begleiterscheinung ist, aber nach vorläufiger Erkenntnis keine Präferenz zu bestimmten zytogenetischen Risikokonstellationen aufweist.

Weitere Untersuchungen zu dieser Frage wären erforderlich, um die pathogenetische Bedeutung von Promotormethylierung bei der AML einzuschätzen und darauf basierend mögliche therapeutische Substanzen, wie z.B. Demethylierungsagenzien für die Behandlung fortgeschrittener Leukämien zu entwickeln.

## **6 Literaturverzeichnis**

- Ahuja, N., Q. Li, et al. (1998). "Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer." Cancer Res **58**(23): 5489-94.
- Ahuja, N., A. L. Mohan, et al. (1997). "Association between CpG island methylation and microsatellite instability in colorectal cancer." Cancer Res **57**(16): 3370-4.
- Andrieu, V., I. Radford-Weiss, et al. (1996). "Molecular detection of t(8;21)/AML1-ETO in AML M1/M2: correlation with cytogenetics, morphology and immunophenotype." Br J Haematol **92**(4): 855-65.
- Aniello, F., A. Locascio, et al. (1996). "Isolation of cDNA clones encoding DNA methyltransferase of sea urchin *P. lividus*: expression during embryonic development." Gene **178**(1-2): 57-61.
- Antequera, F. and A. Bird (1993). "Number of CpG islands and genes in human and mouse." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(24): 11995-9.
- Appelbaum, F. R. (1999). "Molecular diagnosis and clinical decisions in adult acute leukemia." Semin Hematol **36**(4): 401-10.
- Armeanu, S., H. J. Buhring, et al. (1995). "E-cadherin is functionally involved in the maturation of the erythroid lineage." J Cell Biol **131**(1): 243-9.
- Baenkler, H.-W., D. Fritze et al. (2001). "Akute Leukämien." MLP Duale Reihe Innere Medizin (Sonderausgabe), Thieme, S. 1404-16.
- Banker, D. E., M. Groudine, et al. (1997). "Measurement of spontaneous and therapeutic agent-induced apoptosis with BCL-2 protein expression in acute myeloid leukemia." Blood **89**(1): 243-55.
- Banker, D. E., M. Groudine, et al. (1998). "Cell cycle perturbations in acute myeloid leukemia samples following in vitro exposures to therapeutic agents." Leuk Res **22**(3): 221-39.
- Battle, E., E. Sancho, et al. (2000). "The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells." Nat Cell Biol **2**(2): 84-9.
- Baylin, S. B., M. Esteller, et al. (2001). "Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer." Hum Mol Genet **10**(7): 687-92.
- Baylin, S. B. and J. G. Herman (2000). "DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics." Trends Genet **16**(4): 168-74.

- Baylin, S. B., J. G. Herman, et al. (1998). "Alterations in DNA methylation: a fundamental aspect of neoplasia." Adv Cancer Res **72**: 141-96.
- Baylin, S. B., J. W. Hoppener, et al. (1986). "DNA methylation patterns of the calcitonin gene in human lung cancers and lymphomas." Cancer Res **46**(6): 2917-22.
- Baylin, S. B., M. Makos, et al. (1991). "Abnormal patterns of DNA methylation in human neoplasia: potential consequences for tumor progression." Cancer Cells **3**(10): 383-90.
- Belinsky, S. A., K. J. Nikula, et al. (1998). "Aberrant methylation of p16(INK4a) is an early event in lung cancer and a potential biomarker for early diagnosis." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(20): 11891-6.
- Bender, C. M., M. L. Gonzalgo, et al. (1999). "Roles of cell division and gene transcription in the methylation of CpG islands." Mol Cell Biol **19**(10): 6690-8.
- Bender, C. M., J. M. Zingg, et al. (1998a). "DNA methylation as a target for drug design." Pharm Res **15**(2): 175-87.
- Bender, C. M., M. M. Pao, et al. (1998b). "Inhibition of DNA methylation by 5-aza-2'-deoxycytidine suppresses the growth of human tumor cell lines." Cancer Res **58**(1): 95-101.
- Ben-Hattar, J. and J. Jiricny (1988). "Methylation of single CpG dinucleotides within a promoter element of the Herpes simplex virus tk gene reduces its transcription in vivo." Gene **65**(2): 219-27.
- Bestor, T., A. Laudano, et al. (1988). "Cloning and sequencing of a cDNA encoding DNA methyltransferase of mouse cells. The carboxyl-terminal domain of the mammalian enzymes is related to bacterial restriction methyltransferases." J Mol Biol **203**(4): 971-83.
- Bestor, T. H. (1992). "Activation of mammalian DNA methyltransferase by cleavage of a Zn binding regulatory domain." Embo J **11**(7): 2611-7.
- Birchmeier, W. and J. Behrens (1994). "Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness." Biochim Biophys Acta **1198**(1): 11-26.
- Bird, A. (1992). "The essentials of DNA methylation." Cell **70**(1): 5-8.
- Bird, A. (2002). "DNA methylation patterns and epigenetic memory." Genes Dev **16**(1): 6-21.
- Bird, A. P. (1986). "CpG-rich islands and the function of DNA methylation." Nature **321**(6067): 209-13.
- Bird, A. P. (1995). "Gene number, noise reduction and biological complexity." Trends Genet **11**(3): 94-100.

- Bird, A. P., M. H. Taggart, et al. (1987). "Non-methylated CpG-rich islands at the human alpha-globin locus: implications for evolution of the alpha-globin pseudogene." Embo J **6**(4): 999-1004.
- Bitter, M. A., M. M. Le Beau, et al. (1987). "Associations between morphology, karyotype, and clinical features in myeloid leukemias." Hum Pathol **18**(3): 211-25.
- Boeke, J., O. Ammerpohl, et al. (2000). "The minimal repression domain of MBD2b overlaps with the methyl-CpG-binding domain and binds directly to Sin3A." J Biol Chem **275**(45): 34963-7.
- Boultonwood, J., S. Lewis, et al. (1994). "The 5q-syndrome." Blood **84**(10): 3253-60.
- Boyes, J. and A. Bird (1992). "Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein." Embo J **11**(1): 327-33.
- Brandeis, M., M. Ariel, et al. (1993). "Dynamics of DNA methylation during development." Bioessays **15**(11): 709-13.
- Busque, L. and D. G. Gilliland (1993). "Clonal evolution in acute myeloid leukemia." Blood **82**(2): 337-42.
- Cameron, E. E., S. B. Baylin, et al. (1999). "p15(INK4B) CpG island methylation in primary acute leukemia is heterogeneous and suggests density as a critical factor for transcriptional silencing." Blood **94**(7): 2445-51.
- Campos, L., J. P. Rouault, et al. (1993). "High expression of bcl-2 protein in acute myeloid leukemia cells is associated with poor response to chemotherapy." Blood **81**(11): 3091-6.
- Charrin C. (1998). "Del(5q) in myeloid malignancies." Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Anomalies/del5qID1092.html>
- Chen, C. Y., W. Tsay, et al. (2003). "SOCS1 methylation in patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia." Genes Chromosomes Cancer **37**(3): 300-5.
- Chen, R. Z., U. Pettersson, et al. (1998). "DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates." Nature **395**(6697): 89-93.
- Cheson, B. D., P. A. Cassileth, et al. (1990). "Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia." J Clin Oncol **8**(5): 813-9.
- Chim, C. S., S. Y. Wong, et al. (2003). "Aberrant gene promoter methylation in acute promyelocytic leukaemia: profile and prognostic significance." Br J Haematol **122**(4): 571-8.

- Clark, S. J., J. Harrison, et al. (1994). "High sensitivity mapping of methylated cytosines." Nucleic Acids Res **22**(15): 2990-7.
- Colot, V. and J. L. Rossignol (1999). "Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device." Bioessays **21**(5): 402-11.
- Corn, P. G., B. D. Smith, et al. (2000). "E-cadherin expression is silenced by 5' CpG island methylation in acute leukemia." Clin Cancer Res **6**(11): 4243-8.
- Costello, J. F., M. C. Fruhwald, et al. (2000). "Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns." Nat Genet **24**(2): 132-8.
- Cross, S. H., R. R. Meehan, et al. (1997). "A component of the transcriptional repressor MeCP1 shares a motif with DNA methyltransferase and HRX proteins." Nat Genet **16**(3): 256-9.
- Desangles F. (1999). "-7/del(7q) in adults." Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromocancer/Anomalies/del7qID1093.html>
- Devereux, S. (1991). "Therapy associated leukaemia." Blood Rev **5**(3): 138-45.
- Dewald, G. W., M. P. Davis, et al. (1985). "Clinical characteristics and prognosis of 50 patients with a myeloproliferative syndrome and deletion of part of the long arm of chromosome 5." Blood **66**(1): 189-97.
- Eads, C. A., K. D. Danenberg, et al. (1999). "CpG island hypermethylation in human colorectal tumors is not associated with DNA methyltransferase overexpression." Cancer Res **59**(10): 2302-6.
- Eden, S. and H. Cedar (1994). "Role of DNA methylation in the regulation of transcription." Curr Opin Genet Dev **4**(2): 255-9.
- Efstratiadis, A. (1994). "Parental imprinting of autosomal mammalian genes." Curr Opin Genet Dev **4**(2): 265-80.
- Ehrlich, M., M. A. Gama-Sosa, et al. (1982). "Amount and distribution of 5-methylcytosine in human DNA from different types of tissues of cells." Nucleic Acids Res **10**(8): 2709-21.
- Erickson, P., J. Gao, et al. (1992). "Identification of breakpoints in t(8;21) acute myelogenous leukemia and isolation of a fusion transcript, AML1/ETO, with similarity to Drosophila segmentation gene, runt." Blood **80**(7): 1825-31.
- Ershler, W. B. and D. L. Longo (1997). "Aging and cancer: issues of basic and clinical science." J Natl Cancer Inst **89**(20): 1489-97.
- Esteller, M., P. G. Corn, et al. (2001). "A gene hypermethylation profile of human cancer." Cancer Res **61**(8): 3225-9.

- Esteller, M., G. Gaidano, et al. (2002). "Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma." J Natl Cancer Inst **94**(1): 26-32.
- Esteller, M., J. Garcia-Foncillas, et al. (2000). "Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents." N Engl J Med **343**(19): 1350-4.
- Fauci, A.S., Braunwald, E., et al. (1998). "Acute and chronic myeloid leukemia." Harrison's Principles of Internal Medicine 14<sup>th</sup> Edition. New York; St. Louis; San Francisco; Auckland; Bogota; Caracas; Lissabon; London; Madrid; Neu Dehli; San Juan; Singapur; Sydney; Tokio; Toronto, McGraw-Hill, S.684-95.
- Feinberg, A. P., C. W. Gehrke, et al. (1988). "Reduced genomic 5-methylcytosine content in human colonic neoplasia." Cancer Res **48**(5): 1159-61.
- Feurig-Buske, M., Hiddemann, W., et al. (2002). "Pathogenese und Biologie der Leukämien." Internist. Springer Verlag, **43**:1179-89.
- Fischer, K., S. Frohling, et al. (1997). "Molecular cytogenetic delineation of deletions and translocations involving chromosome band 7q22 in myeloid leukemias." Blood **89**(6): 2036-41.
- Bernstein, R., P. Philip et al. (1984). "Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982. Abnormalities of chromosome 7 resulting in monosomy 7 or in deletion of the long arm (7q-): Review of translocations, breakpoints and associated abnormalities." Cancer Genet Cytogenet **11**:300-3.
- Fujii, H., M. A. Biel, et al. (1998). "Methylation of the HIC-1 candidate tumor suppressor gene in human breast cancer." Oncogene **16**(16): 2159-64.
- Fuks, F., W. A. Burgers, et al. (2000). "DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity." Nat Genet **24**(1): 88-91.
- Gilliland, D. G. (1998). "Molecular genetics of human leukemia." Leukemia **12 Suppl 1**: S7-12.
- Goetz, S. E., B. Vogelstein, et al. (1985). "Hypomethylation of DNA from benign and malignant human colon neoplasms." Science **228**(4696): 187-90.
- Graff, J. R., J. G. Herman, et al. (1995). "E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas." Cancer Res **55**(22): 5195-9.
- Graff, J. R., J. G. Herman, et al. (1997). "Mapping patterns of CpG island methylation in normal and neoplastic cells implicates both upstream and downstream regions in de novo methylation." J Biol Chem **272**(35): 22322-9.
- Grimwade, D. (2001). "The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia." Best Pract Res Clin Haematol **14**(3): 497-529.

- Grimwade, D., H. Walker, et al. (1998). "The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties." Blood **92**(7): 2322-33.
- Gruenbaum, Y., H. Cedar, et al. (1982). "Substrate and sequence specificity of a eukaryotic DNA methylase." Nature **295**(5850): 620-2.
- Grunstein, M. (1997). "Histone acetylation in chromatin structure and transcription." Nature **389**(6649): 349-52.
- Guerardel, C., S. Deltour, et al. (2001). "Identification in the human candidate tumor suppressor gene HIC-1 of a new major alternative TATA-less promoter positively regulated by p53." J Biol Chem **276**(5): 3078-89.
- Hare, J. T. and J. H. Taylor (1985). "One role for DNA methylation in vertebrate cells is strand discrimination in mismatch repair." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(21): 7350-4.
- Hayashi, M., Y. Tokuchi, et al. (2001). "Reduced HIC-1 gene expression in non-small cell lung cancer and its clinical significance." Anticancer Res **21**(1B): 535-40.
- Hayashi, Y. (2000). "The molecular genetics of recurring chromosome abnormalities in acute myeloid leukemia." Semin Hematol **37**(4): 368-80.
- Heil, G., A. Ganser (2002). " Diagnostik und Therapie der akuten myeloischen Leukämien." Der Onkologe. Springer Verlag, **8**: 686-692.
- Hendrich, B. and A. Bird (1998). "Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins." Mol Cell Biol **18**(11): 6538-47.
- Herman, J. G. (1999). "Hypermethylation of tumor suppressor genes in cancer." Semin Cancer Biol **9**(5): 359-67.
- Herman, J. G., C. I. Civin, et al. (1997). "Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies." Cancer Res **57**(5): 837-41.
- Holliday, R. (1987). "The inheritance of epigenetic defects." Science **238**(4824): 163-70.
- Hsieh, C. L. (1994). "Dependence of transcriptional repression on CpG methylation density." Mol Cell Biol **14**(8): 5487-94.
- Hsieh, C. L. (1999). "In vivo activity of murine de novo methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b." Mol Cell Biol **19**(12): 8211-8.
- Huret, J.L. (1997). "T(8;21)(q22;q22)." Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol. URL: <http://www.infobiogen.fr/services/chromcancer/Anomalies/t0821.html>

- Hutter, J. J., Jr., F. Hecht, et al. (1984). "Bone marrow monosomy 7: hematologic and clinical manifestations in childhood and adolescence." Hematol Oncol **2**(1): 5-12.
- Issa, J. P. (1999). "Aging, DNA methylation and cancer." Crit Rev Oncol Hematol **32**(1): 31-43.
- Issa, J. P. (2000). "The epigenetics of colorectal cancer." Ann N Y Acad Sci **910**: 140-53; discussion 153-5.
- Issa, J. P., Y. L. Ottaviano, et al. (1994). "Methylation of the oestrogen receptor CpG island links ageing and neoplasia in human colon." Nat Genet **7**(4): 536-40.
- Issa, J. P., P. M. Vertino, et al. (1993). "Increased cytosine DNA-methyltransferase activity during colon cancer progression." J Natl Cancer Inst **85**(15): 1235-40.
- Issa, J. P., B. A. Zehnbaauer, et al. (1996). "The estrogen receptor CpG island is methylated in most hematopoietic neoplasms." Cancer Res **56**(5): 973-77.
- Issa, J. P., B. A. Zehnbaauer, et al. (1997). "HIC1 hypermethylation is a late event in hematopoietic neoplasms." Cancer Res **57**(9): 1678-81.
- Jacobs, R. H., M. A. Cornbleet, et al. (1986). "Prognostic implications of morphology and karyotype in primary myelodysplastic syndromes." Blood **67**(6): 1765-72.
- Jeppesen, P. and B. M. Turner (1993). "The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression." Cell **74**(2): 281-9.
- Johansson, B., F. Mertens, et al. (1993). "Cytogenetic deletion maps of hematologic neoplasms: circumstantial evidence for tumor suppressor loci." Genes Chromosomes Cancer **8**(4): 205-18.
- Johnson, E. J., S. W. Scherer, et al. (1996). "Molecular definition of a narrow interval at 7q22.1 associated with myelodysplasia." Blood **87**(9): 3579-86.
- Jones, P. A. (1996). "DNA methylation errors and cancer." Cancer Res **56**(11): 2463-7.
- Jones, P. A. and P. W. Laird (1999). "Cancer epigenetics comes of age." Nat Genet **21**(2): 163-7.
- Jones, P. A., M. J. Wolkowicz, et al. (1990). "De novo methylation of the MyoD1 CpG island during the establishment of immortal cell lines." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(16): 6117-21.
- Jones, P. L., G. J. Veenstra, et al. (1998). "Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription." Nat Genet **19**(2): 187-91.
- Kanai, Y., A. M. Hui, et al. (1999). "DNA hypermethylation at the D17S5 locus and reduced HIC-1 mRNA expression are associated with hepatocarcinogenesis." Hepatology **29**(3): 703-9.



- Kanai, Y., S. Ushijima, et al. (1998). "DNA hypermethylation at the D17S5 locus is associated with gastric carcinogenesis." Cancer Lett **122**(1-2): 135-41.
- Karayiannakis, A. J., K. N. Syrigos, et al. (1998). "Aberrant E-cadherin expression associated with loss of differentiation and advanced stage in human pancreatic cancer." Anticancer Res **18**(6A): 4177-80.
- Kompetenznetzwerk Leukämie Rundbrief Nr. 7 (Februar 2004). S.2
- Koolman, J., K.-H. Röhm (1998). "Genom." Taschenatlas der Biochemie. Stuttgart; New York, Thieme, S. 228-9.
- Kuismanen, S. A., M. T. Holmberg, et al. (1999). "Epigenetic phenotypes distinguish microsatellite-stable and -unstable colorectal cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(22): 12661-6.
- Laird, P. W., L. Jackson-Grusby, et al. (1995). "Suppression of intestinal neoplasia by DNA hypomethylation." Cell **81**(2): 197-205.
- Laird, P. W. and R. Jaenisch (1994). "DNA methylation and cancer." Hum Mol Genet **3**(Spec No): 1487-95.
- Landis, S. H., T. Murray, et al. (1998). "Cancer statistics, 1998." CA Cancer J Clin **48**(1): 6-29.
- Lantry, L. E., Z. Zhang, et al. (1999). "5-Aza-2'-deoxycytidine is chemopreventive in a 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-induced primary mouse lung tumor model." Carcinogenesis **20**(2): 343-6.
- Law, M.L., G.-Y. Cai et al. (1986). "Chromosomal assignment of the human erythropoietin gene and its DNA polymorphism." PNAS **83**: 6920.
- Le Beau, M. M., K. S. Albain, et al. (1986). "Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leukemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7." J Clin Oncol **4**(3): 325-45.
- Le Beau, M. M., R. Espinosa, 3rd, et al. (1996). "Cytogenetic and molecular delineation of a region of chromosome 7 commonly deleted in malignant myeloid diseases." Blood **88**(6): 1930-5.
- Lewis, J. D., R. R. Meehan, et al. (1992). "Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA." Cell **69**(6): 905-14.
- Li, E., T. H. Bestor, et al. (1992). "Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality." Cell **69**(6): 915-26.
- Li, Q., K. J. Kopecky, et al. (1999). "Estrogen receptor methylation is associated with improved survival in adult acute myeloid leukemia." Clin Cancer Res **5**(5): 1077-84.

- Löffler, G., Petrides, P. E. (1998a). "Stabile Mutationen als Ursache vererbbarer und erworbener Erkrankungen." *Biochemie und Pathobiochemie* 6.Auflage. Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Budapest; Honkong; London; Mailand; Paris; Singapur; Tokio, S.326-30.
- Löffler, G., Petrides, P. E. (1998b). "Aufbau der DNA." *Biochemie und Pathobiochemie* 6.Auflage. Berlin; Heidelberg; New York; Barcelona; Budapest; Honkong; London; Mailand; Paris; Singapur; Tokio, S.156-158.
- Lowenberg, B., J. R. Downing, et al. (1999). "Acute myeloid leukemia." *N Engl J Med* **341**(14): 1051-62.
- Luna-Fineman, S., K. M. Shannon, et al. (1995). "Childhood monosomy 7: epidemiology, biology, and mechanistic implications." *Blood* **85**(8): 1985-99.
- Lyon, M. F. (1961). "Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.)." *Naturwissenschaften* **190**: 372-3.
- Makos, M., B. D. Nelkin, et al. (1992). "Distinct hypermethylation patterns occur at altered chromosome loci in human lung and colon cancer." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(5): 1929-33.
- Makos, M., B. D. Nelkin, et al. (1993). "Regional DNA hypermethylation at D17S5 precedes 17p structural changes in the progression of renal tumors." *Cancer Res* **53**(12): 2719-22.
- Maloisel, L. and J. L. Rossignol (1998). "Suppression of crossing-over by DNA methylation in *Ascobolus*." *Genes Dev* **12**(9): 1381-9.
- Marcucci, G., M. A. Caligiuri, et al. (2000). "Molecular and clinical advances in core binding factor primary acute myeloid leukemia: a paradigm for translational research in malignant hematology." *Cancer Invest* **18**(8): 768-80.
- Martinez-Climent, J. A., N. J. Lane, et al. (1995). "Clinical and prognostic significance of chromosomal abnormalities in childhood acute myeloid leukemia de novo." *Leukemia* **9**(1): 95-101.
- Meehan, R. R., J. D. Lewis, et al. (1989). "Identification of a mammalian protein that binds specifically to DNA containing methylated CpGs." *Cell* **58**(3): 499-507.
- Melki, J. R., P. C. Vincent, et al. (2000). "Hypermethylation of E-cadherin in leukemia." *Blood* **95**(10): 3208-13.
- Melki, J. R., P. C. Vincent, et al. (1999). "Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia." *Cancer Res* **59**(15): 3730-40.
- Mizuno, S., T. Chijiwa, et al. (2001). "Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia." *Blood* **97**(5): 1172-9.

- Momparler, R. L., G. E. Rivard, et al. (1985). "Clinical trial on 5-aza-2'-deoxycytidine in patients with acute leukemia." Pharmacol Ther **30**(3): 277-86.
- Monk, M. (1990). "Changes in DNA methylation during mouse embryonic development in relation to X-chromosome activity and imprinting." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **326**(1235): 299-312.
- Monk, M., M. Boubelik, et al. (1987). "Temporal and regional changes in DNA methylation in the embryonic, extraembryonic and germ cell lineages during mouse embryo development." Development **99**(3): 371-82.
- Mrozek, K., K. Heinonen, et al. (2000). "Prognostic value of cytogenetic findings in adults with acute myeloid leukemia." Int J Hematol **72**(3): 261-71.
- Mrozek, K., K. Heinonen, et al. (1997). "Clinical significance of cytogenetics in acute myeloid leukemia." Semin Oncol **24**(1): 17-31.
- Nagarajan, L. (1995). "Molecular analysis of the 5q- chromosome." Leuk Lymphoma **17**(5-6): 361-6.
- Nakamura, H., K. Kuriyama, et al. (1997). "Morphological subtyping of acute myeloid leukemia with maturation (AML-M2): homogeneous pink-colored cytoplasm of mature neutrophils is most characteristic of AML-M2 with t(8;21)." Leukemia **11**(5): 651-5.
- Nakao, M. (2001). "Epigenetics: interaction of DNA methylation and chromatin." Gene **278**(1-2): 25-31.
- Nakayama, M., M. Wada, et al. (1998). "Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias." Blood **92**(11): 4296-307.
- Nan, X., H. H. Ng, et al. (1998). "Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex." Nature **393**(6683): 386-9.
- Nelkin, B. D., D. Przepiora, et al. (1991). "Abnormal methylation of the calcitonin gene marks progression of chronic myelogenous leukemia." Blood **77**(11): 2431-4.
- Neuman, W. L., C. M. Rubin, et al. (1992). "Chromosomal loss and deletion are the most common mechanisms for loss of heterozygosity from chromosomes 5 and 7 in malignant myeloid disorders." Blood **79**(6): 1501-10.
- Ng, H. H., P. Jeppesen, et al. (2000). "Active repression of methylated genes by the chromosomal protein MBD1." Mol Cell Biol **20**(4): 1394-406.
- Ng, H. H., Y. Zhang, et al. (1999). "MBD2 is a transcriptional repressor belonging to the MeCP1 histone deacetylase complex." Nat Genet **23**(1): 58-61.

- Nowel, P.C. and D.A. Hungerford (1960). "A minute chromosome in human granulocytic leukaemia." Science **132**, 1497.
- Nucifora, G., J. I. Dickstein, et al. (1994). "Correlation between cell morphology and expression of the AML1/ETO chimeric transcript in patients with acute myeloid leukemia without the t(8;21)." Leukemia **8**(9): 1533-8.
- Ohtani-Fujita, N., T. Fujita, et al. (1993). "CpG methylation inactivates the promoter activity of the human retinoblastoma tumor-suppressor gene." Oncogene **8**(4): 1063-7.
- Oka, H., H. Shiozaki, et al. (1993). "Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis." Cancer Res **53**(7): 1696-701.
- Okano, M., D. W. Bell, et al. (1999). "DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development." Cell **99**(3): 247-57.
- Okano, M., S. Xie, et al. (1998). "Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases." Nat Genet **19**(3): 219-20.
- Park, T. J., S. U. Han, et al. (2001). "Methylation of O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase gene is associated significantly with K-ras mutation, lymph node invasion, tumor staging, and disease free survival in patients with gastric carcinoma." Cancer **92**(11): 2760-8.
- Parlier, V., G. van Melle, et al. (1994). "Hematologic, clinical, and cytogenetic analysis in 109 patients with primary myelodysplastic syndrome. Prognostic significance of morphology and chromosome findings." Cancer Genet Cytogenet **78**(2): 219-31.
- Paulsen, M. and A. C. Ferguson-Smith (2001). "DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease." J Pathol **195**(1): 97-110.
- Pedersen, B. and I. M. Jensen (1991). "Clinical and prognostic implications of chromosome 5q deletions: 96 high resolution studied patients." Leukemia **5**(7): 566-73.
- Pradhan, S., A. Bacolla, et al. (1999). "Recombinant human DNA (cytosine-5) methyltransferase. I. Expression, purification, and comparison of de novo and maintenance methylation." J Biol Chem **274**(46): 33002-10.
- Quesnel, B., G. Guillermin, et al. (1998). "Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression." Blood **91**(8): 2985-90.
- Raimondi, S. C., M. N. Chang, et al. (1999). "Chromosomal abnormalities in 478 children with acute myeloid leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in a cooperative pediatric oncology group study-POG 8821." Blood **94**(11): 3707-16.

- Razin, A. and R. Shemer (1995). "DNA methylation in early development." Hum Mol Genet **4 Spec No**: 1751-5.
- Rivard, G. E., R. L. Momparler, et al. (1981). "Phase I study on 5-aza-2'-deoxycytidine in children with acute leukemia." Leuk Res **5(6)**: 453-62.
- Robertson, K. D. (2001). "DNA methylation, methyltransferases, and cancer." Oncogene **20(24)**: 3139-55.
- Robertson, K. D., E. Uzvolgyi, et al. (1999). "The human DNA methyltransferases (DNMTs) 1, 3a and 3b: coordinate mRNA expression in normal tissues and overexpression in tumors." Nucleic Acids Res **27(11)**: 2291-8.
- Rountree, M. R., K. E. Bachman, et al. (2000). "DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci." Nat Genet **25(3)**: 269-77.
- Rountree, M. R., K. E. Bachman, et al. (2001). "DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer." Oncogene **20(24)**: 3156-65.
- Rowley, J. D. (1973). "Identificaton of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia." Ann Genet **16(2)**: 109-12.
- Rowley, J. D. (1998). "The critical role of chromosome translocations in human leukemias." Annu Rev Genet **32**: 495-519.
- Rowley, J. D. and J. R. Testa (1982). "Chromosome abnormalities in malignant hematologic diseases." Adv Cancer Res **36**: 103-48.
- Sakai, T., J. Toguchida, et al. (1991). "Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene." Am J Hum Genet **48(5)**: 880-8.
- Saiki, R. K., S. Scharf et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230(4732)**:1350-4.
- Saltman, D. L., G. M. Dolganov, et al. (1993). "A physical map of 15 loci on human chromosome 5q23-q33 by two-color fluorescence in situ hybridization." Genomics **16(3)**: 726-32.
- Sandler, D. P. (1995). "Recent studies in leukemia epidemiology." Curr Opin Oncol **7(1)**: 12-8.
- Sanger, F., S. Nicklen et al. (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci **74(12)**: 5463-7.
- Santini, V., H. M. Kantarjian, et al. (2001). "Changes in DNA methylation in neoplasia: pathophysiology and therapeutic implications." Ann Intern Med **134(7)**: 573-86.

- Schiffer, C. A., E. J. Lee, et al. (1989). "Prognostic impact of cytogenetic abnormalities in patients with de novo acute nonlymphocytic leukemia." Blood **73**(1): 263-70.
- Shemer, R., A. Walsh, et al. (1990). "Tissue-specific methylation patterns and expression of the human apolipoprotein AI gene." J Biol Chem **265**(2): 1010-5.
- Slovak, M. L., K. J. Kopecky, et al. (2000). "Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study." Blood **96**(13): 4075-83.
- Stephenson, J., B. Czepulkowski, et al. (1996). "Deletion of the acetylcholinesterase locus at 7q22 associated with myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myeloid leukaemia." Leukemia Res **20**: 235-41
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature **403**(6765): 41-5.
- Strout, M. P., G. Marcucci, et al. (1999). "Core-binding factor (CBF) and MLL-associated primary acute myeloid leukemia: biology and clinical implications." Ann Hematol **78**(6): 251-64.
- Studienprotokoll der kooperativen AML-Studie 96 der Süddeutschen Hämoblastosegruppe (März 2000). "Risikoadaptierte und randomisierte Induktions- und Postremissionstherapie der akuten myeloischen Leukämie (AML) des Erwachsenen."
- Sulzer, M. A., M. P. Leers, et al. (1998). "Reduced E-cadherin expression is associated with increased lymph node metastasis and unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer." Am J Respir Crit Care Med **157**(4 Pt 1): 1319-23.
- Swansbury, G. J., S. D. Lawler, et al. (1994). "Long-term survival in acute myelogenous leukemia: a second follow-up of the Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia." Cancer Genet Cytogenet **73**(1): 1-7.
- Swirsky, D. M., Y. S. Li, et al. (1984). "8;21 translocation in acute granulocytic leukaemia: cytological, cytochemical and clinical features." Br J Haematol **56**(2): 199-213.
- Szyf, M. and N. Detich (2001). "Regulation of the DNA methylation machinery and its role in cellular transformation." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **69**: 47-79.
- Tajima, S., H. Tsuda, et al. (1995). "Isolation and expression of a chicken DNA methyltransferase cDNA." J Biochem (Tokyo) **117**(5): 1050-7.
- Tate, P. H. and A. P. Bird (1993). "Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression." Curr Opin Genet Dev **3**(2): 226-31.
- Tenen, D. G., R. Hromas, et al. (1997). "Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia." Blood **90**(2): 489-519.

- Toyota, M., N. Ahuja, et al. (1999). "CpG island methylator phenotype in colorectal cancer." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8681-6.
- Toyota, M. and J. P. Issa (1999). "CpG island methylator phenotypes in aging and cancer." Semin Cancer Biol **9**(5): 349-57.
- Toyota, M., K. J. Kopecky, et al. (2001). "Methylation profiling in acute myeloid leukemia." Blood **97**(9): 2823-9.
- Turel, K. R. and S. G. Rao (1998). "Expression of the cell adhesion molecule E-cadherin by the human bone marrow stromal cells and its probable role in CD34(+) stem cell adhesion." Cell Biol Int **22**(9-10): 641-8.
- Tycko, B. (2000). "Epigenetic gene silencing in cancer." J Clin Invest **105**(4): 401-7.
- Uchida, T., T. Kinoshita, et al. (1997). "Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes." Blood **90**(4): 1403-9.
- Van den Berghe, H., K. Vermaelen, et al. (1985). "The 5q-anomaly." Cancer Genet Cytogenet **17**(3): 189-255.
- Vertino, P. M., R. W. Yen, et al. (1996). "De novo methylation of CpG island sequences in human fibroblasts overexpressing DNA (cytosine-5-)-methyltransferase." Mol Cell Biol **16**(8): 4555-65.
- Von Hoff, D. D., M. Slavik, et al. (1976). "5-Azacytidine. A new anticancer drug with effectiveness in acute myelogenous leukemia." Ann Intern Med **85**(2): 237-45.
- Wales, M. M., M. A. Biel, et al. (1995). "p53 activates expression of HIC-1, a new candidate tumour suppressor gene on 17p13.3." Nat Med **1**(6): 570-7.
- Wang, Q., T. Stacy, et al. (1996). "The CBFbeta subunit is essential for CBFalpha2 (AML1) function in vivo." Cell **87**(4): 697-708.
- Warrington, J. A., S. K. Bailey, et al. (1992). "A radiation hybrid map of 18 growth factor, growth factor receptor, hormone receptor, or neurotransmitter receptor genes on the distal region of the long arm of chromosome 5." Genomics **13**(3): 803-8.
- Wattel, E., C. Preudhomme, et al. (1994). "p53 mutations are associated with resistance to chemotherapy and short survival in hematologic malignancies." Blood **84**(9): 3148-57.
- Weh, H. J., R. Kuse, et al. (1988). "Prognostic significance of chromosome analysis in de novo acute myeloid leukemia (AML)." Blut **56**(1): 19-26.
- Westbrook, C. A., W. L. Neuman, et al. (1992). "Report of the second international workshop on human chromosome 5 mapping." Cytogenet Cell Genet **61**(4): 225-31.

- Whittaker, J.A. and J.A. Holmes (1998). "Acute Myeloid Leukaemia: Clinical Features and Management." *Leukaemia and related disorders*, 3<sup>rd</sup> editon, Oxford; London; Edinburgh; Malden; Carlton; Paris; Berlin, Tokio, Blackwell Science, S. 165-85.
- Wolffe, A.P. and M.A. Matzke (1999). "Epigenetics: regulation through repression." *Science* **286**: 481-6.
- Yoder, J. A., C. P. Walsh, et al. (1997). "Cytosine methylation and the ecology of intragenomic parasites." *Trends Genet* **13**(8): 335-40.
- Yoder, J. A., R. W. Yen, et al. (1996). "New 5' regions of the murine and human genes for DNA (cytosine-5)- methyltransferase." *J Biol Chem* **271**(49): 31092-7.
- Yoshiura, K., Y. Kanai, et al. (1995). "Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(16): 7416-9.
- Yunis, J. J. (1984). "Recurrent chromosomal defects are found in most patients with acute nonlymphocytic leukemia." *Cancer Genet Cytogenet* **11**(2): 125-37.
- Yunis, J. J., M. Lobell, et al. (1988). "Refined chromosome study helps define prognostic subgroups in most patients with primary myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukaemia." *Br J Haematol* **68**(2): 189-94.
- Zheng, Z., J. Pan, et al. (1999). "Downregulation and abnormal expression of E-cadherin and beta-catenin in nasopharyngeal carcinoma: close association with advanced disease stage and lymph node metastasis." *Hum Pathol* **30**(4): 458-66.
- Zingg, J. M. and P. A. Jones (1997). "Genetic and epigenetic aspects of DNA methylation on genome expression, evolution, mutation and carcinogenesis." *Carcinogenesis* **18**(5): 869-82.



## 7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
abn.	Abnormal
ACHE	Acetylcholinesterase
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
APC	Adenomatous polyposis coli
APL	Akute Promyelocyten Leukämie
APS	Ammoniumpersulfat
ASNS	Asparagine Synthetase Gene
Bas	Basophile
Basos	Basophile
bp	Basenpaar
BRCA	Breast Cancer
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CBF	Core Binding Factor
CH <sub>3</sub>	Methylgruppe
CpG	Cytosin-Phospho-Guanin
CR	Complete Remission
CSF1R	colony stimulating factor 1 receptor
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor
DA	Daunorubicin+Ara-C
DAP-kinase	Death-associated Protein kinase
del	Deletion
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNMT	DNA-Methyltransferase
EDTA	Ethylendiamintetraacetische Säure
EGR1	Early growth response 1 protein

Eos	Eosinophile
EPO	Erythropoietin
ER	Estrogen receptor
et al.	et alii
ETO	Eight Twenty One
FAB	French-American-British
<i>g</i>	Schleuderziffer
G	Guanin
GM-CSF	Granulocyte/ Macrophage Colony Stimulating Factor
GST	Glutathione-S-transferase
H	Histon
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetyltransferase
HIC	Hypermethylated in cancer
IGF	Insulin-like growth factor
inv	Inversion
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
IRF1	Interferon regulatory factor 1
ISCN	International for Human Cytogenetic Nomenclature
kb	Kilobasen
KOH	Kaliumhydroxid
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
LDH	Lactatdehydrogenase
LINE	Long Interspersed Repeat Elements
M	Mol
M	Monosomie
MAC	Mitoxantron+Ara-C
MAMAC	m-AMSA+Ara-C
MAV	Mitoxantron+Ara-C+VP
MBD	Methyl-Bindungsdomäne
MCH	Melanin concentrating hormone
MeCP	Methyl CpG binding protein
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
µm	Mikrometer
ml	Milliliter
mM	Millimol
mm	Millimeter
MPO	Myeloperoxidase
MRC	Medical Research Council
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MSP	Methylspezifische PCR
N	Normal
NaOH	Natriumhydroxid
NK-κB	Nuclear factor kappa B
NTP	Nukleotid-Triphosphat
NSE	Nichtspezifische Esterase
OD	Optische Dichte
O <sup>6</sup> MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanine-DNA-Methyltransferase
P	Priorität
PAA	Polyacrylamid
PB-Puffer	CR-Binding-Puffer
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PLANH1	Plasminogen Activator Inhibitor Type 1
RARβ	Retinoic Acid Receptor β Gene
Rb	Retinoblastom
RbApx	Retinoblastoma-associated px
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RR-Mix	Ready-Reaction-Mix
sek.	Sekundär
SHG	Süddeutsche Hämoblastosegruppe
SINE	Short Interspersed Repeat Elements
T	Thymin

t	Translokation
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TCR	T-cell Antigen Receptor
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinase
TMS	Target of methylation-induced silencing
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
U	Units
UV	Ultraviolett
V	Volt
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -d-Galactopyranosid

## 8 Akademische Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren

Arnold	Aumüller	Bach	Back
Bandmann	Barth	Barth	Basler
Baum	Bertalanffy	Bien	Bolm
Cetin	Christiansen	Cziubayko	Daut
Dobbelstein	Eilers	Engenhardt-Cabillic	Feuser
Fruhstorfer	Gemsa	Gerdes	Geus
Görg	Görg	Gotthardt	Gotzen
Grimm	Griss	Grzesik	Gudermann
Happle	Hamer	Hasilik	Herzum
Hörle	Hoffmann	Hofmann	Joseph
Jungclas	Kaluza	Kern	Kill
Kim-Berger	Klaus	Klenk	Klose
Knake	Koolman	Kraft	Kretschmer
Krieg	Kroh	Kroll	Kuhn
Lammel	Lang	Lange	Lennartz
Lippert	Löffler	Maisch	Mennel
Meyer-Wittstock	Moll	Moosdorf	Müller
Müller	Mutters	Neubauer	Nies
Oertel	Pfeiffer	Prinz	Radsak
Remschmidt	Renz	Richter	Riße <sup>1</sup>
Röhm	Rosenow	Rothmund	Schachtschabel
Schäfer	Schäfer	Schepelmann	Schmidt
Schmidt	Schnabel	Schneider	Schneyer
Schüffel	Schulze	Schwarz	Seitz
Seyberth	Slenczka	Sommer	Steiniger
Sturm	Sundermeyer	Sure	Vogelmeier
Vohland	Voigt	Wagner	Weihe
Werner	Westermann	v. Wichert	Wulf

<sup>1</sup> Institut für Rechtsmedizin Gießen

Meine akademischen Lehrer in Bozen waren die Herren  
Martin und Pycha.

Meine akademischen Lehrer in Würzburg waren die Damen und Herren

Auer	Brandl	Breuning	Claßen
Meesmann	Merz	Müllges	Naumann
Reiners	Reißmann	Rieckmann	Sommer
Stoll	Toyka	Wennesz	

## 9 Danksagung

Für die Unterstützung bei der vorliegenden Arbeit möchte ich danken:

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Marcus Schuermann für die Möglichkeit der Promotion. Ich danke ihm für die Überlassung des Themas, sein stetiges Interesse an dieser Arbeit sowie seine wertvolle Unterstützung während des gesamten praktischen und schriftlichen Teils der Dissertation.

Herrn Univ.-Prof. Dr. A. Neubauer für die zur Verfügungstellung von Chemikalien und Geräten, Vermittlung der AML-Proben sowie die gute Kooperation.

Herrn Dipl. Humanbiologen Michael Kersting für die Betreuung dieser Arbeit und das Erlernen zahlreicher molekularbiologischer Techniken sowie für seine Anregungen und ermutigenden Worte. Seine intensive Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft wusste ich immer zu schätzen. Als Ansprechpartner stand er mir jederzeit mit Ratschlägen und konstruktiver Kritik zur Seite.

Dr. med. G. Ehninger, der freundlicherweise die für die vorliegende Arbeit benötigten 15 AML-Proben zur Verfügung stellte.

Dr. Markus Ritter für seine Hilfe bei der Organisation der eingesetzten Proben und Vorstellung der Arbeit vor der Süddeutschen Hämoblastosegruppe.

Dr. Birgit Alpen für das Erlernen der automatischen Sequenzierung.

Dr. Andreas Burchert für die Hilfe bei der Organisation der Spongiosaproben.

Dr. Mueller aus dem biomathematischen Institut für seine Beratung in statistischen Fragen.

Meinen Eltern für ihre immer wieder aufbauenden und aufheiternden Anrufe. Weiterhin für alle Unterstützungen, die mir erst das Studium in Marburg und später in Würzburg ermöglicht haben. Ihnen sei deshalb auch diese Arbeit gewidmet.

Meiner Mitbewohnerin und langjährigen Freundin Lissy Chelangattucherry für ihr Verständnis, ihre immer wieder neue Motivation und vor allem entgegengebrachte Hilfe, mit der sie mir viel Arbeit in anderen Bereichen abgenommen hat.

Michael Salzig für seine Hilfe bei der Formatierung der Arbeit sowie seine Unterstützung und sein Verständnis.

Meinen Freundinnen und Freunden für ihre Aufmunterungen und Hilfestellungen.

Chuantian Zuo.

## 10 Lebenslauf

### PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Katharina Hölzle  
Geburtsdatum/-ort: 18.11.1977 in Gelsenkirchen  
Wohnort: Falkstr. 97, 60487 Frankfurt  
Tel./Mobil: 069/70797988; 0163/3463595  
E-Mail: k.hoelzle@gmx.de  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig

### AUSBILDUNG:

#### Schule:

1984-1988 Grundsule Pfefferackerstrasse in Gelsenkirchen-Buer  
1988-1997 Städt. Gymnasium Herten  
Abschluss: Abitur/Allgemeine Hochschulreife

#### Studium:

1997-2003 Studium der Humanmedizin an der Philipps-Universität in Marburg  
Physikum 8/1999  
1. Staatsexamen 3/2001  
2. Staatsexamen 3/2003  
- Universitätsklinik Würzburg (Neurologie)  
- Juliusspital Würzburg (Innere Medizin)

2003-2004 Praktisches Jahr an der Julius-Maximilians-Universität  
Würzburg  
- Regionalkrankenaus Bozen, Italien (Chirurgie)  
3. Staatsexamen 5/2004

### STUDIENBEGLEITENDE TÄTIGKEITEN/PRAKTIKA:

7-8/2000 Famulatur in Internistischer Praxis, Gladbeck

9-10/2000 Famulatur in der Royal Infirmary Glasgow, Chirurgie

7-9/2001 Famulatur im Mount Sinai Hospital New York City,  
Infektiologie, Nephrologie, Pneumologie

1999-2001 Experimentelle Arbeit zur Dissertation am Medizinischen  
Zentrum für Innere Medizin der Philipps-Universität  
Marburg. „Hypermethylierung von E-Cadherin und HIC-  
1.“

### SPRACHKENNTNISSE:

Englisch (9 Jahre)  
Latein (7 Jahre)  
Französisch (2 Jahre)

### BERUF:

Seit 7/2004 Assistenzärztin der II. Medizinischen Klinik im GPR-Klinikum  
Rüsselheim (akademisches Lehrkrankenhaus der  
Universitätsklinik Mainz)



## 11 Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

### **Hypermethylierung von E-Cadherin und HIC-1 bei zwei prognostisch verschiedenen AML-Subgruppen**

im Medizinischen Zentrum für Innere Medizin unter Leitung von Prof. Dr. A. Neubauer mit Unterstützung durch Prof. Dr. Marcus Schuermann ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Vorliegende Arbeit wird in den folgenden Publikationsorganen veröffentlicht:

K. Hölzle, M. Kersting et al. (2001). "Methylation pattern of the E-Cadherin promotor in two different subgroups of acute myeloid leukaemia (AML)." International Journal for Cancer Research and Treatment. Sonderheft 6, **24**: 195; Abstract 752.

M. Schuermann, K. Hölzle et al. (2001). "Methylation pattern of the E-Cadherin promotor in two different subgroups of acute myeloid leukaemia (AML)." 6<sup>th</sup> meeting of the European Hematology Association in Frankfurt am Main, Abstract 394.

Frankfurt, den 11.02.2005